

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Institut für Osteologie und Biomechanik

Univ.-Prof. Dr. med. Michael Amling

**Untersuchungen zur Rolle der Ribosomalen S6 Kinase 2 (Rsk2) im
Zahnhalteapparat**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Zahnmedizin
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

vorgelegt von:

Franz Andreas Petermann
aus Hamburg-Altona

Hamburg 2016

**Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 09.01.2017**

**Veröffentlicht mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.**

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. M. Amling

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: Prof. Dr. B. Kahl-Nieke

Inhaltsverzeichnis

01 Einleitung	5
1.1 Arbeitshypothese und Fragestellung	5
1.2 Grundlagen	6
1.2.1 Zahnmorphologie	6
1.2.2 Odontogenese	8
1.2.3 Dentin, Schmelz, Zement und Knochen	9
1.2.4 Zahnhalteapparat	14
1.2.5 Parodontologie	15
1.2.6 Coffin-Lowry-Syndrom	20
02 Material und Methoden	24
2.1 Tierhaltung	24
2.1.2 Euthanasie und Präparation der Tiere	24
2.2.1 Radiologische Auswertung	24
2.2.2 Kontaktradiographie	25
2.2.3 MicroCT	25
2.3 Statistik	27
03 Ergebnisteil	28
3.1 Überzählige Zähne bei Rsk2-defizienten Mäusen	28
3.2 Dentinhypoplasie bei Rsk2-defizienten Mäusen	29
3.3 Alveolarknochenabbau bei Rsk2-defizienten Mäusen	30
3.4 Überexpression von Fra1 bei Rsk2-defizienten Mäusen	34
3.5 Überexpression von TNF-α bei Rsk2-defizienten Mäusen	36
04 Diskussion	38
4.1 Rsk2 Einfluss auf die Zahnzahl	38
4.2 Rsk2 Einfluss auf die Dentinbildung	38
4.3 Rsk2 im parodontalen Halteapparat	39
4.4 Einfluss von TNF-alpha-Überexpression bei Rsk2-defizienten Tieren	43
05 Zusammenfassung	45
06 Summary	46

07 Abkürzungsverzeichnis	47
08 Literaturverzeichnis	48
09 Danksagung	55
10 Lebenslauf	56
11 Eidesstattliche Versicherung	57

01 Einleitung

1.1 Arbeitshypothese und Fragestellung

Parodontitis bezeichnet den entzündlichen Abbau des Zahnhalteapparats. Ein Großteil der deutschen, erwachsenen Bevölkerung (ca. 52 - 65%) ist von dieser Erkrankung betroffen und sie ist weltweit einer der häufigsten Gründe für Zahnverlust (Jordan and Micheelis, 2016, Micheelis and Schiffner, 2006). Darüber hinaus gilt Parodontitis als wesentlicher Risikofaktor für koronare Herzerkrankungen, Diabetes und Frühgeburten (Beck et al., 1996, Noack, 2008).

Durch mechanische Reinigung und antibiotische Therapien kann ein Fortschreiten der Parodontitis meist verhindert werden. Eine vollständige parodontale Regeneration im Sinne einer „restitutio ad integrum“ ist allerdings nicht mehr zu erreichen. Für die Entwicklung neuer regenerativer Therapien ist es daher wichtig, die Entwicklung und Homöostase des Zahnhalteapparats auf molekularer Ebene besser zu verstehen.

Eine Möglichkeit bietet hierbei die Analyse von genetischen Erkrankungen, wie das Coffin-Lowry-Syndrom (CLS), die durch Entwicklungsstörungen des Zahnhalteapparats gekennzeichnet sind. CLS ist eine seltene, vererbte Erkrankung, die durch inaktivierende Mutationen in einem für die Ribosomale S6 Kinase 2 (Rsk2) kodierenden Gen verursacht wird. CLS zeichnet sich durch psychomotorische Retardierung und skelettale Symptome aus. Dentale Anomalien, wie Zahnunterzahl und juveniler Zahnverlust sind häufig zu finden (Norderyd and Aronsson, 2012). Bekannt ist, dass Rsk2 einen wichtigen Einfluss auf den Knochenaufbau durch eine Förderung der Osteoblastenfunktion besitzt (David et al., 2005). Es ist jedoch unklar, ob diese fehlende osteoanabole Wirkung von Rsk2 auch für den frühzeitigen Zahnverlust bei CLS verantwortlich ist, oder ob andere Gewebe des Zahnhalteapparats hierbei eine Rolle spielen.

In dieser Arbeit soll daher an Rsk2-defizienten Mäusen mittels Kontaktradiographie und micro-Computertomographie untersucht werden, welche Auswirkungen eine Inaktivierung von Rsk2 auf die postnatale Zahnentwicklung besitzt.

Außerdem soll an Rsk2-defizienten Mäusen analysiert werden, wie sich eine Steigerung des Knochenaufbaus durch Überexpression des osteoanabolen Faktors Fra1 bzw. des Knochenabbaus durch Überexpression des Entzündungsmediators TNF-alpha auf den parodontalen Halteapparat auswirkt.

1.2 Grundlagen

1.2.1 Zahnmorphologie

Zähne nehmen eine zentrale Rolle in der Nahrungsaufnahme ein. Bei den meisten Spezies sind die Zähne im Ober- und Unterkiefer jeweils in einem Zahnbogen angeordnet. Die Zahnbögen sind hierbei in der Medianebene spiegelbildlich, wodurch das Gebiss in vier Quadranten eingeteilt werden kann. Säugetiere weisen meist verschiedene Zahnformen auf (Heterodontie, Heteromorphie). Es wird unterschieden in Schneidezähne (Incisivi), Eckzähne (Canini), vordere Backenzähne (Praemolares) und hintere Backenzähne (Molares). Die Zähne unterscheiden sich in ihrer Form, welche der spezifischen Funktion zugutekommt. Die schaufelförmigen Incisivi dienen der Abtrennung, die dolchartigen Canini dem Ergreifen und Festhalten und die mörser-/pastillförmigen (Prae)Molares dem Zermahlen der Nahrung (Hillson, 1986). Die Anzahl und Form der Zähne sind bei den verschiedenen Säugetierarten den verschiedenen Ernährungsgewohnheiten angepasst (Keil, 1966). So hat z.B. der Mensch, als Allesfresser (Omnivor), 2 Incisivi, 1 Caninus, 2 Praemolares und 3 Molares pro Quadrant. Bei dem Nagetier Maus findet man hingegen in jedem Quadranten nur einen sehr prominenten Incisivus mit langer Wurzel, gefolgt von einer großen unbezahnten Kieferlücke (Diastema) und am Ende finden sich drei Molares (Abb. 1.1.).

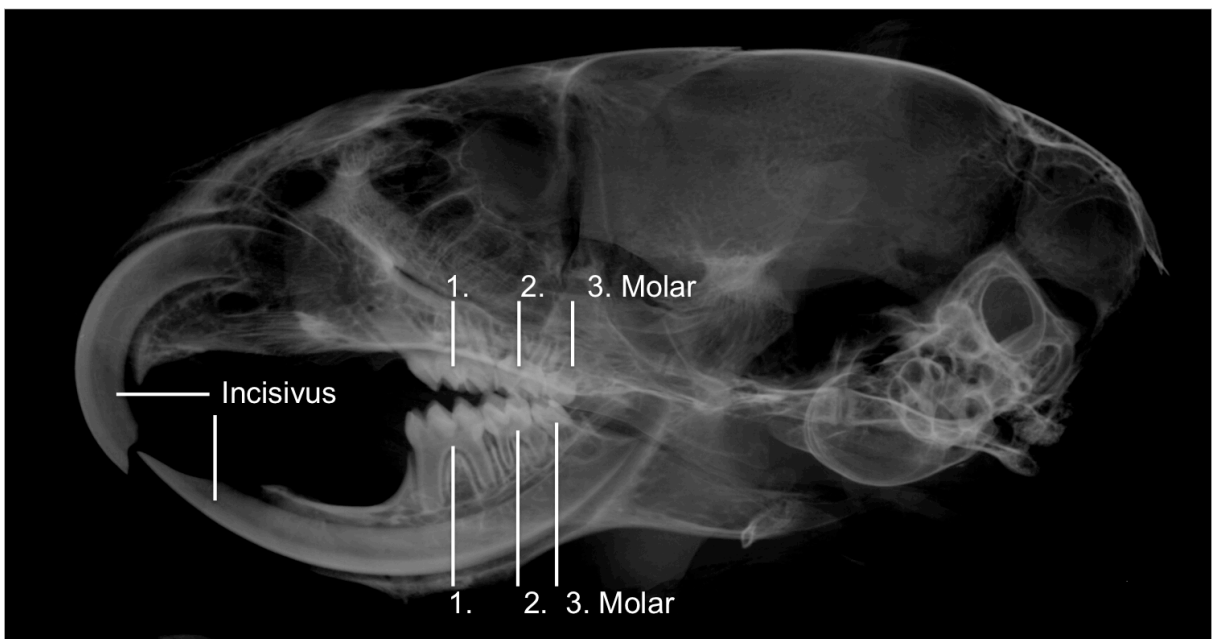


Abb. 1.1: Röntgenaufnahme einer vier Wochen alten Wildtyp-Maus. Die murine Dentition besteht aus einem Incisivus mit langer Wurzel und 3 Molaren pro Quadrant.

Der Zahn wird morphologisch in die Zahnkrone (Corona dentis), den Zahnhals (Collum dentis) und die Zahnwurzel (Radix dentis) eingeteilt.

Zähne zeichnen sich durch eine hohe Widerstandsfähigkeit aus und bestehen aus drei verschiedenen Hartsubstanzen. Im Bereich der Krone liegt von Außen der Schmelz dem Dentin auf. Unterhalb des Zahnhalses wird das Dentin der Zahnwurzel durch Zahnzement bedeckt. Im Inneren des Zahnes, geschützt von den Hartsubstanzen, liegt die weichgewebige Zahnpulpa (Pulpa dentis), auch Zahnmark genannt (Abb. 1.2.).



Abb. 1.2: Histologie eines murinen Molaren. Toluidinblau-gefärbtes Präparat des 1. Unterkiefermolaren einer Wildtyp-Maus (2 Wochen). Der Zahn steht kurz vor dem Durchbruch in die Mundhöhle: 1. Schmelz; 2. Dentin; 3. Zement; 4. Pulpa; 5. Alveolarfortsatz; 6. Mundhöhle; 7. Krone; 8. Hals; 9. Wurzel.

1.2.2 Odontogenese

Zähne entwickeln sich aus Teilen des Ektoderms und speziellen Teilen des Mesenchyms, welche unter dem Begriff Ektomesenchym zusammengefasst werden. Bereits recht früh nach der Fertilisation beginnt die Odontogenese. Dabei schließt sich eine Verdickung des Mundhöhlenepithels in das Mesenchym der Ober- und Unterkieferanlage ein. Aus dieser Zahnleiste bilden sich die Schmelz-/Zahnknospen, welche sich über den Zwischenschritt der Schmelzkappe zur Schmelzglocke differenzieren. Bei der Schmelzglocke wird zwischen innerem und äußerem Schmelzepithel unterschieden. Die Glocke löst ihre epitheliale Verbindung (dentale Lamina) im Laufe der Entwicklung von der Zahnleiste ab. Es bildet sich das Schmelzretikulum zwischen den beiden Schmelzepithelien. Dieser retikuläre Schmelzverband verdickt sich am inneren Schmelzepithel (Stratum intermedium). Eine Basallamina mit Ursprung im Mundhöhlenepithel umschließt die Zahnglocke. Um die Glocke bildet sich aus verdicktem Mesenchym das Zahnsäckchen und im Inneren der Glocke die Zahnpapille. Aus diesem mesenchymalen Säckchen differenziert sich dann später der Alveolarknochen, die Wurzelhaut und das Zahnzement. Aus der Zahnpapille geht die Zahnpulpa hervor. Am äußeren Rand der sich bildenden Pulpa liegen die Odontoblasten in einem Verbund vor. Das innere Schmelzepithel ist durch seine Basallamina von den Odontoblasten getrennt (Membrana praeformativa). Aus den Zellen des inneren Schmelzepithels gehen die Ameloblasten hervor. Odontoblasten bilden das Dentin und die Ameloblasten den Zahnschmelz (Abb. 1.3.).

Das äußere und innere Schmelzepithel wachsen apikal der Krone weiter in die Tiefe und bilden die Hertwigsche epitheliale Wurzelscheide. Aus ihr differenzieren sich Zementoblasten, die das Wurzeldentin bilden.

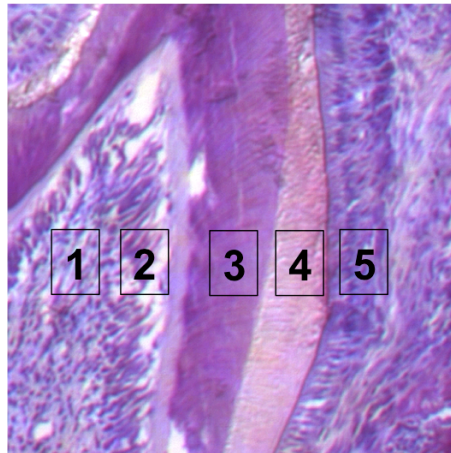


Abb. 1.3: Histologie eines murinen Zahnes: Pulpa (1), Odontoblasten (2), Dentin (3), Schmelz (4), Ameloblasten (5).

1.2.3 Dentin, Schmelz, Zement und Knochen

Die Zahnhartsubstanzen nehmen verschiedene mechanische Funktionen ein und unterscheiden sich dementsprechend in ihrem Verhältnis von organischer zu anorganischer Substanz.

Dentin

Die Grundform des Zahnes wird durch das Dentin (Dentinum, Substantia eburnea) vorgegeben.

Bei der Dentinbildung wandern die Odontoblasten pulpawärts und bleiben dabei über Zellfortsätze untereinander und mit der Membrana praeformativa in Verbindung (Tomes Fasern). Die Odontoblasten produzieren zunächst eine nicht mineralisierte kollagenreiche Matrix (Prädentin). Durch eine schubweise Einlagerung von Apatitkristallen nimmt der Mineralisierungsgrad stetig zu und es bildet sich das definitive Dentin.

Die Odontoblasten stehen den Odontoklasten gegenüber. Diese nehmen eine wichtige Rolle beim Zahnwechsel ein. Sie haben die Fähigkeit Dentin aufzulösen, ein Prozess der nur im Zahnwechsel physiologisch ist. Abbau von Dentin findet sonst nur pathologisch statt, so zum Beispiel bei kariösen Läsionen oder bei mechanischer Überbeanspruchung.

Dentin besteht zum großen Teil (70-80%) aus anorganischer Substanz (Rosenbauer and Engelhardt, 1998). Diese anorganischen Kristalle bestehen aus Hydroxylapatit

$(Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2)$. Dentintubuli durchziehen wellig das Dentin von der Pulpa ausgehend in Richtung Schmelz. Darin verlaufen die Tomes-Fasern.

Odontoblasten sind zeitlebens aktive Zellen, was bedeutet, dass sie kontinuierlich Dentin nachbilden. Hierbei wird das neu gebildete Dentin von innen an das alte Dentin in das Pulpencavum angelagert. Daraus folgt eine stetige Verdrängung der Pulpa. Das so neu gebildete Dentin wird auch als Sekundärdentin bezeichnet. Davon abzugrenzen ist das Tertiärdentin, welches als Abwehr- oder Schutzreaktion des Organismus auf periphere Noxen, wie z.B. Karies, gebildet wird, weswegen es auch als Reizdentin bezeichnet wird.

Schmelz

Schmelz (Enamelum, Substantia adamantia) ist die härteste Substanz des Organismus. Er überzieht die Zahnkrone, läuft zum Zahnhals hin dünn aus und besteht zu 98% aus Hydroxylapatit.

Die Ameloblasten sind die schmelzbildenden Zellen. Mit der Eruption des Zahnes gehen die Ameloblasten zugrunde und es besteht keine weitere Möglichkeit der Schmelzbildung (Schroeder, 2000). Die Ameloblasten verlaufen verschiedene Reifestadien. Zunächst scheiden sie eine nicht mineralisierte Schmelzmatrix aus. Zeitnah erfolgt durch das Protein Amelogenin die Ablagerung von Apatitkristallen. Die Ameloblasten gehen in einem letzten Schritt in ein Reifungsstadium über. Durch eine funktionelle und morphologische Zellumstrukturierung ist es nun möglich, dass ein Austausch von organischen und anorganischen Substanzen ist und die Proteine werden abgebaut. Die anorganischen Kristalle wachsen in der Breite und Größe. In der Folge erlangt der Schmelz seine finale, hohe Mineralisierung (Robinson, 2014). Posterruptiv besteht noch die Möglichkeit der Ionenaufnahme. Diese Fähigkeit wird bei der lokalen Anwendung durch Fluorid therapeutisch zur Kariesprophylaxe genutzt.

Schmelzabbau findet nur pathologisch statt. Neben biochemischen Auflösungen (Karies) wird der Schmelz auch mechanisch durch zu hohe Kräfte zerstört (z.B. Bruxismus, Abrasion).

Zement

Das Zahnzement (Cementum dentalis) findet sich im Bereich der Wurzel unterhalb des Zahnhalses. Es umgibt den Dentinkern ähnlich wie der Schmelz im koronalen Teil. Die Schmelzzementgrenze verläuft girlandenförmig um den Zahn herum. Das Zement hat im Vergleich zu den oben genannten Zahnhartsubstanzen den geringsten anorganischen Anteil mit etwa 65% und ähnelt in seiner Zusammensetzung damit dem Knochen.

Zahnzement nimmt eine sehr zentrale Rolle für die Verankerung des Zahnes im Knochen ein. Obwohl das Zement dem Wurzelentin aufliegt, gehört es definitionsgemäß nicht zum Zahn, sondern zum Zahnhalteapparat (Eickholz, 2013a). Ein wohlgeordnetes kollagenes Fasersystem (Sharpey-Fasern) strahlt in den Zement ein, wodurch die Verbindung zum alveolären Knochen hergestellt wird (Rosenbauer and Engelhardt, 1998).

