

■ W. H. Arnold¹

Mikromorphologie und Molekularbiologie der Dentinogenese und Amelogenese*

Zähne sind die ältesten mineralisierten Gewebe in der Evolution der Wirbeltiere. Die Odontogenese unterliegt sehr komplexen genetischen, biochemischen und physiologischen Regulationsmechanismen, die zur Bildung der härtesten Gewebe – nämlich von Dentin und Zahnschmelz – führen. Die biologische Mineralbildung ist eine zelluläre Leistung und geht immer von einer organischen Grundsubstanz aus, die nachfolgend zur Kristallisation von anorganischen Mineralien führt. Aus diesem Grund sind mit Ausnahme des Zahnschmelzes Biomineralien immer Verbundwerkstoffe aus organischem Material und anorganischen Kristallen. Ein genaues Verständnis der Vorgänge bei der Biomineralisation hat weitreichende Konsequenzen für die Entwicklung von therapeutischen Konzepten in der Zahnmedizin. Im nachfolgenden Artikel soll der derzeitige Stand der Forschung auf dem Gebiet der Biomineralisation von Dentin und Schmelz zusammengefasst werden.

Schlüsselwörter: Biomineralisation, Dentin, Schmelz, Entwicklung, Odontogenese, Dentinogenese, Amelogenese

Biom mineralization. Teeth are the oldest mineralized tissues in the vertebrate evolution. Odontogenesis is controlled by very complex genetically, biochemical and physiological regulatory mechanisms and results in the production of the hardest tissues namely dentin and enamel. Biological mineralization is a cellular activity, which always starts with the production of an organic matrix that subsequently mineralizes. Therefore, with the exception of dental enamel, biominerals are always composite materials containing organic fibers and inorganic crystals. A detailed understanding of the mechanisms of biomineralization may help to develop new therapeutic concepts in dental medicine. The following article summarizes the current knowledge resulting from recent research in biomineralization of dentin and enamel.

Keywords: biomineralization, dentin, enamel, development, odontogenesis, dentinogenesis, amelogenesis

1 Einleitung

Zähne sind die Hartgewebsbildungen, die in der Evolution der Vertebrata zuerst bei den Paraconodata/Euconodata auftauchen, noch vor der Bildung der ersten Skelettknochen [38]. Dentin und Schmelz sind das Produkt von komplexen Biomineralisationsvorgängen, die zu den ältesten Leistungen belebter Organismen zählen und schon bei Einzellern

vorkommen, die in der Lage sind, Magnetit und andere eisenhaltige Mineralien zu bilden [44, 109].

Die Biomineralisationsprodukte der Vertebrata sind verschiedene Calciumphosphate, hauptsächlich aber Hydroxylapatit ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$), der den Hauptbestandteil von Dentin und Schmelz bildet. Calciumphosphate haben viele Eigenschaften, die sie zu idealen biologischen Mineralisationsprodukten machen, denn sie bilden sich unter physiologischen pH-Bedingungen bei normalem atmosphärischem Druck, physiologischen Temperaturen, und sie sind im leicht sauren Milieu gut löslich, eine extrem wichtige Eigenschaft für die biologische Bedeutung des Skeletts. Durch die leichte Löslichkeit der Calciumphosphate unterliegen sie im lebenden Organismus einem ständigen Stoffwechsel mit Abbauprozessen (Demineralisation) und Wiederaufbau (Remineralisation). Eine Störung dieses Ionengleichgewichts führt zu pathologischen Verhältnissen, wie z. B. die Karies das Ergebnis der Störung des Gleichgewichts zwischen De- und Remineralisation an der Schmelzoberfläche ist [47].

Die Frage, wie lebende Zellen in der Lage sind, anorganische Kristalle zu produzieren, beschäftigt die Wissenschaft seit langem, und obwohl auf diesem Gebiet in den letzten Jahrzehnten erhebliche Fortschritte erzielt wurden, sind noch lange nicht alle Fragen beantwortet. Detaillierte Kenntnisse über die Biomineralisation sind nicht nur von akademischem Interesse, sie haben auch allgemein zahnmedizinische Bedeutung, u. a. für eine Verbesserung der Osseointegration von Implantaten (z. B. durch Beschichtung der Implantate mit Calciumphosphat) sowie der regenerativen The-

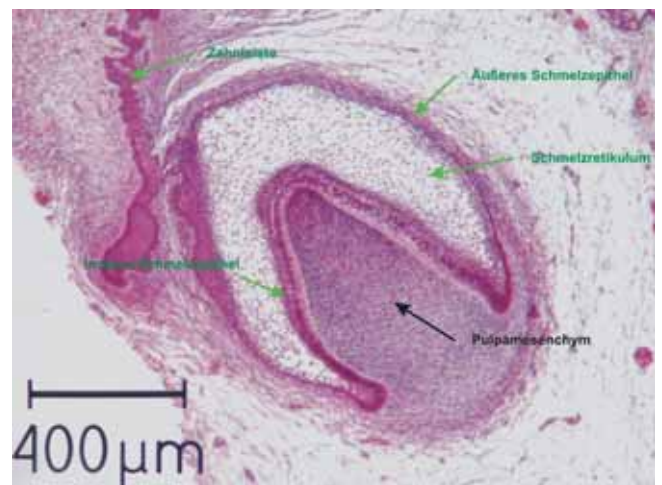


Abbildung 1 Histologischer Schnitt durch die Zahnanlage eines 6 Wochen alten menschlichen Embryos im Glockenstadium. Grün markiert sind die Derivate des Ektoderms, schwarz Derivate des Mesektoderms aus der Neuralleiste.

¹ Lehrstuhl für Anatomie, Fakultät für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde, Universität Witten/Herdecke (Direktor: Prof. Dr. W.H. Arnold)

* Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. Peter Gängler mit den besten Wünschen zum 65. Geburtstag gewidmet.

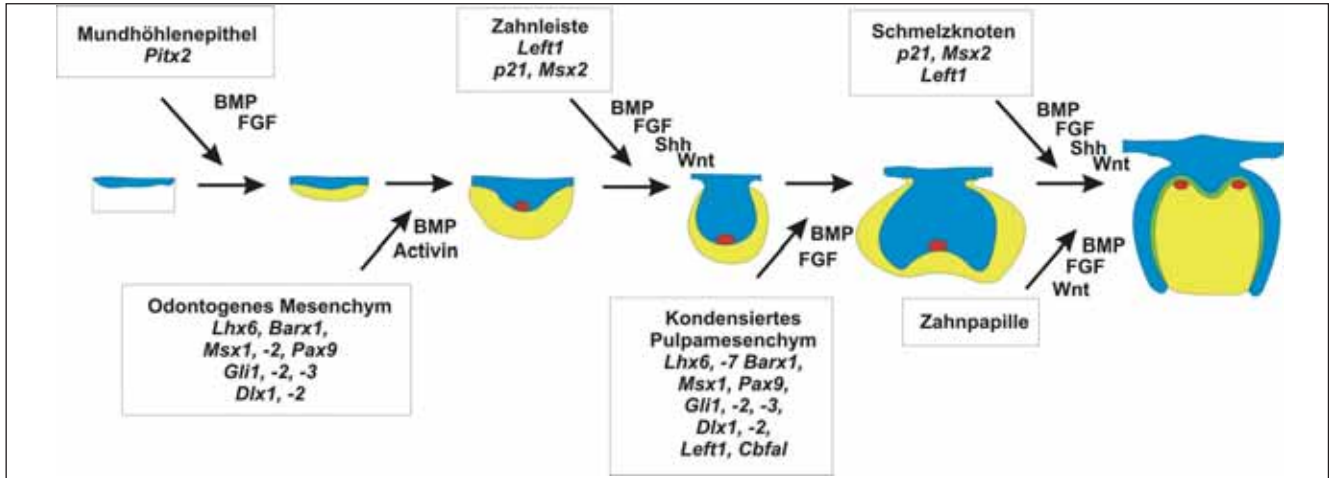


Abbildung 2 Zusammenspiel der unterschiedlichen Induktoren und Gene (kursiv) bei der Zahnentwicklung (modifiziert nach Theleff aus Berkowitz [13]).

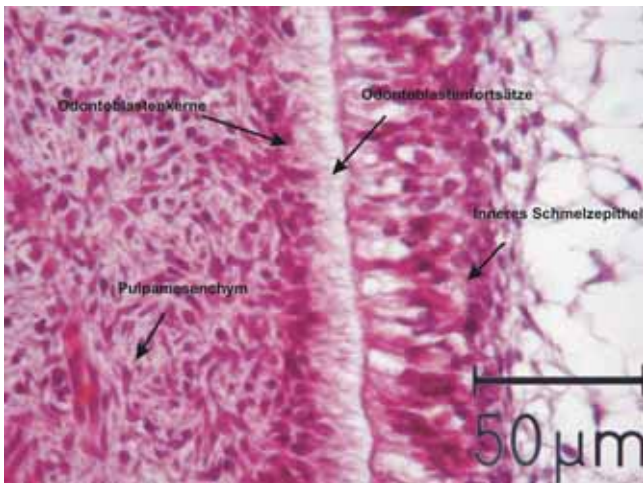


Abbildung 3 Differenzierung der Odontoblasten auf der Innenseite des Schmelzepithels aus dem Pulpamesenchym.

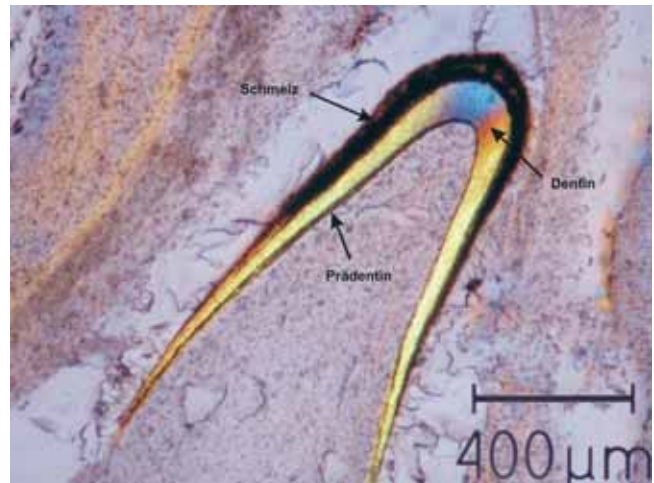


Abbildung 4 Polarisationsmikroskopische Aufnahme der Zahnanlage von Zahn 72 eines menschlichen Fetus im Alter von 16 Wochen mit beginnender Mineralisation.

rapie in der Parodontologie. Auch in der konservierenden Zahnheilkunde spielt die Biomineralisation eine nicht zu unterschätzende Rolle, denn der natürliche Reaktionsmechanismus der Odontoblasten – zur Bildung von intratubulärem Dentin und Reizdentin als Antwort auf einen exogenen Reiz – zum Schutz der Pulpa kann durch die Applikation von Dentinbonding- oder Füllungsmaterialien wie Komposit eventuell erheblich verändert werden oder ganz unterbleiben. Für die Entwicklung von wirksamen Prophylaxemaßnahmen in der Kariesprävention ist die detaillierte Kenntnis der De- und Remineralisationsvorgänge an der Schmelzoberfläche unerlässlich.

Im nachfolgenden Artikel sollen der aktuelle Kenntnisstand über die Biomineralisation von Dentin und Schmelz zusammengefasst und Konsequenzen für die Zahnheilkunde aufgezeigt werden.

