

AUS DEM LEHRSTUHL  
FÜR ZAHNERHALTUNG UND PARODONTOLOGIE  
DIREKTOR: PROF. DR. W. BUCHALLA  
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN  
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

**ZELLPHYSIOLOGIE DER ODONTOBLASTEN –  
SIGNALWEGE MULTIFUNKTIONALER EPITHELZELLEN**

Inaugural - Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Zahnmedizin

der  
Fakultät für Medizin  
der Universität Regensburg

vorgelegt von

Laura Karin Felder

2021



AUS DEM LEHRSTUHL  
FÜR ZAHNERHALTUNG UND PARODONTOLOGIE  
DIREKTOR: PROF. DR. W. BUCHALLA  
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN  
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

**ZELLPHYSIOLOGIE DER ODONTOBLASTEN -  
SIGNALWEGE MULTIFUNKTIONALER EPITHELZELLEN**

Inaugural - Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Zahnmedizin

der  
Fakultät für Medizin  
der Universität Regensburg

vorgelegt von

Laura Karin Felder

2021

Dekan:

Prof. Dr. Dirk Hellwig

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. Helmut Schweikl

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. Dipl.-Ing. (FH) Martin Rosentritt

Tag der mündlichen Prüfung:

08.04.2022

## Inhaltsverzeichnis

<b>1.</b>	<b>Einleitung</b>	5
<b>2.</b>	<b>Fragestellung</b>	6
<b>3.</b>	<b>Methode</b>	7
<b>4.</b>	<b>Ergebnisse</b>	8
4.1	Struktur des Dentin-Pulpa-Komplexes	8
4.1.1	Zahntwicklung	8
4.2	Gewebe des Dentin-Pulpa-Komplexes	11
4.2.1	Weichgewebe der Zahnpulpa	11
4.2.1.1	Proteine der Zahnpulpa	11
4.2.1.2	Zellen der Zahnpulpa	12
4.2.2	Entwicklung des Zahnhartgewebes	15
4.2.2.1	Wurzelzement	15
4.2.2.2	Schmelzbildung	16
4.2.2.3	Dentinbildung	16
4.3	Struktur und Funktion der Odontoblasten	20
4.3.1	Morphologie der Odontoblasten	20
4.3.2	Physiologie der Odontoblasten	24
4.3.2.1	Bildung von Dentin	24
4.3.2.2	Immunfunktion der Odontoblasten	25
4.3.2.3	Mechanorezeption – sensorische Funktion	26
4.4	Intrazelluläre Signalwege zu Bildung von Dentin und Tertiärdentin	27
4.4.1	Karies und kariöse Mikroorganismen	27
4.4.2	Tertiärdentin	29
4.4.2.1	Reaktionsdentin	30
4.4.2.2	Reparaturdentin	31
4.5	Signalwege zur Bildung von Dentin	32
4.5.1	Der Wnt-Signalweg	32
4.5.1.1	Allgemeines zum Wnt-Signalweg	32
4.5.1.2	Wnt-Proteine und Sekretion	33
4.5.1.3	Der kanonische Wnt-Signalweg	35

4.5.1.4	Die Funktion von Wnt bei Zahnentwicklung und Differenzierung	37
4.5.1.5	Die Funktion von Wnt in der Tertiärdentinbildung	49
4.5.1.6	Inhibitoren des Wnt- Signalwegs	43
4.5.2	Der transformierende Wachstumsfaktor- $\beta$ (TGF- $\beta$ ) -Signalweg	43
4.5.2.1	Allgemeines zur Familie der TGF- $\beta$ -Proteine	43
4.5.2.2	TGF- $\beta$ Rezeptoren	45
4.5.2.3	TGF- $\beta$ vermittelte Smad-Aktivierung	45
4.5.2.4	Die Funktion von TGF- $\beta$ bei der Zahnentwicklung	50
4.5.2.5	Die Funktion on TGF- $\beta$ in der Tertiärdentinbildung	52
4.5.3	Der Fibroblasten-Wachstumsfaktor-Signalweg	54
4.5.3.1	Allgemeines zu FGF	54
4.5.3.2	Das FGF-Signalsystem	55
4.5.3.3	Der FGF-Signalweg	55
4.5.3.4	Regulation der FGF Ligandenaktivität	58
4.5.3.5	Regulation der FGFR-Funktion	59
4.5.3.6	Die Funktion von FGF bei der Zahnentwicklung	60
4.5.3.7	Die Funktion von FGF in der Tertiärdentinbildung	61
4.5.4	Funktion von Sphingomyelinasen in der Bildung von Dentin	62
4.5.5	Funktion von Histondeacetylasen	64
<b>5.</b>	<b>Schlussfolgerung</b>	<b>66</b>
<b>6.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>67</b>
<b>7.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>71</b>
<b>8.</b>	<b>Danksagung</b>	

## 1. Einleitung

In entwickelten Zähnen separieren Odontoblasten und darunter liegende Präodontoblasten (Höhl-Zellen) die Gewebe der dentalen Pulpa vom Dentin und kleiden als terminal differenzierte, postmitotische Zellen in einem einschichten Epithel die Pulpakammer aus (Ruch *et al.*, 1982; Couve *et al.*, 2013; Larmas und Sandor, 2014). Funktionell vereinen Odontoblasten drei sehr komplexe und scheinbar unabhängige Funktionen (Couve *et al.*, 2013). Als *sensorische Zellen* rezipieren Odontoblasten thermische, mechanische und chemische Reize. Sie exprimieren mechanosensitive Ionenkanäle oder allgemein TRP-Kanäle (*transient receptor potential channels*) als Basis von Mechanorezeption und Signaltransduktion. Ein hypothetisches Modell beschreibt Odontoblasten in ihrer Funktion als Rezeptoren hydrodynamischer Kräfte in den Dentintubuli, die Signale auch an Neurone weiterleiten und auf diese Weise an der Schmerzrezeption beteiligt sind (Allard *et al.*, 2000; Allard *et al.*, 2006; Magloire *et al.*, 2009; Mickle *et al.*, 2015). Die *Bildung von Dentin* ist nach gängiger Ansicht die primäre Funktion reifer Odontoblasten (Couve *et al.*, 2013). Funktionale Odontoblasten besitzen äußerst hohe sekretorische Aktivität. Sie sezernieren Kollagen I und bilden schließlich aus einem Geflecht von Kollagenfasern das nicht mineralisierte Prädentin. Die Mineralisierung des Prädentins und schließlich die Bildung von Zahnhartsubstanz ist genetisch durch sekretorische Kalzium-bindende Phosphoproteine (SCPP) reguliert (Rajan *et al.*, 2020). Unter pathologischen Bedingungen können auch reife Odontoblasten oder mesenchymale Stammzellen, die zu odontoblasten-ähnlichen Zellen differenzieren und irreversibel geschädigte Odontoblasten ersetzen, wieder vermehrt Dentin als Tertiärdentin in den beiden Formen von Reaktions- oder Reparaturdentin bilden. In einer vollkommen anderen Funktion detektieren Odontoblasten im verzweigten System der *zellulären Immunantwort* als Epithelzellen als erste Linie der Verteidigung die Invasion pathogener kariogener Keime, verstärken diese Information und geben sie an andere Immunzellen, etwa dendritische Zellen, im Pulpa-Dentin-Komplex weiter (Bleicher, 2014; Farges *et al.*, 2015).

Bis heute ist es nicht gelungen, primäre humane Odontoblasten zu kultivieren. Alternativ wurde in zahlreichen Ansätzen versucht, Pulpazellen einschließlich pulpaler Stammzellen (DPSC) mit speziellen Kulturmethoden in Zellen mit odontoblasten-ähnlichen Eigenschaften zu differenzieren (Smith *et al.*, 2016; Itoh *et al.*, 2018; Widbiller *et al.*, 2019a). Die Isolierung primärer humaner Odontoblasten *in vitro* wiederum wäre äußerst wünschenswert, weil nur so Details ihrer komplexen Funktionen der Schmerzrezeption, der

Dentinbildung und der Immunkompetenz auf zellulärer Ebene studiert werden könnten. Dieses Wissen wäre dann die Basis für therapeutische Ansätze und Strategien in der Zahnheilkunde.

In einem zellbiologisch orientierten Projekt einer Arbeitsgruppe der Poliklinik für Zahnerhaltung und Parodontologie wurden kürzlich Primärkulturen aus der Pulpa-Dentin-Grenze humaner Weisheitszähne isoliert. Die Bestimmung der Identität und die Charakterisierung dieser Zellen als Odontoblasten sind schwierige Vorhaben, weil mit steigender Zahl an Untersuchungen deutlicher wird, dass ein wirklich spezifischer Marker für Odontoblasten fehlt. Dennoch geben die Resultate der letzten Arbeiten Hinweise, dass die aus der Pulpa-Dentin-Grenze isolierten primären Zellen einen Odontoblasten-Phänotyp exprimieren. Sie wären damit perfekte Kandidaten für die detaillierte Analyse von Mechanismen der unterschiedlichen und komplexen Funktionen von Odontoblasten (Gallorini *et al.*, 2021). Aus dem aktuellen Stand des Wissens über diese Funktionen sollten sich für uns zielführende Forschungsansätze für drängende neue Projekte ergeben mit dem Ziel, aus den Forschungsergebnissen therapeutische Ansätze abzuleiten.

## **2. Fragestellung**

In der vorliegenden Arbeit sollen zunächst der Ursprung sowie Morphologie und Funktion von Odontoblasten im Kontext von Weich- und Hartgeweben des Pulpa-Dentin-Komplexes dargestellt werden. Auf dieser Basis wird dann das aktuelle Wissen über intrazelluläre Signalwege der Bildung von Dentin und Tertiärdentin als eine der gegenwärtig bekannten Funktionen von Odontoblasten erörtert. Derzeit werden für diese Funktion vor allem über Wnt/ $\beta$ -Catenin, TGF- $\beta$ /Smad und FGF vermittelte Pathways in Odontoblasten, odontoblasten-ähnlichen Zellen und dentalen Pulpazellen diskutiert (Rajan *et al.*, 2020). Die über sonic hedgehog (Shh) induzierten Signalwege werden in der vorliegenden Arbeit nicht diskutiert. Momentan ist nicht bekannt, wie spezifisch die Wnt/ $\beta$ -Catenin-, TGF- $\beta$ /Smad- oder FGF-vermittelten Signalwege für Odontoblasten wirklich sind und wie weit andere alternative Wege für die Funktion der Dentin- und Tertiärdentinbildung erforscht wurden. Zu diesen Fragen soll das in Literaturdatenbanken aktuell verfügbare Wissen erfasst werden.



### 3. Methode

Die Literaturrecherche wurde am 21.12.2020 von Dr. Knüttel (Universitätsbibliothek Regensburg; Teilbibliothek Medizin) unter Verwendung der Datenbank MEDLINE® über die Plattform OVID durchgeführt. Die Suchstrategie umfasst den Zeitraum von 1946 bis einschließlich 18. Dezember 2020. Es wurden die Schlüsselwörter „odontoblasts“, „dentinogenesis“, „dental pulp stem cells“ und „dentin“ insbesondere [odontoblasts] ((Odontoblasts/) OR ((odonto or odontob\* or preodontoblast\* or pre-odontoblast\* or odontocyt\*).ti,ab,kf.)) OR [dentinogenesis] ((Dentinogenesis/) OR (dentinogen\*.ti,ab,kf.)) OR (((primary or secondary or tertiary or reaction\* or reparative) adj dentin\*).ti,ab,kf.)) OR (Dentin, Secondary/) OR ((dentin\* adj3 (repair or regenerat\* or heal\* or mineralization or differentiation)).ti,ab,kf.)) OR ((orthodentin or predentin or metadentin).ti,ab,kf.)) OR [dental pulp stem cells] ((Dental Pulp/ and (Stem Cells/ or Mesenchymal Stromal Cells/)) OR (((dental or pulp) adj stem cell?).ti,ab,kf.)) OR ((DPSC or DPSCs or hDPSC or hDPSCs).ti,ab,kf.)) AND [dentin] ((exp dentin/) OR ((dentin\*).ti,ab,kf.)) verwendet. So ergab die Suche zunächst eine Trefferanzahl von 9007 ohne Duplettenentfernung.

Im Anschluss wurde ein Relevanzranking anhand weiterer Schlüsselwörter durchgeführt. Die erste Priorität umfasst [odontoblasts or dentinogenesis or (dental pulp stem cells AND dentin)] AND (exp Signal Transduction/) OR ((signal\* or pathway\* or transduction\* or messenger\*).ti,ab,kf.)) OR (exp Extracellular Matrix Proteins/) OR (exp Sialoglycoproteins/) OR (exp Phosphoproteins/) OR (dentin sialophosphoprotein.rn.) OR ((DSPP or dentin sialophosphoprotein or dentin sialo-phosphoprotein or dentin sialoprotein or dentin phosphoprotein).ti,ab,kf.)) OR ("DMP1 protein, human".rn. or "DMP1 protein, mouse".rn. or "DMP1 protein, rat".rn.) OR ((DMP-1 or DMP1 or DMP or (dentin matrix adj1 (protein or phosphoprotein))).ti,ab,kf.)) OR (exp Extracellular Matrix Proteins/) OR (extracellular matrix protein\*.ti,ab,kf.)) OR (SIBLING?.ti,ab,kf.)) OR ((RUNX2 or "runt-related transcription factor 2" or PEBP2A or "polyomavirus enhancer A binding protein 2").ti,ab,kf.)) OR („RUNX2 protein, human".rn. or "Runx2 protein, mouse".rn. or "Runx2 protein, rat".rn.) [molecular mechanisms] mit einer Trefferzahl von 2761. Die Trefferzahl zweiter Priorität ohne diese molekularen Terme lag bei 6246. Nach der Untersuchung aller 9007 Datenbankeinträge auf Dubletten ergaben sich 8992 individuelle Einträge.

Die Quellen konnten, gegliedert nach erster und zweiter Priorität, in das Literaturverwaltungsprogramm Citavi importiert werden. Mit Hilfe dessen wurden für die Arbeit ausschließlich die 2761 Referenzen erster Priorität nach „relevant“, „nicht relevant“,

„Relevanz unklar“ und „ausortierte Dubletten“ sortiert. Zusätzlich wurden weitere Referenzen händisch hinzugefügt.

## **4. Ergebnisse**

### **4.1 Struktur des Dentin-Pulpa-Komplexes**

Zähne sind ein strukturelles und funktionelles Komposit aus mineralisierten Hartgeweben und Weichgebe. Die mineralisierten Gewebe Schmelz, Dentin und Zement umschließen das Weichgewebe der Zahnpulpa, das lose im Zentrum des Zahns zu liegen kommt. Anatomisch und funktionell bilden Dentin und die Zahnpulpa den Pulpa-Dentin-Komplex (Dimitrova-Nakov und Goldberg, 2014). Im Folgenden sollen zunächst die einzelnen Stufen der Odontogenese betrachtet werden. Die dabei aktivierten Gene, Proteine und Signalwege sollten als molekulare Mechanismen früher Entwicklungsstadien ebenso bedeutend für spätere Reparaturprozesse der Pulpa sein.

#### **4.1.1 Zahnentwicklung**

Die Entwicklung des menschlichen Gebisses beginnt während der Embryogenese und reift in den fetalen, neonatalen und postnatalen Phasen. Weil die Lamina dentalis während der Wurzelbildung der Milchzähne abgebaut wird, geht auch die Verbindung zwischen den Knospen der Milchzähne und der permanenten Zähne verloren. Deswegen gibt es beim Menschen nur zwei Generationen von Zähnen (Yu und Klein, 2020). Das bleibende Gebiss ist erst mit Abschluss der Adoleszenz vollständig ausgebildet (Dimitrova-Nakov und Goldberg, 2014). Ab der fünften embryonalen Entwicklungswoche zeigt sich eine durchgehende Schicht aus verdicktem Epithel. An dieser Stelle befindet sich später der Ober- und Unterkiefer. Die sogenannte primäre epitheliale Lamina, die Lamina dentalis, führt anfänglich zu Zahnleisten, woraus dann einzelne Zähne entstehen.

Die eigentliche Zahnentwicklung beginnt ab der sechsten Woche, indem lokalisiert Verdickungen der epithelialen Lamina auftreten, woraus anschließend Oberkiefer- und Unterkieferzahnbögen ausgeformt werden. Bereits im frühen Stadium wird das Epithel durch eine Basallamina von dem darunterliegenden Ektomesenchym getrennt. Die Zahnentwicklung selbst ist Prozess und Resultat der Wechselwirkung zwischen Epithel und darunterliegendem Mesenchym (Thesleff, 2014). An dieser Stelle fungiert die Basallamina als Bindeglied und fördert den Austausch sowie epithel-mesenchymale Wechselwirkungen, welche wiederum

eine große Bedeutung für die Odontogenese insgesamt und die Entwicklung der Zahnplakoden im Besonderen haben.

Die Zahnplakode ist ein erstes Zentrum der Signalgebung in den Epithelien der Zahnentwicklung und initiiert die Entwicklung individueller Zähne (Thesleff, 2014). Die Signalmoleküle zwischen den Epithelien wiederum gehören zu Gruppen konservierter Moleküle wie Wnt, BMP, hedgehog (Shh) oder FGFs. Ihre Funktion und Kommunikation sind in Übersichtsartikeln ausführlich diskutiert (Yu und Klein, 2020; Thesleff, 2014). Das Ektomesenchym reagiert mit einer Konsistenzänderung und Kondensation von Zellen, die sich später in zwei Zelllinien teilen und die Dentalpapille sowie den peripheren Zahnfollikel bilden. Aus der Dentalpapille gehen schließlich Odontoblasten und Pulpagewebe hervor, aus dem Zahnfollikel entstehen Zementoblasten und Parodontalgewebe (Thesleff und Tummers, 2008).

Die epitheliale Invagination in das Ektomesenchym stellt den Bereich der Zahnkrone deutlich dar und lässt erkennen, dass sich der Zahn in unterschiedlichen Stadien entwickelt. Knospen-, Kappen- und Glockenstadien können nicht eindeutig voneinander getrennt werden, da die Zahnentwicklung ein kontinuierlicher Prozess ist (Abb. 1). Ursprünglich befindet sich jeder Zahn in Form einer Knospe (bud). So sind die Zahnknospen der Milch- und Schneidezähne ab der achten und die der Milchmolaren ab der neunten embryonalen Entwicklungswoche sichtbar. Charakteristisch für das Knospenstadium und den Übergang zur Zahnkappe ist die fortschreitende ektodermale Invagination in das Ektomesenchym, wonach die Zellen eng gepackt um die Zahnknospe liegen.

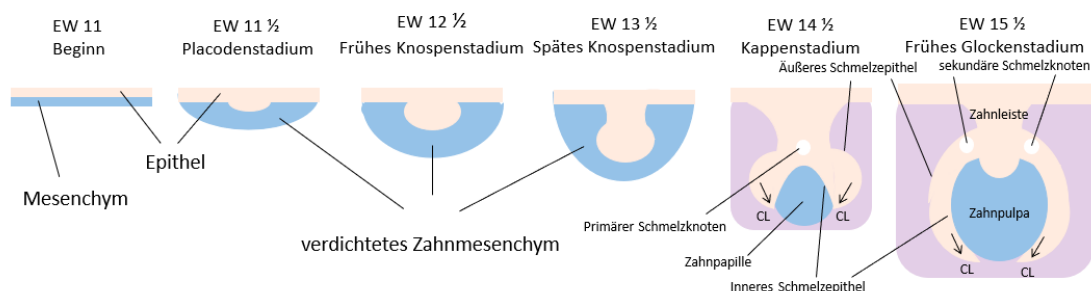


Abb. 1: Zahnentwicklung. Die Zahnentwicklung beginnt im Wesentlichen mit der Verdickung des Epithels ab der 11. Entwicklungswoche. Nach dem Placodenstadium ragt das Epithel während des frühen und späten Knospenstadiums immer weiter in das Zahnmesenchym und verdichtet sich mit diesem. Ab der Entwicklungswoche 14 senden zuerst die primären und eine Entwicklungswoche später die sekundären Schmelzknoten Signale zur Bildung und Ausbreitung der Cervixschleife (*ansa cervicalis*, CL). Diese besteht aus einem inneren und äußeren Schmelzepithel und umgibt im Kappenstadium zunächst die Zahnpapille, welche im frühen Glockenstadium (EW 15) schon die eigentliche Zahnpulpa darstellt. Die Abbildung wurde nach (Yu und Klein, 2020) modifiziert.

Für das nachfolgende Kappenstadium ist neben der sichtbaren Konkavität des Epithels auch das fortschreitende epitheliale Wachstum charakteristisch. Das sogenannte Schmelzorgan lässt sich in ein äußeres und inneres Schmelzepithel teilen (Dimitrova-Nakov und Goldberg, 2014). Ersteres befindet sich in der Peripherie der Kappe und steht in Kontakt mit dem peridental Mesenchym. Letzteres wird von Zellen gebildet, die durch die Basalmembran von der späteren Zahnpulpa getrennt sind und die schließlich zu den schmelzbildenden Ameloblasten differenzieren. In der Mitte des Schmelzorgans an der Spitze der Zahnknospe bilden Zellen des Epithels den primären Schmelzknoten (Abb. 1). Als zweites Zentrum von Zellen für die Signalgebung steuert der primäre Schmelzknoten den Übergang vom Knospen- in das Kappenstadium. Er induziert nach der Bildung sekundärer Schmelzknoten als drittes Zentrum der Signalgebung schließlich die Größe und Formgebung der Zähne einschließlich des endgültigen Höckerreliefs (Thesleff, 2014). Ursprung der Odontoblasten und der Zahnpulpa ist die aus dem Ektomesenchym gebildete Zahnpapille.

Da der Zahn im letzten Stadium, dem Glockenstadium, nun seine endgültige Form annimmt, spricht man von der Morphodifferenzierung. Die Stelle, an der das äußere und innere Schmelzepithel in Verbindung treten, wird als Reflexionszone oder Zervixschleife (*ansa cervicalis*) bezeichnet. Diese Zervixschleife verläuft in apikaler Richtung; über das Wachstum zervikaler Zellen des Schmelzepithels in tiefere Gewebe entsteht die Hertwig'sche Epithelscheide. Das präeruptive Kronenwachstum findet mit Hilfe verschiedener Zellteilungen und indem sich der Bereich der Zahnpapille abgrenzt, statt. Die Hertwig'sche Epithelscheide steuert die Wurzelbildung einschließlich der Differenzierung der Wurzelodontoblasten (Thesleff, 2014). Im späten Glockenstadium folgt dann die Differenzierung des inneren Schmelzepithels und der epithelial-mesenchymalen Grenzfläche zur Basalmembran. Diese Zellen wiederum differenzieren in Präameloblasten und Präodontoblasten und sezernieren schließlich die schmelz- und dentinbildenden Ameloblasten und Odontoblasten. Bereits am Ende der Kronenmorphogenese sind die ersten Schichten von Dentin und Schmelz zu erkennen (Dimitrova-Nakov, 2014). Somit werden Morphogenese und Zelldifferenzierung während der Embryogenese gekoppelt, indem Präameloblasten und Präodontoblasten in Abhängigkeit ihrer räumlichen Position und morphogenetischen Bewegung differenzieren. Diese Bewegung bewirkt die Ausbildung der Krone und den Beginn der Wurzelbildung. Das kondensierte Ektomesenchym wird auch als Zahnfollikel oder Zahnsack bezeichnet und ist am Rand des Schmelzorgans und der Zahnpapille lokalisiert. Aus ihm entstehen unterstützende Zahngewebe wie Zahnzement, Parodontalligament und Alveolarknochen. Es ist damit indirekt an der Entwicklung sowie an

der Wurzel- und Zahneruption beteiligt. Aus Schmelzorgan, Zahnpapille und Zahnfollikel werden schließlich Zahnorgan und Zahnkeim gebildet.

Da der Mensch zwei Phasen der Gebisse aufweist, eine primär vorübergehende und eine sekundär dauerhafte, setzt schon während der Odontogenese der Milchzähne die Entwicklung der bleibenden Zähne ein. Die Entwicklung der Milchzähne erfolgt um die sechste Schwangerschaftswoche aus einer primären Zahnschicht, wobei es schnell zur Koexistenz der bleibenden Zahnkeime kommt. Das Ende der Odontogenese liegt zwischen dem 18. und 25. Lebensjahr mit der Bildung der Zahnwurzel und der Entwicklung der Weisheitszähne. Die Entwicklung der bleibenden Zähne erfolgt auf zwei unterschiedliche Arten: entweder sukzessiv lingual am Schmelzorgan des Milchzahns oder, wie bei den bleibenden Backenzähnen, aus der Verlängerung einer anfänglichen Zahnschicht. Auch hier wird die räumliche und zeitliche Entwicklung durch epithelial-mesenchymale Wechselwirkungen und sequentiellm Signalaustausch durch die Basalmembran gesteuert (Dimitrova-Nakov und Goldberg, 2014).

## **4.2 Gewebe des Dentin-Pulpa-Komplexes**

### **4.2.1 Weichgewebe der Zahnpulpa**

#### **4.2.1.1 Proteine der Zahnpulpa**

Die dentale Pulpa ist ein sehr komplexes, vaskularisiertes und innerviertes Gewebe aus unterschiedlichen Populationen gewebeansässiger (residente) und nicht-ansässiger Zellen. Die Bildung der Zahnpulpa beruht auf residenten Zellen mit sekretorischen und reorganisatorischen Funktionen bei der Entstehung der kollagenreichen extrazellulären Matrix (ECM). So wurden in der Zahnpulpa eine Menge charakteristischer Zellen identifiziert mit Odontoblasten, Zellen der Subodontoblastenschicht, Stroma-Fibroblasten oder Pulpoblasten und mesenchymalen Stammzellen als den am häufigsten vorkommenden Zellpopulationen (Veis und Goldberg, 2014).

Pulpazellen besitzen die Fähigkeit, alle ECM-Proteine zu produzieren. Zu den Strukturproteinen zählen vor allem die Kollagene Typ I und Typ III in Verbindung mit Fibronektin und, in geringerem Maß, die Kollagene Typ V und Typ VI sowie Mikrofibrillen, die hauptsächlich aus Fibrillin aufgebaut sind. Neben den unterschiedlichen Kollagenen synthetisieren Zellen der Pulpa phosphorylierte nicht-kollagene ECM-Proteine wie die SIBLING-Proteine DSPP (*dentin sialophosphoprotein*), DMP-1 (*dentin matrix protein 1*),

BSP (*bone sialoprotein*), Osteopontin oder MEPE (*matrix extracellular phosphoglycoprotein*). Außerdem enthält die ECM nicht-phosphorylierte Proteine wie Osteocalcin, Osteonektin, Tenascin oder Fibronektin und Glycosaminoglykane oder Proteoglykane wie Decorin (Veis und Goldberg, 2014). Neben dem fucosylierten Glykoprotein Fibronektin, welches in der Odontoblastenschicht um die Blutgefäße herum und in großen Mengen im Kern der Pulpa vorliegt, wurden auch andere kleine Glykoproteine nachgewiesen. Es besteht ein Zusammenhang zwischen Proteoglykanen (PGs) und Fibronektin, dessen Expression von der Kalziumdosis abhängig ist. Die apikale Region enthält eine erhöhte Konzentration an Typ III-Kollagen. Aus dieser Zone konnte ebenso ein hoher Anteil an Fibronektin extrahiert werden, was auf ein Verhältnis von 1:1 in der Kollagen III zur Fibronektin-Komplexbildung schließen lässt (Goldberg *et al.*, 2011; Veis und Goldberg, 2014).

Extrazelluläre Funktionsproteine der dentalen Pulpa sind Wachstumsfaktoren wie HGF (*hepatocyte growth factor*), FGF-2 (*fibroblast growth factor 2*), TGF- $\beta$  (*transforming growth factor beta*), TNF $\alpha$  (*tumor necrosis factor  $\alpha$* ), LEF1 (*lymphocyte enhancer-binding factor 1*) oder BMP2 (*bone morphogenetic protein 2*), das zur großen TGF-Familie gehört sowie ihre Rezeptoren. Wichtige extrazelluläre Enzyme sind beispielsweise alkalische und saure Phosphatasen oder Metalloproteasen wie die Kollagenasen MMP-1 oder MMP-8 (Veis und Goldberg, 2014).

#### **4.2.1.2 Zellen der Zahnpulpa**

Nicht-residente Zellen aus dem Blut oder dem Knochenmark gelangen über das apikale Foramen in die Pulpa. Granulozyten sind die Hauptpopulation der Leukozyten (CD45+) neben CD3+-T-Lymphozyten, CD14+-Monozyten, dendritischen Zellen, natürlichen Killerzellen (NK), B-Zellen und regulatorischen T-Zellen (Renard *et al.*, 2016; Gaudin *et al.*, 2015). Diese teilweise auch residenten Zellen des Immunsystems koordinieren mit anderen, residenten Makrophagen, Odontoblasten, Pulpafibroblasten, mesenchymalen Stammzellen oder Nervenzellen immunologische Reaktionen auf kariogene Mikroorganismen und initiieren Reparaturprozesse geschädigter Gewebe (Galler *et al.*, 2021). Aber nicht nur dabei übernehmen die diversen Zelltypen ganz spezifische Aufgaben.

### *Nervenzellen*

Die dentale Pulpa ist ein sehr dicht innerviertes Gewebe mit der überwiegend afferenten Übertragung von Signalen in das zentrale Nervensystem. Dabei werden zunächst primäre afferente Fasern stimuliert, die letztlich vorwiegend Schmerzempfindung unterschiedlicher Intensität auslösen. Damit verbunden ist sehr häufig eine Entzündung der Pulpa, bei der Nervenfasern wohl nicht nur das Gefühl für Schmerzen übermitteln, sondern die möglicherweise auch über klassische Neurotransmitter an der Regulation der Entzündungsreaktion selbst beteiligt sind (Zhan *et al.*, 2020).

### *Pulpafibroblasten*

Pulpafibroblasten bilden die größte Population der Zellen der Zahnpulpa. Diese schmalen länglichen Zellen fusiformer Art sind durch desmosomenartige Gap Junctions und Tight Junctions verbunden. Pulpafibroblasten haben sekretorische Funktion und bilden die extrazelluläre Matrix (ECM) samt Bindegewebe. Die Population der Fibroblasten der Pulpa ist anscheinend sehr heterogen mit unterschiedlichen Funktionen. Es gibt Hinweise, dass diese Zellen Wachstumsfaktoren wie BMPs oder TGF- $\beta$  sowie die adäquaten Rezeptortypen IA, I und II exprimieren, ebenso wie VEGF (*vascular endothelial growth factor*), der die Vaskularisierung initiiert (Jeanneau *et al.*, 2017). Diese Faktoren regulieren die Gewebeerneuerung und Regeneration der dentalen Pulpa (Chmilewsky *et al.*, 2014).