Ähnlich wie beim Dentin liegen die zementbildenden Zementoblasten und desmodontale Fibroblasten an der Oberfläche des Zements und sind zeitlebens aktiv (Welsch and Deller, 2010a). Werden Zementoblasten in den Zement eingelagert, spricht man von Zementozyten. Dieser Zelltyp hat eine niedrigere metabolische Aktivität als die Zementoblasten. Zementozyten stehen über zytoplasmatische Fortsätze untereinander in Kontakt und ähneln den im Knochen liegenden Osteozyten (Furseth, 1969, Furseth, 1970).

Abhängig von dem Vorkommen von Zementozyten werden zwei verschiedene Arten von Zement unterschieden: Zelluläres und azelluläres Zement. Darüber hinaus wird nach der Art der einstrahlenden kollagenen Fasern unterschieden. Insgesamt werden so beim Menschen fünf Zementarten wie folgt beschrieben: 1. Azelluläres, afibrilläres Zement bildet eine homogene Matrix am zervikalen Schmelz und seine Funktion ist unbekannt (Schroeder, 1992). 2. Azelluläres Fremdfaserzement findet sich im ersten (zervikalen) und mittleren Wurzeldrittel. Die Fasern entstammen dem Desmodont. Dabei handelt es sich um die sog. Sharpey-Fasern (überwiegend Kollagen Typ I) (Schroeder, 1986). 3. Das zelluläre Eigenfaserzement beinhaltet Zementozyten und an der Wurzeloberfläche laufende Fasern, welche die Zementmatrix nicht verlassen. Es befindet sich im apikalen Wurzeldrittel an Teilungsstellen, Resorptionslakunen und Frakturlinien. Er trägt nicht zur direkten Befestigung des Zahnes im Knochen bei, vernetzt sich aber mit dem Dentin und hat vermutlich reparative Funktionen (Bosshardt and Schroeder, 1992, Schroeder,

1992). 4. Azelluläres Eigenfaserzement beherbergt hingegen keine Zellen. Es ähnelt dem zuvor genannten Zement und findet sich im apikalen Drittel und in Furkationen. Dieses Zement trägt zur Adaptation der Wurzel bei (Schroeder, 1992). 5. Das zelluläre Gemischtfaserzement besteht aus azellulärem Fremdfaserzement sowie azellulärem und zellulärem Eigenfaserzement und befindet sich sowohl in Furkationen als auch im apikalem Wurzeltrittel. Diese Mischform trägt ebenso zur Adaptation der Wurzeloberfläche und Verankerung des Zahnes im Knochen bei (Eickholz, 2013a).

Knochen

Knochen hat im Vergleich zum Schmelz mit 65% einen deutlich höheren anorganischen Anteil (Welsch and Deller, 2010b). Die organische Matrix nimmt im Knochen eine wichtige Organisations- und Stützfunktion ein. Durch den niedrigen Mineralgehalt, erhält der Knochen eine höhere Flexibilität, im Gegenzug aber auch eine niedrigere Steifigkeit und Härte (Currey, 1969).

Die Knochenbildung ähnelt der Bildung von Schmelz, Dentin und Zement. Die knochenbildenden Osteoblasten sondern eine organische Matrix ab, an der sich Hydroxylapatitkristalle anlagern. Die Mineralisation wird in eine primäre und sekundäre Mineralisation unterschieden. In der primären Mineralisation lagern sich eine histologisch abgrenzbare Schicht an der organischen Matrix an, es folgt eine sekundäre, geringere Nachreifung. Osteoblasten, die während des Wachstums eingeschlossen werden, verlieren ihre knochenbildende Funktion. Diese Osteozyten stehen über gap junctions mit den anderen Zellen in Verbindung und haben eine wichtige Rolle im Knochenmetabolismus.

Den Osteoblasten stehen die knochenabbauenden Osteoklasten gegenüber. Osteoblasten bilden ein azides Milieu, was eine Herauslösung der Mineralien aus der Knochenstruktur zur Folge hat, die organische Kollagenmatrix wird durch Enzyme abgebaut (Teitelbaum, 2007).

Zeitlebens findet eine physiologische, ausgeglichene Knochenresorption und Knochenapposition statt. Es entsteht ein Gleichgewicht von zellulärem Auf- und Abbau (Turnover), was eine ständige Erneuerung des Knochens zur Folge hat (Remodeling). Der Knochenmetabolismus kann durch hormonelle und äußere Einflüsse gesteuert werden (Ducy et al., 2000).

Beim Knochen unterscheidet man makroskopisch zwei verschiedene Bereiche. Kompakter Knochen (Substantia corticalis oder Substantia compacta) findet sich außen am Knochen. Im Inneren eines Knochens befindet sich ein dreidimensionales knöchernes Geflecht, spongiöser Knochen (Substantia spongiosa) oder auch trabekulärer Knochen genannt. In den entstandenen Zwischenräumen befindet sich blutbildendes Gewebe und Fettgewebe.

Knochen entsteht über zwei verschiedene Wege, der desmalen und chondralen Ossifikation. Bei der desmalen Knochenbildung differenzieren sich Mesenchymzellen direkt zu Osteoblasten. Bei der chondralen Ossifikation wird zuerst Knorpel von den Chondroblasten gebildet, der dann in mehreren Schritten abgebaut und durch Knochengewebe ersetzt wird.

Der Kieferknochen wird größtenteils desmal gebildet. Den zahntragenden Teil des Kieferknochens bezeichnet man als Alveolarknochen. Der Alveolarknochen steht in einer engen wechselseitigen Abhängigkeit zu den Zähnen. So wächst er mit den Zähnen beim Zahndurchbruch, gibt ihnen in der Nutzphase Halt und atrophiert, wenn die Zähne verloren gehen.

Systematisch wird der Knochen unterteilt in den eigentlichen Alveolarknochen, der dem Zahn direkt zugewandt ist, die Kompakta welche von außen aufliegt, und die netzartige Spongiosa zwischen den zuvor genannten Schichten (Abb. 1.3.).

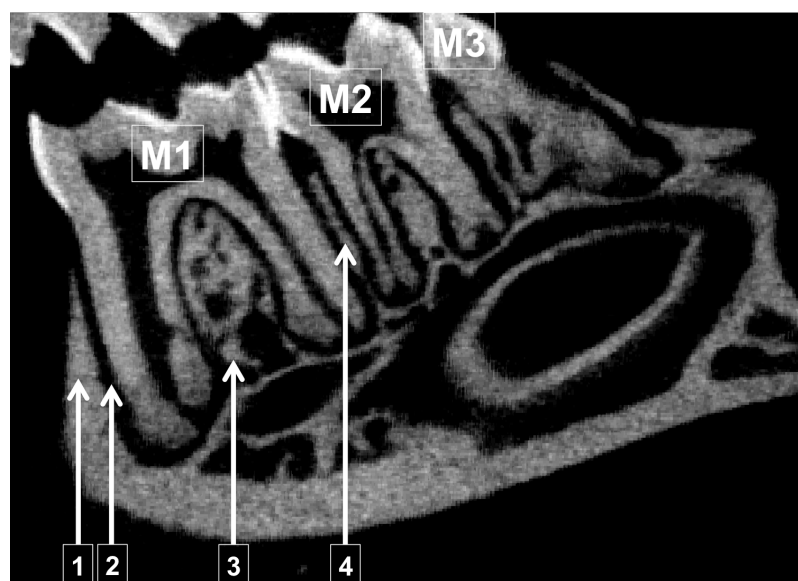


Abb. 1.3: μ CT-2D-Rekonstruktion eines murinen Kieferknochens (Wildtypmaus, 16 Wochen). 1. Kompakta, 2. Desmodontalspalt, 3. Spongiosa, 4. Alveolarknochen. Unterkiefermolaren (M1-M3).

1.2.4 Zahnhalteapparat

Der Zahnhalteapparat (Parodont) besteht aus vier Komponenten: Zement, Wurzelhaut (Desmodont, Ligamentum periodontale), Alveolarknochen und die mit diesen Strukturen verbundene Gingiva (Zahnfleisch) (Abb. 1.3. & 1.4.). Das Parodont verfügt über Rezeptoren, die Schmerz, taktile Reize und Druck übertragen. Die Funktion des Parodonts besteht zum einen darin, den Zahn im Kiefer zu verankern, und zum anderen das aseptische Ökosystem der inneren Gewebe vor Kontamination abzusichern (Listgarten et al., 1991).

Das Zement nimmt hierbei eine zentrale Rolle ein, da es über spezialisierte kollagene Fasern des Desmodonts (Sharpey-Fasern) den Zahn im Alveolarfach verankert. Die Fasern ziehen durch den Periodontalspalt hindurch und halten den Zahn so in einer federnden Art und Weise fest.

Neben den kollagenen Sharpey-Fasern besteht das Desmodont aus zellulärem lockerem Bindegewebe (Fibrozyten, Zementoblasten, Osteoprogenitorzellen, Osteoblasten, Osteoklasten) sowie Blutgefäßen und sensiblen Nerven (Propriozeptoren für Tiefensensibilität). Das Reservoir von Zellen ist für den Aufbau, die Aufrechterhaltung, das Remodeling und die Heilung des Alveolarknochens und des Wurzelzements erforderlich (Eickholz, 2013a). Der hohe Zellgehalt und die relativ hohe Umsatzrate seiner Bestandteile ermöglichen dem Desmodont einen schnellen Umbau. Dies ist die Grundlage für normale prä- und posteruptive, wie auch orthodontische Zahnbewegungen (Eickholz, 1999).

In den Alveolarfortsatz inserieren die Sharpey-Fasern. Er ist der zahntragende Teil des Kieferknochens und hat Fächer, in welchen die Zahnwurzeln stecken, die Alveolen. Das bereits oben beschriebene knöcherne Remodeling bedingt ständige funktionsabhängige Umbauprozesse (Ott et al., 2002). Bei Zahnverlust und fehlender physiologischer Belastung kann der Knochen schnell atrophieren.

Die Gingiva bedeckt den Alveolarknochen. Sie besteht aus epithelialen und bindegewebsartigen Anteilen sowie Nerven und Gefäßen (Eickholz, 2013a). Zum großen Teil ist dieser Teil der Mundschleimhaut fest mit dem Periost verbunden, lediglich ein kleiner Teil über dem Limbus alveolaris (Alveolarfortsatzspitze) ist beweglich (freie Gingiva). Der zuletzt genannte Teil der Gingiva ist durch den Sulcus gingivalis von der Zahnkrone getrennt (Abb. 1.4.). Der von außen nicht sichtbare Ausläufer der freien Gingiva endet im Sulcus und lagert sich hier mit einem

epithelialen Attachment (Saumepithel) an den Zahnschmelz an. Der epitheliale Ansatz stellt den koronaren Anteil der dentogingivalen Verbindung dar, also der Zone, in der sich die extraalveoläre Zahnoberfläche und die Gingiva berühren (Schroeder, 1996). Das gesunde Epithel verhindert das Eindringen von Bakterien in das Parodontium. Das gesamte Epithel spielt so eine wichtige Rolle in der peripheren Abwehr parodontaler Infektionen. Passiv eindiffundierte Bakterien können im Saumepithel erkannt, opsoniert und phagozytiert werden (Eickholz, 2013a).

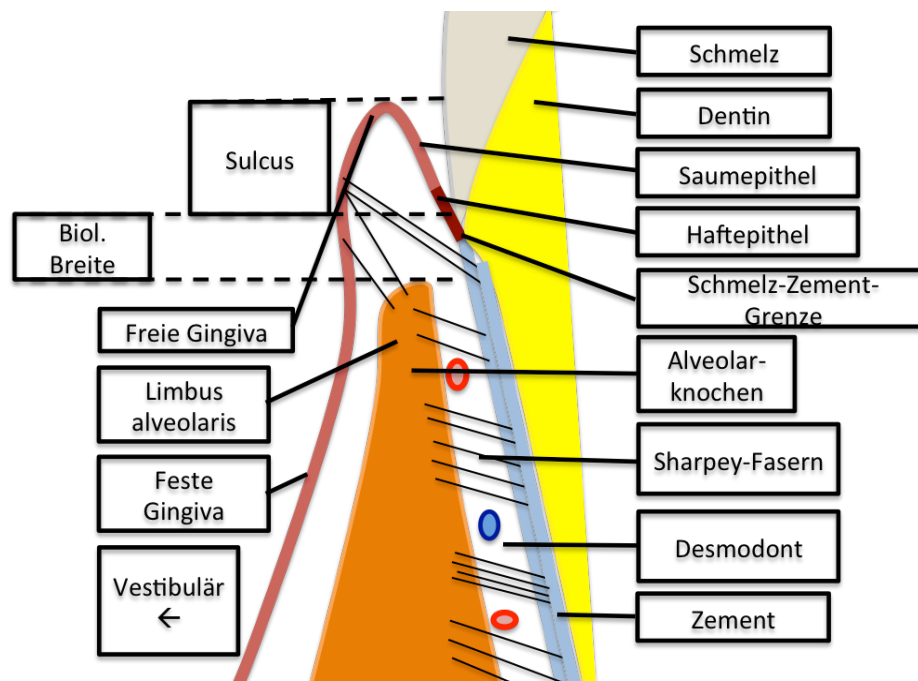


Abb. 1.4: Schematische Darstellung des Zahnhalteapparats.

1.2.5 Parodontologie

Die häufigsten Erkrankungen des Zahnhalteapparats sind plaqueassoziierte, meist chronisch entzündliche Veränderungen. Als Gingivitis wird eine Entzündung der Gingiva bezeichnet. Bei der Parodontitis greift die Entzündung auch den tiefer liegenden Zahnhalteapparat an und verursacht Knochenabbau. Eine Gingivitis kann jahrelang bestehen, ohne sich zu einer Parodontitis zu entwickeln. Außerdem ist sie über Plaquekontrolle reversibel. Die Parodontitis entwickelt sich in der Regel aus einer mehr oder weniger ausgeprägten Gingivitis. Sie ist auf Grund der limitierten

Regenerationsfähigkeit des Zahnzements und Knochens nur beschränkt reversibel (Rateitschak and Wolf, 2003d).

Parodontitiserkrankungen beschränken sich nicht auf den dentoalveolären und oralen Bereich. Die systemische Wirksamkeit der pathogenen Keime führt zu einer erhöhten Suszeptibilität für bestimmte Allgemeinerkrankungen. So besteht ein erhöhtes Risiko für Diabetes mellitus und Arteriosklerose. Außerdem konnte gezeigt werden, dass Parodontitis ein Risikofaktor für Frühgeburten darstellt. Auch hier spielen die aus dem oralen Entzündungsherd stammenden Zytokine einen Schlüsselmechanismus (Beck et al., 1996, Noack, 2008).

1.2.5.1 Gingivawucherung

Neben einer verstärkten Blutungsneigung ist die Gingivawucherung ein klinisches Indiz für eine Gingivitis. Die Gingiva als Teil des Parodonts nimmt wie zuvor beschrieben eine Schutz- und Barrierefunktion für die tieferen Schichten ein. Häufig entstehen die klassischen Parodontitiden mit einer Entzündung im Gingivaabschnitt. Doch nicht immer ist eine Gingivawucherung Zeichen einer Entzündung des Zahnfleisches. Neben der entzündlichen, plaquebedingten Genese, die lokal oder systemisch modifiziert sein kann, spielen genetische Faktoren, Allgemeinerkrankungen, hormonelle Ursachen, genetische Fibrosen und die Einnahme von Medikamenten (z. B. Calciumkanalblocker, Phenytoin-Präparate, Cyclosporin A) eine Rolle (Eickholz, 2013c, Hassell and Hefti, 1991). Die gebräuchliche Bezeichnung einer Gingivahyperplasie ist irreführend, da neben der Vermehrung der Fibroblasten auch eine Zunahme der extrazellulären Matrix entsteht. Die Gingivawucherungen können so in plaqueinduzierte und nicht plaqueinduzierte Wucherungen eingeteilt werden (Armitage, 2000).

1.2.5.2 Parodontitis

Bei intaktem und klinisch entzündungsfreiem Parodont resultiert nach drei Wochen ungehinderter Plaqueakkumulation eine manifeste Entzündung der Gingiva (Eickholz, 2013b). Diese Gingivitis geht mit den klassischen Entzündungszeichen Tumor, Rubor, Dolor, Calor (Schwellung, Rötung, Schmerz, lokale Temperaturerhöhung) und erhöhter Blutungsneigung einher. Wird der verursachende

supragingivale Biofilm konsequent entfernt, verschwinden diese klinischen Entzündungszeichen nach etwa einer Woche wieder (Eickholz, 2013b). Bei anhaltender Exposition der bakteriellen Beläge schreitet die Gingivitis voran. Bei den meisten Menschen entwickelt sich aus der Penetration in die tieferen Schichten dann eine Parodontitis. Es ist noch nicht endgültig geklärt, bei welchen Patienten sich die Gingivitis zur Parodontitis entwickelt und bei welchen nicht. Wie bei jeder Infektion steht auf der einen Seite die Vermehrung von pathogenen Mikroorganismen, damit verbunden deren toxisches Potenzial und die Fähigkeit der Gewebspenetranz, auf der anderen Seite stehen die unterschiedlichen Reaktionen des Wirts auf den Infekt (Page and Kornman, 1997).

Die Parodontitis imponiert gegenüber der Gingivitis durch die weitgehend irreversible Zerstörung des Zahnhalteapparats, die als Verlust von bindegewebigem Attachment und Knochenabbau festgestellt wird. Dabei ist von einem Individuum zum anderen das Ausmaß und die Zerstörung der Strukturen unterschiedlich. Durch den Attachmentverlust ist der Übergang von Zahnfleisch zum Zahn nach apikal verschoben. Neben ästhetischer Beeinträchtigung wird diese Situation oft als unangenehm wahrgenommen, da freiliegende Zahnhälse vorliegen. Freiliegende Zahnhälse sind also negativ für die Ästhetik, erhöhen die Sensibilität des Zahnes (fehlende Hartsubstanz über den sensiblen Dentinkanälchen) und haben aufgrund der im Vergleich zum Schmelz geringeren Mineralisation ein erhöhtes Kariesrisiko (Rateitschak and Wolf, 2003c). Im ungünstigsten Fall endet die fortschreitende Zerstörung des Zahnhalteapparats mit dem Zahnverlust (Eickholz, 2013b).