2 Odontogenese

Embryonal entstehen Schmelz und Dentin aus zwei verschiedenen Keimblättern. Schmelz geht aus dem ektodermalen Mundhöhlenepithel hervor, während Dentin aus dem

Mesektoderm der Neuralleiste entsteht. Durch die Invagination des Mundhöhlenektoderms in das darunter liegende mesektodermale Bindegewebe (Ektomesenchym) entstehen die Zahnknospen, die sich in das Schmelzepithel und das Pulpamesenchym differenzieren (Abb. 1). Zwischen beiden Geweben entwickelt sich eine sehr komplexe, streng genetisch kontrollierte Induktionskaskade, die wechselseitig die Differenzierung von Dentin und Schmelz bewirkt (Abb. 2). Das innere Schmelzepithel induziert durch die Freisetzung von *Bone Morphogenic Protein* (BMP) und *Fibroblast Growth Factor* (FGF) eine Verdichtung des darunter liegenden Ektomesenchyms und die Differenzierung der angrenzenden Mesenchymzellen zu Präodontoblasten (Abb. 3). Diese setzen ihrerseits wiederum Wachstumsfaktoren frei, die die Differenzierung der Ameloblasten aus dem inneren Schmelzepithel induzieren. Die Mineralisierung der Zahnhartsubstanz beginnt mit der Bildung von Prädentin aus den Präodontoblasten, deren apikaler Zellfortsatz sich mit der mineralisierenden Dentinschicht verlängert und zum Odontoblastenfortsatz des reifen Odontoblasten differenziert. Der Odontoblastenfortsatz verlängert sich durch die Dickenzunahme des Dentins ständig weiter, bleibt aber im Dentintu-

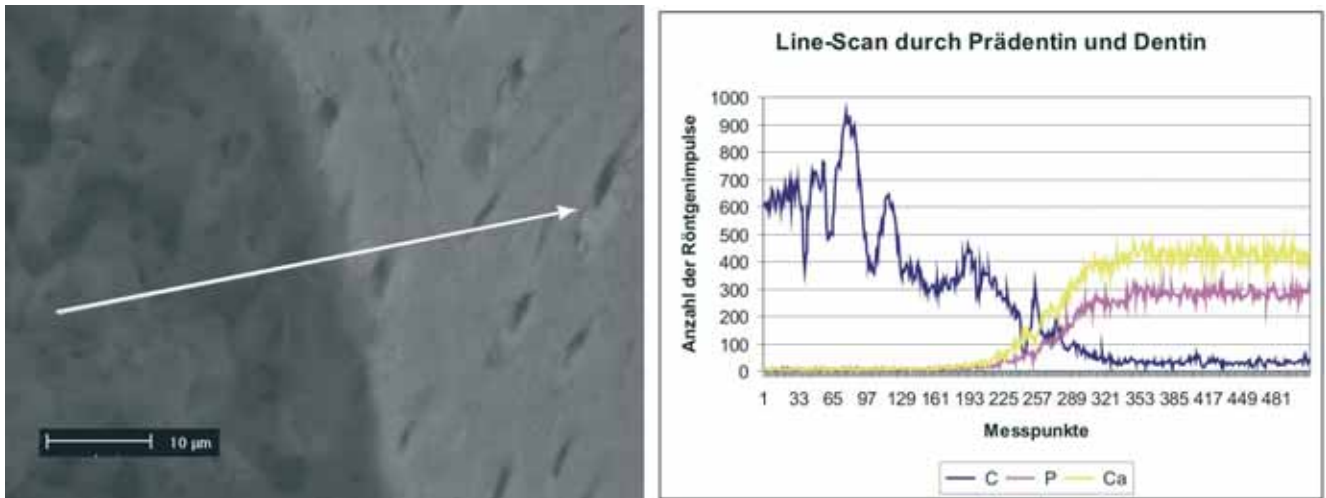


Abbildung 5 EDX Line-Scan durch das Prädentin und Dentin der in Abb. 4 gezeigten Zahnanlage. Die Calcium- und Phosphatmenge nimmt im Prädentin in Richtung des mineralisierten Dentins rasch zu, während die Kohlenstoff-Konzentration abnimmt. Der Pfeil im REM-Bild markiert die Leserichtung des Scans.

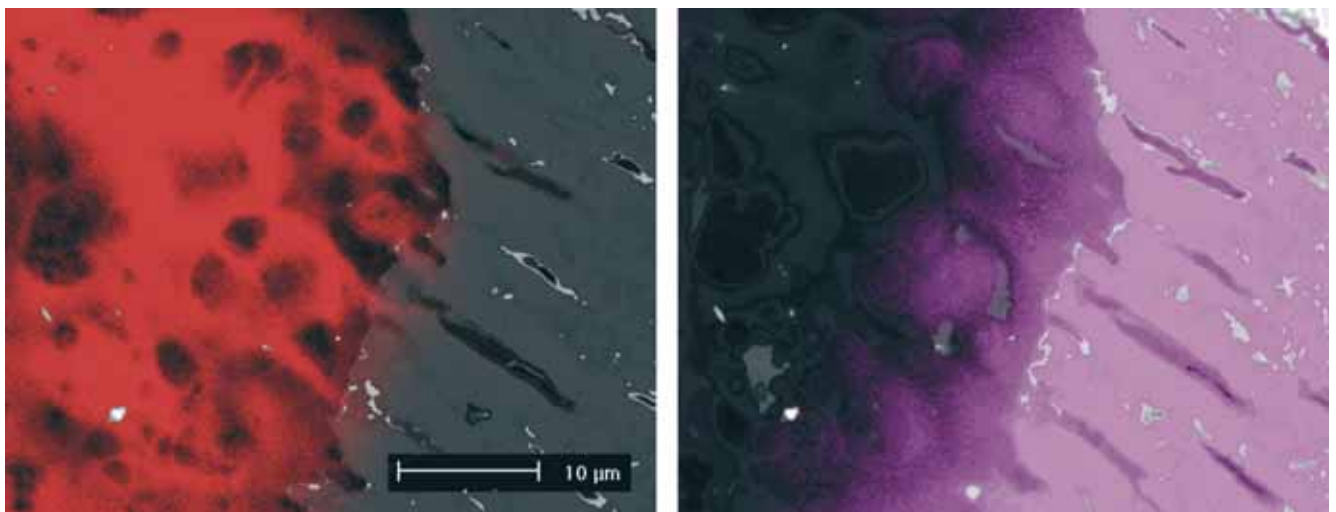


Abbildung 6 Überlagerungsbild einer REM-Aufnahme (Grautöne) und dem entsprechenden EDX Element-Mapping von Kohlenstoff (a, rot) und Calcium (b, lila) in Prädentin und Dentin. Der Kohlenstoffnachweis nimmt zum Dentin hin ab, ist aber im mineralisierendem Dentin noch deutlich zu erkennen. Der Calciumnachweis ist sowohl in der Prädentinmatrix wie auch im Randsaum der Dentintubuli sowie im mineralisierten Dentin positiv.

bulus liegen und ist zeitlebens in der Lage, weiter Prädentin abzuscheiden und Dentin zu bilden. Mit der Mineralisierung des Prädentins zu Dentin beginnen die Ameloblasten mit der Sekretion der Schmelzmatrix auf der Außenseite des Dentins, so dass der Schmelz das Dentin kappenartig bedeckt (Abb. 4). Die Mineralisation des Dentins folgt dem weiter unten beschriebenen Muster der Hartgewebebildung unter Einbeziehung der Matrixvesikel, der kollagenen Fasern und der nicht kollagenen Proteine. Das pulpanahe Prädentin enthält nur eine geringe Konzentration an Calcium und Phosphat. Die Calcium- und Phosphatmenge im Prädentin nimmt zur Mineralisationsfront hin langsam zu, um dann in der Front abrupt anzusteigen (Abb. 5 und 6). Zur Dentinmitte reißt das mineralisierte Dentin aus und die Calcium- und Phosphatmenge steigt noch etwas an (Tab. 1). Die Mechanismen, die zu der plötzlichen Änderung des nur wenig mineralisierten Prädentins zu dem vollständig mineralisierten Dentin führen, sollen unten erörtert werden. Die Amelogenese ist ein extrem komplexer Prozess, der zur Bildung der vollständig mineralisierten Schmelzschicht auf der Zahnkrone führt. Sie verläuft anders als die Dentinogenese, da die zellulären Bestandteile nicht in den Schmelz integriert wer-

den, so dass sich Schmelz und Dentin strukturell unterscheiden.

3 Calciumphosphate

Obwohl in der wissenschaftlichen Literatur das anorganische Mineral, welches das Dentin und den Schmelz bildet, immer als Hydroxylapatit bezeichnet wird, bildet dieser nur den Hauptbestandteil. Grundsätzlich kommt Hydroxylapatit weder im Dentin noch im Schmelz in reiner Form vor, sondern es handelt sich immer um einen Mischkristall aus verschiedenen Calciumphosphaten [39]. Diese Phosphate unterscheiden sich in ihrem Ca/P-Verhältnis, der Kristallstruktur und ihrer Säurelöslichkeit (Tab. 2), wobei die Löslichkeit mit der Zunahme des Ca/P-Verhältnisses abnimmt.

Monocalciumphosphat-Anhydrid wird in der Medizin als Komponente in einigen Calciumphosphatzementen verwendet [41, 42, 75, 76]. Dicalciumphosphat-Dihydrat (Brushit) kommt im Zahnstein vor und wurde als intermediäre Phase bei der Knochenbildung beschrieben [67]. Es wird in Calciumphosphatzementen verwendet und zusammen mit Fluoriden zur Kariesprophylaxe in Zahnpasten eingesetzt [33, 46,

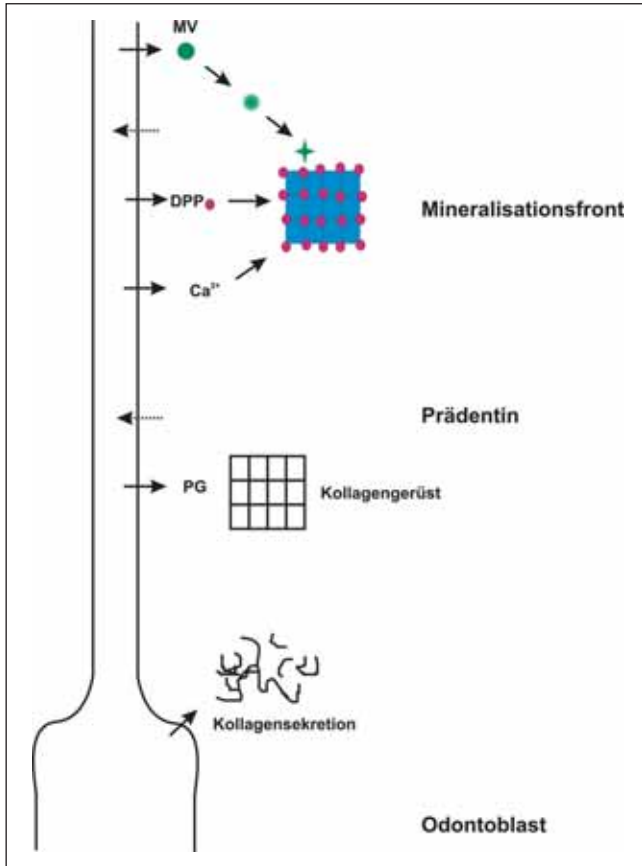


Abbildung 7 Stark vereinfachte schematische Darstellung der Mineralisation von Dentin. Die Kollagensekretion findet im Bereich der Zellkörper der Odontoblasten statt und bildet die Prädentinmatrix. Durch den Einfluss der Proteoglykane (PG), die im mittleren Abschnitt der Odontoblastenfortsätze sezerniert werden, werden die Kollagenfasern zum Fasergerüst geordnet. Stoffwechselprodukte des Umbaus der Matrixproteine werden in den Odontoblastenfortsätzen rückresorbiert (gestrichelte Pfeile). Im Bereiche der Mineralisationsfront werden Dentin-Phosphoprotein (DPP) und Matrixvesikel (MV) von den Odontoblastenfortsätzen freigesetzt. DPP wird in das Kollagengerüst gelagert und bewirkt durch seine hohe Affinität zum Calcium die Initialisierung der Apatitkristallbildung entweder direkt aus gelöstem Ca^{2+} des Prädentins, oder durch Einlagerung von Apatit-Nanokristallen aus den Matrixvesikeln.