Pulpafibroblasten exprimieren aber auch alle Komponenten des Komplement-Systems als Bestandteil des angeborenen Immunsystems. Diese lokale Bildung der kleinen Proteine außerhalb der Leber kann den Entzündungsprozess, aber auch den Heilungsvorgang verstärken. Gleichzeitig bilden Pulpafibroblasten mit diesen Komponenten einen Membranangriffskomplex (*membrane attack complex, MAC*), ebenfalls als Funktion des Immunsystems gegen kariogene Bakterien (Bergmann *et al.*, 2020). Weil Fibroblasten auch Mustererkennungsrezeptoren (*pattern-recognition receptors; PRR*) wie Toll-like- (TLR) und NOD-like-Rezeptoren (NLR) exprimieren, unterstützen sie die Erkennung inflammatorischer Moleküle. Als Reaktion auf Pathogen-assoziierte molekulare Muster (*pathogen-associated molecular patterns; PAMP*) wie LPS (Lipopolysaccharid) oder LTA (Lipoteichonsäure) bilden sie proinflammatorische Zytokine und Chemokine (Galler *et al.*, 2021). Diese protektiven immunologischen Funktionen der Pulpafibroblasten fördern den Regenerationsprozess pulpaler Gewebe.

### *Stammzellen in der dentalen Pulpa*

Das dentale Pulpagewebe enthält Stammzellen, die wegen ihres Ursprungs neurale und mesenchymale Eigenschaften exprimieren (Galler *et al.*, 2021). Dabei ist die Bezeichnung „mesenchymale Stammzellen (MSCs)“ eine allgemeine für Zellen aus dem Bindegewebe oder Stroma, die *in vitro* Eigenschaften von Stammzellen exprimieren. Zellen mit einem ähnlichen Immunphänotyp und ähnlichen funktionalen Eigenschaften wurden in vielen Organen nachgewiesen. Eine charakteristische funktionelle Eigenschaft ist die Fähigkeit dieser Zellen, in geeigneten Medien *in vitro* in Chondrozyten, Adipozyten oder Osteoblasten zu differenzieren. Ein Nachweis multipotenter Eigenschaften einzelner Zellen *in vivo* fehlt jedoch bisher (Yianni und Sharpe, 2019). Eine andere Eigenschaft dieser Zellen ist die Expression sogenannter Marker für MSCs wie CD90, CD73 oder CD105 (Yianni und Sharpe, 2019; Dominici *et al.*, 2006).

Diese Eigenschaften wurden auch in Zellkulturen nachgewiesen, die aus Pulpagewebe von Milchzähnen und bleibenden Zähnen isoliert wurden (Gronthos *et al.*, 2000; Miura *et al.*, 2003). Die Pulpa von Milchzähnen enthält eine Population von Stammzellen mit möglicherweise multipotenten Eigenschaften, die wahrscheinlich als Hinweis auf ihre Herkunft Marker von Nerven- und Gliazellen exprimieren (Miura *et al.*, 2003). Aus dem Pulpagewebe bleibender Zähne bilden Zellen mit hoher Proliferationsrate in Kultur als Hinweis auf die Fähigkeit zu mineralisieren nach mehreren Wochen in einem Differenzierungsmedium mit Ascorbinsäure, Dexamethason und Phosphat dichte Körperchen mit hohem Kalziumgehalt. In immunsupprimierten Mäusen bildeten Explantate dieser nun als DPSC bezeichneten Zellen Dentin-ähnliche Strukturen in einer kollagenen Matrix, zeigten zytoplasmatische Fortsätze in die Dentinmatrix und exprimierten Matrixkomponenten wie Bonesialoprotein, Osteocalcin oder DSPP. Weil diese Zellen in solche mit Eigenschaften von Odontoblasten differenzierten, wurden sie schließlich als odontoblasten-ähnlich (*odontoblast-like*) bezeichnet (Gronthos *et al.*, 2000). DPSCs mit diesen Merkmalen können auch aus Perizyten der Pulpa gewonnen werden, dennoch sind sie sehr wahrscheinlich nicht die einzige Quelle von DPSCs (Yianni und Sharpe, 2019; Sharpe, 2016).

Die Stammzellen der Pulpa, die in odontoblasten-ähnliche Zellen differenzieren, sind ein Baustein in der Reparatur von Pulpaschäden durch Trauma oder Karies. Als Konsequenz schwerer Schäden des Dentins verbunden mit einer Exposition von Pulpagewebe werden DPSC aktiviert, wandern an den Ort der Schädigung und bilden nach ihrer Differenzierung als



odontoblasten-ähnliche Zellen Reparaturdentin. Signale ihrer Aktivierung und Rekrutierung werden unten diskutiert.

#### *Odontoblasten an der Pulpa-Dentin-Grenze*

Struktur und Funktion von Odontoblasten werden in einem separaten Kapitel behandelt, weil sie neben Dentin auch Reaktionsdentin bilden (Kapitel 4.3). Die Prozesse und Signalwege, die zur Bildung von Dentin und Reaktionsdentin führen, sind ein wesentlicher Teil dieser Arbeit.

### **4.2.2 Entwicklung von Zahnhartgeweben**

Der Zahn besteht aus den mineralisierten Geweben Schmelz und Dentin, die das nicht mineralisierte, vaskularisierte und innervierte Weichgewebe der Zahnpulpa umgeben. Wurzelzement als drittes Zahnhartgewebe ist in knochenähnlicher Struktur eng mit dem Dentin der Zahnwurzel verbunden. Im Folgenden werden Eigenschaften des Wurzelzements und des Schmelzes nur kurz skizziert. Die Eigenschaften von Dentin hingegen sollen ausführlicher erörtert werden, weil die Beschreibung molekularer Mechanismen der Aktivierung der Funktion dentinbildender Zellen eine zentrale Fragestellung der vorliegenden Arbeit ist.

#### **4.2.2.1 Wurzelzement**

Wurzelzement wird von Zementoblasten als dünnes, kalzifiziertes, nicht-vaskuläres Gewebe gebildet. Es besteht je zur Hälfte aus anorganischem Hydroxylapatit und einer organischen Matrix aus Proteinen wie Kollagen (Typ I) und nicht-kollagenen Proteinen wie Dentinmatrixprotein 1 (DMP-1), Bonesialoprotein (BSP), Osteopontin, Osteocalcin oder Osteonektin. Ähnlich wie in der Dentinogenese wird die Expression dieser Proteine von Faktoren wie TGF- $\beta$ , BMPs oder Wnt reguliert. Als zentraler Transkriptionsfaktor wurde bisher *Osx* (*osterix*) identifiziert, der seinerseits, von Wnt oder TGF- $\beta$  gesteuert, die Expression etwa von DMP1, BSP oder Osteocalcin kontrolliert. Eine ausführliche Diskussion dieser Prozesse wurde verschiedentlich publiziert (Baranova *et al.*, 2020; Han *et al.*, 2014a).

#### 4.2.2.2 Schmelzbildung

Zahnschmelz liegt im Bereich der Zahnkrone in einer dünnen Schicht eng verbunden über dem Dentin. Er besteht zu etwa 95% aus Hydroxylapatit und zu nur 5% aus organischer Matrix. Als schließlich nicht-zelluläres Gewebe kann Schmelz, anders als Dentin, nach seiner Bildung bei einer Schädigung, etwa durch Karies, nicht regeneriert werden. Schmelz wird von Ameloblasten, die aus dem inneren Schmelzepithel entstehen, gebildet, indem sie Proteine wie Amelogenin, Ameloblastin oder Enamelin als Gerüst für die anschließende Mineralisierung sezernieren (Green *et al.*, 2019). Die organische Matrix wird gegen Ende der Reife proteolytisch abgebaut, etwa durch die Matrixmetalloproteinase 20 (MMP20), und Ameloblasten gehen nach erfüllter Funktion in die Apoptose. Wie für die anderen Zahnhartgewebe auch, wird die Aktivität der Ameloblasten durch Transkriptionsfaktoren und Proteine wie Shh (*sonic hedgehog*), Klk4 (*kallikrein-4*), Runx2, Wnt/ $\beta$ -Catenin oder die TGF- $\beta$ -Superfamilie mit BMPs und TGF- $\beta$  gesteuert. Auch diese Entwicklung ist an anderer Stelle ausführlich erörtert (Baranova *et al.*, 2020; Lacruz *et al.*, 2017).

#### 4.2.2.3 Dentinbildung

##### *Proteine des Dentins*

Bei der Entwicklung bleibender Zähne spielen die Odontoblasten und Hoehls-Zellen, welche aus den Nervenstämmen abstammen, eine entscheidende Rolle. Sie bilden gemeinsam eine Schicht am Rand der Pulpa und sind zusätzlich an der Konfiguration der Pulpaauskleidung beteiligt (Goldberg, 2014b). Die ektomesenchymalen Odontoblasten produzieren alle Komponenten des tubulären Orthodontins in einem geschlossenen dichten Epithel an der Pulpa-Dentin-Grenze. Dentin selbst ist ein nicht-zelluläres Hartgewebe, das aus 70% Hydroxylapatit, 20% organischer Phase und 10% Wasser besteht (Baranova *et al.*, 2020; Goldberg *et al.*, 2011). Allein Kollagen bildet ungefähr 90% der Proteine der organischen Matrix. Typ I-Kollagen, dessen Ketten sich zu einer Tripelhelix zusammenfügen, wiederum ist die häufigste Form des Kollagens, aber auch Typ III und in geringen Mengen Typ V/IV wurden nachgewiesen (Goldberg *et al.*, 2011; Christiansen *et al.*, 2000).

Neben den kollagenen Proteinen enthält Dentin außer Wachstumsfaktoren und hunderten anderer Proteinspezies wenige nicht-kollagene, phosphorylierte Proteine der Familie der *small integrin-binding ligand N-linked glycoproteins* (SIBLINGs) wie Bonesialoprotein (BSP), Osteopontin (OPN), MEPE (*matrix extracellular phosphoglycoprotein*), Dentinmatrixprotein 1 (DMP1) und Dentinsialophosphoprotein

(DSPP). Man vermutet, dass gerade diese Proteine wesentlich an der Mineralisation des Prädentins beteiligt sind (Fisher und Fedarko, 2003; Goldberg *et al.*, 2011; Veis und Goldberg, 2014; Widbiller *et al.*, 2019b).

Dentinsialophosphoprotein (DSPP) etwa, das nicht nur in Dentin, sondern auch in Knochen und sogar in Tumoren nachgewiesen wurde, wird unmittelbar nach der Sekretion extrazellulär von MMP2 und MMP20 in die drei Proteine Dentinsialoprotein (DSP), Dentineglykoprotein (DGP) und Dentinphosphoprotein (DPP) oder Phosphophoryn (PP) gespalten. Allerdings ist bis heute nicht bekannt, ob DGP eine Komponente humanen Dentins ist (Goldberg *et al.*, 2011; Yamakoshi, 2008). Die beiden natürlichen humanen Proteine DSP und DPP sind wohl Spaltprodukte der Aktivität von BMP1 (Marschall und Fisher, 2010). Dentinsialoprotein (DSP) ist ein weniger stark phosphoryliertes Protein aus dem N-terminalen Ende von DSPP und neben DPP mit einem Anteil von 5-8% das häufigste nicht-kollagene Protein des Dentins. DPP ist als sehr stark phosphoryliertes, extrem saures und Kalziumbindendes Protein ein Kristallisationskeim der Dentinmineralisation. Wie Osteopontin (OPN) ist DSP ähnlich aufgebaut wie Bonesialoprotein (BSP) (Marschall und Fisher, 2010; Ritchie, 2018). Es ist möglich, dass die Expression von DSPP durch TGF $\beta$ -1 inhibiert, durch BMP-2 jedoch aktiviert wird (Thyagarajan *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 2008). Dentinmatrixprotein-1 (DMP-1) ist ebenfalls ein sehr stark phosphoryliertes und saures Protein, das in Dentin in zwei proteolytischen Fragmenten (37 kDa und 57 kDa) des Gesamtproteins vorkommt. DMP-1 wurde an der Mineralisierungsfront lokalisiert, es bindet an Kollagenfibrillen, bindet selbst Kalziumionen und ist daher vermutlich ebenso wie DSPP an der Mineralisation von Prädentin beteiligt (George *et al.*, 1993; Qin *et al.*, 2007). Wahrscheinlich steuert DMP-1 auch die Regulation der Expression von DSPP und wird selbst von TGF $\beta$ -1 kontrolliert (Unterbrink *et al.*, 2002; Narayanan *et al.*, 2006).

Bonesialoprotein (BSP) ist ein weiteres Protein, von dem man annimmt, es fördere den Prozess der Biomineralisation. Man schätzt, dass dieses sehr stark posttranslational modifizierte Protein etwa 1% der nicht-kollagenen Proteine des Dentins ausmacht. Die Funktion von BSP in der Dentinogenese ist jedoch bis heute unbekannt. BSP ist anscheinend wie Osteopontin ein multifunktionales Protein. Es fördert in Knochen wahrscheinlich die initiale Bildung von Mineralkristallen wegen seines hohen Gehalts an Glutamat, es ist allerdings auch ein Faktor in der Tumorbilogie (Kruger *et al.*, 2014).

Osteopontin (OPN) ist ein phosphoryliertes Glykoprotein in der Entwicklung von Hartgewebe wie Knochen, es hat allerdings auch Funktionen in der Immunregulation. Als Zytokin fördert es die Immunfunktion in Entzündungsprozessen während der Wundheilung.

Wie BSP ist auch OPN eines der nicht-kollagenen Proteine der extrazellulären Matrix in Dentin mit bislang nicht geklärter Funktion (Kruger *et al.*, 2014; Sodek *et al.*, 2000).

MEPE (*matrix extracellular phosphoglycoprotein*) ist ebenfalls ein phosphoryliertes Protein mit einer Sequenz von Arg-Gly-Asp (RGD), die das Zellattachement fördert, sowie Serin-reichen Sequenzen mit Homologie zu DSPP, DMP-1 oder auch OPN (Rowe *et al.*, 2000). Die Funktion von MEPE ist ebenfalls nicht geklärt. Möglicherweise inhibiert sein C-terminales Fragment (Dentonin) die Differenzierung von Odontoblasten und den Prozess der Mineralisation (Gullard *et al.*, 2016; Liu *et al.*, 2004).

Andere Strukturproteine des Dentins wie Osteocalcin und Osteonektin, die auch im Knochengewebe vorkommen, besitzen Bindungsstellen für Kollagen und Hydroxylapatit. Ihre Bestimmung in der Bildung von Hartgewebe ist nicht eindeutig geklärt, neuere Untersuchungen verweisen jedoch auch auf endokrine Funktionen (Zoch *et al.*, 2016; Rosset und Bradshaw, 2016). Verschiedene Proteoglykane, darunter Biglycan und Decorin, sind ausführlicher an anderer Stelle beschrieben (Goldberg *et al.*, 2011; Fisher und Fedarko, 2003).

### *Mineralisation des Dentins*

Dentin wird von den vom Mesenchym abgeleiteten Odontoblasten gebildet. Die Odontogenese als solche weist über einen ähnlichen Satz von Proteinen Parallelen zur Knochenentwicklung auf. Zu den wichtigsten Strukturproteinen zählen Kollagen Typ I, Osteocalcin, Bonesialoprotein (Bsp), Osteopontin, Dentinmatrixprotein 1 und Dentinsialophosphoprotein.

Verglichen mit dem ausführlich untersuchten Prozess der Schmelzbildung ist die Regulation der Dentinmineralisierung weniger gut verstanden. DMP1 reguliert die DSPP-Expression direkt durch die Bindung an seinen Promoter und induziert so die Aktivierung der Transkription, welche für die frühe Odontoblastendifferenzierung wichtig ist (Narayanan *et al.*, 2001; Yu und Klein, 2020). Der für die Knochenentwicklung essentielle Transkriptionsfaktor Sp7 (Osterix) soll ebenfalls an der Aufrechterhaltung von Größe und Form der Molaren und Schneidezähne von Bedeutung sein (Yu und Klein, 2020; Bae *et al.*, 2018).

Eine entscheidende Rolle spielen neben den transformierenden Wachstumsfaktoren (TGF) auch Mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK) beim Übergang der sekundären in die tertiäre Dentinogenese, indem sie grundlegend zelluläre Funktionen wie Proliferation, Differenzierung, Motilität, Stressaktion, Apoptose und Überleben steuert. Zur TGF-

Superfamilie gehören TGF- $\beta$ 1 und TGF- $\beta$ 3, welche als Marker aktiv die Differenzierung der Odontoblasten bis hin zur Tertiärdentinbildung fördern (Rajan *et al.*, 2020; Simon *et al.*, 2011).

### *Unterschiedliche Arten von Dentin und Dentinbildung*

Während der Dentinogenese sezernieren Odontoblasten extrazelluläre Matrixmoleküle (organische Matrix) wie Kollagen Typ I, das gemeinsam mit Proteoglykanen ein kollagenes Netzwerk als nicht-mineralisiertes Prädentin bildet. Schließlich setzen Odontoblasten andere, nicht-kollagene Matrixproteine wie DMP-1 oder DSPP frei, die als Kondensationskerne die Mineralisation des Prädentins in Form von Hydroxylapatit fördern (Goldberg *et al.*, 2011). Ausgehend von der Odontoblastenschicht werden zur Peripherie hin Prädentin, intertubuläres und peritubuläres Dentin als insgesamt zirkumpulpaes Dentin sowie Manteldentin an der Grenze zum Schmelz unterschieden.

Das nicht-mineralisierte Prädentin ist eine 15-20  $\mu$ m dicke Schicht eines Netzwerks aus Kollagen Typ I (90%) und anderen Proteinen der extrazellulären Matrix wie den nicht-kollagen Glykoproteinen, Proteoglykanen und SIBLINGs wie DMP-1 und DSPP. Diese beiden phosphorylierten Proteine sind Marker der aktiven Dentinbildung und verweisen auf die sekretorische Phase der Odontoblasten (Goldberg *et al.*, 2011; Couve *et al.*, 2013; Rajan *et al.*, 2020). In dieser Phase bilden Odontoblasten Primärdentin über zwei bis drei Jahre mit einer Rate von etwa 4–8  $\mu$ m/Tag (Couve, 1986; Balic und Mina, 2011). Sobald die Zahnkrone gebildet ist und der funktionale Zahn aus dem Kiefer in die Mundhöhle durchbricht, transformieren Odontoblasten aus der sekretorischen Phase und der Bildung von Primärdentin in eine Phase der Reifung mit der Bildung von Sekundärdentin während der gesamten Lebensphase. Dabei ändern Odontoblasten ihren Phänotyp oder ihre Morphologie und reduzieren die Dentinbildung auf etwa 0,5  $\mu$ m/Tag (Couve, 1986; Bleicher, 2014; Rajan *et al.*, 2020). Spätestens jetzt wird im zirkumpulpaes Dentin zwischen intertubulärem und peritubulärem (intratubulärem) Dentin unterschieden (Holland, 1985; Goldberg *et al.*, 2011). Nach dem Zahndurchbruch kann Dentin nach einem Verlust, etwa in Folge eines Traumas wie der Präparation einer Kavität oder durch Karies infolge der Aktivität kariogener Bakterien oder ihrer Produkte, nicht mehr ersetzt werden. Dennoch kann Tertiärdentin an der Pulpa-Dentin-Grenze entlang von Dentintubuli des Primär- oder Sekundärdentins gebildet werden. Je nach Stärke des Stimulus unterscheidet man zwischen Reaktionsdentin und Reparaturdentin (Ricucci *et al.*, 2014a; Smith *et al.*, 1995; Magloire *et al.*, 2001).

## *Regulation der Dentinbildung*

Die Regulation der Expression kollagener und nicht-kollagener Matrixproteine des Dentins und damit der Prozess der Mineralisierung durch Odontoblasten ist bisher nur in Ansätzen bekannt. In der aktuell verfügbaren Literatur sind dafür Funktionen von Wnt, BMP/TGF- $\beta$  oder Shh beschrieben, Signalmoleküle und Signalwege also, die an der Regulation der Zahnentwicklung allgemein beteiligt sind. Außerdem können Enzyme wie die Histone-Deacetylase (HDAC) als Regulator der Transkription genetischer Information oder die neutrale Sphingomyelinase 2 (nSMase2), die mit Ceramiden Mediatoren des intrazellulären Vesikeltransports erzeugt, den Vorgang der Mineralisierung kontrollieren. Ähnlichkeiten der genetischen Struktur von SIBLING-Genen an einem Genort eines Chromosoms ließen nun vermuten, dass diese Gene ursprünglich aus Genverdopplungen resultierten. Diese Gruppierung, Ähnlichkeiten der Intro-Exon-Grenzen und Gemeinsamkeiten in den Exonsequenzen selbst waren Gründe, diese Proteine in einer Familie zusammenzufassen (Fisher und Fedarko, 2003). Daher darf man auch in der vorliegenden Arbeit annehmen, dass die Regulation ihrer Expression von gleichen, wenn nicht sogar von identischen Mechanismen reguliert wird. Diese Regulation sollte temporär und lokal koordiniert und synchron erfolgen. In den folgenden Abschnitten werden deswegen zunächst Eigenschaften der Odontoblasten beschrieben. Anschließend wird die Bedeutung von Signalwegen für die Bildung von Dentin und insbesondere von Tertiärdentin genauer erörtert.

### **4.3 Struktur und Funktion von Odontoblasten**

#### **4.3.1 Morphologie der Odontoblasten**

Im Lebenszyklus der ektomesenchymalen Odontoblasten werden morphologisch vier Stadien unterschieden. Als Präodontoblasten sezernieren die Zellen sehr intensiv Proteine mit hoher Intensität und beginnen, Zellpolarität auszubilden. Die aus Präodontoblasten differenzierten postmitotischen sekundären Odontoblasten nehmen an Größe bis zu etwa 50  $\mu\text{m}$  zu und bilden Primärdentin. In transitionalen Odontoblasten, die Sekundärdentin bilden, lässt die sekretorische Aktivität sehr stark nach und die Zahl der Zellorganellen nimmt wahrscheinlich durch den Prozess der Autophagie ab. Gealterte Odontoblasten schließlich bewahren die zylindrische Form und enthalten nur noch wenige Zellorganelle um den Zellkern. Diese Zellen entwickeln ein autolysosomales System mit großen Vakuolen aus der Verschmelzung von Autophagosomen und Lysosomen. Diese Vakuolen mit den Markern LC3 (*microtubule-associated protein light chain 3*) und LAMP2 (*lysosome-associated membrane*

*protein 2*) entwickeln eine dynamische autophagische Aktivität für Abbauprozesse von Organellen und Proteinen. Der kontinuierliche Umsatz vor allem von Mitochondrien, aber auch anderer Organelle und Proteine, führt zu einer Ansammlung von Lipofuscin als pigmentierte Aggregate von Proteinen in Autolysosomen (Goldberg, 2014b; Couve, 1986; Ruch *et al.*, 1995; Couve *et al.*, 2013).

Odontoblasten kleiden als einschichtig geordnetes Epithel an der Pulpa-Dentin-Grenze die Pulpakammer aus. Dabei ist die zelluläre Polarisation eine grundlegende Eigenschaft von Odontoblasten und das Ergebnis der morphologischen Veränderung symmetrischer mesenchymaler Zellen zu asymmetrischen Epithelzellen. Zellpolarität kennzeichnet Unterschiede in Form, Struktur und Funktion innerhalb einer Zelle. Als eng gepackte, langgestreckte, zylinderförmige Zellen bilden Odontoblasten ein Säulenepithel und senden Zellfortsätze in das tubuläre Prädentin und weiter in das mineralisierte Dentin bis an die Pulpa-Dentin-Grenze (Abb. 2 und 3). Während der Bildung von Primärdentin ist die morphologische Veränderung der Odontoblasten das entscheidende Ereignis in der Bildung des tubulären Dentins (Couve, 1986; Chang *et al.*, 2019).

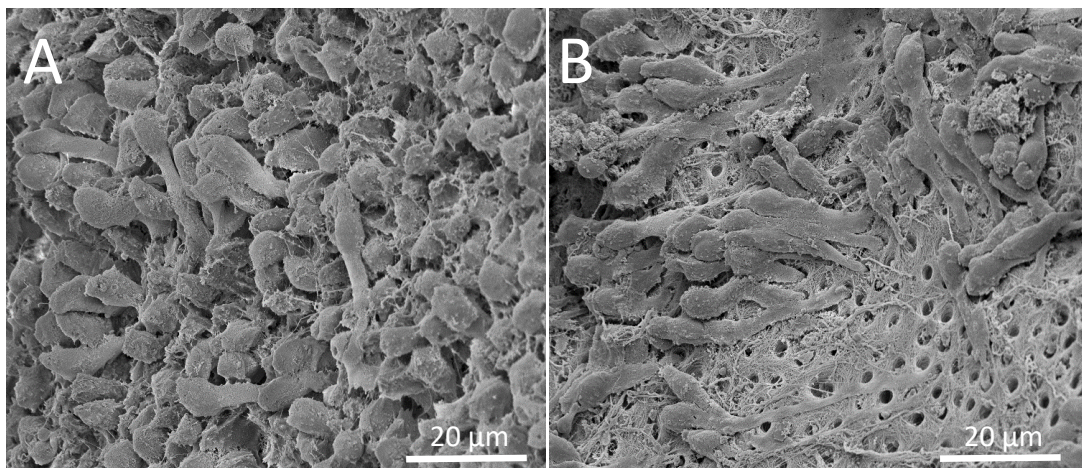


Abb. 2: Mikroskopische Aufnahmen von Odontoblasten an der Pulpa-Dentin-Grenze. Das rasterelektronische Bild zeigt einen dichten Rasen von Odontoblasten-Zellkörpern (A). Die Zellkörper der Odontoblasten auf faserigem Prädentin senden Zellfortsätze in Dentintubuli (B). Eigentum des Universitätsklinikums Regensburg (Urheberrecht), für diese Arbeit überlassen von Prof. H. Schweikl (ZEP).



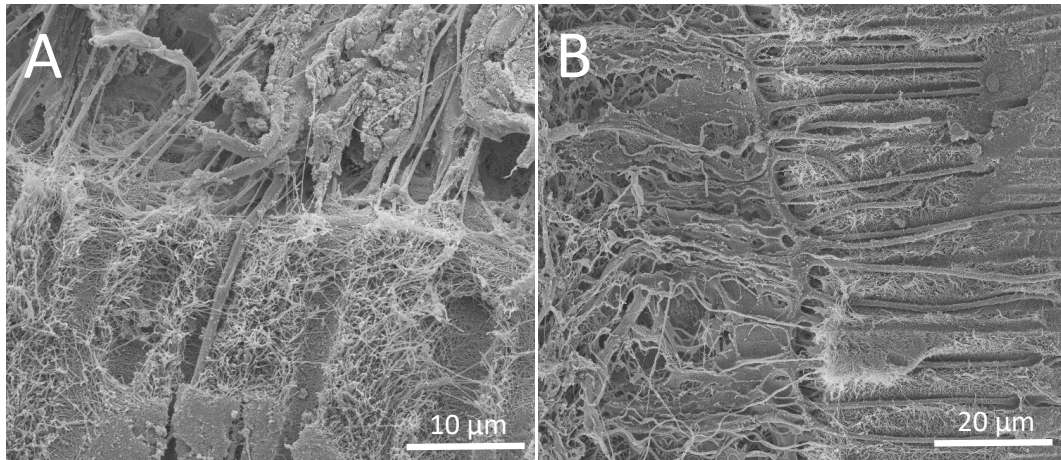


Abb. 3: Odontoblasten an der Dentin-Pulpa-Grenze. Das rasterelektronische Bild zeigt im Querschnitt faseriges Prädentin mit Zellkörpern und einem Zellfortsatz in einem der Dentintubuli (A). Von jedem der Zellkörper, die dem Prädentin aufliegen, ziehen Zellfortsätze in Dentintubuli. Am rechten Rand wird die Mineralisierungsfront erkennbar (B). Eigentum des Universitätsklinikums Regensburg (Urheberrecht), für diese Arbeit überlassen von Prof. H. Schweikl (ZEP).

In polarisierten Epithelzellen wie Odontoblasten werden apikale, laterale und basale Membranabschnitte unterschieden. Am apikalen Abschnitt, in Odontoblasten zum tubulären Dentin, erfolgt der Austausch von Substanzen und Molekülen mit der extrazellulären Umgebung, im lateralen Abschnitt sind benachbarte Zellen über spezialisierte Strukturen eng verbunden und der basale Abschnitt haftet an der Basalmembran oder der extrazellulären Matrix (Rodriguez-Boulan und Macara, 2014). Die typische epitheliale Polarisation auch der Odontoblasten beinhaltet interzelluläre Verbindungen wie Tight Junctions und Adherens Junctions als Verbindungen zwischen den Aktin-Filamenten benachbarter Zellen, Desmosomen und Gap Junctions sowie eine Umorientierung der Zellorganellen. Die Verteilung von Membranlipiden in den verschiedenen Membranabschnitten ist asymmetrisch und die Expression spezifischer Proteine wie CBR (*crumbs*), PAR (*protease-activated receptor*) oder SCRIB (*polarity protein Scribble*) führt zur Gestaltung der apikal-basalen Polarität (Chang *et al.*, 2019; Martin-Belmonte und Perez-Moreno, 2011). Mit fortschreitender Reifung verändert sich die Position von Zellorganellen in den Odontoblasten. Während der Polarisation im Übergang von Präodontoblasten zu sekundären Odontoblasten wandert der Zellkern in den basalen Abschnitt des Zellkörpers, der Membranstapel des Golgi-Apparats kommt weit apikal davon zu liegen mit den Zentrosomen zwischen diesen beiden Organellen. Das ausgedehnte endoplasmatische Retikulum (ER) befindet sich lateral entlang



der Längsachse der Zellen und ein ausgeprägt raues ER mit sekretorischen Vesikeln am Beginn des Zellfortsatzes (Abb. 4) (Ruch *et al.*, 1995).

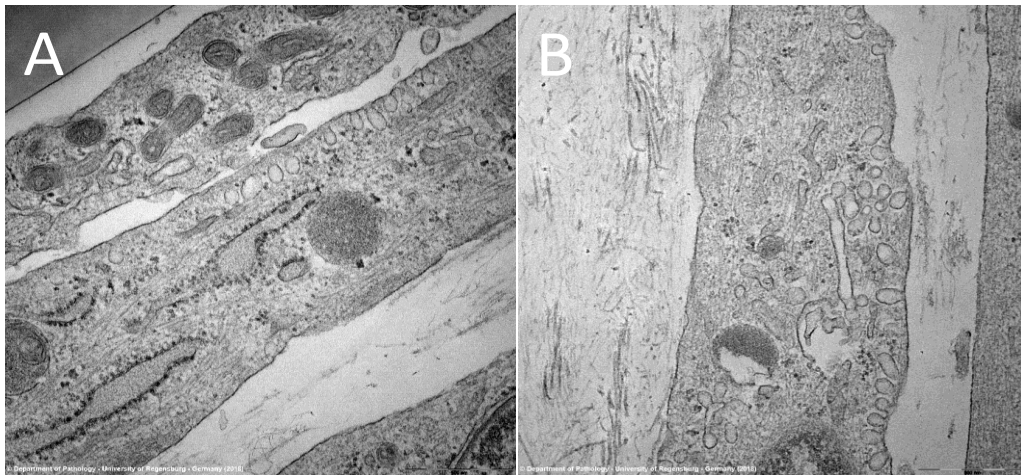


Abb. 4: Ultrastruktur primärer Zellen aus der Pulpa-Dentin-Grenze in Kultur. Das elektronenmikroskopische Bild (TEM) zeigt in der unteren der beiden eng aneinander liegenden Zellen ein sehr ausgeprägtes raues endoplasmatisches Retikulum und membranumhüllte Vesikel an der Zellmembran (A). Golgi-Apparat und viele membranumhüllte Vesikel verweisen auf eine hohe synthetische Aktivität der Zellen. Extrazellulär sind langgestreckte Kollagenbündel erkennbar (B). Eigentum des Universitätsklinikums Regensburg (Urheberrecht); die Aufnahmen stammen aus dem Institut für Pathologie (Prof. C. Brochhausen); für diese Arbeit überlassen von Prof. H. Schweikl (ZEP). Eigenschaften der hier analysierten Zellen (hOD-1) sind nach (Gallorini *et al.*, 2020) publiziert.