Entsprechend der Geschwindigkeit und der Ausbreitung wird zwischen einer aggressiven und einer chronischen Form der Parodontitis unterschieden. Die aggressive Parodontitis verläuft schnell und zeichnet sich durch drei Merkmale aus. Der Betroffene zeigt einen gesunden Allgemeingesundheitsstatus ohne prädisponierende Grunderkrankungen, es herrscht eine rasch fortschreitende Gewebedestruktion vor und es ist eine auffällige familiäre Häufung festzustellen. Die chronische Parodontitis hingegen zeigt einen langsamen, progressiven Verlauf (Eickholz, 2013b).

1.2.5.3 Pathogenese

Bei der Parodontitis, dauert die Entstehung der pathologischen, entzündlichen, abbauenden Prozesse mehrere Tage. Die ersten pathogenen Bakterien, die sich an den Zahn anlagern, sind dabei nicht direkt für die Entzündung verantwortlich. Vielmehr bilden sie ein Grundgerüst, an das weitere Bakterien andocken, die in der Summe dann das Gewebe reizen. Aus den Reizen folgt als Immunantwort des Körpers eine erhöhte Leukozytenanzahl. Es bildet sich ein histologisch erkennbarer Leukozytenwall im Sulkus. Der Leukozytenwall führt allerdings auch bei anhaltender Bakterienbesiedlung zu einer Auflockerung des Saumeithels und somit ist das Vordringen der Bakterien in subgingivale Bereiche erleichtert. Es entstehen gingivale Taschen. Im weiteren Verlauf dringen die Bakterien weiter in die Tiefe vor und zunehmend sind anaerobe parodontopathogene Bakterienstämme nachzuweisen (unter anderem: *Actionobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsynthesis*). Diese Bakterien wirken besonders pathogen, da sie die Fähigkeit besitzen, auf der Wurzeloberfläche Kolonien zu bilden (Adhärenz & Kolonienbildung) und sie sich mit anderen Bakterienstämmen zu Clustern/Komplexen zu vereinigen (Koaggregation) (Socransky et al., 1998).

Der Attachmentverlust, also der Abbau von Bindegewebe und Knochen, entsteht durch das Zusammenspiel mehrerer Faktoren. Wichtig ist die zelluläre Deregulation von aufbauenden Zemento-/Osteoblasten und abbauenden Markkophagen. Es entsteht eine Verschiebung von der Gewebshomöostase (Balance zwischen Auf- und Abbau) hin zum forcierten Abbau von Desmodont und Knochen. Ein wichtiger Pathomechanismus ist hierbei die bakteriell bedingte Überaktivierung von Markkophagen, die ihrerseits proinflammatorischen Zytokine abgeben. Neben dem Zytokin Interleukin-1 nimmt der Tumornekrosefaktor- α hierbei eine Schlüsselrolle ein (Kang et al., 2016, Lima et al., 2004, Matsuda et al., 2016). Beide Zytokine werden von ortsständigen Gewebezellen und von Abwehrzellen sezerniert mit dem Ziel die Immunantwort am Ort der Entzündung zu verstärken. Über eine Überaktivierung der Osteoklasten induzieren sie jedoch abbauende Prozesse. Die proinflammatorischen Zytokine beeinflussen also in doppelter Hinsicht die Parodontitis, zum einen fördern sie den Entzündungsprozess, zum andern den Abbau des parodontalen Apparats (Rateitschak and Wolf, 2003b).

1.2.5.4 Therapie

Die Gingivitis ist in der Regel kausal therapierbar, das heißt durch die Beseitigung der Plaque kann die Entzündung reduziert werden und sich die Gingiva regenerieren. Da auch die Parodontitis eine vorwiegend bakterielle Erkrankung ist, sollte der erste Therapieansatz daher antiinfektiös sein. Ähnlich wie bei der supragingivalen Reinigung besteht auch hier die Möglichkeit der mechanischen Reinigung der befallenen Zahn- und Wurzeloberfläche sowie des gingivalen Weichgewebes. In besonderen Fällen kann die Reinigung mit lokal oder systemisch wirkenden Medikamenten unterstützt werden. Darüber hinaus sollten Risikofaktoren eliminiert werden. Dazu gehört zum Beispiel die Aufgabe des Rauchens, aber auch die Einstellung des Blutzuckers bei Diabetikern (Jepsen et al., 2011).

Neben dem primären Therapieansatz (Reinigung und antibakterieller Behandlung) wird zunehmend auch eine Regeneration der Strukturen angestrebt. Eine echte Regeneration aller parodontaler Strukturen wird in diversen Verfahren angestrebt, der Erfolg ist aber uneinheitlich und nicht voraussagbar. Hierbei gibt es verschiedene Therapieansätze (Rateitschak and Wolf, 2003a):

1. Stimulation der körpereigenen Knochenregeneration durch geschlossene oder offene Wurzelreinigung ohne weitere Hilfsmittel

Nach der gründlichen Wurzelreinigung kommt es zu einem alveolären Knochengewinn, allerdings nur bei dauerhafter, optimaler, professioneller Zahnreinigung. Neues Zement und Desmodont bilden sich hierbei kaum. Somit ist die angestrebte Regeneration aller Strukturen nicht erreichbar (Rosling et al., 1976).

2. Einsatz von Knochen und Knochenersatzstoffen

Sowohl autogener (eigener) als auch allogener (humaner), xenogener (Tier) und alloplastischer (künstlicher) Knochen sind osseokonduktiv (die Knochenneubildung leitend) in ihrer Wirkung. Osseoinduktive (die Knochenneubildung anregende) Eigenschaften besitzt hingegen nur autogener Knochen. Alle anderen Präparate wirken nicht relevant osteoinduktiv. Dafür sind sie jedoch leichter verfügbar (Camelo et al., 2001, Rosen et al., 2000, Westfelt et al., 1983, Danesh-Sani et al., 2016). Zu beachten ist jedoch, dass die Bildung von Alveolarknochen immer auch begrenzt wird durch die geringe Regenerationsfähigkeit des Zements.

3. Einsatz von Membranen, zur gesteuerten Geweberegeneration

Eingebrachte Membranen sollen der gesteuerten Heilung dienen. In Form einer mechanischen Barriere wird ein rasches Epithelwachstum und der Kontakt von Wurzeloberfläche und der Gingiva verhindert. So soll eine Regeneration der tieferen Strukturen ermöglicht werden, was in manchen Fällen gute Resultate für den Attachmentgewinn zeigt (Cortellini and Tonetti, 2000, Rateitschak and Wolf, 2003a).

4. Anwendung von Matrixproteinen und Wachstums- bzw. Differenzierungsfaktoren

Das Zusammenspiel von pluripotenten Zellen, extrazellulärer Matrix, Hormonen, Wachstumsfaktoren, bestimmten Matrixproteinen und Signalmolekülen ist die Voraussetzung für die Regeneration aller parodontaler Strukturen (Cochran and Wozney, 1999). Produkte, die diese Substanzen enthalten, setzen hierbei vor allem auf die Regeneration von Zement. So besteht z. Bsp. Emdogain (Straumann®) aus fraktionierten, porcinen Schmelzmatrixproteinen, die zementbildend wirken sollen. Es wird ein Prozess in Gang gesetzt, der Vorgänge der natürlichen Zahnentwicklung nachahmt (Zetterstrom et al., 1997). Die Erfolge mit diesen Proteinen sind zum Teil erstaunlich positiv, jedoch nicht in ausreichendem Maße voraussagbar (Heijl et al., 1997).

Für die Entwicklung von Produkten, die spezifisch und potent die Zementbildung fördern, ist es daher notwendig die Regulationsmechanismen der Zementogenese besser zu verstehen. Eine effiziente Möglichkeit ist hierbei die Analyse von seltenen monogenetischen Erkrankungen, bei denen spezifische Störungen des Zahnhalteapparates vorliegen (McCauley and Somerman, 2012, Cobourne and Sharpe, 2013). Eine in dieser Hinsicht besonders interessante Erkrankung ist das Coffin-Lowry-Syndrom.

1.2.6 Coffin-Lowry-Syndrom

Das Coffin-Lowry-Syndrom wurde erstmals im Jahre 1966 von Coffin beschrieben. Unabhängig davon beschrieb Lowry im Jahr 1971 unwissentlich dasselbe Syndrom. Beide beschrieben Abnormitäten vor allem der Hände und des Gesichts. Einige Jahre später wurde darüber hinaus auch über orodentale Befunde berichtet. Außerdem wurde die Erkrankung mit einer x-chromosomal vererbten Genanomalie begründet. Im Zuge der neuen Erkenntnisse wurde die Schlussfolgerung gezogen, dass es sich bei allen Beschreibungen um das selbe Syndrom handelt und Temtamy

fürhte den noch heute gültigen Namen Coffin-Lowry-Syndrom (CLS) ein (Temtamy et al., 1975).

Als typische Symptome von CLS gelten teigige Hände mit spitzzulaufenden Fingern, eine kleine Statur, mentale Retardierung, ein wulstiges Gesicht, schräg nach unten verlaufende Augenlider bei verbreitertem Augenabstand, eine breite, flache Nase mit ausgeprägtem Septum, umgestülpte und wulstige Lippen, große Ohren, Schädeldeformitäten, sowie eine progressiver Knochenverlust mit erhöhtem Frakturrisiko (Della Cella et al., 1987, Kawana et al., 2014, Vles et al., 1984) (Abb. 1.6.). Darüber hinaus treten auch dentale Abnormitäten auf (Hunter, 2002). Neben Zahnfehlstellungen, Zahnzahl- und Zahnformanomalien wurde insbesondere von Alveolarknochenabbau mit verfrühtem Zahnverlust berichtet (Salinas, 1982, Temtamy et al., 1975, Wassersprung and Sarnat, 2006).

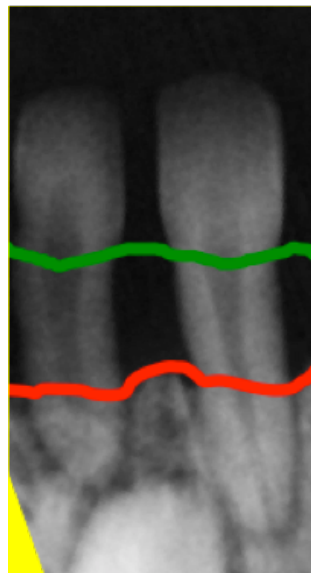


Abb. 1.5: Abbildung nachbearbeitet aus: International Journal of Paediatric Dentistry 2012 March; Ausschnitt einer intraoralen Röntgenaufnahme der Unterkieferfrontzähne eines 3,5 jährigen Coffin-Lowry Patienten. Die rote Linie markiert den pathologisch niedrigen Knochenverlauf, die grüne Linie stellt einen physiologischen Knochenverlauf dar. (Norderyd and Aronsson, 2012).

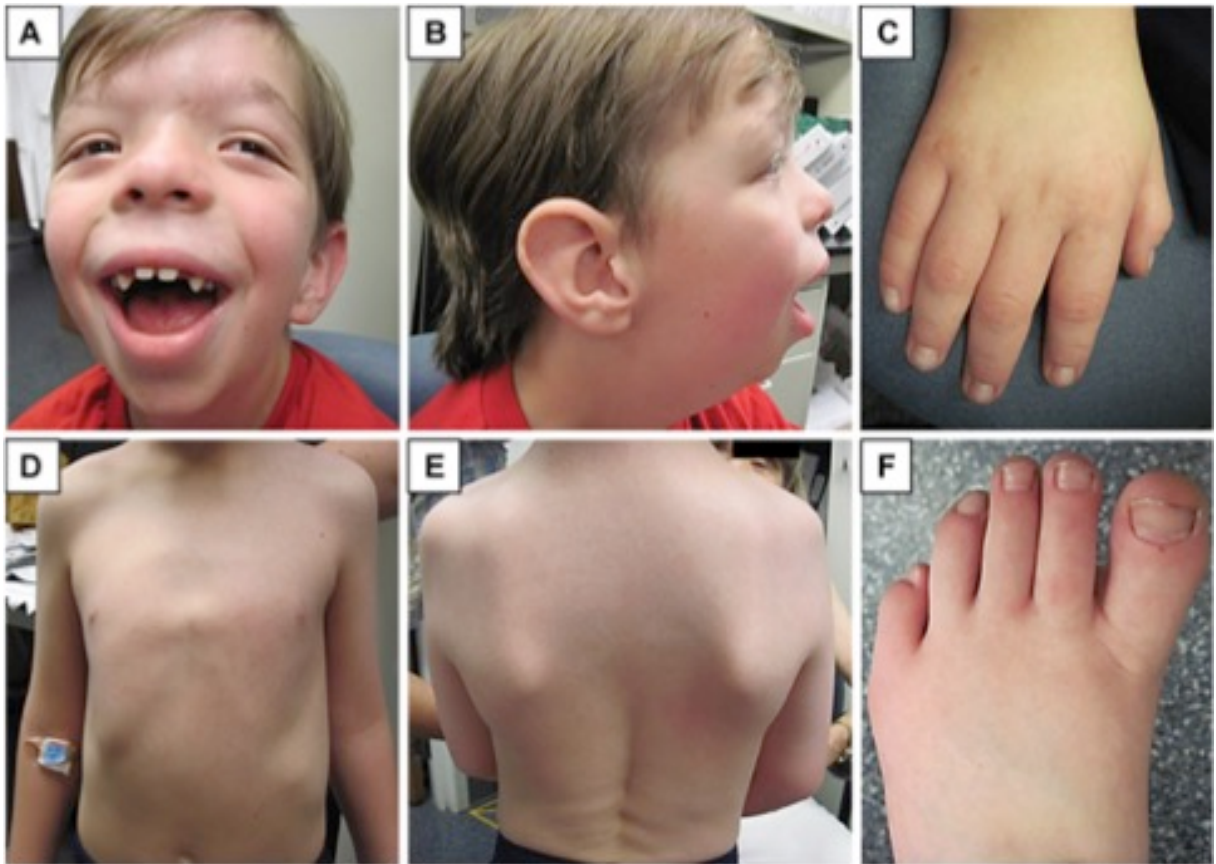


Abb. 1.6: Abbildung aus American Journal of Medical Genetics Part A Volume 164, Issue 9; Coffin-Lowry Patient (10 Jahre), typische syndrombedingte Fehlbildungen der Orbita, Nase, Ohr, Lippen, Finger und des muskuloskelettalen Apparat sind zu sehen. Im Bild A ist eine Zahnunterzahl zu bemerken (Nishimoto et al., 2014).

Die für CLS verantwortlichen Genmutationen liegen auf dem kurzen Arm des X-Chromosoms an der Stelle Xp22.1-p22.2. Da männliche Nachkommen nur ein X-Chromosom haben, tritt die Krankheit vor allem bei Männern auf, wohingegen Frauen in der Regel nur symptomlose Konduktorinnen sind (Hanauer et al., 1988). Die Mutation, die die Symptome hervorruft, liegt in dem Gen, das für die ribosomale S6 Kinase 2 (Rsk2) transkribiert. Dieses Protein gehört zu den wachstumsfaktorregulierten Proteinkinasen (Trivier et al., 1996).

Rsk2 steht am distalen Ende des Ras/Map-Kinase Signalweges (Signaltransduktion der Zellsteuerung) und ist für die Phosphorylierung verschiedener Substrate zuständig. So werden auch wichtige Faktoren des Knochenremodellings, wie Mitglieder der ActivatorProtein-1 (AP-1) Transkriptionsfaktorfamilie, durch RSK2 aktiviert. Die AP-1 Faktoren bestehen aus einem Komplex, der unter anderem von der sogenannten FOS-Familie gebildet wird. Aus der FOS-Familie wiederum stammt auch Fra1 (Fos related protein 1), welches eine starke osteoanabole Wirkung besitzt

(Eferl and Wagner, 2003, Grigoriadis et al., 1994, Romeo et al., 2012, Wagner, 2002). Interessanterweise konnte in Zellkulturexperimenten gezeigt werden, dass Fra1 auch in Zementoblasten aktiv ist (Berry et al., 2006, Eferl and Wagner, 2003, Grigoriadis et al., 1994, Romeo et al., 2012, Wagner, 2002). Die Wirkung von Fra1 auf die Zementogenese in vivo ist jedoch unklar.

Durch Studien mit Rsk2-defizienten Mäusen konnte gezeigt werden, dass Rsk2 eine stimulierende Wirkung auf die Knochenbildung besitzt (David et al., 2005, Yang et al., 2004). Während diese Erkenntnisse den systemischen Knochenverlust bei CLS erklären können, ist bisher unklar, ob die fehlende osteoanabole Wirkung von RSK2 auch verantwortlich ist für den alveolären Knochenabbau und verfrühten Zahnverlust oder ob andere parodontale Gewebe hierbei eine Rolle spielen.

In dieser Studie soll daher in Rsk2-defizienten Tieren untersucht werden, welchen Einfluss Rsk2 auf die Zähne und den Zahnhalteapparat besitzt. Außerdem soll analysiert werden, wie sich eine Steigerung des Knochenaufbaus durch Überexpression von Fra1 und des Knochenabbaus durch Überexpression vom Tumornekrosefaktor-alpha (TNF- α) auf den Zahnhalteapparat von Rsk2-defizienten Tieren auswirkt.