| | C | Ca | P | Ca/P |
|--------------------------|-------------|-------------|------------|------------|
| Prädentin | 76,9 ± 11,7 | 7,8 ± 10,05 | 2,9 ± 2,8 | 2,5 ± 0,85 |
| Mineralisierendes Dentin | 35,6 ± 20,1 | 30,7 ± 12,4 | 14,1 ± 5,1 | 2,1 ± 0,33 |
| Dentin | 21,5 ± 6,4 | 36,6 ± 7,2 | 17,3 ± 2,0 | 2,1 ± 0,21 |

Tabelle 1 Elementgehalt in Gewichtsprozent in Prädentin, mineralisierendem Dentin und Dentin. Der absolute Gehalt von Calcium und Phosphor ist in allen drei gemessenen Regionen unterschiedlich, während das Ca/P-Verhältnis nur im Prädentin höher ist.

59, 110]. Octacalciumphosphat ist ein wichtiges Zwischenprodukt bei der Biomineralisation [62] und wurde als Bestandteil von Zahnstein nachgewiesen [66]. Da reiner Hydroxylapatit in biologischen Systemen nicht vorkommt, variieren die Angaben zur Zusammensetzung von Knochen, Dentin und Schmelz und sind immer gemittelte Werte. Daher erreicht das Ca/P-Verhältnis für Knochen, Dentin und Schmelz nie den stöchiometrischen Wert von 1,67 für

Hydroxylapatit. Die Zusammensetzung von Knochen, Dentin, Schmelz und reinem Hydroxylapatit ist in Tabelle 3 zusammengefasst.

4 Kollagen

Die biologische Mineralbildung des Dentins geht immer von einer Grundsubstanz aus, die von den Odontoblasten sezerniert wird. Kollagene Fasern sind die Hauptbestandteile der extrazellulären Matrix, wobei es sich beim Dentin fast ausschließlich um Kollagen Typ I handelt [30, 114]. Neben dem Kollagen spielen aber auch die nichtkollagenen Matrixproteine eine wesentliche Rolle in der Biomineralisation [15, 18, 114].

Kollagen Typ I ist das häufigste und wichtigste Matrixprotein in mineralisiertem Gewebe. Es besteht aus einer Aggregation von helikal angeordneten Kollagenmolekülen, die in axialer Richtung um $D = 67 \text{ nm}$ gegeneinander verschoben sind, um eine maximale hydrophobe und elektrostatische Wechselwirkung mit den Nachbarmolekülen zu erreichen. Die benachbarten Kollagenmoleküle bilden Mikrofibrillen mit einer Dicke von 4 nm aus. Am Ende der Moleküle treten in regelmäßigen Abständen von 67 nm Lücken mit einer Länge von $0,6 D$ zwischen aufeinander folgenden Kollagenmolekülen auf, in die das Kontrastmittel für die Elektronenmikroskopie eingelagert wird, was die typische Querstreifung der Kollagenfasern verursacht [53]. Durch die versetzte Anordnung der Kollagenmoleküle und die Lücken am Ende entstehen zwischen den Mikrofibrillen Überlappungszonen mit einer Länge von $0,4 D$. Zur Stabilisierung werden die Kollagenmoleküle durch eine Kondensation von Allysine mit Lysin zu einer Schiffsbasis, oder durch eine Aldol-Kondensation miteinander quervernetzt. Durch eine Amadori-Umlagerung wird diese Verbindung zu einem säureresistenten Produkt. Deswegen sind die kollagenen Fasern des Dentins nicht säurelöslich, im Gegensatz zum mineralischen Apatit.

In dreidimensionaler Anordnung ergeben sich zwischen den Mikrofibrillen an den Überlappungszonen Mikrokanälchen von 2 nm Durchmesser, in die Calcium- und Phosphationen einströmen und Kristallisationskerne für Calciumphosphat zwischen den Mikrofibrillen ausbilden können, ohne dabei die Struktur der Mikrofilamente zu zerstören [54, 84]. Die Mineralisation des Apatits erfolgt entlang der Kollagenfibrillen an deren Außenseite, so dass die c-Achse der Apatitkristalle parallel zu den Kollagenfasern verläuft [114]. Damit ergibt sich letztendlich für das Dentin ein klassischer Verbundwerkstoff, der aus den organischen kollagenen Fasern besteht, die ihm die Biegefestigkeit verleihen, und dem anorganischen Apatit, der für die Härte verantwortlich ist. Die kollagenen Fasern bilden dabei das Grundgerüst, welches die Orientierung der Apatitkristalle festlegt und damit die Struktur des Hartgewebes bestimmt. Eine direkte Mineralisation der kollagenen Fasern ist nicht möglich, vielmehr bedarf es weiterer Komponenten – nämlich der Matrixvesikel aus den Odontoblastenfortsätzen – zur Initiierung der Kristallisation der nichtkollagenen Proteine und weiterer Ionen zur Steuerung der Biomineralisation.

5 Matrixvesikel

Matrixvesikel sind runde bis ovale Extrusionen des apikalen Zytoplasmas und der Zellmembran der Odontoblastenfortsätze mit einem Durchmesser von $30\text{--}300 \text{ nm}$, die kein Kollagen enthalten. Ihre Funktion bei der Dentinbiosynthese ist äußerst komplex. Die Phospholipidmembran der Matrixvesikel enthält mehrere Enzyme zur Regulation der Calcium-

phosphatbildung. Die alkalische Phosphatase ist an die Oberfläche der Membran gebunden und für die Ablagerung von Calciumphosphat verantwortlich [60]. Neben der alkalischen Phosphatase konnten auch die Adenosinmonophosphoesterase (AMPase) und die anorganische Pyrophosphatase (PPiase) [5] sowie die Ca²⁺-ATPase [4] nachgewiesen werden. Die AMPase und PPiase setzen Phosphationen aus AMP und anorganischem Pyrophosphat (PPi) für den Einbau in Calciumphosphat frei, während die Ca²⁺-ATPase die initiale Mineralisation reguliert, indem es PPi für die Hydrolyse zur Verfügung stellt [7]. Neben den Phosphatasen wurden weitere Membranproteine in der Vesikelmembran nachgewiesen. Dazu gehören das Annexin V [48, 65, 92] und der Na-abhängige Phosphattransporter [78, 79]. Annexin V ist ein nach innen gerichteter Calciumkanal und erhöht die Ca²⁺-Ionenkonzentration in den Matrixvesikeln, während der Na-abhängige Phosphattransporter die Phosphationenkonzentration in den Vesikeln erhöht und damit die Mineralisation fördert [7]. Die Mineralisation der Matrixvesikel gliedert sich in zwei Phasen: In der ersten Phase führt die Zunahme der Calcium- und Phosphationenkonzentration in den Matrixvesikeln zunächst zur Bildung von amorphen Calciumphosphat [81, 82], aus dem Octacalciumphosphat entsteht. Octacalciumphosphat wird dann zu Nanokristallen aus Hydroxylapatit [7, 10, 56, 85] umgewandelt, die sich nadelförmig vergrößern und zur Auflösung der Vesikelmembran führen. In der zweiten Phase wachsen die freier werdenden Nanokristalle in Abhängigkeit von der extrazellulären Ca²⁺- und PO₄³⁻-Konzentration, dem pH-Wert und den nichtkollagenen Matrixproteinen, die das Kristallwachstum kontrollieren. Die extravasikulär proliferierenden Hydroxylapatitkristalle lagern sich den Kollagen-Mikrofibrillen an, die die weitere Wachstumsrichtung der Apatitkristalle bestimmen und schließlich vollständig von Apatit umgeben werden.

Bereits 1972 haben Slavkin et al. [97] vermutet, dass Matrixvesikel auch als Träger für morphogenetische Signalmoleküle bei der Dentinogenese fungieren. Neuere Untersuchungen haben nachgewiesen, dass Matrixvesikel der Epiphysenfuge von Skelettknochen sowohl *Bone Morphogenic Proteins* (BMPs) [77] als auch Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) [36] enthalten. Sowohl BMPs als auch MMPs fördern die Mineralisierung von Knochen. Für das Dentin wurde dieser Nachweis allerdings noch nicht geführt.

6 Nichtkollagene Matrixproteine

Typ I-Kollagen bildet ein dreidimensionales Maschenwerk, in das nichtkollagene Matrixproteine eingelagert werden, die für die weitere Regulation des Kristallwachstums von Hydroxylapatit verantwortlich gemacht werden. Man nimmt heute an, dass die nichtkollagenen Matrixproteine die Biomineralisation regulieren [18, 64], indem sie die Mineralisation ent-

| Verbindung | Ca/P-Verhältnis | Formel | pH-Stabilitätsbereich |
|------------------------------------|-----------------|---|---------------------------|
| Monocalciumphosphat-Monohydrat | 0,5 | Ca(H ₂ PO ₄) ₂ x H ₂ O | 0,0-2,0 |
| Dicalciumphosphat-Dihydrat | 1,0 | CaHPO ₄ x 2 H ₂ O | 2,0-6,0 |
| Octacalciumphosphat | 1,33 | Ca ₈ (HPO ₄) ₂ (PO ₄) ₄ x 5H ₂ O | 5,5-7,0 |
| Amorphes Calciumphosphat | 1,2 – 2,2 | Ca _x (PO ₄) _y x nH ₂ O | |
| Calcium-defizitärer Hydroxylapatit | 1,5-1,67 | Ca _{10-x} (HPO ₄) _x (PO ₄) _{6-x} (OH) _{2-x} | 6,5-9,5 |
| Hydroxylapatit | 1,67 | Ca ₁₀ (PO ₄) ₆ (OH) ₂ | 9,5-12,5 |
| Tetracalciumphosphat | 2,0 | Ca ₄ (PO ₄) ₂ ^o | Nicht in wässriger Lösung |

