

Molecules Contributing to the Maintenance of Periodontal Tissues

Their Possible Association with Orthodontic Tooth Movement

Moleküle, die einen Beitrag zur Aufrechterhaltung parodontaler Gewebe leisten

Ihre mögliche Assoziation zur kieferorthopädischen Zahnbewegung

Eva Müssig, Pascal Tomakidi, Thorsten Steinberg¹

Abstract

This review is aimed at providing a depiction of molecules and their topography which characterize native gingiva and PDL fibroblasts, to describe their function in tissue maintenance, and to discuss their possible modulation due to orthodontic tooth movement.

Maintenance of the human periodontium requires the balance of proliferation and differentiation in the respective tissues' cells. Moreover, the cells must synthesize the extracellular matrix molecules and receptors that facilitate adhesion. To describe the molecules that contribute to periodontal tissue maintenance, we illustrate the localization of their expression and topography on frozen sections from native gingival tissue and primary cell cultures derived from periodontal ligament. In native gingival epithelium, proliferation is confined to basal and parabasal cells. Keratin K14, when used as structural marker, is visible in the entire epithelium, while K13, an indicator of early differentiation, is restricted to the suprabasal cell compartment. Vimentin indicates mesenchymal cells in the subgingival connective tissue. Concerning the matrix molecules, collagen type-IV is abundant at the epithelium-*lamina propria* interface, and fibronectin is apparent throughout the mesenchyme. The matrix receptor integrin $\beta 1$ reveals a pericellular localization in basal and parabasal cells, while focal adhesion kinase p125^{FAK} is seen pericellularly in all epithelial layers. Cultures of primary periodontal ligament (PDL) fibroblasts (PDL-F) reveal expression of vimentin, strong proliferation, synthesis and extracellular deposition of collagen type-I and fibronectin. The integrin subunits $\beta 1$ and p125^{FAK} are largely detectable at the cell periphery.

Key Words: Gingiva · Periodontium · Periodontal ligament fibroblasts · Orthodontic tooth movement

Zusammenfassung

Dieser Übersichtsartikel verfolgt das Ziel, die Moleküle sowie deren Topographie darzustellen, die die native Gingiva und PDL-Fibroblasten charakterisieren, ihre Funktion in der Aufrechterhaltung des Gewebes zu beschreiben und ihre mögliche Veränderung durch orthodontische Zahnbewegungen zu diskutieren.

Die Aufrechterhaltung des humanen Parodonts erfordert das Gleichgewicht von Proliferation und Differenzierung in den Zellen der entsprechenden Gewebe. Darüber hinaus müssen die Zellen extrazelluläre Matrix-Moleküle und Rezeptoren synthetisieren, die die Zelladhäsion ermöglichen. Um Moleküle zu beschreiben, die an der Aufrechterhaltung des humanen Parodonts beteiligt sind, stellen wir ihre Lokalisation und Topographie an Gefrierschnitten von nativem Gingiva-Gewebe und Primärkulturen von Zellen des Parodontalligaments dar. Im nativen Gingiva-Epithel ist die Proliferation auf die basalen und parabasalen Zellen beschränkt. Keratin K14 ist überall im Epithel sichtbar, wenn es als Strukturmarker verwendet wird, während K13, ein Marker für die frühe Zelldifferenzierung, auf das suprabasale Zellkompartiment beschränkt bleibt. Vimentin kennzeichnet die mesenchymalen Zellen im subgingivalen Bindegewebe. In Bezug auf die Matrix-Moleküle konzentriert sich Kollagen Typ-IV auf den Übergangsbereich von Epithel und *Lamina propria*, Fibronektin ist im gesamten Mesenchym vorhanden. Der Matrix-Rezeptor Integrin $\beta 1$ zeigt eine perizelluläre Lokalisation in basalen sowie parabasalen Zellen, während die fokale Adhäsionskinase p125^{FAK} perizellulär in allen Epithelschichten nachweisbar ist. Primärkulturen von Parodontalligament-(PDL)-Fibroblasten (PDL-F) zeigen eine Expression von Vimentin, eine starke Proliferation und die Synthese sowie extrazelluläre Deposition von Kollagen Typ-I und Fibronektin. Die Integrin-Untereinheit $\beta 1$ und p125^{FAK} sind größtenteils an der Zellperipherie nachweisbar.

Schlüsselwörter: Gingiva · Parodont · Parodontalligament-Fibroblasten · Orthodontische Zahnbewegung

¹Department of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics, Dental School, University of Heidelberg, Germany.

Received: May 2, 2005; accepted: September 16, 2005

Requirements for Periodontal Tissue Maintenance Gingival Epithelium

The periodontium consists of several tissues, including gingiva, periodontal ligament (PDL), root cementum and alveolar bone. We describe in this review their molecular characteristics and provide hints as to their reaction to orthodontic mechanical forces.

Oral cavity epithelia exhibit substantial variations in the degree and type of keratinization. Orthokeratinized epithelium similar to that in skin is found in the hard palate, whereas other regions are either parakeratinized, such as gingiva, or non-keratinized, such as buccal mucosa [29]. As in other oral epithelia, cell proliferation, essential for self-renewal, occurs in the basal and parabasal keratinocytes of the gingival epithelium [34]. One of the most sensitive biochemical differentiation markers in keratinocytes is the keratin protein family made up of 30 polypeptides – the major cytoskeletal components in the architecture of all epithelia. One acidic and one basic/neutral polypeptide undergo heterotypic association to form intermediate filaments in keratinocytes [8]. In stratified epithelia, the basal keratinocytes express K5, K14, K19 and K15 [16], while in the suprabasal cell compartment, keratin expression depends on the specific pathway of differentiation. In the oral cavity, the suprabasal cells of keratinized epithelia of the gingiva and hard palate express K1 and K10, while K4 and K13 are the major keratins in the non-keratinized buccal epithelium. However, small amounts of K1/10 are also detectable in non-keratinized oral epithelia [4].

Mesenchyme and Extracellular Matrix

Similar to epithelial cells, mesenchymal cells have intermediate filaments such as vimentin. In the human periodontium, along with other mesenchymal cells, periodontal ligament fibroblasts (PDL-F) and alveolar bone cells express vimentin as a major cytoskeletal constituent [17, 25]. Another cell type that expresses vimentin exclusively as an intermediate filament protein is the fibroblast of the *lamina propria*, i.e. the soft connective tissue underlying the gingival epithelium [1, 24]. In the gingival epithelium, the intercellular spaces between the densely-packed and highly-organized keratinocyte layers are very small. These spaces thus contain only small amounts of extracellular matrix (ECM), i.e. the ground substance in which all solid tissue cells are embedded. The opposite situation exists in the periodontal connective tissues, where a large amount of ECM surrounds a minor number of stochastically-distributed mesenchymal cells (for review see [3]). As in other epithelia, the ECM underneath the gingival epithelium forms the basement membrane (BM). On the ultrastructural level, this BM can be divided into the *lamina lucida*, containing laminin, and the *lamina densa*, which consists of collagen type-IV [33]. In addition to collagen type-IV, which is a non-fibrillar, network-forming collagen type, gingival connective tissue and other

Erfordernisse für die Aufrechterhaltung parodontaler Gewebe

Gingiva-Epithel

Das Parodont besteht aus mehreren Geweben. Dazu gehören Gingiva, Parodontalligament (PDL), Wurzelzement und Alveolarknochen. In dieser Arbeit werden deren molekulare Eigenschaften beschrieben und einige Hinweise für ihre Reaktion auf kieferorthopädische mechanische Kräfte gegeben.

Die Epithelien der Mundhöhle zeigen erhebliche Unterschiede in der Ausprägung und im Typ ihrer Keratinisierung. Das Epithel des harten Gaumens ist, ähnlich dem der Haut, orthokeratinisiert, während andere Regionen, wie z.B. die Gingiva, parakeratinisiert oder, wie z.B. die Wangenschleimhaut, nicht keratinisiert sind [29]. Wie in anderen oralen Epithelien findet die Zellproliferation, die für die Selbsterneuerung erforderlich ist, in den basalen wie auch in den parabasalen Keratinozyten des Gingiva-Epithels statt [34]. Zu den sensitivsten biochemischen Markern für die Differenzierung in Keratinozyten gehört die Familie der Keratin-Proteine, die aus 30 verschiedenen Polypeptiden besteht und den Hauptbestandteil des Zytoskelettes aller Epithelien ausmacht. Dabei bilden ein saures und ein basisches/neutrales Polypeptid ein Heterodimer und formen auf diese Weise die Intermediärfilamente in Keratinozyten [8]. Im stratifizierten Epithel exprimieren die basalen Keratinozyten die Keratine K5, K14, K19 und K15 [16], während im suprabasalen Zellkompartiment die Keratinexpression von der Art der Differenzierung abhängt. In der Mundhöhle exprimieren die suprabasalen Zellen des keratinisierten Epithels der Gingiva und des harten Gaumens K1 und K10, während im nicht-keratinisierten Epithel der Wange K4 und K13 die häufigsten Keratine darstellen. Jedoch sind auch in nicht-keratinisiertem oralen Epithel geringe Mengen von K1 und K10 nachweisbar [4].