02 Material und Methoden

2.1 Tierhaltung

Die Generierung von Rsk2-defizienten Mäusen sowie Mäusen mit Fra1 und TNF-alpha Überexpression wurde bereits beschrieben (David et al., 2005) (Jochum et al., 2000) (Derer et al., 2014). Die Rsk2-defizienten und Fra1 transgenen Tiere wurden in der Tierhaltung des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf gehalten. Die TNF-alpha transgenen Tiere stammen aus der Tierhaltung des Universitätsklinikums Erlangen (in Kooperation mit Dr. Anja Derer). Für die Untersuchungen wurden nur männliche Mäuse verwendet, da Rsk2 X-chromosomal vererbt wird. Die Rsk2-defizienten Tiere wurden im Alter von 4, 8, 16, und 30 Wochen untersucht. Die Fra1 transgenen Mäuse wurden mit Rsk2-defizienten Mäusen verpaart und im Alter von 8 Wochen analysiert. Die TNF-alpha transgenen Tiere wurden im Alter von 10 Wochen analysiert. Die Euthanasie der Tiere erfolgte mit Genehmigung der lokalen Tierschutzbehörde.

2.1.2 Euthanasie und Präparation der Tiere

Die Tiere wurden durch eine CO₂-Narkose betäubt und getötet. Im direkten Anschluss wurden sämtliche Organe herausgetrennt und das Fell abgezogen. Die Skelette wurden anschließend auf einer Platte aus Kork in gestreckter Form befestigt. Die Skelette wurden danach für 24 h in 3,7% Formaldehyd zur Fixierung eingelegt und anschließend in 80% Ethanol überführt. Die Schädel wurden im Bereich der oberen Halswirbel mit einem Skalpell abgetrennt.

2.2.1 Radiologische Auswertung

Die radiologische Auswertung der Präparate erfolgte durch digitale bildgebende Verfahren mit zweidimensionaler Kontaktradiographie und dreidimensionaler hochauflösender Computertomographie (μ CT).

2.2.2 Kontaktradiographie

Die fixierten Mäuseschädel wurden in der Medianebene getrennt und in dem Röntgengerät „cabinet x ray system“ (Faxitron Bioptics®) auf dem Präparateträger mittig auf der höchsten Ebene platziert. Bevor das Röntgengerät benutzt werden konnte, musste eine Kalibrierung durchgeführt werden. Dafür wurde die Röntgenröhre für 300sec bei 24kV aufgewärmt.

Über den angeschlossenen Computer wurde das Röntgengerät bedient und die Röntgenaufnahme ausgelöst. Mit Hilfe der Hard- und Software „MX 20“ (Faxitron Bioptics®) wurde die Spannung und die Belichtungsdauer eingestellt. Um einheitliche Aufnahmen zu generieren wurden alle Schädel bei 70kV und 23mSec bestrahlt. Die Bilder wurden im „.tif“ Format abgespeichert. Anhand der Röntgenbilder wurde eine erste Analyse der Schädel vorgenommen. Hierbei wurde die Schädelform, die Zahnzahl und der Alveolarknochen betrachtet. Die Zahnanzahl wurde tabellarisch erfasst.

2.2.3 MicroCT

Die Schädel wurden mit einem μ CT (μ CT-40, Scano medical) mit einer Auflösung von 15 μ m gescannt. Mit der Auswertungssoftware des Herstellers konnten weitere Untersuchungen der Schädel vorgenommen werden. Analysiert wurde das Pulpenvolumen und das basale Knochenvolumen. Die Quantifizierung des Alveolarknochenabbaus erfolgte an 3D-Rekonstruktionen des rechten Unterkiefers mit Hilfe der Software ImageJ (Image J 1.42, National Institute of Health). Der Knochenverlust wurde anhand der Berechnung der Fläche von der Schmelz-Zement-Grenze bis zur Spitze der alveolaren Knochenlamelle vorgenommen. Die Fläche der 4 Wochen alten Mäuse wurde hierbei als Referenz verwendet.

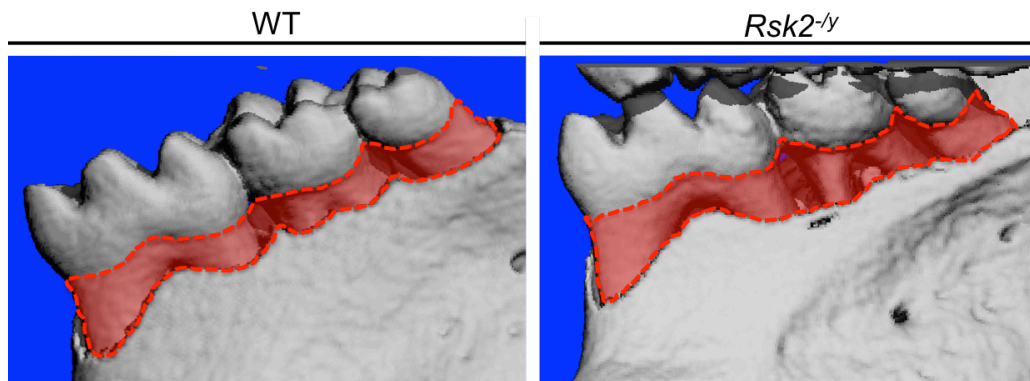


Abb. 2.1: μ CT-3D-Rekonstruktion der mandibulären Molarenregion einer Wildtyp- und $Rsk2^{-/-}$ -Maus (16 Wochen). Der rot eingefärbte Bereich markiert die Fläche des Alveolarknochenabbaus.

Die Auswertung des basalen Kieferknochens erfolgte mit Hilfe einer standardisierten Auswertungsroutine des Herstellers. Für die Auswertung des Pulpavolumens wurde folgendes Protokoll verwendet:

- Evaluations Programm öffnen, den gewünschten Kiefer auswählen
- durchgängig markieren („backward“ & „morph“), Threshold: Low: 333 (<4wks age 250); Upper: nicht ändern (solid object)
- 3D-Bildprogramm öffnen und die Datei auswählen
- Zahn in mesio-distale Ansicht drehen
- „Cut plane“ bis das Pulpavol. angeschnitten ist (vom Pulpdach bis zum Foramen apikale)
- Shift-Taste gedrückt halten und mit der Maus zu drei versch. Punkten fahren, Koordinaten notieren
- Session-Manager öffnen, Scan wählen, (die aktuelle, kleine) „.aim“ Date anklicken
- Application -> DecTerm öffnen
- im DecTerm Fenster folgenden Befehl eingeben: „ @ue:flip.com “ Leerzeichen, einfügen (mittlere Maustaste), Leerzeichen, erneut einfügen, „ .aim “ Dateipfad löschen, stattdessen „ _flip.isq “, Leerzeichen, Koordinaten wie folgt eingeben “1 2 3“ Leer “4 5 6“ Leer “7 8 9“, Enter (Return) drücken
- Evaluations Programm öffnen und die Datei mit dem Pfad „ _flip.isq “ wählen
- den ersten Molar definieren und dann das Pulpencavum bis ca. 4/5 der Wurzel markieren, durchgehend markieren („backward“ & „morph“)
- Threshold: Low -1000; Upper 400
- (optional) 3D-Programm, die „flip.isq.aim“ Datei öffnen
- DecTerm Commander öffnen, Befehl: „ ipl “ Enter
- „ read in “, Leer, einfügen der „flip.seq.aim“-Datei, Enter
- „ cl in “, Enter, „ 2 “, Enter, „ 2 “, Enter(2x)
- (optional) „ write in “, einfügen, Dateipfad mit „ pulpa.aim “ ergänzen, Enter
- „ examine in number “, Enter → die OV gibt das Pulpavolumen an

Abb. 2.2: Arbeitsanweisung für die Volumenberechnung der Pulpa am μ CT.

2.3 Statistik

Die Auswertung der Daten und die Erstellung der Diagramme erfolgte mit den Statistik- und Analysesoftwaren SPSS (IBM) und Prism 6 (GraphPad Software Inc.). Zweiseitiger studentischer t-Test wurde verwendet für den statistischen Vergleich von Wildtypmäusen und Rsk2-defizienten Mäusen. Einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) mit einem Tukey's Test für Mehrfachvergleiche wurde verwendet für die statistische Auswertung bei mehreren Gruppen. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung (SD) angegeben.

03 Ergebnisteil

3.1 Überzählige Zähne bei Rsk2-defizienten Mäusen

Die Analyse der Röntgenaufnahmen zeigte, dass ein Teil der Rsk2-defizienten Mäuse eine Hyperodontie aufwies. Dabei ist festzustellen, dass die überzähligen Zähne sich mesial des Molarenblocks befanden. Die genetische Penetranz lag mit etwa 15% relativ niedrig. Bei zusätzlicher Fra1 und TNF-alpha-Überexpression lag die Prävalenz überzähliger Zähne bei knapp 30 % bzw. etwa 25 %. Die Wildtypmäuse hingegen wiesen keine überzähligen Zähne auf (Abb. 3.1-2). Dieses Ergebnis zeigt, dass Rsk2 in der Zahnentwicklung die Anzahl der Zahnanlagen beeinflusst und bestätigt damit frühere Beobachtungen (Laugel-Haushalter et al., 2014).

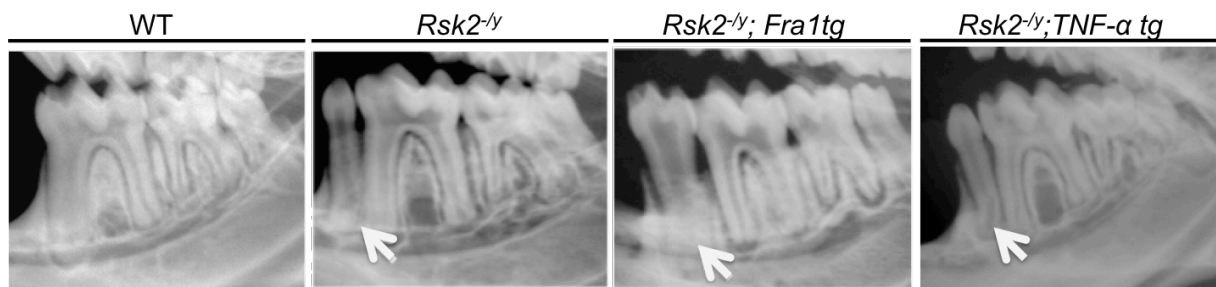


Abb.3.1: Röntgenaufnahmen des rechten Unterkiefers bei Wildtypmäusen (WT), Rsk2-defizienten Mäusen (*Rsk2^{-ly}*) sowie Rsk2-defizienten Mäusen mit zusätzlicher Fra1 Überexpression (*Rsk2^{-ly};Fra1tg*) oder TNF-alpha Überexpression (*Rsk2^{-ly};TNF-α tg*). Die weißen Pfeile markieren den zusätzlichen Zahn mesial des Molarenblocks.

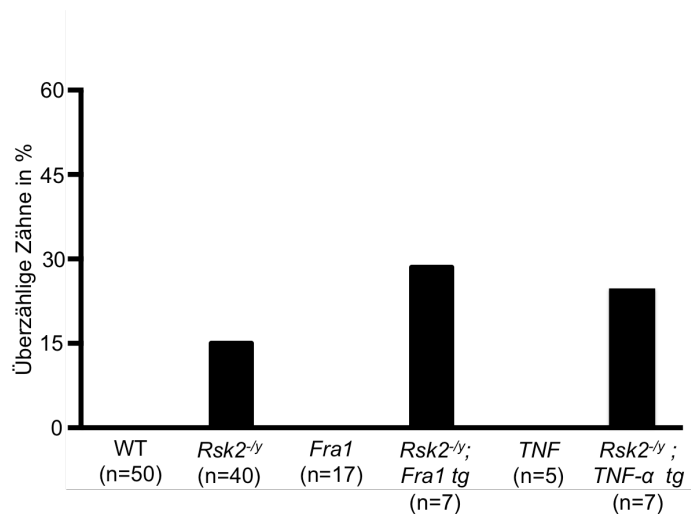


Abb.3.2: Prozentuale Auswertung der überzähligen Zähne in den untersuchten Gruppen, sortiert nach Genotypen.

3.2 Dentinhypoplasie bei *Rsk2*-defizienten Mäusen

Rsk2-defiziente Mäuse haben eine erniedrigte Knochenmasse auf Grund einer verminderten Osteoblastenaktivität (David et al., 2005, Yang et al., 2004). Da Osteoblasten und dentinbildende Odontoblasten in ihrer Herkunft und Funktion Gemeinsamkeiten aufweisen (Bronner, 2010), wurde als nächstes die Dentinbildung in *Rsk2*-defizienten Tieren untersucht. Die Analyse der Röntgenbilder deutete darauf hin, dass die *Rsk2*-defizienten Mäuse ein größeres Pulpencavum bei gleicher Zahngröße aufweisen (Abb. 3.3).

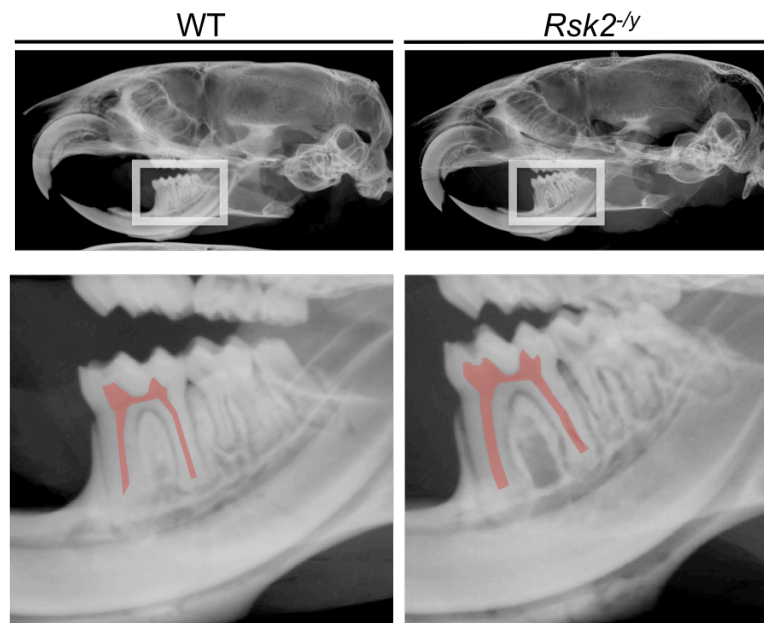


Abb.3.3: Röntgenaufnahme des halben Schädels einer Wildtyp- und *Rsk2*^{-/-}-Maus (16 Wochen). Rot eingefärbt die Zahnpulpa des ersten Unterkiefermolaren.

Um den Einfluss von *Rsk2* auf die Dentinbildung näher zu untersuchen, wurden als nächstes das Pulpenvolumen der ersten Unterkiefermolaren von Wildtyp und *Rsk2*-defizienten Mäusen mittels μ CT dreidimensional quantifiziert (Abb. 3.4). Hierbei zeigte sich, dass die *Rsk2*-defizienten Mäuse ab dem Alter von 8 Wochen im Vergleich zu den Wildtypen eine signifikant größere Pulpa besitzen (Abb. 3.5). Indirekt lässt sich hieraus schließen, dass die Dentinschicht bei *Rsk2*-defizienten Tieren dünner ist.

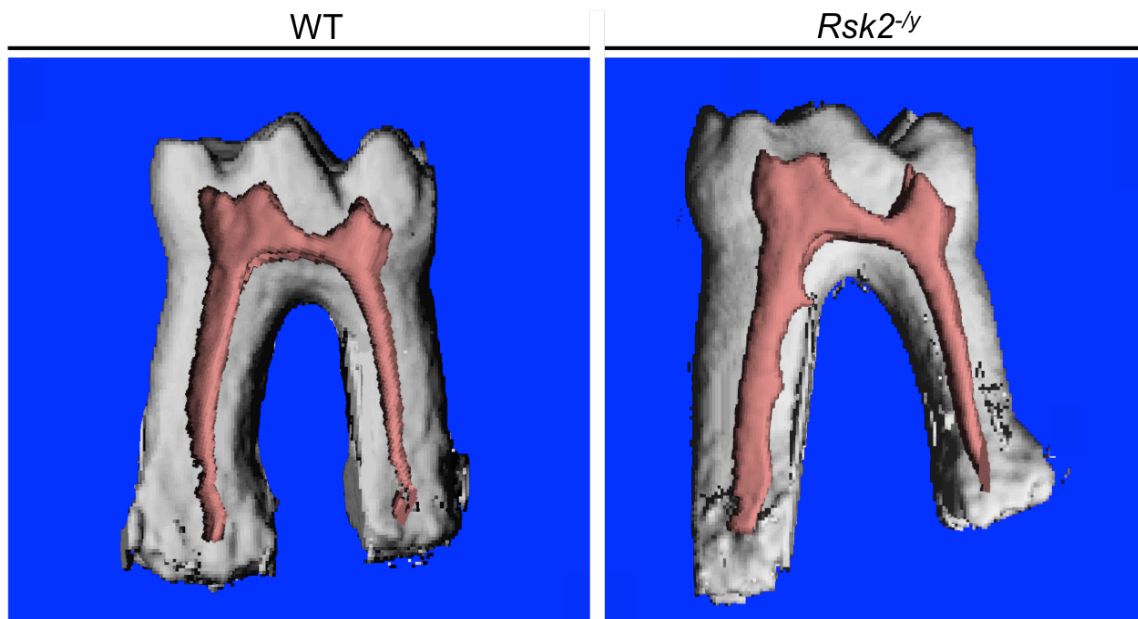


Abb. 3.4: 3D Rekonstruktion des ersten Molaren mit Pulpa (rot) von einer Wildtyp- und *Rsk2*^{-/-}-defizienten Maus (16 Wochen).