### *Zellfortsätze*

Der Zellfortsatz der Odontoblasten entspricht dem apikalen Membranabschnitt von Epithelzellen und ist eine kontinuierliche Ausdehnung des Zellkörpers. Fortsätze der Odontoblasten enthalten vor allem ein Netzwerk von Proteinen als Zytoskelett bestehend aus Mikrotubuli, Aktinfilamenten und Intermediärfilamenten (Zwischenfilamente) wie Vimentin oder Nestin (Holland, 1985). Nestin verweist als vermeintlich neuroektodemaler Stammzellmarker nochmals auf den Ursprung der Odontoblasten, es hat aber wohl neben seiner Bedeutung für die Zellstruktur verschiedene regulatorische Funktionen (Rubin de Celis *et al.*, 2016). Zellorganelle des Zellkörpers erscheinen im mittleren Abschnitt des Odontoblastenfortsatzes, werden aber in der Peripherie rasch weniger. Neben den strukturellen Merkmalen enthält der Odontoblastenfortsatz Vesikel des endo- und exozytotischen Pathways. Die Vesikel des konstitutiven exozytotischen Pathways dienen der Sekretion von Kollagen und nicht-kollagenen Proteinen für die Mineralisation des Prädentins (Holland, 1985; Linde und Goldberg, 1993).

Primäre Zilien, welche ebenfalls im supranukleären Bereich nachgewiesen werden konnten (Thivichon-Prince *et al.*, 2009; Magloire *et al.*, 2004), erfüllen wesentliche Aufgaben in der Dentinbildung über Wnt-Signalwege, welche in einem späteren Kapitel detaillierter beschrieben werden (Couve *et al.*, 2013; Magloire *et al.*, 2009). Sekretorische Vesikel und phosphatasereiche endozytotische Vehikel wiederum sind Mittel der Sekretion und Reabsorption. Zum einen durchqueren die Odontoblasten mit ihren Fortsätzen das Prädentin und verlaufen entweder im inneren Drittel oder entlang der gesamten Dentinlänge bis hin zum Übergang von Schmelz in Dentin. Odontoblastenverzweigungen sind dünner als die Zellfortsätze und enthalten kein Nestin, sondern nur Vimentin und Aktin. Ihre Aufgabe ist, die Verbindung zwischen den Tubuli herzustellen, indem sie in winzige Tubuli greifen und durch die gesamte Dicke des hypermineralisierten peritubulären Dentins kreuzen (Couve und Schmachtenberg, 2011; Goldberg, 2014b).

### **4.3.2 Physiologie der Odontoblasten**

#### **4.3.2.1 Bildung von Dentin**

Die postmitotische Form der Odontoblasten ist an der Dentinogenese, der Synthese und Sekretion der extrazellulären Dentinmatrix, beteiligt. Odontoblasten reifen, werden aufgrund ihrer begrenzten Lebensdauer schließlich von Lysosomen und autophagischen Vakuolen beladen und werden so zu apoptotischen Zellen (Goldberg, 2014b). Auf diese Weise verringert sich mit der Zeit die Anzahl der Odontoblasten in der äußersten Zellschicht. Die Zellen werden kleiner, bis sie auf eine einzige Zellschicht reduziert sind. Diese wird vermutlich von Hoehls-Zellen, welche Odontoblasten der zweiten Generation genannt werden, erneuert (Goldberg und Smith, 2004; Goldberg, 2014b).

Präodontoblasten teilen sich und wandern zum zentralen äußeren Teil der Pulpa. Nun erfolgen mitotische Teilungen, wobei bei der letzten Teilung solcher Präodontoblasten eine asymmetrische Teilung auftritt und die größeren der dadurch entstandenen Zellen einen begrenzenden Kontakt mit der Basallamina herstellen. Die kleineren der Zellen liegen entfernt von der Basalmembran und sind in der Hoehls-Zellschicht zusammengefasst. Schon frühzeitig tragen die Odontoblasten zur Bildung des koronalen Dentins bei. Sie synthetisieren die extrazelluläre Matrix, die essenziell für die Dentinmineralisation ist. Bei der zuerst gebildeten Dentinschicht handelt es sich um die äußerste und atubuläre Dentinschicht, welche im Mantel der Krone auch Manteldentin genannt wird. Danach bilden die Odontoblasten Primär- und Sekundärdentin. Nach Fertigstellung der Krone folgt die Bildung der Wurzel.

Dabei wandern die Prädontoblasten nach ihrer Differenzierung in radikuläre Odontoblasten von der zentralen Pulpa in die Peripherie unter die Hertwigsche-Epithelscheide.

Phänotypischen Veränderungen zufolge werden die Epithelzellen zu Zementoblasten und schließlich zu Zementozyten. Außerdem können aus dem Zahnfollikel austretende Präzementoblasten zu ungebundenen Zellen der Hertwig'schen-Epithelscheide gleiten. Anschließend beginnt die Wurzelbildung, die dem Zahndurchbruch und der Verlängerung der Pulpa vorausgeht. Direkt in der Zahnpulpa differenzieren dafür Stammzellen oder Vorläuferzellen von Odontoblasten und tragen so zur Wurzeldentinogenese bei. Nachdem die Bildung des äußeren Dentins abgeschlossen ist, beginnt die Bildung des zirkumpulpalen Wurzeldentins, welches anfänglich entweder eine tubuläre oder Fibrodentinstruktur aufweist (Goldberg, 2014a).

Nach Abschluss der Zahnbildung befinden sich die Odontoblasten am Rand der Pulpa, wobei eine pseudostratifizierte Palisadenstruktur erhalten bleibt. Die primäre Dentinogenese erfolgt unmittelbar nach der Bildung des Manteldentins und während der frühen Sekretionsphase der Zahnbildung. Nachdem die Synthese und Sekretion von ECM allmählich reduziert wird und die autophagischen Aktivitäten zunehmen, kommt eine Periode der verringerten Aktivität der Odontoblasten. Das Ende der primären Dentinogenese setzt mit der Kaubelastung der Zähne, dem okklusalen Druck, ein. So sind die Odontoblasten als postmitotische Zellen nicht nur an der Bildung, sondern auch an der Aufrechterhaltung des Dentins beteiligt und können während der gesamten Lebensdauer sekundäres Dentin bilden. Das tertiäre oder reaktionäre Dentin wird als Reaktion auf kariöse Läsionen, Abrasionen oder die Exposition gegen Dentalmaterialien gebildet (Hosoya *et al.*, 2012; Goldberg, 2014a).

#### **4.3.2.2 Immunfunktion der Odontoblasten**

Odontoblasten bilden als äußerste Schicht der Zahnpulpa eine erste natürliche Barriere zwischen dem mineralisierten Dentin und dem dentalen Weichgewebe. Sie übernehmen mit den weit in die Dentintubuli reichenden Zellfortsätzen als Teil des angeborenen Immunsystems eine Schutzfunktion des Pulpa-Dentin-Komplexes gegen die über Dentin eindringenden pathogenen Mikroorganismen oder andere exogene Reize des Immunsystems (Yu und Abbott, 2007).

Die anfänglich schnelle Erkennung von pathogenen Mikroorganismen und speziell Pathogen-assoziierten-molekularen-Mustern (PAMPs) findet über sogenannte Mustererkennungsrezeptoren (PRR) wie Toll-like-Rezeptoren oder die Nukleotid-bindende

Oligomerisierungsdomäne auf der Oberfläche der Odontoblasten statt (Staquet et al., 2011; Yumoto et al., 2018). Die über PRR vermittelte Zellantwort besteht auf molekularer Ebene überwiegend in der Bildung pro- und anti-inflammatorischer Zytokine und Interferone (IFN). Auf der zellulären Ebene werden Phagozytose, Autophagie und möglicherweise schließlich Zelltod durch Apoptose oder Nekrose initiiert (Brubaker *et al.*, 2015).

Odontoblasten detektieren mit Mustererkennungsrezeptoren wie TLR4 und TLR2, das mit TLR6 dimerisiert, konservierte bakterielle Moleküle oder PAMPs wie LTA (Lipoteichonsäure) aus der Zellwand Gram-positiver oder LPS (Lipopolysaccharid) aus der äußeren Membran Gram-negativer Mikroorganismen (Staquet *et al.*, 2011; Bleicher, 2014). Die Bindung von LPS oder LTA an TLR4 oder TLR2/TLR6 initiiert in Odontoblasten MyD88-abhängige und MyD88-unabhängige Signalwege zur Bildung pro- und anti-inflammatorischer Zytokine über den redoxsensitiven Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B oder MAPKs (Staquet et al., 2011; Napetschnig und Wu, 2013; Bleicher, 2014). Nach der Aktivierung ruhender dendritischer Zellen durch Odontoblasten mittels Zytokine oder Chemokine sezernieren auch diese pro- oder anti-inflammatorische Zytokine und aktivieren damit die Immunantwort (Bleicher, 2014). Die durch orale Pathogene ausgelöste Immunantwort äußert sich schließlich als Entzündungsreaktion. Eine antibakterielle Reaktion ist auch die Freisetzung von Defensinen, um so pathogene Mikroorganismen in der proximalen Odontoblastenschicht abzutöten (Yumoto *et al.*, 2018; Zhai *et al.*, 2020).

#### **4.3.2.3 Mechanorezeption - Sensorische Funktion**

Neben dem Immunsystem als natürliche Barriere gegen exogene Krankheitserreger besitzen Odontoblasten auch die Fähigkeit, thermische Schwankungen sowie chemische und mechanische Belastungen zu erkennen (Yumoto *et al.*, 2018). Mithilfe der Architektur des Zahnes lassen sich eindeutige Rückschlüsse auf die Möglichkeiten der mechanosensorischen Weiterleitung ziehen. Odontoblasten leiten über ihre Fortsätze, welche in apikaler Richtung in die Dentintubuli ragen und dort mit Dentinflüssigkeit umgeben sind, Informationen an Nervenzellen in der Pulpa weiter. Nach einer immer noch aktuellen Hypothese können externe Reize durch die in Bewegung gebrachte Dentinflüssigkeit an den dicht gepackten Nervenkomplex trigeminal sensorischer Axone übermittelt werden (Brännström und Aström, 1972). Das würde erklären, wieso durch freiliegendes Dentin oder Dentintubuli nach bakteriellen, mechanischen und chemischen Erosionen des Zahnschmelzes sowie Rezessionen

der Gingivialempfindlichkeiten bis hin zu Schmerzen der Zähne auftreten können (Magloire *et al.*, 2010).

Da die sensorischen Nervenzellen der Zahnpulpa bis in die Odontoblastenschicht ragen, ist eine Weiterleitung nozizeptiver Signale vom Odontoblasten zur Nervenzelle möglich (Yumoto *et al.*, 2018). Dabei übertragen Neurotransmitter wie Glutamat die Signale zwischen Odontoblasten und den Neuronen der Pulpa (Nishiyama *et al.*, 2016). Im engen Zusammenhang mit der Mechano- und Nozizeption steht die Expression verschiedener Ionenkanäle. Diese sind sowohl an der Nozizeption als auch an der Signalübertragung beteiligt und ermöglichen das Erkennen nozizeptiver Signale, hervorgerufen durch verschiedenste externe Stimuli (Yumoto *et al.*, 2018). Neben den spannungsgesteuerten Na<sup>+</sup>-Kanälen spielen auch mechanisch- und wärmeempfindliche Ionenkanäle mit transientem Rezeptorpotential (TRPV1, TRPV2, TRPV3, TRPV4, TRPM3, KCa, TREK-1) eine entscheidende Rolle (Magloire *et al.*, 2010; Yumoto *et al.*, 2018). Während erstere auf depolarisierende Ströme reagieren und dadurch die Odontoblasten anregen, nehmen zweitere die Wärme, Kälte oder Bewegung der Dentinflüssigkeit in den Tubuli wahr (Magloire *et al.*, 2010; Sole-Magdalena *et al.*, 2018). Die bereits in einem früheren Kapitel erwähnten primären Zilien der Odontoblasten besitzen eine doppelte Funktion im Rahmen der Mechanorezeption. Sie dienen sowohl als Antennen zur Erkennung trophischer Signale als auch als mechanosensorische Organelle (Couve, 1986; Thivichon-Prince *et al.*, 2009; Magloire *et al.*, 2010; Couve und Schmachtenberg, 2011)

#### **4.4 Intrazelluläre Signalwege zur Bildung von Dentin und Tertiärdentin**

##### **4.4.1 Karies und kariogene Mikroorganismen**

Karies zählt als Erkrankung der Zahnhartgewebe Schmelz und Dentin neben Parodontalerkrankungen zu den häufigsten Infektionserkrankungen in Deutschland. Epidemiologische Daten und Fakten aus verschiedenen Ländern deuten auf einen Anstieg der Karieshäufigkeit sowohl bei Kindern als auch Erwachsenen hin (Bagramian *et al.*, 2009; Mundgesundheitsrat, 2010). Karies umschreibt die Demineralisation der Zahnhartsubstanzen aufgrund einer anhaltenden Ansäuerung des Mikromilieus über die Pellikel adhärierenden oralen Mikroorganismen und dem damit verbundenen Abbau der organischen Matrix des Dentins durch infiltrierende Bakterien. Durch eine bakterielle Infektion initiiert, schreitet die Karies unter diesem mikrobiellen Einfluss weiter fort. Über die Demineralisierung von

Schmelz und Dentin kann dies schließlich zu einer Entzündung der Pulpa bis hin zu einer irreversiblen Pulpitis und einer Schädigung des Pulpagewebes führen (Soden *et al.*, 2009).

Die Zusammensetzung eines karieswirksamen Biofilms oraler Keime verändert sich mit dem Fortschreiten kariöser Läsionen. Die frühe Kariesforschung identifizierte *Mutans-Streptokokken* als wichtige azidogene und azidurische, pathogenen Keime der Zahnkaries. Gestützt von relevanter Literatur wird zunehmend angenommen, dass schon im Biofilm der frühen Karies, den sogenannten White-Spot Läsionen, auch andere Streptokokkenspezies (*non-mutans streptococci*), beispielsweise *S. sanguinis* oder *S. mitis* (Mitis-Gruppe) und *Actinomyces*, aber auch *Lactobacillus spec* und *Bifidobacterium* vorhanden sind. So geht man sehr stark von einer Initiierung von Karies durch diese Mikroorganismen aus (Takahashi und Nyvad, 2011). Aufgrund der differentiellen Ansäuerung des Milieus nimmt der Anteil azidurischer Mikroorganismen zu. Mithilfe moderner Methoden konnten hunderte Bakterienspezies angewiesen werden und man vermutet, dass mehr als die Hälfte dieser Keime nicht kultivierbar ist (Liu *et al.*, 2020). Daraus schlussfolgert man, dass die Karies nach heutiger Auffassung als Krankheit anzusehen ist, die nicht von einem einzelnen pathogenen Keim ausgeht, sondern von einer komplexen Gemeinschaft ganz unterschiedlicher, überwiegend Gram-positiver Bakterienspezies verursacht wird. Dazu zählen neben *Streptococcus mutans* andere Streptokokkenspezies, Aktinomyzeten, Laktobazillen, Veillonella, Atopobium, Olsenella, Propionibakterien oder Bifidobakterien, die in Läsionen der fortgeschrittenen Karies gefunden wurden (Costalonga und Herzberg, 2014; Kianoush *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2020). Neben einer großen Vielfalt Gram-positiver Keime siedeln aber auch Gram-negative Bakterien wie *Prevotella*, *Porphyromonas* oder *Fusobacterium spp* in kariösen Läsionen (Martin *et al.*, 2002; Chmilewsky *et al.*, 2015). In intakten, gesunden humanen Zähnen wurden keine Keime entdeckt, Gram-positive und Gram-negative Bakterien können jedoch Dentin besiedeln, es zerstören und über Dentintubuli, in denen sie auch identifiziert wurden, Pulpagewebe erreichen (Chmilewsky *et al.*, 2015). Durchmesser und Dichte der Dentintubuli, über die Bakterien und ihre Produkte wie LPS oder LTA diffundieren können, nehmen mit der Nähe zur Pulpa zu, so dass der Prozess der Kariesexpansion beschleunigt wird (Galler *et al.*, 2021).

Die Ausbreitung der Karies basiert auf komplexen Wechselwirkungen innerhalb des dentalen Biofilms. Dort beeinflussen die aziduren, azidogenen und neutralisierenden Bakterien, im Rahmen ihrer Interaktionen die Kariesaktivität durch Demineralisation, Stabilität und Remineralisation (Costalonga und Herzberg, 2014; Rajan *et al.*, 2020; Liu *et al.*, 2020). Während der Demineralisation werden im Dentin eingeschlossene Mediatoren oder

Biomoleküle in den Dentin-Pulpa-Komplex freigesetzt (Simon *et al.*, 2009; Rajan *et al.*, 2020). So wurden als Dentinmatrixkomponenten Proteine extrahiert, die als Signalmoleküle die Antwort von Zellen an der Pulpa-Dentin-Grenze wie Odontoblasten oder Zellen des Pulpagewebes wie dentale Stammzellen steuern oder die Neubildung extrazellulärer Matrix und deren Mineralisation initiieren. Neben den nicht-kollagenen Proteine wie DSPP, DMP-1, BSP oder OPN wurden Wachstumsfaktoren wie TGF- $\beta$ 1, BMP-2, PDGF (*platelet-derived growth factor*), PLGF (*placenta growth factor*), EGF (*epidermal growth factor*) aber auch bFGF (*basic fibroblast growth factor*) oder VEGF (*vascular endothelial growth factor*) nachgewiesen und freigesetzt (Cassidy *et al.*, 1997; Widbiller *et al.*, 2019b; Ivica *et al.*, 2020; Galler *et al.*, 2021).

Eine Reaktivierung der Odontoblasten löst die Immunantwort mit anschließendem Infektionsgeschehen aus. Liegt der Säureangriff der bakteriellen Metabolite nur in milder Form vor, kann die Infektion neutralisiert werden und die Odontoblasten kehren in ihren reifen Zustand zurück. Durch einen schweren physio-pathologischen Reiz jedoch entsteht eine hyperkalzifizierte Dentinschicht, da die Odontoblasten zwischen ihrem reifen Zustand und der Sekretion wechseln (Rajan *et al.*, 2020). Es ist jedoch noch nicht abschließend geklärt, ob diese pathognomonisch für die Veränderung des Stadiums sowie der Funktion der Odontoblasten verantwortlich ist (Simon *et al.*, 2009; Goldberg, 2014a; Rajan *et al.*, 2020).

#### **4.4.2 Tertiärdentin**

Der Begriff “tertiäre Dentinogenese” wurde neu definiert, um die im Dentin-Pulpa-Komplex ablaufenden Reaktionen besser unterscheiden und verstehen zu können (Smith *et al.*, 1995). Die Bildung von Tertiärdentin beschreibt die Reparatur und Regeneration von Hartgewebe des Dentin-Pulpa-Komplexes und ist damit ein Prozess der natürlichen Wundheilung (Farges *et al.*, 2015; Rajan *et al.*, 2020). So unterteilt man je nach Überleben oder Absterben der primären Odontoblastenpopulation in Reaktionsdentin und Reparaturdentin. Reaktionsdentin entsteht durch die Aktivierung einer Gruppe primärer postmitotischer Odontoblasten, die eine milde Verletzungen des Zahns, etwa durch eine beginnende Karies, überleben (Smith *et al.*, 1995; Farges *et al.*, 2011; Farges *et al.*, 2015; Rajan *et al.*, 2020). Reparaturdentin wiederum wird von einer neuen Generation odontoblasten-ähnlicher Zellen gebildet, die nach dem traumabedingten Untergang primärer Odontoblasten aus dentalen Stammzellen oder Vorläuferzellen entstehen (Smith *et al.*, 1995; Cox *et al.*, 1996; Goldberg *et al.*, 2011).

#### 4.4.2.1 Reaktionsdentin

Das reaktionäre Dentin wird als tubuläres Dentin gebildet. Der Unterschied zum reparativen Dentin besteht darin, dass das Reaktionsdentin von Odontoblasten selbst synthetisiert wird, oder, wenn diese verändert sind, möglicherweise auch von einer Schicht darunterliegender Hoelscher-Zellen. Als Ursache für die Bildung reaktionären Dentins sind frühe und milde kariöse Läsionen und Abrasionen der Zähne bekannt (Smith et al., 1995; Goldberg *et al.*, 2011). Des Weiteren kann der Begriff „Reizdentin“ verwendet werden, um die Reaktion der Tertiärdentinbildung zu beschreiben. So ist man ursprünglich davon ausgegangen, dass verschiedene schädliche Mittel, beispielsweise Säuren, bakterielle Stoffwechselprodukte der Karies, aber auch Restaurationsmaterialien als Pulpa-Reizstoffe fungieren und Tertiärdentinbildung auslösen können (Baume, 1980; Smith *et al.*, 1995).

So initiierte eine leichte Karies an der Zahnoberfläche Reaktionen der Pulpa unterschiedlicher Intensität im Bereich der mit Mikroorganismen befallenen Dentintubuli. Die Zahl der Zellen des Immunsystems stieg, die kompakte Schicht von Odontoblasten wurde gestört, Odontoblasten selbst wurden kleiner und tubuläres Reaktionsdentin wurde gebildet (Bergenholtz, 1981; Ricucci *et al.*, 2014a). Auch in Zähnen mit Karies mittleren Ausmaßes wurde Tertiärdentin als Reaktionsdentin mit einer deutlichen Grenze zum gesunden sekundären Dentin geformt. Weil auch in dieser Art des Tertiärdentins die weniger Tubuli mit denjenigen des Sekundärdentins verbunden waren, wurde es noch als Reaktionsdentin definiert. Die ursprüngliche palisadenartige Schicht an Odontoblasten war jedoch im Bereich des Reaktionsdentins zu einer Lage einzelner Zellen ohne die typische säulenartige Morphologie reduziert. Dennoch verwies die, wenn auch irreguläre, tubuläre Struktur des Tertiärdentins auf die

Aktivität überlebender Odontoblasten (Bjorndal, 2001, 2008; Ricucci *et al.*, 2014a). Nicht-kollagene Proteine und vor allem Wachstumsfaktoren wie TGF- $\beta$  oder BMPs aus dem kariös geschädigten Dentin sollten die von kariösen Mikroorganismen oder deren Produkten betroffenen Odontoblasten zur Bildung von Reaktionsdentin stimulieren (Neves und Sharpe, 2018; Widbiller *et al.*, 2019a). Letztlich wäre die Bildung von Reaktionsdentin das Resultat der Interaktion biologisch aktiver Komponenten wie Wachstumsfaktoren aus dem Dentin mit noch vitalen Odontoblasten.



#### 4.4.2.2 Reparaturdentin

Der Prozess der Bildung von Reparaturdentin unterscheidet sich wesentlich von der Entwicklung von Reaktionsdentin. Reparaturdentin wird nicht von Odontoblasten, sondern von einer neuen Generation odontoblasten-ähnlicher (*odontoblast-like*) Zellen der Pulpa als Reaktion auf einen adäquaten Reiz gebildet (Smith *et al.*, 1995). Nach extremen Verletzungen oder Schäden der Zahnhartsubstanz unter Umständen mit Exposition der Pulpa kann die reparative Dentinogenese eine Dentinbrücke bilden, wodurch die Dentinmatrix als Kontinuum um die Pulpa wiederhergestellt wird. Dabei führt eine komplexe Sequenz biologischer Ereignisse zur Rekrutierung und Differenzierung von Stammzellen oder Vorläuferzellen der Pulpa zu odontoblasten-ähnlichen Zellen, bevor die Matrixsekretion an der Stelle des geschädigten Dentins induziert wird (Cox *et al.*, 1992; Smith *et al.*, 1995).

Unser Verständnis der Odontoblasten-Phänotypen und der Art der Komponenten stützt sich jedoch auf die inzwischen gefestigte Tatsache, dass die Dentinmatrix einen Cocktail biologisch aktiver Moleküle enthält. Werden diese während eines Zahntraumas oder der anschließenden Restaurationen freigesetzt, verändern sie biologische Prozesse im Dentin-Pulpa-Komplex (Smith *et al.*, 1995; Widbiller *et al.*, 2018; Widbiller *et al.*, 2019b).

Wenn Odontoblasten sehr schweren Stimuli etwa aus tiefen kariösen Läsionen ausgesetzt sind, können Bakterien und ihre Metabolite Odontoblasten irreversibel schädigen. An dieser Stelle übernehmen dentale Stammzellen im perivaskulären Bereich der Pulpa entscheidende Funktionen (Huang *et al.*, 2009a). Momentan nimmt man an, dass sie bei der postnatalen Homöostase und bei Reparaturprozessen mitwirken (Rajan *et al.*, 2020; Shi und Gronthos, 2003). Eine komplexe Kaskade von Zellreaktionen führt zur Differenzierung in odontoblasten-ähnliche Zellen. Diese Zellen mit der Morphologie von Fibroblasten bilden anstelle von Odontoblasten reparatives Dentin und verhindern so, dass störende Reize die Zahnpulpa erreichen (Farges *et al.*, 2015; Rajan *et al.*, 2020). Strukturell weist reparatives Dentin jedoch Unterschiede auf, da der charakteristische tubuläre Aufbau des Dentins verlorengelht. Stattdessen wird amorphes verkalktes Material in der Art einer dystrophen Verkalkung abgelagert (Ricucci *et al.*, 2014b; Rajan *et al.*, 2020; Ricucci *et al.*, 2014a). Ob dieses kalzifizierte Gewebe wirklich Dentin darstellt oder ob es eher eine ektopische Kalzifizierung mesenchymaler Pulpazellen ist, wird momentan diskutiert (Ricucci *et al.*, 2014a).

## 4.5 Signalwege zur Bildung von Dentin

Die derzeit beschriebenen Signalwege sind fast alle in irgendeiner Weise an der Regulation der Zahnentwicklung beteiligt, beginnend mit der Bildung von Plakoden bis hin zur späten Bildung von Dentin. Zu diesen Pathways zählen beispielsweise Wnt, transformierender Wachstumsfaktor  $\beta$ /BMPs (*bone morphogenetic proteins*) (TGF $\beta$ /BMP), *hedgehog* (SHH) oder auch Wachstumsfaktoren wie der Fibroblasten-Wachstumsfaktor (FGF). Spezifische Liganden und Rezeptorproteine auf der Oberfläche der relevanten Zielzellen vermitteln die Interaktion dentaler Epithelien und dem Mesenchym und kreieren so Gradienten, aber auch Schranken innerhalb dentaler Epithelien für die Aktivierung spezifischer genetischer Programme und vor allem Transkriptionsfaktoren. Gerade sie steuern und exekutieren letztlich die Zytodifferenzierung und Mineralisation. Signalwege über Wnt, TGF- $\beta$ /BMP, SHH oder auch FGF werden von Liganden getriggert, die über kurze Strecken autokrin oder parakrin wirken und über weite Entfernungen einen morphogenen Gradienten bilden (Pagella *et al.*, 2020). Im Folgenden werden die für die Zahnentwicklung und die Dentinbildung wesentlichen Signalwege, ergänzt mit der Funktion anderer spezifischer Proteine mit Signalfunktion, vorgestellt.

### 4.5.1 Der Wnt -Signalweg

#### 4.5.1.1 Allgemeines zum Wnt -Signalweg

Wnt ist neben Notch-Delta, Hedgehog, der großen Familie der Transforming Growth Factor beta (TGF- $\beta$ ) sowie den knochenmorphogenetischen Proteinen (BMP) und Hippo eines der zentralen Signalmoleküle der Ontogenese (Nusse und Clevers, 2017). Wnt ist als wachstumsstimulierendes Protein ein Signalmolekül, das Zellproliferation und Zellmigration induziert, die Physiologie von Stammzellen reguliert und wachsendem Gewebe eine Form verleiht. In Tumorgewebe ist oft der Wnt-Signalweg als Hyperaktivierung außer Kontrolle (van Amerongen und Nusse, 2009). Durch die Aktivierung von Wnt können Gene exprimiert werden. Mithilfe verschiedener Klassen an Wnt-Rezeptoren wird die korrekte Formgebung während der Entwicklung und der Strukturhaltung in späteren Phasen reguliert (Goldstein *et al.*, 2006; Kitajima *et al.*, 2013; Huang und Niehrs, 2014; Schneider *et al.*, 2015; Loh *et al.*, 2016; Nusse und Clevers, 2017). Wnt-Proteine sind also formgebende Moleküle, die in Geweben trotz anderer Berichte wohl doch nur über eine relativ kurze Entfernung in einem Gradienten

aktiv sind und so konzentrationsabhängig die Zellphysiologie steuern. Meist ist Wnt zwischen benachbarten Zellen aktiv (Clevers und Nusse, 2012).

Der Wnt-Pathway selbst ist wegen seiner vielfältigen Funktionen in verschiedenen Prozessen sehr kompliziert. Diese Komplexität spiegelt sich in der großen Zahl an Liganden und Rezeptoren wider. Wnt wurde in den verschiedensten vielzelligen Metazoen nachgewiesen, einschließlich der 19 Wnt-Gene im humanen Genom. In ähnlich großer genetischer Vielfalt wird FZD (frizzled) exprimiert, der Wnt-Rezeptor in der Zellmembran (Clevers und Nusse, 2012). Die vielseitigen Möglichkeiten der Aktivierung von Wnt-Rezeptoren wiederum resultieren in einer Vielfalt an intrazellulären Reaktionen, und die Aktivierung des  $\beta$ -Catenin/TCF- Transkriptionskomplexes ist nur der derzeit am besten untersuchte Pathway (van Amerongen und Nusse, 2009).

#### **4.5.1.2 Wnt-Proteine und Sekretion**

Die Bezeichnung Wnt stammt ursprünglich aus Arbeiten über die Ontogenese von *Drosophila* und ist eine Abkürzung der Kombination der homologen Gene *wingless* und *Int1*, das zunächst als Onkogen in der Maus identifiziert wurde. Die Produkte beider Gene gehören zu einer Familie konservierter extrazellulärer Signalmoleküle (Rijsewijk *et al.*, 1987). Wnt-Proteine sind etwa 40 kDa groß und beinhalten viele Cystein-Reste. Seit der Darstellung des ersten Wnt-Proteins, Wnt3A, ist auch bekannt, dass Wnt-Proteine an Lipide, meist Palmitinsäure, gebunden sind. Im endoplasmatischen Retikulum werden Wnt-Proteine durch Porcupine (Porc), eine transmembrane Acyltransferase, zu dieser lipidgebundenen Form modifiziert. Fehlt dieses Enzym, verbleiben Wnts im ER und werden nicht sezerniert. Die Lipide der Wnts übernehmen also Funktionen in der Sekretion, aber auch in der effektiven Signalübertragung, indem sie die Bindung von Wnt an seinen Rezeptor unterstützen (Clevers und Nusse, 2012). Der intrazelluläre Transport sowie der Transport aus der Zelle wird von Wntless/Evi (Wls), welches zunächst im Golgi-Apparat vorliegt, reguliert und findet möglicherweise über Endosomen statt. Außerhalb der Zelle werden Wnts von exozytischen Vesikeln sekretiert und das Notum-Enzym, welches als Deacylase wirkt, entfernt das Lipid. Auf diese Weise werden Wnts inaktiviert. Wnts binden an die auf der Zielzelle befindlichen FZDs oder andere Rezeptoren. Die so zellgebundene Wnts können sich auf diesem Weg nach Zellteilung über das Gewebe ausbreiten (Abb. 5) (Nusse und Clevers, 2017).

