

Tania Alejandra Molina Carvajal

Dr. med dent.

Modulation der Topographie von Molekülen des Fokal-Adhäsions-Komplexes und der Aktivität der Fokal-Adhäsions-Kinase in primären humanen Parodontal-Fibroblasten nach mechanischer Kraftapplikation

Geboren am 06. 05. 1970 in La Serena / Chile

Reifeprüfung am 15. 12. 1986 in La Serena / Chile

Studiengang der Fachrichtung Zahnmedizin von WS 92/93 bis SS 1998

Physikum am 07. 08. 1995 an der Universität Heidelberg

Staatsexamen am 29. 07. 1998 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Kieferorthopädie

Doktormutter: Frau Prof. Dr. med. dent. Gerda Komposch

Das Parodontium ist das Gewebe, das dem Zahn seinen Halt verleiht. Es wird gebildet durch das Parodontale Ligament, den Alveolarknochen, das Zement und einem Teil der Gingiva. Diese Komponenten spielen bei der kieferorthopädischen Zahnbewegung eine Rolle. Um einen Zahn innerhalb des Alveolarknochens zu bewegen, werden Kräfte auf die Zähne ausgeübt, die als Zug oder Druck auf das Parodontium übertragen werden. Um den Erfolg klinischer Behandlungsmethoden - in diesem Fall der orthodontischen Zahnbewegungsteigern zu können, ist die Kenntnis der biologischen Eigenschaften der Zellen des Parodontiums von großer Bedeutung. Vor allem für die Kieferorthopädie ist dabei das Wissen um ihr Verhalten auf extrazelluläre physikalische Reize wie z.B. mechanische Kräfte von essentieller Bedeutung.

Generell ist über die Reaktion dieser Zellen auf mechanische Kräfte während der orthodontischen Zahnbewegung wenig bekannt. Daher sind die molekularen Mechanismen, die bei der Umsetzung der mechanischen Kräfte in biochemische Reaktionen eine Rolle

spielen, größtenteils noch ungeklärt. Eines der Ziele der vorliegenden Arbeit war es, die aus dem humanen Parodontium isolierten und kultivierten PDL-Fibroblasten hinsichtlich ihrer potentiellen osteoblastären Eigenschaften biochemisch zu charakterisieren. Weiterhin wollten wir die Signaltransduktionsmechanismen, die nach mechanischer Reizung der Zellen ablaufen, untersuchen. Hierfür etablierten wir primäre PDL-Fibroblasten aus Gewebeproben.

Fokalkontakte sind die strukturelle Verbindung zwischen Zellen und extrazellulärer Matrix (ECM) und dienen der Transduktion mechanischer Signale in das Zellinnere. In Fokalkontakten führt die Bindung von aktivierten $\beta 1$ -Integrin an die ECM zur Aktivierung der Fokal-Adhäsions-Kinase (FAK/p125^{FAK}). Ein anderes Ziel unserer Untersuchung war es zu analysieren, ob kieferorthopädisch-mechanische Kräfte in primären humanen PDL-Fibroblasten zu Änderungen in der Immunlokalisation von Fokalkontakt-Komponenten führen und ob es zu Unterschieden im Aktivierungszustand und der Quantität von FAK/p125^{FAK} kommt.

Für diese Untersuchungen wurden mechanische, kieferorthopädisch-relevante Kräfte *in vitro* simuliert. Die PDL-Fibroblasten wurden einer 2,5%igen Dehnung ausgesetzt. An Kulturen gedehnter und ungedehnter Zellen wurden neben der Morphologie mittels indirekter Immunfluoreszenz die Komponenten von Fokalkontakten (i) Integrin- $\beta 1$ -aktiv, (ii) Paxillin, (iii) FAK/p125^{FAK} sowie (iv) Phosphotyrosin, (v) der Zytoskelettpartner Aktin und (vi) als Strukturmarker das Intermediärfilament Vimentin untersucht. Die Erfassung des Aktivierungszustandes und der Quantität von FAK/p125^{FAK} erfolgte im Immunblot. Dehnungsbedingt kam es in PDL-Kulturen zu einer Elongation der Zellen in Richtung der Dehnungsachse, die durch die Vimentinexpression reflektiert wurde. Generell zeigten alle untersuchten Fokalkontakt-Komponenten sowie Phosphotyrosin im Dehnungsverlauf eine relative Kolokalisation. Diese ließ dehnungs-induziert eine Umorganisation von einer präferenziell peripher-perinukleären zu einer zunehmend zytoplasmatischen Immunlokalisation der Komponenten entlang der Dehnungsachse erkennen. Darüberhinaus war eine zunehmende Abundanz von Aktin-Streßfasern im Zytoplasma beobachtbar. Die dehnungsinduzierten topographischen Veränderungen waren bei vergleichbarer Quantität mit einer Modulation der Aktivierung von FAK/p125^{FAK} assoziiert, die nach 60min. sehr stark war und zwischen 24 und 72 Std. zunehmend nachließ.

Die Ergebnisse zeigen, daß mechanische Kräfte in humanen PDL-Zellen zu einer zeitabhängigen Veränderung in der Lokalisation von Komponenten der Fokalkontakte, sowie einer Modulation der FAK/p125^{FAK}-Aktivierung führen. Diese Veränderungen reflektieren möglicherweise eine transiente Instabilität von Fokalkontakten im Rahmen ihrer Umorganisation, die möglicherweise auch Einfluß auf den Phänotyp von PDL-Fibroblasten bei orthodontischen Knochenumbauprozessen haben kann.

Weiterhin war von Interesse, ob Zellen des Parodontiums auf andere chemisch modulierende Agentien der Tyrosinphosphorylierung reagieren. Dafür behandelten wir die Zellen mit Genistein, einer Substanz, die die aktive Tyrosinphosphorylierung blockiert. Nach der Genistein Behandlung wurden die Zellen durch indirekte Immunfluoreszenz hinsichtlich der genannten Moleküle des Fokal-Adhäsions-Komplexes untersucht. Der Verlust der peripheren Abundanz von Phosphotyrosin sowie der peripheren Expression von Fokal-Adhäsions-Komplex-Komponenten ist in Keratinozyten und PDL-Fibroblasten gleichermaßen zu beobachten. Zusammen mit den morphologischen Veränderungen legt er die zentrale Rolle der Tyrosinphosphorylierung, untem anderen von FAK/p125^{FAK}, für die Zelladhäsion nahe.

Wenn die im Rahmen der vorliegenden Arbeit identifizierten Komponenten tatsächlich an entsprechenden *in vivo* Prozessen beteiligt sind, dann könnte man sich für die Zukunft die Applikation entsprechender chemischer Substanzen vorstellen, welche die beschriebenen Komponenten aktivieren oder inaktivieren könnten. So wäre beispielweise denkbar, daß entsprechende Substanzen, die in den Parodontalspalt eingebracht wurden, die Induktion von Matrix und Knochenumbauprozessen über den beschriebenen Signaltransduktionsweg in PDL-Zellen fördern bzw. hemmen.