Mesenchym und extrazelluläre Matrix

Ähnlich den Epithelzellen besitzen auch Mesenchymzellen Intermediärfilamente wie z.B. Vimentin. Neben anderen mesenchymalen Zellen im humanen Parodont exprimieren auch Parodontalligamentfibroblasten (PDL-F) und Alveolarknochenzellen Vimentin als Hauptbestandteil ihres Zytoskelettes [17, 25]. Ein weiterer Zelltyp, der ausschließlich Vimentin als Intermediärfilamentprotein exprimiert, sind die Fibroblasten der *Lamina propria*, des Bindegewebes unterhalb des Gingiva-Epithels [1, 24]. Im Gingiva-Epithel sind die Interzellularräume zwischen den dicht liegenden und hoch organisierten Schichten der Keratinozyten sehr klein. Deshalb enthalten diese Räume nur geringe Mengen an extrazellulärer Matrix (EZM), der Grundsubstanz, in die alle Zellen solider Gewebe eingebettet sind. Eine umgekehrte Situation zeigt sich im parodontalen Bindegewebe, in dem eine große Menge an EZM eine kleine Anzahl von zufällig verteilten Mesenchymzellen umgibt (Übersicht siehe [3]). Wie in anderen Epithelien bildet die EZM die Basalmembran (BM) unterhalb des Gingiva-Epithels. Auf ultrastruk-

periodontal connective tissues (such as bone) contain collagen type-I [9]. Collagen type-I together with the collagen types -II, -III, -V and -XI form the group of fibrillar collagens whose main function is to provide their tissues with mechanical strength [21]. In addition to proteoglycans, which are ubiquitous constituents of periodontal tissues, fibronectin is enclosed in connective tissues of the periodontium including PDL and bone [23]. The fibronectin gene encodes for various glycoprotein isoforms of high molecular weight generated by alternative splicing. Fibronectins promote cell adhesion and affect cell morphology, migration, differentiation, and cytoskeletal organization. Gingival fibronectins are located above collagen fibers and close to blood vessels [28]. Intact fibronectin has been demonstrated *in vitro* to support the proliferation and chemotaxis of PDL-F [13]. Moreover, PDL-F responds to the application of mechanical forces by significantly increasing their production of collagen type-I and fibronectin [12].

Cell-Matrix-Interactions by Integrins

Fibronectin contains the amino acid motif Arg-Gly-Asp, also known as RGD-sequence; it resembles an ECM ligand for a variety of integrin receptors. The main fibronectin receptor is integrin $\alpha 5 \beta 1$, but other $\beta 1$ -integrins can also facilitate cells adhering to fibronectin [35]. Fibroblasts in the gingival connective tissue and PDL, osteoblasts, and gingival keratinocytes express integrin receptors, which bind to fibronectin with various affinities [10, 20, 36].

Generally, integrins are heterodimers consisting of an α - and a β -chain which link the ECM to the cytoskeleton. These adhesion receptors are important for cytoskeletal organization and signal/mechanotransduction; they are also involved in the regulation of proliferation, differentiation, apoptosis, and cell migration (for review see [35]). $\beta 1$ -integrins are intracellularly associated with proteins forming the focal adhesion complex, of which one is the focal adhesion kinase (p125^{FAK}), responsible for the transduction of mechanical signals into the cell nucleus by phosphorylation of down-stream targets. Several integrin subunits and p125^{FAK} demonstrated a modulation of expression and activity when primary cultures of gingival fibroblasts and PDL-F were subjected to mechanical forces [5, 19].

The immunolocalization of the above-mentioned molecules is illustrated below in specimens of native gingival tissue and primary cell cultures of human PDL-F, and we describe how these molecules may be influenced by orthodontic tooth movement.

Immunolocalization of Cellular Molecules Contributing to the Maintenance of Periodontal Tissues as Exemplified in Native Gingival Tissue

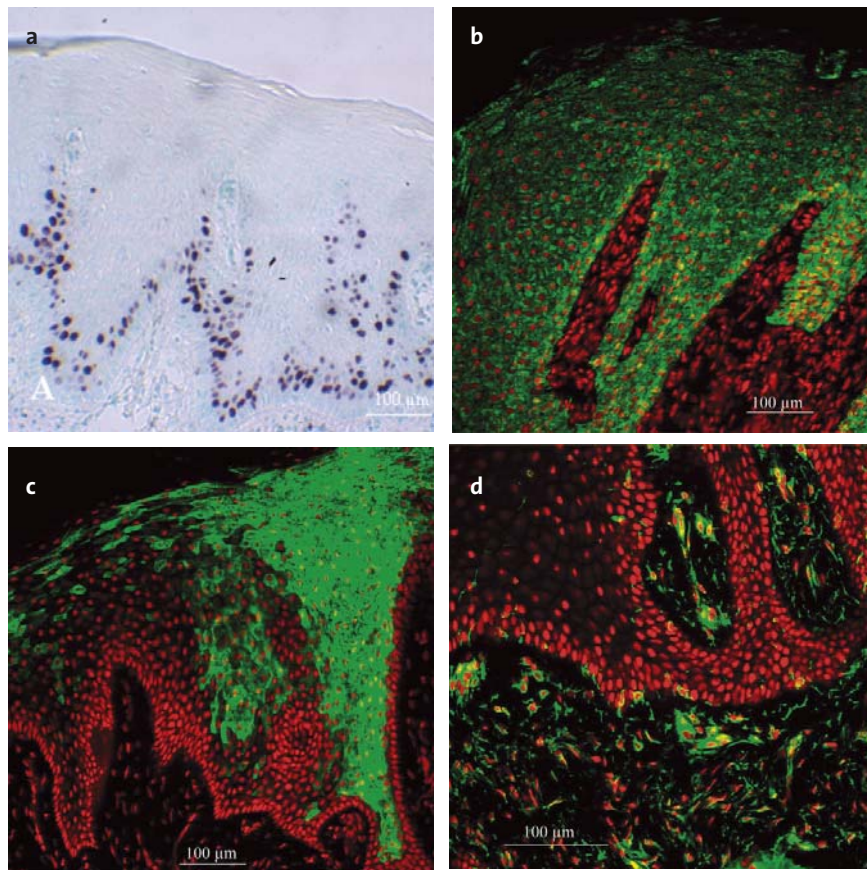
Unlike epidermis, proliferating cells are located in the basal and parabasal cell layers of the gingival epithelium. This is substantiated by the ABC (Avidin-Biotin-Complex) signal

tureller Ebene kann diese BM in eine *Lamina lucida*, die Laminin enthält, und in eine *Lamina densa*, die aus Kollagen Typ-IV besteht, unterteilt werden [33]. Zusätzlich zu Kollagen Typ-IV, das zu den nicht-fibrillären netzwerkbildenden Kollagenen gehört, enthalten das gingivale Bindegewebe und andere parodontale Bindegewebe, einschließlich des Knochens, Kollagen Typ-I [9]. Kollagen Typ-I bildet zusammen mit den Kollagenen Typ-II, -III, -V und -XI die Gruppe der fibrillären Kollagene, deren Hauptfunktion darin besteht, den Geweben mechanische Festigkeit zu verleihen [21]. Neben Proteoglykanen, die einen ubiquitären Bestandteil des Parodontalgewebes darstellen, kommt auch Fibronectin (FN) im parodontalen Bindegewebe, einschließlich PDL und Knochen, vor [23]. Das FN-Gen codiert für verschiedene hochmolekulare Glykoprotein-Isoformen, die durch alternatives Spleißen entstanden sind. Fibronectine vermitteln die Zelladhäsion und beeinflussen die Zellmorphologie, die Migration, die Differenzierung und die Organisation des Zytoskelettes. Fibronectine der Gingiva sind über Kollagenfasern und in unmittelbarer Nachbarschaft zu Blutgefäßen lokalisiert [28]. Unter *In-vitro*-Bedingungen konnte gezeigt werden, dass intaktes Fibronectin die Proliferation und die Chemotaxis von PDL-F unterstützt [13]. Darüber hinaus reagieren PDL-F auf die Applikation mechanischer Kräfte durch einen signifikanten Anstieg in der Produktion von Kollagen Typ-I und Fibronectin [12].

Zell-Matrix-Interaktionen durch Integrine

Fibronectin enthält das Aminosäuremotiv Arg-Gly-Asp, auch bekannt als RGD-Sequenz, und stellt einen EZM-Liganden für eine Vielzahl von Integrin-Rezeptoren dar. Der häufigste Fibronectin-Rezeptor ist Integrin $\alpha 5 \beta 1$, aber auch andere $\beta 1$ -Integrine sind in der Lage, die Zelladhäsion an Fibronectin zu ermöglichen [35]. Fibroblasten im gingivalen Bindegewebe und im PDL, Osteoblasten und Gingiva-Keratinocyten exprimieren Integrin-Rezeptoren, die mit unterschiedlicher Affinität an Fibronectin binden [10, 20, 36].

Generell sind Integrine Heterodimere, die aus einer α - und einer β -Kette bestehen, welche die EZM mit dem Zytoskelett verbinden. Diese Adhäsionsrezeptoren sind für die Organisation des Zytoskelettes und für die Signal-/Mechanotransduktion wichtig, und sie sind auch in die Regulation der Proliferation, Differenzierung, Apoptose und Migration von Zellen involviert (Übersicht siehe [35]). $\beta 1$ -Integrine sind intrazellulär mit Proteinen assoziiert, die den fokalen Adhäsionskomplex bilden. Eines dieser Proteine, die fokale Adhäsionskinase (p125^{FAK}), ist für die Transduktion mechanischer Signale in den Zellkern durch Phosphorylierung von weiter abwärts gelegenen Zielmolekülen verantwortlich. Einzelne Integrin-Untereinheiten und p125^{FAK} zeigen eine Modulation ihrer Expression und ihrer Aktivität, wenn Primärkulturen von Gingiva-Fibroblasten und PDL-F mechanischen Kräften ausgesetzt werden [5, 19].