Tabelle 2 Biologisch relevante Calciumphosphate; modifiziert aus Epfle [39]

| | Hydroxylapatit | Knochen | Dentin | Schmelz |
|-------------------------------|----------------|---------|--------|---------|
| Calcium (Gew. %) | 39,6 | 34,8 | 35,1 | 36,5 |
| Phosphor (Gew. %) | 18,5 | 15,2 | 16,9 | 17,7 |
| Ca/P | 1,67 | 1,71 | 1,61 | 1,63 |
| Natrium (Gew. %) | - | 0,9 | 0,6 | 0,5 |
| Magnesium (Gew. %) | - | 0,72 | 1,23 | 0,44 |
| Kalium (Gew. %) | - | 0,03 | 0,05 | 0,08 |
| Carbonat (Gew. %) | - | 7,4 | 5,6 | 3,5 |
| Fluorid (Gew. %) | - | 0,03 | 0,06 | 0,01 |
| Chlorid (Gew. %) | - | 0,13 | 0,01 | 0,30 |
| Pyrophosphat (Gew. %) | - | 0,07 | 0,10 | 0,02 |
| Anorganischer Anteil (Gew. %) | 100 | 65 | 70 | 97 |
| Organischer Anteil (Gew. %) | - | 25 | 20 | 1,5 |
| Wasser (Gew. %) | - | 10 | 10 | 1,5 |

Tabelle 3 Zusammensetzung humaner Hartgewebe im Vergleich zu Hydroxylapatit; modifiziert aus Epfle [39]

weder fördern oder hemmen. Entsprechend ihrer Herkunft können die nichtkollagenen Matrixproteine in verschiedene Gruppen unterteilt werden. Die erste Gruppe bilden die dentinspezifischen Matrixproteine, die nur in der extrazellulären Matrix des Prädentins vorkommen. Davon sind bisher drei bekannt: Das Dentin-Phosphoprotein (DPP), das Dentin-Matrixprotein 1 (DMP1) und das Dentin-Sialoprotein (DSP). Die zweite Gruppe bilden die knochenspezifischen Matrixproteine, zu denen das Osteocalcin (OCN) und das *Bone Sialoprotein* (BSP) gehören; und die dritte Gruppe bilden Matrixproteine, die auch in anderen, nichtmineralisierten Geweben, gebildet werden. Dazu gehören u. a. Wachstumsfaktoren, wie das *Bone Morphogenic Protein* (BMP), verschiedene Proteoglykane (PGs) und das Osteopontin (OPN) [31].

DPP ist mengenmäßig das häufigste Matrixprotein des Dentins. Es handelt sich um ein stark phosphoryliertes Protein mit einer hohen negativen Ladung, woraus eine große Affinität zum Calcium resultiert. Es wird angenommen, dass DPP in den Lücken der Kollagenmoleküle an die Fibrillen gebunden wird, damit die Calciumionenkonzentration zwischen den Kollagenfibrillen erhöht wird und so die Kristallisation des Hydroxylapatits initiiert werden kann [31]. Da sich DPP an die kristallografische 100-Fläche des wachsenden Apatitkristalls bindet, kann es die Form und Größe der Kri-

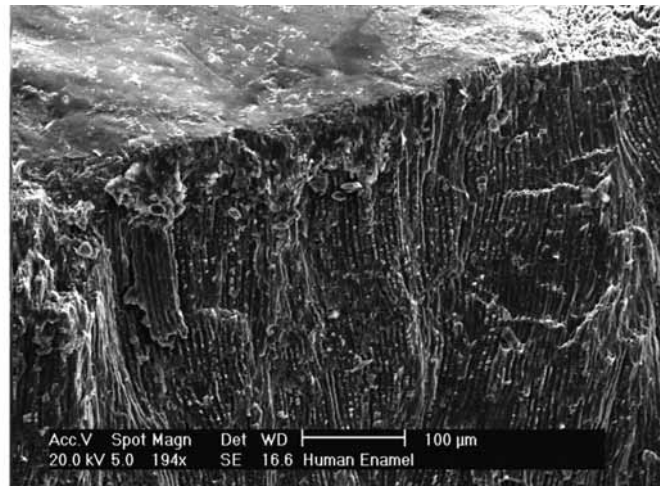
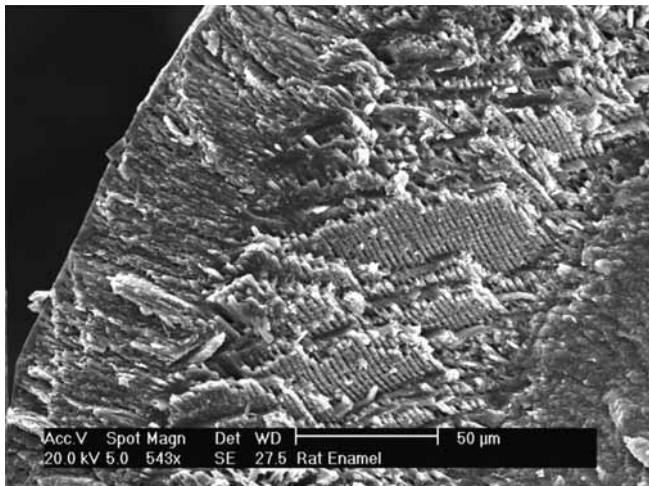


Abbildung 8a REM Aufnahme eines Gefrierbruchs vom Schmelz des Rattenschneidezahns. Die innere Schicht weist eine streng geometrische Anordnung der Apatitkristalle auf, in der äußeren Schicht sind die Schmelzprismen parallel senkrecht zur Oberfläche angeordnet.

Abbildung 8b REM-Aufnahme eines Gefrierbruchs des menschlichen Schmelzes mit parallel angeordneten Schmelzprismen, die senkrecht auf die Schmelzoberfläche treffen.

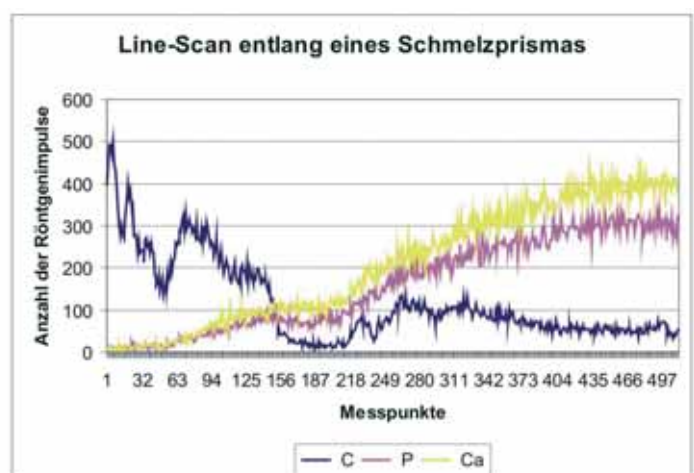
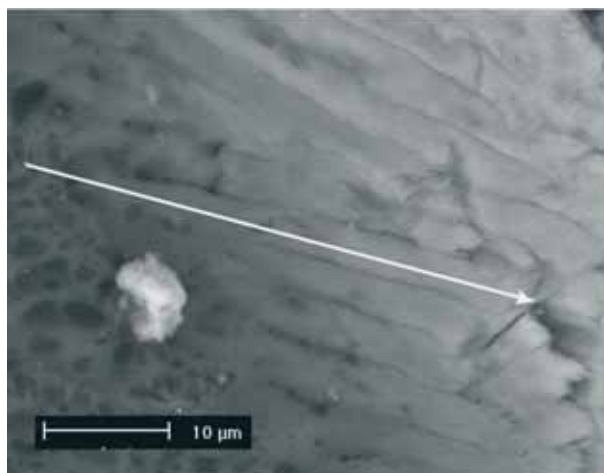


Abbildung 9 Line-Scan entlang eines mineralisierenden Schmelzprismas. Der Calcium- und Phosphatgehalt nimmt linear zu. Der Pfeil im REM-Bild markiert die Leserichtung des Scans.

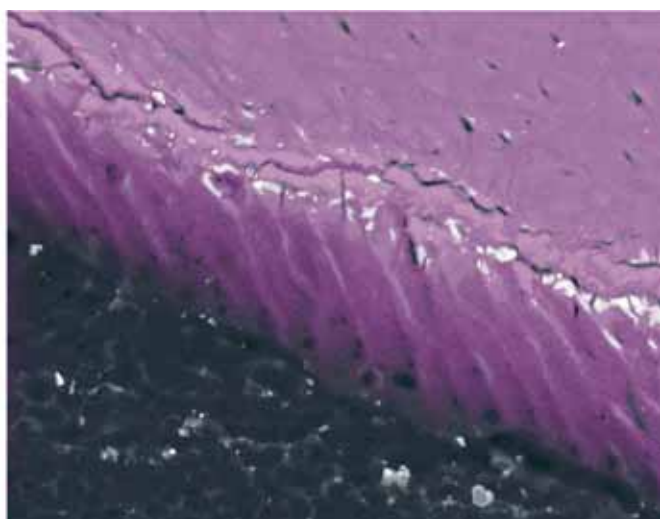
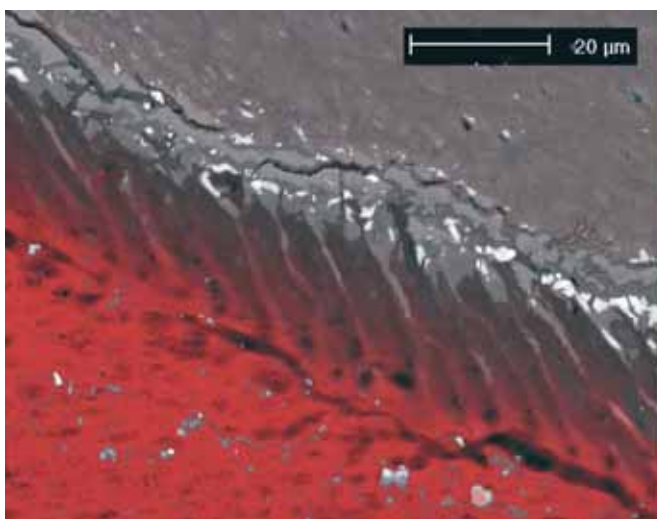


Abbildung 10 Überlagerungsbild einer REM-Aufnahme (Grautöne) und dem entsprechenden EDX Element Mapping im mineralisierenden Schmelz. a) Kohlenstoffnachweis (rot) in der organischen Schmelzmatrix. b) Calciumnachweis (lila) ausschließlich in den mineralisierten Schmelzprismen und angrenzendem Dentin.

stalle beeinflussen [45] und in höherer Konzentration das Kristallwachstum vermindern. DMP1 ist ebenfalls ein stark negativ geladenes Protein mit einer hohen Calciumaffinität. Es wird in sehr geringer Konzentration ausschließlich von Odontoblasten gebildet [49, 50]. Seine Funktion ist noch weitgehend unklar. Es könnte jedoch – wie das DPP – bei der Initiierung der Kristallbildung beteiligt sein. Beim DSP handelt es sich um ein saures Glycoprotein, das dem BSP sehr ähnlich ist [28]. Mit immunohistochemischen Methoden konnte das DSP in Odontoblasten, Pulpazellen, im Prädentin und Dentin nachgewiesen werden, jedoch nicht im Schmelz, Knochen, Knorpel oder der Muskulatur [29, 35]. Allerdings hat das BSP kaum einen Einfluss auf die Mineralisation von Dentin [16]. Auf Grund genetischer Untersuchungen weiß man, dass DSP und DPP von ein und demselben Gen kodiert werden, welches für die Transkription von Dentin-Sialophosphoprotein (DSPP) verantwortlich ist [40, 70]. Butler et al. (2002) nahmen daher an, dass DSPP als inaktives Protein von den Odontoblasten sezerniert wird und an der Prädentin-Dentin-Grenze zu dem aktiven DPP und dem inaktiven DSP hydrolysiert wird [32].

Osteocalcin (OCN) gehört zu den γ -carboxyglutaminsäurehaltigen Proteinen und wird ebenfalls von den Odontoblasten produziert [19, 21]. OCN ist wahrscheinlich an der Regulation des Kristallwachstums der Apatitkristalle beteiligt, indem es an Hydroxylapatit gebunden wird und seine Neubildung vermindert. Das *Bone Sialoprotein* ist ein Phosphoprotein, welches ursprünglich im Knochen isoliert wurde [43]. Im Dentin wurde BSP in den Odontoblastenfortsätzen und im peritubulären Dentin nachgewiesen. Die Funktion von BSP bei der Mineralisation von Hydroxylapatit ist nicht geklärt, aber in vitro konnte gezeigt werden, dass BSP in einem Agarose-Gel-System bei niedriger Calcium- und Phosphatkonzentration die Bildung von Hydroxylapatit fördert [61].

Das Osteopontin (OPN) ist ebenfalls ein Phosphoprotein und wurde ursprünglich im Knochen isoliert [94] und in Präosteoblasten, Osteoblasten, Osteozyten, Chondrozyten sowie unterschiedlichen, nichtmineralisierten Geweben nachgewiesen [27]. OPN hat vielfältige Funktionen, wozu gehören: Zellattachement und Signalübertragung, Regulation der Bildung und des Umbaus von mineralisiertem Gewebe, Hemmung des Wachstums des Kristallgitters von Apatit in Knochen und Dentin und Zellmigration [37]. Während der Odontogenese konnte OPN im Prädentin nachgewiesen werden [22, 72] und hemmt wahrscheinlich die Mineralisation [17, 51]. Eine weitere wichtige Gruppe der nichtkollagenen Matrixproteine sind Proteoglykane, die von den Odontoblastenfortsätzen in das Prädentin sezerniert werden. Dabei handelt es sich hauptsächlich um Decorin und Biglycan, die im Prädentin zunächst die Mineralisierung verhindern und erst nach deren Hydrolyse die Kristallisation von Hydroxylapatit an den Kollagenfibrillen ermöglichen und damit die Umwandlung von Prädentin zum mineralisierten Dentin bewirken [31]. Das komplexe Zusammenspiel zwischen Matrixprotein, Matrixvesikel und Kollagen ist in Abb. 7 schematisch zusammengefasst.

7 Einfluss weiterer Ionen

In Mineralien wie dem Hydroxylapatit sind die Atome in einem dreidimensionalen Kristallgitter angeordnet, dessen

| | C | Ca | P | Ca/P |
|----------------------|-------------|-------------|------------|------------|
| Mineralisationsfront | 43,7 ± 15,6 | 23,8 ± 10,1 | 11,4 ± 4,3 | 2,0 ± 0,18 |
| Reife Prismen | 18,2 ± 5,9 | 33,9 ± 6,9 | 16,7 ± 2,3 | 2,0 ± 0,15 |

Tabelle 4 Elementgehalt in Gewichtsprozent an der Mineralisationsfront und in reifen Schmelzprismen. Während sich der absolute Gehalt von Calcium und Phosphor unterscheidet, ist das Ca/P-Verhältnis gleich.

Struktur durch die Bindungskräfte zwischen den Atomen und dem Ionenradius der Anionen und Kationen bestimmt wird. Ionen mit ähnlichem Radius können im Kristallgitter ausgetauscht werden und so zu „Verunreinigungen“ führen. Der reine Hydroxylapatit des Zahnschmelzes ist glasklar, während der geologische Apatit fast immer durch Fremdionen verunreinigt ist und daher unterschiedliche Färbungen annimmt. Bei der Biomineralisation spielen Ionen wie Natrium, Kalium, Magnesium und Fluorid in der Initialphase der Mineralisation eine Rolle. In der extrazellulären Matrix des Prädentins konnte ein erhöhter Gehalt von Kalium und Natrium nachgewiesen werden [55, 111], der jedoch nicht mit einem Anstieg des Calciumgehalts korreliert. An der Mineralisationsgrenze zwischen Prädentin und Dentin kommt es zu einer selektiven Erhöhung der Kalium- und Phosphatkonzentration, die zu einer Aktivierung der Matrix für die Nukleation von Apatitkristallen führt [113]. Wie oben bereits dargestellt, sind zahlreiche nichtkollagene Matrixproteine für die Kontrolle der Mineralisation notwendig, die durch Kalium aktiviert werden könnten, da Kalium für eine Anzahl von Phosphotransferase-Reaktionen notwendig ist [101]. Monovalente Kationen – wie Natrium und Kalium – können als Gegenspieler der anionischen, nichtkollagenen Proteine der extrazellulären Matrix dienen, indem sie an die Makromoleküle gebunden werden und damit die Aktivierung der Matrix blockieren und eine zu frühe Mineralisation verhindern [113, 114].

Magnesium beeinflusst die Biomineralisation in vielfältiger Weise durch Veränderung der Enzymaktivität der alkalischen Phosphatase [6], Modifikation der Bindungsaffinität der Matrixproteine mit Apatit [93] und Veränderung der Kristallgröße und des Kristallgitters des Apatits [8, 14, 104, 106]. Ein erhöhter aber inhomogener Magnesiumgehalt wurde im schnell mineralisierendem Dentin des Rattenschneidezahns nachgewiesen, während der Magnesiumgehalt im reifen Dentin niedriger, aber homogen war [112]. Welche Rolle genau Magnesium in den verschiedenen Phasen der Biomineralisation spielt, ist jedoch nach wie vor nicht geklärt.

Eines der interessantesten Ionen, das bei der Biomineralisation eine Rolle spielt, ist das *Fluorid*. Da Fluorid nachweislich die Kariesinzidenz reduziert, muss es einen Einfluss auf die Biomineralisation von Dentin und Schmelz haben. Lange Zeit hat man angenommen, dass ein erhöhter Fluorideinbau während der Odontogenese die Hauptursache für die Kariesreduktion darstellt, da Zähne von Probanden aus Untersuchungsgruppen mit hoher Fluoridaufnahme eine höhere Fluoridkonzentration hatten als Zähne von Gruppen mit niedriger Fluoridaufnahme. Fluoridkonzentrationen > 1 ppm im Trinkwasser führen allerdings zu Mineralisationsdefekten des Schmelzes, die hinlänglich als Fluorose bekannt sind. Die Wirkungen des Fluorids auf die Biomineralisation von Schmelz und Dentin sind wegen der hohen

Elektronegativität und des geringen Ionenradius von Fluorid vielfältiger Art und sehr komplex [90]. Fluoridionen können einen Effekt auf das Kristallgitter selbst oder auf die extrazellulären Matrixproteine haben. Keinen Einfluss hat Fluorid auf die Proliferation [20, 69] und Differenzierung [108] odontogener Zellen. Erhöhte Fluoridkonzentrationen verändern aber die extrazellulären Matrixproteine. Durch Fluorid wird die Phosphorylierung des DPP vermindert, indem es die Aktivität der alkalischen Phosphatase verändert [73, 74]. Eine Verminderung der Phosphorylierung des DPP resultiert in der Reduktion der Ca^{2+} -Bindung und führt damit zu einer Hypomineralisation von Dentin. Neuere Untersuchungen haben gezeigt, dass die Expression von DSP im Prädentin und den Ameloblasten verlängert wird, was eine Störung der Mineralisation von Dentin und Schmelz zur Folge haben kann [71]. Eine Veränderung der Struktur der Glycosaminoglykane der extrazellulären Matrix wird ebenfalls diskutiert, was in Wechselwirkung mit dem Kollagen zu einer Verminderung der Mineralisation führen kann [90]. Auf die vielfältigen Effekte des Fluorids während der Schmelzbildung wird im nachfolgenden Kapitel eingegangen.

8 Schmelzbildung

Strukturell unterscheiden sich Schmelz und Dentin erheblich. Während Dentin im Aufbau einem Verbundwerkstoff aus organischen kollagenen Fasern und mineralisiertem anorganischen Calciumphosphat gleicht, enthält der Schmelz kein Kollagen, sondern er besteht fast ausschließlich aus prismenförmigen anorganischen Calciumphosphatkristallen (s. Tab. 3). Die Anordnung der Schmelzprismen ist der Funktion des Zahnes angepasst und unterscheidet sich bei unterschiedlichen Tierspezies entsprechend der Beanspruchung der Zähne. Die Schmelzlamelle des ständig nachwachsenden Schneidezahns der Ratte besteht z. B. aus mehreren Schichten, wobei die innere, dem Dentin aufliegende Schicht, aus streng geometrisch angeordneten Schmelzprismen zusammengesetzt ist, die rechtwinklig gegeneinander versetzt sind, während die äußere Schicht aus parallel senkrecht zur Schmelzoberfläche angeordneten Schmelzprismen besteht (Abb. 8a). Im Schmelz des menschlichen Zahns liegen die Schmelzprismen alle parallel zueinander und nehmen von der Schmelz-Dentin-Grenze einen gewundenen Verlauf, um dann senkrecht auf die Schmelzoberfläche zu treffen (Abb. 8b). Da dem Schmelz das Gerüst aus kollagenen Fasern fehlt und er fast ausschließlich aus dicht gepackten, bis zu 100 μm langen Apatitkristallen besteht, deren Struktur im Gegensatz zum Dentin und Knochen nach der Kristallbildung nicht mehr verändert wird, muss sich auch seine Biomineralisation von der des Dentins unterscheiden. Die Schmelzbildung geht von den Ameloblasten des inneren Schmelzepithels aus und wird in unterschiedliche Phasen unterteilt [95]:

- Sekretion der organischen Matrix
- Kristallkeimbildung
- Regulation des Kristallwachstums
- Abbau der organischen Matrix
- Kristallreifung.

Die organische Schmelzmatrix, die von den Ameloblasten gebildet wird, besteht hauptsächlich aus Amelogenin (90%) und Enamelin (10%) [100]. Sie ist im Vergleich zum Prädentin wesentlich dünner und frei von Vesikeln. Die Matrixproteine haben unterschiedliche, teilweise gegensätzliche Funktionen, indem sie zum Einen die Kristallbildung von Apatit initiieren, das Kristallwachstum und den pH-Wert in der Schmelzmatrix regulieren, zum anderen aber auch die Matrixproteine wieder hydrolysieren [23]. Aus diesem Grund

kann man bei den Ameloblasten unterschiedliche funktionelle Stadien unterscheiden, nämlich eine sich abwechselnde sekretorische und resorptive Phase [99]. Neben Amelogenin und Enamelin synthetisieren die Ameloblasten auch Proteinase, insbesondere Metalloproteinase, alkalische Phosphatase und Serine-Proteinase, die die Matrixproteine Amelogenin und Enamelin als Substrat benutzen und wieder abbauen [12, 83, 96, 98, 100]. Amelogenin wird in einer inaktiven Form von den Ameloblasten sezerniert, durch die Metalloproteinase in der Matrix aktiviert [23], und damit die Kristallisation der Schmelzprismen eingeleitet. Das Amelogenin wird durch die Serine-Proteinase hydrolysiert, deren Abbauprodukte durch die Ameloblasten wieder resorbiert werden. Damit die unterschiedlichen Matrixproteine die differierenden Funktionen ausführen können, sind sie unterschiedlich gelöst (kompartimentiert). Die Metalloproteinase und die alkalische Phosphatase sind in der extrazellulären Flüssigkeit frei gelöst, während die Serine-Proteinase an die Kristalloberfläche gebunden sind [23–25] und durch die Hydrolyse des Amelogenins das Kristallwachstum steuern. Während des Stadiums der Apatitreifung werden die extrazellulären Matrixproteine vollständig resorbiert und durch extrazelluläre Flüssigkeit ersetzt, die das weitere Kristallwachstum, das nunmehr ausschließlich von der Calcium- und Phosphationenkonzentration bestimmt wird, unterhält [91].