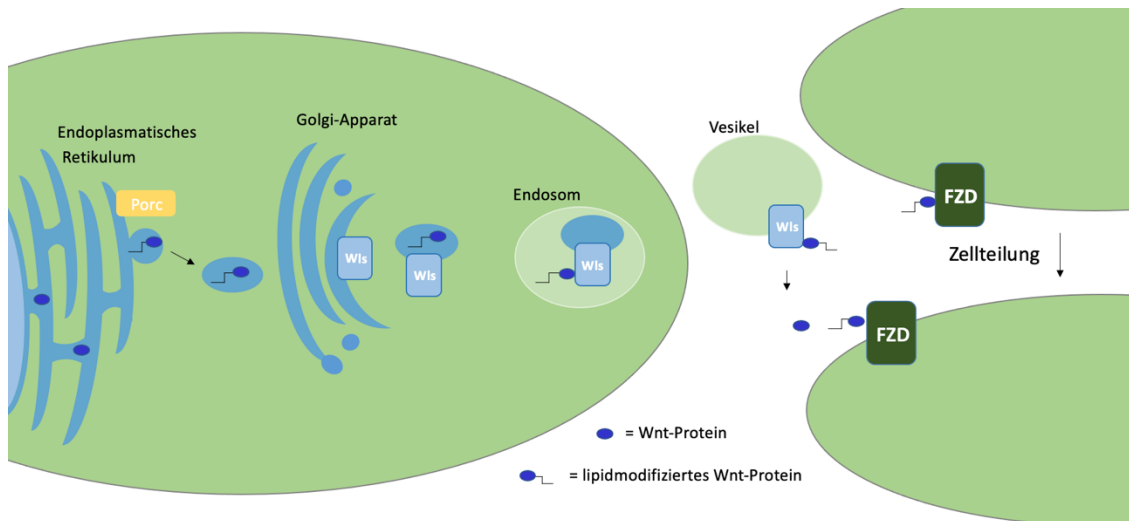


Abb. 5: Modell der Wnt-Sekretion. Im Endoplasmatischen Retikulum werden Wnt-Proteine durch Porcupine (Porc) in eine lipidmodifizierte Form überführt. Als solche und eingehüllt in Endosomen können sie über Wls in der Zelle und aus der Zelle transportiert werden. Im Interzellarraum werden sie von exozytischen Vesikeln sekretiert. Indem die Wnt-Proteine an die Membranrezeptoren FZD binden, können sie sich über Zellen und Gewebe ausbreiten. Die Abbildung wurde nach (Nusse und Clevers, 2017) modifiziert.

Wnt-Rezeptoren bilden einen Rezeptorkomplex aus zwei Proteinen, nämlich FZD und die Korezeptoren LRP5/6 (*low-density lipoprotein receptor-related protein*). Die FZD-Proteine besitzen 7-transmembrane (7TM) und eine extrazelluläre N-terminale, cysteinreiche Domäne (CRD) (Bhanot *et al.*, 1996; Nusse und Clevers, 2017). Die CRD ist primär für die Wnt-Bindung verantwortlich und besitzt eine Affinität zu Wnt im nM-Bereich. Charakteristisch für die CRD ist neben der Oberflächenbeschaffenheit auch die hydrophobe Tasche, an die das Wnt-Lipid bindet (Janda *et al.*, 2012; Nusse und Clevers, 2017).

Während der Signalübertragung kooperieren FZD und das Transmembranmolekül LRP5/6. Auf diese Weise wird durch die Bindung des Wnt-Proteins eine Dimerisierung der beiden Rezeptoren induziert (Nusse und Clevers, 2017). Auf der Zelloberfläche treten R-Spondine als Wnt-Agonisten mit Mitgliedern der LGR5-Familie in Interaktion und verstärken damit die Wnt-Signalübertragung. ZNRF3 und RNF43 wiederum sind Transmembranmoleküle, die die Wnt-Signalübertragung hemmen. Ihre E3-Ubiquitin-Ligase-Aktivität wirkt auf FZD-Moleküle und initiiert den Abbau der Rezeptoren. Es ist jedoch bekannt, dass durch die Bindung von R-Spondin an ZNRF3 dessen Aktivität herunterreguliert wird. Neben den derzeit zehn bekannten FZD-Rezeptoren ist Gpr124 ein weiterer Wnt-Rezeptor oder Korezeptor von FZD/LRP, welcher bei der Regulierung der Blut-Hirn-Schranke und anderen

Bereichen des Gefäßsystems durch Wnt, beteiligt ist. Andere Transmembranproteine wie die Tyrosinkinase ROR oder RYK können ebenfalls Wnt binden. ROR enthalten ein CRD-Motiv, das demjenigen der FZDs ähnlich ist. In welcher Weise nun die verschiedenen, an der Rezeption von Wnt beteiligten Membranproteine höher organisierte Komplexe bilden und jeweils alternative Pathways starten, ist bis heute nicht bekannt (Bhanot *et al.*, 1996; Nusse und Clevers, 2017). Interessanterweise werden Wnt-Rezeptoren nicht nur von Wnts aktiviert. Beispielsweise kann auch Norrin, das Norrie-Krankheitsprotein, als Ligand für den FZD4/LRP5-Komplex fungieren (Nusse und Clevers, 2017).

#### 4.5.1.3 Der kanonische Wnt-Signalweg

Die Vielfalt der Funktionen von Wnt-Liganden und Rezeptoren spiegelt sich in der Klassifizierung der Proteine und Signalwege wider. So werden nun Wnt-Proteine, die an FZDs binden und den  $\beta$ -Catenin/TCF-Pathway aktivieren, mitunter als kanonisch bezeichnet. Sie aktivieren auch den kanonischen Wnt/ $\beta$ -Catenin-Pathway. Nicht-kanonische Wnts wiederum binden an FZDs und aktivieren kleine G-Proteine wie Rho, JNK (c-Jun N-terminale Kinase) und damit verschiedene  $\beta$ -Catenin-unabhängige, nicht-kanonische Wnt-Pathways. Der Wnt/Calcium-Signalweg ist nochmals besonders, weil hier über FZD große trimere G-Proteine aktiviert werden, die ihrerseits über die Phospholipase C und die Proteinkinase C die Freisetzung der *second messenger* Inositoltriphosphat (IP<sub>3</sub>) und Kalzium aktivieren (van Amerongen und Nusse, 2009; Clevers, 2006). Im Folgenden wird der kanonische Pathway genauer erklärt, weil er für die Bildung von Dentin und Tertiärdentin bevorzugt analysiert wurde.

Das Schlüsselenzym des kanonischen Wnt-Signalwegs ist das zytoplasmatische Protein  $\beta$ -Catenin. Dessen Stabilität wird von dem sogenannten Zerstörungskomplex (*destruction complex* DC) kontrolliert. Das Gerüst dieses regulierenden Komplexes stellt das Tumorsupressorprotein Axin dar, welches mit  $\beta$ -Catenin sowie einem weiteren zytoplasmatischen Tumorsupressorprotein APC (*Adenomatosis polyposis coli*) und den beiden konstitutiv aktiven Serin-Threonin-Kinasen CK1a/d (*casein kinase Ia/d*) und GSK3a/b (*glycogen synthase kinase-3 $\beta$* ) interagiert. Man nimmt an, dass auch das Protein Dvl (*disheveled*) für die Aktivierung des Signalwegs benötigt wird, möglicherweise indem FZD an DVL bindet und zum einen die Dimerisierung von FZD und LRP fördert und zum anderen die Wechselwirkung von LRP und Axin ermöglicht. Die Dimerisierung FZD/LRP erleichtert die Phosphorylierung von LRP durch Proteinkinasen wie GSK3 (Abb. 6).

Im Wesentlichen unterscheidet man zwischen der Abwesenheit des Wnt-Signals, der Bindung von Wnt am Rezeptor und der APC-Mutation (Nusse und Clevers, 2017). Wenn die FZD- oder LRP-Rezeptoren in Abwesenheit von Wnt nicht besetzt sind, wird das an Axin gebundene  $\beta$ -Catenin konstitutiv und kontinuierlich von CK1 und GSK3 phosphoryliert (Liu *et al.*, 2002). Das so entstandene phosphorylierte Degron-Motiv des  $\beta$ -Catenins ist die Andockstelle für ein weiteres Protein, die E3-Ubiquitinligase  $\beta$ -TrCP, welches die Ubiquitinierung und damit den proteosomalen Abbau des  $\beta$ -Catenin induziert (Aberle *et al.*, 1997; Nusse und Clevers, 2017) (Abb. 6).

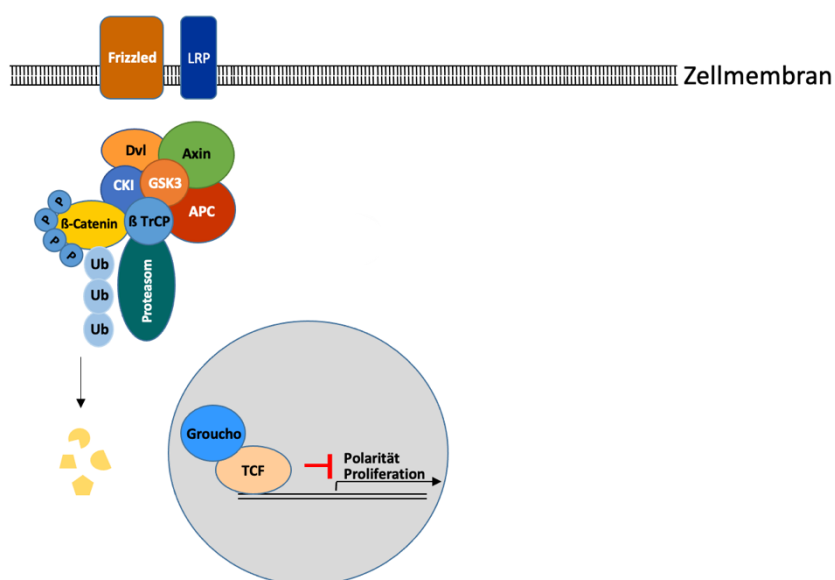


Abb. 6: Inaktivierung des Wnt-Signaltransduktionswegs. Wenn kein Wnt-Protein an die Zellmembranrezeptoren Frizzled (FZD) oder LRP gebunden ist, ist  $\beta$ -Catenin ein Bestandteil des Proteinkomplexes (DC-Komplex) aus CK1, GSK3, Axin, APC und  $\beta$ -TrCP. CK1 und GSK-3 phosphorylieren konstitutiv  $\beta$ -Catenin, das anschließend durch  $\beta$ -TrCP ubiquitiniert wird. Das phosphorylierte und ubiquitinierte  $\beta$ -Catenin kann proteosomal abgebaut werden. Im Zellkern bindet nun das Protein Groucho an den T-Zell-Faktor (TCF) und inhibiert so die Proliferation der Wnt-Zielgene.

Bindet WNT an seinen Rezeptor, verlagert sich der in seiner Aktivität gestörte DC-Komplex zunächst an die Zellmembran. Der durch GSK-3 $\beta$  phosphorylierte LRP-Rezeptor kann nicht nur GSK-3 in seiner phosphorylierenden Aktivität direkt hemmen und dadurch  $\beta$ -Catenin stabilisieren, sondern auch die Ubiquitinierung des bereits phosphorylierten  $\beta$ -Catenins innerhalb des Komplexes blockieren. Als Resultat ist dann ein rascher Konzentrationsanstieg des  $\beta$ -Catenin und eine Sättigung des Komplexes durch die phosphorylierte Form zu erkennen. So kann neu synthetisiertes  $\beta$ -Catenin akkumulieren und in den Zellkern

translozieren, wo anschließend die Zielgene aktiviert werden (Li *et al.*, 2012; Azzolin *et al.*, 2014; Nusse und Clevers, 2017) (Abb. 7).

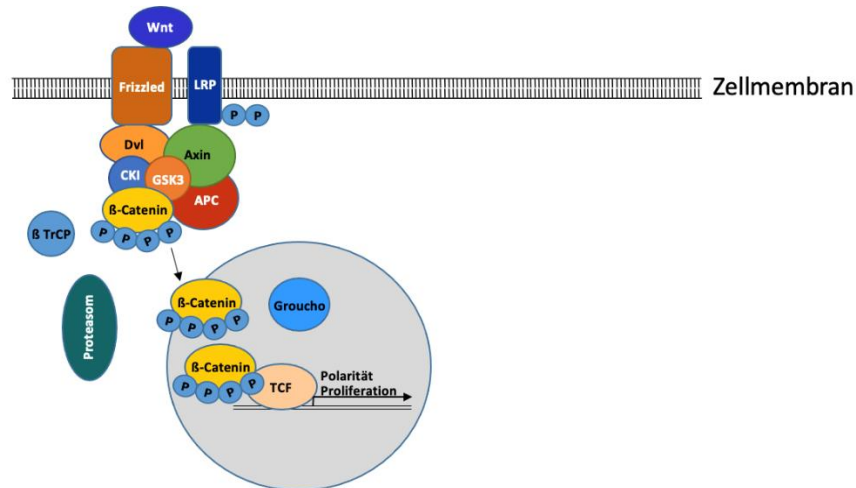


Abb. 7: Aktivierung des Wnt-Signaltransduktionswegs. Unter der Wnt-Rezeptorbindung verlagert sich die Komplexaktivität zur Zellmembran. Der phosphorylierte LRP-Rezeptor besitzt die Fähigkeit, den DC-Komplex zu stabilisieren sowie den proteosomalen Abbau des phosphorylierten  $\beta$ -Catenins und seine Ubiquitinierung zu hemmen. Das neu synthetisierte  $\beta$ -Catenin gelangt nun in den Zellkern, verdrängt das Repressorprotein Groucho, bindet selbst und aktiviert den Transkriptionsfaktor TCF (T-Zell-Faktor) und damit die Expression Wnt-abhängiger Zielgene.

In mehreren Studien ist die Rede von einer weiteren regulatorischen Domäne im APC-Protein. Diese  $\beta$ -Catenin inhibitorische Domäne (CID) reguliert den  $\beta$ -Catenin-Spiegel wahrscheinlich durch eine erhöhte Ubiquitinierung wesentlich herunter und inhibiert damit die Transkriptionsaktivität von  $\beta$ -Catenin/Wnt. Möglicherweise induziert aber auch eine GSK3-vermittelte Phosphorylierung um die CID-Region eine Konformationsänderung des APC-Proteins und erlaubt so den Zugang der Ubiquitin-Protein-Ligase E3 (Nusse und Clevers, 2017).

#### 4.5.1.4 Die Funktion von Wnt in der Zahnentwicklung und Differenzierung

Nachdem bereits die wesentlichen Abläufe des Wnt-Signalwegs geklärt wurden, soll im Folgenden die Beteiligung des Wnt-Signalwegs an der Zahnentwicklung erläutert werden. Vor allem der Wnt- $\beta$ -Catenin Signalweg, welcher auch kanonischer Signalweg genannt wird,

hat eine bedeutende Funktion als Regulator der Dentinogenese (Ishimoto *et al.*, 2015; Scheller *et al.*, 2008). Es gab sehr früh Hinweise darauf, dass mehrere Wnt-Gene über den Wnt/ $\beta$ -Catenin-Pathway schon während des Knospenstadiums an der Regulation der Zahnentwicklung beteiligt sind (Thesleff und Sharpe, 1997). So wurde die Expression von Wnt3a, Wnt4, Wnt5a, Wnt6, Wnt7b, Wnt10a oder Wnt10b über die gesamte Zahnentwicklung berichtet (Dassule und McMahon, 1998). Ein sehr deutlicher Hinweis auf die unverzichtbare Funktion von Wnt und des kanonischen Wnt-Signalwegs für die Dentinbildung kam aus Experimenten, in denen die Information für die Expression von Wntless (Wls), ein Chaperon für die Sortierung und Sekretion von Wnt, spezifisch in Odontoblasten deletiert wurde. Als Folge davon war die Bildung von Dentin gestört, die Dicke des gebildeten Dentins war stark reduziert und das Volumen der Pulpa entsprechend vergrößert. Wnt10a,  $\beta$ -Catenin, Kollagen Typ I und Dentinsialoprotein waren deutlich runterreguliert (Bae *et al.*, 2015). Komplementäre Resultate wurden mit einem anderen experimentellen Ansatz nach Deletion von Wls in Osteocalcin-exprimierenden Zellen erzielt. Hier wurde ein Zuwachs an Dentin wahrscheinlich wegen einer fehlgesteuerten Wnt-abhängigen Expression von Runx2 beobachtet (Lim *et al.*, 2014).

Es wurde auch berichtet, dass eine besondere Form des Wnt-Proteins, das Wnt6, den nicht-kanonischen Wnt/JNK-Weg in dentalen Pulpazellen aktiviert und damit die Zellmigration und -differenzierung verbessert, die Bildung von Mineralisierungsknoten fördert und die alkalische Phosphatase (ALP) aktiviert. Das Wnt-Signal erhöht auch die Expression von Runx2 (*runt-related transcription factor 2*), Dentinsialophosphoprotein (DSPP) und Dentin-Matrix-Protein-1 (DMP-1) (Li *et al.*, 2014). Für Wnt7b wurden ähnliche Beobachtungen über die Aktivierung von ERK1/2 berichtet (Chen *et al.*, 2019).

NRP1 (Neuropilin 1) steuert in dentalen Stammzellen den biologischen Prozess der Zelldifferenzierung, indem eine Zunahme von NRP1 durch Überexpression auch DMP1, DSPP und ALP in ihrer Konzentration ansteigen lässt und insgesamt den Prozess der Mineralisation fördert. Der Abbau von NRP1 erzielt den gegensätzlichen Effekt. Die Inhibition der Expression von NRP1 blockiert den Wnt/ $\beta$ -Catenin-Pathway und die Differenzierung der Odontoblasten. So lässt sich der direkte Zusammenhang zwischen erhöhter NRP-1 Expression und ansteigender Zelldifferenzierung über den klassischen Wnt-Pathway nachweisen (Song *et al.*, 2017a).

Auch Kif3a (*kinesin-like protein 3a*) ist für die Differenzierung humaner Pulpazellen über Wnt-Signalwege möglicherweise nicht ohne Bedeutung. Das verringerte Auftreten von Kif3a stört die Funktion und Bildung primärer Zilien und führt parallel dazu zu einer reduzierten



Mineralisation. Des Weiteren führt dieser Abbau zur wesentlichen Beeinträchtigung der Dentinogenese, indem die Expression von Proteinen wie Runx2, ALP, DMP-1 und DSPP gehemmt wird. Passend dazu war die Wnt3a-abhängige Expression von  $\beta$ -Catenin inhibiert, diejenige von GSK-3 $\beta$  erhöht (Jiang *et al.*, 2016).

Innerhalb eines engen Zeitfensters wird in der Ontogenese der Transkriptionsfaktor LIM-Homöobox 8 (Lhx8) in kraniofazialen Gewebe aus der Neuralleiste aktiviert. LIM reguliert wohl auch die Differenzierung des Zahnmesenchyms über die veränderte Expression von DSPP, Kollagen Typ I oder Osteocalcin. Über die Aktivierung des Wnt-Signalweg hemmt Lhx8 die Dentinogenese, seine Inhibition wiederum fördert die Mineralisation des Dentins. Lhx8 scheint also die Bildung von Dentin und die Regeneration über die Wnt- und TGF $\beta$ -Pathways zu steuern (Zhou *et al.*, 2015).

Zusätzlich spielt anscheinend die Festigkeit der extrazellulären Matrix eine entscheidende Rolle. Die Expression von Markern der odontogenen Differenzierung in dentalen Stammzellen, unter anderem ALP, Osteocalcin, Osteopontin, Runx-2, BMP-2, DSPP und DMP-1, war bei zunehmender Festigkeit der künstlichen, experimentellen Matrix erhöht. Der Wnt-Signalweg wird also auch durch mechanische Reize aus der extrazellulären Matrix beeinflusst und steuert die Proliferation und Differenzierung (Liu *et al.*, 2018a).

#### **4.5.1.5 Die Funktion von Wnt in der Tertiärdentinbildung**

Die Aktivierung des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Pathways ist ein zentraler Mechanismus der Reparatur von Schäden des Pulpa-Dentin-Komplexes (Neves und Sharpe, 2018). Wnt-Signale regulieren auch die Regenerationsfähigkeit der Zähne. In Arealen, in denen Wnt verstärkt exprimiert wird, liegt das Gleichgewicht physiologischer Zellreaktionen weit auf der Seite von Prozessen der Heilung der Pulpa nach einer Schädigung verglichen mit Verläufen in die Apoptose als gesteuerten Zelltod. Im Falle einer Perforation der Pulpa und anschließender direkter Überkappung wurde während der Tertiärdentinbildung (Reparaturdentin) an der Stelle der Überkappung eine erhöhte Expression von  $\beta$ -Catenin in odontoblasten-ähnlichen Zellen und Stammzellen der Pulpa nachgewiesen. Auch während der weiteren Differenzierung von Odontoblasten steigt  $\beta$ -Catenin fortgehend an (Han *et al.*, 2014b). Ähnliche Beobachtungen wurden nach der Aktivierung von Wnt3a berichtet (Hunter *et al.*, 2015). Kommt es durch das Fehlen von Wnt-Proteinen zum vermehrten Abbau von  $\beta$ -Catenin, wird die Differenzierung der Odontoblasten stark gehemmt, da die Bindung von  $\beta$ -Catenin an Runx-2 und somit auch die Aktivierung von Runx2 vermindert ist (Ishimoto *et al.*, 2015). Auch BMP9 und Wnt3a

können wirksame Faktoren der odontogenen Regeneration im Zusammenhang des Wnt- $\beta$ -Catenin-Signalwegs sein. Sie wirken synergistisch und induzieren die odontoblastische Differenzierung (Zhang *et al.*, 2015). Der Wnt/ $\beta$ -Catenin-Pathway übernimmt also eine zentrale Funktion in der Bildung von Tertiärdentin durch die Förderung der Proliferation und der Differenzierung dentaler Stammzellen und Zellen der dentalen Papille (SCAP) (Yoshioka *et al.*, 2013; Han *et al.*, 2014a; Yoshida *et al.*, 2016).

#### *Wnt in der Bildung von Reaktionsdentin*

Wenn Karies noch nicht das Gewebe der Zahnpulpa erreicht hat, sollte während einer therapeutischen Behandlung so viel Dentin wie möglich erhalten bleiben. Aus dem demineralisierten Dentin selbst werden Wachstumsfaktoren freigesetzt, die ihrerseits in den Dentintubuli Odontoblasten und Odontoblastenfortsätze erreichen können (Widbiller *et al.*, 2019b). Man nimmt heute als gesichert an, dass diese Faktoren noch nicht geschädigte Odontoblasten zur Sekretion von Tertiärdentin als Reaktionsdentin stimulieren. Diese dritte Form des Dentins wird auf der Oberfläche der Pulpa gebildet und verstärkt damit das vorhandene sekundäre Dentin. Die Wirkung von Wnt speziell auf die Bildung von Reaktionsdentin wird aktuell mitunter konträr diskutiert.

So wurde berichtet, dass unter einem Silikatzement tubuläres Reaktionsdentin gebildet wurde, das Odontoblasten anlag. Nach längerer Zeit wurden sogar Dentinbrücken mit Reaktionsdentin und Reparaturdentin identifiziert. Zu der Zeit exprimierten Odontoblasten und Pulpazellen die Liganden Wnt3a, Wnt10a und  $\beta$ -Catenin als Hinweis auf die Aktivität des den kanonischen Wnt-Pathways (Hara *et al.*, 2021). In einem Mausmodell wurde unter einer tiefen Kavität mit verbleibendem Dentin parallel zur Aktivierung von Wnt in Odontoblasten und Pulpazellen die Bildung von Reaktionsdentin an der Präparationsstelle beobachtet. Dieses neue tubuläre Dentin wurde von Odontoblasten gebildet. Allerdings beeinflusste die Inhibition des Wnt-Pathways die Bildung von Reaktionsdentin nicht wesentlich. TGF- $\beta$  oder BMPs unterstützen die strukturelle Organisation von Reaktionsdentin, sind aber für dessen Bildung anscheinend nicht essentiell (Neves und Sharpe, 2018). In einem ähnlichen Modell wurde nach einer nur leichten oberflächlichen Schädigung des Dentins die Rate der Mineralisation stark erhöht. Diese Bildung von neuem Dentin durch Odontoblasten wurde wahrscheinlich durch die Aktivierung des Wnt-Pathways mit Wnt3a stimuliert (Zhao *et al.*, 2018).

### *Wnt in der Bildung von Reparaturdentin*

Wie im Kapitel „Tertiärdentin“ bereits besprochen, wird das Reparaturdentin, eine spezielle Form des Tertiärdentins, nicht mehr von Odontoblasten selbst, sondern von odontoblasten-ähnlichen mesenchymalen Fibroblasten oder Stammzellen der Pulpa gebildet. Grund für diesen komplexen biologischen Prozess und die Differenzierung können verschieden starke Stimuli auf das Pulpagewebe sein. Wenn nach einer starken Schädigung das Pulpagewebe offen liegt und Zellen absterben, werden Reparaturprozesse von überlebenden Zellen initiiert (Han *et al.*, 2014b; Galler *et al.*, 2021).

Einige Autoren berichten vom Zusammenhang zwischen Prozessen des Wnt-Signalwegs und der Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen der Pulpa zu odontoblasten-ähnlichen Zellen und der damit verbundenen Bildung des Reparaturdentins (Scheller *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2016; Babb *et al.*, 2017; Song *et al.*, 2017a). Nach einer schweren, experimentell herbeigeführten Schädigung von Pulpagewebe stimulierte die Anwesenheit kleiner GSK-3-Inhibitoren in abbaubaren Kollagenschwämmen die Bildung von Reparaturdentin. Durch die Inhibition der Aktivität von GSK-3 unterbleibt die Phosphorylierung von  $\beta$ -Catenin, es kann in den Zellkern transloziert werden und dort mit dem Transkriptionsfaktor Tcf die Expression von Zielgenen initiieren. Diese Beobachtung verweist also sehr deutlich auf die Aktivierung des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Pathways als eine wesentliche Komponente des Reparaturprozesses (Neves *et al.*, 2017). Nach einer Stimulierung schwer geschädigter Zellen der Pulpa erhöhte auch deren Exposition gegen Wnt3a die Zellvitalität sowie die Bildung von Tertiärdentin als Reparaturdentin. Pulpazellen differenzierten unter diesen Bedingungen in odontoblasten-ähnliche Zellen (Hunter *et al.*, 2015). Mitunter können sehr verschiedene Prozesse der Bildung von Reaktionsdentin und Reparaturdentin auch simultan initiiert sein (Hara *et al.*, 2021).

Der Wnt-Pathway kann außer über Wnt-Liganden auch durch andere Substanzen stimuliert werden und auf diese Weise die Bildung von Reparaturdentin fördern. So etwa aktiviert Lithiumchlorid (LiCl) die Akkumulation von  $\beta$ -Catenin, steigert die Zelldifferenzierung und folglich die Bildung von Reparaturdentin. Dabei wurde die Expression von Runx2 während der Differenzierung hochreguliert, jedoch deutlich reduziert, wenn  $\beta$ -Catenin inhibiert. Umgekehrt wurden Runx2 sowie DSPP, DMP-1, ALP, BSP (Bonesialoprotein) oder OCN (Osteocalcin) nach einer Stimulierung der Expression von  $\beta$ -Catenin durch LiCl hochreguliert. Daher durfte man auch annehmen, dass Runx2 während der Differenzierung von Odontoblasten und der Bildung von Reparaturdentin  $\beta$ -Catenin

herunterreguliert wird (Han *et al.*, 2014b). In einer ähnlichen Untersuchung wurde LiCl experimentell als Überkappungsmaterial verwendet, um die Dentinregeneration und –reparatur zu aktivieren und die Ausbildung einer vollständigen Dentinbrücke mit dem Ziel der Vitalerhaltung der Pulpa gewährleisten zu können. Das in Anwesenheit von LiCl gebildete Reparaturdentin glied strukturell nicht Osteodentin, sondern schien eine tubuläre Struktur aufzuweisen und war damit dem natürlichen Dentin ähnlicher als etwa Knochen (Ishimoto *et al.*, 2015).

Auch lange nicht-kodierende RNAs (lncRNAs) gelten als wichtige Klassen regulatorischer Moleküle in einigen biologischen Prozessen, wie zum Beispiel der Differenzierung zu odontoblasten-ähnlichen Zellen. Versuchsergebnissen zufolge wird während der Differenzierung dentaler Pulpazellen zu odontoblasten-ähnlichen Zellen die Expression von lncRNA-DANCR (*anti-differentiation ncRNA*) zeitabhängig herunterreguliert. Nach Überexpression von lncRNA-DANCR wird die Bildung von DSPP und DMP-1 gestoppt. Daraus schließt man, dass ein Konzentrationsanstieg von lncRNA-DANCR die Expression von pGSK-3 und  $\beta$ -Catenin stark verringert. Folglich kann lncRNA-DANCR die Aktivierung des Wnt- $\beta$ -Catenin-Signalwegs und die damit verbundene Zelldifferenzierung von Pulpazellen zu odontoblasten-ähnlichen Zellen hemmen. Diese Verwendung von lncRNA-DANCR sollte daher auch eine Option für die Bildung von Reparaturdentin in der Therapie sein (Chen *et al.*, 2016).

Auch ein Crosstalk zwischen BMP2 (*bone morphogenetic protein 2*) und Wnt ist für die Bildung von Reparaturdentin beschrieben. BMP2 fördert über die Aktivierung des kanonischen Wnt- $\beta$ -Catenin-Signalwegs die Zelldifferenzierung humaner Pulpazellen und reguliert die Expression von  $\beta$ -Catenin in Odontoblasten hoch. Die BMP-2-stimulierte Expression von  $\beta$ -Catenin wird wiederum durch die MAPK p38 vermittelt (Yang *et al.*, 2015). Es wurde jedoch auch von der Beteiligung des kanonischen Wnt-Signalwegs an der Differenzierung von Pulpazellen, einer Mischpopulation von Zellen einschließlich Stammzellen und Vorläuferzellen, zu odontoblasten-ähnlichen Zellen und der damit einhergehenden negativen Regulation der Reparaturdentinbildung berichtet. Das im Zytoplasma identifizierte, überexprimierte Wnt10A verstärkte die Proliferation dentaler Pulpazellen; die ALP-Aktivität und die Expression der odontoblasten-spezifischen Gene DSPP und DMP-1 waren jedoch herunterreguliert (Zhang *et al.*, 2014).