Figures 1a to 1d. Cellular antigens indicating proliferation and cells of the epithelial and mesenchymal compartment. ABC-staining (avidin-biotin complex) on frozen sections of native gingival tissue reveals that proliferation (detected by Ki-67 antigen) occurs in the basal as well as parabasal cells of the epithelium (a). Indirect immunofluorescence with the use of a K14-specific antibody detecting the carboxy-terminus of the intermediate filament protein yields a green panepithelial K14 fluorescence (b). K13 as indicator of early differentiation in non-keratinized epithelia reveals variable occurrence in the gingival epithelium. While some areas are homogeneously positive from the third suprabasal cell layer on, other parts of the epithelium show columnar or single cell fluorescence (c). Vimentin is mostly restricted to mesenchymal cells in the subgingival connective tissue (d). The red fluorescence indicates nuclear staining. Bars indicate 100 µm with same magnification in prints (a–c), and (d) showing a higher magnification.

Abbildungen 1a bis 1d. Zelluläre Antigene, die Proliferation anzeigen und Zellen aus dem epithelialen und mesenchymalen Kompartiment kennzeichnen. Die ABC-Färbemethode (Avidin-Biotin-Komplex) an Gefrierschnitten von nativem Gingiva-Gewebe zeigt, dass die Proliferation (detektiert über das Ki-67-Antigen) in den basalen und in den parabasalen Zellen des Epithels erfolgt (a). Die indirekte Immunfluoreszenz mit einem K14-spezifischen Antikörper, der den Carboxy-Terminus der Intermediärfilamentproteine

erkennt, führt zu einer grünen panepithelialen K14-Fluoreszenz (b). K13 ist ein Marker für die frühe Differenzierung von nicht keratinisierten Epithelien und zeigt ein variables Erscheinungsbild im Gingiva-Epithel. Während einige Bereiche von der dritten suprabasalen Zellschicht an homogen positiv sind, zeigen andere Regionen eine Fluoreszenz von Zellkolonnen oder einzelnen Zellen (c). Vimentin ist hauptsächlich auf die mesenchymalen Zellen im subgingivalen Bindegewebe beschränkt (d). Die rote Fluoreszenz zeigt die Zellkernfärbung. Die Balken repräsentieren 100 µm mit einer identischen Vergrößerung in den Abbildungen (a–c), und (d) zeigt eine höhere Vergrößerung.

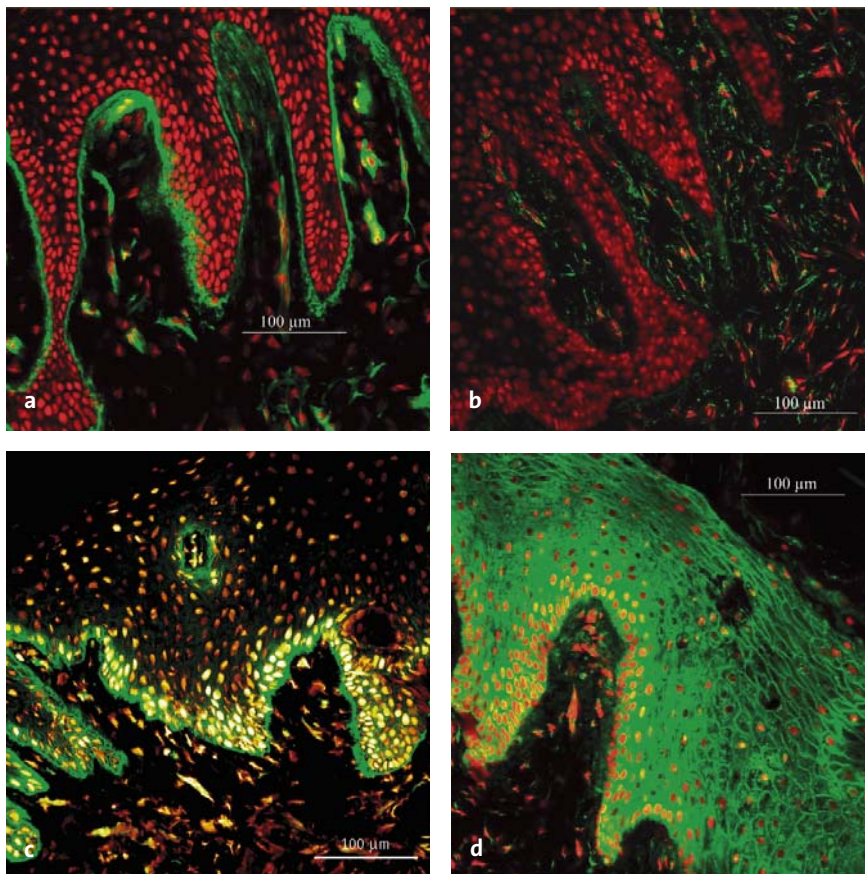
for proliferating cells, which is exclusively visible in the nuclei of cells in the basal cell compartment (Figure 1a). The total amount of this intermediate filament protein can be detected using the specific antibody for the carboxyterminal-end of keratin K14. K14-specific fluorescence is thus not restricted to the basal cell layers, but is also detectable throughout the epithelium (Figure 1b). Depending on the degree of differentiation, keratin K13 exhibits a somewhat even distribution in the differentiated cell layers, while the basal and parabasal layers are negative (Figure 1c). Epithelial sites devoid of K13 are indicated by the red stain of the nuclei only (Figure 1c). This K13-topography shows that this part of the epithelium resembles keratinized gingival tissue. Other parts of the epithelium, where K13 fluorescence is restricted to positive cell columns or individual cells in the uppermost layers, reflect a transition zone from the non-keratinized to the keratinized gingival phenotype (Figure 1c).

Vimentin, the intermediate filament protein of mesenchymal cells, exhibits its abundance in subgingival connective

Im Folgenden wird die Immunlokalisation der oben erwähnten Moleküle in Gewebeproben von nativem Gingiva-Gewebe und von Primärkulturen humaner PDL-F dargestellt und es wird beschrieben, wie diese Moleküle durch die kieferorthopädische Zahnbewegung beeinflusst werden können.

Immunlokalisation zellulärer Moleküle, die zur Aufrechterhaltung parodontaler Gewebe beitragen, erläutert am Beispiel von nativem Gingiva-Gewebe

Im Unterschied zur Epidermis sind proliferierende Zellen im Gingiva-Epithel in basalen und in parabasalen Zellschichten lokalisiert. Dies wird durch das ABC-(Avidin-Biotin-Komplex)-Signal in proliferierenden Zellen deutlich, das ausschließlich in den Zellkernen des Basalzellkompartimentes sichtbar ist (Abbildung 1a). Mit einem spezifischen Antikörper, der gegen den Carboxy-Terminus von Keratin K14 gerichtet ist, kann die gesamte Menge des Intermediärfilamentproteins sichtbar gemacht werden. Deshalb beschränkt sich die K14-spezifische Fluoreszenz nicht auf die basalen Zell-



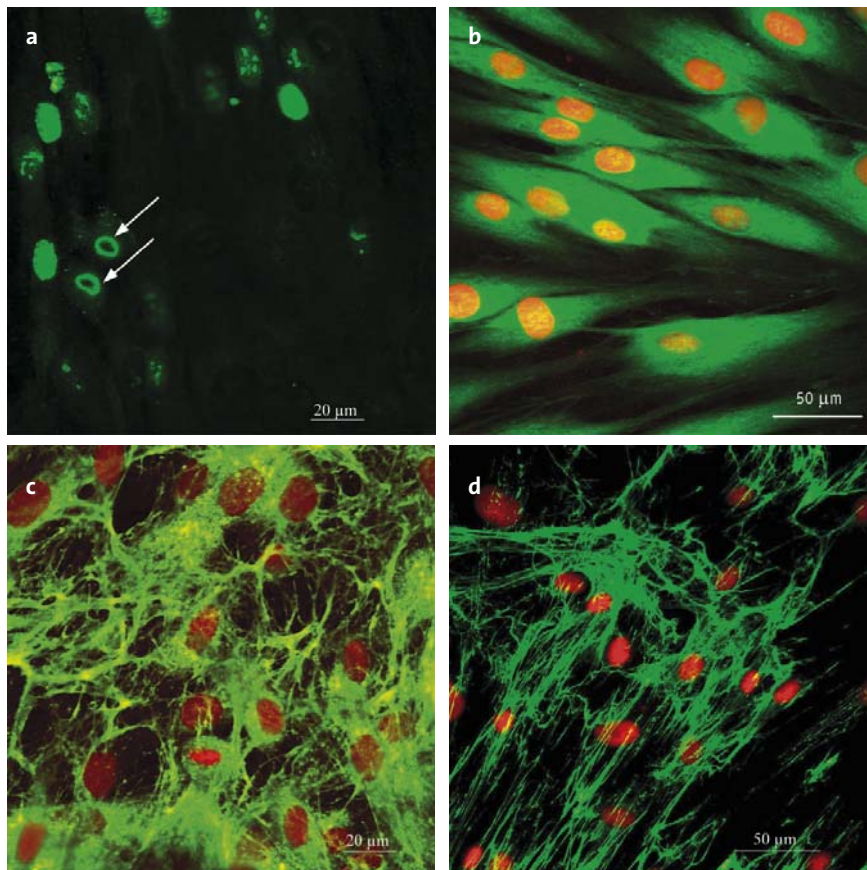
Figures 2a to 2d. Immunohistochemistry for extracellular matrix molecules and constituents of focal contacts. The basement membrane component collagen type-IV is clearly localized at the interface between the epithelium and the gingival connective tissue, but also around blood vessels (a). The high molecular weight glycoprotein fibronectin exhibits a homogenous distribution in the *lamina propria* (b). Among the constituents of focal contacts, integrin $\beta 1$ shows pericellular fluorescence in basal and parabasal cells (c), while p125^{FAK} is visible in the entire epithelium, here decorating the plasma membrane in suprabasal layers (d). The red fluorescence indicates nuclear staining. All prints same magnification and bars indicate 100 μ m.

Abbildungen 2a bis 2d. Immunhistochemie für extrazelluläre Matrix-Moleküle und Komponenten von Fokalkontakten. Die Basalmembran-Komponente Kollagen Typ-IV zeigt eine deutliche Lokalisation am Übergang zwischen Epithel und Gingiva-Bindegewebe, aber auch um Blutgefäße (a). Das hochmolekulare Glykoprotein Fibronektin weist eine homogene Verteilung in der *Lamina propria* auf (b). Von den Komponenten der Fokalkontakte, zeigt Integrin $\beta 1$ eine perizelluläre Fluoreszenz in den basalen und parabasalen Zellen (c), während p125^{FAK} im gesamten Epithel sichtbar ist, und in suprabasalen Zellschichten an der Plasmamembran auftritt (d). Die rote Fluoreszenz zeigt die Zellkernfärbung. Alle Abbildungen haben dieselbe Vergrößerung, die Balken repräsentieren 100 μ m.

tissue, while the epithelium lacks any particular fluorescence (Figure 1d). In terms of extracellular matrix (ECM) proteins, the basement membrane (BM) constituent collagen type-IV can be observed at the interface between the epithelium and connective tissue. This is demonstrated by the largely band-like green fluorescence in the gingival tissue's papillary region (Figure 2a). Moreover, specific fluorescence for this BM-constituent also appears in the subgingival mesenchyme underlying the epithelium – indicating here the proportion of collagen type-IV surrounding the blood vessels (Figure 2a). The glycoprotein fibronectin, associated with collagen fibers and blood vessels, exhibits a ubiquitous presence in the subgingival *lamina propria*. This is reflected by the fine green fluorescence evenly distributed in the connective tissue (Figure 2b). $\beta 1$ -integrins, such as $\alpha 2\beta 1$ and $\alpha 3\beta 1$, facilitate not only cell-matrix-interaction but also intercellular interaction [41]. In the gingival epithelium, the integrin subunit $\beta 1$ reveals a pericellular location in basal and parabasal cells (Figure 2c). In case of cell-matrix-interaction, $\beta 1$ -integrins involved in focal contacts are associated with signal transducing molecules, such as focal adhesion kinase (p125^{FAK}) [6]. In specimens of native gingival tissue, p125^{FAK} is present in all cell layers, being primarily located on the plasma membrane of epithelial keratinocytes (Figure 2d).

schichten, sondern ist im gesamten Epithel nachweisbar (Abbildung 1b). Abhängig vom Grad der Differenzierung zeigt Keratin K13 teilweise eine homogene Verteilung in den differenzierten Zellschichten, während die basalen und die parabasalen Schichten negativ sind (Abbildung 1c). In epithelialen Bereichen, in denen K13 fehlt, ist nur die rote Fluoreszenz der Zellkernfärbung sichtbar (Abbildung 1c). Diese Topographie von K13 zeigt, dass dieser Teil des Epithels keratinisiertes Gingiva-Gewebe darstellt. Andere Teile des Epithels, in denen sich die K13-Fluoreszenz auf Zellkolonnen oder einzelne Zellen in den obersten Schichten beschränkt, zeigen eine Übergangszone vom nicht-keratinisierten zum keratinisierten Gingiva-Phänotyp (Abbildung 1c).

Vimentin, das Intermediärfilamentprotein mesenchymaler Zellen, liegt im subgingivalen Bindegewebe vor, während im Epithel keine spezifische Fluoreszenz sichtbar ist (Abbildung 1d). Was die Proteine der extrazellulären Matrix (EZM) betrifft, ist Kollagen Typ-IV, ein Bestandteil der Basalmembran (BM), am Übergang zwischen Epithel und Bindegewebe zu beobachten. Dies kann durch die größtenteils bandförmige Grünfluoreszenz in der Papillenregion des Gingiva-Gewebes gezeigt werden (Abbildung 2a). Darüber hinaus ist eine spezifische Fluoreszenz dieses Bestandteils der BM auch in dem unterhalb des Epithels liegenden subgingivalen Mesenchym



Figures 3a to 3d. Detection of proliferation, intermediate filaments and ECM molecules in nearly confluent primary cultures of periodontal ligament fibroblasts (PDL-F). The proliferation-associated antigen *Ki-67* shows different stages of nuclear distribution ranging from grains to dots, and arrows indicate two freshly formed nuclei following mitosis (a). Vimentin, the major intermediate filament constituent of mesenchymal cells, is clearly visible in the cytoplasm of all PDL-F (b). Constituents of the PDL's ECM reveal synthesis and apparently extracellular deposition of fibrillar collagen type-I (c), and the high molecular weight glycoprotein fibronectin (d). The red fluorescence indicates nuclear staining. Lower magnification in prints (b+d), bars indicate 50 µm, and higher magnification in (a+c), bar indicates 20 µm.

Abbildungen 3a bis 3d. Nachweis von Proliferation, Intermediärfilamenten und EZM-Molekülen in einer nahezu konfluenten Primärkultur von Parodontalligament-Fibroblasten. Das proliferationsassoziierte Antigen *Ki-67* zeigt verschiedene Stadien der Kernverteilung, die von Körnchen bis hin zu Punkten reichen. Die Pfeile weisen auf zwei neu gebildete Zellkerne nach der Mitose hin (a). Vimentin, die Hauptkomponente des Intermediärfilament-Systems mesenchymaler Zellen ist deutlich im Zytoplasma aller PDL-F zu sehen (b). Die Komponenten der EZM von PDL-F zeigen die Synthese und eine offensichtlich extrazelluläre Deposition von fibrillärem Kollagen Typ-I (c) und dem hochmolekularen Glykoprotein Fibronectin (d). Die rote Fluoreszenz zeigt die Zell-

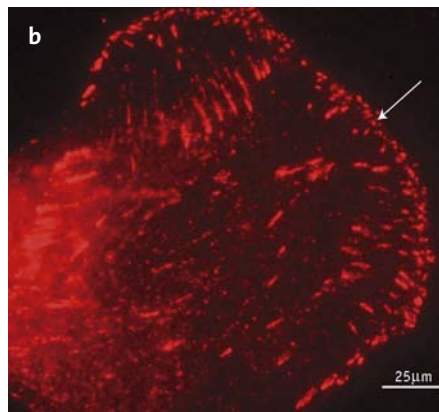
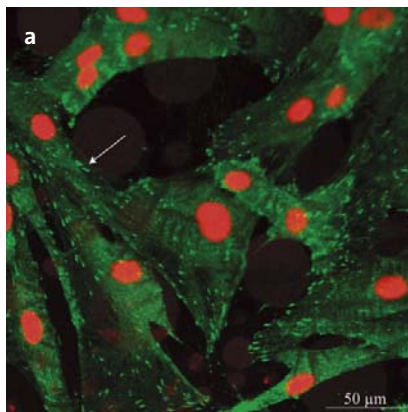
kernfärbung. Geringere Vergrößerung in den Abbildungen (b + d), die Balken zeigen hier 50 µm an; höhere Vergrößerung in (a + c), hier repräsentiert der Balken 20 µm.

Topography of Cellular Molecules Contributing to the Periodontal Tissue Maintenance as Exemplified in Periodontal Ligament Fibroblasts (PDL-F)

Among the periodontal tissues, the periodontal ligament plays a key role in orthodontic tooth movement. Under *in-vitro* conditions molecules contributing to the maintenance of this soft connective tissue can be demonstrated in primary cultures of human PDL-F.

The *Ki-67* antigen, known as a reliable proliferation marker [7], is visible in many cell nuclei (approximately 60–70%, arbitrary estimation) (Figure 3a). This reveals a strong PDL-F proliferation under standard culture conditions. Interestingly, the *Ki-67* antigen's distribution reveals various patterns inside the nuclei, e.g., from condensed large dots to fine grains evenly distributed throughout the entire nucleus (Figure 3a). This pattern variety reflects the cells' different cell-cycle stages in the primary culture we have shown in Figure 3a. Vimentin, the characteristic intermediate filament protein of mesenchymal cells, displays homogenous distribution in primary cultures of PDL-F. The protein is visible in the entire cytoplasm and exhibits a distinct filament structure at the cell extensions (Figure 3b). Considering the ECM

sichtbar, was hier den Anteil von Kollagen Typ-IV anzeigt, der die Blutgefäße umgibt (Abbildung 2a). Das Glykoprotein Fibronectin, das mit Kollagenfasern und Blutgefäßen assoziiert ist, zeigt eine ubiquitäre Verteilung in der subgingivalen *Lamina propria*. Dies wird durch die zarte Grünfluoreszenz angezeigt, die homogen im Bindegewebe verteilt ist (Abbildung 2b). $\beta 1$ -Integrine, wie $\alpha 2\beta 1$ und $\alpha 3\beta 1$ ermöglichen nicht nur Zell-Matrix-Interaktionen, sondern auch Zell-Zell-Interaktionen [41]. Im Gingiva-Epithel lässt die Integrin $\beta 1$ -Untereinheit eine perizelluläre Lokalisation in den basalen und in den parabasalen Zellen erkennen (Abbildung 2c). Bezüglich der Zell-Matrix-Interaktionen sind $\beta 1$ -Integrine, die an Fokalkontakten beteiligt sind, mit Signaltransduktionsmolekülen wie der fokalen Adhäsionskinase ($p125^{FAK}$) assoziiert [6]. In Gewebeproben von nativem Gingiva-Gewebe ist $p125^{FAK}$ in allen Zellschichten vorhanden und liegt hier vor allem an der Plasmamembran epithelialer Keratinozyten vor (Abbildung 2d).



Figures 4a and 4b. Immunocytochemistry for focal adhesion components in nearly confluent PDL-F. In areas of less cell density, the integrin $\beta 1$ subunit, in addition to some cytoplasmic occurrence, is clearly visible at the cell periphery (a, indicated by the arrow). The red fluorescence indicates nuclear staining. A similar topography is seen for p125^{FAK}, as demonstrated on the single cell level (b, see arrow). High power magnification in (b), bar indicates 25 μ m and lower magnification in print (a), bar indicates 50 μ m.

Abbildungen 4a und 4b. Immunzytochemie für fokale Adhäsionskomponenten in einer nahezu konfluenten Kultur von PDL-F. In Bereichen geringer Zelldichte ist die Intergrin- $\beta 1$ -Untereinheit zusätzlich zu ihrer leicht zytoplasmatischen

Verteilung auch deutlich an der Zellperipherie zu sehen (a, durch Pfeil gekennzeichnet). Die rote Fluoreszenz zeigt die Zellkernfärbung. Eine ähnliche Topographie ist für p125^{FAK} zu sehen, wie auf dem Einzelzellniveau sichtbar ist (b, siehe Pfeil). Hohe Vergrößerung in Abbildung (b), hier repräsentiert der Balken 25 μ m; niedrigere Vergrößerung in Abbildung (a): Balken 50 μ m.

molecules, PDL-F cell cultures exhibit particularly large amounts of collagen type-I (Figure 3c) and fibronectin (Figure 3d). Synthesis of both molecules can be observed in the nearly confluent stage, and the topography indicates their deposition at extracellular sites. This is reflected by the network of collagen type-I and fibronectin fibers (Figures 3c and 3d) that seem to overlie the PDL cells. In addition to molecules of the PDL-extracellular matrix, the fluorescence also demonstrates the presence of constituents of the focal adhesion complex, the integrin subunit $\beta 1$ and p125^{FAK} (Figures 4a and 4b). Besides being cytoplasmically-distributed, integrin $\beta 1$ (Figure 4a) and p125^{FAK} (Figure 4b) show distinct immunolocalization at the cell periphery. Inside the PDL, integrin $\beta 1$ facilitates the adhesion of PDL-F to ECM molecules such as collagen, laminin, and fibronectin.

Molecules Contributing to Periodontal Tissue Maintenance and their Possible Relationship to Orthodontic Tooth Movement

Ki-67: A Nuclear Antigen to Detect Proliferation

Cell proliferation is an essential prerequisite for the maintenance and function of self-renewing tissues such as the periodontal ligament and gingiva. Under normal conditions, all the cells that are lost in the gingival epithelium due to terminal differentiation are replaced by cells from the proliferatively-less-differentiated cell layers. This balance of proliferation and differentiation is called tissue homeostasis [30]. Unlike in the epidermis, where proliferation is primarily restricted to the basal layer [4], proliferation in oral epithelia occurs in the basal and parabasal layers (i.e. the first suprabasal cell layers) of the basal cell compartment [34]. Here, ABC-staining reveals detection of the Ki-67 antigen, generally used as a reliable proliferation marker in basal and parabasal cells of the gingival epithelium. In primary cultures of human PDL-F, the Ki-67 antigen re-

Topographie zellulärer Moleküle die zur Aufrechterhaltung parodontaler Gewebe beitragen, erläutert an Parodontalligamentfibroblasten (PDL-F)

Von den parodontalen Geweben ist das Parodontalligament wesentlich an der kieferorthopädischen Zahnbewegung beteiligt. Unter *In-vitro*-Bedingungen können Moleküle, die zum Erhalt dieses Bindegewebes beitragen, in Primärkulturen humaner PDL-F dargestellt werden. Das Ki-67-Antigen, das als zuverlässiger Proliferationsmarker bekannt ist [7], ist in vielen Zellkernen sichtbar (ca. 60–70%, ungefähre Schätzung) (Abbildung 3a). Dies lässt eine starke Proliferation von PDL-F unter Standardkulturbedingungen erkennen. Interessanterweise zeigt das Ki-67-Antigen ein unterschiedliches Verteilungsmuster innerhalb der Zellkerne, von kondensierten großen Punkten bis hin zu feinen Körnchen, die über den ganzen Zellkern verteilt sind (Abbildung 3a). Diese Variation im Muster reflektiert verschiedene Stadien des Zellzyklus der Zellen in der in Abbildung 3a dargestellten Primärkultur. Vimentin, das charakteristische Intermediärfilamentprotein mesenchymaler Zellen, zeigt eine homogene Verteilung in Primärkulturen von PDL-F. Das Protein ist im gesamten Zytoplasma sichtbar und weist an den Zellausläufern eine deutliche Filament-Struktur auf (Abbildung 3b). Betrachtet man die EZM-Moleküle, so zeigen PDL-F-Zellkulturen eine ausgesprochen große Menge an Kollagen Typ-I (Abbildung 3c) und Fibronectin (Abbildung 3d). Im nahezu konfluenten Stadium kann die Synthese beider Moleküle beobachtet werden und die Topographie weist auf ihre extrazelluläre Ablagerung hin. Dies zeigt sich im Netzwerk aus Fasern von Kollagen Typ-I und Fibronectin (Abbildungen 3c und 3d), die augenscheinlich den PDL-Zellen aufliegen. Die Fluoreszenz zeigt zusätzlich zu den Molekülen der extrazellulären Matrix des PDL auch die Anwesenheit von Bestandteilen des fokalen Adhäsionskomplexes, der Integrin-

veals various nuclear distribution patterns. This finding is in line with *Ki-67* expression studies on early mouse development, indicating that this pattern variation results from *Ki-67*'s association with different nuclear domains, and reflects different stages in the cell cycle [39]. Regarding proliferation in periodontal tissues following the application of orthodontic mechanical forces *in-vivo* and *in-vitro* studies have presented controversial results. In the dentogingival junction zone of rats, a decrease in proliferation was observed in the junctional epithelium between the second and third molars on both the pressure and tension sites [42]. On the other hand, mechanical stretching led to an increase in DNA synthesis in cultured human PDL-F [14].

Intermediate Filaments (IFs) as Characteristics of Epithelium and Mesenchyme

Intermediate filaments are major constituents of the cellular cytoskeleton, made up of various solid and non-solid tissues including epithelia, the periodontal connective tissues, and bone. Intermediate filaments play an important role in vital mechanical and biological functions such as cell contractility, migration, stiffness, and proliferation [38]. In stratified epithelia, the intermediate filament proteins are called keratins and represent a protein family of around 30 polypeptides [31]. They can be used to both prove the epithelial nature of a cell and serve as markers of certain stages of keratinocyte differentiation. Keratins K5 and K14 are commonly expressed in the basal cell compartment of all complex epithelia, which also harbor the proliferating cells. The keratins K1 and K10 predominate in keratinized epithelia (e.g. skin, hard palate) in the suprabasal cell layers, where cell differentiation occurs, while K4 and K13 indicate early differentiation in non-keratinized epithelia (e.g. buccal mucosa, sulcular gingival epithelium) [4]. K14 fluorescence reveals the abundance of this IF in the entire gingival epithelium. This panepithelial presence of the protein results from the antibody-specific recognition of the K14 protein's carboxy-terminus. Since the K14's carboxy-terminus is not degraded during migration of the keratinocytes from the basal to the uppermost suprabasal epithelial layers, the antibody, in addition to recognizing newly synthesized protein in the basal layers, also recognizes the protein proportion in suprabasal cells. Hence, when using this antibody, K14 can serve as a structural marker to visualize the entire epithelium. Interestingly, the pattern visible for K13 varies in the gingival tissue specimens shown. While the suprabasal compartment is somewhat homogeneously positive, other epithelial areas revealed the presence of K13 only in columns or individual cells. This topographic pattern of K13 indicates a transition of the gingival epithelium from the non-keratinized (homogenous K13) to the keratinized phenotype (diminution of K13). Although numerous *in-vivo* and *in-vitro* studies have investigated the response of PDL and alveolar bone or their cellular counter-

$\beta 1$ -Untereinheit und p125^{FAK} (Abbildungen 4a und 4b.) Neben ihrer zytoplasmatischen Verteilung zeigen Integrin $\beta 1$ (Abbildung 4a) und p125^{FAK} (Abbildung 4b) eine deutliche Immunlokalisation an der Zellperipherie. Im PDL ermöglicht Integrin $\beta 1$ die Adhäsion von PDL-F an EZM-Moleküle wie Kollagen, Laminin und Fibronektin.

Moleküle, die an der Aufrechterhaltung parodontaler Gewebe beteiligt sind und ihre mögliche Verbindung zur orthodontischen Zahnbewegung

Ki-67: Ein nukleäres Antigen zur Detektion der Proliferation

Die Zell-Proliferation ist eine notwendige Grundvoraussetzung für die Aufrechterhaltung und Funktion von sich regenerierenden Geweben wie dem Parodontalligament und der Gingiva. Unter normalen Bedingungen werden alle Zellen, die im Gingiva-Epithel durch terminale Differenzierung verloren gehen, durch Zellen aus weniger differenzierten Zellschichten ersetzt. Dieses Gleichgewicht zwischen Proliferation und Differenzierung bezeichnet man als Gewebshomöostase [30]. Im Unterschied zur Epidermis, in der die Proliferation hauptsächlich auf die basalen Zellschichten beschränkt ist [4], findet die Proliferation in oralen Epithelien in basalen und parabasalen Zellschichten (z.B. den ersten suprabasalen Zellschichten) des Basalzellkompartimentes statt [34]. Die ABC-Färbung zeigt in diesem Zell-Kompartiment die Detektion des *Ki-67*-Antigens, welches standardmäßig als verlässlicher Proliferationsmarker in basalen und parabasalen Zellen des Gingiva-Epithels verwendet wird. In Primärkulturen von humanen PDL-F zeigt das *Ki-67*-Antigen verschiedene nukleäre Verteilungsmuster. Diese Erkenntnis steht im Einklang mit *Ki-67*-Expressionsstudien während der frühen Entwicklungsstadien der Maus, in der diese unterschiedlichen Muster aus der Assoziation von *Ki-67* mit verschiedenen nukleären Domänen resultieren und unterschiedliche Stadien des Zellzyklus reflektieren [39]. Betrachtet man die Proliferation in parodontalen Geweben nach der Applikation von orthodontischen mechanischen Kräften, so zeigen *In-vitro*- und *In-vivo*-Studien kontroverse Ergebnisse. Bei Ratten wurde im dentogingivalen Bereich zwischen dem zweiten und dritten Molaren im Saume epithel eine verminderte Proliferation an der Druck- und an der Zugseite beobachtet [42]. Andererseits führte mechanische Dehnung in humanem PDL-F zu einem Anstieg der DNA-Synthese [14].

Intermediärfilamente (IF) als charakteristisches Merkmal des Epithels und des Mesenchyms

Intermediärfilamente sind die Hauptbestandteile des Zytoskeletts der Zellen, die verschiedene Weich- und Hartgewebe wie Epithelien, das parodontale Bindegewebe und den Knochen bilden. Diese Intermediärfilamente spielen eine wichtige Rolle bei mechanischen und biologischen Funktionen, bei der Zell-Kontraktion, Migration, Stabilität

parts to orthodontic mechanical forces, little is known about the gingival response. Despite this lack of knowledge, a significant gingival response has been observed in patients in whom one tooth was distally retracted from the neighboring tooth. Within a 4.5-month observation period, a well-defined triangular patch had formed, prior to a detachment of the epithelium from the tooth. Concomitantly, a crease had developed on the distal aspect of the tooth [2]. On the cellular level, one study has recently shown that the continuous mechanical *in-vitro* stretching of epidermal keratinocytes leads to the activation of signal transduction pathways via phosphorylation of the epidermal growth factor receptor and the kinases ERK1/2. Moreover, stretching causes a marked increase in cell proliferation [40]. Although this study had employed dermal keratinocytes, it is conceivable that mechanical stretching exerts similar effects on gingival keratinocytes. The frequently observed expression of vimentin in the connective tissue of native gingival tissue specimens demarcates cells of mesenchymal origin, since vimentin is the major structural component of the IF system in those cells. Thus, our primary PDL-F cell cultures exhibited a homogenous green fluorescence upon incubation with the vimentin-specific antibody. Regarding force application, another study reported that endothelial cells exposed to shear stress respond with a displacement of the vimentin IF-system, indicating a mechanical deformation or strain. Onset of shear forces induced an increase in IF strain present in the cell's cytoplasm but tending to be near the nuclear boundary [11]. These experiments seem to support the hypothesis that mechanical forces lead to a deformation of the cytoskeletal IF system and the induction of IF strain in the tissue cells affected by orthodontic tooth movement.

Constituents of ECM and Focal Contacts in Periodontal Tissues

The BM-constituent collagen type-IV in native gingival tissue was displayed in both the BM underneath the gingival epithelium and the basement membrane surrounding the blood vessels in the subgingival connective tissue. In the normal *basal laminae* of adults, collagen type-IV and other BM constituents such as laminin-1 and nidogen-1 prevail [18]. Although there are no *in-vivo* studies on the response of the above-mentioned BM constituents following orthodontic force, one can hypothesize from observing the gingival response already described in patients that the BM underneath the gingival epithelium may also respond to orthodontic tooth movement. Other ECM components in the periodontium are represented by the fibrillar collagen type-I and the high molecular weight glycoprotein fibronectin, the latter detected in both the connective tissue of native gingiva and primary PDL cell cultures. Collagen type-I is the main collagen found in the ECM of periodontal connective tissues; it helps to stabilize the tissues [21]. In the

und Proliferation [38]. In stratifizierten Epithelien bezeichnet man die Intermediärfilamente als Keratine, die sich aus einer Proteinfamilie von ca. 30 verschiedenen Polypeptiden zusammensetzen [31]. Sie können verwendet werden, um die epitheliale Herkunft einer Zelle zu belegen; weiterhin dienen sie als Marker von bestimmten Keratinozyten-Differenzierungsstadien. Die Keratine K5 und K14 werden allgemein im Basalzellkompartiment aller komplexen Epithelien exprimiert, das darüber hinaus auch die proliferierenden Zellen beherbergt. In den suprabasalen Zellschichten, wo die Zelldifferenzierung abläuft, werden die Keratine K1 und K10 hauptsächlich in keratinisierten Epithelien exprimiert (z.B. Haut oder harter Gaumen), während K4 und K13 die frühe Differenzierung in nicht-keratinisierten Epithelien anzeigt (z.B. Wangenschleimhaut, gingivales Saume epithel) [4]. Die K14-Fluoreszenz zeigt die Abundanz dieses IF im Gingiva-Epithel. Diese panepitheliale Verteilung des Proteins resultiert aus der antikörperspezifischen Erkennung des Carboxy-Terminus des K14-Proteins. Da der K14-Carboxy-Terminus während der Migration der Zellen von den basalen zu den obersten suprabasalen Zellschichten nicht degradiert wird, detektiert der Antikörper zusätzlich zu dem neu synthetisierten Protein in den basalen Zellschichten auch die Proteine in den suprabasalen Zellen. Daher kann dieser Antikörper als Strukturmarker für die Visualisierung des gesamten Epithels verwendet werden. Interessanterweise ist das für K13 detektierte Muster unterschiedlich in den abgebildeten Gingiva-Gewebeproben. Während das suprabasale Kompartiment bis zu einem gewissen Grad gleichmäßig positive Signale zeigt, ist in anderen Bereichen des Epithels die Gegenwart von K13 nur säulenförmig oder in einzelnen Zellen zu sehen. Dieses Muster der K13-Topographie deutet auf einen Übergang des Gingiva-Epithels vom nicht-keratinisierten Phänotyp hin (verminderte K13-Expression). Obwohl zahlreiche *In-vitro*- und *In-vivo*-Studien zur Reaktion des PDLs und des Alveolarknochens oder ihrer entsprechenden Zellen auf orthodontisch mechanische Kräfte vorliegen, ist noch wenig über die Reaktion der Gingiva auf diese Kräfte bekannt. Trotz dieser geringen Kenntnisse wurde eine signifikante Reaktion der Gingiva bei Patienten beobachtet, bei denen ein Zahn von seinem benachbarten Zahn nach distal bewegt wurde. Während einer Beobachtungsperiode von 4,5 Monaten entstand ein gut definierter dreieckiger Bereich, dem eine Ablösung der epithelialen Anheftung vom Zahn vorausgegangen war. Gleichzeitig hatte sich im distalen Bereich des Zahnes ein faltiger Wulst gebildet [2]. Auf zellulärer Ebene wurde erst kürzlich für epidermale Hautkeratinozyten berichtet, dass eine kontinuierliche mechanische Dehnung *in vitro* zu einer Aktivierung des Signaltransduktionsweges über die Phosphorylierung des epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptors und der Kinasen ERK1/2 führt. Darüber hinaus verursacht Dehnung einen drastischen Anstieg der Zellproliferation [40]. Ob-

periodontium and other tissues, fibronectins are important in promoting cell adhesion, thereby affecting cell morphology, migration, differentiation, and cytoskeletal organization [26]. Intact fibronectin can induce an increase in proliferation in PDL cells in cell cultures [13]. Both ECM molecules seemed to exhibit an extracellular deposition in our PDL-F cultures, proving that this cell-type makes an essential contribution to the presence of these matrix components in the periodontal ligament. *In-vitro* studies conducted on PDL-F have demonstrated an increase in collagen type-I- and fibronectin-expression on both the *mRNA* gene transcription and the protein expression level following mechanical loading [12, 22]. Although these studies suggest a potential increase in matrix synthesis associated with orthodontic forces, other reports obtained from cell culture and animal experiments add to the growing body of evidence that degradation of ECM may also occur as a result of force application to the periodontium. It has been observed in rats that tooth movement leads to an increase in the gene expression of matrix metalloproteinases (MMPs)-8 and -13 in periodontal connective tissues; both MMPs cleave fibrillar collagens such as collagen type-I, which is highly abundant in the PDL and gingival connective tissue [32]. Mechanical *in-vitro* stretching of PDL-F and gingival fibroblasts (GF) led to an induction of *mRNAs* encoding for MMP-1 and -2 [5]. MMP-2 which not only degrades fibrillar collagens, but the network-forming collagen type-IV, present in the gingival basement membrane as well [37]. Other molecules obviously affected by mechanical forces are integrins, which facilitate cell adhesion to ECM molecules and are involved in signal-/mechanotransduction. In cell cultures of PDL-F and GF, both cell types revealed an increase in the *mRNA* gene transcription of the integrin $\beta 1$ subunit following the application of mechanical stretch [5]. As demonstrated in this review, the integrin subunit $\beta 1$ is present in basal and parabasal cells of the gingival epithelium, indicating binding of ECM ligands located at both subepithelial and intra-epithelial sites. In this context, $\beta 1$ -ligands located in the subepithelial ECM are collagen, laminin, fibronectin, and tenascin [35], while syndecan stands out as an intraepithelial ECM ligand [27]. $\beta 1$ -integrins are known to be involved in the formation of focal contacts [15], where the integrins' cytoplasmic parts are linked to cytoskeletal components via bridging molecules such as focal adhesion kinase. In the present illustrations, p125^{FAK} was revealed to be located at the cell periphery primarily, as indicated by the plasma membrane-associated fluorescence in the native gingival epithelium and the fluorescence signal at the cell periphery in PDL-F cell cultures. This kinase becomes activated by tyrosine phosphorylation upon binding of $\beta 1$ -integrins to an ECM ligand and thus triggers signal-/mechanotransduction. In primary PDL-F cultures, an increase in p125^{FAK}-activation was detected when these cells were subjected to mechanical strain [19]. This force-depen-

wohl diese Studie sich mit Hautkeratinozyten beschäftigte, kann darüber spekuliert werden, ob mechanische Dehnung ähnliche Effekte in Gingiva-Keratinocyten hervorruft. Die weithin sichtbare Expression von Vimentin im Bindegewebe von nativen Gingiva-Gewebeproben kennzeichnet Zellen mesenchymalen Ursprungs, da Vimentin die Hauptstrukturkomponente des IF-Systems in diesen Zellen darstellt. Dadurch zeigen auch die primären PDL-F-Zellen eine homogene grüne Fluoreszenz nach Inkubation mit einem Vimentin-spezifischen Antikörper. In Bezug auf die Applikation von Kräften wurde erst kürzlich berichtet, dass Endothelzellen, die Scherkräften ausgesetzt waren, mit einer Verformung des Vimentin-IF-Systems reagieren, die durch eine mechanische Deformation oder Dehnung zustande kommt. Das Anlegen einer Scherkraft induziert eine vermehrte IF-Verformung im Zytoplasma, hier jedoch vorzugsweise in der Nähe des Zellkerns [11]. Basierend auf diesen Experimenten erscheint es möglich, dass mechanische Kräfte zur Deformation des Zytoskelett-IF-Systems und zur Induktion einer IF-Verformung in den Zellen derjenigen Gewebe führen, die von der orthodontischen Zahnbewegung betroffen sind.

Bestandteile der extrazellulären Matrix und der Fokalkontakte in parodontalen Geweben

Die BM-Komponente Kollagen Typ-IV im nativen Gingiva-Gewebe zeigt sowohl die Basalmembran unterhalb des Gingiva-Epithels an als auch die Basalmembran, die die Blutgefäße im subgingivalen Bindegewebe umgibt. In den regulär gebildeten *Basallaminae* von Erwachsenen sind Kollagen Typ-IV und weitere Bestandteile der Basalmembran wie Laminin-1 und Nidogen-1 vorhanden [18]. Bisher fehlen allerdings *In-vivo*-Studien über eine Antwort der oben erwähnten BM-Bestandteile auf kieferorthopädische Kräfte. Dennoch kann durch vorhergehend beschriebene Reaktionen der Gingiva, die bei Patienten beobachtet wurden, angenommen werden, dass die BM unter dem Gingiva-Epithel auch auf die kieferorthopädischen Zahnbewegungen reagiert. Andere Komponenten der EZM des Parodonts werden durch das fibrilläre Kollagen Typ-I und das hochmolekulare Glykoprotein Fibronectin repräsentiert, wobei Letzteres sowohl im Bindegewebe der nativen Gingiva als auch in Primärkulturen des PDL nachgewiesen wurde. Kollagen Typ-I ist das häufigste Kollagen, das in der EZM von parodontalem Bindegewebe gefunden wird und trägt zur Gewebestabilität bei [21]. Sowohl im Parodont als auch in anderen Geweben sind Fibronektine wichtig, um die Zell-Adhäsion zu fördern; sie beeinflussen dadurch die Zellmorphologie, die Migration, die Differenzierung und die Organisation des Zytoskelettes [26]. In der Zellkultur ist Fibronectin in der Lage, einen Anstieg der Proliferation von PDL-Zellen zu induzieren [13]. Beide EZM-Moleküle weisen augenscheinlich eine extrazelluläre Ablagerung in unseren PDL-F-Kulturen auf, was beweist,

dent activation of p125^{FAK} may represent a modulation of mechanotransduction inside the cells of the PDL during orthodontic tooth movement.

Conclusion

In summary, we have described the expression and topography of a number of molecules which contribute to the maintenance and function of the periodontal tissues. Moreover, we have discussed their biological function in terms of tissue maintenance, and reviewed the literature to aid in defining their potential role during orthodontic tooth movement. The progressive characterization of molecules will thus lead to better understanding of the molecular basis of orthodontic tooth movement.

References

1. Abiko Y, Hiratsuka K, Kiyama-Kishikawa M, et al. Profiling of differentially expressed genes in human gingival epithelial cells and fibroblasts by DNA microarray. *J Oral Sci* 2004;46:19–24.
2. Atherton JD. The gingival response to orthodontic tooth movement. *Am J Orthod* 1970;58:179–86.
3. Bartold PM, Walsh LJ, Narayanan AS. Molecular and cell biology of the gingiva. *Periodontol* 2000;24:28–55.
4. Bloor BK, Tidman N, Leigh IM, et al. Expression of Keratin K2e in cutaneous and oral lesions: association with keratinocyte activation, proliferation, and keratinisation. *Am J Pathol* 2003;162:963–75.
5. Bolcato-Bellemin AL, Elkaim R, Abehsera A, et al. Expression of mRNAs encoding for alpha and beta integrin subunits, MMPs, and TIMPs in stretched human periodontal ligament and gingival fibroblasts. *J Dent Res* 2000;79:1712–6.
6. Danker K, Gabriel B, Heidrich C, et al. Focal adhesion kinase pp125^{FAK} and the beta 1 integrin subunit are constitutively complexed in HaCaT cells. *Exp Cell Res* 1998;239:326–31.
7. Endl E, Gerdes J. The Ki-67 protein: fascinating forms and an unknown function. *Exp Cell Res* 2000;257:231–7.
8. Fuchs E, Weber K. Intermediate filaments: structure, dynamics, function and disease. *Annu Rev Biochem* 1994;63:345–82.
9. Fujita T, Shiba H, Sakata M, et al. SPARC stimulates the synthesis of OPG/OCIF, MMP-2 and DNA in human periodontal ligament cells. *J Oral Pathol Med* 2002;31:345–52 (Erratum in: *J Oral Pathol Med* 2002 ;31:504).
10. Gurses N, Thorup AK, Reibel J, et al. Expression of VLA-integrins and their related basement membrane ligands in gingiva from patients of various periodontitis categories. *J Clin Periodontol* 1999;26:217–24.
11. Helmke BP, Rosen AB, Davies PF. Mapping mechanical strain of an endogenous cytoskeletal network in living endothelial cells. *Biophys J* 2003;84:2691–9.
12. Howard PS, Kucich U, Taliwal R, et al. Mechanical forces alter extracellular matrix synthesis by human periodontal ligament fibroblasts. *J Periodontol* 1998;33:500–8.
13. Kapila YL, Lancero H, Johnson PW. The response of periodontal ligament cells to fibronectin. *J Periodontol* 1998;69:1008–19.
14. Kletsas D, Basdra EK, Papavassiliou AG. Mechanical stress induces DNA synthesis in PDL fibroblasts by a mechanism unrelated to autocrine growth factor action. *FEBS Lett* 1998;430:358–62.
15. Kreis S, Schonfeld HJ, Melchior C, et al. The intermediate filament protein vimentin binds specifically to a recombinant integrin alpha2/beta1 cytoplasmic tail complex and co-localizes with native