Für die Initiation der Kristallbildung ist die dreidimensionale Struktur der Matrixproteine ausschlaggebend. Proteine als Kristallisationskeime haben den Vorteil, dass die Kristallbildung unter einer strengen genetischen Kontrolle stattfinden kann, und das Protein die Wachstumsrichtung des Kristalls bestimmt [3], was dazu führt, dass die Ausrichtung der Schmelzprismen bei verschiedenen Spezies unterschiedlich ist (s. Abb. 8). Auf diese Weise kann durch die Stereochemie der Makromoleküle in der Schmelzmatrix die Kristallform und die Richtung des Wachstums reguliert werden [1, 2]. Die initiale Kristallbildung geht von Octacalciumphosphat aus, welches aber rasch zu Hydroxylapatit umgewandelt wird [26]. Für eine weitgehend physikalisch-chemische Mineralisation von Hydroxylapatit im Schmelz spricht auch das Ca/P-Verhältnis, das – anders als zwischen Prädentin und Dentin – in den mineralisierenden Prismenenden und den ausgereiften Schmelzprismen annähernd gleich bleibt (Tab. 4). *EDX-Line-Scans* durch heranreifende Schmelzprismen zeigten einen linearen Anstieg des Calcium- und Phosphatgehalts von der Mineralisationsfront bis zum ausgereiften Prismenende (Abb. 9). Mit *EDX Element Mapping* kann Calcium und Phosphat nur im mineralisierten Schmelz, nicht jedoch in der Schmelzmatrix nachgewiesen werden (Abb. 10).

Bei der Kristallisation von Hydroxylapatit werden H^+ -Ionen freigesetzt, die den pH-Wert der Matrix so weit vermindern würden, dass der neugebildete Apatit sofort wieder gelöst werden würde. Amelogenin ist wegen seines hohen Prolinanteils der wichtigste Protonenfänger in der Schmelzmatrix [95] und verhindert den Abfall des pH-Wertes. Da Amelogenin durch die Proteinase in der Schmelzmatrix wieder abgebaut wird, ist ein zweites Puffersystem in Form der Carboanhydrase notwendig. Diese katalysiert die Reaktion von H^+ und HCO_3^- zu H_2O und CO_2 und stabilisiert somit den pH-Wert. Mit immunohistochemischen Methoden konnte die Carboanhydrase sowohl im Cytoplasma, wie auch in der apikalen Zellmembran von Ameloblasten nachgewiesen werden [68, 105]. Bei den Ameloblasten des inneren Schmelzepithels unterscheidet man morphologisch und funktionell zwei unterschiedliche Formen: Ameloblasten mit unregelmäßigen apikalen Fortsätzen (Tomes'sche Fortsätze) und Ameloblasten mit glatter apikaler Zellmembran. Ameloblas-

ten können innerhalb kürzester Zeit von der unregelmäßigen in die glatte Form übergehen, wobei man annimmt, dass die unregelmäßige Form die sekretorische Phase repräsentiert, während der die Matrixproteine synthetisiert werden, und die glatte Form die resorptive Phase darstellt, in der die Matrixproteine abgebaut werden [95]. Während der resorptiven Phase wird vermehrt Carboanhydrase in die Matrix abgegeben und damit die Pufferkapazität aufrechterhalten.

Eine andere Frage stellt der Calciumtransport durch das innere Schmelzepithel in die Schmelzmatrix dar, da das Schmelzorgan die Zahnanlage von der Blutzirkulation abschirmt und der Transportweg für Calciumionen aus den Blutgefäßen zur Schmelzmatrix daher relativ lang ist. Untersuchungen mit dem radioaktiven ^{45}Ca -Isotop haben gezeigt, dass nach intravenöser Injektion das Calcium schon nach kurzer Zeit (Sekunden bis Minuten) im Mineral nachweisbar ist [52, 63, 80, 86, 87]. Zwei unterschiedliche Wege des Transports von Calcium und Phosphat durch das innere Schmelzepithel in die Schmelzmatrix werden diskutiert und sind in der Morphologie der Ameloblasten begründet. Die unregelmäßigen Ameloblasten sind an ihrer apikalen Zelleite über *tight junctions* fest verbunden und erlauben keinen parazellulären Transport von Ionen, sondern nur den aktiven Transport durch die Zellen. Für polare Zellen wie die Speicheldrüsenzellen konnten in neueren Untersuchungen solche Transportmechanismen für Calcium und Phosphat nachgewiesen werden [57, 58]. In unregelmäßigen Ameloblasten wurde in der apikalen Zellmembran eine Ca^{2+} -ATPase nachgewiesen [34, 102, 103], was für einen aktiven Ca^{2+} -Ionen transport spricht. Da es sich bei den Ameloblasten ebenso wie bei den Zellen der Drüsenepithelien um polare Zellen handelt und sich die grundlegenden Mechanismen des Ionen transports nicht unterscheiden, ist anzunehmen, dass sich in den Ameloblasten dieselben Transportmechanismen für den Calcium- und Phosphattransport finden wie in den Speicheldrüsenzellen. In den glatten Ameloblasten konnte die Ca^{2+} -ATPase nicht nachgewiesen werden [103], was auf einen anderen Transportmechanismus hinweist. Glatte Ameloblasten besitzen keine *tight junctions* an der apikalen Zelleite und sind für Ionen und Proteine durchlässig. Auf diese Weise könnten Calcium- und Phosphationen, ja sogar Proteine auf passivem Weg in die Schmelzmatrix gelangen. Allerdings befinden sich die Ameloblasten immer nur für kurze Zeit in der glatten Form, so dass der passive Transport von Calcium- und Phosphationen durch das innere Schmelzepithel eine untergeordnete Rolle zu spielen scheint.

Aus dem oben Dargestellten ergibt sich, dass Fluorid während der Amelogenese unterschiedliche Angriffspunkte haben kann. Das Fluoridion kann das Mineral selbst beeinflussen, indem es eingebaut wird, das Kristallgitter verändert oder die Matrixproteine bzw. deren Reaktionsprodukte verändert [90]. In mehreren Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass Fluorid die Proteolyse der Matrixproteine vermindert [9, 88]. Entsprechend werden diese Proteine nicht resorbiert und damit das Kristallwachstum behindert. Dies könnte eine Erklärung für die Mineralisationsdefekte bei der Fluorose sein. Nachdem die Apatit-Kristallisation initiiert wurde und die Matrixproteine resorbiert wurden, beschleunigt Fluorid in der extrazellulären Matrix die Kristallbildung [11, 107]. Fluorid wird darüber hinaus in das Kristallgitter des Apatits anstelle des OH -Ions eingebaut, was zu einer Reduktion der Bindungsenergie im Kristallgitter führt und damit die Säurelöslichkeit des Minerals vermindert.

Schlussfolgerungen

Nach dem Zahndurchbruch ist der Zahnschmelz keinen Stoffwechselprozessen mehr ausgesetzt, da der azelluläre

Schmelz ausschließlich mineralischer Natur ist und Wechselwirkungen zwischen der Schmelzoberfläche und dem Milieu der Mundhöhle überwiegend physikalisch-chemischer Natur sind [89]. Demineralisations- und Remineralisationsvorgänge sind daher als Veränderungen der Löslichkeit von Hydroxylapatit im Schmelz zu verstehen, die ganz wesentlich vom Milieu an der Schmelzoberfläche (Ionenkonzentration, pH-Wert, Plaquebesiedlung) beeinflusst wird. Vor diesem Hintergrund sind sowohl die kariöse Demineralisation des Schmelzes als auch die Applikation von Prophylaktika zur Kariesprävention zu betrachten. Anders verhält es sich beim Dentin, dessen Reaktionsmöglichkeiten wesentlich komplexer sind und immer eine Kombination von chemischen und biologischen Reaktionen des mineralisierten Dentins und der Odontoblasten darstellen. Bioaktive Moleküle (z. B. Kunststoffmonomere) können die Sekretion von extrazellulärer Matrix aus den Odontoblastenfortsätzen bewirken, was zur Bildung von peritubulärem oder intratubulärem Dentin sowie zur Reizdentinbildung in der Pulpa führen kann. Bei der Applikation von Füllungsmaterialien im Dentin sowie bei der Entwicklung neuer Füllungsmaterialien sollten die komplexen Reaktionsmöglichkeiten der Odontoblasten immer mit in Betracht gezogen werden, um Schädigungen der Pulpa zu vermeiden.

Literatur

1. Addadi L, Weiner S: Interactions between acidic proteins and crystals: stereochemical requirements in biomineralization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82, 4110-4114 (1985)
2. Addadi L, Weiner S: Stereochemical and structural relations between macromolecules and crystals in biomineralization. In Mann S, Webb J, Williams RJP (Hrsg): *Biomineralization, Chemical and Biochemical Perspectives*. Weinheim, New York 1989, S. 133-152
3. Addadi L, Moradian-Oldak J, Furedi-Milhofer H, Weiner S, Veis A (Hrsg): Stereochemical aspects of crystal regulation in calcium phosphate-associated mineralized tissues. *Excerpta Medica, New York* 1992
4. Akisaka T, Gay CV: Ultrastructural localization of calcium-activated adenosine triphosphatase (Ca^{2+} -ATPase) in growth-plate cartilage. *J Histochem Cytochem* 33, 925-932 (1985)
5. Ali SY, Sajdera SW, Anderson HC: Isolation and characterization of calcifying matrix vesicles from epiphyseal cartilage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 67, 1513-1520 (1970)
6. Althoff J, Quint P, Krefting ER, Höhling HJ: Morphological studies on the epiphyseal growth plate combined with biochemical and X-ray microprobe analyses. *Histochemistry* 74, 541-552 (1982)
7. Anderson HC, Garimella R, Tague SE: The role of matrix vesicles in growth plate development and biomineralization. *Front Biosci* 10, 822-837 (2005)
8. Aoba T, Moreno EC, Shimoda S: Competitive adsorption of magnesium and calcium ions onto synthetic and biological apatites. *Calcif Tissue Int* 51, 143-150 (1992)
9. Aoba T, Fejerskov O: Dental fluorosis: chemistry and biology. *Crit Rev Oral Biol Med* 13, 155-170 (2002)
10. Arnold S, Höhling HJ, Plate U: Quantitative analysis of the development of different hard tissues. In Massaro EJ (Hrsg): *The Skeleton: Biochemical, Genetic, and Molecular Interactions in Development and Homeostasis V Bone Mineralization*. Humana Press, San Diego 2004, S. 279-293
11. Bachra BN, Fischer HR: The effect of some inhibitors on the nucleation and crystal growth of apatite. *Calcif Tissue Res* 3, 348-357 (1969)
12. Bartlett JD, Simmer JP: Proteinases in developing dental enamel. *Crit Rev Oral Biol Med* 10, 425-441 (1999)
13. Berkovitz BKB, Holland GR, Moxham BJ: Early tooth development. In Berkovitz BKB, Holland GR, Moxham BJ (Hrsg): *Oral Anatomy, Histology and Embryology*. Mosby, Edinburgh, London, New York 2002, S. 290-303
14. Bigi A, Foresti E, Gregorini R, Ripamonti A, Roveri N, Shah JS: The role of magnesium on the structure of biological apatites. *Calcif Tissue Int* 50, 439-444 (1992)
15. Boskey A, Maresca M, Appel J: The effects of noncollagenous matrix proteins on hydroxyapatite formation and proliferation in a collagen gel system. *Connect Tissue Res* 21, 171-176; discussion 177-178 (1989)
16. Boskey A, Spevak L, Tan M, Doty SB, Butler WT: Dentin sialoprotein (DSP) has limited effects on in vitro apatite formation and growth. *Calcif Tissue Int* 67, 472-478 (2000)
17. Boskey AL: Osteopontin and related phosphorylated sialoproteins: effects on mineralization. *Ann N Y Acad Sci* 760, 249-256 (1995)