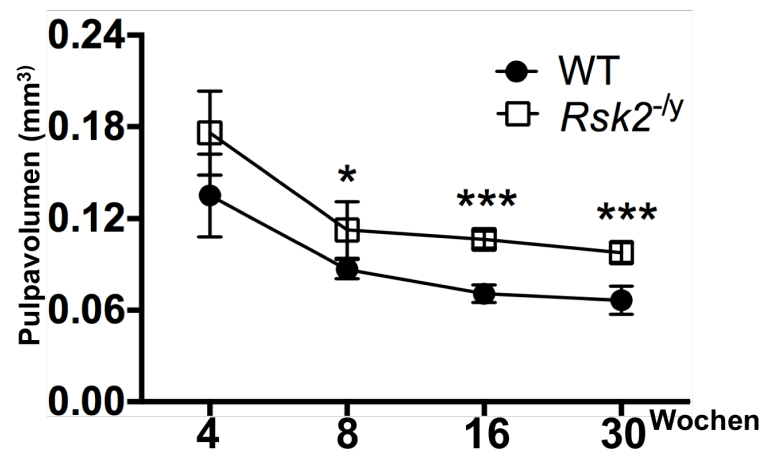


Abb. 3.5: Quantifizierung des Pulpavolumens von Wildtyp- und *Rsk2*^{-/-}-Mäusen im Alter von 4 bis 30 Wochen (n=4-8 pro Genotyp und Alter). Mittelwerte \pm SD * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$.

3.3 Alveolarknochenabbau bei *Rsk2*-defizienten Mäusen

Frühzeitiger Zahnverlust ist ein häufig beschriebenes Symptom bei Patienten mit Coffin-Lowry-Syndrom. Die Kontaktradiographien von Wildtyp und *Rsk2*-defizienten Mäusen deuteten auf einen Alveolarknochenabbau bei *Rsk2*-Defizienz hin (Abb. 3.6).

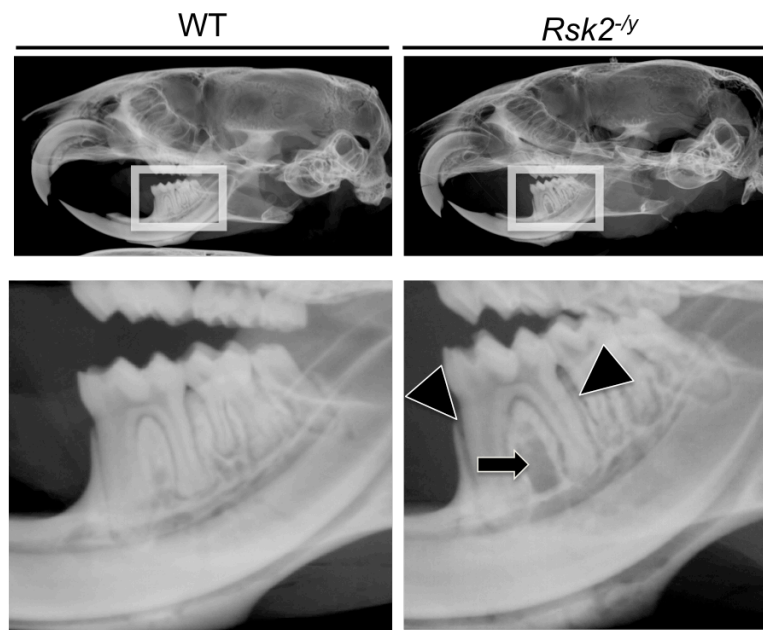


Abb.3.6: Röntgenaufnahme des halben Schädels einer Wildtyp- und *Rsk2^{-/-}*-Maus (16 Wochen). Dreieck markiert den Alveolarknochenverlust und Pfeile interradiikuläre Lakunen.

Im nächsten Schritt wurden daher Schädel von *Rsk2*-defizienten Tieren und Kontrolltieren mittels μ -Computertomographie untersucht. Hierbei zeigten sich keine wesentlichen Unterschiede in Bezug auf die Schädelform zwischen *Rsk2*-defizienten Tieren und Kontrolltieren (Abb. 3.7). Eine nähere Analyse der Unterkiefer zeigte jedoch einen deutlichen horizontalen Knochenabbau mit Furkationsbefall bei *Rsk2*-defizienten Tieren im Alter von 16 Wochen (Abb. 3.7-8).

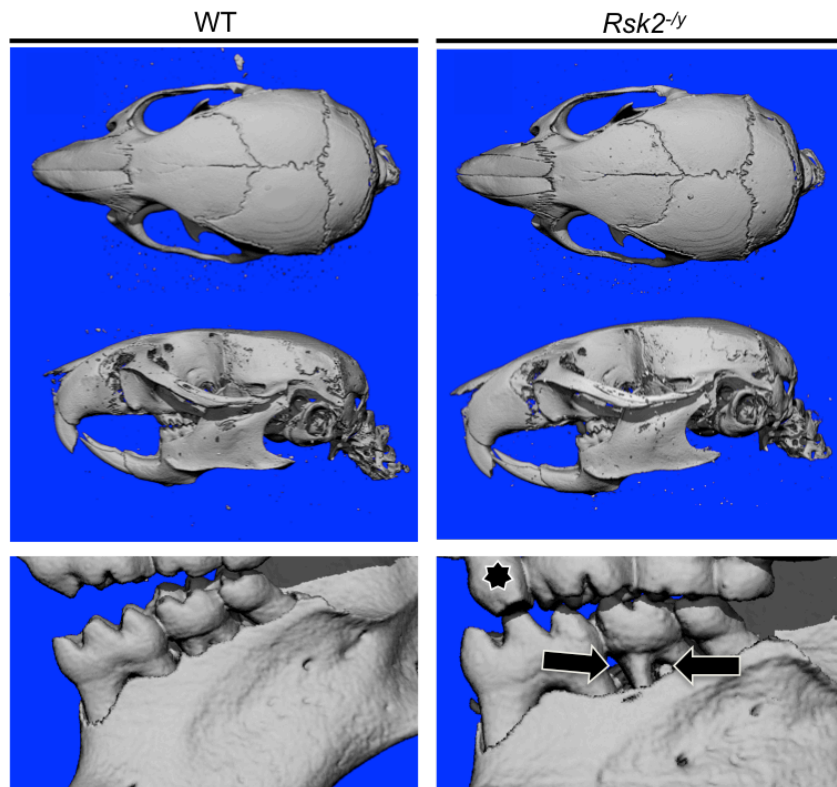


Abb. 3.7: μ CT-3D-Rekonstruktion der Schädel einer 16 Wochen alten Wildtyp- und *Rsk2*^{-/-}-Maus. Ansicht von oben, im Profil und der mandibulären Molarenregion. Die Pfeile markieren den Alveolarknocheneinbruch mit Furkationsbefall. Der Stern markiert einen zusätzlichen Zahn.

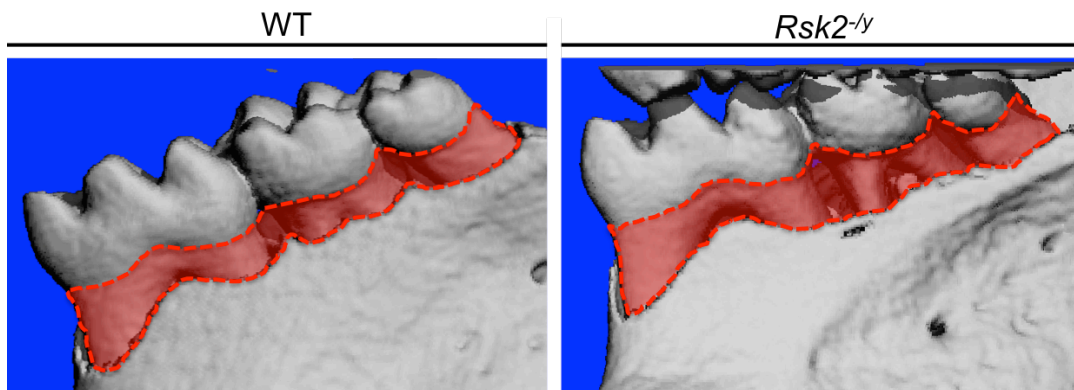


Abb. 3.8: μ CT-3D-Rekonstruktion der mandibulären Molarenregion einer Wildtyp- und *Rsk2*^{-/-}-Maus (16 Wochen). Der rot eingefärbte Bereich markiert die Fläche des Alveolarknochenabbaus.

Anhand von μ CT-3D-Rekonstruktionen (Abb. 3.8) des Unterkiefers wurde der Grad des Knochenabbaus bestimmt. Während im Alter von 4 Wochen kein signifikanter Unterschied zwischen *Rsk2*-defizienten und Wildtypmäusen bestand, war ab dem

Alter von 8 Wochen ein progredienter, signifikanter Alveolarknochenabbau bei *Rsk2*-defizienten Mäusen zu beobachten (Abb. 3.9).

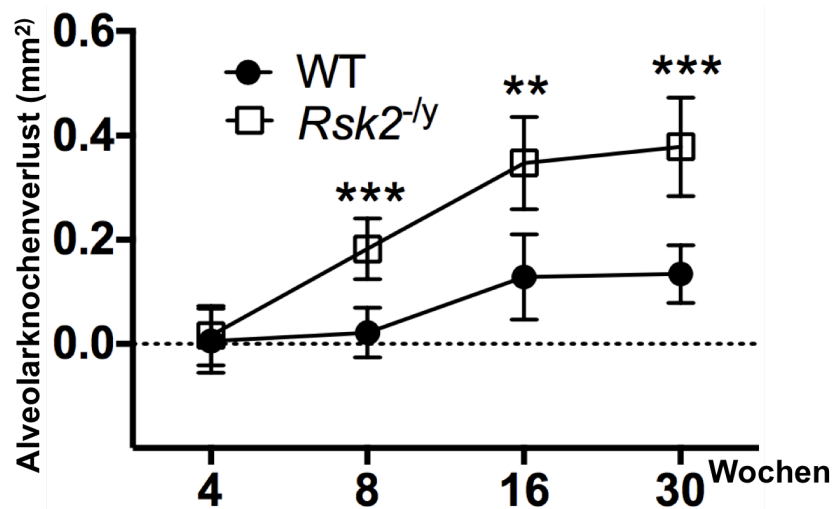


Abb. 3.9: Quantifizierung des Alveolarknochenverlusts bei Wildtyp- und *Rsk2*^{-/-}-Mäusen gegen das Alter von 4 bis 30 Wochen (n=4-6). Mittelwerte \pm SD **p<0.01, ***p<0.001 (n=4-6 pro Genotyp und Alter).

μ CT-Querschnittsaufnahmen der Molaren zeigten darüber hinaus bei den *Rsk2*-defizienten Tieren eine Verdünnung der Wurzelspitzen (Abb. 3.10), was auf eine Störung des am Apex befindlichen Zements hindeutet. *Rsk2* scheint also eine wichtige Funktion für die Alveolarknochenhomöostase zu haben und hat eventuell einen Einfluss auf die Bildung von Zement.

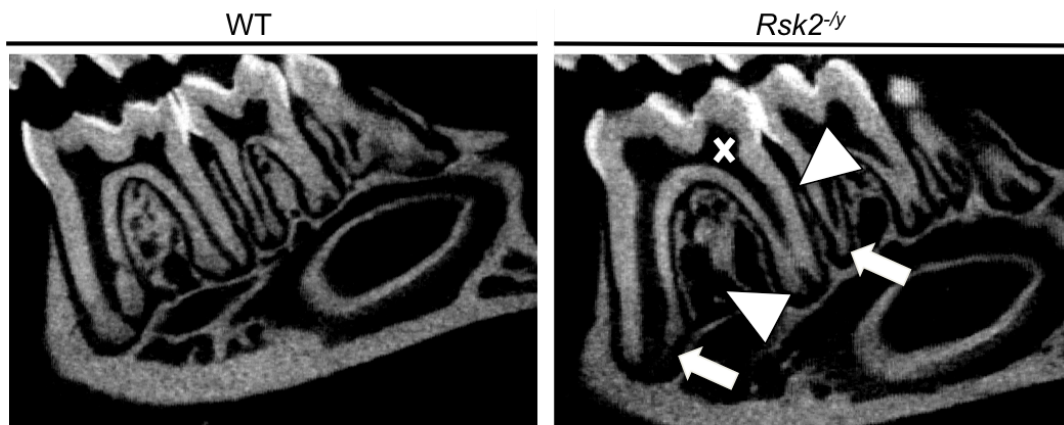


Abb. 3.10: μ CT-2D-Rekonstruktion der unteren Molaren von Wildtyp- und *Rsk2*^{-/-}-Mäusen (16 Wochen). Die Pfeile zeigen die dünnen Wurzelspitzen, das Kreuz markiert das große Pulpacavum, die Dreiecke das niedrige Alveolarknochenniveau und die interradikulären Lakunen.

3.4 Überexpression von Fra1 bei Rsk2-defizienten Mäusen

Da Rsk2 die Aktivität knochenbildender Osteoblasten steuert (David et al., 2005), konnten die bisherigen Untersuchungen nicht klären, ob der Alveolarknochenabbau bei Rsk2-defizienten Mäusen eine direkte Folge der verminderten Knochenformation ist oder als ein intrinsischer Defekt des Zahnhalteapparats gesehen werden muss. Um diese beiden Pathomechanismen besser zu unterscheiden, wurde als nächstes untersucht, welche Auswirkungen eine Steigerung der Osteoblastenaktivität durch die Überexpression des osteoanabolen Faktors Fra1 (Luther et al., 2011) bei Rsk2-defizienten Mäusen besitzt. Hierzu wurden Rsk2-defiziente Mäuse mit Fra1-überexprimierenden Mäusen verpaart und im Alter von 8 Wochen untersucht. Es wurde zunächst mittels μ CT der basale, trabekuläre Kieferknochen der Tiere mit Rsk2-Defizienz und/oder Fra1-Überexpression untersucht (Abb. 3.11). Die Quantifizierung ergab, dass Fra1 Überexpression zu einem im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen signifikanten Anstieg des trabekulären Knochenvolumens führt (Abb. 3.12). Bei zusätzlicher Rsk2-Defizienz war die Erhöhung des Knochenvolumens bei Fra1 Überexpression schwächer, jedoch im Vergleich zu Rsk2-defizienten Tieren immer noch signifikant. Diese Analysen deuten darauf hin, dass eine Überexpression des osteoanabolen Faktors Fra1 bei Rsk2-Defizienz die Knochenformation im Kieferknochen erhöht.

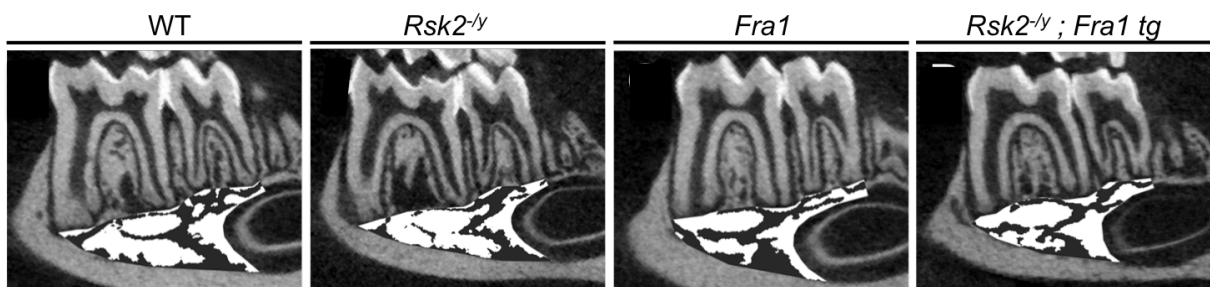


Abb. 3.11: Berechnung des basalen Knochenvolumens (schwarz-weiß eingefärbt). Fra1 Überexpression führt zu einer Zunahme des basalen Knochens.

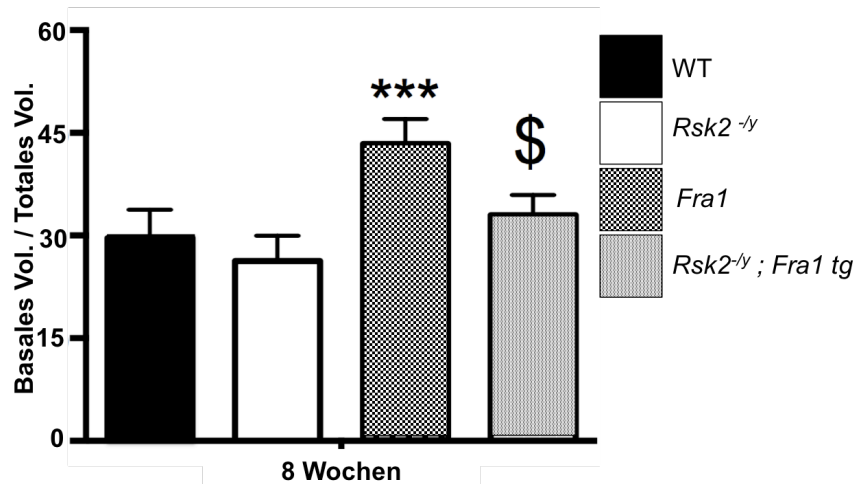


Abb. 3.12: Berechnung des basalen Knochenvolumens. *Fra1* Überexpression führt zu einer Zunahme des basalen Knochens. Mittelwerte \pm SD *** $p < 0.001$ vs. Wildtyp, \$ $p < 0.05$ vs. *Rsk2^{-/-}* (n=4-7 pro Genotyp).

Die Auswertung des Alveolarknochenlevels auf μ CT 3D-Rekonstruktionen zeigte jedoch, dass bei *Rsk2*-defizienten Tieren trotz *Fra1*-Überexpression ein im Vergleich zum Wildtyp signifikanten Knochenabbau vorliegt (Abb. 3.13-14). Diese Analysen zeigen, dass der *Rsk2*-abhängige Alveolarknochenabbau durch eine Steigerung der Knochenformation nicht aufgehoben werden kann.