dass dieser Zelltyp essentiell zur Präsenz dieser Matrixkomponenten im Parodontalligament beiträgt. *In-vitro*-Studien an PDL-F haben nach mechanischer Belastung einen Anstieg in der Expression von Kollagen Typ-I und Fibronektin sowohl auf Transkriptions- als auch auf Proteinebene gezeigt [12, 22]. Obwohl diese Studien einen Zusammenhang zwischen der kieferorthopädischen Zahnbewegung und einem möglichen Anstieg in der Matrix-Synthese nahe legen, häuften sich die Hinweise aus anderen Studien, die auf Zellkultur- und Tierexperimenten basieren, dass Degradation von EZM ebenfalls als Ergebnis der Kraftapplikation auf das Parodont auftreten kann. An Ratten konnte beobachtet werden, dass die Zahnbewegung zu einem Anstieg in der mRNA-Gen-Transkription der Matrixmetalloproteinase (MMP)-8 und -13 im parodontalen Bindegewebe führt; beide MMPs spalten fibrilläres Kollagen wie das Kollagen Typ-I, das in großen Mengen im PDL und im gingivalen Bindegewebe vorhanden ist [32]. *In vitro* führte die mechanische Dehnung von PDL-F und Gingiva-Fibroblasten (GF) zu einer vermehrten mRNA-Synthese, die für MMP-1 und -2 kodieren [5]. MMP-2, das nicht nur das fibrilläre Kollagen, sondern auch das netzwerkbildende Kollagen Typ-IV degradiert, ist in der Basalmembran lokalisiert [37]. Andere Moleküle, die offensichtlich durch mechanische Kräfte beeinflusst werden, sind Integrine, welche die Zell-Adhäsion zu EZM-Molekülen ermöglichen und auch in die Signal-/Mechanotransduktion involviert sind. In Zellkulturen von PDL-F und GF ließen beide Zelltypen nach mechanischer Dehnung einen Anstieg in der mRNA-Gen-Transkription der Integrin- β 1-Untereinheit erkennen [5]. Wie in diesem Übersichtsartikel exemplarisch dargestellt, tritt die Integrin- β 1-Untereinheit in basalen sowie in parabasalen Zellen des Gingiva-Epithels auf. Dies zeigt, dass sie EZM-Liganden bindet, die in subepithelialen, aber auch in intraepithelialen Bereichen lokalisiert sind. In diesem Zusammenhang stellen Kollagen, Laminin, Fibronektin und Tenascin β 1-Liganden dar, die in der subepithelialen EZM lokalisiert sind [35], während sich Syndecan als ein intraepithelialer EZM-Ligand auszeichnet [27]. β 1-Integrine sind bekanntlich am Aufbau von Fokalkontakten beteiligt [15], in denen die zytoplasmatischen Teile der Integrine über Brückenmoleküle wie die fokale Adhäsionskinase mit den Bestandteilen des Zytoskelettes verbunden sind. In den gezeigten Abbildungen ist p125^{FAK} überwiegend an der Zellperipherie lokalisiert, wie an der Plasmamembran-assoziierten Fluoreszenz im nativen Gingiva-Epithel und an der Zellperipherie in den PDL-F-Zellkulturen zu erkennen ist. Diese Kinase wird durch Tyrosinphosphorylierung nach Bindung des β 1-Integrins an einen EZM-Liganden aktiviert und veranlasst hierdurch die Signal-/Mechanotransduktion. In Primärkulturen von PDL-F wurde ein Anstieg der Aktivierung von p125^{FAK} nachgewiesen, wenn diese Zellen mechanischer Belastung ausgesetzt waren [19]. Diese kraftabhängige Aktivierung von p125^{FAK}

- alpha2/beta1 in endothelial cell focal adhesions. *Exp Cell Res* 2005;305:110–21.
16. Lloyd C, Yu QC, Cheng J, et al. The basal keratin network of stratified squamous epithelia: defining K15 function in the absence of K14. *J Cell Biol* 1995;129:1329–44.
17. Meazzini MC, Toma CD, Schaffer JL, et al. Osteoblast cytoskeletal modulation in response to mechanical strain in vitro. *J Orthop Res* 1998;16:170–80.
18. Miosge N, Heinemann S, Leissling, et al. Ultrastructural triple localization of laminin-1, nidogen-1, and collagen type IV helps elucidate basement membrane structure in vivo. *Anat Rec* 1999;254:382–8.
19. Molina T, Kabsch K, Alonso A, et al. Topographic changes of focal adhesion components and modulation of p125^{FAK} activation in stretched human periodontal ligament fibroblasts. *J Dent Res* 2001;80:1984–9.
20. Nakayama S, Okada Y, Saito K, et al. Beta1 integrin/focal adhesion kinase-mediated signaling induces intercellular adhesion molecule 1 and receptor activator of nuclear factor kappaB ligand on osteoblasts and osteoclast maturation. *J Biol Chem* 2003;278:45368–74.
21. Narayanan AS, Hassell TM. Characterization of collagens in phenytoin-enlarged human gingiva. *Coll Relat Res* 1985;5:513–8.
22. Ozaki S, Kaneko S, Podyma-Inoue KA, et al. Modulation of extracellular matrix synthesis and alkaline phosphatase activity of periodontal ligament cells by mechanical stress. *J Periodontol Res* 2005;40:110–7.
23. Pitaru S, Aubin JE, Bhargava U, et al. Immunoelectron microscopic studies on the distributions of fibronectin and actin in a cellular dense connective tissue: the periodontal ligament of the rat. *J Periodontol Res* 1987;22:64–74.
24. Poggi P, Rota MT, Boratto R. The volatile fraction of cigarette smoke induces alterations in the human gingival fibroblast cytoskeleton. *J Periodontol Res* 2002;37:230–5.
25. Shapiro F, Cahill C, Malatantis G, et al. Transmission electron microscopic demonstration of vimentin in rat osteoblast and osteocyte cell bodies and processes using the immunogold technique. *Anat Rec* 1995;241:39–48.
26. Smith JC, Symes K, Hynes RO, et al. Mesoderm induction and the control of gastrulation in *Xenopus laevis*: the roles of fibronectin and integrins. *Development* 1990;108:229–38.
27. Sobel G, Szabo I, Paska C, et al. Changes of cell adhesion and extracellular matrix (ECM) components in cervical intraepithelial neoplasia. *Pathol Oncol Res* 2005;11:26–31.
28. Sonmez S, Canda T, Ozkara E, et al. Quantitative evaluation of the vasculature and fibronectin localization in gingival connective tissue of smokers and non-smokers. *J Periodontol* 2003;74:822–30.
29. Squier CA, Johnson NW, Hopps RM. Human oral mucosa: Development, structure and function. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1976:7–44.
30. Stark HJ, Willhauck MJ, Mirancea N, et al. Authentic fibroblast matrix in dermal equivalents normalises epidermal histogenesis and dermoepidermal junction in organotypic co-culture. *Eur J Cell Biol* 2004;83:631–45.
31. Sun TT, Tseng SC, Huang AJ. Monoclonal antibody studies of mammalian epithelial keratins: a review. *Ann N Y Acad Sci* 1985;455:307–29.
32. Takahashi I, Nishimura M, Onodera K, et al. Expression of MMP-8 and MMP-13 genes in the periodontal ligament during tooth movement in rats. *J Dent Res* 2003;82:646–51.
33. Tomakidi P, Fusenig NE, Kohl A, et al. Histomorphological and biochemical differentiation capacity in organotypic co-cultures of primary gingival cells. *J Periodontol Res* 1997;32:388–400.
34. Tomakidi P, Breitzkreutz D, Fusenig NE, et al. Establishment of oral mucosa phenotype in vitro in correlation to epithelial anchorage. *Cell Tissue Res* 1998;292:355–66.

kann eine Modulation der Mechanotransduktion innerhalb der Zellen des PDL während der kieferorthopädischen Zahnbewegung reflektieren.

Schlussfolgerung

Zusammenfassend wurden hier die Expression und die Topographie einer Anzahl von Molekülen beschrieben, die zur Aufrechterhaltung und zur Funktion der parodontalen Gewebe beitragen. Darüber hinaus haben wir ihre biologische Funktion für die Gewbeerhaltung diskutiert, aber auch eine Literaturübersicht gegeben, um ihre mögliche Rolle bei der kieferorthopädischen Zahnbewegung zu erklären. Aus diesem Grund wird die weitergehende Charakterisierung dieser Moleküle zu einem besseren Verständnis der molekularen Grundlagen der kieferorthopädischen Zahnbewegung führen.

35. van der Flier A, Sonnenberg A. Function and interactions of integrins. *Cell Tissue Res* 2001;305:285–98.
36. van der Pauw MT, Everts V, Beertsen W. Expression of integrins by human periodontal ligament and gingival fibroblasts and their involvement in fibroblast adhesion to enamel matrix-derived proteins. *J Periodontol Res* 2002;37:317–23.
37. Visse R, Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res* 2003;92:827–39.
38. Wang N, Stamenovic D. Mechanics of vimentin intermediate filaments. *J Muscle Res Cell Motil* 2002;23:535–40.
39. Winking H, Gerdes J, Traut W. Expression of the proliferation marker Ki-67 during early mouse development. *Cytogenet Genome Res* 2004;105:251–6.
40. Yano S, Komine M, Fujimoto M, et al. Mechanical stretching in vitro regulates signal transduction pathways and cellular proliferation in human epidermal keratinocytes. *J Invest Dermatol* 2004;122:783–90.
41. Yu X, Miyamoto S, Mekada E. Integrin alpha 2 beta 1-dependent EGF receptor activation at cell-cell contact sites. *J Cell Sci* 2000;113:2139–47.
42. Zentner A, Heaney TG, Serogl HG. Proliferative response of cells of the dentogingival junction to mechanical stimulation. *Eur J Orthod* 2000;22:639–48.

Correspondence Address

Dr. med. dent. Eva Müssig
Department of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics,
Dental School, University of Heidelberg
Im Neuenheimer Feld 400
69120 Heidelberg
Germany
Phone (+ 49/6221) 56-6571, Fax -5753
e-mail: Eva.Muessig@med.uni-heidelberg.de