18. Boskey AL: Matrix proteins and mineralization: an overview. *Connect Tissue Res* 35, 357-363 (1996)
19. Bronckers AL, Gay S, Dimuzio MT, Butler WT: Immunolocalization of gamma-carboxyglutamic acid-containing proteins in developing molar tooth germs of the rat. *Coll Relat Res* 5, 17-22 (1985)
20. Bronckers AL, Woltgens JH: Short-term effects of fluoride on biosynthesis of enamel-matrix proteins and dentine collagens and on mineralization during hamster tooth-germ development in organ culture. *Arch Oral Biol* 30, 181-191 (1985)
21. Bronckers AL, Gay S, Finkelman RD, Butler WT: Developmental appearance of Gla proteins (osteocalcin) and alkaline phosphatase in tooth germs and bones of the rat. *Bone Miner* 2, 361-373 (1987)
22. Bronckers AL, D'Souza RN, Butler WT, Lyaruu DM, van Dijk S, Gay S, Woltgens JH: Dentin sialoprotein: biosynthesis and developmental appearance in rat tooth germs in comparison with amelogenins, osteocalcin and collagen type-I. *Cell Tissue Res* 272, 237-247 (1993)
23. Brookes SJ, Kirkham J, Shore RC, Bonass WA, Robinson C: Enzyme compartmentalization during biphasic enamel matrix processing. *Connect Tissue Res* 39, 89-99; discussion 141-149 (1998)
24. Brookes SJ, Kirkham J, Shore RC, Wood SR, Slaby I, Robinson C: Amelin extracellular processing and aggregation during rat incisor amelogenesis. *Arch Oral Biol* 46, 201-208 (2001)
25. Brookes SJ, Lyngstadaas SP, Robinson C, Shore RC, Wood SR, Kirkham J: Enamel compartmentalization in developing porcine enamel. *Connect Tissue Res* 43, 477-481 (2002)
26. Brown WE: A mechanism for growth of apatitic crystals. In Stack MV, Fearnhead RW (Hrsg): *Tooth Enamel – its Composition, Properties, and Fundamental Structure. Report of the Proceedings of an International Symposium on the Composition, Properties, and Fundamental Structure of Tooth Enamel.* John Wright & Sons Ltd, Bristol 1965, S. 11-14
27. Butler WT: The nature and significance of osteopontin. *Connect Tissue Res* 23, 123-136 (1989)
28. Butler WT: Sialoproteins of bone and dentin. *J Biol Buccale* 19, 83-89 (1991)
29. Butler WT, Bhowm M, Brunn JC, D'Souza RN, Farach-Carson MC, Happonen RP, Schrohenloher RE, Seyer JM, Somerman MJ, Foster RA, et al.: Isolation, characterization and immunolocalization of a 53-kDa dentin sialoprotein (DSP). *Matrix* 12, 343-351 (1992)
30. Butler WT: Dentin matrix proteins and dentinogenesis. *Connect Tissue Res* 33, 59-65 (1995)
31. Butler WT, Ritchie H: The nature and functional significance of dentin extracellular matrix proteins. *Int J Dev Biol* 39, 169-179 (1995)
32. Butler WT, Brunn JC, Qin C, McKee MD: Extracellular matrix proteins and the dynamics of dentin formation. *Connect Tissue Res* 43, 301-307 (2002)
33. Crall JJ, Bjerga JM: Effects of DCPD/APF application and prolonged exposure to fluoride on caries-like lesion formation in vitro. *J Oral Pathol* 16, 488-491 (1987)
34. Crenshaw MA, Takano Y: Mechanisms by which the enamel organ controls calcium entry into developing enamel. *J Dent Res* 61 Spec No, 1574-1579 (1982)
35. D'Souza RN, Bronckers AL, Happonen RP, Doga DA, Farach-Carson MC, Butler WT: Developmental expression of a 53 kD dentin sialoprotein in rat tooth organs. *J Histochem Cytochem* 40, 359-366 (1992)
36. Dean DD, Schwartz Z, Muniz OE, Gomez R, Swain LD, Howell DS, Boyan BD: Matrix vesicles are enriched in metalloproteinases that degrade proteoglycans. *Calcif Tissue Int* 50, 342-349 (1992)
37. Denhardt DT, Guo X: Osteopontin: a protein with diverse functions. *Faseb J* 7, 1475-1482 (1993)
38. Donoghue PC, Forey PL, Aldridge RJ: Conodont affinity and chordate phylogeny. *Biol Rev Camb Philos Soc* 75, 191-251 (2000)
39. Epple M, Dorozhkin SV: Die biologische und medizinische Bedeutung von Calciumphosphaten. *Angew Chem* 114, 3260-3277 (2002)
40. Feng JQ, Luan X, Wallace J, Jing D, Ohshima T, Kulkarni AB, D'Souza RN, Kozak CA, MacDougall M: Genomic organization, chromosomal mapping, and promoter analysis of the mouse dentin sialophosphoprotein (Dspp) gene, which codes for both dentin sialoprotein and dentin phosphoprotein. *J Biol Chem* 273, 9457-9464 (1998)
41. Fernandez E, Gil FJ, Ginebra MP, Driessens FC, Planell JA, Best SM: Calcium phosphate bone cements for clinical applications. Part I: solution chemistry. *J Mater Sci Mater Med* 10, 169-176 (1999)
42. Fernandez E, Gil FJ, Ginebra MP, Driessens FC, Planell JA, Best SM: Calcium phosphate bone cements for clinical applications. Part II: precipitate formation during setting reactions. *J Mater Sci Mater Med* 10, 177-183 (1999)
43. Fisher LW, Termine JD, Deijter SW, Jr., Whitson SW, Yanagishita M, Kimura JH, Hascall VC, Kleinman HK, Hassell JR, Nilsson B: Proteoglycans of developing bone. *J Biol Chem* 258, 6588-6594 (1983)
44. Fortin D, Beveridge TJ: Mechanistic routes to biomineral surface development. In Baeuerlein E (Hrsg): *From Biology to Biotechnology and Medical Application.* Wiley-VCH, Weinheim, 2000, S. 7-24
45. Fujisawa R, Kuboki Y: Preferential adsorption of dentin and bone acidic proteins on the (100) face of hydroxyapatite crystals. *Biochim Biophys Acta* 1075, 56-60 (1991)
46. Gaffar A, Blake-Haskins J, Mellberg J: In vivo studies with a dicalcium phosphate dihydrate/MFP system for caries prevention. *Int Dent J* 43, 81-88 (1993)
47. Gängler P, Arnold WH, Steinberg D: Zahnkaries - Grundlagen und Diagnostik. Ätiologie und Pathogenese. In Gängler P, Hoffmann T, Willershausen B, Schwenzner N, Ehrenfeld M (Hrsg): *Konservierende Zahnheilkunde und Parodontologie.* Thieme, Stuttgart, New York 2005, S. 112-136
48. Genge BR, Wu LN, Wuthier RE: Differential fractionation of matrix vesicle proteins. Further characterization of the acidic phospholipid-dependent Ca²⁺-binding proteins. *J Biol Chem* 265, 4703-4710 (1990)
49. George A, Sabsay B, Simonian PA, Veis A: Characterization of a novel dentin matrix acidic phosphoprotein. Implications for induction of biomineralization. *J Biol Chem* 268, 12624-12630 (1993)
50. George A, Silberstein R, Veis A: In situ hybridization shows Dmp1 (AG1) to be a developmentally regulated dentin-specific protein produced by mature odontoblasts. *Connect Tissue Res* 33, 67-72 (1995)
51. Goldberg HA, Hunter GK: The inhibitory activity of osteopontin on hydroxyapatite formation in vitro. *Ann N Y Acad Sci* 760, 305-308 (1995)
52. Hanawa M, Takano Y, Wakita M: An autoradiographic study of calcium movement in the enamel organ of rat molar tooth germs. *Arch Oral Biol* 35, 899-906 (1990)
53. Hodge AJ, Petruska JA: Recent studies with electron microscope on order aggregates of the tropocollagen macromolecules. In Ramachandran GN (Hrsg): *Aspects of Protein Structure.* Academic Press, New York 1963, S. 289-300
54. Höhling HJ, Barckhaus RH, Krefting ER, Althoff J, Quint P: Collagen mineralization: Aspects of structural relationships between collagen and the apatic crystallites. In Bouncei E, Motte PM (Hrsg): *Ultrastructure of Skeletal Tissue.* Academic Press, San Diego 1990, S. 41-62
55. Höhling HJ, Mishima H, Kozawa Y, Daimon T, Barckhaus R, Richter KD: Microprobe analysis of the potassium-calcium distribution relationship in predentin. *Scanning Microsc Int* 5, 247-253 (1991)
56. Höhling HJ, Arnold S, Höhling JM, Plate U, Wiesmann HP: Correlation between the distribution of nanometer sized apatitic nanocrystalline particles and the acidic sites of phosphoproteins as apatitic nucleates in developing hard tissues. *Matwiss Werkstofftech* 32, 149-153 (2001)
57. Homann V, Kinne-Saffran E, Arnold WH, Gaengler P, Kinne RK: Calcium transport in human salivary glands: a proposed model of calcium secretion into saliva. *Histochem Cell Biol* DOI: 10.1007/s00418-005-0100-2 (2005)
58. Homann V, Rosin-Steiner S, Stratmann T, Arnold WH, Gaengler P, Kinne RK: Sodium-phosphate cotransporter in human salivary glands: molecular evidence for the involvement of NPT2b in acinar phosphate secretion and ductal phosphate reabsorption. *Arch Oral Biol* 50, 759-768 (2005)
59. Hoppenbrouwers PM, Groenendijk E, Tewarie NR, Driessens FC: Improvement of the caries resistance of human dental roots by a two-step conversion of the root mineral into fluoridated hydroxylapatite. *J Dent Res* 67, 1254-1256 (1988)
60. Hsu HH, Morris DC, Davis L, Moylan P, Anderson CH: In vitro Ca deposition by rat matrix vesicles: is the membrane association of alkaline phosphatase essential for matrix vesicle-mediated calcium deposition? *Int J Biochem* 25, 1737-1742 (1993)
61. Hunter GK, Goldberg HA: Nucleation of hydroxyapatite by bone sialoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 8562-8565 (1993)
62. Iijima M, Nelson DG, Pan Y, Kreinbrink AT, Adachi M, Goto T, Moriwaki Y: Fluoride analysis of apatite crystals with a central planar OCP inclusion: concerning the role of F⁻ ions on apatite/OCP/apatite structure formation. *Calcif Tissue Int* 59, 377-384 (1996)
63. Kawamoto T, Shimizu M: Pathway and speed of calcium movement from blood to mineralizing enamel. *J Histochem Cytochem* 45, 213-230 (1997)
64. Kinne RW, Fisher LW: Keratan sulfate proteoglycan in rabbit compact bone is bone sialoprotein II. *J Biol Chem* 262, 10206-10211 (1987)
65. Kirsch T, Nah HD, Demuth DR, Harrison G, Golub EE, Adams SL, Pacifici M: Annexin V-mediated calcium flux across membranes is dependent on the lipid composition: implications for cartilage mineralization. *Biochemistry* 36, 3359-3367 (1997)
66. Legeros RZ, Shannon IL: The crystalline components of dental calculi: human vs. dog. *J Dent Res* 58, 2371-2377 (1979)
67. LeGeros RZ: *Calcium Phosphates in Oral Biology and Medicine.* Karger, Basel 1991
68. Lin HM, Nakamura H, Noda T, Ozawa H: Localization of H⁽⁺⁾-ATPase and carbonic anhydrase II in ameloblasts at maturation. *Calcif Tissue Int* 55, 38-45 (1994)
69. Lyaruu DM, de Jong M, Bronckers AL, Woltgens JH: Ultrastructural study of fluoride-induced in-vitro hypermineralization of enamel in hamster tooth germs explanted during the secretory phase of amelogenesis. *Arch Oral Biol* 31, 109-117 (1986)
70. MacDougall M, Simmons D, Luan X, Nydegger J, Feng J, Gu TT: Dentin phosphoprotein and dentin sialoprotein are cleavage products expressed from a single transcript coded by a gene on human chromosome 4. Dentin phosphoprotein DNA sequence determination. *J Biol Chem* 272, 835-842 (1997)
71. Maciejewska I, Spodnik JH, Wojcik S, Domaradzka-Pytel B, Bereznowski Z: The dentin sialoprotein (DSP) expression in rat tooth germs following fluoride treatment: an immunohistochemical study. *Arch Oral Biol* 51, 252-261 (2006)
72. Mark MP, Butler WT, Prince CW, Finkelman RD, Ruch JV: Developmental expression of 44-kDa bone phosphoprotein (osteopontin) and bone gamma-carboxyglutamic acid (Gla)-containing protein (osteocalcin) in calcifying tissues of rat. *Differentiation* 37, 123-136 (1988)
73. Milan AM, Waddington RJ, Embury G: Altered phosphorylation of rat dentine phosphoproteins by fluoride in vivo. *Calcif Tissue Int* 64, 234-238 (1999)
74. Milan AM, Waddington RJ, Embury G: Fluoride alters casein kinase II and alkaline phosphatase activity in vitro with potential implications for dentine mineralization. *Arch Oral Biol* 46, 343-351 (2001)
75. Mirtchi AA, Lemaitre J, Munting E: Calcium phosphate cements: action of setting regulators on the properties of the beta-tricalcium phosphate-monocalcium phosphate cements. *Biomaterials* 10, 634-638 (1989)
76. Mirtchi AA, Lemaitre J, Terao N: Calcium phosphate cements: study of the beta-tricalcium phosphate-monocalcium phosphate system. *Biomaterials* 10, 475-480 (1989)
77. Missana L R., Aguilera XM, Hsu HH: Bone morphogenetic proteins (BMPs) and non-collagenous proteins of bone identified in calcifying matrix vesicles of growth plate. *Bone Miner Res* 13, S241 (1998)