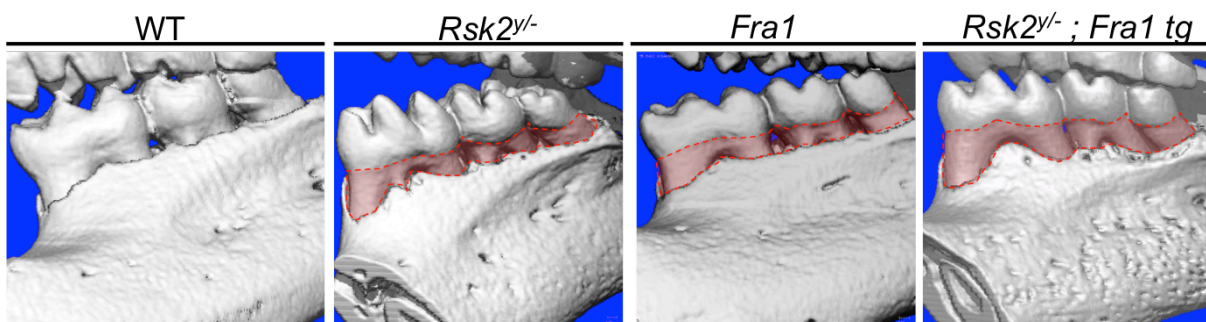


Abb. 3.13: 3D- μ CT-Rekonstruktionen der Molarenregion von einer Wildtypmaus, *Rsk2*-defizienten Maus, *Fra1*-überexprimierenden Maus und einer Kreuzung von *Rsk2*-Defizienz mit *Fra1*-Überexpression (10 Wochen). Man sieht keine Zunahme des Alveolarknochenlevels bei *Fra1*-Überexpression.

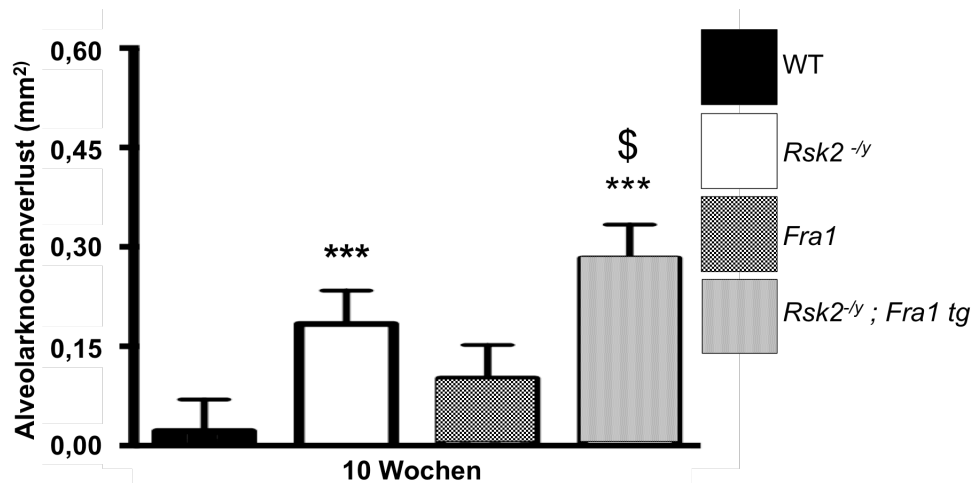


Abb. 3.14: Alveolarknochenverlust gegen die verschiedenen Genotypen. Durch eine *Fra1*-Überexpression kann der Alveolarknochenabbau bei *Rsk2*-Defizienz nicht reduziert werden. Mittelwerte \pm SD *** $p < 0.001$ vs. Wildtyp, \$ $p < 0.05$ vs. *Rsk2*^{-/-} (n=5-7 pro Genotyp).

3.5 Überexpression von TNF- α bei *Rsk2*-defizienten Mäusen

Vorangegangene Untersuchungen haben gezeigt, dass *Rsk2*-Defizienz bei TNF- α -überexprimierenden Mäusen zu einem verstärkten Knochenabbau in den Kniegelenken und Wirbelkörpern führt (Bohm et al., 2012, Larsson et al., 2015). Da TNF- α auch in der Pathogenese des parodontalen Knochenabbaus eine wichtige Rolle spielt (Lima et al., 2004), haben wir als nächstes untersucht, welchen Einfluss eine Überexpression von TNF- α bei *Rsk2*-defizienten Tieren auf den Alveolarknochen besitzt.

Die Quantifizierung des alveolären Knochenverlustes mittels μ CT bei 10-Wochen-alten Tieren zeigte, dass eine Überexpression von TNF- α den alveolären Knochenabbau bei *Rsk2*-Defizienz nicht verstärkt (Abb. 3.15-16). Interessanterweise führte aber auch eine alleinige Überexpression von TNF- α nicht zu einem alveolären Knochenabbau.

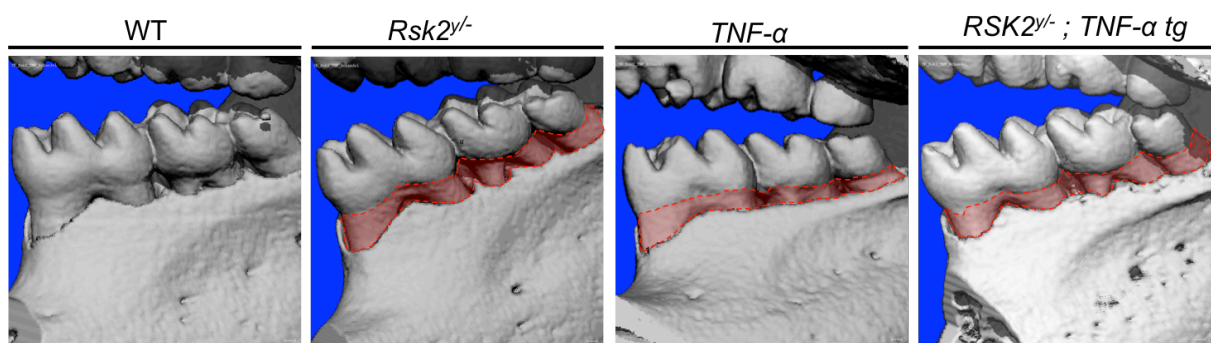


Abb. 3.15: 3D- μ CT-Rekonstruktionen der Molarenregion von 10-Wochen-alten Mäusen der angegebenen Genotypen. Man sieht keine Abnahme des Alveolarknochenlevels bei einer TNF- α -Überexpression.

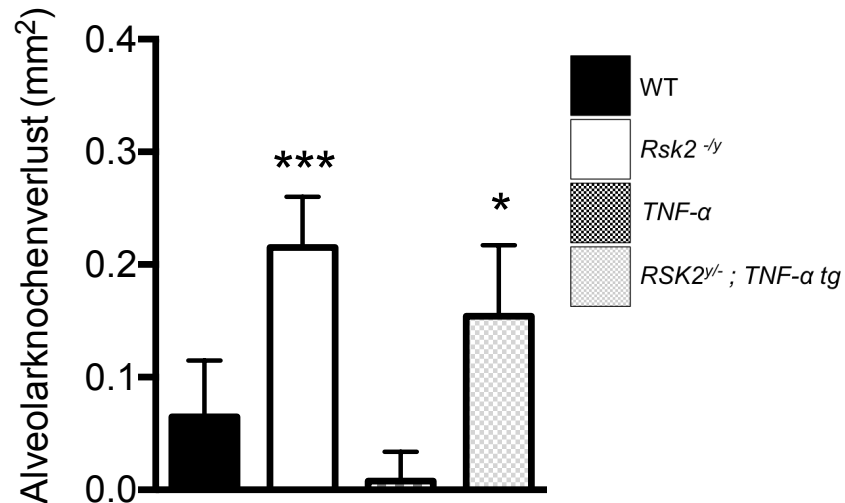


Abb.3.16: Alveolarknochenverlust gegen die verschiedenen Genotypen (10 Wochen). *TNF-α*- Überexpression führt nicht zu vermehrtem Knochenverlust. Mittelwerte \pm SD *** p <0.001, * p <0.05 (n=4-8 pro Genotyp).

Im Gegensatz hierzu waren jedoch bei Mäusen mit *TNF-α*-Überexpression deutliche degenerative Veränderungen der Kiefergelenke mit ausgeprägten Erosionen der Gelenkoberflächen zu finden. Bei zusätzlicher *Rsk2*-Defizienz erschienen diese Veränderungen noch ausgeprägter (Abb.3.17). Diese Ergebnisse zeigen, dass Alveolarknochen und Kiefergelenk durch *TNF-α*-Überexpression unterschiedlich beeinflusst werden und deuten auf einen protektiven Effekt von *Rsk2* bei entzündlichem Knochenabbau im Kiefergelenk hin.

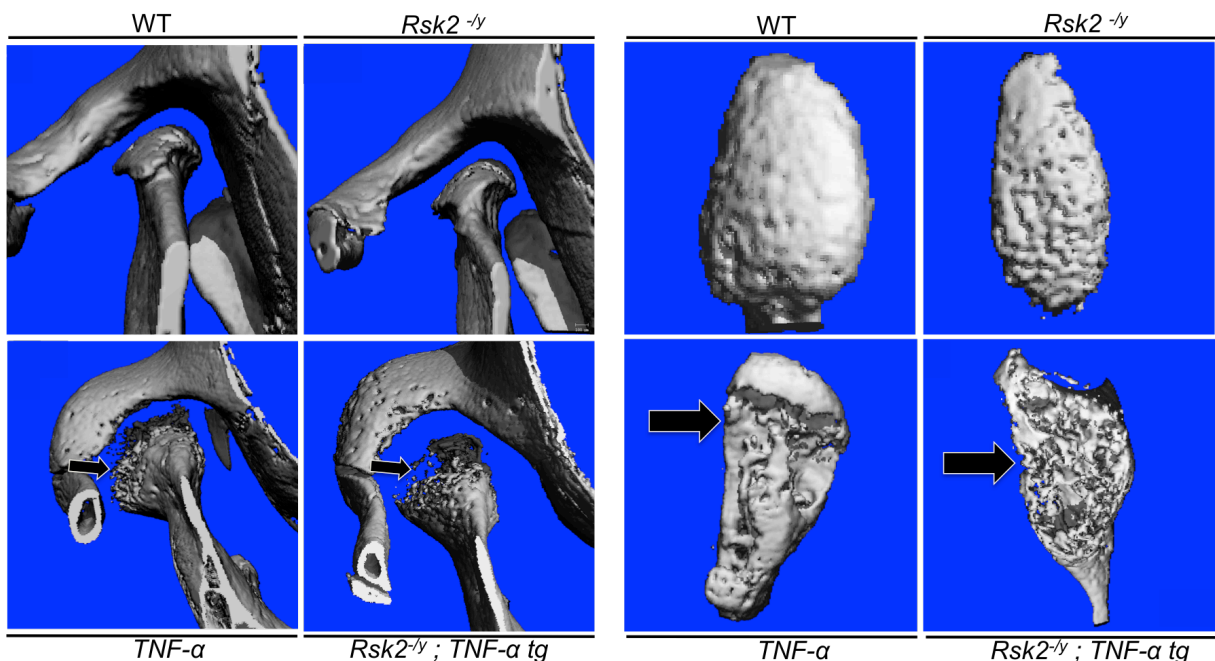


Abb. 3.17: 3D- μ CT Rekonstruktionen des Kiefergelenks und des Kiefergelenkköpfchens der verschiedenen Genotypen in der Aufsicht. Die Pfeile markieren die Destruktion des Knochens.

04 Diskussion

Diese Arbeit zeigt, dass Rsk2 einen entscheidenden Einfluss auf die postnatale Entwicklung der Zähne und Aufrechterhaltung des Zahnhalteapparats besitzt. Eine Inaktivierung von Rsk2 im Mausmodell beeinflusst Zahnzahl, Dentinbildung, Wurzelform und Alveolarknochenhomöostase.

4.1 Rsk2 Einfluss auf die Zahnzahl

In der Analyse der Röntgenaufnahmen und der μ CT Datensätze konnte festgestellt werden, dass Rsk2-Defizienz zu Hyperdontie führt. So wird im Bereich der für Mäuse typischen Diastemaregion ein überzähliger Zahn in etwa 15% der Fälle beobachtet. Die Bedeutung von Rsk2 für die Determination der Zahnzahl ist erst seit kurzem bekannt. Erstmals zeigte Langel-Haushalter et al. Hyperodontie bei Rsk2-defizienten Tieren. Die Prävalenz lag jedoch mit 65% (im Oberkiefer) und 31% (im Unterkiefer) höher als in dieser Arbeit (Langel-Haushalter et al., 2014), was möglicherweise auf Variationen zwischen dem genetischen Hintergrund der Mauslinien zurückzuführen ist.

Die wachstumsfaktorregulierten Proteinkinasen sind wichtig für die Phosphorylierung verschiedener Substrate im Rahmen des Zellzyklus. Am distalen Ende des Ras/Map-Signalwegs nimmt Rsk2 eine zentrale Position ein. Das Rsk2 Gen steht auch in der Zahnentwicklung an entscheidender Stelle und bedingt die Zahnzahl und Morphologie. Im Mausmodell führt Rsk2 zu überzähligen Zähnen im Bereich zwischen Schneidezähnen und Molaren. In dieser Region sind bei anderen Spezies Prämolaren angelegt. Die Funktion von Rsk2 könnte daher in der Reaktivierung von evolutionär verlorengegangenen Zahnkeimen liegen (Marangoni et al., 2015). Offen bleibt allerdings die Frage, warum es bei Rsk2-Mutationen beim Menschen zu einer Zahnunterzahl aber bei der Maus zu einer Zahnüberzahl kommt. Um diese Frage näher zu beantworten, sollte zunächst untersucht werden, welche Zahntypen bei Patienten mit CLS fehlen.

4.2 Rsk2 Einfluss auf die Dentinbildung

In unseren Untersuchungen wurde außerdem beobachtet, dass Rsk2-defiziente Tiere eine im Vergleich zum Wildtyp signifikant größere Zahnpulpa aufweisen. Da die

Zahngröße der Rsk2-defizienten Tiere nicht verändert war, lässt sich hieraus indirekt schließen, dass die Dentinschicht bei Rsk2-Defizienz dünner ist. Gründe hierfür können eine reduzierte Dentinbildung oder eine gestörte Dentinmineralisation sein (Foster et al., 2014). In weiteren Untersuchungen außerhalb dieser Arbeit wurden daher nichtentkalkte, toluidinblau gefärbte histologische Schnitte von Unterkiefermolaren von Rsk2-defizienten Tieren und Kontrolltieren analysiert (nicht publizierte Daten). Hierbei zeigte sich bei Rsk2-defizienten und Kontrolltieren eine gleichermaßen dünne Schicht nichtmineralisiertes Prädentin und ein normales Verhältnis zwischen Prädentin und mineralisiertem Dentin. Durch Markierung neu gebildeten Dentins mit fluoreszierendem Farbstoff konnte bei Rsk2-defizienten Tieren eine im Vergleich zum Wildtyp reduzierte Dentinbildung nachgewiesen werden. Insgesamt lassen diese Ergebnisse also darauf schließen, dass Rsk2 nicht die Dentinmineralisation, sondern die Dentinforma-tion in Analogie zu der Funktion von Rsk2 für die Knochenbildung steuert (David et al., 2005).

Die klinische Relevanz dieser Erkenntnisse sollte in weiteren Studien untersucht werden. So ist es vorstellbar, über eine lokale Medikamentenapplikation die RSK2-Aktivität zu steigern, um die Dentinbildung, bei pathologischen Zahnanomalien oder tiefen kariösen Defekten anzuregen, um die Zahnvitalität zu erhalten. Dies könnte zum Beispiel bei der indirekten und direkten Überkappung der Pulpa in der Zahnerhaltung eine Rolle spielen. Die zur Zeit in diesem Bereich verwendeten Präparate regen die Tertiärdentinbildung meist chemisch über ein alkalisches Milieu an und zeigen oft nur begrenzten Erfolg (Wolff, 2010). Über eine lokale RSK2-aktivierende medikamentöse Applikation, könnte eine direkte zelluläre, vielversprechende Aktivierung der Odontoblasten erreicht werden.

4.3 Rsk2 im parodontalen Halteapparat

Die Analyse der Röntgen- und μ CT-Bilder zeigte darüberhinaus einen progredienten Alveolarknochenabbau bei Rsk2-Defizienz. Beim CLS ist eine Osteopenie bekannt, die jedoch erst im höheren Lebensalter auftritt (David et al., 2005). Bisher war jedoch unklar, ob der systemische Knochenmasseverlust auch ursächlich für den Alveolarknochenabbau und verfrühten Zahnverlust bei CLS ist (Norderyd and Aronsson, 2012). Unsere Analysen Rsk2-defizienter Mäuse zeigten, dass der Alveolarknochenabbau bereits bei jüngeren Tieren zu beobachten ist, während der

systemische Knochenmasseverlust später eintritt (David et al., 2005). Außerdem konnte durch eine systemische Steigerung der Osteoblastenaktivität durch die Überexpression des osteoanabolen Faktors Fra1 der Rsk2-abhängige Alveolarknochenabbau nicht aufgehalten werden. Die Untersuchungsergebnisse deuten also daraufhin, dass eine Steigerung der Osteoblastenfunktion nicht vor Rsk2-abhängigen Alveolarknochenabbau schützt und daher dem verfrühten Zahnverlust bei CLS-Patienten nicht alleinig eine Osteoblastenunterfunktion zu Grunde liegen kann. Es ist daher anzunehmen, dass andere parodontale Gewebe in der Pathogenese involviert sind.