#### **4.5.1.6 Inhibitoren des Wnt-Signalwegs**

Die zentrale Funktion des Wnt-Pathways in der Entwicklung von Geweben, gesamten Organismen und daher auch in der Entstehung und Progression von Krankheitsbildern bedingte kontinuierlich die Motivation, spezifische Inhibitoren dieses Signalwegs zu entwickeln. Ein attraktives Ziel dabei war vor allem der TCF/ $\beta$ -Catenin-Komplex. Leider erwies sich dieses spezielle Vorhaben bisher nicht als sehr erfolgreich (Clevers und Nusse, 2012). Upstream waren daher Moleküle wie Axin interessante Komponenten in der Regulation des Wnt-Pathways. Axin bildet das Zentrum des Zerstörungskomplexes, seine Stabilität wird durch die ADP-Ribosylierung durch Tankyrase kontrolliert. Die chemische Verbindung XAV939 stabilisiert Axin, indem es als Inhibitor der Aktivität der Isoenzyme Tankyrase 1 und Tankyrase 2 fungiert. Axin wird durch die gehemmte Ribosylierung nicht mehr abgebaut, daher steigt seine den Zerstörungskomplex stabilisierende Proteinmenge. Dadurch wird die Phosphorylierung von  $\beta$ -Catenin und dessen Abbau beschleunigt. In der Folge sinkt die Transkription  $\beta$ -Catenin-abhängiger Gene (Huang *et al.*, 2009b). Bemerkenswert ist hier der Crosstalk zwischen dem WNT/ $\beta$ -Catenin- und dem NF- $\kappa$ B-Pathway. So wurde die LPS-stimulierte Expression pro-inflammatorischer Zytokine und Enzyme wie IL-6, TNF- $\alpha$ , iNOS oder Cox-2 durch XAV939 inhibiert. Dieser anti-inflammatorische Effekt von XAV939 wird anscheinend durch  $\beta$ -Catenin vermittelt (Jang *et al.*, 2019). Umgekehrt wird  $\beta$ -Catenin durch die Inhibitoren von GSK-3 stabilisiert und der Wnt/ $\beta$ -Catenin-Pathway dadurch aktiviert. Effekte der Inhibitoren sowie ihrer Zielproteine sind an anderer Stelle ausführlicher diskutiert (Clevers und Nusse, 2012). Auch wenn bisher keine Inhibitoren für Wnt-Rezeptoren beschrieben sind, sollten die Möglichkeiten des pharmakologischen Eingreifens in den Wnt/ $\beta$ -Catenin-Pathway künftig in der spezifischen Therapie in der Zahnmedizin genutzt werden können.

#### **4.5.2 Der transformierende Wachstumsfaktor- $\beta$ (TGF- $\beta$ ) -Signalweg**

##### **4.5.2.1 Allgemeines zur Familie der TGF- $\beta$ -Proteine**

TGF- $\beta$ -Proteine dienen als Zytokine der Kommunikation zwischen Zellen. TGFs werden von vielen verschiedenen Zelltypen wie Makrophagen, Lymphozyten, Blutplättchen, Epithelzellen, Fibroblasten, Perizyten oder Endothelzellen gebildet und sezerniert. Wie die meisten Wachstumsfaktoren sind auch die TGF- $\beta$ -Proteine als strukturell verwandte Familie zusammengefasst. Die humanen TGF- $\beta$ -Proteine werden von derzeit bekannten 33 Genen

kodiert und sind sowohl als Homo- als auch Heterodimere aktiv. Die heterogene Familie der humanen TGF- $\beta$  Proteine umfasst drei Isoproteine von TGF- $\beta$ , Aktivine (Inhibine), Nodal (Bmp-16), BMPs (*bone morphogenetic proteins*) und GDFs (*growth and differentiation factors*). Vor allem BMP-2 und BMP-4 scheinen an der Bildung des Skelettes und der Differenzierung von Hartgewebe beteiligt zu sein (Morikawa *et al.*, 2016). Die Bezeichnung TGF- $\beta$  basiert auf der zunächst identifizierten transformierenden Eigenschaft der Moleküle (Roberts *et al.*, 1981). Unter ihnen gilt das TGF- $\beta$ 1-Homodimer als das zuerst erkannte, biochemisch charakterisierte und am ausführlichsten untersuchte Protein. Anhand dessen wurden weitere Wirkmechanismen der anderen Proteine abgeleitet (Derynck und Budi, 2019).

Alle TGF- $\beta$ -Proteine werden als größere Vorstufen mit einem amino-terminalen Signalpeptid, einem großen Prosegment und dem carboxy-terminalen Abschnitt des reifen und aktiven Moleküls synthetisiert (Derynck *et al.*, 1988). TGF- $\beta$  wird sezerniert und zunächst in der extrazellulären Matrix (ECM) im Komplex mit LTBP (*latent TGF- $\beta$  binding protein*) gespeichert. In dieser Form ist das latente TGF- $\beta$  inaktiviert und wird bei Bedarf durch kontraktile Kräfte über Integrine in Verbindung mit Proteasen aktiviert. Die komplizierte Regulation dieses latenten Zustands und der Freisetzung von TGF- $\beta$  wiederum ist nur wenig untersucht, jedoch essentiell für die biologische Wirkung (Caja *et al.*, 2018). Die Aktivität der TGF- $\beta$ -Proteine wird lokal außerdem durch eine Reihe von Proteinen reguliert, die selektiv an TGF- $\beta$  binden und so dessen Bindung an Rezeptoren inhibieren. Die meisten dieser Proteine wie Noggin, Chordin oder Tsg (*twisted gastrulation*) wirken an BMPs antagonistisch oder, wie Tsg, abhängig von umgebenden Bedingungen auch stimulierend (Derynck und Budi, 2019).

Ursprünglich ist man davon ausgegangen, dass Proteine der TGF- $\beta$ -Familie die Entwicklung von Organismen insgesamt und insbesondere die Proliferation, Differenzierung und das Wachstum der Zellen stimulieren. Dies geschieht in Abhängigkeit von Zelltyp und Umgebung. Neue Erkenntnisse lassen ebenso darauf schließen, dass TGF- $\beta$  als bifunktionaler Regulator fungiert, indem es Zellprozesse zwar auch stimuliert, größtenteils jedoch hemmt. So etwa wurden die drei TGF- $\beta$ -Isoproteine als starke Inhibitoren der Zellproliferation identifiziert. Eine solche Regulation der Zellproliferation tritt vor allem bei epithelialen, endothelialen, hämatopoetischen und immunologischen Zellen auf. Sehr charakteristisch sind jedoch vor allem die Effekte der TGF- $\beta$ -Proteine auf die Zelldifferenzierung, die sie auf multiplen Stufen der Entwicklung kontrollieren ( Morikawa *et al.*, 2016; Budi *et al.*, 2017; Derynck und Budi, 2019). Neben der Zellproliferation und -differenzierung haben die TGF- $\beta$ -Proteine Einfluss auf weitere Zellfunktionen. So können sie

anscheinend den Zelltod fördern und hemmen, die Expression von Proteinen der extrazellulären Matrix (ECM), die Zellmotilität und -invasion induzieren sowie Zellstoffwechsel steuern. Die Deregulierung der Proteine der TGF- $\beta$ -Familie spielt eine entscheidende Rolle bei Entwicklungsstörungen, während eine verstärkte Signalauslösung oder -übertragung zu Krebserkrankungen und Fibrosen führen kann (Caja *et al.*, 2018).

#### 4.5.2.2 TGF- $\beta$ -Rezeptoren

Die große Zahl an TGF- $\beta$ -Liganden findet nur wenige Rezeptoren in der Zellmembran als Ausgangspunkt der Signalübertragung. Es werden zwei strukturell ähnliche Rezeptortypen, Typ I und Typ II, unterschieden. Im Genom von Säugetieren wurden kodierende Sequenzen für fünf verschiedene Typ I- und sieben Typ II-Rezeptoren identifiziert, die wahrscheinlich duale (Serin/Threonin und Tyrosin) Kinaseaktivitäten exprimieren. Ohne Liganden liegen die maximal 5000 Rezeptoren je Zelle als Monomere, Homodimere oder Heterodimere vor, die sich erst durch die Bindung eines Liganden (TGF- $\beta$ ) mit hoher Affinität zu heteromeren Rezeptorkomplexen formieren (Derynck und Budi, 2019). Zusätzlich zu den Rezeptoren exprimieren Zellen Korezeptoren, die selektiv die Bindung von Liganden an ihre Rezeptoren unterstützen. Gut charakterisiert sind die beiden Korezeptoren Betaglycan und Endoglin. Die Anwesenheit von Betaglycan ist sehr entscheidend für die Aktivierung von TGF- $\beta$ -Proteinen, vor allem von BMP-2 oder BMP-4. Auch RGMs (*repulsive guidance molecules*) scheinen bevorzugt als BMP-Korezeptoren zu wirken (Derynck und Budi, 2019).

Mit der Erkenntnis, dass die TGF- $\beta$  induzierten Signalantworten stark von der Wechselwirkung mit anderen Signalwegen abhängig sind, lassen sich die unterschiedlichen Wirkmechanismen der TGF- $\beta$ -Signalwege besser verstehen. Zunächst unterscheidet man die TGF- $\beta$ -induzierte Smad-Aktivierung von Nicht-Smad-Signalmechanismen, welche durch unterschiedliche ligandenaktivierte Rezeptorkomplexe initiiert wird, die Smad-Signalübertragung ergänzt und somit zur zellulären Reaktion beiträgt (Derynck und Budi, 2019).

#### 4.5.2.3 TGF- $\beta$ -induzierte Smad-Aktivierung

Smad-Proteine sind die Haupteffektorproteine des TGF- $\beta$ -Signalwegs. Die Bezeichnung selbst ist eine Kombination von Smad-Proteinen (*small*) in *Caenorhabditis elegans* und Mad-Proteinen (*mothers against decapentaplegic*) in *Drosophila*. Es werden mehrere Smad-Proteine unterschieden. So bilden Smad2, Smad3 und Smad4 Komplexe nach Aktivierung des

TGF- $\beta$ -Pathways, Smad6 und Smad7 wiederum sind Inhibitoren dieses Signalwegs (I-Smads). Andererseits sind Smad1, Smad5 und Smad8 Substrate in der Kaskade der Aktivierung über BMPs. Smad-Komplexe können spezifisch an DNA-Sequenzen binden. Für die effiziente Expression von Zielgenen binden sie jedoch an eine Vielzahl anderer Transkriptionsfaktoren, Chromatin-modifizierende Enzyme oder allgemein Co-Regulatoren (Tzavlaki und Moustakas, 2020). Abb. 8 stellt ein vereinfachtes Modell der TGF- $\beta$ -induzierten Smad-Aktivierung, welche zur Smad-vermittelten Aktivierung der Genexpression führt, dar. Das TGF- $\beta$ -Dimer wird auf der Zelloberfläche präsentiert. Die Signalübertragung wird initiiert, indem TGF- $\beta$  an den transmembranen TypII-TGF- $\beta$ -Rezeptor (T $\beta$ RII) bindet und anschließend aus T $\beta$ RII und dem TypI-TGF- $\beta$ -Rezeptor (T $\beta$ RI) ein heteromerer Rezeptorkomplex gebildet wird. Das führt zur Phosphorylierung der GS-Domäne (Glycin-Serin-reich) des T $\beta$ RI durch T $\beta$ RII. Der folglich aktivierte T $\beta$ RI aktiviert dann wiederum die Signalkaskade über die Phosphorylierung C-terminaler Serinreste von Smad2/3 (R-Smad; *receptor-regulated*) und ermöglicht diesen die Komplexbildung mit einem Co-Smad (Smad 4) (*common-mediator*). Das so entstandene Smad-Trimer (R-Smad-4-Komplex) transloziert in den Zellkern und bindet dort neben anderen Transkriptions- und Kofaktoren an Smad-regulatorische DNA-Sequenzen der TGF- $\beta$ -Zielgene, wodurch ihre Expression induziert oder gehemmt wird (Budi *et al.*, 2017; Derynck und Budi, 2019).



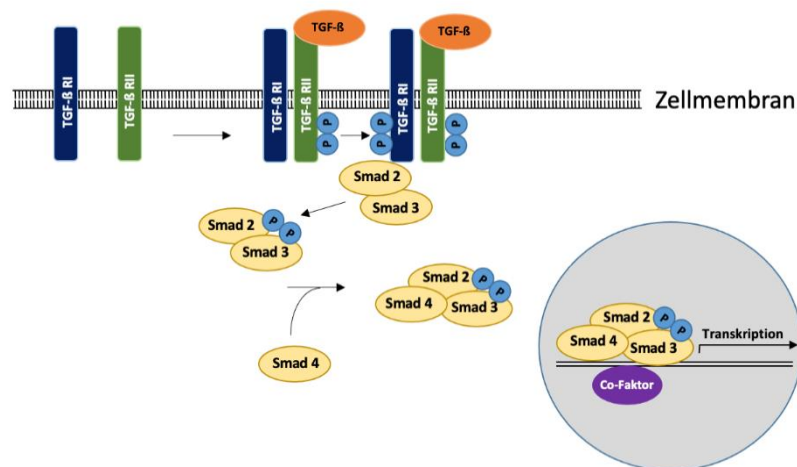


Abb. 8: Modell der TGF- $\beta$ -abhängigen Smad-Aktivierung zur Smad-modifizierten Genexpression. Nachdem das TGF- $\beta$ -Protein an den TGF- $\beta$ -Rezeptor II (TGF- $\beta$  RII) gebunden hat, bildet dieser mit TGF- $\beta$  RI einen aktivierten Rezeptorkomplex. Nach Phosphorylierung von TGF- $\beta$  RI binden Smad2 und Smad3 an den Rezeptorkomplex und werden ebenso phosphoryliert. Der so aktivierte Komplex aus Smad2/3 bindet an Smad4. Dieses Smad-Trimer transloziert in den Zellkern und bindet mit Kofaktoren an die Promotorregion TGF- $\beta$ -abhängiger Zielgene (modifiziert nach Budi *et al.*, 2017).

#### *Smad als Verbindungsglied zwischen verschiedenen Transkriptionswegen der EMT*

Smads haben nicht nur allein, sondern in Kooperation mit anderen Transkriptionswegen die Kontrolle über Genexpressionen des epithelial-mesenchymalen Übergangs (EMT). Die unterschiedlichen Mechanismen einzelner Signalwege ermöglicht es den Smad-Komplexen, mit verschiedenen Transkriptionseffektoren zu interagieren und eine koordinierte Genreprogrammierung zu gewährleisten. Während die Transkription von Zielgenen im Notch- und Hedghog- ebenso wie im Wnt-Signalweg von deren Effektoren aktiviert wird, induzieren neben den DNA-bindenden Transkriptionsfaktoren auch Coaktivatoren und -repressoren die TGF- $\beta$ - und BMP-aktivierte Transkription (Derynck *et al.*, 2014).

#### *Smad als Inhibitor des TGF- $\beta$ Signalwegs*

Die funktionelle Smad-Aktivierung kann auch durch inhibitorische Smad-Protein (Smad6 und Smad7) gestört werden. Dies geschieht, indem sie mit T $\beta$ RI assoziiert werden und die R-Smad-Aktivierung als solches verhindern oder indem die Komplexbildung von R-Smads mit Smad4 unterbunden wird (Derynck und Budi, 2019).

### *Kontextabhängigkeit des TGF- $\beta$ Signalwegs*

Seit mehr als 30 Jahren betreibt man Forschungen im Bereich der TGF- $\beta$  Signalwege, welche verschiedene, auch entgegengesetzte Reaktionen in Abhängigkeit des zellulären Kontextes erkennen ließen. Die Grundlage dieser Kontextabhängigkeit beruht auf der variierenden Physiologie verschiedener Zellen sowie der Verbindung zwischen dem TGF- $\beta$ - und dem Smad-Signalweg. Aktivierte Smad-Komplexe aus Smad 2/3 und 4 zielen direkt auf Gensequenzen im Zellkern ab. Nach deren Bindung aktivieren oder unterdrücken sie die Genexpression jedoch nicht allein, sondern in der reversiblen Wechselwirkung mit anderen DNA-bindenden Transkriptionsfaktoren oder Transkriptions-Koregulatoren (Kofaktoren). Da diese von anderen Signalwegen gesteuert werden oder in Abhängigkeit zu anderen Signalwegen stehen, ist die durch sogenannte Signalkreuzung auf mehreren Ebenen entstandene Transkriptionsantwort kontextabhängig. Darüber hinaus werden Smad-Aktivierung und Smad-Aktivitäten durch separate Kinase- und Ubiquitinierungswege reguliert. Hinzu kommt, dass Smad-Komplexe selbst durch die TGF- $\beta$ -induzierte Rezeptoraktivierung der Nicht-Smad-Signalwege aktiviert werden können (Morikawa *et al.*, 2016).

### *TGF- $\beta$ -aktivierte Nicht-Smad-Signalwege*

Alle TGF- $\beta$ -Liganden binden an einen heteromeren Komplex aus Typ I- und Typ II-Rezeptoren mit intrazellulärer Kinaseaktivität. In diesem Liganden-Rezeptorkomplex phosphoryliert zunächst der Typ II-Rezeptor den Type I-Rezeptor, der seinerseits downstream Kaskaden der Signalübertragung initiiert. Nach aktueller Auffassung bestimmt die Lipid-Protein-Umgebung des Liganden-Rezeptorkomplexes in der Zellmembran die Art des aktivierten Pathways. Während der Rezeptorkomplex in Membranbereichen mit Clathrin wohl die kanonische Smad-Signalkaskade über Smad2/Smad3 aktiviert, nehmen anscheinend Rezeptor-aktivierte, nicht-Smad-Pathways in bisher unbekanntem oder aber in caveolären Bereichen der Membran ihren Anfang. Caveolae sind stark hydrophobe Membranabschnitte im Verbund mit dem Protein Caveolin (Kiss und Botos, 2009). Man unterscheidet verschiedene TGF- $\beta$ -initiierte, nicht-Smad-Pathways, die etwa über die Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPK) ERK 1/2 (*extracellular signal-regulated kinases*), JNK (*c-Jun amino terminal kinase*) und p38 MAPK oder aber über IKK (I $\kappa$ B kinase) im NF- $\kappa$ B-Pathway, über PI3K (*phosphatidylinositol-3 kinase*) und Akt sowie über die Rho-Familie kleiner G-Proteine Zellreaktionen steuern (Abb.9) (Zhang, 2017).

Diese Pathways ohne Smad-Proteine vermitteln nun Signale, die in der Aktivierung adäquater Transkriptionsfaktoren wie ATF2 oder c-Jun enden und möglicherweise dabei von Smad-Proteinen unterstützt werden. So etwa wirken Smad-Proteine in Verbindung mit ERK1/2-regulierten Transkriptionsfaktoren oder ERK1/2 steuert umgekehrt die Aktivität von Smad1/2/3, während die Aktivität von JNK und p38 wiederum von Smad6/7 reguliert wird. Ähnliche Effekte sind für alternative nicht-Smad-Pathways beschrieben. Auf diese Weise kontrollieren diese Pathways wiederum Smad-vermittelte Effekte im kanonischen Pathway. Die Komplexität dieser Wechselwirkungen ist in Übersichtsartikeln ausführlich dargestellt (Zhang, 2017; Derynck und Budi, 2019).

Eine zentrale Funktion von TGF- $\beta$  ist die Induktion der epithelial-mesenchymalen *Transition (EMT)*, die Transformation epithelialer Zellen, die ihre typischen Eigenschaften in diesem Prozess verlieren und in solche mit mesenchymalen Eigenschaften übergehen. Dieser Übergang ist auch ein wesentlicher Vorgang in der Entwicklung von dentalem Pulpagewebe einschließlich der Zellen an der Pulpa-Dentin-Grenze. TGF- $\beta$ -aktivierte Nicht-Smad-Signalwege aktivieren die Zielgenexpression und steuern so die EMT. Die Hauptaufgabe liegt in der Auflösung der Epithelübergänge, der Reorganisation und Motilität des Zytoskeletts sowie der Translationskontrolle. Die nicht-Smad-Signalwege erfüllen hier ihre Funktion, indem sie auf Smads abzielen und ihre Funktion unterstützen. Gleichzeitig steuern sie die Expression und Aktivierung von Transkriptionsfaktoren und wirken bei deren Kontrolle mit den Smad-Komplexen zusammen (Abb. 9) (Derynck *et al.*, 2014). So wurde etwa gezeigt, dass die Aktivierung von ERK1/2 wesentlich ist für die durch TGF- $\beta$ -stimulierte EMT, indem die Zelladhäsion abnimmt und die Zellmobilität steigt. Gleiches wird für JNK, p38 oder PI3K in ihrer Funktion für die Organisation des Zytoskeletts oder für die Regulation der Zellmigration berichtet (Zhang, 2017).

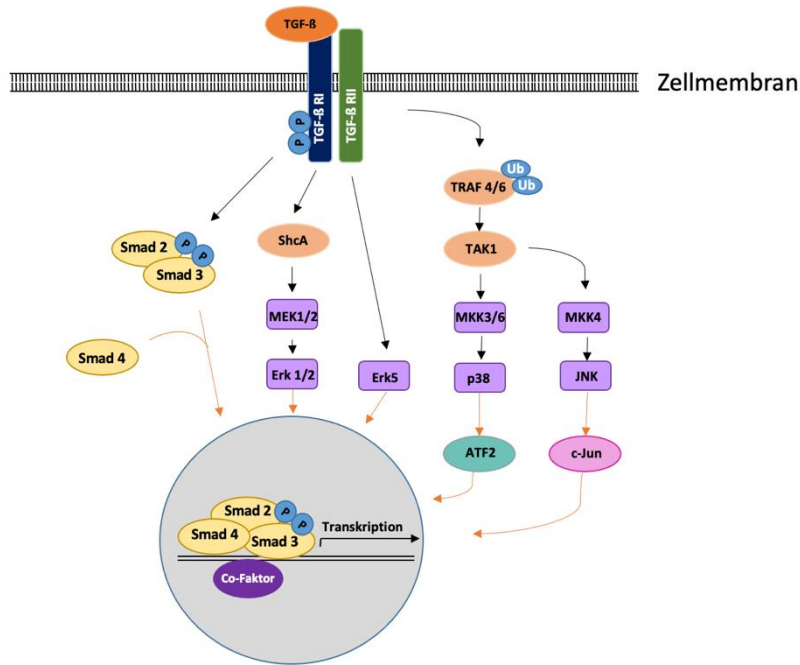


Abb. 9: Modell der Aktivierung TGF- $\beta$ -abhängiger nicht-Smad-Signalwege. An spezifischen Membranabschnitten (*caveolae*) stimuliert die Bindung von TGF- $\beta$  an TGF- $\beta$  RII die Aktivierung von TGF- $\beta$  RI und damit den kanonischen Pathway über Smad2/3, aber auch nicht-Smad-Pathways. Der Einfachheit halber sind hier nur die nicht-Smad-Signalwege über MAPKs gezeigt. Diese aktivieren wiederum spezifische Transkriptionsfaktoren wie ATF2 oder c-Jun, die nun alleine oder mit Smad-Proteinen die Transkription TGF- $\beta$ -abhängiger Gene initiieren. Die Abbildung ist modifiziert nach Derynck et al. (2014), dort sind Pathways ausführlich beschrieben. ShcA (adaptor protein); TAK1 (transforming growth factor- $\beta$ -activated kinase 1); TRAF 4/6 (TNFR-associated factors 4/6); ATF2 (activating transcription factor 2).

#### 4.5.2.4 Beteiligung von TGF- $\beta$ an der Zahnentwicklung

Mehrere Mitglieder der TGF- $\beta$ -Familie werden in sich entwickelnden Zähnen vom Anfangsstadium bis zum Erwachsenenalter exprimiert (Huojia *et al.*, 2005). Dabei ist die Signalübertragung über TGF- $\beta$  und knochenmorphogenetischem Protein (BMP) für die Dentinogenese wesentlich. Die Rolle der TGF- $\beta$ /BMP-Signalübertragung bei der Differenzierung von Odontoblasten und der Dentinbildung ist vielfach experimentell dokumentiert. Übereinstimmend wurde festgestellt, dass die Smad4-abhängige TGF- $\beta$ /BMP-Signalübertragung für die Differenzierung von Odontoblasten und die Dentinbildung während der Zahnentwicklung entscheidend ist (Yun *et al.*, 2016).

Die Expression von Genen, welche spezifisch für verschiedene Entwicklungsstadien sind, konnte während der Differenzierung dentaler Pulpazellen in Präodontoblasten und in adulten Pulpazellen von Rindern nachgewiesen werden. Da die Proliferation nach 14 Tagen Primärkultur herunterreguliert wurde, war die Expression von Fibronektin und Typ I- und

Typ III-Kollagen-mRNAs als Marker der Zelldifferenzierung erhöht. Die Expression der alkalischen Phosphatase stieg anscheinend allmählich, und die mRNA für Osteocalcin erschien spät unmittelbar vor Beginn der nachweisbaren Mineralisierung. BMP-2-mRNA wurde ebenfalls zu einem späten Zeitpunkt exprimiert, als auch Osteocalcin auftrat. Rekombinantes TGF- $\beta$  1 inhibierte die Aktivität der alkalischen Phosphatase, während BMP-2 und BMP-4 sie stimulierten. BMP-4 wiederum erhöhte die Expression von Alpha 1 (I) - Kollagen-mRNA, BMP-2 stimulierte die Osteocalcinsynthese. Diese Ergebnisse zeigen repräsentativ die regulatorische Funktion dieser Mitglieder der TGF- $\beta$ -Familie bei der Genexpression extrazellulärer Matrixproteine und der Differenzierung dentaler Pulpazellen zu Präodontoblasten (Nakashima *et al.*, 1994).

TGF- $\beta$  reguliert die Zellproliferation und -differenzierung in verschiedenen Zelltypen der Zahnpulpa. Während TGF- $\beta$ 1 und TGF- $\beta$ 3 überwiegend in Odontoblasten exprimiert werden, zeigt die Pulpa ein hohes Expressionsniveau von TGF- $\beta$ 2. TGF- $\beta$ 1 wird hauptsächlich durch die Matrixmetalloproteinase 11 (MMP11) aktiviert und erhöht seinerseits die Expressionsniveaus von MMP20 und Dentinsialophosphoprotein (DSPP) in Pulpazellen. Das TGF- $\beta$ 1-Präpeptid, das anscheinend hauptsächlich in Odontoblasten synthetisiert wird, wird überwiegend durch MMP2 und MMP20 sowohl in Odontoblasten als auch im Dentin aktiviert. Die TGF- $\beta$ 1-Aktivität kann durch den altersbedingten Abbau von DSPP-verwandten Proteinen verringert werden. TGF- $\beta$ 1 ist somit anscheinend in seinen vielfältigen biologischen Funktionen an einer komplizierten dynamischen Wechselwirkung mit Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) oder DSPP-verwandten Proteinen beteiligt, die in Zahnpulpa, Odontoblasten und Dentin vorhanden sind (Niwa *et al.*, 2018).

Der molekulare Mechanismus von TGF- $\beta$ 3 in dentalen Pulpazellen ist nicht klar. Es konnte beobachtet werden, dass die Expression von DSPP und DMP1 durch TGF- $\beta$ 3 in primär kultivierten dentalen Pulpazellen induziert wurde, jedoch nicht in Osteoblasten der Calvaria. Die Osteocalcin-, Osteopontin- und Osteonektinexpression war nach Behandlung mit TGF- $\beta$ 3 sowohl in den Pulpazellen als auch in Osteoblasten der Calvaria erhöht. Dentinsialoprotein (DSP) wurde in der Nähe von mit TGF- $\beta$ 3 nachgewiesen. Diese Ergebnisse würden darauf verweisen, dass TGF- $\beta$ 3 durch Hochregulierung der Osteocalcin- und COL I-Expression in dentalen Pulpazellen eine ektopische Mineralisierung induziert und die Differenzierung von Stammzellen zu Odontoblasten regulieren kann (Huojiia *et al.*, 2005).

Der Bindegewebswachstumsfaktor (CTGF) ist ein nachgeschalteter Mediator für TGF- $\beta$ 1. Die TGF- $\beta$ 1-induzierte CTGF-Expression wird über den Smad-Signalweg reguliert. Die Expression von CTGF, TGF- $\beta$ 1 und p-SMAD2/3 ist gewebespezifisch und

stadienspezifisch. Der TGF- $\beta$ 1-SMAD2/3-CTGF-Signalweg ist sehr wahrscheinlich an der Regulation der Amelogenese, der Dentinogenese und der Bildung von Tertiärdentin beteiligt (Li und Pan, 2018).

TGF- $\beta$ 1 kontrolliert Prozesse in der Embryogenese über die Modulation der extrazellulären Matrix (ECM). Während der Zahnentwicklung werden histomorphogenetische und zytodifferenzierende Ereignisse durch ECM-vermittelte epithelial-mesenchymale Wechselwirkungen reguliert. Sowohl die intrazellulären als auch die extrazellulären Formen von TGF- $\beta$ 1 werden ortsspezifisch exprimiert. So wurde der Wachstumsfaktor während der Glockenstadien der Zahnentwicklung parallel zu alkalischer Phosphatase, Fibronectin, Kollagenen I und III und GAGs identifiziert. Diese Daten stützen die Hypothese, dass die Wirkungen von TGF- $\beta$ 1 bei der Zahnentwicklung zu qualitativen Veränderungen in der Zusammensetzung und Struktur der extrazellulären Matrix beitragen (D'Souza *et al.*, 1992).

#### **4.5.2.5 Beteiligung von TGF- $\beta$ an der Tertiärdentinbildung**

Wie bereits erwähnt, sind die Isoformen des TGF- $\beta$  an der zellulären Signalübertragung während der Zahnentwicklung und -reparatur beteiligt. Über ihre zelluläre Lokalisierung oder Verteilung innerhalb des Zahngewebes im reifen Zahn ist jedoch wenig bekannt. In gesunden Geweben wurde TGF- $\beta$ 3 mit höchster und TGF- $\beta$ 11 mit schwächster Intensität nachgewiesen. Ähnliche Muster wurden bei kariösen Zähnen beobachtet, TGF- $\beta$ 1 bewirkte jedoch eine erhöhte Expression in Odontoblasten und Pulpazellen kariöser Zähne. Biochemisch waren größere Mengen an TGF- $\beta$ 1 im tertiären Dentin als in primären Dentinproben nachweisbar. Die Expression von TGF- $\beta$  in Odontoblasten und das erhöhte Vorhandensein von TGF- $\beta$ 1 im tertiären Dentin legen nahe, dass anscheinend diese Isoform für das Verhalten von Odontoblasten und die Modulation der Reaktion des Gewebes auf Verletzungen wichtig ist (Sloan *et al.*, 2000).

#### *Beteiligung von TGF- $\beta$ an der Bildung von Reaktionsdentin*

In mehreren Studien wurde versucht, die Rolle von TGF- $\beta$ 1 bei der Induktion von Apoptose und ihrer molekularen Mechanismen in Odontoblasten zu charakterisieren. TGF- $\beta$ 1 kann in MDPC-23 dosisabhängig den apoptotischen Zelltod induzieren. Negativ mutierte Formen von Smad2 oder Smad3 blockieren die TGF- $\beta$ 1-induzierte Apoptose anscheinend, wobei die Smad3-Mutante effizienter ist als die Smad2-Mutante. Das inhibitorische Smad7 hemmt ebenfalls die TGF- $\beta$ 1-induzierte Apoptose dieser Zellen. Die Überexpression von Smad7 oder

der Smad3-dominanten negativen Mutanten wiederum steuert die negative Regulation der TGF- $\beta$ 1-induzierten Transkriptionsaktivität. Diese Ergebnisse legen nahe, dass Smad-Proteine an der TGF- $\beta$ 1-induzierten Apoptose von Odontoblasten beteiligt sind (He *et al.*, 2005).

#### *Beteiligung von TGF- $\beta$ an der Bildung von Reparaturdentin*

TGF- $\beta$  spielt eine wesentliche Rolle bei der Differenzierung dentaler Pulpazellen zu Odontoblasten, um die reparative Dentinbildung zu induzieren. Dabei wirkt TGF- $\beta$  über die Mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPKs) ERK1/2 und p38 zusammen mit dem Smad-Signalweg. SB203580, ein spezifischer p38-MAPK-Inhibitor, reduzierte die Phosphorylierung von Smad3, während es die Phosphorylierung von Smad2 leicht erhöhte. Zusätzlich erhöhte die Hemmung der ERK1/2-Aktivität mit dem MEK1/2-Inhibitor U0126 die TGF- $\beta$ 1-vermittelte Phosphorylierung von Smad3. Diese Ergebnisse legen nahe, dass p38 die Phosphorylierung von Smad2 und Smad3 während der TGF- $\beta$ 1-Signalübertragung in menschlichen dentalen Pulpazellen unterschiedlich beeinflusst und ERK1/2 möglicherweise an dem Prozess beteiligt ist (Wang *et al.*, 2006).

Etwa die Hälfte des in der Dentinmatrix enthaltenen TGF- $\beta$ 1 liegt in aktiver Form vor. TGF- $\beta$ 1 wurde in Verbindung mit dem Latenz-assoziierten Peptid (LAP), Betaglycan und Decorin in einem isolierten Dentinmatrixpräparat gefunden. Die Verbindung von TGF- $\beta$ 1 mit Betaglycan, Decorin und LAP könnte die Verfügbarkeit und biologische Aktivität dieses Wachstumsfaktors regulieren und seine Präsentation gegenüber den TGF- $\beta$ -Rezeptoren des Typs I und II auf Odontoblasten beeinflussen. Während der Reparatur des Hartgewebes sind solche Kontrollprozesse wichtig, um die biologischen Wirkungen von TGF- $\beta$ 1 auf Zellen zu stimulieren. Außerdem gelten Liposomen experimentell als wirksames Trägermaterial für die Abgabe von TGF- $\beta$ 1 *in vitro*. So förderte Liposomen-gebundenes TGF- $\beta$ 1 nicht nur die Dentinogenese, sondern erhöhte auch die Mineralisierung dentaler Pulpazellen. Dies unterstreicht das Potenzial des TGF- $\beta$ 1-Signalwegs für die therapeutische Verwendung hinsichtlich der Regeneration des Dentin-Pulpa-Komplexes (Jiang *et al.*, 2020).

Ebenso konnte gezeigt werden, dass ein Verlust der Reaktionsfähigkeit und Minderung der Signalübertragung von TGF- $\beta$  in Odontoblasten zu einer Beeinträchtigung der Dentinmatrixbildung und sogar zur Pulpa-Obliteration führte. Auch dieses Erkenntnis unterstreicht die schon zuvor erwähnte wichtige Rolle des TGF- $\beta$ -Signalwegs für die Dentinbildung und den Schutz der Pulpa (Ahn *et al.*, 2015). Offensichtlich sind die

Aktivitäten von TGF- $\beta$ 1 und ALP im Prozess der Differenzierung von Odontoblasten und der Dentinbildung verknüpft. So erhöhte TGF- $\beta$ 1 auf einem Trägermaterial die Mineralisierung und die ALP-Aktivität dentaler Pulpazellen. Die mit TGF- $\beta$ 1 behandelten Zellen exprimierten Dentinsialoprotein (DSP), Osteopontin (OPN) und Typ I-Kollagen (Col I). Nach einer in vivo-Transplantation der Zellkulturen formierten sich säulenförmige Odontoblasten und schließlich wurde tubuläres Dentin gebildet (Li *et al.*, 2011).

Auch microRNAs sind anscheinend wesentlich an der Differenzierung dentaler Pulpazellen zu odontoblasten-ähnlichen Zellen beteiligt. Beispielsweise wurden in einer repräsentativen Studie 36 differentiell exprimierte microRNAs im Prozess der Differenzierung identifiziert. Besonders interessant war dabei die Expression von miR-135b, die während der Differenzierung dentaler Pulpazellen signifikant herunterreguliert war. Diese microRNA könnte daher ein Regulator der Differenzierung sein. Dabei schienen Smad5 und Smad4 Zielgene von miR-135b zu sein, die dort an die untranslatierte Region bindet (Song *et al.*, 2017b).

### **4.5.3 Der Signalweg über den Fibroblasten-Wachstumsfaktor (FGF)**

#### **4.5.3.1 Allgemeines zu FGF**

Die FGF-Familie besteht aus 18 sekretierten Proteinen, die mit signalgebenden Tyrosinkinase-FGF-Rezeptoren (FGFRs) in der Zellmembran interagieren und ein breites Spektrum an Funktionen vermitteln (Ornitz und Itoh, 2015; Goetz und Mohammadi, 2013). Die FGF-Proteine sind in fünf Unterfamilien als parakrine und in einer Unterfamilie als endokrine FGFs sowie in einer weiteren Unterfamilie als intrazelluläre FGFs zusammengefasst.

Sie sind sowohl in frühesten Stadien der Embryonalentwicklung als auch während der Organogenese an Differenzierung und Wachstum beteiligt. Im erwachsenen Gewebe vermitteln sie besonders bei Stoffwechsel- und Reparatur- oder Regenerationsprozessen durch eine Reaktivierung dieser Entwicklungssignalwege ihre Wirkung. Auf zellulärer Ebene steuern FGFs das Überleben von Zellen, die Zellproliferation, Zellmigration und Differenzierung (Ornitz und Itoh, 2015).



#### 4.5.3.2 Das FGF-Signalsystem

Repräsentativ für parakrine und endokrine FGFs werden im Folgenden die nahe verwandten Strukturen von FGF2 und FGF19 skizziert. Die konservierte globuläre Kerndomäne der Proteine besteht aus 12 $\beta$ -Strängen ( $\beta$ 1- $\beta$ 12) in FGF2 (parakrin) und 11 $\beta$ -Strängen in FGF19 (endokrin). Endokrinen FGFs fehlt der 11 $\beta$ -Strang. Die Schleife, die  $\beta$ -Strang 1 und  $\beta$ -Strang 2 verbindet, und die Region zwischen  $\beta$ -Strang 10 und  $\beta$ -Strang 12 sind Bindungsstellen für Heparansulfat am FGF-Rezeptor. Die Konformation der Heparansulfat-Bindungsstelle von FGF19 unterscheidet sich von derjenigen in parakrinen FGFs.

Das alternative Spleißen der kodierenden Sequenzen für die D3-Domäne der FGF-Rezeptoren FGFR1, FGFR2 und FGFR3 erzeugt FGFRb- und FGFRc-Isoformen mit unterschiedlicher Ligandenbindungsspezifität. FGFRs interagieren mit Heparansulfat der Zelloberfläche über ihre D2-Domäne. Heparansulfat ist der obligatorische Kofaktor für die parakrine FGF-Signalgebung.

Im ternären Komplex interagiert jeder FGF-Ligand intensiv mit einem FGF-Rezeptor über dessen primäre Ligandenbindungsstelle, die D2, D3 und den D2-D3-Linker des Rezeptors umfasst. Jeder Ligand bindet auch an den angrenzenden Rezeptor im Komplex über eine sekundäre Ligandenbindungsstelle an der D2-Domäne, die neben der Stelle liegt, die die Rezeptor-Rezeptor-Wechselwirkung vermittelt. Heparansulfat fördert die Bildung des 2:2-parakrinen FGF-FGFR-Komplexes durch gleichzeitige Wechselwirkung mit Liganden und Rezeptor (Goetz und Mohammadi, 2013).

#### 4.5.3.3 Der FGF-Signalweg

Die Interaktion von FGF-Liganden mit ihren Signalrezeptoren wird durch Protein- oder Proteoglykan-Kofaktoren sowie extrazelluläre Bindungsproteine reguliert (Ornitz und Itoh, 2015). Bindet FGFs an seinen FGF-Rezeptor (FGFR), so induziert das eine FGFR-Dimerisierung, in der die Tyrosin-Kinase-Domänen nahe beieinanderstehen. Dies ermöglicht die Kinaseaktivierung durch Transphosphorylierung. Die aktivierten FGFR-Kinasen wiederum aktivieren ihre intrazellulären Substrate durch Phosphorylierung und induzieren so potenziell interaktive Signalwege, die verschiedene zelluläre Reaktionen, wie Zellproliferation, das Überleben der Zellen, aber auch den Zelltod auslösen können. Hauptsubstrate der FGFR-Kinase sind dabei das FGFR-Substrat 2 $\alpha$  (FRS2 $\alpha$ ), das konstitutiv mit der Rezeptorkinase assoziiert ist, und Phospholipase C $\gamma$ 1 (PLC $\gamma$ 1) (Goetz und Mohammadi, 2013).

Befindet sich FRS2 $\alpha$  im aktivierten Zustand, so bindet es an das Adapterprotein *growth-factor-receptor-bound 2* (GRB2). GRB2 rekrutiert dann entweder den Guanin-Nukleotid-Austauschfaktor *son of sevenless* (SOS) (Abb. 10) oder das Adapterprotein GRB2-assoziiertes Bindungsprotein 1 (GAB1) (Abb. 11) an den Signalkomplex. SOS aktiviert die RAS-GTPase, die die Aktivierung der MAPK-Kaskade einleitet (Abb. 10), während rekrutiertes GAB1 die membrangebundene Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K) aktiviert, die zur Aktivierung der AKT-Kinase (Proteinkinase B) (Abb. 11) führt (Goetz und Mohammadi, 2013).

### Regulation der Zellproliferation

Die Bindung von FGF an seinen Rezeptor in der Zellmembran aktiviert die Proteine FRS2 $\alpha$ -GRB2-SOS und die Kaskade RAS-RAF. Die dann durch MAPKK (MEK1/1) phosphorylierte, aktivierte MAPK (ERK1/2) transloziert vom Zytoplasma in den Zellkern und aktiviert ihrerseits Transkriptionsfaktoren wie c-FOS oder ETS, um die Transkription spezifischer Gene einzuleiten. Das Ergebnis dieses Weges ist in erster Linie die Regulation der Zellproliferation. Allerdings ist auch ein Crosstalk mit Signalwegen möglich, die Zelldifferenzierung oder Zellmigration steuern (Abb. 10) (Goetz und Mohammadi, 2013; Ornitz und Itoh, 2015).

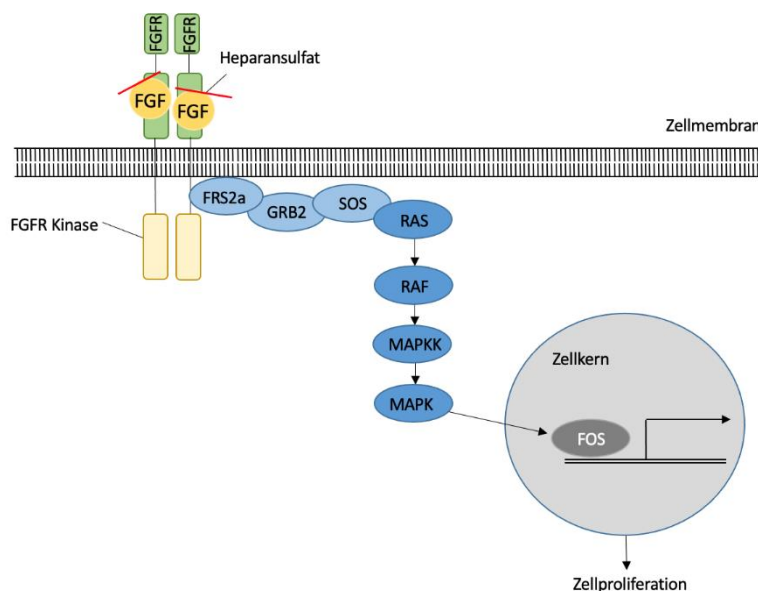


Abb. 10: Regulation der Zellproliferation. FGF bindet an seinen FGF-Rezeptor (FGFR) und induziert so eine FGFR-Dimerisierung. Die aktivierten FGFR-Kinasen wiederum aktivieren ihre intrazellulären Substrate downstream durch Phosphorylierung wie oben im Text skizziert. (modifiziert nach (Goetz und Mohammadi, 2013)).

### Regulation des Zellüberlebens

FGF aktiviert über seinen Rezeptor die Kette FRS2 $\alpha$ -GRB2-GAB1 und letztlich die Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K). Die PI3K-aktivierte PDK (*phosphoinositide-dependent kinase*) aktiviert dann AKT (Proteinkinase B), die pro-apoptotische Effektoren wie BAD (*Bcl-2 antagonist of cell death*) und BAX (*Bcl-2-associated X protein*) sowie die Apoptose initiiierende Caspase 9 inhibiert. AKT aktiviert den Transkriptionsfaktor FOXO (*forkhead box protein O*) und fördert so das Zellüberleben (Abb. 11) (Goetz und Mohammadi, 2013).

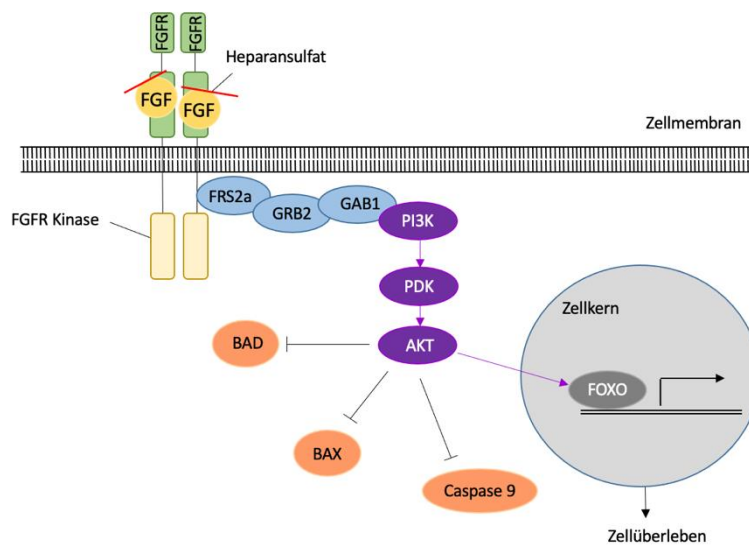


Abb. 11: Regulation des Zellüberlebens. FGFs bindet an seinen FGF-Rezeptor (FGFR) in der Zellmembran und aktiviert über die oben im Text beschriebene Signalkaskade das Zellüberleben (modifiziert nach (Goetz und Mohammadi, 2013)).

### Regulation der Zellmotilität

Die Rekrutierung und Phosphorylierung von PLC $\gamma$ 1 (Phospholipase C $\gamma$ 1) durch die FGFR-Kinase vermittelt einen spezifischen Signalweg, von dem angenommen wird, dass er eine Rolle bei der Zellmigration und Zelldifferenzierung spielt. Möglicherweise modifiziert er auch die RAS-MAPK- und PI3K-AKT-Wege (Abb. 12). Aktiviertes PLC $\gamma$ 1 katalysiert die Hydrolyse des Membranphospholipids Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>) zu den beiden intrazellulären Botenstoffen (*second messengers*) Diacylglycerin (DAG) und Inositol-1,4,5,-trisphosphat (IP<sub>3</sub>). DAG aktiviert die Proteinkinase C (PKC), die wiederum ihre Substrate durch Phosphorylierung aktiviert. Dazu gehören beispielsweise das myristoylierte Ala-reiche C-Kinase-Substrat (MARCKS), ein Regulator der Zellmotilität.

Ergänzend dazu stimuliert IP<sub>3</sub> die Freisetzung von Kalziumionen aus intrazellulären Speichern und löst dadurch die Aktivierung von kalziumabhängigen Proteinen wie der Phosphatase Calcineurin aus. Aktiviertes Calcineurin induziert die nukleäre Translokation des Transkriptionsfaktors NFAT (*nuclear factor of activated T cells*). NFAT stimuliert neben anderen auch die Expression von Proteinen, die für die Regulation der Zellmotilität essentiell sind (Abb. 12) (Goetz und Mohammadi, 2013).

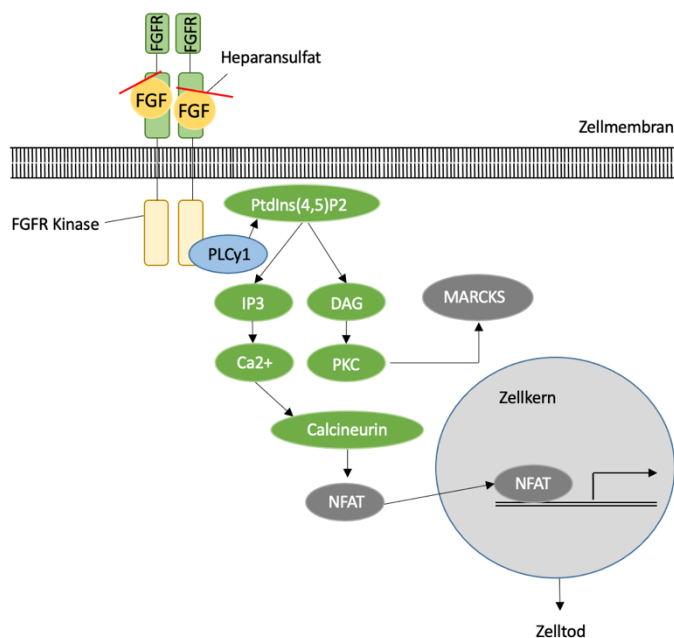


Abb. 12: Regulation der Zellmotilität. Das aktivierte PLC $\gamma$ 1 katalysiert die Hydrolyse von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>) zu den Botenstoffen Diacylglycerin (DAG) und Inositol-1,4,5,-trisphosphat (IP<sub>3</sub>) und Signalwege downstream. Über die im Text oben beschriebene Signalkaskade steuern diese die Zellmotilität (modifiziert nach (Goetz und Mohammadi, 2013)).

#### 4.5.3.4 Regulation der FGF-Liganden Aktivität

Bei der Regulation der FGF-Ligandenaktivität ist den verschiedenen FGFs eine Kernhomologiedomäne von etwa 120 Aminosäuren gemeinsam. Diese sind zu einer globulären  $\beta$ -*trefoil* geordnet, ein Faltungsmotiv aus  $\beta$ -Faltblatt und  $\alpha$ -Helices mit Ähnlichkeiten mit einem dreiblättrigen Kleeblatt. Parakrine FGFs haben eine reguläre  $\beta$ -Kleeblattdomäne, die aus zwölf  $\beta$ -Strängen ( $\beta$ <sub>1</sub>– $\beta$ <sub>12</sub>) besteht, wohingegen endokrine FGFs aufgrund des Fehlens des  $\beta$ <sub>11</sub>-Strangs eine atypische  $\beta$ -Kleeblattdomäne aufweisen. Die konservierte Kerndomäne wird von stark divergierenden aminoterminalen und

carboxyterminalen Sequenzen flankiert, die eine Schlüsselrolle bei der Verleihung unterschiedlicher funktioneller Eigenschaften an FGF spielen.

Die FGF-Aktivität wird durch mehrere Mechanismen reguliert. Dazu gehören die Interaktion von FGF-Liganden mit Heparansulfat am FGFR, das alternative Splicen, die Homodimerisierung und die gezielte proteolytische Spaltung von FGF-Liganden. Unter diesen ist die Interaktion von FGF mit Heparansulfat die wichtigste. Heparansulfat gilt als essentieller Kofaktor des FGF-Signalwegs, aber auch als solcher in der durch BMPs, WNTs oder Hedgehogs gesteuerten Zellantwort. Es definiert nicht nur die Wirkungsweise von FGFs, also ob ein FGF parakrin oder endokrin wirkt, sondern trägt auch zu den unterschiedlichen biologischen Aktivitäten parakriner Liganden innerhalb derselben Unterfamilie bei (Goetz und Mohammadi, 2013; Ornitz und Itoh, 2015).

#### **4.5.3.5 Regulation der FGFR-Funktion**

Bis jetzt wurden vier verschiedene FGF-Rezeptoren (FGFR) beschrieben (Ornitz und Itoh, 2015). Ein prototypischer FGFR besteht aus drei extrazellulären Immunglobulin-ähnlichen Domänen (D1–D3), einer Single-Pass-Transmembran-Domäne und einer intrazellulären Tyr-Kinase-Domäne. Die Ektodomänenregion, die D2, D3 und den D2-D3-Linker umfasst, ist für die Ligandenbindung notwendig und ausreichend. Derzeit wird angenommen, dass Domäne 1 und die Sequenz von Aminosäuren zwischen D1 und D2 die Ligandenbindungen hemmen (Goetz und Mohammadi, 2013; Ornitz und Itoh, 2015). Die Spezifität der Ligandenbindung durch FGFR1, FGFR2 und FGFR3 wird hauptsächlich durch alternatives Splicen kodierender Sequenzen der D3-Domäne dieser Rezeptoren bestimmt, wodurch FGFRb- und FGFRc-Isoformen erzeugt werden. Der Prozess des Splicens ist grundlegend für die Etablierung einer gerichteten FGF-Signalübertragung zwischen epithelialelem und mesenchymalem Gewebe.

Das alternative Splicen von FGFR2 ist funktionell am wichtigsten und ist demjenigen von FGFR1 sehr ähnlich. Die Funktionen von FGFR1 und FGFR2 sind im Prozess der Ontogenese vielfach redundant (Ornitz und Itoh, 2015). Die FGF-FGFR-Bindung induziert die FGFR-Dimerisierung, die die intrazellulären Kinasedomänen der Rezeptoren nebeneinanderstellt und so die sequentielle Autophosphorylierung ermöglicht. Subtile Unterschiede in der Rezeptordimerisierung werden durch unterschiedliche Liganden induziert. Das wird wiederum in Unterschieden in der Rezeptoraktivierung deutlich, woraus verschiedene biologische Reaktionen resultieren (Goetz und Mohammadi, 2013).

#### 4.5.3.6 Die Funktion von FGF bei der Zahnentwicklung

Nachdem nun die allgemeinen Grundlagen des FGF-Signalwegs beschrieben wurden, soll auf die speziellen Aspekte bezüglich der Zahnentwicklung eingegangen werden. Die für die Zahnentwicklung charakteristischen epithelialen-mesenchymalen Interaktionen werden von Wachstumsfaktoren, insbesondere dem FGF, reguliert (Madan und Kramer, 2005). Nachdem es zunächst noch widersprüchliche Forschungsergebnisse zu ihrer Wirkung auf die Odontoblastendifferenzierung gab, zeigen jüngste Studien sehr plausibel, dass FGF-2 auf die Zellen der Odontoblasten-Linie stadienspezifisch wirkt. Eine kontinuierliche Exposition von Pulpazellen gegen FGF-2 hemmt die Differenzierung von Odontoblasten, während eine frühe und begrenzte Exposition von Pulpazellen gegen FGF2 zu einer deutlichen Zunahme der Differenzierung von Odontoblasten führt (Sagomyants *et al.*, 2017).

FGF-2,-3,-4 und -8 scheinen eine wesentliche Rolle in der Kronenentwicklung zu spielen, wohingegen die Wurzelentwicklung hauptsächlich durch FGF-2 reguliert wird (Madan und Kramer, 2005). Besonders im Glockenstadium ist FGF-2, welches meist innerhalb der Basalmembran zwischen Zahnepithel und Zahnmesenchym zu beobachten ist, anscheinend maßgeblich für die Regulation der Zelldifferenzierung und Matrixsekretion verantwortlich. Hinweise darauf ergab die Analyse der Expression von Differenzierungsmarkern wie Dentinsialophosphoprotein, Amelogenin oder der alkalischen Phosphatase (ALP) mittels Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) (Unda *et al.*, 2001; Tsuboi *et al.*, 2003). Exogenes FGF-2 verringerte die Genexpression der Differenzierungsmarker, wobei die Inhibition von endogenem FGF-2 durch Antisense-ODN (*oligodeoxynucleotides*) die Genexpression der Marker erhöhte und damit die Schmelz- und Dentinbildung signifikant förderte (Tsuboi *et al.*, 2003). FGF-2 kann gemeinsam mit FGF-1 an der Kontrolle der Odontoblasten- und auch Ameloblastendifferenzierung beteiligt sein und vermag in Kombination mit TGF- $\beta$  die Differenzierung der Präodontoblasten zu induzieren (Unda *et al.*, 2001). Dabei wirken FGF-1 und TGF- $\beta$ -1 synergetisch und fördern die Odontoblastendifferenzierung, während FGF-2 die Wirkung von TGF- $\beta$ -1 so moduliert, dass eine Polarisierung der Präodontoblasten gefördert wird (Unda *et al.*, 2000).

Besonders bei der Wurzelentwicklung wird FGF als Mediator epithelialer-mesenchymaler Interaktionen angesehen. Eine intensive Immunfärbung für FGF-2 wurde in sich differenzierenden Odontoblasten in allen untersuchten Stadien beobachtet. Dieses Lokalisierungsmuster von FGF-2 deutet darauf hin, dass der Wachstumsfaktor an dem mit der

Wurzelentwicklung verbundenen Signalnetzwerk beteiligt sein könnte (Madan und Kramer, 2005).

#### **4.5.3.7 Die Funktion von FGF bei der Bildung von Tertiärdentin**

##### *Die Funktion von FGF bei der Bildung von Reparaturdentin*

Mitglieder der Familie der FGFs spielen neben der primären Dentinbildung eine wichtige Rolle bei der reparativen Dentinogenese. Vorzugsweise sollte die Aktivierung von FGF-2 die Differenzierung von Odontoblasten inhibieren. Die Behandlung mit FGF-2 stimulierte zunächst die Differenzierung verbleibender Vorläuferzellen in Pulpazellkulturen zu funktionellen Odontoblasten, inhibierte jedoch deren Differenzierung zu reifen Odontoblasten. Die hemmende Wirkung von FGF-2 auf die Differenzierung von Odontoblasten wird wahrscheinlich durch die Aktivierung der FGFR/MEK/ERK1/2-Signalkaskade und die Herunterregulierung der über BMPs vermittelten Signaltransduktion mit negativer oder positiver Wirkung auf die Expression von DMP-1 oder DSPP reguliert (Sagomyants *et al.*, 2017).

Histochemische Untersuchungen zeigten, dass anscheinend FGF-23 in überexprimierter Form die Dentinmineralisierung und die Dentinogenese negativ reguliert. Das war an einer reduzierten Mineralisierungsdichte und einem geringeren mineralisierten Volumen erkennbar. Insgesamt wurden das Zahnvolumen, die reparative Dentinfläche, die Expression des Dentinsialoproteins im Dentin und die Ablagerung von Typ-I-Kollagen und Osteocalcin in der Zahnmatrix signifikant reduziert. Das Predentinvolumen und die Expression von Biglycan im Dentin in FGF-23-transgenen Mäusen war jedoch im Vergleich zu Wildtyp-Geschwistern erhöht (Chen *et al.*, 2011). Fehlendes FGF-23, das den zirkulierenden Phosphatspiegel moduliert, indem es die Phosphatreabsorption in den Nieren kontrolliert, stört die Morphologie und die Proteinexpression des dentoalveolären Komplexes. Histologisch und elektronenmikroskopisch wurde eine Unterbrechung der Odontoblastenschicht beobachtet. Proteine wie Dentinsialoprotein und Dentinphosphoprotein zeigten eine veränderte Lokalisation in FGF-23 (-/-)-Proben (Chu *et al.*, 2010).

##### *Die Funktion von FGF in der regenerativen Therapie*

Die kontrollierte Freisetzung hoher Dosen des FGF-2 aus Gelatinehydrogelen induziert DMP-1-positiv kalzifizierte Partikel in der proliferierenden Pulpa, während eine moderate Dosis von FGF-2 eine DMP-1-positive Dentinbrücke auf der Oberfläche der Pulpa aufbaut.

Anscheinend verändert die Dosierung des freigesetzten FGF-2 die Struktur des bei Dentindefekten regenerierten kalzifizierten Gewebes, das Reparaturdentin. Diese Ergebnisse verweisen auf neue Therapiemöglichkeiten, da beispielsweise die Dentinregeneration einer amputierten Pulpa, nicht aber die reparative Dentinbildung in Richtung amputierter Pulpa durch die Dosierungsanpassung von FGF-2 in biologisch abbaubaren Gelatinehydrogelen reguliert werden kann (Ishimatsu *et al.*, 2009). Weitere Ergebnisse weisen darauf hin, dass etwa erhöhte extrazelluläre Ca<sup>2+</sup>-Spiegel zu einer erhöhten FGF-2-Expression durch ERK1/2 und Proteinkinase A (PKA) in Zellen der dentalen Papille und der humanen Pulpa führt. Die Ca<sup>2+</sup>-induzierte PKA-Aktivität nahm durch die Vorbehandlung mit dem MEK-Inhibitor PD98059 ab. Dieser Mechanismus kann für die Entwicklung regenerativer Therapien des Dentins nützlich sein (Kanaya *et al.*, 2018).

#### **4.5.4 Die Funktion von Sphingomyelinasen in der Bildung von Dentin**

Sphingomyelinasen (SMases) katalysieren die Hydrolyse von Sphingolipiden wie Sphingomyelin (SM) zu Ceramid. Neben Sphingosin (Sph) und Sph-1-Phosphat sind Ceramide Signalmoleküle (*second messengers*), die zellulären Stress, Zellteilung, Zelldifferenzierung oder Apoptose steuern (Clarke und Hannun, 2006). Abhängig von Parametern wie dem pH-Wert oder dem Bedarf an Metallionen als Kofaktoren unterscheidet man derzeit fünf Typen von SMasen, wobei die in den Lysosomen lokalisierte saure SMase sowie die beiden neutralen SMasen (nSMase) die Hauptenzyme der stressinduzierten Bildung von Ceramiden sind. Die Aktivität der nSMase wiederum wird durch eine Reihe von Faktoren angeregt, zu denen Zytokine wie TNF, UV-Licht, Chemotherapeutika oder auch chemische Stressoren wie Phosphatidylserin, mehrfach ungesättigte Fettsäuren wie Arachidonsäure oder auch Lipopolysaccharid (LPS) gehören. Die neutrale nSMase2 oder Sphingomyelin-Phosphodiesterase 3 (*Smpd3*) mit einer besonderen Funktion im intrazellulären vesikulären Transport von Proteinen im sekretorischen Pathway ist membrangebunden im Golgi-Apparat, der Plasmamembran und in den Kompartimenten des Vesikelrecycling lokalisiert (Clarke *et al.*, 2011). Nicht unerheblich, beispielsweise für den Prozess der Mineralisation, könnte die Beobachtung sein, dass nSMase bei hoher Zelldichte bevorzugt in der Zellmembran lokalisiert ist und allgemein Konfluenz die Lokalisation reguliert (Clarke *et al.*, 2006). Quantitative Analysen der Lipidmoleküle in Exosomvesikeln zeigen neben Cholesterin eine Anreicherung von Sphingolipiden und Ceramiden, die anscheinend essentiell für die Bildung von Exosomen sind (Catalano und O'Driscoll, 2020). Exosomen (30–150 nm) stammen aus



intrazellulären multivesikulären Körperchen (*multi-vesicular bodies*, MVBs) (100–1000 nm), die ihrerseits über zwei verschiedene Mechanismen oder ESCRTs (*endosomal sorting complexes required for transport machinery*) entstehen. Der ESCRT-abhängige Weg benötigt ESCRT als eine multimolekulare Verbindung von Proteinkomplexen. Der ESCRT-unabhängige Pathway hingegen wird über nSMAsen gesteuert. Die produzierten Ceramide sammeln sich in Mikrodomänen in Membranen und induzieren die Knospung und Bildung intraluminaler Vesikel und schließlich MVBs nach bisher im Detail unbekanntem Mechanismen (Catalano und O'Driscoll, 2020).

Die Deletion des Genlokus für die neutrale Sphingomyelinase (nSMase2) erzeugte in Mäusen eine neue Form der systemischen juvenilen Hypoplasie oder des Zwergwuchses. Die SMPD3-Defizienz störte die Homöostase der Bildung von Sphingomyelin, Ceramid und Diacylglycerol (DAG) im Golgi-Apparat sowie die Bildung von Vesikeln und insgesamt den sekretorischen Vesikeltransport im Golgi. Damit war auch die Sekretion extrazellulärer Matrixproteine inhibiert mit der Folge von Fehlbildungen des Skeletts neben anderen Anomalien (Stoffel *et al.*, 2016). Die nSMase ist also wesentlich an der Regulation der Bildung von Knochen, aber auch von Dentin beteiligt. Mäuse mit der Mutation *fragilitas ossium* (*fro*) exprimieren eine schwere Form von *Osteogenesis imperfecta*, die hier nicht auf einem Mangel in der Verfügbarkeit von Kollagen, sondern auf einer Deletion von *Smpd3* basiert. Dieser genetische Defekt führt zum vollständigen Verlust der nSMase-Aktivität und damit außer der Knochenfehlbildung auch zu *Dentinogenesis imperfecta* (Aubin *et al.*, 2005).

Die unbedingte Notwendigkeit der Expression von *Smpd3* in Odontoblasten als Regulator der Mineralisation der extrazellulären Matrix der Zähne wurde auch noch auf andere Art gezeigt. In Mäusen mit der Mutation *fro/fro* war in mehreren Stadien unmittelbar nach der Geburt die Mineralisation des Manteldentins vorübergehend verzögert und als Folge davon auch die Schmelzbildung gebremst. Allerdings waren auch in den Mutanten Matrixvesikel über die gesamte Kollagenmatrix des Prädentins verteilt. SMPD3 in Odontoblasten, nicht jedoch in Ameloblasten exprimiert, und die *fro*-Mutation hatten keinen Einfluss auf die Differenzierung der Odontoblasten (Khavandgar *et al.*, 2013). In humanen Zellen des Parodontalligaments erhöhte *Smpd3* die Expression von Enzymen mit zentraler Funktion in der Mineralisation wie die alkalische Phosphatase (ALP), Kollagen Typ oder auch Osterix und Runx2. Mit GW4869 als Inhibitor von nSMase2 ist diese Funktion gehemmt (Miyachi *et al.*, 2017).

Auch andere physiologische Funktionen von nSMase wurden vielfach mit pharmakologischen Inhibitoren untersucht. Neben anderen Molekülen ist GW4869 in

geringen Konzentrationen ein sehr starker, nicht-kompetitiver Inhibitor der nSMase-Aktivität und hemmt als Folge die Freisetzung von Exosomen. GW4869 inhibiert also den Lipidmetabolismus, greift jedoch nicht direkt in den Vesikeltransport ein (Catalano und O'Driscoll, 2020). In bisher unveröffentlichten Analysen einer Arbeitsgruppe an dieser Poliklinik (Prof. Schweikl, (ZEP/UKR) inhibierte GW4869 partiell die Mineralisation in Kulturen von Pulpazellen. Der Grund für diese partielle Inhibition ist momentan noch unklar. Möglicherweise basiert diese Inhibition auf der Anwesenheit unterschiedlicher oder unterschiedlich sensibler Zellpopulationen. Nicht auszuschließen ist jedoch auch die Inhibition der Freisetzung nur einer zentralen Komponente der Mineralisation, etwa die Freisetzung von Kollagen.

#### **4.5.5 Die Funktion von Histondeacetylasen**

Epigenetische Prozesse, also Mechanismen der Regulation der Genexpression aufgrund einer chemischen Modifizierung am Chromatin, der DNA oder DNA-assoziierten Proteine ohne eine Veränderung der Basensequenz, steuern Zellfunktionen und die Zelldifferenzierung während der Entwicklung von Organismen. Durch eine Chromatin-Remodellierung, etwa aufgrund einer kovalenten Modifikation von Histonen durch die reversible enzymatische Acetylierung oder Methylierung, wird die Zugänglichkeit der genomischen DNA und damit die Genexpression verändert. Beispielsweise öffnet die Acetylierung von Histonen durch Histonacetyltransferasen (HAT) die Struktur des Chromatins, während umgekehrt die Histondeacetylierung durch Histondeacetylasen (HDAC) in einer Chromatinkondensation und damit in einer Inhibition der Transkription resultiert (Huynh *et al.*, 2017). Es gibt einige Hinweise auf die Funktion von HDACs auch für den Prozess der Mineralisierung von Hartgewebe. So scheint die Hemmung von HDACs die Differenzierung von Osteoblasten zu beschleunigen (Schroeder *et al.*, 2004).

Generell ist die reversible Deacetylierung von Histonen durch HDACs ein wichtiger epigenetischer Mechanismus, um das Gleichgewicht zwischen Knochenbildung und -abbau zu regulieren. Bisher relativ wenig erforscht, scheint die reversible Histonacetylierung doch ein sehr wesentlicher Prozess in der Bildung des Dentin-Pulpa-Komplexes zu sein (Yamauchi *et al.*, 2020). Es gibt inzwischen aus sehr detaillierten Untersuchungen auch Hinweise auf die Funktion von HDACs für die Dentinbildung und von Möglichkeiten, durch die Verwendung von HDAC-Inhibitoren etwa die Differenzierung von Pulpazellen und die Bildung von Tertiärdentin zu beeinflussen (Duncan *et al.*, 2011). So wurde berichtet, dass die Inhibition

von HDAC die Mineralisation und die damit assoziierte Expression relevanter Enzyme wie DSPP, DMP-1, BMP-2/-4 oder Nestin fördern würde (Duncan *et al.*, 2012, 2013). Auch die erhöhte Expression von Osteopontin oder BSP und die runterregulierte Expression von Osteocalcin korreliert mit der Inhibition von HDAC2 (Paino *et al.*, 2014). Neben HDAC2 wurden andere Isoenzyme wie HDAC4 und HDAC5 als Modulatoren der Differenzierung von Pulpazellen in odontoblasten-ähnliche Zellen diskutiert. Die Inhibition der Aktivität von HDAC4 und HDAC5 erhöhte die Expression von Dentinsialophosphoprotein, Runx2 oder der alkalischen Phosphatase (ALP) auf der Transkriptions- und Translationsebene. Osteocalcin schien auch in dieser Arbeit verstärkt exprimiert worden zu sein, ebenso wie die Fähigkeit der Zellen insgesamt *in vitro* zu mineralisieren. Es wurde vermutet, die Inhibition der Histondeacetylasen könnte ein Schlüssel sein, die Regeneration von Zahnhartgewebe zu beschleunigen (Liu *et al.*, 2018b).

Allerdings ist momentan nicht detailliert bekannt, welche Pathways die Expression von HDACs stimuliert. An anderer Stelle sind lediglich viele Hinweise ausführlicher diskutiert, wie HDACs multiple Signalwege, die von Zytokinen initiiert werden, integrieren können (Bradley *et al.*, 2015). Möglicherweise wird die Funktion von MAPK wie JNK/c-Jun wichtig, und auch der TGF- $\beta$ 1-Pathway über Smad2/3, Smad4 und NFIC (*nuclear factor I-C*) könnte in DPSCs für die Funktion von HDACs entscheidend sein (Jin *et al.*, 2013). Beispielsweise scheint die Aktivität von NFIC die Bildung der Zahnwurzel spezifisch zu steuern (Steele-Perkins *et al.*, 2003). Auch der Transkriptionsfaktor KLF4 benötigt wahrscheinlich am Ende des TGF- $\beta$ 1-Pathways Histondeacetylasen als regulierende Kofaktoren für die Induktion der Funktion von Odontoblasten (Tao *et al.*, 2019; Baranova *et al.*, 2020).

## 5. Schlussfolgerung

In dieser Arbeit wurden zunächst der Ursprung sowie die Morphologie und Funktionen der Odontoblasten im Rahmen der Zahnentwicklung gezeigt. Zu den Funktionen der Odontoblasten während der Odontogenese liegen zahlreiche experimentelle Hinweise vor, so dass diese Vorgänge sehr detailliert beschrieben werden können. Im Gegensatz dazu wird aus der für die vorliegende Arbeit analysierten Datenlage und der daraus verfügbaren Literatur deutlich, wie gering das aktuelle Wissen über molekulare Mechanismen im Prozess der Tertiärdentinbildung weiterhin ist. Dies zeigen die Kapitel der Arbeit, welche die Bedeutung verschiedener Signalwege in Odontoblasten zur Bildung von Reaktions- oder Reparaturdentin zunächst im Allgemeinen und danach im Speziellen behandelt haben. Dennoch sind besonders Wnt/ $\beta$ -Catenin-, TGF- $\beta$ /Smad- und FGF-vermittelte Signalwege in Odontoblasten, odontoblasten-ähnlichen Zellen, Pulpastammzellen und dentalen Pulpazellen als zentrale Mechanismen der Tertiärdentinbildung beschrieben. Für diese Prozesse sind möglicherweise auch die unterstützenden Funktionen von Sphingomyelinasen und Histondeacetylasen bedeutsam. So sind die hier erzielten Resultate die Grundlage experimenteller Arbeiten, die Funktionen verschiedener Signalwege für die Bildung von Tertiärdentin zu untersuchen. Eine erfolgreiche Analyse der spezifischen Bedeutung einzelner Signalwege sollte über ihre pharmakologische Inhibition oder Überexpression sowie durch knockdown-Experimente realisierbar sein.

## 6. Zusammenfassung

Odontoblasten trennen das Weichgewebe der dentalen Pulpa vom Hartgewebe des Dentins und kleiden als terminal differenzierte Zellen in einem einschichtigen Epithel die Pulpakammer aus. Odontoblasten vereinen drei sehr komplexe und scheinbar unabhängige Funktionen. Als sensorische Zellen rezipieren Odontoblasten thermische, mechanische sowie chemische Reize. Sie exprimieren mechanosensitive Ionenkanäle oder allgemein TRP-Kanäle (*transient receptor potential channels*) als Basis von Mechanorezeption und Signaltransduktion. In einer vollkommen anderen Funktion detektieren Odontoblasten im verzweigten System der zellulären Immunantwort als Epithelzellen die Invasion pathogener kariogener Keime, verstärken diese Information und geben sie an andere Immunzellen, etwa dendritische Zellen, im Pulpa-Dentin-Komplex weiter. Schließlich ist die Bildung von Dentin die primäre Funktion reifer Odontoblasten.

Allerdings ist es bis heute nicht gelungen, primäre humane Odontoblasten zu isolieren und *in vitro* zu kultivieren. Eine Kultur humaner Odontoblasten wäre äußerst wünschenswert, weil nur so Prozesse ihrer komplexen Funktionen auf zellulärer Ebene studiert werden könnten. Dieses Wissen wäre dann die Basis für therapeutische Ansätze und Strategien in der restaurativen Zahnheilkunde. Ein erster Ansatz dazu wäre die vertiefte Charakterisierung von Zellen, die kürzlich in unserer Arbeitsgruppe an der Poliklinik für Zahnerhaltung und Parodontologie aus der Pulpa-Dentin-Grenze isoliert wurden. Jedoch ist die Identifizierung dieser Zellen als Odontoblasten ein schwieriges Vorhaben, weil ein spezifischer Marker für Odontoblasten derzeit nicht bekannt ist. Obwohl die aus der Pulpa-Dentin-Grenze isolierten primären Zellen einen Odontoblasten-Phänotyp zu exprimieren scheinen, sollte eine detaillierte Analyse von Mechanismen der unterschiedlichen Funktionen ihre exakte Identifizierung ermöglichen.

Daher sollte in einem ersten Schritt in der vorliegenden Literaturarbeit das derzeit verfügbare Wissen über intrazelluläre Signalwege der Bildung von Dentin und Tertiärdentin als eine der Funktionen von Odontoblasten vergleichend diskutiert werden. Vor allem sollten die über Wnt/ $\beta$ -Catenin, TGF- $\beta$ /Smad und FGF vermittelten Pathways in Odontoblasten, odontoblasten-ähnlichen Zellen und dentalen Pulpazellen erfasst werden. Momentan ist nicht bekannt, wie spezifisch diese Signalwege für Odontoblasten wirklich sind und wie weit andere alternative Wege für die Funktion der Dentin- und Tertiärdentinbildung erforscht wurden.

Zu diesen Fragen wurde eine Literaturrecherche in der Datenbank MEDLINE® über die Plattform OVID durchgeführt. Die von Dubletten bereinigte Suche mit spezifischen Schlüsselwörtern ergab 8992 individuelle Einträge. Als Ergebnis eines Relevanzrankings wurde in erster Priorität eine Trefferzahl von 2761 erzielt, in zweiter Priorität ohne molekulare Terme wurden 6246 Referenzen ermittelt. Diese Quellen wurden in das Literaturverwaltungsprogramm Citavi importiert. Für die vorliegende Arbeit wurden ausschließlich die Referenzen erster Priorität nach „relevant“, „nicht relevant“, „Relevanz unklar“ und „aussortierte Dubletten“ sortiert.

In der vorliegenden Arbeit wurden zunächst noch vor der Analyse spezifischer Signalwege die Struktur des Dentin-Pulpa-Komplexes dargestellt und die Stadien der Entwicklung humaner Zähne analysiert. Anschließend wurde gezeigt, wie die Signalwege, die zur Dentinbildung führen, auch an der Regulation der Zahnentwicklung beginnend mit der Bildung von Plakoden beteiligt sind. Zu diesen Pathways zählen diejenigen über Wnt, TGF $\beta$ /BMP oder auch Wachstumsfaktoren wie der Fibroblasten-Wachstumsfaktor (FGF). Wnt ist eines der zentralen Signalmoleküle der Ontogenese und als wachstumsstimulierendes Protein ein Signalmolekül, das Zellproliferation und Zellmigration induziert, die Physiologie von Stammzellen reguliert und wachsendem Gewebe eine Form verleiht. Die Komplexität des Pathways spiegelt sich in der großen Zahl an Liganden und Rezeptoren wider und aus der Aktivierung von Wnt-Rezeptoren in der Zellmembran resultiert bevorzugt über die Aktivierung des  $\beta$ -Catenin/TCF-Transkriptionskomplexes eine Vielfalt intrazellulärer Reaktionen. Der Wnt- $\beta$ -Catenin Signalweg hat eine bedeutende Funktion als Regulator der Dentinogenese und ist ein zentraler Mechanismus der Reparatur von Schäden des Pulpa-Dentin-Komplexes. Dieser Pathway übernimmt auch eine zentrale Funktion in der Bildung von Tertiärdentin durch die Förderung der Proliferation und der Differenzierung dentaler Stammzellen und Zellen der dentalen Papille.

Ein anderer Signalweg zur Dentinbildung wird von transformierenden Wachstumsfaktoren- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) gesteuert, die als Zytokine der Kommunikation zwischen Zellen dienen. Die heterogene Familie humaner TGF- $\beta$  Proteine umfasst drei Isoproteine von TGF- $\beta$ , Aktivine (Inhibine), Nodal (Bmp-16), BMPs (*bone morphogenetic proteins*) und GDFs (*growth and differentiation factors*). Vor allem BMP-2 und BMP-4 scheinen an der Bildung des Skelettes und der Differenzierung von Hartgewebe beteiligt zu sein. Funktionell binden die TGF- $\beta$ -Liganden zunächst an Rezeptoren in der Zellmembran und aktivieren Smad- und Nicht-Smad-abhängige Signaltransduktionsketten. Smad-Proteine sind die Haupteffektorproteine des TGF- $\beta$ -Signalwegs. Isoformen des TGF- $\beta$  fungieren auch in der

Zahnreparatur. So war TGF- $\beta$ 1 in Odontoblasten und Pulpazellen kariöser Zähne verstärkt exprimiert und im tertiären Dentin nachweisbar. TGF- $\beta$  scheint die Differenzierung dentaler Pulpazellen zu Odontoblasten zu steuern und so die reparative Dentinbildung zu induzieren.

Die Mitglieder der Familie der Fibroblasten-Wachstumsfaktoren (FGF) interagieren mit signalgebenden Tyrosinkinase-FGF-Rezeptoren (FGFRs) in der Zellmembran und vermitteln ein breites Spektrum an Funktionen. FGFs sind in den frühesten Stadien der Embryonalentwicklung und während der Organogenese an Differenzierung und Wachstum beteiligt und regulieren im erwachsenen Gewebe Stoffwechsel-, Reparatur- und Regenerationsprozesse. In der Zahnentwicklung steuern FGFs die charakteristischen epithelialen-mesenchymalen Interaktionen. FGF2 scheint hier auf die Zellen der Odontoblastenlinie stadienspezifisch zu wirken, und FGF-2,-3,-4 und -8 sind an der Entwicklung der Zahnkrone beteiligt. Mitglieder der Familie der FGFs kontrollieren aber auch die reparative Dentinogenese, beispielsweise über die Differenzierung von Vorläuferzellen in Pulpazellkulturen zu funktionellen Odontoblasten.

Neben diesen klassischen Signalwegen scheinen auch besondere Enzymaktivitäten wie die der Sphingomyelinasen (SMases) oder der Histonacetyltransferasen (HAT) die Bildung von Dentin und Tertiärdentin zu fördern. SMases katalysieren die Hydrolyse von Sphingolipiden wie Sphingomyelin (SM) zu Ceramid, die ihrerseits als Signalmoleküle zellulären Stress, Zellteilung oder Zelldifferenzierung steuern. Die Notwendigkeit der Expression von Smpd3 (Sphingomyelin-Phosphodiesterase 3) in Odontoblasten als Regulator der Mineralisation der extrazellulären Matrix der Zähne wurde kürzlich nachgewiesen. Die reversible Acetylierung von Histonen durch Histonacetyltransferasen (HAT) wiederum ist ein wichtiger epigenetischer Mechanismus der Regulation des Gleichgewichts zwischen Knochenbildung und -abbau. Es gibt inzwischen auch Untersuchungen zur Funktion von Histondeacetylasen (HDACs) in der Dentinbildung und von Möglichkeiten, durch die Verwendung von HDAC-Inhibitoren etwa die Differenzierung von Pulpazellen und die Bildung von Tertiärdentin zu beeinflussen.

Trotz dieser teilweise sehr detaillierten Kenntnisse von Signaltransduktionswegen ist das aktuelle Wissen über molekulare Mechanismen im Prozess der Tertiärdentinbildung weiterhin sehr gering. Dennoch sind die hier erzielten Resultate eine Grundlage für experimentelle Arbeiten, Funktionen verschiedener Pathways für die Bildung von Tertiärdentin zu untersuchen. Man darf erwarten, dass die spezifische Bedeutung einzelner Signalwege durch die Inhibition mit chemischen Substanzen oder knockdown-Experimenten

und andererseits mittels Überexpression zentraler Regulatorproteine identifiziert werden kann.



## 7. Literaturverzeichnis

- Aberle H, Bauer A, Stappert J, Kispert A, Kemler R (1997). beta-catenin is a target for the ubiquitin-proteasome pathway. *The EMBO journal* 16:3797–3804.
- Ahn YH, Kim TH, Choi H, Bae CH, Yang YM, Baek JA et al. (2015). Disruption of Tgfb $\beta$ 2 in odontoblasts leads to aberrant pulp calcification. *Journal of Dental Research* 94:828–835.
- Allard B, Couble ML, Magloire H, Bleicher F (2000). Characterization and gene expression of high conductance calcium-activated potassium channels displaying mechanosensitivity in human odontoblasts. *Journal of Biological Chemistry* 275:25556–25561.
- Allard B, Magloire H, Couble ML, Maurin JC, Bleicher F (2006). Voltage-gated sodium channels confer excitability to human odontoblasts: possible role in tooth pain transmission. *Journal of Biological Chemistry* 281:29002–29010.
- Aubin I, Adams CP, Opsahl S, Septier D, Bishop CE, Auge N et al. (2005). A deletion in the gene encoding sphingomyelin phosphodiesterase 3 (Smpd3) results in osteogenesis and dentinogenesis imperfecta in the mouse. *Nature Genetics* 37:803–805.
- Azzolin L, Panciera T, Soligo S, Enzo E, Bicciato S, Dupont S et al. (2014). YAP/TAZ incorporation in the  $\beta$ -catenin destruction complex orchestrates the Wnt response. *Cell* 158:157–170.
- Babb R, Chandrasekaran D, Carvalho, Moreno, Neves, V, Sharpe PT (2017). Axin2-expressing cells differentiate into reparative odontoblasts via autocrine Wnt/beta-catenin signaling in response to tooth damage. *Scientific Reports* 7:3102.
- Bae CH, Kim TH, Ko SO, Lee JC, Yang X, Cho ES (2015). Wntless regulates dentin apposition and root elongation in the mandibular molar. *Journal of Dental Research* 94:439–445.
- Bae JM, Clarke JC, Rashid H, Adhami MD, McCullough K, Scott JS et al. (2018). Specificity Protein 7 Is Required for Proliferation and Differentiation of Ameloblasts and Odontoblasts. *Journal of Bone & Mineral Research* 33:1126–1140.
- Bagramian RA, Garcia-Godoy F, Volpe AR (2009). The global increase in dental caries. A pending public health crisis. *American Journal of Dentistry* 22:3–8.
- Balic A, Mina M (2011). Identification of secretory odontoblasts using DMP1-GFP transgenic mice. *Bone* 48:927–937.
- Baranova J, Buchner D, Gotz W, Schulze M, Tobiasch E (2020). Tooth Formation: Are the Hardest Tissues of Human Body Hard to Regenerate?. *International Journal of Molecular Sciences* 21:4031.
- Baume LJ (1980). The biology of pulp and dentine. A historic, terminologic-taxonomic, histologic-biochemical, embryonic and clinical survey. *Monographs in Oral Science* 8:1–220.
- Bergenholtz G (1981). Inflammatory response of the dental pulp to bacterial irritation. *Journal of Endodontics* 7:100–104.
- Bergmann M, Jeanneau C, Giraud T, Richard G, About I (2020). Complement activation links inflammation to dental tissue regeneration. *Clinical Oral Investigations* 24:4185–4196.
- Bhanot P, Brink M, Samos CH, Hsieh JC, Wang Y, Macke JP et al. (1996). A new member of the frizzled family from Drosophila functions as a Wingless receptor. *Nature* 382:225–230.
- Bjorndal L (2001). Presence or absence of tertiary dentinogenesis in relation to caries progression. *Advances in Dental Research* 15:80–83.
- Bjorndal L (2008). The caries process and its effect on the pulp: the science is changing and so is our understanding. *Pediatric Dentistry* 30:192–196.
- Bleicher F (2014). Odontoblast physiology. *Experimental Cell Research* 325:65–71.
- Bradley EW, Carpio LR, van Wijnen AJ, McGee-Lawrence ME, Westendorf JJ (2015). Histone Deacetylases in Bone Development and Skeletal Disorders. *Physiological reviews* 95:1359–1381.
- Brännström M, Aström A (1972). The hydrodynamics of the dentine; its possible relationship to dentinal pain. *International Dental Journal* 22:219–227.

- Brubaker SW, Bonham KS, Zanoni I, Kagan JC (2015). Innate immune pattern recognition: a cell biological perspective. *Annual review of immunology* 33:257–290.
- Budi EH, Duan D, Derynck R (2017). Transforming Growth Factor- $\beta$  Receptors and Smads: Regulatory Complexity and Functional Versatility. *Trends in cell biology* 27:658–672.
- Caja L, Dituri F, Mancarella S, Caballero-Diaz D, Moustakas A, Giannelli G et al. (2018). TGF- $\beta$  and the Tissue Microenvironment: Relevance in Fibrosis and Cancer. *International Journal of Molecular Sciences* 19:1294.
- Cassidy N, Fahey M, Prime SS, Smith AJ (1997). Comparative analysis of transforming growth factor- $\beta$  isoforms 1–3 in human and rabbit dentine matrices. *Archives of oral biology* 42:219–223.
- Catalano M, O'Driscoll L (2020). Inhibiting extracellular vesicles formation and release: a review of EV inhibitors. *Journal of extracellular vesicles* 9:1703244.
- Chang B, Svoboda KK, Liu X (2019). Cell polarization: From epithelial cells to odontoblasts. *European Journal of Cell Biology* 98:1–11.
- Chen D, Yu F, Wu F, Bai M, Lou F, Liao X et al. (2019). The role of Wnt7B in the mediation of dentinogenesis via the ERK1/2 pathway. *Archives of oral biology* 104:123–132.
- Chen L, Liu H, Sun W, Bai X, Karaplis AC, Goltzman D et al. (2011). Fibroblast growth factor 23 overexpression impacts negatively on dentin mineralization and dentinogenesis in mice. *Clinical & Experimental Pharmacology & Physiology* 38:395–402.
- Chen L, Song Z, Huang S, Wang R, Qin W, Guo J et al. (2016). lncRNA DANCR suppresses odontoblast-like differentiation of human dental pulp cells by inhibiting wnt/beta-catenin pathway. *Cell & Tissue Research* 364:309–318.
- Chen S, Gluhak-Heinrich J, Martinez M, Li T, Wu Y, Chuang HH et al. (2008). Bone morphogenetic protein 2 mediates dentin sialophosphoprotein expression and odontoblast differentiation via NF- $\kappa$ B signaling. *Journal of Biological Chemistry* 283:19359–19370.
- Chmilewsky F, Jeanneau C, Dejoui J, About I (2014). Sources of dentin-pulp regeneration signals and their modulation by the local microenvironment. *Journal of Endodontics* 40:19–25.
- Chmilewsky F, Jeanneau C, Laurent P, About I (2015). LPS induces pulp progenitor cell recruitment via complement activation. *Journal of Dental Research* 94:166–174.
- Christiansen DL, Huang EK, Silver FH (2000). Assembly of type I collagen: fusion of fibril subunits and the influence of fibril diameter on mechanical properties. *Matrix Biology* 19:409–420.
- Chu EY, Fong H, Blethen FA, Tompkins KA, Foster BL, Yeh KD et al. (2010). Ablation of systemic phosphate-regulating gene fibroblast growth factor 23 (Fgf23) compromises the dentoalveolar complex. *Anatomical Record (Hoboken, N J)* 293:1214–26.
- Clarke CJ, Hannun YA (2006). Neutral sphingomyelinases and nSMase2: bridging the gaps. *Biochimica et Biophysica Acta* 1758:1893–1901.
- Clarke CJ, Snook CF, Tani M, Matmati N, Marchesini N, Hannun YA (2006). The extended family of neutral sphingomyelinases. *Biochemistry* 45:11247–11256.
- Clarke CJ, Wu BX, Hannun YA (2011). The neutral sphingomyelinase family: identifying biochemical connections. *Advances in enzyme regulation* 51:51–58.
- Clevers H (2006). Wnt/beta-catenin signaling in development and disease. *Cell* 127:469–480.
- Clevers H, Nusse R (2012). Wnt/ $\beta$ -catenin signaling and disease. *Cell* 149:1192–1205.
- Costalonga M, Herzberg MC (2014). The oral microbiome and the immunobiology of periodontal disease and caries. *Immunology letters* 162:22–38.
- Couve E (1986). Ultrastructural changes during the life cycle of human odontoblasts. *Archives of oral biology* 31:643–651.
- Couve E, Osorio R, Schmachtenberg O (2013). The amazing odontoblast: activity, autophagy, and aging. [Review]. *Journal of Dental Research* 92:765–772.
- Couve E, Schmachtenberg O (2011). Autophagic activity and aging in human odontoblasts. *Journal of Dental Research* 90:523–528.

- Cox CF, Subay RK, Suzuki S, Suzuki SH, Ostro E (1996). Biocompatibility of various dental materials: pulp healing with a surface seal. *International Journal of Periodontics & Restorative Dentistry* 16:240–251.
- Cox CF, White KC, Ramus DL, Farmer JB, Snuggs HM (1992). Reparative dentin: factors affecting its deposition. *Quintessence International* 23:257–270.
- Dassule HR, McMahon AP (1998). Analysis of epithelial-mesenchymal interactions in the initial morphogenesis of the mammalian tooth. *Developmental Biology* 202:215–227.
- Derynck R, Budi EH (2019). Specificity, versatility, and control of TGF- $\beta$  family signaling. *Science signaling* 12:1–24.
- Derynck R, Lindquist PB, Lee A, Wen D, Tamm J, Graycar JL et al. (1988). A new type of transforming growth factor-beta, TGF-beta 3. *The EMBO journal* 7:3737–3743.
- Derynck R, Muthusamy BP, Saeteurn KY (2014). Signaling pathway cooperation in TGF- $\beta$ -induced epithelial-mesenchymal transition. *Current opinion in cell biology* 31:56–66.
- Dimitrova-Nakov S, Goldberg M (2014). Pulp Development. In: The Dental Pulp. Goldberg M, editor. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, pp. 3–11.
- Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D et al. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 8:315–317.
- D'Souza RN, Flanders K, Butler WT (1992). Colocalization of TGF-beta 1 and extracellular matrix proteins during rat tooth development. *Proceedings of the Finnish Dental Society* 88:419–426.
- Duncan HF, Smith AJ, Fleming GJ, Cooper PR (2011). HDACi: cellular effects, opportunities for restorative dentistry. *Journal of Dental Research* 90:1377–1388.
- Duncan HF, Smith AJ, Fleming GJ, Cooper PR (2012). Histone deacetylase inhibitors induced differentiation and accelerated mineralization of pulp-derived cells. *Journal of Endodontics* 38:339–345.
- Duncan HF, Smith AJ, Fleming GJ, Cooper PR (2013). Histone deacetylase inhibitors epigenetically promote reparative events in primary dental pulp cells. *Experimental Cell Research* 319:1534–1543.
- Farges JC, Alliot-Licht B, Renard E, Ducret M, Gaudin A, Smith AJ et al. (2015). dental pulp defence and repair mechanisms in dental caries. *Mediators of Inflammation* 015:230–251.
- Farges JC, Carrouel F, Keller JF, Baudouin C, Msika P, Bleicher F et al. (2011). Cytokine production by human odontoblast-like cells upon Toll-like receptor-2 engagement. *Immunobiology* 216:513–517.
- Fisher LW, Fedarko NS (2003). Six Genes Expressed in Bones and Teeth Encode the Current Members of the SIBLING Family of Proteins. *Connective Tissue Research* 44:33–40.
- Galler KM, Weber M, Korkmaz Y, Widbiller M, Feuerer M (2021). Inflammatory Response Mechanisms of the Dentine-Pulp Complex and the Periapical Tissues. *International Journal of Molecular Sciences* 22:1480.
- Gallorini M, Krifka S, Widbiller M, Schroder A, Brochhausen C, Cataldi A et al. (2021). Distinguished properties of cells isolated from the dentin-pulp interface. *Annals of Anatomy* 234:151628.
- Gaudin A, Renard E, Hill M, Bouchet-Delbos L, Bienvenu-Louvet G, Farges J-C et al. (2015). Phenotypic analysis of immunocompetent cells in healthy human dental pulp. *Journal of Endodontics* 41:621–627.
- George A, Sabsay B, Simonian PA, Veis A (1993). Characterization of a novel dentin matrix acidic phosphoprotein. Implications for induction of biomineralization. *Journal of Biological Chemistry* 268:12624–12630.
- Goetz R, Mohammadi M (2013). Exploring mechanisms of FGF signalling through the lens of structural biology. *Nature reviews. Molecular cell biology* 14:166–180.
- Goldberg M (2014a). Pulp Aging: Fibrosis and Calcospherites. In: The Dental Pulp. Goldberg M, editor. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, pp. 113–121.

- Goldberg M (2014b). Pulp Anatomy and Characterization of Pulp Cells. In: The Dental Pulp. Goldberg M, editor. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, pp. 13–33.
- Goldberg M (2014c). The dental pulp. Biology, pathology, and regenerative therapies. Heidelberg: Springer.
- Goldberg M, Kulkarni AB, Young M, Boskey A (2011). Dentin: structure, composition and mineralization. *Frontiers in bioscience (Elite edition)* 3:711–735.
- Goldstein B, Takeshita H, Mizumoto K, Sawa H (2006). Wnt signals can function as positional cues in establishing cell polarity. *Developmental Cell* 10:391–396.
- Green DR, Schulte F, Lee K-H, Pugach MK, Hardt M, Bidlack FB (2019). Mapping the Tooth Enamel Proteome and Amelogenin Phosphorylation Onto Mineralizing Porcine Tooth Crowns. *Frontiers in Physiology* 10:925.
- Gronthos S, Mankani M, Brahimi J, Robey PG, Shi S (2000). Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97:13625–13630.
- Gullard A, Gluhak-Heinrich J, Papagerakis S, Sohn P, Unterbrink A, Chen S et al. (2016). MEPE Localization in the Craniofacial Complex and Function in Tooth Dentin Formation. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 64:224–236.
- Han J, Menicanin D, Gronthos S, Bartold PM (2014a). Stem cells, tissue engineering and periodontal regeneration. *Australian Dental Journal* 59 Suppl 1:117–130.
- Han N, Zheng Y, Li R, Li X, Zhou M, Niu Y et al. (2014b). beta-catenin enhances odontoblastic differentiation of dental pulp cells through activation of Runx2. *PLoS ONE [Electronic Resource]* 9:e88890.
- Hara M, Horibe K, Mori H, Nakamura H (2021). The Role of canonical Wnt signaling in dentin bridge formation. *Journal of Oral Biosciences*.
- He WX, Niu ZY, Zhao SL, Smith AJ (2005). Smad protein mediated transforming growth factor beta1 induction of apoptosis in the MDPC-23 odontoblast-like cell line. *Archives of oral biology* 50:929–936.
- Holland GR (1985). The odontoblast process: form and function. *Journal of Dental Research* 64:499–514.
- Hosoya A, Hiraga T, Ninomiya T, Yukita A, Yoshida K, Yoshida N et al. (2012). Thy-1-positive cells in the subodontoblastic layer possess high potential to differentiate into hard tissue-forming cells. *Histochemistry & Cell Biology* 137:733–742.
- Huang GT-J, Gronthos S, Shi S (2009a). Mesenchymal stem cells derived from dental tissues vs. those from other sources: their biology and role in regenerative medicine. *Journal of Dental Research* 88:792–806.
- Huang S-MA, Mishina YM, Liu S, Cheung A, Stegmeier F, Michaud GA et al. (2009b). Tankyrase inhibition stabilizes axin and antagonizes Wnt signalling. *Nature* 461:614–620.
- Huang Y-L, Niehrs C (2014). Polarized Wnt signaling regulates ectodermal cell fate in *Xenopus*. *Developmental Cell* 29:250–257.
- Hunter DJ, Bardet C, Mouraret S, Liu B, Singh G, Sadoine J et al. (2015). Wnt Acts as a Prosurvival Signal to Enhance Dentin Regeneration. *Journal of Bone & Mineral Research* 30:1150–1159.
- Huoja M, Muraoka N, Yoshizaki K, Fukumoto S, Nakashima M, Akamine A et al. (2005). TGF-beta3 induces ectopic mineralization in fetal mouse dental pulp during tooth germ development. *Development Growth & Differentiation* 47:141–152.
- Huynh NC, Everts V, Ampornaramveth RS (2017). Histone deacetylases and their roles in mineralized tissue regeneration. *Bone Report* 7:33–40.
- Ishimatsu H, Kitamura C, Morotomi T, Tabata Y, Nishihara T, Chen KK et al. (2009). Formation of dentinal bridge on surface of regenerated dental pulp in dentin defects by controlled release of fibroblast growth factor-2 from gelatin hydrogels. *Journal of Endodontics* 35:858–865.

- Ishimoto K, Hayano S, Yanagita T, Kurosaka H, Kawanabe N, Itoh S et al. (2015). Topical application of lithium chloride on the pulp induces dentin regeneration. *PLoS ONE [Electronic Resource]* 10:e0121938.
- Itoh Y, Sasaki JI, Hashimoto M, Katata C, Hayashi M, Imazato S (2018). Pulp Regeneration by 3-dimensional Dental Pulp Stem Cell Constructs. *Journal of Dental Research* 97:1137–1143.
- Ivica A, Deari S, Patcas R, Weber FE, Zehnder M (2020). Transforming Growth Factor Beta 1 Distribution and Content in the Root Dentin of Young Mature and Immature Human Premolars. *Journal of Endodontics* 46:641–647.
- Janda CY, Waghray D, Levin AM, Thomas C, Garcia KC (2012). Structural basis of Wnt recognition by Frizzled. *Science* 337:59–64.
- Jang J, Jung Y, Chae S, Bae T, Kim S-M, Shim YJ et al. (2019). XAV939, a Wnt/ $\beta$ -catenin pathway modulator, has inhibitory effects on LPS-induced inflammatory response. *Immunopharmacology and immunotoxicology* 41:394–402.
- Jeanneau C, Lundy FT, ElKarim, IA, About I (2017). Potential Therapeutic Strategy of Targeting Pulp Fibroblasts in Dentin-Pulp Regeneration. *Journal of Endodontics* 43:17-24.
- Jiang L, Ayre WN, Melling GE, Song B, Wei X, Sloan AJ et al. (2020). Liposomes loaded with transforming growth factor beta1 promote odontogenic differentiation of dental pulp stem cells. *Journal of Dentistry* 103:103501.
- Jiang S, Chen G, Feng L, Jiang Z, Yu M, Bao J et al. (2016). Disruption of kif3a results in defective osteoblastic differentiation in dental mesenchymal stem/precursor cells via the Wnt signaling pathway. *Molecular Medicine Reports* 14:1891–1900.
- Jin H, Park JY, Choi H, Choung PH (2013). HDAC inhibitor trichostatin A promotes proliferation and odontoblast differentiation of human dental pulp stem cells. *Tissue engineering* 19:613–624.
- Kanaya S, Xiao B, Sakisaka Y, Suto M, Maruyama K, Saito M et al. (2018). Extracellular calcium increases fibroblast growth factor 2 gene expression via extracellular signal-regulated kinase 1/2 and protein kinase A signaling in mouse dental papilla cells. *Journal of Applied Oral Science* 26:e20170231.
- Khavandgar Z, Alebrahim S, Eimar H, Tamimi F, McKee MD, Murshed M (2013). Local regulation of tooth mineralization by sphingomyelin phosphodiesterase 3. *Journal of Dental Research* 92:358–364.
- Kianoush N, Adler CJ, Nguyen K-AT, Browne GV, Simonian M, Hunter N (2014). Bacterial profile of dentine caries and the impact of pH on bacterial population diversity. *PloS one* 9:e92940.
- Kiss AL, Botos E (2009). Endocytosis via caveolae: alternative pathway with distinct cellular compartments to avoid lysosomal degradation? *Journal of cellular and molecular medicine* 13:1228–1237.
- Kitajima K, Oki S, Ohkawa Y, Sumi T, Meno C (2013). Wnt signaling regulates left-right axis formation in the node of mouse embryos. *Developmental Biology* 380:222–232.
- Kruger TE, Miller AH, Godwin AK, Wang J (2014). Bone sialoprotein and osteopontin in bone metastasis of osteotropic cancers. *Critical reviews in oncology/hematology* 89:330–341.
- Lacruz RS, Habelitz S, Wright JT, Paine ML (2017). DENTAL ENAMEL FORMATION AND IMPLICATIONS FOR ORAL HEALTH AND DISEASE. *Physiological reviews* 97:939–993.
- Larmas M, Sandor GK (2014). Enzymes, dentinogenesis and dental caries: a literature review. *Journal of Oral & Maxillofacial Research* 5:e3.
- Li R, Wang C, Tong J, Su Y, Lin Y, Zhou X et al. (2014). WNT6 promotes the migration and differentiation of human dental pulp cells partly through c-Jun N-terminal kinase signaling pathway. *Journal of Endodontics* 40:943–948.
- Li S, Pan Y (2018). Immunolocalization of connective tissue growth factor, transforming growth factor-beta1 and phosphorylated-SMAD2/3 during the postnatal tooth development and formation of junctional epithelium. *Annals of Anatomy* 216:52–59.
- Li VSW, Ng SS, Boersema PJ, Low TY, Karthaus WR, Gerlach JP et al. (2012). Wnt signaling through inhibition of  $\beta$ -catenin degradation in an intact Axin1 complex. *Cell* 149:1245–1256.

- Li Y, Lu X, Sun X, Bai S, Li S, Shi J (2011). Odontoblast-like cell differentiation and dentin formation induced with TGF-beta1. *Archives of oral biology* 56:1221–1229.
- Lim WH, Liu B, Cheng D, Hunter DJ, Zhong Z, Ramos DM et al. (2014). Wnt signaling regulates pulp volume and dentin thickness. *Journal of Bone & Mineral Research* 29:892–901.
- Linde A, Goldberg M (1993). Dentinogenesis. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine* 4:679–728.
- Liu C, Li Y, Semenov M, Han C, Baeg G-H, Tan Y et al. (2002). Control of  $\beta$ -Catenin Phosphorylation/Degradation by a Dual-Kinase Mechanism. *Cell* 108:837–847.
- Liu G, Wu C, Abrams WR, Li Y (2020). Structural and Functional Characteristics of the Microbiome in Deep-Dentin Caries. *Journal of Dental Research* 99:713–720.
- Liu H, Li W, Gao C, Kumagai Y, Blacher RW, DenBesten PK (2004). Dentonin, a fragment of MEPE, enhanced dental pulp stem cell proliferation. *Journal of Dental Research* 83:496–499.
- Liu N, Zhou M, Zhang Q, Zhang T, Tian T, Ma Q et al. (2018a). Stiffness regulates the proliferation and osteogenic/odontogenic differentiation of human dental pulp stem cells via the WNT signalling pathway. *Cell Proliferation* 51:e12435.
- Liu Z, Chen T, Han Q, Chen M, You J, Fang F et al. (2018b). HDAC inhibitor LMK-235 promotes the odontoblast differentiation of dental pulp cells. *Molecular Medicine Reports* 17:1445–1452.
- Loh KM, van Amerongen R, Nusse R (2016). Generating Cellular Diversity and Spatial Form: Wnt Signaling and the Evolution of Multicellular Animals. *Developmental Cell* 38:643–655.
- Madan AK, Kramer B (2005). Immunolocalization of fibroblast growth factor-2 (FGF-2) in the developing root and supporting structures of the murine tooth. *Journal of Molecular Histology* 36:171–178.
- Magloire H, Couble ML, Romeas A, Bleicher F (2004). Odontoblast primary cilia: facts and hypotheses. *Cell Biology International* 28:93–99.
- Magloire H, Couble ML, Thivichon-Prince B, Maurin JC, Bleicher F (2009). Odontoblast: a mechano-sensory cell. *Journal of Experimental Zoology* 009:416–424.
- Magloire H, Maurin JC, Couble ML, Shibukawa Y, Tsumura M, Thivichon-Prince B et al. (2010). Topical review. Dental pain and odontoblasts: facts and hypotheses. *Journal of Orofacial Pain* 24:335–349.
- Magloire H, Romeas A, Melin M, Couble ML, Bleicher F, Farges JC (2001). Molecular regulation of odontoblast activity under dentin injury. *Advances in Dental Research* 15:46–50.
- Marschall Z von, Fisher LW (2010). Dentin sialophosphoprotein (DSPP) is cleaved into its two natural dentin matrix products by three isoforms of bone morphogenetic protein-1 (BMP1). *Matrix Biology* 29:295–303.
- Martin FE, Nadkarni MA, Jacques NA, Hunter N (2002). Quantitative microbiological study of human carious dentine by culture and real-time PCR: association of anaerobes with histopathological changes in chronic pulpitis. *Journal of clinical microbiology* 40:1698–1704.
- Martin-Belmonte F, Perez-Moreno M (2011). Epithelial cell polarity, stem cells and cancer. *Nature reviews. Cancer* 12:23–38.
- Mickle AD, Shepherd AJ, Mohapatra DP (2015). Sensory TRP channels: the key transducers of nociception and pain. *Progress in molecular biology and translational science* 131:73–118.
- Miura M, Gronthos S, Zhao M, Lu B, Fisher LW, Robey PG et al. (2003). SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100:5807–5812.
- Miyauchi S, Kitagaki J, Masumoto R, Imai A, Kobayashi K, Nakaya A et al. (2017). Sphingomyelin Phosphodiesterase 3 Enhances Cytodifferentiation of Periodontal Ligament Cells. *Journal of Dental Research* 96:339–346.
- Morikawa M, Derynck R, Miyazono K (2016). TGF- $\beta$  and the TGF- $\beta$  Family: Context-Dependent Roles in Cell and Tissue Physiology. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 8:27–50.
- Mundgesundheits (2010). Gesundheitsberichterstattung des Bundes. *Krankenhaus-Hygiene + Infektionsverhütung* 32:56.

- Nakashima M, Nagasawa H, Yamada Y, Reddi AH (1994). Regulatory role of transforming growth factor-beta, bone morphogenetic protein-2, and protein-4 on gene expression of extracellular matrix proteins and differentiation of dental pulp cells. *Developmental Biology* 162:18–28.
- Napetschnig J, Wu H (2013). Molecular basis of NF- $\kappa$ B signaling. *Annual review of biophysics* 42:443–468.
- Narayanan K, Gajjeraman S, Ramachandran A, Hao J, George A (2006). Dentin matrix protein 1 regulates dentin sialophosphoprotein gene transcription during early odontoblast differentiation. *Journal of Biological Chemistry* 281:19064–19071.
- Narayanan K, Srinivas R, Ramachandran A, Hao J, Quinn B, George A (2001). Differentiation of embryonic mesenchymal cells to odontoblast-like cells by overexpression of dentin matrix protein 1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98:4516–4521.
- Neves VC, Babb R, Chandrasekaran D, Sharpe PT (2017). Promotion of natural tooth repair by small molecule GSK3 antagonists. *Scientific Reports* 7:39654.
- Neves VC, Sharpe PT (2018). Regulation of Reactionary Dentine Formation. *Journal of Dental Research* 97:416–422.
- Nishiyama A, Sato M, Kimura M, Katakura A, Tazaki M, Shibukawa Y (2016). Intercellular signal communication among odontoblasts and trigeminal ganglion neurons via glutamate. *Cell Calcium* 60:341–355.
- Niwa T, Yamakoshi Y, Yamazaki H, Karakida T, Chiba R, Hu JC et al. (2018). The dynamics of TGF-beta in dental pulp, odontoblasts and dentin. *Scientific Reports* 8:4450.
- Nusse R, Clevers H (2017). Wnt/ $\beta$ -Catenin Signaling, Disease, and Emerging Therapeutic Modalities. *Cell* 169:985–999.
- Ornitz DM, Itoh N (2015). The Fibroblast Growth Factor signaling pathway. *Wiley interdisciplinary reviews. Developmental biology* 4:215–266.
- Pagella P, Porcheri C, Mitsiadis TA (2020). Exploiting teeth as a model to study basic features of signaling pathways. *Biochemical Society transactions* 48:2729–2742.
- Paino F, La Noce M, Tirino V, Naddeo P, Desiderio V, Pirozzi G et al. (2014). Histone deacetylase inhibition with valproic acid downregulates osteocalcin gene expression in human dental pulp stem cells and osteoblasts: evidence for HDAC2 involvement. *Stem Cells* 32:279–289.
- Qin C, D'Souza R, Feng JQ (2007). Dentin matrix protein 1 (DMP1): new and important roles for biomineralization and phosphate homeostasis. *Journal of Dental Research* 86:1134–1141.
- Rajan S, Ljunggren A, Manton DJ, Björkner AE, McCullough M (2020). Post-mitotic odontoblasts in health, disease, and regeneration. *Archives of oral biology* 109:104591.
- Renard E, Gaudin A, Bienvenu G, Amiaud J, Farges JC, Cuturi MC et al. (2016). Immune Cells and Molecular Networks in Experimentally Induced Pulpitis. *Journal of Dental Research* 95:196–205.
- Ricucci D, Loghin S, Lin LM, Spangberg LS, Tay FR (2014a). Is hard tissue formation in the dental pulp after the death of the primary odontoblasts a regenerative or a reparative process? *Journal of Dentistry* 42:1156–1170.
- Ricucci D, Loghin S, Siqueira, JF, Jr (2014b). Correlation between clinical and histologic pulp diagnoses. *Journal of Endodontics* 40:1932–1939.
- Rijsewijk F, Schuermann M, Wagenaar E, Parren P, Weigel D, Nusse R (1987). The Drosophila homology of the mouse mammary oncogene int-1 is identical to the segment polarity gene wingless. *Cell* 50:649–657.
- Ritchie H (2018). The functional significance of dentin sialoprotein-phosphophoryn and dentin sialoprotein. *International Journal of Oral Science* 10:31.
- Roberts AB, Anzano MA, Lamb LC, Smith JM, Sporn MB (1981). New class of transforming growth factors potentiated by epidermal growth factor: isolation from non-neoplastic tissues. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 78:5339–5343.
- Rodriguez-Boulan E, Macara IG (2014). Organization and execution of the epithelial polarity programme. *Nature reviews. Molecular cell biology* 15:225–242.

- Rosset EM, Bradshaw AD (2016). SPARC/osteonectin in mineralized tissue. *Matrix Biology* 52-54:78–87.
- Rubin de Celis MF, Celis MFR de, Bornstein SR, Androutsellis-Theotokis A, Andoniadou CL, Licinio J et al. (2016). The effects of stress on brain and adrenal stem cells. *Molecular psychiatry* 21:590–593.
- Ruch JV, Lesot H, Begue-Kirn C (1995). Odontoblast differentiation. *International Journal of Developmental Biology* 39:51–68.
- Ruch JV, Lesot H, Karcher-Djuricic V, Meyer JM, Olive M (1982). Facts and hypotheses concerning the control of odontoblast differentiation. *Differentiation* 21:7–12.
- Sagomyants K, Kalajzic I, Maye P, Mina M (2017). FGF Signaling Prevents the Terminal Differentiation of Odontoblasts. *Journal of Dental Research* 96:663–670.
- Scheller EL, Chang J, Wang CY (2008). Wnt/beta-catenin inhibits dental pulp stem cell differentiation. *Journal of Dental Research* 87:126–130.
- Schneider J, Arraf AA, Grinstein M, Yelin R, Schultheiss TM (2015). Wnt signaling orients the proximal-distal axis of chick kidney nephrons. *Development (Cambridge, England)* 142:2686–2695.
- Schroeder TM, Kahler RA, Li X, Westendorf JJ (2004). Histone deacetylase 3 interacts with runx2 to repress the osteocalcin promoter and regulate osteoblast differentiation. *Journal of Biological Chemistry* 279:41998–42007.
- Sharpe PT (2016). Dental mesenchymal stem cells. *Development (Cambridge, England)* 143:2273–2280.
- Shi S, Gronthos S (2003). Perivascular niche of postnatal mesenchymal stem cells in human bone marrow and dental pulp. *Journal of Bone & Mineral Research* 18:696–704.
- Simon S, Smith AJ, Lumley PJ, Berdal A, Smith G, Finney S et al. (2009). Molecular characterization of young and mature odontoblasts. *Bone* 45:693–703.
- Simon SR, Berdal A, Cooper PR, Lumley PJ, Tomson PL, Smith AJ (2011). Dentin-pulp complex regeneration: from lab to clinic. [Review]. *Advances in Dental Research* 23:340–345.
- Sloan AJ, Perry H, Matthews JB, Smith AJ (2000). Transforming growth factor-beta isoform expression in mature human healthy and carious molar teeth. *Histochemical Journal* 32:247–252.
- Smith AJ, Cassidy N, Perry H, Begue-Kirn C, Ruch JV, Lesot H (1995). Reactionary dentinogenesis. *International Journal of Developmental Biology* 39:273–280.
- Smith AJ, Duncan HF, Diogenes A, Simon S, Cooper PR (2016). Exploiting the Bioactive Properties of the Dentin-Pulp Complex in Regenerative Endodontics. *Journal of Endodontics* 42:47–56.
- Sodek J, Ganss B, McKee MD (2000). Osteopontin. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine* 11:279–303.
- Soden RI, Botero TM, Hanks CT, Nor JE (2009). Angiogenic signaling triggered by cariogenic bacteria in pulp cells. *Journal of Dental Research* 88:835–840.
- Sole-Magdalena A, Martinez-Alonso M, Coronado CA, Junquera LM, Cobo J, Vega JA (2018). Molecular basis of dental sensitivity: The odontoblasts are multisensory cells and express multifunctional ion channels. [Review]. *Annals of Anatomy* 215:20–29.
- Song Y, Liu X, Feng X, Gu Z, Gu Y, Lian M et al. (2017a). NRP1 Accelerates Odontoblast Differentiation of Dental Pulp Stem Cells Through Classical Wnt/beta-Catenin Signaling. *Cellular Reprogramming* 19:324–330.
- Song Z, Chen LL, Wang RF, Qin W, Huang SH, Guo J et al. (2017b). MicroRNA-135b inhibits odontoblast-like differentiation of human dental pulp cells by regulating Smad5 and Smad4. *International Endodontic Journal* 50:685–693.
- Staquet MJ, Carrouel F, Keller JF, Baudouin C, Msika P, Bleicher F et al. (2011). Pattern-recognition receptors in pulp defense. [Review]. *Advances in Dental Research* 23:296–301.
- Steele-Perkins G, Butz KG, Lyons GE, Zeichner-David M, Kim H-J, Cho M-I et al. (2003). Essential role for NFI-C/CTF transcription-replication factor in tooth root development. *Molecular & Cellular Biology* 23:1075–1084.



- Stoffel W, Hammels I, Jenke B, Binczek E, Schmidt-Soltau I, Brodesser S et al. (2016). Neutral sphingomyelinase (SMPD3) deficiency disrupts the Golgi secretory pathway and causes growth inhibition. *Cell Death & Disease* 7:e2488.
- Takahashi N, Nyvad B (2011). The role of bacteria in the caries process: ecological perspectives. *Journal of Dental Research* 90:294–303.
- Tao H, Lin H, Sun Z, Pei F, Zhang J, Chen S et al. (2019). Klf4 Promotes Dentinogenesis and Odontoblastic Differentiation via Modulation of TGF-beta Signaling Pathway and Interaction With Histone Acetylation. *Journal of Bone & Mineral Research* 34:1502–1516.
- Thesleff I (2014). Current understanding of the process of tooth formation: transfer from the laboratory to the clinic. *Australian Dental Journal* 59 Suppl 1:48–54.
- Thesleff I, Sharpe P (1997). Signalling networks regulating dental development. *Mechanisms of Development* 67:111–123.
- Thesleff I, Tummers M (2008). Tooth organogenesis and regeneration. *Harvard Stem Cell Institute*.
- Thivichon-Prince B, Couble ML, Giamarchi A, Delmas P, Franco B, Romio L et al. (2009). Primary cilia of odontoblasts: possible role in molar morphogenesis. *Journal of Dental Research* 88:910–915.
- Thyagarajan T, Sreenath T, Cho A, Wright JT, Kulkarni, AB (2001). Reduced expression of dentin sialophosphoprotein is associated with dysplastic dentin in mice overexpressing transforming growth factor-beta 1 in teeth. *Journal of Biological Chemistry* 276:11016–11020.
- Tsuboi T, Mizutani S, Nakano M, Hirukawa K, Togari A (2003). Fgf-2 regulates enamel and dentine formation in mouse tooth germ. *Calcified Tissue International* 73:496–501.
- Tzavlaki K, Moustakas A (2020). TGF- $\beta$  Signaling. *Biomolecules* 10.
- Unda FJ, Martin A, Hernandez C, Perez-Nanclares G, Hilario E, Arechaga J (2001). FGFs-1 and -2, and TGF beta 1 as inductive signals modulating in vitro odontoblast differentiation. *Advances in Dental Research* 15:34–37.
- Unda FJ, Martin A, Hilario E, Begue-Kirn C, Ruch JV, Arechaga J (2000). Dissection of the odontoblast differentiation process in vitro by a combination of FGF1, FGF2, and TGFbeta1. *Developmental Dynamics* 218:480–489.
- Unterbrink A, O'Sullivan M, Chen S, MacDougall M (2002). TGF beta-1 downregulates DMP-1 and DSPP in odontoblasts. *Connective Tissue Research* 43:354–358.
- van Amerongen R, Nusse R (2009). Towards an integrated view of Wnt signaling in development. *Development (Cambridge, England)* 136:3205–3214.
- Veis A, Goldberg M (2014). Pulp Extracellular Matrix. In: The Dental Pulp. Goldberg M, editor. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, pp. 35–46.
- Wang FM, Hu T, Tan H, Zhou XD (2006). p38 Mitogen-activated protein kinase affects transforming growth factor-beta/Smad signaling in human dental pulp cells. *Molecular & Cellular Biochemistry* 291:49–54.
- Widbiller M, Bucchi C, Rosendahl A, Spanier G, Buchalla W, Galler KM (2019a). Isolation of primary odontoblasts: Expectations and limitations. *Australian Endodontic Journal: the Journal of the Australian Society of Endodontology* 019:378-387.
- Widbiller M, Eidt A, Lindner SR, Hiller KA, Schweikl H, Buchalla W et al. (2018). Dentine matrix proteins: isolation and effects on human pulp cells. *International Endodontic Journal* 51:e278-e290.
- Widbiller M, Schweikl H, Bruckmann A, Rosendahl A, Hochmuth E, Lindner SR et al. (2019b). Shotgun Proteomics of Human Dentin with Different Prefractionation Methods. *Scientific Reports* 9:4457.
- Yamakoshi Y (2008). Dentin Sialophosphoprotein (DSPP) and Dentin. *Journal of Oral Biosciences* 50:33–44.
- Yamauchi Y, Cooper PR, Shimizu E, Kobayashi Y, Smith AJ, Duncan HF (2020). Histone Acetylation as a Regenerative Target in the Dentine-Pulp Complex. *Frontiers in Genetics* 11:1.

- Yianni V, Sharpe PT (2019). Perivascular-Derived Mesenchymal Stem Cells. *Journal of Dental Research* 98:1066–1072.
- Yoshida S, Wada N, Hasegawa D, Miyaji H, Mitarai H, Tomokiyo A et al. (2016). Semaphorin 3A Induces Odontoblastic Phenotype in Dental Pulp Stem Cells. *Journal of Dental Research* 95:1282–1290.
- Yoshioka S, Takahashi Y, Abe M, Michikami I, Imazato S, Wakisaka S et al. (2013). Activation of the Wnt/beta-catenin pathway and tissue inhibitor of metalloprotease 1 during tertiary dentinogenesis. *Journal of Biochemistry* 153:43–50.
- Yu C, Abbott PV (2007). An overview of the dental pulp: its functions and responses to injury. *Australian Dental Journal* 52:4-16.
- Yu T, Klein OD (2020). Molecular and cellular mechanisms of tooth development, homeostasis and repair. *Development (Cambridge, England)* 147:dev184754.
- Yumoto H, Hirao K, Hosokawa Y, Kuramoto H, Takegawa D, Nakanishi T et al. (2018). The roles of odontoblasts in dental pulp innate immunity. [Review]. *Japanese Dental Science Review* 54:105–117.
- Yun CY, Choi H, You YJ, Yang JY, Baek JA, Cho ES (2016). Requirement of Smad4-mediated signaling in odontoblast differentiation and dentin matrix formation. *Anatomy & cell biology* 49:199–205.
- Zhai Y, Yuan X, Zhao Y, Ge L, Wang Y (2020). Potential Application of Human beta-Defensin 4 in Dental Pulp Repair. *Frontiers in Physiology* 11:1077.
- Zhan C, Huang M, Yang X, Hou J (2020). Dental nerves: a neglected mediator of pulpitis. *International Endodontic Journal* 020:85–99.
- Zhang H, Wang J, Deng F, Huang E, Yan Z, Wang Z et al. (2015). Canonical Wnt signaling acts synergistically on BMP9-induced osteo/odontoblastic differentiation of stem cells of dental apical papilla (SCAPs). *Biomaterials* 39:145–154.
- Zhang YE (2017). Non-Smad Signaling Pathways of the TGF- $\beta$  Family. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 9:a022129.
- Zhao Y, Yuan X, Liu B, Tulu US, Helms JA (2018). Wnt-Responsive Odontoblasts Secrete New Dentin after Superficial Tooth Injury. *Journal of Dental Research* 97:1047–1054.
- Zoch ML, Clemens TL, Riddle RC (2016). New insights into the biology of osteocalcin. *Bone* 82:42–49.

## **8. Danksagung**

An dieser Stelle möchte ich allen danken, die mir mein Studium und die Vollendung meiner Dissertation ermöglichten.

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Helmut Schweikl, für die Möglichkeit unter seiner Betreuung diese Promotionsarbeit anfertigen zu können, für seine stete Hilfsbereitschaft, alle Hinweise, Ratschläge sowie inspirierenden Gespräche und die freundliche Arbeitsatmosphäre.

Der Fakultät für Medizin der Universität Regensburg danke ich für die Zulassung zu Promotion als externe Promovendin.

Herrn Dr. Helge Knüttel danke ich für die systematische Suchstrategie sowie die Einweisung in das Literaturverwaltungsprogramm Citavi.

Herrn Prof. Dr. Rosentritt, Poliklinik für Zahnärztliche Prothetik, danke ich für das Zweitgutachten zu meiner Arbeit.

Nicht zuletzt danke ich meinen Eltern, die mir das Studium der Zahnmedizin ermöglichten und mich jederzeit unterstützen, sowie meinem Ehemann Leo, der mir viel Verständnis und Geduld entgegenbrachte und mir die notwendige Ruhe und Sicherheit für die Erstellung dieser Arbeit gab.

Zum Abschluss richte ich meinen Dank an Gott, der durch seinen Segen und sein Wirken diese Arbeit erst gelingen ließ.