78. Montessuit C, Caverzasio J, Bonjour JP: Characterization of a Pi transport system in cartilage matrix vesicles. Potential role in the calcification process. *J Biol Chem* 266, 17791-17797 (1991)
79. Montessuit C, Bonjour JP, Caverzasio J: Expression and regulation of Na-dependent P(i) transport in matrix vesicles produced by osteoblast-like cells. *J Bone Miner Res* 10, 625-631 (1995)
80. Munhoz CO, Leblond CP: Deposition of calcium phosphate into dentin and enamel as shown by radioautography of sections of incisor teeth following injection of ⁴⁵Ca into rats. *Calcif Tissue Res* 15, 221-235 (1974)
81. Olszta MJ, Douglas EP, Gower LB: Scanning electron microscopic analysis of the mineralization of type I collagen via a polymer-induced liquid-precursor (PILP) process. *Calcif Tissue Int* 72, 583-591 (2003)
82. Olszta MJ, Odom DJ, Douglas EP, Gower LB: A new paradigm for biomineral formation: mineralization via an amorphous liquid-phase precursor. *Connect Tissue Res* 44 Suppl 1, 326-334 (2003)
83. Overall CM, Limeback H: Identification and characterization of enamel proteinases isolated from developing enamel. Amelogenolytic serine proteinases are associated with enamel maturation in pig. *Biochem J* 256, 965-972 (1988)
84. Plate U, Höhling HJ, Reimer L, Barckhaus RH, Wienecke R, Wiesmann HP, Boyde A: Analysis of the calcium distribution in predentine by EELS and of the early crystal formation in dentine by ESI and ESD. *J Microsc* 166 (Pt 3), 329-341 (1992)
85. Plate U, Arnold S, Stratmann U, Wiesmann HP, Höhling HJ: General principle of ordered apatitic crystal formation in enamel and collagen rich hard tissues. *Connect Tissue Res* 38, 149-157; discussion 201-145 (1998)
86. Reith EJ, Boyde A: Autoradiographic evidence of cyclical entry of calcium into maturing enamel of the rat incisor tooth. *Arch Oral Biol* 26, 983-987 (1981)
87. Reith EJ, Schmid MI, Boyde A: Rapid uptake of calcium in maturing enamel of the rat incisor. *Histochemistry* 80, 409-410 (1984)
88. Robinson C, Kirkham J: The effect of fluoride on the developing mineralized tissues. *J Dent Res* 69 Spec No, 685-691; discussion 721 (1990)
89. Robinson C, Shore RC, Brookes SJ, Strafford S, Wood SR, Kirkham J: The chemistry of enamel caries. *Crit Rev Oral Biol Med* 11, 481-495 (2000)
90. Robinson C, Connell S, Kirkham J, Brookes SJ, Shore RC, Smith AM: The effect of fluoride on the developing tooth. *Caries Res* 38, 268-276 (2004)
91. Robinson C, Connell S, Brookes SJ, Kirkham J, Shore RC, Smith DA: Surface chemistry of enamel apatite during maturation in relation to pH: implications for protein removal and crystal growth. *Arch Oral Biol* 50, 267-270 (2005)
92. Rojas E, Arispe N, Haigler HT, Burns AL, Pollard HB: Identification of annexins as calcium channels in biological membranes. *Bone Miner* 17, 214-218 (1992)
93. Roy ME, Nishimoto SK: Matrix Gla protein binding to hydroxyapatite is dependent on the ionic environment: calcium enhances binding affinity but phosphate and magnesium decrease affinity. *Bone* 31, 296-302 (2002)
94. Senger DR, Wirth DF, Hynes RO: Transformed mammalian cells secrete specific proteins and phosphoproteins. *Cell* 16, 885-893 (1979)
95. Simmer JP, Fincham AG: Molecular mechanisms of dental enamel formation. *Crit Rev Oral Biol Med* 6, 84-108 (1995)
96. Simmer JP, Fukae M, Tanabe T, Yamakoshi Y, Uchida T, Xue J, Margolis HC, Shimizu M, DeHart BC, Hu CC, Bartlett JD: Purification, characterization, and cloning of enamel matrix serine proteinase 1. *J Dent Res* 77, 377-386 (1998)
97. Slavkin HC, Croissant R, Bringas P, Jr.: Epithelial-mesenchymal interactions during odontogenesis. 3. A simple method for the isolation of matrix vesicles. *J Cell Biol* 53, 841-849 (1972)
98. Smith CE, Pompura JR, Borenstein S, Fazel A, Nanci A: Degradation and loss of matrix proteins from developing enamel. *Anat Rec* 224, 292-316 (1989)
99. Smith CE, Nanci A: Overview of morphological changes in enamel organ cells associated with major events in amelogenesis. *Int J Dev Biol* 39, 153-161 (1995)
100. Smith CE: Cellular and chemical events during enamel maturation. *Crit Rev Oral Biol Med* 9, 128-161 (1998)
101. Suelter CH: Enzymes activated by monovalent cations. *Science* 168, 789-795 (1970)
102. Takano Y, Ozawa H, Crenshaw MA: Ca-ATPase and ALPase activities at the initial calcification sites of dentin and enamel in the rat incisor. *Cell Tissue Res* 243, 91-99 (1986)
103. Takano Y: Enamel mineralization and the role of ameloblasts in calcium transport. *Connect Tissue Res* 33, 127-137 (1995)
104. Terpstra RA, Driessens FC: Magnesium in tooth enamel and synthetic apatites. *Calcif Tissue Int* 39, 348-354 (1986)
105. Toyosawa S, Ogawa Y, Inagaki T, Ijuhin N: Immunohistochemical localization of carbonic anhydrase isozyme II in rat incisor epithelial cells at various stages of amelogenesis. *Cell Tissue Res* 285, 217-225 (1996)
106. Tsuboi S, Nakagaki H, Ishiguro K, Kondo K, Mukai M, Robinson C, Weatherell JA: Magnesium distribution in human bone. *Calcif Tissue Int* 54, 34-37 (1994)
107. Varughese K, Moreno EC: Crystal growth of calcium apatites in dilute solutions containing fluoride. *Calcif Tissue Int* 33, 431-439 (1981)
108. Walton RE, Eisenmann DR: Ultrastructural examination of various stages of amelogenesis in the rat following parenteral fluoride administration. *Arch Oral Biol* 19, 171-182 (1974)
109. Webb J, St. Pierre TG, Macey DJ: Iron in biomineralization in invertebrates. In Frankel RB, Blakemore RRP (Hrsg): *Iron Biomaterials*. Plenum Publishing, New York 1990, S. 193-229
110. Wefel JS, Harless JD: Topical fluoride application and lesion progression in vitro. *J Dent Res* 63, 1276-1278 (1984)
111. Wiesmann HP, Hoehling HJ, Zierold K, Barckhaus R: Elemental distributions in predentine associated with dentine mineralization in rat incisor. *Connect Tissue Res* 33, 179-184 (1995)
112. Wiesmann HP, Tkotz T, Joos U, Zierold K, Stratmann U, Szuwart T, Plate U, Hoehling HJ: Magnesium in newly formed dentin mineral of rat incisor. *J Bone Miner Res* 12, 380-383 (1997)
113. Wiesmann HP, Plate U, Zierold K, Höhling HJ: Potassium is involved in apatite biomineralization. *J Dent Res* 77, 1654-1657 (1998)
114. Wiesmann HP, Meyer U, Plate U, Höhling HJ: Aspects of collagen mineralization in hard tissue formation. *Int Rev Cytol* 242, 121-156 (2005)

I Korrespondenzadresse:

Prof. Dr. Wolfgang H. Arnold
 Lehrstuhl Anatomie
 Fakultät für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde
 Alfred Herrhausen-Straße 50
 58448 Witten
 E-Mail: wolfa@uni-wh.de