Aufgrund der strukturellen und funktionellen Nähe zum Wurzelzement ist es möglich, dass hierbei insbesondere die Zementbeschaffenheit eine Rolle spielt. In der Tat finden sich in der Literatur zwei Fälle, bei denen bei ausgefallenen Zähnen von CLS-Patienten Zementhypoplasien beobachtet wurden (Day et al., 2000, Norderyd and Aronsson, 2012). Ein abschließender kausaler Zusammenhang konnte allerdings noch nicht gestellt werden. Wir konnten in μ CT-Schnittbildern von Molaren Rsk2-defizienter Tiere eine hypoplastische Wurzelspitzenkonfiguration erkennen, was auf Veränderungen des am Apex befindlichen Zements hinweist. In weiteren histologischen Untersuchungen innerhalb der Arbeitsgruppe wurde daher der parodontale Komplex an nicht entkalkten, histologischen Schnitten der Unterkiefermolaren untersucht (Koehne et al., 2016). Die Auswertung der Histologiepräparate bestätigte die Beobachtung des pathologisch reduzierten Alveolarknochenniveaus bei Rsk2-defizienten Tieren (Abb. 4.1 A,B). Außerdem zeigte sich bei Rsk2-Defizienz im Vergleich zum Wildtyp eine deutliche Hypoplasie des zervikalen azellulären Zements, der für die Verankerung parodontaler Fasern verantwortlich ist (Abb. 4.1 C-H). In der Tat konnte auch ein Ablösen dieser Fasern vom Zement bei Rsk2-defizienten Tieren beobachtet werden (Abb. 4.1 G,H).

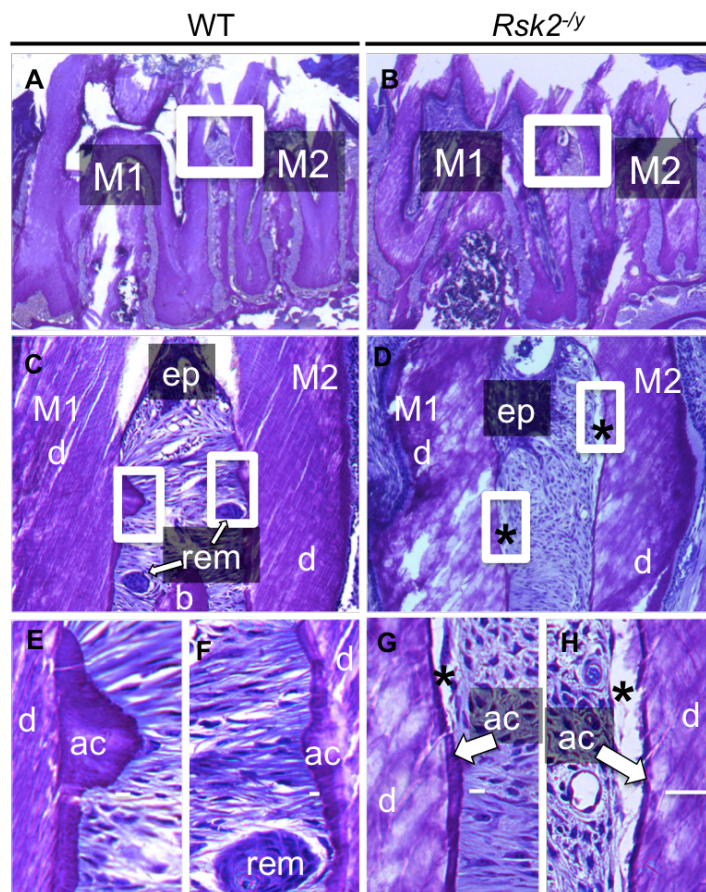


Abb. 4.1: Modifiziert nach J Dent Res 2016 Vol. 95, Issue 7: Toluidinblau gefärbte Histologie der ersten beiden Molaren (M1, M2) bei Wildtyp und *Rsk2*^{-/-} Mäusen (16 Wochen). Beim WT besteht ein physiologischer Aufbau des Zahnhalteapparats mit azellulärem Zement (ac) sowie Malassez'schen Epithelresten (rem). Bei *Rsk2*^{-/-} inseriert das Epithel (ep) tiefer, die azelluläre Zementschicht ist dünner, es gibt weniger Malassez'schen Epithelresten und das parodontale Ligament weist pathologische Ablösungen auf (Sterne) (Koehne et al., 2016).

Auch im Bereich des am Apex gebildeten zellulären Zements konnte eine Veränderung in der Zementbeschaffenheit festgestellt werden (Abb. 4.2). Bei den Tieren mit *Rsk2*-Defizienz lag sowohl eine Hypoplasie als auch eine Hypomineralisation des zellulären Zements vor (Abb. 4.2).

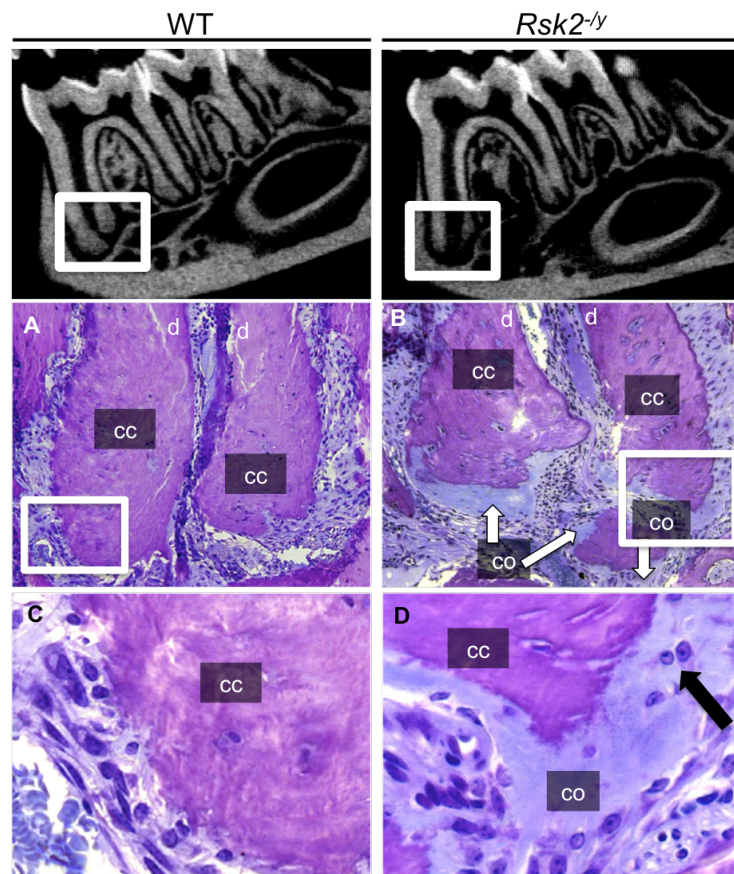


Abb. 4.2: Modifiziert nach J Dent Res 2016 Vol. 95, Issue 7: Toluidinblau gefärbte Histologie der Unterkieferregion einer Wildtyp- und *Rsk2*-Maus. Die *Rsk2*-defizienten Tiere weisen eine Hypoplasie des zellulären Zements (cc) und eine Ansammlung nicht mineralisierten Zements (co) auf. Die Pfeile zeigen in Zementoid eingebettete Zementozyten (Koehne et al., 2016).

Insgesamt zeigen diese Ergebnisse zusammen mit weiteren *in vivo* und *in vitro* Untersuchungen (Koehne et al., 2016), dass *Rsk2* eine zentrale Rolle in der Zementbildung besitzt, und legen nahe, dass bei CLS Störungen der Zementbildung für den Alveolarknochenabbau und juvenilen Zahnverlust verantwortlich sind. Eine vergleichbare Pathogenese ist auch bei anderen humanen Erkrankungen wie Hypophosphatasie zu finden, bei denen es durch Phosphatasemangel zu Störungen der Zementbildung zu Zahnverlust führen (Chapple, 1993).

Da die parodontale Knochenregeneration wesentlich von der Zementbildung abhängt (Bartold et al., 2000), sind Moleküle, die die Zementbildung anregen, von großem Interesse für die regenerative Zahnmedizin. So ist vorstellbar, dass bei einer ausgeheilten Parodontitis durch die lokale Applikation von RSK2-stimulierenden Medikamenten eine Steigerung der Zementogenese erreicht werden kann. Durch die spezifische Aktivierung der Zementbildung auf zellulärer Ebene könnten das Ausmaß parodontaler Knochenregeneration im Vergleich zu bisher verwendeten Verfahren wesentlich erhöht werden und die langfristige Prognose parodontal geschädigter

Zähne verbessert werden. Zudem könnten so hypersensible und kariesanfällige, freiliegende Zahnhälse auf natürliche Weise geschützt werden.

4.4 Einfluss von TNF-alpha-Überexpression bei Rsk2-defizienten Tieren

TNF- α ist ein proinflammatorisches Zytokin, das in der Pathogenese der Parodontitis eine wichtige Rolle spielt. TNF- α kann bei akuten Parodontitiden sowohl lokal in der Sulkusflüssigkeit als auch systemisch im Blut nachgewiesen werden (Rateitschak and Wolf, 2003b). TNF- α verstärkt nicht nur die Entzündungsreaktion, sondern führt auch zu einer Steigerung der Osteoklastenaktivität und Hemmung der Osteoblasten (Algate et al., 2016). In früheren Studien konnte gezeigt werden, dass Rsk2 vor TNF- α induziertem rheumatischem und systemischem Knochenverlust schützt (Bohm et al., 2012, Derer et al., 2014). Um herauszufinden, ob Rsk2 und TNF- α ebenfalls im Zahnhalteapparat interagieren, haben wir Zähne von Rsk2-defizienten Tieren mit zusätzlicher TNF- α -Überexpression analysiert. Es konnte jedoch kein Effekt von TNF- α auf den Rsk2-abhängigen Alveolarknochenabbau beobachtet werden. Diese Ergebnisse zeigen wiederum, dass der Alveolarknochenabbau in Rsk2-defizienten Tieren durch andere Faktoren moduliert wird als im übrigen Skelettsystem.

Interessanterweise führte jedoch auch eine alleinige TNF- α -Überexpression nicht zu einem Abbau des Alveolarknochens, was im deutlichen Widerspruch zu der proklamierten zentralen Rolle von TNF- α in der Parodontitis steht (Rateitschak and Wolf, 2003c). Es bleibt zu untersuchen, ob in diesem Mausmodell die Überexpression von TNF- α sich trotz des ubiquitären Promoters lokal unterscheidet, oder, ob unsere Beobachtungen auf eine differenziertere Rolle von TNF- α in der Pathogenese der Parodontitis hindeuten. Obwohl in einer kürzlich erschienen Studie ein Effekt von TNF- α -Überexpression auf den Alveolarknochen beobachtet wurde (Hall et al., 2016), ist die Rolle von TNF- α ohne weitere Interleukine für den alveolären Knochenverlust nicht hinreichend geklärt. Unabhängig hiervon sollte zur Klärung der entzündlichen Genese von Rsk2-abhängigen Alveolarknochenabbau in zukünftigen Studien auf andere Parodontitismodelle, wie z. B. das Ligaturmodell (Zhuang et al., 2015, Kim et al., 2015), ausgewichen werden.

Ein deutlicher Effekt von TNF- α -Überexpression konnte in dieser Studie hingegen im Kiefergelenk beobachtet werden. Tiere mit TNF- α -Überexpression zeigten degenerative Veränderungen der Kiefergelenke mit Erosion der Gelenkoberflächen. Bei zusätzlicher Rsk2-Defizienz erschienen diese eher verstärkt. Diese Ergebnisse bestätigen in vivo die zentrale Rolle von TNF- α für die Pathogenese von arthritischen Kiefergelenkveränderungen (Dimopoulou et al., 2015). Darüber hinaus deuten die μ CT-Aufnahmen auf einen protektiven Effekt von Rsk2 bei diesen Erkrankungen hin, welcher bereits im peripheren Skelett hinreichend etabliert wurde (Derer et al., 2014). Auf Grund der hohen klinischen Relevanz von rheumatischen Kiefergelenkserkrankungen sollten in weiteren Studien die Effekte von TNF- α und Rsk2 im Kiefergelenk näher untersucht werden.

05 Zusammenfassung

Seltene genetische Erkrankungen mit juvenilem Zahnverlust können Einblick in die molekulare Kontrolle des Zahnhalteapparats geben und neue regenerative Therapieansätze für Patienten mit Parodontitis aufzeigen. Bei Patienten mit Coffin-Lowry-Syndrom (CLS), das durch eine fehlende Funktion der ribosomalen S6 Kinase 2 (Rsk2) gekennzeichnet ist, wurden Nichtanlagen, verfrühter Zahnverlust und Störungen der Zementbildung beschrieben. In der vorliegenden Arbeit wurde daher der Einfluss von Rsk2 auf die postnatale Zahnentwicklung in einem Rsk2-defizienten Mausmodell untersucht. Darüber hinaus wurde analysiert, welchen Einfluss eine Steigerung des Knochenaufbaus durch Überexpression des osteoanabolen Faktors Fra1 bzw. einer Steigerung des Knochenabbaus durch Überexpression des proinflammatorischen Faktors TNF- α auf den Zahnhalteapparat in Rsk2-defizienten Tieren besitzt.

Mittels Kontaktradiographien und μ CT konnte gezeigt werden, dass eine Rsk2-Defizienz bei Mäusen zu Hyperdontie, Dentinhypoplasie und alveolärem Knochenabbau führt. Der Alveolarknochenabbau wurde bereits bei Tieren im Alter von 8 Wochen beobachtet und zeigte sich im Beobachtungszeitraum progredient. Eine Steigerung der Knochenformation in Rsk2-defizienten Tieren durch Überexpression von Fra1 führte nicht zu einer Verbesserung des Alveolarknochenlevels. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass der Alveolarknochenabbau bei Rsk2-Defizienz auf einem intrinsischen Defekt des Zahnhalteapparats beruht und unabhängig von der systemischen Knochenformation ist. Schließlich zeigte die Analyse von Tieren, die TNF- α überexprimieren, dass TNF- α und Rsk2 im Alveolarknochen nicht interagieren. In den Kiefergelenken konnte hingegen ein deutlicher degenerativer Effekt von TNF- α beobachtet werden, der durch Rsk2-Defizienz eher verstärkt wurde.

Zusammenfassend zeigt diese Arbeit die zentrale Funktion von Rsk2 für den Erhalt des Zahnhalteapparats und trägt somit zum Verständnis der Ätiopathogenese des juvenilen Zahnverlustes bei CLS bei. Die Ergebnisse bilden somit die Grundlage für die weitere Erforschung von Rsk2 im Bereich der Regeneration zahnbezogener Hartgewebe. Darüber hinaus deuten sie auf einen möglichen protektiven Effekt von Rsk2 bei TNF- α induzierten rheumatischen Kiefergelenkerkrankungen hin, welcher in weiteren Studien untersucht werden sollte.

06 Summary

Analyzing rare genetic disorders associated with juvenile oral bone loss can help to identify determining factors of periodontal development and find new ways of regenerative treatment for periodontitis. Patients with Coffin-Lowry-Syndrom (CLS), a genetic disorder caused by inactivating mutations in the ribosomal S6 kinase 2 (Rsk2), show hypodontia, premature tooth loss and impaired formation of cementum. This study investigates the effects of Rsk2 to the postnatal periodontal tissue development by the examination of Rsk2 knockout mice. Moreover, the study examines the alveolar bone level of mice lacking Rsk2 function combined with overexpression of both bone anabolic factor Fra1 and proinflammatory factor TNF- α .

Evaluations of x-ray images and μ CTs show that mice with Rsk2 deficiency suffer from hyperodontia, dentin hypoplasia and alveolar bone loss. The alveolar bone loss manifested already at eight weeks of age and was progressive. Overexpression of osteoanabolic factor Fra1 did not result in a higher alveolar bone level. Therefore these observations suggest that the alveolar bone loss is independent of the systematic bone formation but due to an internal defect of the periodontium. Finally the results of TNF- α overexpression revealed no interaction of Rsk2 and TNF- α for the alveolar bone. In contrast, in the temporomandibular joints, TNF- α caused severe degeneration, an effect that was further increased by Rsk2-deficiency.

Overall this study reveals the central function of Rsk2 for the integrity of the periodontium and therefore explains the reasons for juvenile premature tooth loss from CLS patients. Based on these findings further studies can investigate the Rsk2 function for the regeneration of periodontal tissues. Moreover the observations indicate a protection effect of Rsk2 from rheumatic mandibular joint disease caused by Rsk2, which should be examined in further studies as well.

07 Abkürzungsverzeichnis

Abbildung – Abb.

Activator Protein-1 - AP-1

Coffin-Lowry-Syndrom - CLS

Fos related protein 1 – Fra1

Kilovolt - kV

Kohlenstoffdioxid - CO₂

Micro-Computertomographie – MicroCT, μ CT

Ribosomale S6 Kinase 2 - Rsk2

Rsk2-defiziente Mäuse– *Rsk2*^{-y}

Sekunde - sec.

Standartabweichung - SD

Transgenic – tg.

Tumornekrosefaktor-alpha – TNF- α

Wildtyp – WT

08 Literaturverzeichnis

- Algate K., Haynes D. R., Bartold P. M., Crotti T. N. & Cantley M. D. (2016) The effects of tumour necrosis factor-alpha on bone cells involved in periodontal alveolar bone loss; osteoclasts, osteoblasts and osteocytes. *J Periodontal Res*, 51: 549-66.
- Armitage G. C. (2000) Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Northwest Dent*, 79: 31-5.
- Bartold P. M., Mcculloch C. A., Narayanan A. S. & Pitaru S. (2000) Tissue engineering: a new paradigm for periodontal regeneration based on molecular and cell biology. *Periodontology 2000*, 24: 253-69.
- Beck J., Garcia R., Heiss G., Vokonas P. S. & Offenbacher S. (1996) Periodontal disease and cardiovascular disease. *J Periodontol*, 67: 1123-37.
- Berry J. E., Ealba E. L., Pettway G. J., Datta N. S., Swanson E. C., Somerman M. J. & Mccauley L. K. (2006) JunB as a downstream mediator of PTHrP actions in cementoblasts. *J Bone Miner Res*, 21: 246-57.
- Bohm C., Derer A., Axmann R., Hillienhoff U., Zaiss M. M., Luther J., Zech C., Stock M., Scholtyssek C., Engelke K., Hess A., Tuckermann J. P., Schett G. & David J. P. (2012) RSK2 protects mice against TNF-induced bone loss. *J Cell Sci*, 125: 2160-71.
- Bosshardt D. D. & Schroeder H. E. (1992) Initial formation of cellular intrinsic fiber cementum in developing human teeth. A light- and electron-microscopic study. *Cell Tissue Res*, 267: 321-35.
- Bronner F. F.-C. M. R. H. (2010) Bone and Development. *Springer-Verlag*, 1: 334.
- Camelo M., Nevins M. L., Lynch S. E., Schenk R. K., Simion M. & Nevins M. (2001) Periodontal regeneration with an autogenous bone-Bio-Oss composite graft and a Bio-Gide membrane. *Int J Periodontics Restorative Dent*, 21: 109-19.
- Chapple I. L. (1993) Hypophosphatasia: dental aspects and mode of inheritance. *J Clin Periodontol*, 20: 615-22.
- Cobourne M. T. & Sharpe P. T. (2013) Diseases of the tooth: the genetic and molecular basis of inherited anomalies affecting the dentition. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol*, 2: 183-212.
- Cochran D. L. & Wozney J. M. (1999) Biological mediators for periodontal regeneration. *Periodontol 2000*, 19: 40-58.
- Cortellini P. & Tonetti M. S. (2000) Focus on intrabony defects: guided tissue regeneration. *Periodontol 2000*, 22: 104-32.

