

Aus dem Universitätsklinikum Münster  
Klinik u. Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie  
der Wilhelms-Universität Münster  
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. Dr. Dr. h.c. Joos)

TRANSMISSIONSELEKTRONENMIKROSKOPISCHE  
DARSTELLUNG VON AMELOGENIN IM MINERALISIERENDEN  
SCHMELZ DES RATTENFRONTZAHNES

INAUGURAL - DISSERTATION  
zur Erlangung des doctor medicinae dentium

der Medizinischen Fakultät  
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von  
JAN HEERMANN  
aus Essen

Münster 2004

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

Dekan: Univ.-Prof. Dr. H. Jürgens

1. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. Hans Peter Wiesmann
2. Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. W. Heindel

Tag der mündlichen Prüfung: 30. Juni 2004

Aus dem Universitätsklinikum Münster  
 Klinik u. Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie  
 der Wilhelms-Universität Münster  
 (Direktor: Univ.-Prof. Dr. Dr. Dr. h.c. Joos)

Referent: PD Dr. Hans Peter Wiesmann  
 Koreferent: Uni.-Prof. Dr. W. Heindel

## Zusammenfassung

### TRANSMISSIONSELEKTRONENMIKROSKOPISCHE DARSTELLUNG VON AMELOGENIN IM MINERALISIERENDEN SCHMELZ DES RATTENFRONTZAHNES

**Jan Heermann**

Durch Immunohistochemie von zehn Rattenzähnen konnten signifikante Unterschiede in der Anzahl der Amelogenine in den drei Phasen der Amelogenese gefunden werden:

Schnittebene 1 (Z1) = sekretorische Phase  
 Schnittebene 2 (Z2) = frühe Schmelzreifung  
 Schnittebene 3 (Z3) = fortgeschrittene Schmelzreifung

In den Untersuchungen fanden sich Ansammlungen von Amelogeninen, die als Nanospheren bezeichnet wurden. Als Nanosphere wird eine Ansammlung von mindestens drei Amelogeninen im Abstand von 100nm definiert.

Es wurden 3 unterschiedliche Zählungen über das TEM durchgeführt:

1. Anzahl der Amelogenine pro  $\mu\text{m}^2$  am Tomeschen Fortsatz während der Entwicklung: Die Anzahl nahm von durchschnittlich 16,7 in der sekretorischen Phase über 8,1 in der jungen Schmelzreifung auf 5,4 in der fortgeschrittenen Schmelzreifung kontinuierlich ab.
2. Anzahl der Nanospheren aus Amelogeninen pro  $\mu\text{m}^2$  am Tomeschen Fortsatz während der Entwicklung: Diese nahm von durchschnittlich 2,1 in der sekretorischen Phase über 1,3 in der jungen Schmelzreifung auf 0,7 Nanospheren pro  $\mu\text{m}^2$  in der fortgeschrittenen Schmelzreifung ab.
3. Anzahl der Amelogenine pro Nanosphere am Tomeschen Fortsatz während der Entwicklung: Die Anzahl stieg durchschnittlich von 4,8 in der sekretorischen Phase auf 8,7 in der jungen Schmelzreifung und fiel dann auf 3,2 Amelogenine pro Nanosphere in der fortgeschrittenen Schmelzreifung.

Die gefundenen Nanospheren ermöglichen ein geordnetes Längenswachstum der Schmelzkristalle. Durch sie erhalten die Kristalle einen Schutz vor unkontrolliertem Wachstum in die Breite. Erst in der späten Reifungsphase, wenn der Kristall auch in die Breite wächst, finden sich deutlich weniger Nanospheren.

Tag der mündlichen Prüfung: 30. Juni 2004

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b><i>Einleitung</i></b> .....	<b>4</b>
	<b>1.1. Grundlagen</b> .....	<b>4</b>
	1.1.1. Der Rattenfrontzahn.....	4
	1.1.2. Amelogenese.....	5
	1.1.3. Ameloblastendifferenzierung.....	6
	1.1.4. Bildung der Schmelzmatrix .....	7
	1.1.5. Die Schmelzproteine: Amelogenin, Enamelin, Ameloblastin, Tuftelin und Tuft Protein.....	8
	1.1.6. Mineralisation und Reifung .....	15
	<b>1.2. Problemstellung</b> .....	<b>17</b>
<b>2</b>	<b><i>Materialien und Methodik</i></b> .....	<b>18</b>
	<b>2.1. Materialien</b> .....	<b>18</b>
	2.1.1. Probengewinnung .....	18
	2.1.2. Präparat und Präparatvorbereitung.....	18
	<b>2.2. Probeneinbettung</b> .....	<b>19</b>
	2.2.1. Vorgehen bei Lowicryl®einbettung .....	19
	2.2.2. Vorgehen bei der Epon®einbettung.....	19
	<b>2.3. Dünnschnitte und Lichtmikroskopie</b> .....	<b>20</b>
	<b>2.4. Immunohistochemie</b> .....	<b>21</b>
	<b>2.5. Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)</b> .....	<b>22</b>
	<b>2.6. Statistische Auswertung</b> .....	<b>22</b>
<b>3</b>	<b><i>Ergebnisse</i></b> .....	<b>23</b>
	<b>3.1. Der Rattenfrontzahn in der Lichtmikroskopie</b> .....	<b>23</b>
	<b>3.3. Statistische Auswertung</b> .....	<b>33</b>
<b>4</b>	<b><i>Diskussion</i></b> .....	<b>37</b>
<b>5</b>	<b><i>Zusammenfassung</i></b> .....	<b>45</b>
<b>6</b>	<b><i>Literaturverzeichnis</i></b> .....	<b>47</b>
<b>7</b>	<b><i>Danksagung</i></b> .....	<b>57</b>
<b>8</b>	<b><i>Lebenslauf</i></b> .....	<b>58</b>

# 1 Einleitung

---

## 1.1. Grundlagen

### 1.1.1. Der Rattenfrontzahn

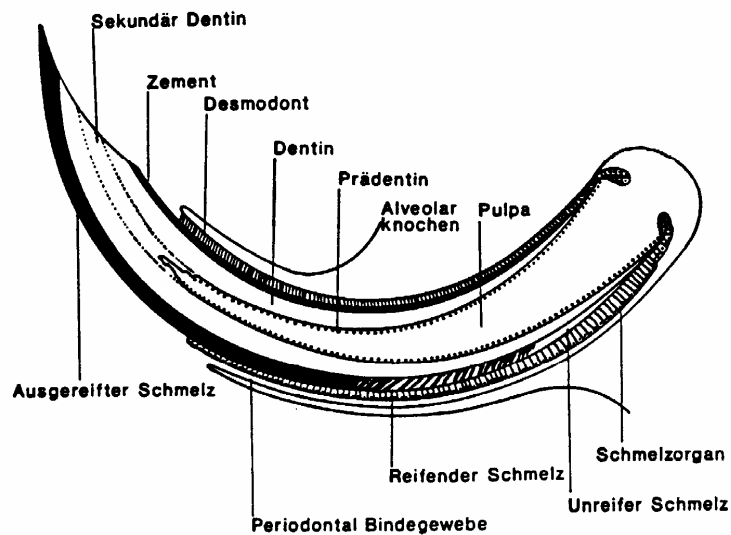


Abbildung 1: Schematische Darstellung des Rattenfrontzahns. Zeichnung in Anlehnung an Osborn (1981)

Der Frontzahn der Ratte wird beim Nagen ständig neu geschärft. Das weiche Dentin geht leichter verloren, der harte Schmelz dagegen nutzt sich langsamer ab. Sein kontinuierliches Wachstum macht den Rattenzahn zum idealen Untersuchungsgut. Die unterschiedlichen Entwicklungsstufen des Schmelzes können so an einem Zahn untersucht werden. Die schematische Darstellung in Abbildung 1 zeigt den Aufbau des Rattenfrontzahnes. Der Teil, der aus dem Knochen herausragt, stellt den ausgereiften Zahnschmelz mit sekundärem Dentin dar. Der Teil im Knochen ist Region für Schmelz-

und Dentinwachstum. Hier findet sich das Schmelzorgan mit den verschiedenen Reifungsphasen des Schmelzes, der Amelogenese.

### 1.1.2. Amelogenese

Unter den Hartgeweben der Wirbeltiere nimmt der Schmelz eine besondere Rolle ein. Ihn zeichnet ein hoher Mineralanteil (ca. 95 Gew.% bzw. 86 Vol.% beim Menschen (Schroeder 1987)) aus, durch den er seinen hohen Härtegrad erhält. Der Zahnschmelz ist ektodermalen Ursprungs. Alle anderen Hartgewebe stammen vom Mesoderm ab. Dennoch gelten auch bei der Differenzierung dieser Substanz die Grundprinzipien der Hartgewebsbildung (Applebaum 1938, 1943). Gebildet wird er von spezialisierten Zellen, den Ameloblasten, die zunächst eine aus nicht kollagenen Proteinen bestehende organische Matrix synthetisieren (Nanci et al. 1985, Wöltgens et al. 1991, 1995, Sasagawa 1998). Zu diesen Schmelzmatrixproteinen zählt unter anderem das Amelogenin.

Zu Beginn des Reifungsprozesses ist die Matrix noch reich an Wasser und Proteinen, aber relativ arm an Mineralien. Später bilden sich an diesen Proteinen Kristalle. Proteine, Kristalle und die Oberfläche der Tomeschen Fortsätze der Ameloblasten bilden dabei ein charakteristisches Strukturgefüge (Plate et Höhling 1994). Während der Schmelzreifung verliert die Matrix immer mehr an Proteinen (Listgarten 1976).

Die Amelogenese beinhaltet sowohl die Sekretion der organischen Matrix durch die Ameloblasten als auch deren sofortige partielle Mineralisation (Boyde 1965, Frank & Nalbandian 1967, Sasaki et al. 1997). Dabei wird reziprok der größte Teil der primären organischen Matrix wieder abgebaut (Listgarten 1976).

### 1.1.3. Ameloblastendifferenzierung

Die Ameloblasten differenzieren sich aus den Zellen des inneren Schmelzepithels, ausgehend von der Region der Höckerspitzen, bis alle Zellen des Schmelzepithels in Ameloblasten umgewandelt worden sind (Robinson et al. 1981, Deutsch & Peer 1982, Fincham et al. 1983, Casasco 1996).

Vor dieser Differenzierung, entwickelt sich das Dentin; daher erfolgt die Amelogenese immer mit einer zeitlichen Verzögerung zur Dentinogenese. Die Abhängigkeit der Amelogenese von der Anwesenheit des Manteldentins ist ein Beispiel für die reziproke Induktion, da zuvor Zellen des inneren Schmelzepithels notwendig waren, um die Odontoblasten zur Dentinbildung anzuregen. Das Produkt der Odontoblasten, das Dentin, ist wiederum Initiator für eine weitere Differenzierung des inneren Schmelzepithels (TenCate 1994, Kagayama et al. 1997, Zeichner- David et al. 1997).

Odontoblasten bewegen sich im Verlauf der Dentinogenese in zentraler Richtung, die Ameloblasten wandern während der Schmelzbildung nach peripher und lassen dabei die neugebildete Schmelzschicht zurück, welche das Dentin wie eine Kappe überzieht. Zu Beginn der Amelogenese befindet sich der Zahn im Kronenstadium (Nanci & Warshawsky 1984).

Die Blutgefäße befinden sich außerhalb des Schmelzorgans im Zahnfollikel (Pannese 1961). Die Zellen des inneren Schmelzepithels verbrauchen für die initiale Schmelzbildung Glykogen bis es schließlich zum Kollaps des Schmelzorgans kommt (Matthiessen 1967).

Mit dem Verlust des trennenden, sternförmigen Retikulums nähern sich die Ameloblasten an die follikulären Blutgefäße an. Das Stratum intermedium hat einen unmittelbaren Kontakt zur Ameloblastenschicht



und ist funktionell mit der Amelogenese assoziiert. Seine Zellen zeigen im Gegensatz zu den Ameloblasten eine starke alkalische Phosphataseaktivität (Pannese 1962).

#### 1.1.4. Bildung der Schmelzmatrix

Die Amelogenese beginnt mit der Synthese der extrazellulären organischen Schmelzmatrix. Bei allen anderen Hartgeweben ist der Begriff der organischen Matrix reserviert für die rein organische Komponente. Während der Amelogenese bezeichnet der Begriff "Matrix" nicht nur die organische, sondern auch die anorganische Komponente der zuerst gebildeten Zahnschmelzpartien. Diese Terminologie kann zu Verwirrungen führen. Aus diesem Grund bezeichnen verschiedene Autoren den zuerst gebildeten und erst teilweise mineralisierten Schmelz auch als "developing enamel" (wörtlich: sich entwickelnder Schmelz). Die organische Komponente des "developing enamel" bilden die sogenannten Schmelzproteine (TenCate 1994). Sie werden vorwiegend von den Ameloblasten sezerniert und ordnen sich in einem Muster an, das bis heute noch nicht komplett geklärt werden konnte. Neben den Proteinen finden sich Calcium und Phosphationen. Auch sie ordnen sich mit Hilfe der Proteine zu einem bestimmten Muster zusammen, was letztendlich zur Kristallbildung führt. Zu den am besten untersuchten Proteinen der extrazellulären Matrix zählt das Amelogenin. Daneben wurden noch weitere sogenannte „Non-Amelogenine“ wie Enamelin, Ameloblastin, Tuftelin und Tuft Protein in der Literatur beschrieben.

### 1.1.5. Die Schmelzproteine: Amelogenin, Enamelin, Ameloblastin, Tuftelin und Tuft Protein

Mit der Struktur und Funktion der Schmelzproteine befassen sich verschiedene Arbeitsgruppen bereits seit längerer Zeit, ohne dass es bis heute gelungen ist, alle Details ausreichend zu beleuchten. Bereits vor über 35 Jahren wurde der Begriff des "Amelogenins" durch Eastoe (1965) eingeführt. Dabei handelt es sich um ein hydrophobes Protein mit einem Molekulargewicht von 22-30 kDa. Vorherrschende Aminosäuren sind Prolin, Histidin und Glutamin. Heute ist bekannt, dass Amelogenin in der Sekretionsphase ca. 90 % der Schmelzproteine ausmacht (Robinson et al. 1978, Deutsch & Peer 1982, Fincham et al. 1982, 1983).

Der Code für das Amelogenin des Menschen ist auf den Genen des X- und des Y-Chromosoms lokalisiert (Lau et al 1989, Chapman et al. 1991, Salido et al. 1992, Chen et al. 1998, Gibson et al. 1992, 1998, Gibson 1999). Die Primärstruktur des Amelogenins wurde inzwischen für insgesamt fünf Säugetierspezies (Kuh, Schwein, Ratte, Maus, Mensch) gefunden und weist hier auch erhebliche Übereinstimmungen auf (Fincham et al. 1983, Karg et al. 1997). Untersuchungen eines bovinen Amelogenins mit niedrigerem Molekulargewicht hatten gezeigt, dass ein aus 45 Aminosäuren bestehendes Tyrosin-reiches Polypeptid (TRAP) das Amino-terminale Fragment des eigentlichen Amelogenins (aus weiteren 197 Aminosäuren aufgebaut) bildet (Fincham et al. 1983, Deutsch & Alayoff 1987a, Shimokawa et al. 1987, Fincham et al. 1989b, Moradian-Oldak et al. 1994b, Gibson et al. 1995, 1996, Fong et al. 1996). Dieser Sequenz aus 45 Aminosäuren (TRAP = tyrosine rich amelogenin protein) scheint offenbar eine besondere funktionelle Bedeutung zuzukommen.

Diese Ergebnisse waren leicht in Einklang zu bringen mit der bereits zu einem früheren Zeitpunkt gefundenen Proteinaseaktivität in der sich entwickelnden Schmelzmatrix. Man vermutete, dass ein definiertes Amelogenin nach der Sekretion in den Extrazellularraum durch proteolytische Veränderungen in kleinere Fragmente gespalten wird, die

dann wiederum von postsekretorischen Ameloblasten rückresorbiert werden sollten (Fincham et al. 1991). Obwohl manche Arbeitsgruppen davon ausgingen, dass in der extrazellulären Matrix verschiedene Amelogeninkomponenten nebeneinander nachweisbar sind (Seyer & Glimcher 1977, Blumen et al. 1991, Bronckers et al 1993), wurde allgemein die Hypothese akzeptiert, dass sämtliche mit Hilfe der Gelelektrophorese oder mit Hilfe chromatographischer Analysen nachweisbaren Amelogenin-Polypeptide durch proteolytische Spaltung aus einem einzigen „Muttermolekül“ hervorgegangen sind (Fincham et al. 1990, 1991, 1995, 1996, 1997, Ryu et al. 1996, Moradian-Oldak et al. 1996b).

Heute geht man davon aus, dass dieser Komplex von Amelogeninen durch eine Kombination multipler Amelogeninexpressionen entsteht (Salido et al. 1992, Li & DenBesten 1995), die wiederum im Zuge ihrer Entwicklung moduliert werden können. Dabei finden diskrete postsekretorische Veränderungen der sezernierten Amelogenine durch die Wirkung von Proteinase in der extrazellulären Matrix statt (Overall & Limback 1988). Diese Proteinase sind ebenfalls sezernierte Produkte der Ameloblasten (Karg et al. 1997). Als Mutteramelogenin bezeichnet man das Protein mit einem Molekulargewicht von 25 kDa (Fincham et al. 1991). Diese Proteinfamilie scheint beim Wachstum und der Organisation der Kristalle eine wichtige Rolle zu spielen.

Damit das Kristallwachstum nicht zum Stillstand kommt, müssen bestimmte Proteine offenbar wieder entfernt werden (Glimcher et al. 1977, Robinson et al. 1996). Der durch das Kristallwachstum ausgeübte Druck führt scheinbar dazu, dass das Amelogenin aus den Kristallzwischenräumen zurück zu den Ameloblasten verdrängt wird (Glimcher et al. 1977). Ein Teil des Amelogenins wird zwischen den schneller wachsenden Kristallen eingefangen und dort durch die Wirkung proteolytischer Enzyme zu Molekülen mit geringerem Molekulargewicht abgebaut (DenBesten et al. 1989, Barlett et al. 1996). Diese Protein-

Spaltprodukte mit niedrigerem Molekulargewicht werden dann aus den Zwischenräumen der wachsenden Kristallite entfernt, bis schließlich nur noch TRAP zurückbleibt, welches eine Bindung mit den Hydroxyl-Apatitkristallen eingeht.

Das zweite wichtige Schmelzprotein ist Enamelin. Das Molekulargewicht der Enameline liegt bei 70 kDa und weniger (Termine et al., 1980a, Belcourt et al. 1982, Doi et al. 1984, Deutsch et al. 1989, 1994, 1995a, 1995b, 1997, 1998, Fukae et al. 1996). In den 90er Jahren konnten darüber hinaus im Schmelz von Schwein und Rind noch höhermolekulare Enameline identifiziert werden (Tanabe et al., 1990, Fukae et al., 1993); Molekulargewicht im Zahn des Schweins bis zu 186 kDa (Hu et al., 1997c). In früheren Studien (Mechanic 1971) wurde der Begriff „Enamelin“ allgemein für alle Matrixproteine verwendet, die bei der Schmelzentwicklung beteiligt waren. Dies wurde jedoch nicht beibehalten (Eastoe 1979). Der Begriff wird seither für das spezifische Schmelzprotein Enamelin genutzt, das offensichtlich als größtes Protein an der Schmelzentwicklung beteiligt ist. Derzeit sind die Aminosäuresequenzen vom Schwein (Hu et al. 1997), von der Maus (Hu et al. 1998a) und vom Menschen (Hu et al. 1998b) bekannt. Vorherrschende Aminosäuren sind Glutaminsäure, Asparaginsäure und Serin; aus diesem Grund besitzt das Enamelin insgesamt saure Eigenschaften (Deutsch et al. 1991, Bashir et al. 1997). Auch bei den Enamelinen ist, ähnlich wie bei den Amelogeninen, davon auszugehen, dass es sich zumindest bei einigen der leichteren Moleküle um Abbauprodukte von Enamelinen mit höherem Molekulargewicht handelt (Menanteau et al. 1988, Tanabe et al. 1994). Andere Erklärungen für die Tatsache, dass in der extrazellulären Schmelzmatrix verschiedene Enameline nachgewiesen werden konnten, sind ähnlich dem der Amelogenine:

- alternatives mRNA-Splicing

- Existenz verschiedener Gene, die unterschiedliche Proteine codieren.

Untersuchungen zur Biosynthese von Schmelzmatrixproteinen *in vivo* und *in vitro* konnten die Existenz von 4 verschiedenen Enamelin-Spezies (70, 45, 30, 28 kDa) beim Rind und von 2 verschiedenen Enamelinarten bei der Maus belegen (Ogata et al. 1988, Zeichner-David et al. 1988, Couwenhoven et al. 1989, 1993, 1994).

Translationsstudien, die mit mRNA von Mensch, Maus, Ratte, Rind, Schwein und Kaninchen arbeiteten, wiesen die Existenz von einem bzw. zwei Enamelin-Proteinen nach (Farge et al. 1987, Zeichner-David et al. 1996).

Zweidimensionale Untersuchungen zeigen, dass es sich bei den Enamelinen um saure Proteine mit einem isoelektrischen Punkt von 5.5 und darunter handelt. Dies ließ sich bereits infolge der Aminosäurezusammensetzung der Enameline vermuten (Slavkin et al. 1988, Deutsch et al. 1995b).

Bis Anfang der 90er Jahre existierten praktisch keine verwertbaren Informationen zur Primärstruktur der Enameline. Es konnte weder eine für Enamelin typische Aminosäuresequenz noch eine entsprechende Gencodierung identifiziert werden. Dann gelang es der Arbeitsgruppe um Deutsch (Deutsch et al. 1989, 1991, 1994) ein neues saures Schmelzprotein zu klonen, zu sequenzieren und zu charakterisieren. Dieses Protein wurde von der Arbeitsgruppe um Deutsch als "Tuftelin" bezeichnet, wobei es sich eindeutig um ein Protein aus der Familie der Enameline handelte (Deutsch et al. 1995b). Struktur und Lokalisation dieses Proteins wurden über die Analyse der Aminosäuresequenz, mit Hilfe von ELISA Technik, Western blot, indirekter Immunohistochemie und hochauflösender Protein-A-Gold Immunozytochemie beschrieben. Das vor allem an Asparagin- und Glutaminsäure reiche Schmelzprotein enthält insgesamt 389 Aminosäuren und besitzt ein berechnetes Molekulargewicht von 43.814. Durch posttranslationelle Modifikationen

(z.B. Glykosylierungen) des ursprünglichen Tuftelins lässt sich das aktuelle Molekulargewicht noch erhöhen. Damit fügt sich das Molekulargewicht des "Tuftelins" in den für Enameline beschriebenen Bereich ein (Termine et al. 1980a, Ogata et al. 1988, Deutsch et al. 1991). Dass Enameline teilweise glykosyliert sind, konnte bereits von Kogaya & Furuhashi (1988), Kogaya (1989) und Chardin et al. (1990) gezeigt werden, es bestätigt ebenfalls die Zugehörigkeit des von Deutsch et al. (1995a) dargestellten Tuftelins in die Gruppe der Enameline.

Die Verteilung von Tuftelin im Zahnschmelz scheint nicht homogen zu sein. Offenbar ist die Konzentration dieses Proteins im Bereich der Schmelz- Zement- Grenze höher (Nanci et al. 1994, 1996, Deutsch et al. 1995a, Ryu et al. 1997a).

Untersuchungen, die sich mit der simultanen ultrastrukturellen Lokalisation von Amelogeninen und Enamelinen befassten, konnten zeigen, dass diese Proteine innerhalb der Zellen meist nicht lokalisiert, sondern in separaten Vesikeln bzw. sekretorischen Granula auftreten (Nanci et al 1984).

Da Tufteline verschiedener Spezies (Rind, Mensch, Haifisch) bei immunohistochemischen Untersuchungen bzw. im Western Blot eine Kreuzreaktivität aufweisen (Deutsch et al. 1989, 1991), scheint hier eine enge strukturelle Verwandtschaft zwischen den Enamelinen der genannten Spezies vorzuliegen. In Enamelin-reichen Fraktionen aus dem sich entwickelnden Schmelz des Rindes konnten mit Hilfe von synthetischen Antiseren gegen Tuftelin Enameline mit den Molekulargewichten 28 kDa, 48 kDa, 58 kDa und 66 kDa gefunden werden (Deutsch et al. 1991). Zu ähnlichen Resultaten kamen Deutsch und Mitarbeiter (1995b) bei der Analyse von Zahnschmelz der Ratte bzw. des Hasen.

Verschiedene Untersuchungen haben den Verdacht nahegelegt, dass die Enameline hochgradig phosphoryliert sein könnten (Termine et al. 1980a, 1980b, Uchida et al. 1991a).

Die Relevanz der phosphorylierten Molekülabschnitte für die initiale Mineralisation liegt primär in deren Fähigkeit, mit Calciumionen des Kristallgitters spezifische Chelatkomplexe zu bilden (Stratmann et al. 1991, Sydney-Zax et al. 1991, Deutsch et al. 1995b, Borke et al. 1995, MacDougall et al. 1998).

Aus den Untersuchungen kann die Hypothese abgeleitet werden, dass auch die Enameline eine spezifische Rolle im Rahmen des Kristallwachstums und womöglich auch der Kernbildung spielen. Die gefundene Häufung an der Schmelz-Dentin-Grenze lässt dies durchaus vermuten. Allerdings bleibt die korrekte Aminosäuresequenz von einigen Autoren umstritten und damit die berechtigte Existenz neben den Enamelinen (Bashir et al. 1998).

Die Frage nach der genauen Funktion der Enameline, die innerhalb der Schmelzmatrix die Proteine mit höherem Molekulargewicht darstellen, sogenannte Non-Amelogenine, ist noch nicht endgültig geklärt. Verschiedene Autoren vermuten, dass es sich bei den Enamelinen um eine Aggregation von Abbauprodukten des Amelogenins durch proteolytische Enzyme aus den Ameloblasten und Serumalbumin, welches in den sich entwickelnden Schmelz eingedrungen ist, handelt. Auf der anderen Seite gibt es auch Hinweise dafür, dass Enameline zuerst sezerniert werden und dann an die erste hypermineralisierte Schmelzschicht, die sich auf der Dentinoberfläche ablagert, binden bzw. die Mineralkeimbildung induzieren (Fincham et al. 1982, 1983, Takano et al. 1992, 1996). So findet sich das saure Protein Enamelin besonders häufig in der Phase der primären Mineralisation im engen Kontakt an der Schmelz-Dentin-Grenze noch lange vor der Sekretion von Amelogenin. Auf Grund der sauren Eigenschaft wird vermutet, dass Enamelin für die initiale Kristallisierung in der Matrix verantwortlich ist (Termine et al. 1980a). In schmelzmineralisierten Phasen waren auch immer Enameline zu finden, nicht aber zwingend Amelogenine. Diekwisch et al. (1993) schlussfolgerten, dass die sezernierten Amelogenine die „Orientierung und

Dimension (Länge und Breite)“ der Kristalle während der Zahnentwicklung kontrollieren.

Es wurde auch eine Theorie entwickelt, die davon ausgeht, dass das Amelogenin mit zunehmender Mineralisierung der Schmelzmatrix selektiv entfernt wird, während das Enamelin infolge seiner relativ festen Bindung an die mineralischen Bestandteile zurückbleibt (Nanci et al. 1987a, 1987b).

Unabhängig davon, welche der hier nur kurz umrissenen Theorien zutrifft, muss auf jeden Fall unterstrichen werden, dass im Gegensatz zu anderen Hartgewebsproteinen, in denen die einmal gebildete Matrix sich nicht mehr verändert, die Schmelzproteine relativ labil sind und während der Amelogenese sowohl quantitative als auch qualitative Veränderungen erfahren.

Zu den Non-Amelogeninen findet sich in der Literatur auch das Protein Ameloblastin, welches Cerny et al. (1996) auch als „Amelin“ bezeichnet. Es unterscheidet sich in seiner Aminosäuresequenz von Amelogenin und Enamelin (Fukae und Tanabe 1987b) und lässt ein eigenständiges Protein vermuten. Durch immunohistochemische Untersuchungen zeigt sich, dass das Protein in allen Schichten der Schmelzbildung, außer an der Oberfläche des Schmelzes ca. 30 µm unterhalb der Ameloblasten, zu finden ist. Die Anordnung des Proteins innerhalb der Schmelzmatrix gleicht einer Bienenwabenstruktur (Uchida et al. 1991a; Fukae et al. 1993). Das Molekulargewicht des Ameloblastins wird mit 13-17 kDa beschrieben und ist damit relativ gering.

Neben Tuftelin wird in der Literatur auch ein „Tuft Protein“ beschrieben. Ursprünglich entdeckte Osborn (1969) sogenannte Schmelz“tufts“ (Schmelzbüschel), die er nach kompletter Demineralisation als „unlösliches proteinähnliches Material“ an der Schmelz-Dentin-Grenze charakterisierte. Dieses Protein macht ca. 0,01 – 0,06 Gew% des reifen



Schmelzes aus. Durch die Analyse seiner Aminosäuresequenz konnte Robinson et al. (1998) zeigen, dass teilweise gleiche Sequenzen von Ameloblastin vorhanden sind.

Derzeit sind die Beziehungen zwischen dem schwer löslichen Tuft Protein und anderen Non-Amelogeninen wie Tuftelin, Ameloblastin und Enamelin unklar.

#### 1.1.6. Mineralisation und Reifung

Auch der Prozess der Mineralisation der Matrix unterscheidet sich bei der Amelogenese erheblich von der anderer Körperhartgewebe. Unmittelbar nach der Sekretion der Schmelzproteine durch die Ameloblasten beginnt bereits der Mineralisationsprozess (Deporter 1977, Arneloot & Coomans 1987, Deutsch et al. 1987c, 1989, Sasaki et al. 1987, Bawden 1989, Scott & Symons 1991). Es existiert kein Zwischenstadium, welches z.B. der Prädentin- oder der Osteoidbildung entsprechen würde, also keine Schicht einer organischen Matrix.

Eine Theorie besagt, dass Apatitkristalle im bereits ausmineralisierten Dentin quasi als Kristallisationszentren für die Mineralisation der Schmelzmatrixproteine dienen (Engfeldt & Hammarlund-Essler 1956, Reith 1970, Weidmann 1971, Weinstock & Leblond 1971, 1972). Diese Theorie könnte auch erklären, dass während der Amelogenese keine Matrixvesikel nachweisbar sind. Das Kristallwachstum erfolgt von diesem Zeitpunkt an in sehr hoher Geschwindigkeit und führt zu einer ca. 25-30%igen Mineralisation der Matrix (Allan 1967, Angmar-Mansson 1970). Diese Phase des Mineralisationsprozesses soll sich auch von anderen Körperhartgeweben insofern unterscheiden, als die mineralischen Bestandteile nicht in die Matrix inkorporiert werden (wie z.B. beim Kollagen), sondern diese ersetzen (TenCate 1994).

Nach der zunächst partiellen Mineralisation der Schmelzmatrix, in deren Verlauf der Zahnschmelz bereits seine endgültige Form erreicht hat, beginnt der weitere Prozess der sogenannten Schmelzreifung. Dieser beinhaltet eine kontinuierliche Zunahme mineralischer Bestandteile bei gleichzeitigem Abbau und Abtransport von Proteinkomponenten, bis schließlich die definitive Schmelzkonsistenz mit einem Mineralisationsgrad von nahezu 96 % erreicht ist (Suga 1982, Robinson et al. 1990, 1995, Akita et al. 1992).

Die Resorption organischen Materials erfolgt in erster Linie durch die distal aufgefächerten Ameloblasten (Reith & Cotty 1967, Kallenbach 1977, Sasaki 1984 a, 1984 b, Inage et al. 1990, 1991, Benson et al. 1998).

## **1.2. Problemstellung**

Vor über dreißig Jahren wurde der Begriff Amelogenin von Eastoe in die Literatur eingeführt. Seither liegen Untersuchungen vor, die sich u.a. mit der chemischen Zusammensetzung, den physikalischen Eigenschaften und der Struktur dieses Proteins beschäftigten. Es erscheint sicher, dass dieses Protein einen Großteil der Schmelzmatrix ausmacht. Man weiß inzwischen auch, dass das Amelogenin von den Ameloblasten in die Schmelzmatrix sezerniert wird und verschiedene Spaltprodukte des Proteins existieren. Dennoch ist auch heute die Funktion des Amelogenins im Zahnschmelz nicht überzeugend geklärt. Verschiedene teilweise sehr unterschiedliche Funktionen wie Kernbildung oder Kontrolle des Kristallwachstums werden diskutiert. Weitgehend unbekannt ist auch die genaue Lokalisation und Anordnung des Amelogenins in der Schmelzmatrix.

Ziel dieser Arbeit ist es daher, herauszufinden wo das Amelogenin in der Schmelzmatrix gebunden ist und sein Auftreten in verschiedenen Phasen der Schmelzentwicklung zu vergleichen. Mögliche Rückschlüsse hinsichtlich seiner Bedeutung für den Schmelzmineralisationsprozess sollten gezogen werden.

## **2 Materialien und Methodik**

---

### **2.1. Materialien**

#### 2.1.1. Probengewinnung

Als Untersuchungsgut dienen 20 obere und untere Inzisivi sechs Wochen alter Wistarratten (43 Tage), die alle aus einem Wurf stammen. Direkt nach Tötung durch Äther werden die Inzisivi der Ratten inkl. Schmelzorgan freipräpariert und die unverletzten Präparate fixiert.

#### 2.1.2. Präparat und Präparatvorbereitung

Von den insgesamt 20 Zähnen werden 10 Inzisivi in frisch angesetzter 4%-iger Paraformaldehydlösung und 10 Inzisivi in 3,5%-iger Glutaraldehydlösung für 5 Stunden bei 4°C fixiert. Die in Glutaraldehyd fixierten Proben werden danach eine Stunde mit einprozentigem Osmiumtetroxid ( $O_8 O_4$ ) in 0,1M PBS nachfixiert. Alle Proben werden durch 3x30 min. Spülen in 0,1M PBS vom überschüssigen Fixiermittel gereinigt

5 in Paraformaldehydlösung und 7 in Glutaraldehydlösung fixierte Zähne werden in 20% EDTA (Boehringer Ingelheim) + 0,2% Paraformaldehyd insgesamt 3 Wochen lang entkalkt. Alle in Paraformaldehyd fixierten Proben werden für die Immunhistologie in Lowicryl® K4M (Polysciences, Inc. Warrington) eingebettet, und alle in Glutaraldehydlösung fixierten Proben werden in Epon® (Meca Laboratories, Montreal, QC) für Lichtmikroskopie und Elektronenmikroskopie eingebettet.

## **2.2. Probeneinbettung**

### **2.2.1. Vorgehen bei Lowicryl®einbettung**

Nach dem oben beschriebenen Spülprozess in 0,1M PBS werden die Proben in einer aufsteigenden Alkoholreihe mit je 60 min. in 30%-igem, 50%-igem, 70% -igem, 95% -igem und 100 % -igem Alkohol bei 6 Grad Celsius entwässert

Nun folgt die Lowicryl®substitution für je 60 min. bei minus 25 Grad Celsius zunächst im Verhältnis Lowycryl® – Alkohol 1:1, dann 2:1 und schließlich in reinem Lowicryl®. Zuletzt werden die Proben für 48 Stunden in reinem Lowicryl® bei minus 40 Grad Celsius unter UV-Licht polymerisiert.

### **2.2.2. Vorgehen bei der Epon®einbettung**

Auch hier werden die Proben zunächst in der Alkoholkaskade entwässert. Hier werden die Zähne bei 21 Grad jeweils 3 \* 30 min. lang in zunächst 50% -igem, dann 70% -igem, 80% -igem, 95% -igem und zuletzt 100%-igem Alkohol entwässert. Danach werden die Proben zunächst für zwei Stunden in Propylenoxid und dann für 12 Stunden in eine Propylen-Epon® Mischung im Verhältnis von 1:1 überführt. Jetzt werden die Proben einmal in reinem Epon® für 24 Stunden bei 4 Grad, danach ein zweites Mal für 6 Stunden zunächst bei 21 Grad und schließlich für 24 Stunden bei 60 Grad eingebettet, wobei das Epon® aushärtet.

### 2.3. Dünnschnitte und Lichtmikroskopie

Von den Rattenzähnen werden drei Schnittebenen, die folgendermaßen definiert sind, gewonnen. Nach Halbierung des Rattenzahnes wird der proximale Teil, jener mit dem Schmelzorgan, zur Untersuchung herangezogen. Diese Hälfte wird nochmals in der Mitte halbiert und man erhält die drei Bereiche, die zu untersuchen sind (siehe Abbildung 2). Dabei entspricht die 1. Schnittebene der Sekretions-, die 2. der frühen Mineralisations- und die 3. der späten Mineralisationsphase.

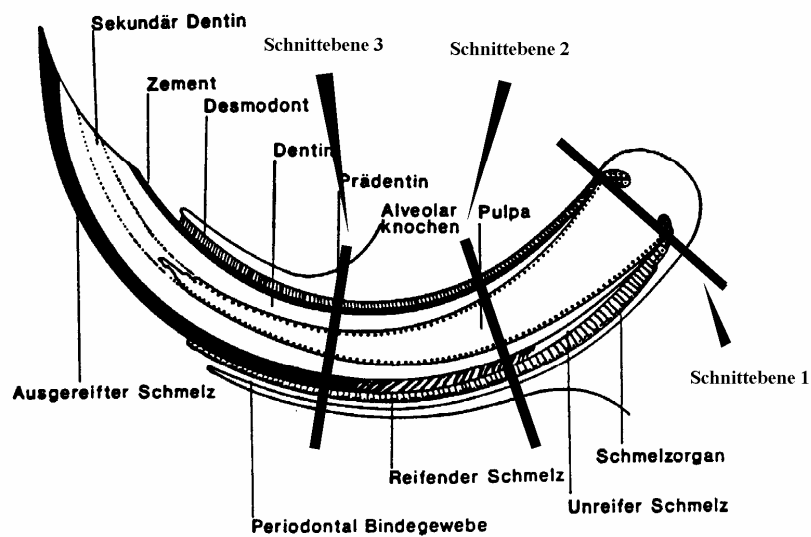


Abbildung 2: Schematische Darstellung der drei Schnittebenen am Rattenfrontzahn. Zeichnung in Anlehnung an Osborn (1981)

Von den drei Schnittebenen werden 0,5 µm dünne Schnitte mit einem Glasmesser (Mikrotom) gewonnen. Nach Färbung mit Toluidinblau kann

mit Hilfe des Lichtmikroskopes festgestellt werden, welche Entwicklungsphasen der Schmelzreifung vorliegen. Dabei werden die Schnittebenen in Z1, Z2 und Z3 unterteilt, wobei Z1 der Sekretionsphase, Z2 der frühen Reifungsphase und Z3 der späten Reifungsphase entspricht.

#### **2.4. Immunohistochemie**

Zunächst müssen 0,1µm dünne Scheiben mit dem Diamantmesser geschnitten und auf Nickelgitter befestigt werden. Als Antikörper wird ein „rabbit anti-bovine amelogenin“ verwendet, der ursprünglich von John Termine vorbereitet wurde. Bronckers et al. (1995, 1997) nutzten zuvor diesen Antikörper in ihren Untersuchungen. Der Antikörper wird folgendermaßen appliziert:

Für die elektronenmikroskopische Analyse werden die Proben zunächst auf den Nickelgittern in BSA (5%) für 30 Minuten rehydriert. Dann erfolgt die Eintauchung in den primären Antikörper „rabbit anti-bovine amelogenin“ 1:50 verdünnt in PBS für 2 Stunden. Nach dreifacher Spülung mit PBS (3x 10 Minuten) werden die Proben mit dem zweiten Antikörper GOAT ANTI-RABBIT IgG (Transduction Laboratories, Lexington) 1:5 verdünnt in PBS für eine Stunde kontaminiert. Dieser Antikörper ist mit 20nm großen Goldpartikeln konjugiert. Abschließend werden die Proben 2x in PBS und 1x in destilliertem Wasser für jeweils 10 Minuten gewaschen.

Die Negativ-Kontrolle erfolgt mit gleichem Protokoll, wobei das Eintauchen in den primären Antikörper Anti-Amelogenin ausbleibt.

Die Proben werden nach der Trocknung für die Elektronenmikroskopie mit Uranylacetat und Bleicitrat kontrastiert.

## **2.5. Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)**

Als Elektronenmikroskop dient ein CM10 von Philips mit 60 kV Beschleunigungsspannung. Fünf Vergrößerungsstufen in den folgenden Größen werden genutzt: 650-fache, 1950-fache, 6300-fache, 10500-fache und 15500-fache. Mit einer integrierten Kamera können die gefundenen Bereiche dokumentiert werden.

## **2.6. Statistische Auswertung**

Die in dieser Arbeit angegebenen Werte sind Mittelwerte  $\pm$  der Standardabweichung vom Mittelwert. Die Daten der verschiedenen Experimente wurden unter Anwendung des t-Testes miteinander verglichen. Unterschiede mit  $p < 0,05$  wurden als signifikant festgelegt. Dabei wurde das Datenverarbeitungsprogramm Excel 2000 eingesetzt.



### 3 Ergebnisse

---

#### 3.1. Der Rattenfrontzahn in der Lichtmikroskopie

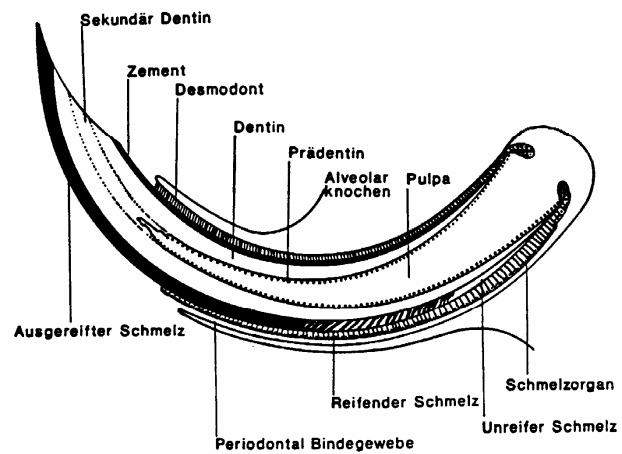


Abbildung 3 : Rattenfrontzahn des Oberkiefers mit Schmelzorgan direkt nach Entnahme im Vergleich zur Skizze zur Orientierung



Abbildung 4: Rattenfrontzahn des Unterkiefers mit Schmelzorgan (SO) direkt nach Entnahme



Abbildung 5: Ausschnitt eines Rattenzahnes mit Darstellung des Schmelzorgans

Die Abbildungen 3-5 zeigen entnommene Rattenfrontzähne unmittelbar nach der Tötung der Tiere. Gut zu erkennen ist das Schmelzorgan, dass sich als weiß-transparente und am stumpfen Ende hochvisköse Substanz

zeigt. Der Frontzahn im Unterkiefer ist deutlich stärker gekrümmt als im Oberkiefer, jedoch der innere Aufbau ist identisch.

Von den in Epon® eingebetteten Zähnen wurden die in den folgenden Abbildungen dargestellten Dünnschnitte hergestellt. Diese wurden mit Toluidinblau gefärbt.

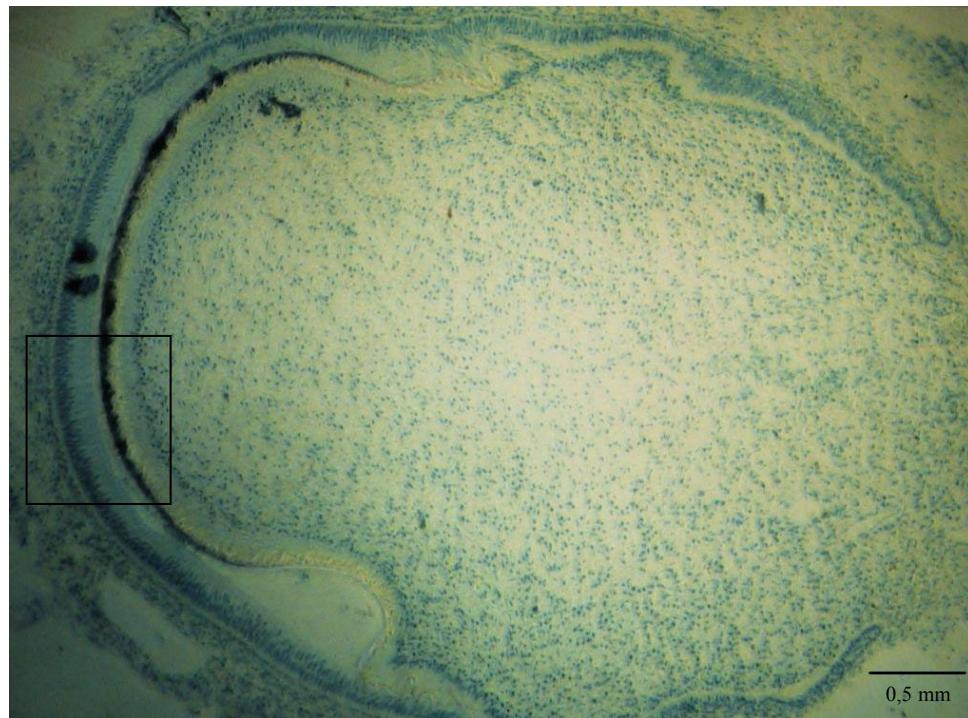


Abbildung 6: Querschnitt durch das Schmelzorgan in der Übersicht. Der Ausschnitt stellt den Bereich da, der in den folgenden Abbildungen in den drei verschiedenen Schnittebenen dargestellt wird.

Abbildungen 7-9 zeigen die drei verschiedenen Schnittebenen des Schmelzorgans (vergleiche Skizze in Abbildung 2 Seite 19). Aus diesen Bereichen stammen die Aufnahmen aus der Elektronenmikroskopie.

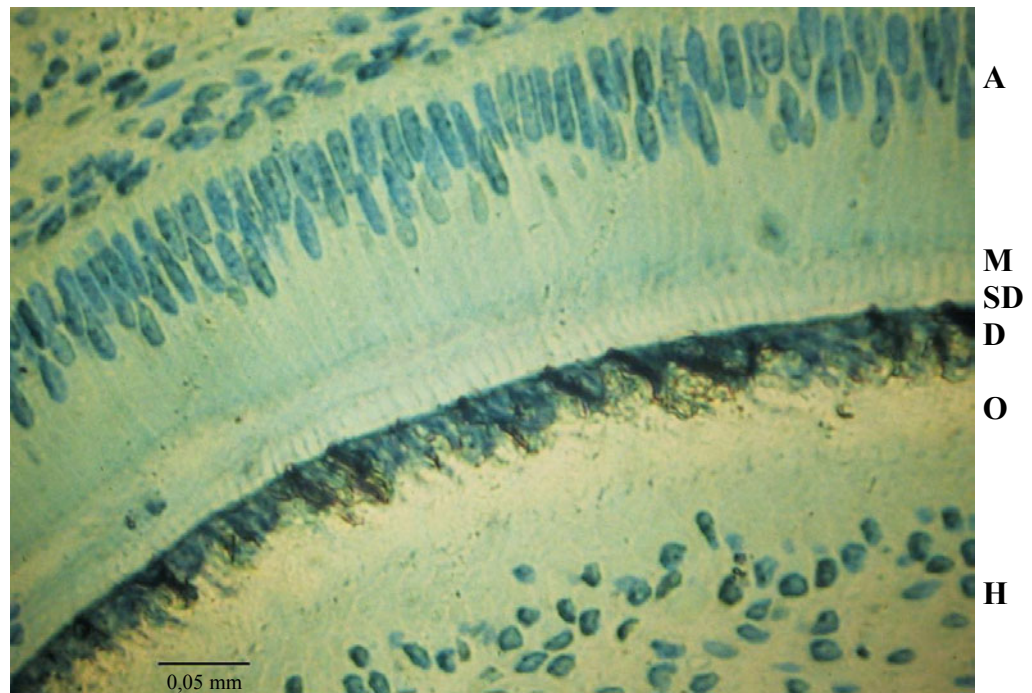


Abbildung 7 : Querschnitt des Rattenzahnes in der sekretorischen Phase (Z1)

Im oberen Drittel der Abbildung 7 sind die parallel geordneten Ameloblasten (A) gut zu erkennen. In der Bildmitte befindet sich die sekretorische Phase mit der Matrixzone (M). Sehr deutlich abgegrenzt an der Schmelz-Dentingrenze (SD) erkennt man das schon etwas gereifte Dentin (D). Im unteren Drittel zeigen sich Odontoblasten (O) mit Histiozyten (H) des Pulpengewebes.



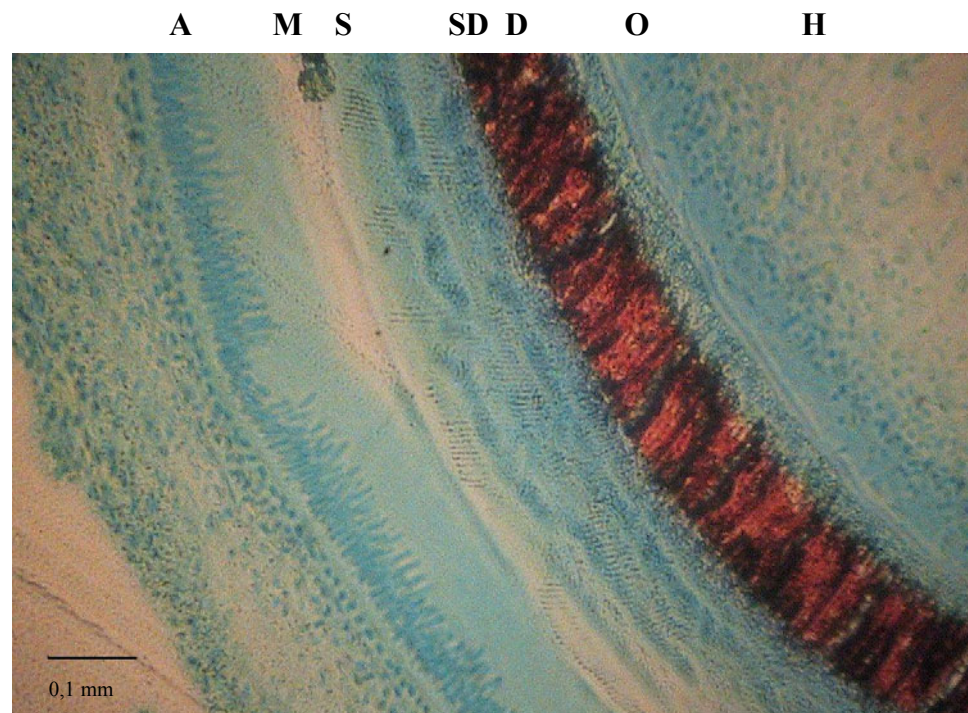


Abbildung 8 :      Querschnitt in der frühen Reifungsphase (Z2)

In Abbildung 8 wird die frühe Reifungsphase dargestellt. Auch hier sind die parallel angeordneten Ameloblasten (A) gut zu erkennen. Die Matrixzone (M) geht nun direkt in den Bereich von teils gereiften Schmelz über (S). Im rechten Drittel findet sich Dentin (D) mit den angrenzenden Odontoblasten (O) und Histiocyten (H).

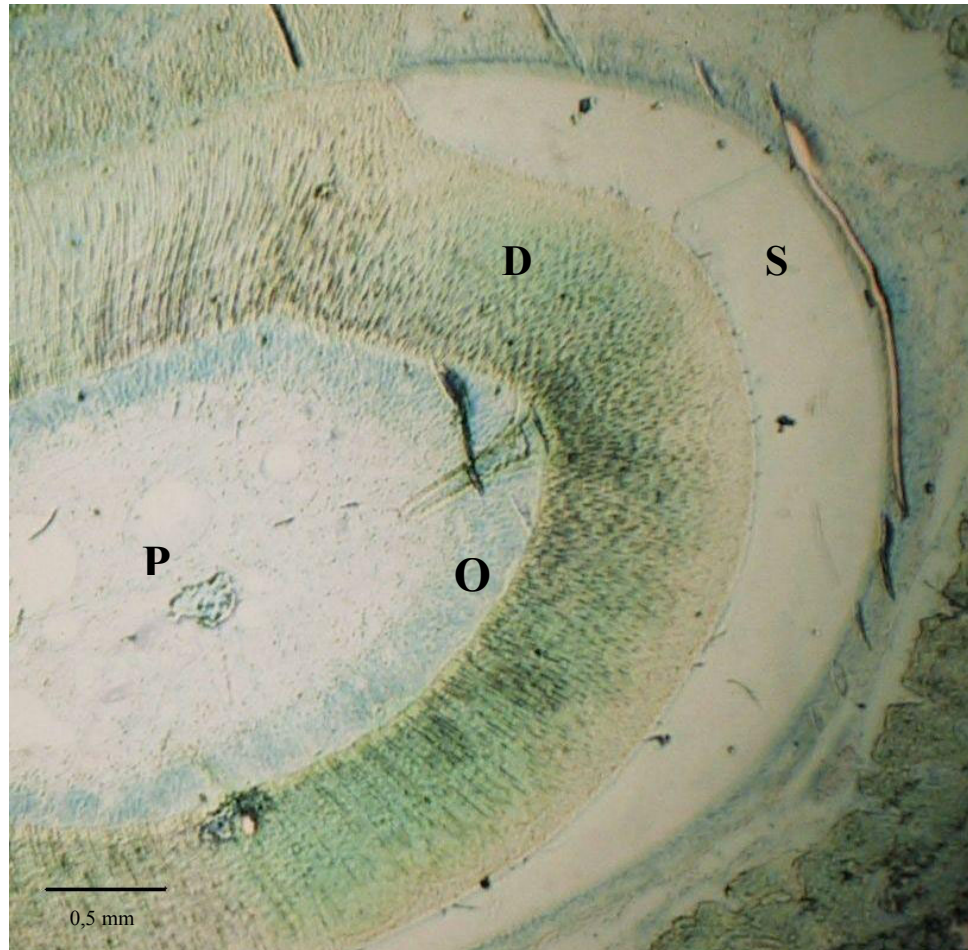


Abbildung 9 : Querschnitt in der späten Reifungsphase (**Z3**)

In Abbildung 9 wird der Rattenzahn in der späten Reifungsphase dargestellt. Der Schmelz (**S**) ist in seiner Breite nahezu im Finalstadium. Das Dentin (**D**) ist nahezu doppelt so breit wie der Schmelz und wird im inneren von den Odontoblasten (**O**) und der Pulpa (**P**) abgegrenzt.

## Elektronenmikroskopische Ergebnisse

Die elektronenmikroskopischen Übersichtsaufnahmen der ersten Schnittebene (unreifer Schmelz -> Abbildung 10) zeigen auf den ersten Blick eine gleichmäßige Verteilung der Goldmarker.

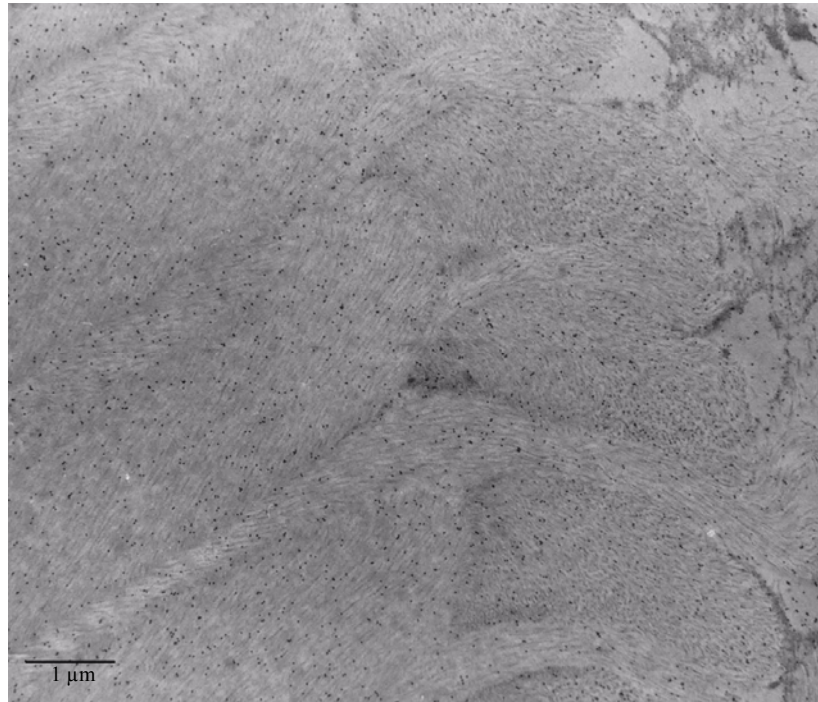


Abbildung 10 : Übersicht der extrazellulären Matrix in der Umgebung des Tomeschen Fortsatzes

Bei genauerer Betrachtung lassen sich Nanosphären mit bis zu 12 Goldkörnern auf engem Raum erkennen (Abbildungen 11, 12 und 13), speziell im Bereich um den Tomeschen Fortsatz.

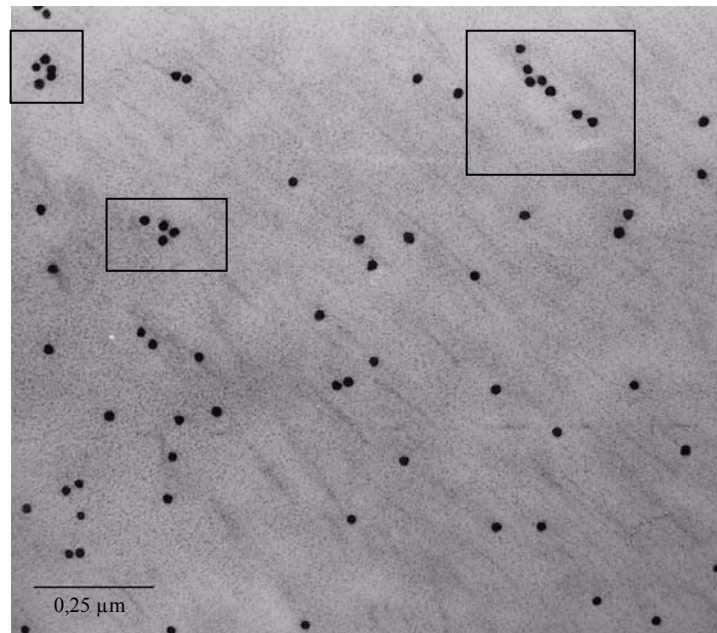


Abbildung 11 : Nanospheren aus Goldkörnern entlang der Schmelzprismen in der sekretorischen Phase (**Z1**)

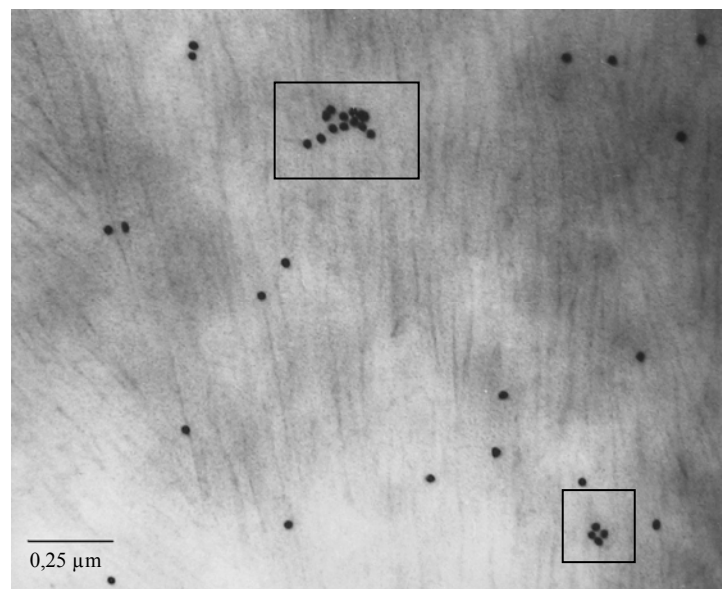


Abbildung 12: Nanospheren aus Goldkörnern entlang der Schmelzprismen in der frühen Reifungsphase (**Z2**)



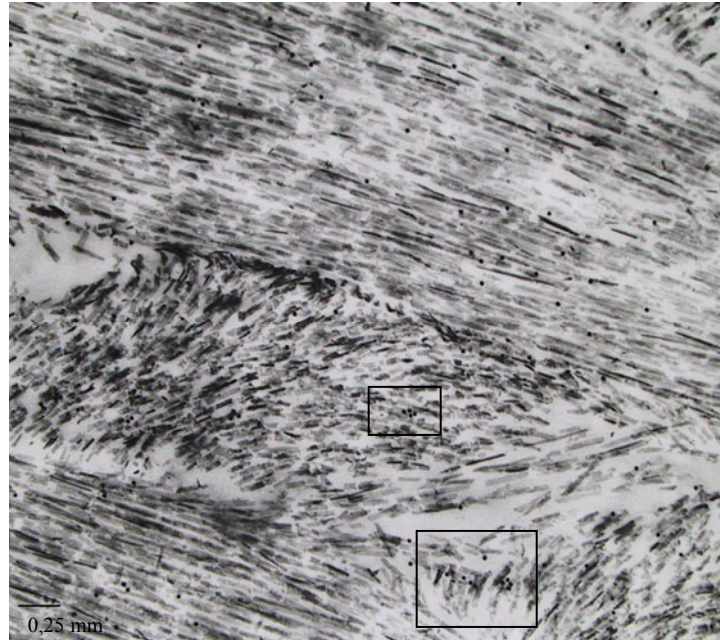


Abbildung 13: Nanospheren aus Goldkörnern entlang der Schmelzprismen in der fortgeschrittenen Reifungsphase (**Z3**)

Diese Nanospheren finden sich in allen drei Schnittebenen (Abbildungen 11-13). Daneben fällt auf, dass einige Goldkörner in gleichmäßigen Abständen entlang den Schmelzprismen zu finden sind.

In den Ameloblasten selbst zeigen sich weder diese Nanospheren noch die scheinbar geordneten Ketten von Goldkörnern. Auch die Anzahl der intrazellulär markierten Amelogenine ist deutlich geringer. Lediglich am Tomeschen Fortsatz des Ameloblasten findet man im Vergleich zur Schmelzmatrix ähnliche Dichteverhältnisse.

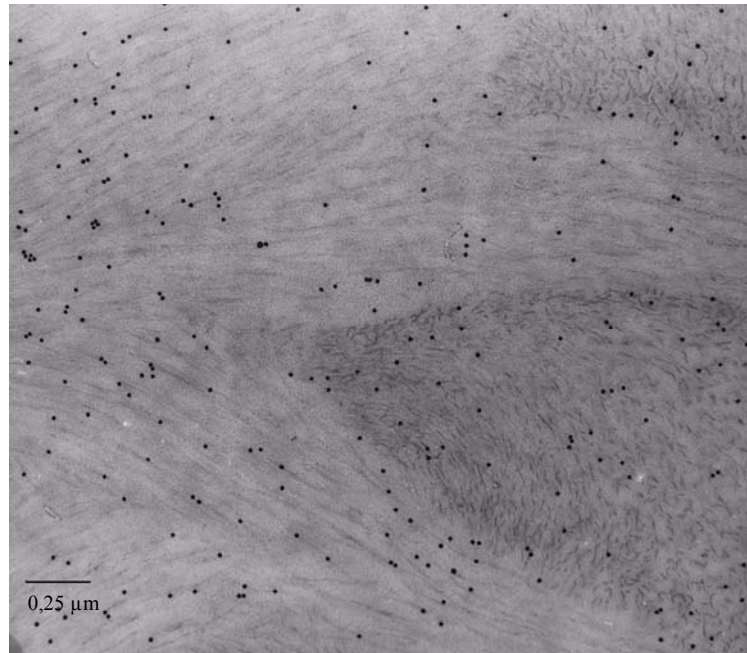


Abbildung 14: Ausschnittsvergrößerung von Abbildung 10

Die Negativprobe für die Immunofärbung zeigte keine Immunomarkierungen. Lediglich unspezifischer Hintergrund wurde vereinzelt mit dem Antigen markiert (siehe Abbildung 15). Dabei zeigten sich keine Unterschiede in den verschiedenen Schnittebenen. Unterschiede in der Matrixzone und den Ameloblasten waren auch nicht erkennbar.

Der Antikörper reagiert folglich sehr spezifisch auf das Amelogenin.

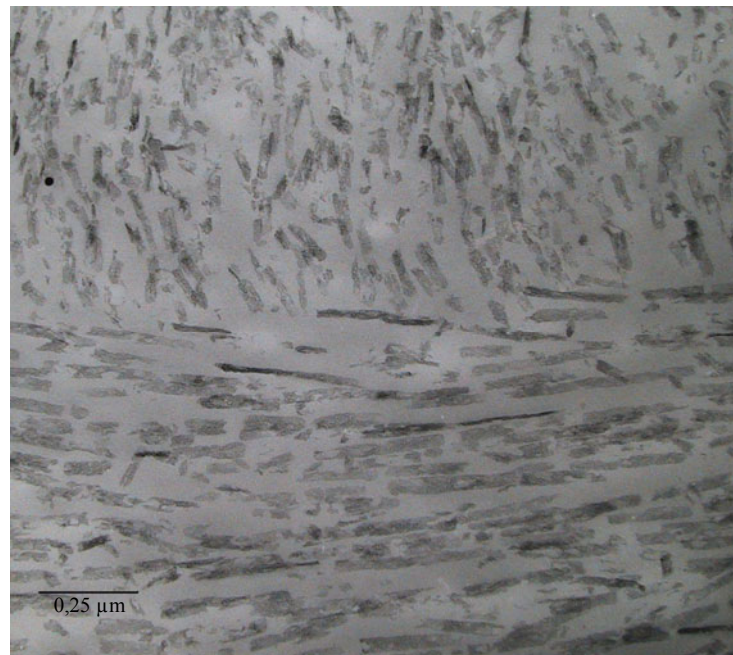


Abbildung 15: Negativprobe

### **3.3. Statistische Auswertung**

Ein Vergleich der drei untersuchten Schnittebenen (Z1, Z2 und Z3) zeigt unterschiedliche Mengen an Goldkörnern in der Umgebung des Tomeschen Fortsatzes. Die Zahl der Goldkörner nimmt von Z1 nach Z3 ab. Die Unterschiede zwischen Z1 und Z2 und zwischen Z2 und Z3 sind signifikant. (Siehe Abbildung 16). Die Anzahl nahm von durchschnittlich 16,7 in der sekretorischen Phase (Z1) über 8,1 in der jungen Schmelzreifung (Z2) auf 5,4 in der fortgeschrittenen Schmelzreifung (Z3) kontinuierlich ab.

## Goldkörner pro Fläche

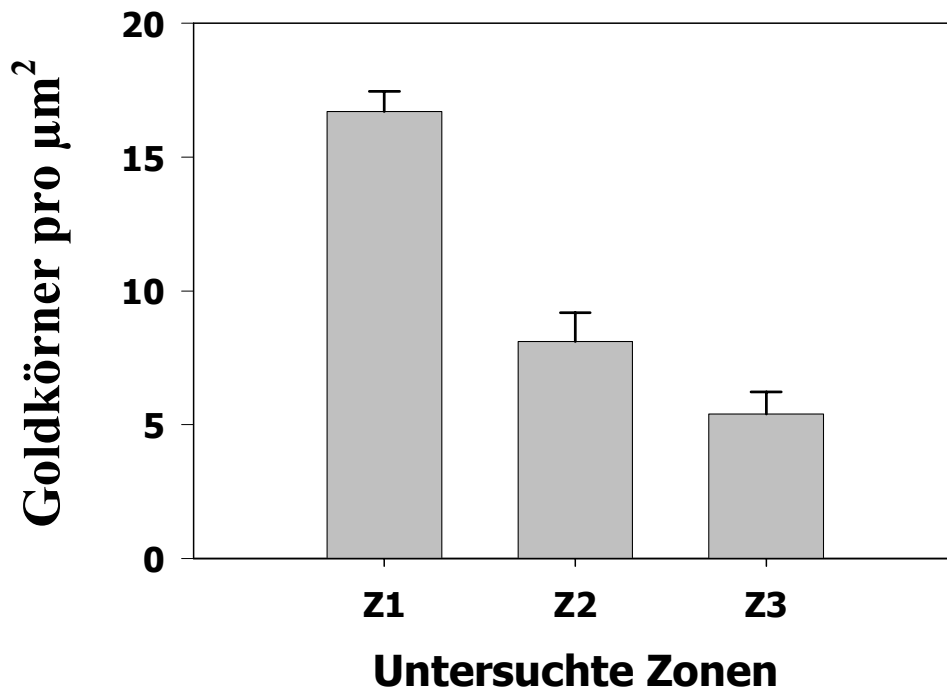


Abbildung 16: Ergebnisse der Zählungen der Goldkörner pro  $\mu\text{m}^2$  in den Schnittebenen Z1, Z2 und Z3

Die Untersuchung der Anzahl von Nanospheren pro  $\mu\text{m}^2$  zwischen den Zonen Z1 und Z2 und Z2 und Z3 zeigten einen signifikanten Unterschied (Siehe Abbildung 17 auf S. 35). Als Nanospheren wird eine Ansammlung von mindestens 3 Goldkörnern im Abstand von 100nm definiert. Die Menge der Nanospheren nehmen von durchschnittlich 2,1 in der sekretorischen Phase über 1,3 in der jungen Schmelzreifung auf 0,7 Nanospheren pro  $\mu\text{m}^2$  in der fortgeschrittenen Schmelzreifung ab.

## Nanospheren pro Fläche

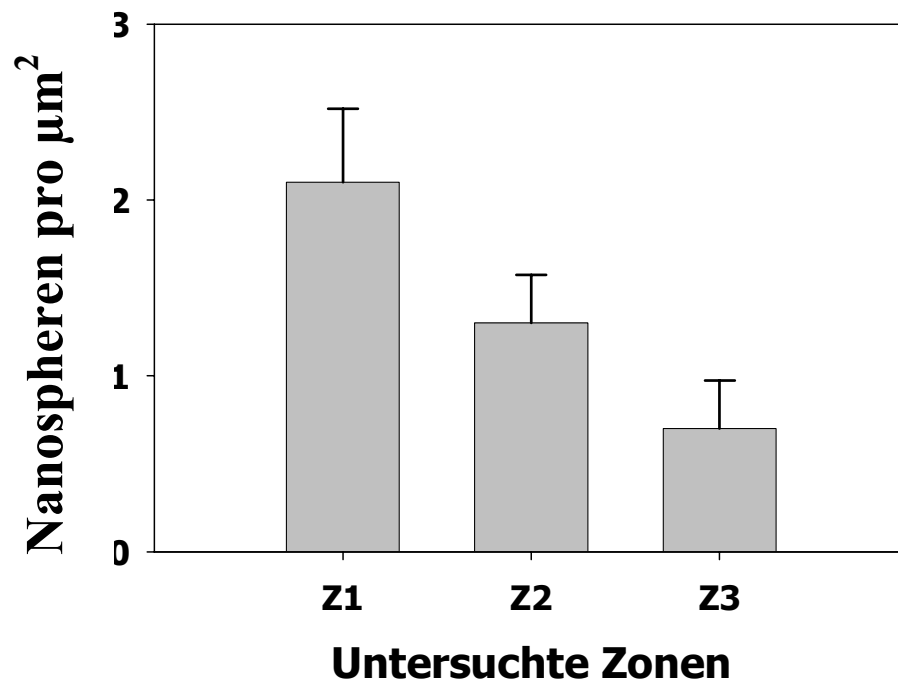


Abbildung 17: Ergebnisse der Zählungen der Inseln pro  $\mu\text{m}^2$  in den Schnittebenen Z1, Z2 und Z3

In einer dritten Untersuchung wurden die Goldkörner pro Insel gezählt. Auch hier zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen Z1 und Z2 und zwischen Z2 und Z3 (siehe Abbildung 18).

## Größe der Nanospheren

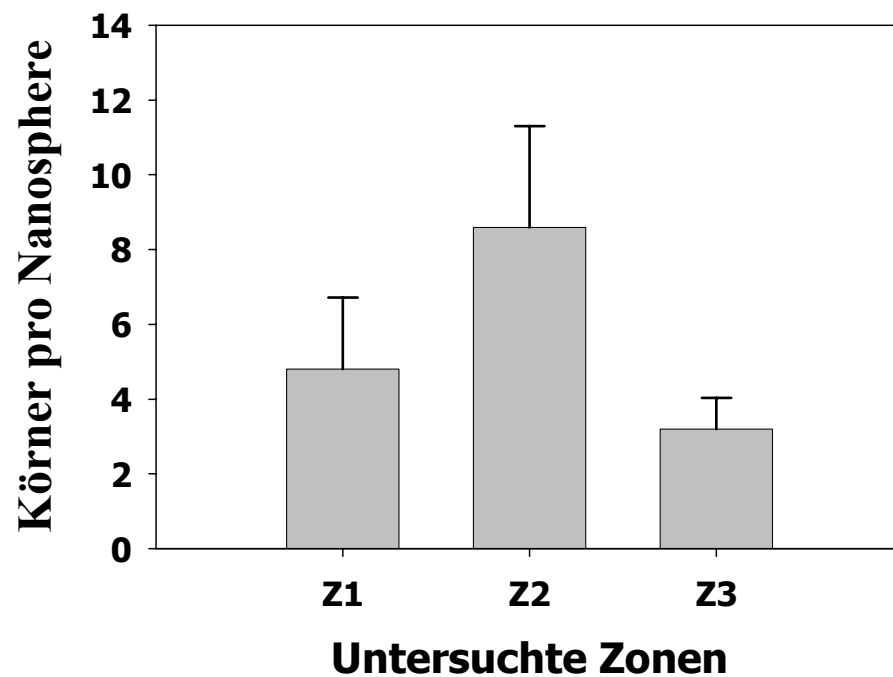


Abbildung 18: Ergebnisse der Zählung einzelner Körner pro Insel in den Schnittebenen Z1, Z2 und Z3

Die Anzahl der Körner steigen von Z1 nach Z2 an und fallen von Z2 nach Z3 ab (siehe Abbildung 18). Die Anzahl stieg durchschnittlich von 4,8 in der sekretorischen Phase auf 8,7 in der jungen Schmelzreifung und fiel dann auf 3,2 Amelogenine pro Nanosphäre in der fortgeschrittenen Schmelzreifung.

## 4 Diskussion

---

Die Hauptvorgänge in der extrazellulären Matrix sind die folgenden: 1. Platzschaffung zwischen den sekretorischen Ameloblasten und der Schmelz-Dentin-Grenze; 2. Organisation der Amelogeninproteine zur Schaffung eines molekular strukturierten Raumes; 3. Transport von Calcium- und Phosphationen durch die Ameloblasten, die für eine übersättigte Lösung sorgen; 4. Kernbildung von Apatitkristallen und 5. Größenzunahme der Kristalle. Anschließend, während der Schmelzreifung, erfolgt ein beschleunigtes Wachstum der Kristalle in Länge und Breite, während gleichzeitig neben anderen Proteinen (z.B. Enamelin) das Amelogenin abgebaut und schließlich aus der extrazellulären Matrix entfernt wird. Letzterer Vorgang, der Abbau und Verlust an Proteinen bei gleichzeitiger Härtung des Zahnschmelzes, ist, verglichen mit anderen Hartgeweben wie z.B. Knochen ungewöhnlich und nur im Zahnschmelz zu finden. Warum müssen in der sekretorischen Phase besonders viele Amelogeninproteine vorhanden sein? Warum finden sich während der Schmelzreifung deutlich weniger dieser Stoffe? Sind letztere neu sezernierte Proteine oder Abbauprodukte des Mutteramelogenins? Welche Funktion haben die gefundenen Anhäufungen an Proteinen? All diese Fragen sollen im Folgenden näher diskutiert und mit den gefundenen Ergebnissen dieser Arbeit erörtert werden.

In der vorliegenden Rattenzahnuntersuchung weist das Amelogenin innerhalb der Schmelzmatrix in der sekretorischen Phase eine ähnliche Verteilung auf, wie Herold (Herold et al. 1987) am Rinderzahn feststellen konnte. Auch er fand Ansammlungen mit mehreren Goldpartikeln auf engem Raum. Daneben war auch ein loses Netzwerk von Amelogeninen entlang der parallelen Schmelzprismen erkennbar. Ebenfalls zeigten sich

beim Rind deutlich weniger Partikel im Ameloblasten als in der Schmelzmatrix. Obwohl es sich, im Gegensatz zum Rind, beim Rattenzahn um einen kontinuierlich wachsenden Zahn handelt, scheinen die Grundfunktionen der Amelogenese unterhalb von Säugetieren ähnlich abzulaufen. Die DNA-Sequenzen von Rinder- (Shimokawa et al. 1997), Schweine- (Fukae et al. 1979, Yamakoshi et al. 1989) und Rattenzähnen (Bonass et al. 1991) sind neben weiteren Wirbeltieren untersucht worden und zeigen deutliche Übereinstimmungen.

Die auffälligen Mengenunterschiede der gefundenen Goldkörner innerhalb der drei untersuchten Regionen deuten darauf hin, dass während der Entwicklung des Schmelzes dem Protein eine geringere Bedeutung zukommt, sobald sich erste Schmelzkristalle bilden. Smith et al. (1989) postulierte, dass die Menge an Schmelzproteinen während der sekretorischen Phase langsam zu einem Maximum in der frühen Reifungsphase ansteigt, um dann schlagartig abzusinken. In der Einleitung wurde auf Arbeiten um Diekwisch (1993) hingewiesen, die die Funktion der Amelogenine in der „Orientierung und Dimensionierung (Länge und Breite)“ der Kristalle während der Zahnentwicklung sehen. Dies erklärt, warum die Anzahl der Amelogenine während der Reifung abnimmt, denn sobald die Bildung der ersten Kristalle beginnt, erfährt die weitere Kristallentwicklung eine Art Schienenfunktion. Diese Schienenfunktion ist vorgegeben durch die Richtung der Mineralisationsfront (Schmelz-Dentin-Grenze) zum Tomeschen Fortsatz der Ameloblasten. Da sich die Ameloblasten während der Schmelzreifung nun weiter zurückziehen und Schmelzmatrix hinterlassen, hat die Funktion der Amelogenine als „Orientierung und Dimension“ nur noch geringe Bedeutung.

Die Bereiche der multiplen Goldkörner entsprechen dem „stippled“ oder „granular material“, die Watson (1960) erstmals am Zahnschmelz des Hasen beschrieb. Nancy und Warshawsky (1980) vermuteten hier ein Artefakt, verursacht durch die Fixierung mit Osmium Tetraoxid (1984). Um dies zu bestätigen, wurden Proben einerseits durch Eintauchen in



Osmium Tetraoxid und andererseits Vergleichsproben durch Herzperfusion mit Glutaraldehyd fixiert. Im Ergebnis stellten sie fest, dass weniger „stippled“ Regionen zu zählen waren, je besser das Material fixiert war (Herzperfusion mit Glutaraldehyd). In Proben, die sie als besonders gut fixiert beurteilten, fanden sie überhaupt keine.

Frank (1979) dagegen sah in diesen „stippled material“ eine Art Vorläufer von Kristallen in der Schmelzmatrix. Die Ergebnisse dieser Untersuchung bestätigen Franks Vermutungen insofern, dass diese Stellen keine Artefakte sind.

Die vorliegende Untersuchung zeigt, dass ein nahezu gleiches Verhältnis der gefundenen Anzahl an Goldkörnern insgesamt und den Nanospheren besteht. Gleichzeitig nimmt die Anzahl sowohl der gefundenen Körner als auch der Nanospheren während der Reifung ab. Dieses Phänomen war in 5 verschiedenen Zähnen zu erkennen und lässt daher keine Artefakte vermuten. Ob diese Bereiche den Beginn eines Kristallwachstums darstellen, kann in dieser Untersuchung nicht eruiert werden. Die Prävalenz in der sekretorischen Phase und dem deutlich geringeren Auftreten in der Endphase der Schmelzentwicklung können dies jedoch vermuten lassen.

Vorstellbar ist auch, dass Amelogeninkonglomerate durch „Vakuolen“ zu ihrem Bestimmungsort transportiert werden. Herold et al. (1987) lokalisierten im Rindzahn Amelogenin in allen Organellen des Ameloblasten; u.a. in Zisternen des rauen endoplasmatischen Retikulums, im Golgiapparat und in den sekretorischen Granula. Autoren zuvor (Frank 1970, Weinstock und LeBlond 1971) fanden ähnliche Muster mit der Radioautographie, was vermuten ließ, dass die Ameloblasten den klassischen sekretorischen Transportweg merokriner Sekretion nutzen (Palade 1984). Auch Nanci und Warshawsky (1984) widmeten eine Arbeit den vermeintlichen Sekretionsorten der Ameloblasten. Sie entdeckten in ihren Studien Einstülpungen der Ameloblastenmembran, in deren Nähe

sich Ansammlungen von Körnern fanden und auch Bereiche, die mit der Membran verschmolzen waren.

Jüngere Untersuchungen konnten in Zähnen von Mäusen zeigen, dass mehrere Amelogenine sich zu sogenannten „Nanospheren“ ordnen, die einen Durchmesser von 15-20 nm bilden (Moradian-Oldak et al. 1994). Wie in der Einleitung erwähnt, wird allgemein akzeptiert, dass die Amelogenine in vielfältiger Form existieren. Neben dem „alternative Splicing“ im Ameloblasten, werden die „Mutteramelogenine“ (auch als P173 genannt wegen der 173 vorhandenen Aminosäuren) nach ihrer Sekretion in der extrazellulären Matrix durch Proteasen gespalten. Offensichtlich haben diese Spaltprodukte, aber auch die Mutteramelogenine, die Eigenschaft, sich wieder selbst zu den zuvor genannten „Nanospheren“ zu organisieren. Diese Strukturen wurden später in histologischen Präparaten von Mäusezähnen als „beaded rows“ (zu Deutsch: Perlenreihe) identifiziert, die winzige Schmelzkristalle während der jungen Schmelzbildungsphase umgeben (Fincham et al. 1995). Daraufhin schlug Fincham et al. (1999) vor, dass die Amelogenin-„Fusionen“ die organisierte Mikrostruktur für die Einleitung und das geordnete Wachstum der Schmelzkristalle beinhalten.

Bei der elektronenmikroskopischen Untersuchung konnte festgestellt werden, dass die Menge an Amelogenin insgesamt in der Entwicklung des Rattenzahnes abnimmt. Auch die Anzahl der Amelogenin-„Fusionen“ nehmen in der Entwicklung ab. Diese Nanospheren zeigen jedoch eine Zunahme an Amelogenin innerhalb der Nanospheren. Diese Zunahme findet genau in der Phase statt, in der das Kristallwachstum bzw. die Verlängerung der Kristalle eintritt. Bis zu 13 Goldkörner in einem Konglomerat konnten gefunden werden. Offensichtlich beeinflussen die Wechselwirkungen zwischen Amelogenin und Schmelzkristall das Größenwachstum. Mehrere Arbeiten beschäftigten sich mit dieser Fragestellung (Doi et al. 1984, Aoba et al. 1987a, Moradian-Oldak et al. 1998b). Sie stellten fest, dass Adsorptionsvorgänge die Wachstumskinetik

der Schmelzkristalle beeinflussen. Die Spaltung hydrophiler Anteile des Amelogenins verringerte die Affinität zwischen Kristall und Amelogenin und damit seine wachstumshemmende Wirkung. Aoba et al. (1987a.) hatten festgestellt, dass Amelogenin nicht, wie lange Zeit vermutet, die Schmelzbildung einleitet, sondern das Wachstum in einer übersättigten Lösung hemmt. Diese hemmende Wirkung ist ein eindeutiger Hinweis, dass Amelogenine mit den Apatitkristallen agieren und proteolytische Vorgänge dies wieder umkehren können. Die Wechselwirkungen zwischen Amelogenin und Kristall könnten zu folgendem zusammengefasst werden: 1. Vorbeugung einer verfrühten Kristallisation (Fusion von Kristall und Kristall) (Warshawsky 1989; Moradian-Oldak et al. 1998b) und 2. Modulation der Kristallbildung und die anschließende Verlängerung (Fincham et al. 1995). Amelogenin hätte folglich eine schützende Funktion, die ein geordnetes Wachstum dieser gefundenen Kristalle ermöglicht und Moradian-Oldak et al. (2001) als „protektive Envelope“ (zu Deutsch: schützende Hülle) beschrieb. Ein Anstieg an Amelogenin in den Nanosphären in der jungen Schmelzreifungsphase ermöglicht somit ein geordnetes Wachstum. Gestützt wird dieser Verdacht durch eine Untersuchung von Moradian-Oldak et al. (1998b) auf den anhaftenden Effekt der Amelogenine an die Kristalloberfläche durch ihre supramolekuläre Selbstordnung (in der vorliegenden Untersuchung als Konglomerate bzw. Nanosphären bezeichnet). Sie stellten eine höhere Effektivität des Mutteramelogenins fest, Apatitkristalle untereinander anzuordnen als andere gespaltene Produkte des Amelogenins. Dafür werden zwei Parameter verantwortlich gemacht: 1. die Affinität des Proteins zum Mineral (Protein-Mineral Wechselwirkungen) und 2. die Tendenz der Amelogenine, sich selbst zu organisieren (Protein-Protein Wechselwirkungen). Dies zeigt, dass je intensiver die Nanosphären untereinander gepackt sind, umso höher der Schutz vor verfrühter Fusion der Kristalle. Der Schutz macht dabei durchaus Sinn, denn die extrem dünnen Schmelzkristalle, die sich in der sekretorischen Phase bilden, haben bei einer Dicke von nur 1-2 nm eine sehr große Oberfläche (Moradian-Oldak et al. 2001). Diese Tatsache hat den physikalischen

Effekt, dass sich die Kristalle ohne Schutz aufgrund elektrostatischer Wechselwirkungen aneinander binden würden. Interessant dabei ist, dass der Abstand zwischen den hochorganisierten Kristallen ca. 20 nm entspricht (Diekwisch et al. 1993) und damit genau die Größe der Nanospheren erreichen, die durch Mutteramelogenine gebildet werden (Moradian-Oldak et al. 1994, Fincham et al. 1995). Die Nanospheren würden dann eine Art Platzhalterfunktion erfüllen.

Wie wirkt das Amelogenin auf die Modulation der Kristallbildung und der anschließenden Verlängerung? Um dies zu untersuchen, wurde Octacalciumphosphat (OCP) herangezogen. Es gibt Beweise, die die Theorie unterstützen, dass die streifenähnlichen Schmelzkristalle zunächst als OCP heranwachsen und später in Apatit umgewandelt werden (Miake et al. 1993). Unter Laborbedingungen züchteten Wen et al. (2000) OCP in einer Lösung mit unterschiedlichem Prozentsatz an Amelogenin. Sie stellten fest, dass eine deutliche Verlängerung der Kristalle in Anwesenheit von Amelogenin stattfand. Dieser Effekt war dosisabhängig und ließ vermuten, dass der Einfluss von Amelogenin auf OCP spezifisch ist. Genauere Untersuchungen zeigten dann, dass das OCP im dreidimensionalen Raum eine Richtung favorisierte (Lijima et al. 2001). Dazu wurde systematisch die Dicke, Breite und Länge der Kristalle gemessen. Es stellte sich heraus, dass das Dickenwachstum am geringsten stattfand. Dieses Wachstum läuft in den Apatitkristallen der Rattenzähne ähnlich ab. Die folgende Skizze soll zeigen, wie das geordnete Wachstum der Kristalle im Rattenzahn mit Hilfe der Amelogenine ablaufen könnte (Nanospheren Theorie). Auf der linken Seite die schematische Darstellung, auf der rechten Seite die jeweiligen Abschnitte der elektronenmikroskopischen Aufnahmen:

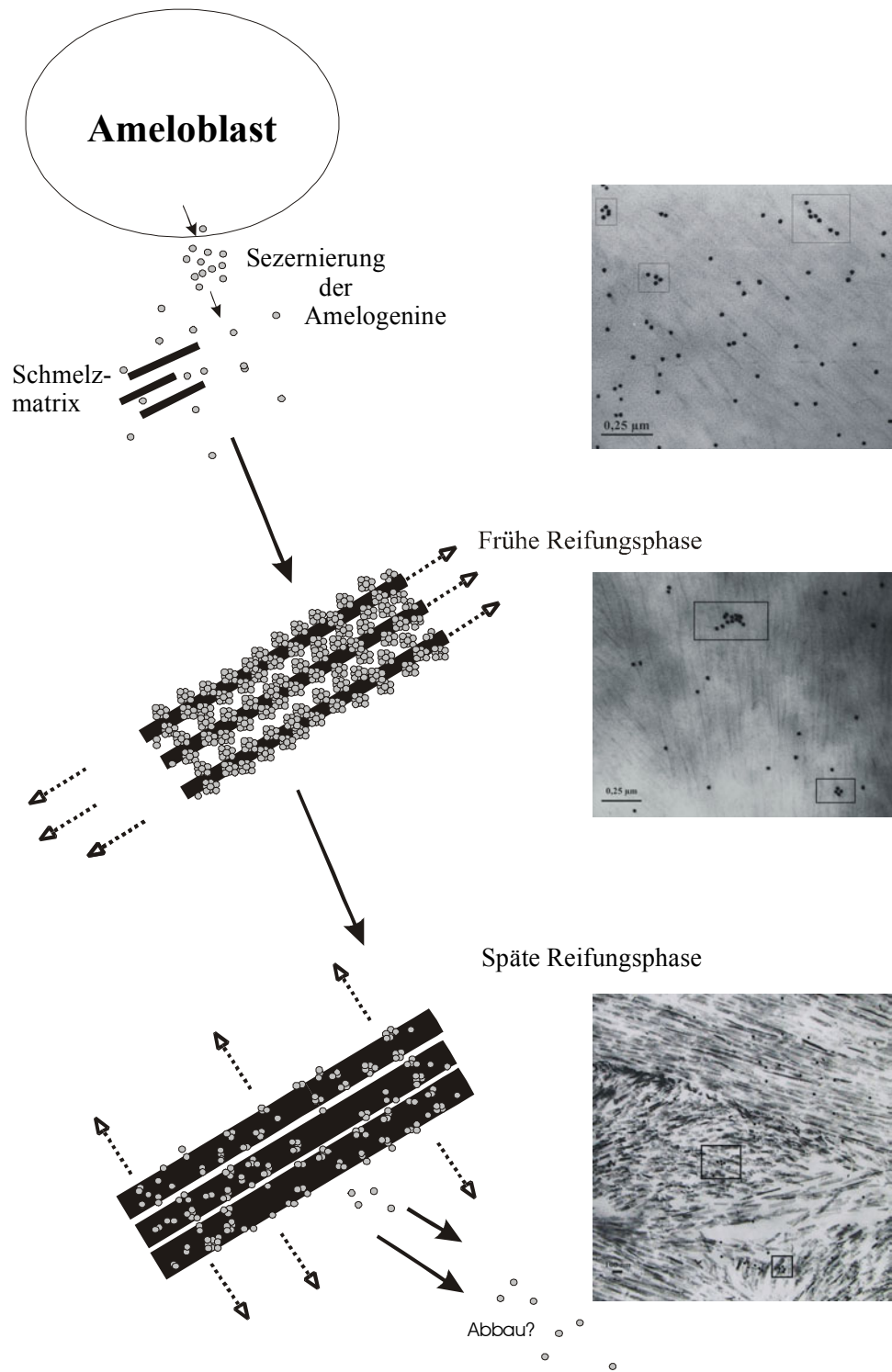


Abbildung 19: Schematische Darstellung der Nanospherentheorie

Die Ameloblasten sezernieren Amelogenin in die Schmelzmatrix. Die Amelogenine setzen sich an vorhandene Kristalle aus der Schmelzmatrix und vereinigen sich zu Konglomeraten. Diese Nanospheren dienen als Blockade für weitere Kristallanlagerungen. Hierdurch entsteht ein geordnetes Längenwachstum der Kristalle.

Erst nach einer ausreichenden Stabilität der Kristalle, lösen sich die Amelogeninkomplexe von den Kristallen, was zu einem zusätzlichen Dickenwachstum führt. Danach lösen sich die Amelogenine wieder auf.

Hiermit erklärt sich die deutliche Abnahme der gefundenen Proteine in der späteren Schmelzreifung. Denn Untersuchungen der Kristallgrößen konnten zeigen, dass das Dickenwachstum erst nach der sekretorischen Phase beginnt und so zu einer Schmelzhärtung führt. Eine Abnahme der Amelogenine hat somit verstärktes Dickenwachstum der Kristalle zur Folge.

Wodurch der Abbauprozess der Nanospheren eingeleitet wird und wie die Proteine abgebaut werden, bleibt jedoch noch unklar. Denkbar ist eine spezielle Proteinase, die in der späten Reifungsphase aktiv wird. Dies muss in weiteren Arbeiten untersucht werden.

## 5 Zusammenfassung

---

Durch Immunohistochemie von zehn Rattenzähnen konnten signifikante Unterschiede in der Anzahl der Amelogenine in den drei Phasen der Amelogenese gefunden werden:

Schnittebene 1 (Z1) = sekretorische Phase

Schnittebene 2 (Z2) = frühe Schmelzreifung

Schnittebene 3 (Z3) = fortgeschrittene Schmelzreifung

In den Untersuchungen fanden sich Ansammlungen von Amelogeninen, die als Nanospheren bezeichnet wurden. Als Nanosphere wird eine Ansammlung von mindestens drei Amelogeninen im Abstand von 100nm definiert.

Es wurden 3 unterschiedliche Zählungen über das TEM durchgeführt:

4. Anzahl der Amelogenine pro  $\mu\text{m}^2$  am Tomeschen Fortsatz während der Entwicklung: Die Anzahl nahm von durchschnittlich 16,7 in der sekretorischen Phase über 8,1 in der jungen Schmelzreifung auf 5,4 in der fortgeschrittenen Schmelzreifung kontinuierlich ab.
5. Anzahl der Nanospheren aus Amelogeninen pro  $\mu\text{m}^2$  am Tomeschen Fortsatz während der Entwicklung: Diese nahm von durchschnittlich 2,1 in der sekretorischen Phase über 1,3 in der jungen Schmelzreifung auf 0,7 Nanospheren pro  $\mu\text{m}^2$  in der fortgeschrittenen Schmelzreifung ab.
6. Anzahl der Amelogenine pro Nanosphere am Tomeschen Fortsatz während der Entwicklung: Die Anzahl stieg durchschnittlich von 4,8 in der sekretorischen Phase auf 8,7 in der jungen Schmelzreifung und fiel dann auf 3,2 Amelogenine pro Nanosphere in der fortgeschrittenen Schmelzreifung.

Die gefundenen Nanospheren ermöglichen ein geordnetes Längenswachstum der Schmelzkristalle. Durch sie erhalten die Kristalle einen Schutz vor unkontrolliertem Wachstum in die Breite. Erst in der späten Reifungsphase, wenn der Kristall auch in die Breite wächst, finden sich deutlich weniger Nanospheren.



## 6 Literaturverzeichnis

---

**Akita H, Fukae M, Shimoda S, Aoba T (1992)**

Localization of glycosylated matrix proteins in secretory porcine enamel and their possible functional roles in enamel mineralization. *Arch Oral Biol* 37: 953-962

**Allan JH (1967)**

Maturation of enamel. In: Miles AEW: Structure and chemical organization of teeth. Vol. 1, Academic Press, New York, 467

**Ameloot PC, Coomans D (1987)**

Light and transmission electron microscopy of the effects of calcium, magnesium and phosphate on dentine and enamel formed by rat molars in vitro. *Arch Oral Biol* 32: 381-389

**Angmar-Mansson B (1970)**

Studies on the distribution and ultrastructure of the main components in human dental enamel. Dr. odont. Thesis, Stockholm

**Aoba T, Fukae M, Tanabe T, Shimizu M, Moreno EC (1987 a)**

Selective adsorption of porcine- amelogenins onto hydroxyapatite and their inhibitory activity on hydroxyapatite growth in supersaturated solutions. *Calcif Tissue Int* 41: 281-289

**Applebaum E (1938)**

Grenz-ray studies of the calcification of enamel. *J Dent Res* 17: 181

**Applebaum E (1943)**

Grenz-ray studies of enamel matrix formation and calcification. *J Dent Res* 22: 7

**Baba T, Terashima T, Oida S, Sasaki S (1996)**

Determination of enamel protein synthesized by recombined mouse molar tooth germs in organ culture. *Arch Oral Biol* 41(2): 215 - 9

**Bartlett JD, Simmer JP, Xue J, Margolis HC, Moreno EC (1996)**

Molecular cloning and MRNA tissue distribution of a novel matrix metalloproteinase isolated from porcine enamel organ. *Gene* 183: 123-128

**Bashir MM, Abrams WR, Rosenbloom J (1997)**

Molecular cloning and characterization of the bovine tuftelin gene. *Arch Oral Biol* 42(7): 489-96

**Bawden JW (1989)**

Calcium Transport during mineralization. *Anat Rec* 224: 226-233

**Belcourt AB, Fincham AG, Termine JD (1982)**

Acid-soluble bovine fetal enamels. *Journal of Dental Research* 61(8):1031-2

**Benson GP, Zaki AE, Eisenmann DR (1998)**

The use of autoradiography and cycloheximide to determine the origin of enamel proteins in the maturation ameloblasts of the rat incisor. *Arch Oral Biol* 43(10): 771-7

- Borke JL, Zaki A el-M, Eisenmann DR, Mednieks MI (1995)**  
Localization of plasma membrane Ca<sup>2+</sup> pump mRNA and protein in human ameloblasts by in situ hybridization and immunohistochemistry. *Connect Tissue Res* 33: 139-144
- Boyde A (1965)**  
The structure of developing mammalian dental enamel. In: Stack MV, Fearnhead RW: *Tooth enamel* 1. Wright, Bristol 161-192
- Bronckers AL, Bervoets TJ, Lyaruu DM, Wöltgens JH (1989)**  
Antagonism of fluoride toxicity by high levels of calcium but not of inorganic phosphate during secretory amelogenesis in the hamster tooth germ in vitro. *Arch Oral Biol* 34: 625-636
- Casasco A (1996)**  
Application of immunocytochemistry for detection of proliferating cell populations during tooth development. *Anat Rec* 245: 162-173
- Casasco A, Calligaro A, Casasco M (1992)**  
Proliferative and functional stages of rat ameloblast differentiation as revealed by combined immunocytochemistry against enamel matrix proteins and bromodeoxyuridine. *Cell Tissue Res* 270: 415-423
- Cerny R, Slaby I, Hammarström L, Wurtz T (1996)**  
A novel gene expressed in rat ameloblasts codes for proteins with cell binding domains. *J Bone Miner Res* 11: 883-891
- Chapman VM, Keitz BT, Distèche CM, Lau EC, Snead ML (1991)**  
Linkage of amelogenin (Amel) to the distal portion of mouse X chromosome. *Genomics* 10: 23-28
- Chardin H, Londono I, Goldberg M (1990)**  
Visualization of glycosaminoglycans in rat incisor extracellular matrix using a hyaluronidase-gold complex. *Histochem* 22: 588-594
- Chen E, Yuan ZA, Collier PM, Greene SR, Abrams WR (1998)**  
Comparison of upstream regions of X- and Y- chromosomal amelogenin genes. *Gene* 216(1): 131-7
- Couwenhoven RI, Davis C, Snead ML (1989)**  
Mouse ameloblasts do not transcribe the albumin gene. *Calcif Tissue Int* 45: 367-371
- Couwenhoven RL, Schwartz SA, Snead ML (1993)**  
Arrest of amelogenin transcriptional activation in bromodeoxyuridinetreated developing mouse molars in vitro. *J Craniofac Genet Dev Biol* 13: 259-269
- Couwenhoven RI, Snead ML (1994)**  
Early determination and permissive expression of amelogenin transcription during mouse mandibular first molar development. *Dev Biol* 164: 290-299
- Crabb HSM, Darling AL (1962)**  
The pattern of progressive mineralization in human dental enamel. *J Biol Buccale* 18: 149-154
- Den-Besten PK, Punzi JS, Li W (1998)**  
Purification and sequencing of a 21 kDa and 25 kDa bovine enamel metalloprotease. *Eur J Oral Sci* 106 (1): 345-9

**Deporter WA (1977)**

The early mineralization of enamel. *Calcif Tiss Res* 24: 271

**Deutsch D (1989)**

Structure and function of enamel gene products. *Anat Rec* 224: 189-210

**Deutsch D, Palmon A, Dafni L, Mao Z, Leytin V, Young M, Fisher LW (1998)**

Tuftelin - Aspects of protein and gene structure. *Eur J Oral Sci* 106(1):315-23

**Deutsch D, Peer E (1982)**

Development of enamel in human fetal teeth. *J Dent Res* 61: 1543

**Deutsch D, Catalano-Sherman J, Dafni L, David S, Palmon A (1995 a)**

Enamel matrix proteins and ameloblast biology. *Connect Tissue Res* 32: 97-107

**Deutsch D, Dafni L, Palmon A, Hekmati M, Young MF, Fisher LW (1997)**

Tuftelin: enamel mineralization and amelogenesis imperfecta. *Ciba Found Symp* 205: 135-147; discussion 147-155

**Deutsch D, Palmon A, Dafni L, Catalano-Sherman J, Young MF, Fisher LW (1995b)**

The enamelin (tuftelin) gene. *Int J Dev Biol* 39: 135-143

**Deutsch D, Palmon A, Fisher LW, Kolodny N, Termine JD, Young MF (1991)**

Sequencing of bovine enamelin ("tuftelin") a novel acidic enamel protein. *J Biol Chem* 266: 16021-16028

**Deutsch D, Palmon A, Young MF, Selig S, Kearns WG, Fisher LW (1994)**

Fluorescence in mapping of the human tuftelin (TUFT1) gene to the chromosome 1 by situ hybridization. *Mammalian Genome* 5: 461-462

**Deutsch D, Shapira L (1987c)**

Pattern of mineral uptake in the developing human deciduous enamel. *J Craniofac Genet Dev Biol* 7: 137-143

**Diekwisch T, David S, Bringas P Jr, Santos V, Slavkin HC (1993)**

Antisense inhibition of ENAMEL translation demonstrates supramolecular controls for enamel HAP crystal growth during embryonic mouse molar development. *Development* 117: 471-482

**Diekwisch TG, Ware J, Fincham AG, Zeichner-David M (1997)**

Immunohistochemical similarities and differences between amelogenin and tuftelin gene products during tooth development. *J Histochem Cytochem* 45: 859-866

**Doi Y, Eanes ED, Shimokawa H, Termine JD (1984)**

Inhibition of seeded growth of enamel apatite crystals by amelogenin and enamelin proteins in vitro. *Journal of Dental Research* 63(2): 98-105

**Eastoe JE (1966)**

The changing nature of developing dental enamel. *British Dental Journal*. 121(10): 451-4

**Eastoe JE (1979)**

Enamel protein chemistry - Past, present and future. *J Dent Res* 58B: 753-764

**Engfeldt B, Hammarlund-Essler E (1956)**

Studies on mineralized dental tissue. A microradiographic study of the mineralization of developing enamel. *Acta Odont Scand* 14: 273

- Farge P, Couble P, Magloire H, Dallaire L (1987)**  
mRNA characterization of human fetal enamel matrix. *Arch Oral Biol* 32: 655-658
- Fincham AG, Belcourt AB, Lyaruu DM, Termine JD (1982)**  
Comparative protein biochemistry of developing dental enamel matrix from five mammalian species. *Calcif Tiss Int* 34:182
- Fincham AG, Belcourt AB, Termine JD (1983)**  
Molecular Composition of the protein matrix of developing human dental enamel. *J Dent Res* 62: 11
- Fincham AG, Hu Y, Lau EC, Slavkin HC, Snead ML (1991)**  
Amelogenin post-secretory processing during biomineralization in the postnatal mouse molar tooth. *Arch Oral Biol* 36: 305-317
- Fincham AG, Moradian-Oldak i, Diekwisch TG, Lyaruu DM, Wright JT, Bringas P Jr, Slavkin HC (1995)**  
Evidence for amelogenin "nanospheres" as functional components of secretory-stage enamel matrix. *J Struct Biol* 115: 50-59
- Frank RM, Nalbandian (1967)**  
Ultrastructure of amelogenesis. In: Miles AES (Hrsg.): *Structure and chemical organization of teeth*. Academic Press, New York
- Fujiwara N, Sakakura Y, Nawa T (1991)**  
Short-term mineralization of dentin and enamel in the mouse embryonic molars cultured in serum-free, chemically-defined medium. *Arch Histol Cytol* 54: 411-418
- Fukae M, Tanabe T, Murakami C, Dohi N, Uchida T (1996)**  
Primary structure of the porcine 89-kDa enamelin. *Advances in Dental Research* 10(2): 111-8
- Fukae M, Tanabe T (1987b)**  
Nonamelogenin in components of porcine enamel in the protein fraction free from enamel crystals. *Calcif Tissue Int* 40: 286-293
- Fukae M, Tanabe T, Uchida T, Yamakoshi Y, Shimizu M (1993)**  
Enamelins in the newly formed bovine enamel. *Calcif Tissue Int* 53: 257-261
- Fukae M, Ijiri H, Tanabe T, Shimizu M (1979)**  
Partial amino acid sequences of two proteins in developing porcine enamel. *J Dent Res* 58(B): 1000
- Gibson CW (1999)**  
Regulation of amelogenin gene expression. *Critical Reviews in Eukaryotic Expression* 9(1): 45-57
- Gibson CW, Collier PM, Yuan ZA, Chen E (1998)**  
DNA sequences of amelogenin genes provide clues to regulate of expression. *European Journal of Oral Sciences* 106 (1): 292-8
- Gibson CW, Golub EE, Abrams WR, Shen G, Ding W, Rosenbloom J (1992)**  
Bovine amelogenin message heterogeneity: alternative splicing and Y-chromosomal gene transcription. *Biochemistry* 31: 8384-8388
- Glimcher MJ, Brickley-Parsons D, Levine PT (1977)**  
Studies of enamel proteins during maturation. *Calcified Tissue Research* 24(3): 259-70

**Gomez S, Boyde A (1994)**

Correlated alkaline phosphatase histochemistry and quantitative backscattered electron imaging in the study of rat incisor ameloblasts and enamel mineralization. *Microsc Res Tech* 29: 29-36

**Herold RC, Boyde A, Rosenbloom J, Lally ET (1987)**

Monoclonal antibody and immunogold cytochemical localization of amelogenins in bovine secretory amelogenesis. *Arch Oral Biol* 32: 439-444

**Höhling HJ (1966)**

Die Bauelemente von Zahnschmelz und Dentin aus morphologischer, chemischer und struktureller Sicht. Hanser, München

**Hu CC, Fukae M, Uchida T, Qian Q, Zhang CH, Ryu OH, Tanabe T, Yamakoshi Y, Murakami C, Dohi N, Shimizu M, Simmer JP (1997c)**

Cloning and characterization of porcine enamelin mRNAs. *J Dent Res* 76: 1720-1729

**Inage T, Fujita M, Kobayashi M, Wakao K, Kobayashi M, Saito N, Shibuya H, Shimada M, Takagi K (1990)**

Ultrastructural differentiation in the distal ends of ameloblasts from the presecretory zone to the early secretory zone. *J Nihon Univ Sch Dent* 32: 259-269

**Kagayama M, Zhu JX, Sasano Y, Sato H, Mayanagi H (1997)**

Development of interglobular dentine in rat molars and its relation to maturation of enamel. *Anat Embryol Berl* 196(6): 477-83

**Kallenbach E (1977)**

Fine structure of secretory ameloblasts in the kitten. *Amer J Anat* 148: 479

**Karg HA, Burger EH, Lyaruu DM, Woltgens JH, Bronckers AL (1997)**

Gene expression and immunolocalisation of amelogenins in developing embryonic and neonatal hamster teeth. *Cell and Tissue Research* 288(3): 545-55

**Kogaya Y (1989)**

Histochemical properties of sulfated glycoconjugates in developing enameloid matrix of the fish *Polypterus senegalus*. *Histochemistry* 91: 185-190

**Kogaya Y, Furuhashi K (1988)**

Sulfated glycoconjugates in rat incisor secretory ameloblasts and developing enamel matrix. *Calcif Tissue Int* 43: 307-318

**Lau EC, Mohandas TK, Shapiro LJ, Slavkin HC, Snead ML (1989)**

Human and mouse amelogenin gene loci are on the sex chromosomes. *Genomics* 4: 162-168

**Listgarten MA (1976)**

Structure of surface coatings on the teeth: a review. *J Periodontol* 47: 139-144

**MacDougall M, Simmons D, Dodds A, Knight C, Luan X, Zeichner-David M, Zhang C, Ryu OH, Qian Q, Simmer JP, Hu CC (1998)**

Cloning, characterization, and tissue expression pattern of mouse tuftelin cDNA. *Journal of Dental Research* 77(12): 1970-8

**Matthiessen ME (1967)**

Comparative enzyme histochemical studies on the development of teeth in man, pig, and mouse. Alkaline phosphatase, acid phosphatase, and unspecific AS-esterase. *Acta Anat* 66: 375-86

**Mechanic GL (1971)**

The multicomponent re-equilibrating protein system of bovine embryonic enamelin (dental enamel protein): Chromatography in deaggregating solvents. In Fearnhead RW and Stack MV (Eds.). *Tooth Enamel II*. pp. 88-92. Wright Bros., Bristol

**Menanteau J, Meflah K, Strecker G (1988)**

The carbohydrate moiety of mineral-bound proteins from fetal enamel: a basis for enamelin heterogeneity. *Calcif Tissue Int* 42: 196-200

**Miake Y, Shimoda S, Fukae M, Aoba T (1993)**

Epitaxial overgrowth of apatite crystals on the thin ribbon precursor at early stages of porcine enamel mineralization. *Calcif Tissue Int* 53: 249-256

**Moradian-Oldak J, Tan J, Fincham AG (1998 b)**

Interactions of amelogenin with hydroxyapatite crystals: an adherence effect through amelogenin molecular self-association. *Biopolymers* 46(4): 225-38

**Moradian-Oldak J (2001)**

Amelogenins: assembly, processing and control of crystal morphology. *Matrix Biology* 20: 293-305

**Moradian-Oldak J, Simmer JP, Lau EC, Sarte PE, Slavkin HC, Fincham AG (1994a)**

Detection of monodisperse aggregates of a recombinant amelogenin by dynamic light scattering. *Biopolymers* 34: 1339-1347

**Nanci A, Bendayan M, Slavkin HC (1985)**

Enamel protein biosynthesis and secretion in mouse incisor secretory ameloblasts as revealed by high-resolution immunocytochemistry. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 33(11): 1153-60

**Nanci A, Ahluwalia JP, Pompura JR, Smith CE (1989 a)**

Biosynthesis and secretion of enamel proteins in the rat incisor. *Anat Rec* 224: 277-291

**Nanci A, Ahluwalia JP, Zalzal S, Smith CE (1989 b)**

Cytochemical and biochemical characterization of glycoproteins in forming and maturing enamel of the rat incisor. *J Histochem Cytochem* 37: 1619-1633

**Nanci A, Kawaguchi H, Kogaya Y (1994)**

Ultrastructural studies and immunolocalization of enamel proteins in rodent secretory stage ameloblasts processed by various cryofixation methods. *Anatomical Record* 238: 425-436

**Nanci A, McKee MD, Smith CE (1992)**

Immunolocalization of enamel proteins during amelogenesis in the cat. *Anat Rec* 233: 335-349

**Nanci A, Slavkin HC, Smith CE (1987 a)**

Application of high-resolution immunocytochemistry to the study of the secretory, resorptive, and degradative functions of ameloblasts. *Adv Dent Res* 1: 148-161

**Nanci A, Slavkin HC, Smith CE (1987 b)**

Immunocytochemical and radioautographic evidence for secretion and intracellular degradation of enamel proteins by ameloblasts during the maturation stage of amelogenesis in rat incisors. *Anat Rec* 217: 107-123

**Nanci A, Warshawsky H (1984)**

Characterization of putative secretory sites on ameloblasts of the rat incisor. *Am J Anat* 171:163-171

**Ogata Y, Shimokawa H, Sasaki S (1988)**

Purification, characterization and biosynthesis of bovine enamelin. *Calcif Tissue Int* 43: 389-399

**Overall CM, Limeback H (1988)**

Identification and characterization of enamel proteinases isolated from developing enamel. Amelogenolytic serine proteinases are associated with enamel maturation in pig. *Biochem J* 15: 965-972

**Pannese E (1961)**

Observations of the ultrastructure of the enamel organ II. *J Ultrastruct Res* 5: 328 – 42

**Pannese E (1962)**

Observations of the ultrastructure of the enamel organ III. *J Ultrastruct Res* 6: 186 – 204

**Plate U, Höhling HJ (1994)**

Morphological and structural studies of early mineral formation in enamel of rat incisors by elektron spectroscopic imaging (ESI) and elektron spectroscopic diffraction (ESD). *Cell Tissue Res* 277: 151-158

**Reith EJ (1970)**

The stages of amelogenesis as observed in molar teeth of young rats. *J Ultrastruct Res* 30: 111

**Reith EJ, Cotty VF (1967)**

The absorptive activity of ameloblasts during maturation of enamel. *Anat Rec* 157: 577

**Robinson C, Fuchs P, Deutsch D, Weatherell JA (1978)**

Four chemically distinct stages in developing enamel from bovine incisor teeth. *Caries Res* 12: 1

**Robinson C, Briggs HD, Atkinson PJ, Waetherell JA (1981)**

Chemical changes during formation and maturation of human deciduous enamel. *Arch Oral Biol* 26: 1027

**Robinson C, Kirkham J, Brookes SJ, Bonass WA, Shore RC (1995)**

The chemistry of enamel development. *Int J Dev Biol* 39: 145-152

**Robinson C, Kirkham J, Fincham A (1989 a)**

The enamelin/non-amelogenin problem. A brief review. *Connect Tissue Res* 22: 93-100

**Robinson C, Shore RC, Kirkham J, Stonehouse NJ (1990)**

Extracellular processing of enamel matrix proteins and the control of crystal growth. *J Biol Buccale* 18: 355-361

**Robinson C, Shore RC, Kirkham J (1989 b)**

Tuft protein: its relationship with the keratins and the developing enamel matrix. *Calcif Tissue Int* 44: 393-398

**Rönholm E (1962)**

The amelogenesis of human teeth as revealed by electron microscopy. 11. The development of enamel cristallites. *J ultrastruct Res* 6: 249

**Ryu OH, Fincham AG, Hu CC, Zhang C, Quian Q, Barlett JD, Simmer JP (1999)**

Characterization of recombinant pig enamelysin activity and cleavage of recombinant pig and mouse amelogenins. *Journal of Dental Research* 78(3): 743-50

**Salido EC, Yen PH, Koprivnikar K, Yu LC, Shapiro LJ (1992)**

The human enamel protein gene amelogenin is expressed from both the X and the Y chromosomes (see comments). *Am J Hum Genet* 50: 303-316

**Sasagawa I (1998)**

Activity of alkaline and acid phosphates in dental epithelial cells and enameloid during odontogenesis in two teleost fish, *Oreochromis niloticus* and *Tilapia buttkoferi*. *Eur J Oral Sci* 106 Suppl 1: 513-8

**Sasaki T, Takagi M, Yanagisawa T (1997)**

Structure and function of secretory ameloblasts in enamel formation. *Ciba Found Symp* 205: 32-46, discussion 46-50

**Scott JH, Symons NBB (1991) Introduction to dental anatomy. In: Shimoda S, Aoba T, Moreno EC (Hrsg)**

Changes in acid-phosphate content in enamel mineral during porcine amelogenesis. Churchill-Livingstone, Edinburgh, 1974  
*J Dent Res* 70: 1516-1523

**Slavkin HC, Bessem C, Bringas P Jr, Zeichner-David M, Nanci A, Snead ML (1988)**

Sequential expression and differential function of multiple enamel proteins during fetal, neonatal, and early postnatal stages of mouse molar organogenesis. *Differentiation* 37: 26-39

**Smith CE, Pompura JR, Borenstein S, Fazel A, Nanci A (1989)**

Degradation and loss of matrix proteins from developing enamel. *Anat Rec* 224: 292-316

**Stratmann U, Barckhaus RH, Lyaruu DM, Wöltgens JH, Wessling G, Baumeister A (1991)**

Electron probe X-ray microanalysis of calcium and phosphorus distribution in developing hamster tooth germs in vitro and in vivo. *Acta Anat (Basel)* 140: 343-349



**Suga S (1982)**

Progressive mineralization pattern of developing enamel during the maturation stage. *J Dent Res* 61: 1532

**Suga S (1989)**

Enamel hypomineralization viewed from the pattern of progressive mineralization of human and monkey developing enamel. *Advances in Dental Research* 3(2): 188-98

**Sydney-Zax M, Mayer I, Deutsch D (1991)**

Carbonate content in developing human and bovine enamel. *J Dent Res* 70: 913-916

**Takano Y (1992)**

Histochemical Demonstration and microanalysis of possible calcium binding sites in the enamel organ of rat incisors. *Scanning Microscopy* 6: 773-784

**Takano Y, Hanaizumi Y, Ohshima H (1996)**

Occurrence of amorphous and crystalline mineral deposits at the epithelial-mesenchymal interface of incisors in the calcium-loaded rat. Implication of novel calcium binding domains. *Anat Rec* 245: 174-185

**Tanabe T, Aoba T, Moreno EC, Fukae M, Shimizu M (1990)**

Properties of phosphorylated 32 kd nonamelogenin proteins isolated from porcine secretory enamel. *Calcif Tissue Int* 46: 205-215

**Tanabe T, Fukae M, Shimizu M (1994)**

Degradation of enamelin by proteinases found in porcine secretory enamel in vitro. *Arch Oral Biol* 39: 277-281

**TenCate AR (1994)**

Oral histology development, structure and function. 4<sup>th</sup> Edition. Mosby, St. Louis Baltimore Boston

**Termine JD, Belcourt AB, Christner PJ, Conn KM, Nylén MU (1980 a)**

Properties of dissociatively extracted fetal tooth matrix proteins. I. Principal molecular species in developing bovine enamel. *Journal of Biological Chemistry* 255(20): 9760-8

**Termine JD, Eanes ED, Conn KM (1980 b)**

Phosphoprotein modulation of apatite crystallization. *Calcified Tissue International* 31(3): 247-51

**Uchida T, Tanabe T, Fukae M, Shimizu M (1991 a)**

Immunocytochemical and immunochemical detection of a 32 kDa non-amelogenin and related proteins in porcine tooth germs. *Arch Histol Cytol* 54: 527-538

**Uchida T, Tanabe T, Fukae M, Shimizu M, Yamada M, Miake K, Kobayashi S (1991 b)**

Immunochemical and immunohistochemical studies, using antisera against porcine 25 kDa amelogenin, 89 kDa enamelin and the 13-17 kDa nonamelogenins, on immature enamel of the pig and rat. *Histochemistry* 96: 129-38

**Väkevä L, Mackie E, Kantomaa T, Thesieff (1990)**

Comparison of the distribution patterns of tenascin and alkaline phosphatase in developing teeth, cartilage, and bone of rats and mice. *Anat Rec* 228: 69-76

**Watson, MI (1960)**

The extracellular nature of crystals in enamel. *Anat Rec* 224: 242-262

**Weidmann SM, Eyre DR (1971)**

The protein of mature and foetal enamel. In: Fearnhead RW, Stack MV: *Tooth enamel* 11. Wright, Bristol 72

**Weinstock A, Leblond CP (1971)**

Elaboration of matrix glycoprotein of enamel by the secretory ameloblasts of the rat incisor as revealed by radioautography after galactose H injection. *J Cell Biol* 51: 26

**Wöltgens JH, Lyaruu DM, Bervoets TJ (1991)**

Possible functions of alkaline phosphatase in dental mineralization: cadmium effects. *J Biol Buccale* 19: 125-128

**Wöltgens JH, Lyaruu DM, Bronckers AL, Bervoets TJ, Van Duin M (1995)**

Biom mineralization during early stages of the developing tooth in vitro with special reference to secretory stage of amelogenesis. *Int J Dev Biol* 39: 203-212

**Yamakoshi Y, Tanabe T, Fukae M, Shimizu M (1989)**

Amino acid sequence of porcine 25kDa Amelogenin, in Fearnhead RW (Ed.). *Tooth Enamel V*, pp. 314-321, Florence, Yokohama

**Yuan ZA, Golub EE, Collier PM, Gibson CW (1995)**

Bovine enamel organ cells express tissue non-specific alkaline phosphatase mRNA. *J Dent Res* 74: 1886-1890

**Zeichner-David M, Vo H, Reyna J, Hsu P, Wang T, Thiemann F, Slavkin HC (1996)**

The "other" enamel proteins (abstract). *Connect Tissue Res* 35: 130

**Zeichner-David M, Vides J, MacDougall M, Fincham A, Snead ML, Bessein C, Slavkin HC (1988)**

Biosynthesis and characterization of rabbit tooth enamel extracellular matrix proteins. *Biochem J* 1: 631-641

**Zeichner-David M, Vo H, Tan H, Diekwisch T, Berman B, Thiemann F, Alcocer MD, Hsu P, Wang T, Eyna J, Caton J, Slavkin HC, MacDougall M (1997)**

Timing of the expression of enamel gene products during mouse tooth development. *Int J Dev Biol* 41: 27-38

## 7 Danksagung

---

Zunächst möchte ich Herrn PD Dr. Hans-Peter Wiesmann und PD Dr. Udo Stratmann für die Mithilfe bei der Präparation der Rattenzähne danken. Ferner danke ich PD Dr. Hans-Peter Wiesmann für die Überlassung des Themas und die Betreuung der Arbeit.

Außerdem danke ich Frau Anna Struck für die Unterstützung bei den Ultradünnschnitten und dem Kontrastieren der Proben.

Ebenso möchte ich Prof. Hans-Jürgen Höhling und Dr. Ulrich Plate für ihre wertvollen Hinweise bei der Korrektur der Arbeit danken.

## 8 Lebenslauf

---

Jan Heermann

### Persönliche Daten

geboren am	01.03.1971
in	Essen
Eltern	Prof. Dr. med. Joachim Heermann und Irmtraud Heermann, geb. Bode (2 Geschwister)

### Ausbildungsdaten

1977-81	Grundschule Carl-Funke, Essen
1981-92	Helmholtz Gymnasium, Essen
6/92	Abitur
8/1992	Beginn der Zahntechnikerlehre
4/1993	Beginn des Zahnmedizinstudiums an der Wilhelms-Universität Münster
3/1994	Vorphysikum
3/1996	Zahnärztliche Vorprüfung
11/1998	Staatsexamen
1/1999-3/1999	Zahnärztliche Tätigkeit im Hilfsprojekt „Zahnarztthilfe Brasilien“ (Cuiabá, Mato Grosso, Brasilien)
5/1999	Assistent in freier Praxis Dr. Kracht, Hattingen

8/2000 – 10/2002      Assistent in freier Praxis Dres. Thiemer  
(Tätigkeitsschwerpunkt Implantologie), Bochum

11/2002 – 6/2003      angestellter Zahnarzt in der Praxis Dres. Thiemer

seit 7/2003              niedergelassener Zahnarzt in der Gemeinschaftspraxis  
Dres. Thiemer

Essen, den 1. Juni 2004