Currey J. D. (1969) The mechanical consequences of variation in the mineral content of bone. *J Biomech*, 2: 1-11.

Danesh-Sani S. A., Engebretson S. P. & Janal M. N. (2016) Histomorphometric results of different grafting materials and effect of healing time on bone maturation after sinus floor augmentation: a systematic review and meta-analysis. *J Periodontol Res*: 1600-765.

David J. P., Mehic D., Bakiri L., Schilling A. F., Mandic V., Priemel M., Idarraga M. H., Reschke M. O., Hoffmann O., Amling M. & Wagner E. F. (2005) Essential role of RSK2 in c-Fos-dependent osteosarcoma development. *J Clin Invest*, 115: 664-72.

Day P., Cole B. & Welbury R. (2000) Coffin-Lowry syndrome and premature tooth loss: a case report. *ASDC J Dent Child*, 67: 148-50.

Della Cella G., Stagnaro M. G., Beluschi C. & Forni G. L. (1987) Coffin-Lowry syndrome. Description of 2 cases associated with cardiovascular anomalies. *Pediatr Med Chir*, 9: 229-32.

Derer A., Bohm C., Grotzsch B., Grun J. R., Grutzkau A., Stock M., Bohm S., Sehnert B., Gaipf U., Schett G., Hueber A. J. & David J. P. (2014) Rsk2 controls synovial fibroblast hyperplasia and the course of arthritis. *Ann Rheum Dis*.

Dimopoulou D., Dimitroulas T., Akriviadis E. & Garyfallos A. (2015) Infliximab as a treatment option for patients with rheumatoid arthritis and primary biliary cirrhosis. *Rheumatol Int*, 11: 1913-6.

Ducy P., Schinke T. & Karsenty G. (2000) The osteoblast: a sophisticated fibroblast under central surveillance. *Science*, 289: 1501-4.

Eferl R. & Wagner E. F. (2003) AP-1: a double-edged sword in tumorigenesis. *Nat Rev Cancer*, 3: 859-68.

Eickholz P. (1999) Konventionelle Parodontalchirurgie und gesteuerte Geweberegeneration (GTR) mit nicht-resorbierbaren und biologisch abbaubaren Barrieren

Eine vergleichende klinische Untersuchung unter besonderer Berücksichtigung von Reproduzierbarkeit und Validität der erhobenen Parameter bzw. verwendeten Meßverfahren. *Med. Habilitation. Universität Heidelberg*.

Eickholz P. (2013a) Parodontologie von A bis Z Grundlagen für die Praxis. *Quintessenz Verlags-GmbH*, 1: 3-11.

Eickholz P. (2013b) Parodontologie von A bis Z Grundlagen für die Praxis. *Quintessenz Verlags-GmbH*, 1: 33-49.

Eickholz P. (2013c) Parodontologie von A bis Z Grundlagen für die Praxis. *Quintessenz Verlags-GmbH*, 1: 11-16.

Foster B. L., Nociti F. H., Jr. & Somerman M. J. (2014) The rachitic tooth. *Endocr Rev*, 35: 1-34.

Furseth R. (1969) The fine structure of the cellular cementum of young human teeth. *Arch Oral Biol*, 14: 1147-58.

Furseth R. (1970) A microradiographic, light microscopic and electron microscopic study of the cementum from deciduous teeth of pigs. *Acta Odontol Scand*, 28: 811-31.

Grigoriadis A. E., Wang Z. Q., Cecchini M. G., Hofstetter W., Felix R., Fleisch H. A. & Wagner E. F. (1994) c-Fos: a key regulator of osteoclast-macrophage lineage determination and bone remodeling. *Science*, 266: 443-8.

Hall B. E., Zhang L., Sun Z. J., Utreras E., Prochazkova M., Cho A., Terse A., Arany P., Dolan J. C., Schmidt B. L. & Kulkarni A. B. (2016) Conditional TNF-alpha Overexpression in the Tooth and Alveolar Bone Results in Painful Pulpitis and Osteitis. *J Dent Res*, 95: 188-95.

Hanauer A., Alembik Y., Gilgenkrantz S., Mujica P., Nivelon-Chevallier A., Pembrey M. E., Young I. D. & Mandel J. L. (1988) Probable localisation of the Coffin-Lowry locus in Xp22.2-p22.1 by multipoint linkage analysis. *Am J Med Genet*, 30: 523-30.

Hassell T. M. & Hefti A. F. (1991) Drug-induced gingival overgrowth: old problem, new problem. *Crit Rev Oral Biol Med*, 2: 103-37.

Heijl L., Heden G., Svardstrom G. & Ostgren A. (1997) Enamel matrix derivative (EMDOGAIN) in the treatment of intrabony periodontal defects. *J Clin Periodontol*, 24: 705-14.

Hillson S. (1986) Archaeology and the study of teeth. *Endeavour*, 10: 145-9.

Hunter A. G. (2002) Coffin-Lowry syndrome: a 20-year follow-up and review of long-term outcomes. *Am J Med Genet*, 111: 345-55.

Jepsen S., Kepschull M. & Deschner J. (2011) Wechselwirkungen zwischen Parodontitis und systemischen Erkrankungen. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz*, 54: 1089-96.

Jochum W., David J. P., Elliott C., Wutz A., Plenk H., Jr., Matsuo K. & Wagner E. F. (2000) Increased bone formation and osteosclerosis in mice overexpressing the transcription factor Fra-1. *Nat Med*, 6: 980-4.

Jordan A. R. & Micheelis W. (2016) Fünfte Deutsche Mundgesundheitsstudie (DMS V). *Deutscher Zahnärzte Verlag, Köln*, 5: 14-18.

Kang S. J., Lee E. K., Han C. H., Lee B. H., Lee Y. J. & Ku S. K. (2016) Inhibitory effects of *Persicariae Rhizoma* aqueous extracts on experimental periodontitis and alveolar bone loss in Sprague-Dawley rats. *Exp Ther Med*, 12: 1563-1571.

Kawana Y., Okamura K. & Kurahashi K. (2014) Boy with Coffin-Lowry syndrome associated with spinal cord injuries. *Masui*, 63: 203-5.

Keil A. (1966) Grundzüge der Odontologie. Allgemeine und vergleichende Zahnkunde als Organwissenschaft. *Gebrüder Borntraeger, Berlin*: 278.

Kim J. H., Lee D. E., Woo G. H., Cha J. H., Bak E. J. & Yoo Y. J. (2015) Osteocytic Sclerostin Expression in Alveolar Bone in Diabetic Rats With Ligature Induced-Periodontitis. *J Periodontol*: 1-14.

Koehne T., Jeschke A., Petermann F., Seitz S., Neven M., Peters S., Luther J., Schweizer M., Schinke T., Kahl-Nieke B., Amling M. & David J. P. (2016) Rsk2, the Kinase Mutated in Coffin-Lowry Syndrome, Controls Cementum Formation. *J Dent Res*, 95: 752-60.

Larsson S., Englund M., Struglics A. & Lohmander L. S. (2015) Interleukin-6 and tumor necrosis factor alpha in synovial fluid are associated with progression of radiographic knee osteoarthritis in subjects with previous meniscectomy. *Osteoarthritis Cartilage*, 23: 1906-14.

Laugel-Haushalter V., Paschaki M., Marangoni P., Pilgram C., Langer A., Kuntz T., Demassue J., Morkmued S., Choquet P., Constantinesco A., Bornert F., Schmittbuhl M., Pannetier S., Viriot L., Hanauer A., Dolle P. & Bloch-Zupan A. (2014) RSK2 is a modulator of craniofacial development. *PLOS One*, 9: 1-15.

Lima V., Vidal F. D., Rocha F. A., Brito G. A. & Ribeiro R. A. (2004) Effects of tumor necrosis factor-alpha inhibitors pentoxifylline and thalidomide on alveolar bone loss in short-term experimental periodontal disease in rats. *J Periodontol*, 75: 162-8.

Listgarten M. A., Lang N. P., Schroeder H. E. & Schroeder A. (1991) Periodontal tissues and their counterparts around endosseous implants *Clin Oral Implants Res*, 2: 1-19.

Luther J., Driessler F., Megges M., Hess A., Herbolt B., Mandic V., Zaiss M. M., Reichardt A., Zech C., Tuckermann J. P., Calkhoven C. F., Wagner E. F., Schett G. & David J. P. (2011) Elevated Fra-1 expression causes severe lipodystrophy. *J Cell Sci*, 124: 1465-76.

Marangoni P., Charles C., Tafforeau P., Laugel-Haushalter V., Joo A., Bloch-Zupan A., Klein O. D. & Viriot L. (2015) Phenotypic and evolutionary implications of modulating the ERK-MAPK cascade using the dentition as a model. *Sci Rep*, 5: 11658.

Matsuda S., Movila A., Suzuki M., Kajiya M., Wisitrasameewong W., Kayal R., Hirshfeld J., Al-Dharrab A., Savitri I. J., Mira A., Kurihara H., Taubman M. A. & Kawai T. (2016) A novel method of sampling gingival crevicular fluid from a mouse model of periodontitis. *J Immunol Methods*: preview abstract.

Mccauley L. K. & Somerman M. J. (2012) *Mineralized tissues in oral and craniofacial science biological principles and clinical correlates*, Ames, Iowa, Wiley-Blackwell, 1: 277-89.

Micheelis W. & Schiffner U. (2006) Vierte Deutsche Mundgesundheitsstudie (DMS IV). *Deutscher Zahnärzte Verlag, Köln*, 4: 5-6.

Nishimoto H. K., Ha K., Jones J. R., Dwivedi A., Cho H. M., Layman L. C. & Kim H. G. (2014) The historical Coffin-Lowry syndrome family revisited: identification of two novel mutations of RPS6KA3 in three male patients. *Am J Med Genet A*, 164a: 2172-9.

Noack B. (2008) Wechselwirkung: Parodontitis und Allgemeinerkrankungen. *ZWP Zahnarz Wirtschaft Praxis*, 5.

Norderyd J. & Aronsson J. (2012) Hypoplastic root cementum and premature loss of primary teeth in Coffin-Lowry syndrome: a case report. *Int J Paediatr Dent*, 22: 154-6.

Ott R., Krug W. & Vollmer H. (2002) Klinik- und Praxisführer Zahnmedizin. *Thieme, Stuttgart*, 1: 209-210.

Page R. C. & Kornman K. S. (1997) The pathogenesis of human periodontitis: an introduction. *Periodontol 2000*, 14: 9-11.

Rateitschak K. H. & Wolf H. F. (2003a) Farbatlanten der Zahnmedizin 1 Parodontologie. *Georg Thieme Verlag*, 3: 323-447.

Rateitschak K. H. & Wolf H. F. (2003b) Farbatlanten der Zahnmedizin 1 Parodontologie. *Georg Thieme Verlag*, 3: 39-50.

Rateitschak K. H. & Wolf H. F. (2003c) Farbatlanten der Zahnmedizin 1 Parodontologie. *Georg Thieme Verlag*, 3: 355.

Rateitschak K. H. & Wolf H. F. (2003d) Farbatlanten der Zahnmedizin 1 Parodontologie. *Georg Thieme Verlag*, 3: 21-66.

Robinson C. (2014) Enamel maturation: a brief background with implications for some enamel dysplasias. *Front Physiol*, 5: 388.

Romeo Y., Zhang X. & Roux P. P. (2012) Regulation and function of the RSK family of protein kinases. *Biochem J*, 441: 553-69.

- Rosen P. S., Reynolds M. A. & Bowers G. M. (2000) The treatment of intrabony defects with bone grafts. *Periodontol* 2000, 22: 88-103.
- Rosenbauer K. A. & Engelhardt J. P. (1998) Klinische Anatomie der Kopf- und Halsregion für Zahnmediziner. *Thieme, Stuttgart*: 146-150.
- Rosling B., Nyman S. & Lindhe J. (1976) The effect of systematic plaque control on bone regeneration in infrabony pockets. *J Clin Periodontol*, 3: 38-53.
- Salinas C. F. (1982) Orofacial findings and genetic disorders. *Birth Defects Orig Artic Ser*, 18: 79-120.
- Schroeder (1996) The junctional epithelium: origin, structure, and significance. A review. *Acta Med Dent Helv* 155-167.
- Schroeder H. E. (1986) The periodontium. Handbook of microscopic anatomy. *Springer-Verlag, Berlin*, 5: 23-129.
- Schroeder H. E. (1992) Biological problems of regenerative cementogenesis: synthesis and attachment of collagenous matrices on growing and established root surfaces. *Int Rev Cytol*, 142: 1-59.
- Schroeder H. E. (2000) Orale Strukturbiologie. *Thieme, Stuttgart*, 5: 37-81.
- Socransky S. S., Haffajee A. D., Cugini M. A., Smith C. & Kent R. L., Jr. (1998) Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol*, 25: 134-44.
- Teitelbaum S. L. (2007) Osteoclasts: what do they do and how do they do it? *Am J Pathol*, 170: 427-35.
- Temtamy S. A., Miller J. D. & Hussels-Maumenee I. (1975) The Coffin-Lowry syndrome: an inherited faciocardiac mental retardation syndrome. *J Pediatr*, 86: 724-31.
- Trivier E., De Cesare D., Jacquot S., Pannetier S., Zackai E., Young I., Mandel J. L., Sassone-Corsi P. & Hanauer A. (1996) Mutations in the kinase Rsk-2 associated with Coffin-Lowry syndrome. *Nature*, 384: 567-70.
- Vles J. S., Haspeslagh M., Raes M. M., Fryns J. P., Casaer P. & Eggermont E. (1984) Early clinical signs in Coffin-Lowry syndrome. *Clin Genet*, 26: 448-52.
- Wagner E. F. (2002) Functions of AP1 (Fos/Jun) in bone development. *Ann Rheum Dis*, 61 Suppl 2: 40-2.
- Watersprung D. & Sarnat H. (2006) Coffin-Lowry syndrome: findings and dental treatment. *Spec Care Dentist*, 26: 220-4.

Welsch U. & Deller T. (2010a) Lehrbuch Histologie. *Elsevier Urban & Fischer, Amsterdam, München*, 3.: 293-303.

Welsch U. & Deller T. (2010b) Lehrbuch Histologie. *Elsevier Urban & Fischer, Amsterdam, München*, 3.: 108-121.

Westfelt E., Nyman S., Socransky S. & Lindhe J. (1983) Significance of frequency of professional tooth cleaning for healing following periodontal surgery. *J Clin Periodontol*, 10: 148-56.

Wolff P. (2010) Vergleich zwischen ProRoot MTA und Kalziumhydroxid bei der direkten Überkappung der Rattenpulpa *Med. Dissertation, Universität Münster*

Yang X., Matsuda K., Bialek P., Jacquot S., Masuoka H. C., Schinke T., Li L., Brancorsini S., Sassone-Corsi P., Townes T. M., Hanauer A. & Karsenty G. (2004) ATF4 is a substrate of RSK2 and an essential regulator of osteoblast biology; implication for Coffin-Lowry Syndrome. *Cell*, 117: 387-98.

Zetterstrom O., Andersson C., Eriksson L., Fredriksson A., Friskopp J., Heden G., Jansson B., Lundgren T., Nilveus R., Olsson A., Renvert S., Salonen L., Sjostrom L., Winell A., Ostgren A. & Gestrelus S. (1997) Clinical safety of enamel matrix derivative (EMDOGAIN) in the treatment of periodontal defects. *J Clin Periodontol*, 24: 697-704.

Zhuang D., Han J., Bi L., Wang Y., Hao Y., Zhou Q. & Cao W. (2015) Sonodynamic effect of hematoporphyrin monomethyl ether on ligature-induced periodontitis in rats. *Drug Des Devel Ther*, 9: 2545-51.

09 Danksagung

Mein Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. Michael Amling, Leiter des Instituts für Osteologie und Biomechanik am Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf, für die Möglichkeit diese Studie unter seiner Obhut durchführen zu dürfen, sowie seiner offenen und freundschaftlichen Art, die mich stets motiviert hat.

Mein Dank gilt außerdem meinem Betreuer Dr. Till Köhne (Poliklinik für Kieferorthopädie), der mich mit der Durchführung, Gestaltung und besonders der statistischen Auswertung einer wissenschaftlichen Arbeit, sowie dem Verfassen der Dissertationsschrift unterstützt hat. Auch möchte ich meinem Betreuer Dr. Jean-Pierre David (Institut für Osteologie und Biomechanik) danken, der mich mit dem Sachverhalt vertraut gemacht hat. Darüberhinaus danke ich den Kolleginnen und Kollegen aus dem Institut für Osteologie und Biomechanik, die mir stets bei technischen Fragen helfend zur Seite standen.

Zuletzt danke ich meiner Familie, die mir immer Rückhalt und Unterstützung entgegen bringt.

Ich widme diese Arbeit meinem verstorbenen Großvater Dr. Friedhelm Rosenau.

11 Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Unterschrift: