

Aus dem Anatomischen Institut
(Geschäftsführender Vorstand: Prof. Dr. Ralph Lucius)
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**Die Auswirkung auf die Dentinogenese bei Mangel an DSPP
spaltenden Enzymen Meprin α und Meprin β**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Würde eines Doktors der Zahnheilkunde
der Medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von
Lara Koopmann
aus Hamburg

Kiel 2017

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Ralph Lucius

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Karina Reiss

Tag der mündlichen Prüfung: 19.12.2017

Zum Druck genehmigt, Kiel, den 28.08.2017

gez.: Prof. Dr. Johann Roider

(Vorsitzender des Ausschusses für Promotion)

INHALTSVERZEICHNIS

I.	EINLEITUNG	1
II.	MATERIAL UND METHODEN	7
2.1	VERWENDETE MATERIALIEN	7
2.2	METHODEN	13
2.2.1	HISTOLOGISCHE METHODEN	13
2.2.2	BIOCHEMISCHE METHODEN.....	18
III.	ERGEBNISSE	23
IV.	DISKUSSION	34
V.	ZUSAMMENFASSUNG	37
VI.	SUMMARY	38
VII.	LITERATURVERZEICHNIS	39
VIII.	DANKSAGUNG	42
IX.	ANHANG	43
9.1	LEBENS LAUF	43
9.2	PUBLIKATION.....	44

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

ABBILDUNG 1: SCHEMATISCHER AUFBAU DER ODONTOBLASTEN UND DEREN DENTINOGENESE.....	2
ABBILDUNG 2: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER HERKUNFT DER MEPRINE	3
ABBILDUNG 3: SCHEMATISCHER AUFBAU VON MEPRIN A UND B	4
ABBILDUNG 4: AUFBAU DES DENTINSILALOPHOSPHOPROTEIN (DSPP)	5
ABBILDUNG 5: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER SCHNITTFÜHRUNG	14
ABBILDUNG 6: VERSUCHSAUFBAU EINER ELEKTROPHORESEKAMMER FÜR WESTERN BLOTS (BLOTSANDWICH)	20
ABBILDUNG 7: WESTERN BLOT ANALYSE DER DSPP SPALTUNG	23
ABBILDUNG 8: MAKROSKOPISCHE BILDER DES UNTERKIEFERS VON MEP1A-/-, MEP1B-/- UND WT MÄUSEN	24
ABBILDUNG 9: QUERSCHNITT DES UNTERKIEFERS VON MEP1A-/-, MEP1B-/- UND WT DURCH MIKRO- CT ANALYSE	25
ABBILDUNG 10: BEURTEILUNG DER DENTINDICHTE (BMD = BONE MASS DENSITY) VON MEP1A-/-, MEP1B-/- UND WT-TIEREN	25
ABBILDUNG 11: BEURTEILUNG DES DENTIN VOLUMENS VON MEP1A-/-, MEP1B-/- UND WT-TIEREN	25
ABBILDUNG 12: HE-FÄRBUNG DER SCHNEIDEZÄHNE VON MEP1A-/-, MEP1B-/- UND WT-TIEREN	26
ABBILDUNG 13: AZAN FÄRBUNG DER SCHNEIDEZÄHNE VON MEP1A-/-, MEP1B-/- UND WT-TIEREN	27
ABBILDUNG 14: HE-FÄRBUNG DER MOLAREN VON MEP1A-/-, MEP1B-/- UND WT-TIEREN	28
ABBILDUNG 15: AZAN FÄRBUNG DER MOLAREN VON MEP1A-/-, MEP1B-/- UND WT- TIEREN	28
ABBILDUNG 16: REM AUFNAHME EINES SCHNEIDEZAHNES EINER MAUS	29
ABBILDUNG 17: REM AUFNAHMEN DER DENTIN SCHICHT VON MEP1A-/-, MEP1B-/- UND WT MÄUSEN	29
ABBILDUNG 18: IMMUNHISTOCHEMISCHE FÄRBUNG MIT ANTI- DSPP ANTIKÖRPER DER SCHNEIDEZÄHNE VON MEP1A-/-, MEP1B-/- UND WT MÄUSEN	30
ABBILDUNG 19: IMMUNHISTOCHEMISCHE FÄRBUNG MIT ANTI-MEPRIN B ANTIKÖRPER DER SCHNEIDEZÄHNE VON MEP1A-/-, MEP1B-/- UND WT MÄUSEN	31

ABBILDUNG 20: IMMUNHISTOCHEMISCHE FÄRBUNG MIT ANTI BMP-1 ANTIKÖRPER DER SCHNEIDEZÄHNE VON MEP1A-/-, MEP1B-/- UND WT MÄUSEN 31

ABBILDUNG 21: IMMUNHISTOCHEMISCHE FÄRBUNG MIT ANTI- DSPP ANTIKÖRPER DER MOLAREN VON MEP1A-/-, MEP1B-/- UND WT MÄUSEN 32

ABBILDUNG 22: IMMUNHISTOCHEMISCHE FÄRBUNG MIT ANTI-MEPRIN B ANTIKÖRPER DER MOLAREN VON MEP1A-/-, MEP1B-/- UND WT MÄUSEN 32

ABBILDUNG 23: IMMUNHISTOCHEMISCHE FÄRBUNG MIT ANTI BMP-1 ANTIKÖRPER DER MOLAREN VON MEP1A-/-, MEP1B-/- UND WT MÄUSEN 33

TABELLENVERZEICHNIS

TABELLE 1: VARIATIONSMUSTER DER HETERODONTIE BEI SÄUGETIEREN.....	6
TABELLE 2: AUFLISTUNG VERWENDETER GERÄTE.....	7
TABELLE 3: AUFLISTUNG VERWENDETER SOFTWARE.....	8
TABELLE 4: AUFLISTUNG VERWENDETER LABOR- UND VERBRAUCHSMATERIALIEN	8
TABELLE 5: AUFLISTUNG VERWENDETER CHEMIKALIEN	9
TABELLE 6: AUFLISTUNG VERWENDETER ZELLKULTURMATERIALIEN.....	10
TABELLE 7: AUFLISTUNG VERWENDETER ANTIKÖRPER, ENZYME UND PROTEINE.....	11
TABELLE 8: AUFLISTUNG VERWENDETER GRÖßENSTANDARDS	11
TABELLE 9: AUFLISTUNG VERWENDETER PUFFER, LÖSUNGEN UND NÄHRMEDIEN.....	12
TABELLE 10: PIPETTIERSCHEMA (1,5 MM GEL).....	20

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
A	Ampere
ADAM	a disintegrin and metalloprotease / eine Disintegrin und Metalloprotease
ADAMTS	a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AZAN	Azokarmin G und Anilinblau Goldorange
BCA	Bicinchoninsäure
BMD	bone mass density / Dentindichte
BMP-1	bone morphogenetic protein 1 / Knochenmorphogenetisches Protein 1
cDNA	complementary DNA / komplementäre DNS
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CT	Computertomografie
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DGP	Dentinglycoprotein
dH ₂ O	destilliertes Wasser
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DPP	Dentin Phosphoprotein
DSP	Dentinsilaloprotein
DSPP	Dentinsilalophosphoprotein
DTT	Dithiothreitol
EDTA	ethylene diamine tetraacetic acid / Ethylendiamintetraessigsäure
EZR	Extrazellulärraum
FCS	fötales Kälberserum
g	Gramm
HCl	Salzsäure
HE	Hämatoxylin-Eosin
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid

KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
M	Molar
mA	Milliampere
mAs	Milliampere-second
Mep	Meprin
Met	Methionin
mgHA/cm ³	Milligramm Hydroxylapatit pro Kubikzentimeter
Min	Minuten / Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mm	Millimeter
mm ³	Kubikmillimeter
MMP	Matrix-Metalloproteasen
ms	Millisekunde
NaCl	Natriumchlorid
Na ₂ HPO ₄	Di-Natriumhydrogenphosphat
nm	Nanometer
nM	Newtonmeter
OI	<i>Osteogenesis imperfecta</i>
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PCPE-1	Prokollagen-C-Proteinase-Enhancer-1
PEI	Polyethylenimin
PFA	Paraformaldehyd
PVDF	Polyvinylidenfluorid
REM	Rasterelektronenmikroskop
SDS-PAGE	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
TBS	TRIS-buffered saline
TBS-T	TRIS-buffered saline with Tween
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TLL1	tolloid-like 1
V	Volt
WT	Wildtyp

I. EINLEITUNG

Zähne sind sowohl für Menschen als auch für Tiere wichtig zum Zermahlen und Zerkleinern der Nahrung. Der Zahn besteht aus verschiedenen Schichten, die äußere Schicht bildet der Schmelz gefolgt vom Dentin, im Inneren des Zahnes befindet sich die Pulpa. In der Pulpa wird die „Versorgung“ des Zahnes gewährleistet durch Bindegewebe, in dem sich Nerven, Arterien, Venen und Lymphgefäße befinden. Der Schmelz ist die härteste Substanz des Körpers und schützt den Zahn vor Abreibung und Säureangriffen. Zudem bietet der Schmelz einen Schutz für das Dentin, welches die Hauptmasse des Zahnes ausmacht. Dentin wird lebenslang produziert.

Dentinogenese

Die Bildung des Dentins, die Dentinogenese, ist ein wichtiger Schritt für die Zahnentwicklung und die Zahnstruktur, dies geschieht durch die Odontoblasten. Odontoblasten sind Bindegewebszellen, die für die Dentinogenese und spätere Versorgung des Dentins verantwortlich sind (Schröder 2000). Sie differenzieren sich aus den Zellen der Zahnpapille, die wiederum aus der Neuralleiste stammen und dadurch einen ektomesenchymalen Ursprung haben (Ehrenfeld 2010). Der reife Odontoblast produziert seine Prädentinbestandteile im endoplasmatischen Retikulum an seinem apikalen Zellpol. Dieser wiederum liegt dem inneren Schmelzepithel an.

Die Prädentinbestandteile werden mittels Exozytose in den Extrazellulärraum (EZR) transportiert. Dort beginnt die eigentliche Mineralisation des Prädentins. Zunächst entsteht das junge Prädentin, welches sowohl organische Bestandteile, bestehend vor allem aus Kollagen Typ I, als auch nichtkollagene Bestandteile, die sich aus Proteoglykanen und dentinspezifischen Proteinen (Dentinsilalophosphoprotein (DSPP), Dentinsilaloprotein (DSP) oder Dentin Phosphoprotein (DPP)) zusammensetzen, enthält. Dieses differenziert sich zu Prädentin, durch Quervernetzung des Kollagens (Buddecke 1981). Als nächster Schritt folgt durch die Ablagerung von Hydroxylapatitkristallen schrittweise die Mineralisation des Prädentins, wobei kugelförmige Gebilde (Kalkosphäriten) entstehen. Das reife Dentin wird von den Tomes-Fasern (Fortsätze der Odontoblasten) durchzogen, diese befinden sich in den Dentinkanälchen (Dentintubuli) (Abbildung 1).

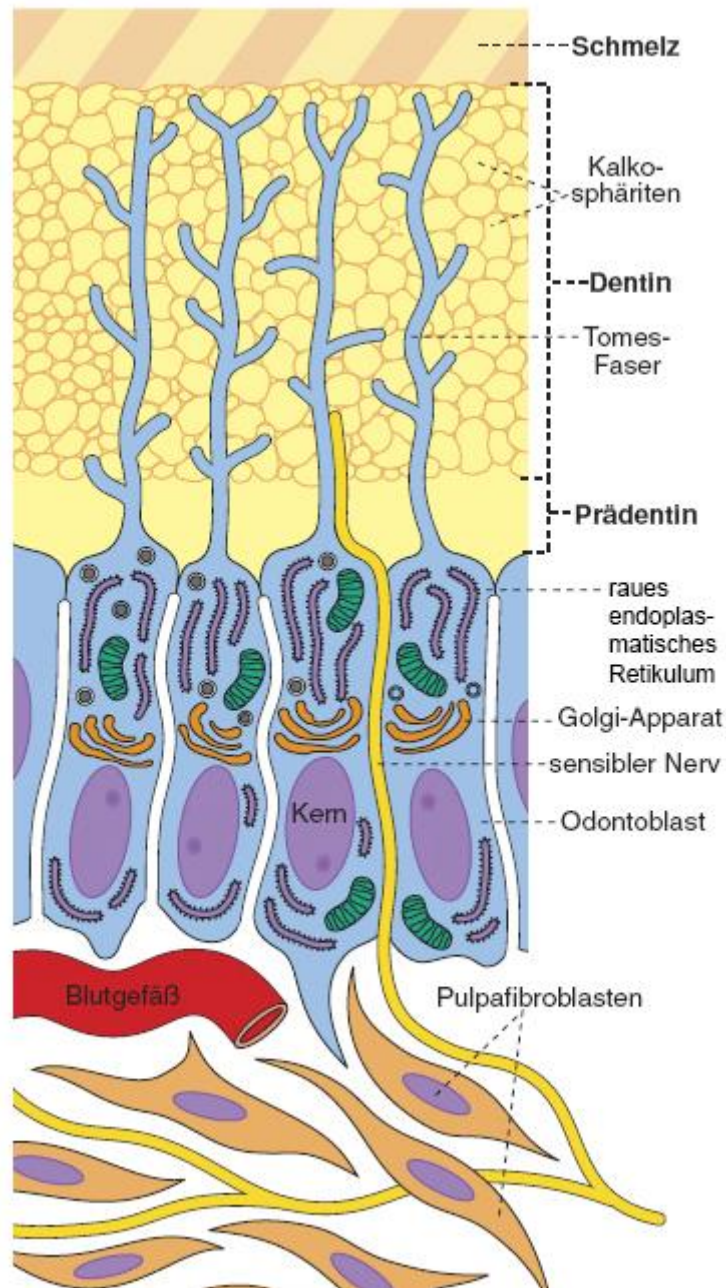


Abbildung 1: Schematischer Aufbau der Odontoblasten und deren Dentinogenese

Diese beginnt im rauen endoplasmatischen Retikulum mit der Bildung der Prädentinbestandteile, welche wiederum durch Exozytose in den Extrazellulärraum gelangen und dort das Prädentin bilden. Durch Mineralisation des Prädentins entsteht das reife Dentin mit seinen Kalkosphäriten (Welsch 2010).

Meprine

Meprine wurden erstmals in den frühen 80er Jahren in Mäusenieren entdeckt, wodurch es zunächst zur Namensgebung „metalloprotease from renal tissue“ kam (Beynon et al. 1981). Die Meprine gehören zur Astacin-Familie der Metalloproteasen, sowie zur Metzincin Superfamilie.

Die Besonderheit dieser Familie ist das Zink Bindemotiv (HExxHxxGxxHxxxRxDR) und ein „Met-Turn“. Weiterhin sind Meprine mit dem knochenmorphogenetischen Protein 1 (bone morphogenetic protein 1= BMP-1) (Dumermuth et al. 1991) als auch mit Matrix-Metalloproteasen (MMP) und ADAMs (a disintegrin and metalloprotease) verwandt (Abbildung 2; Stöcker et al. 1995).

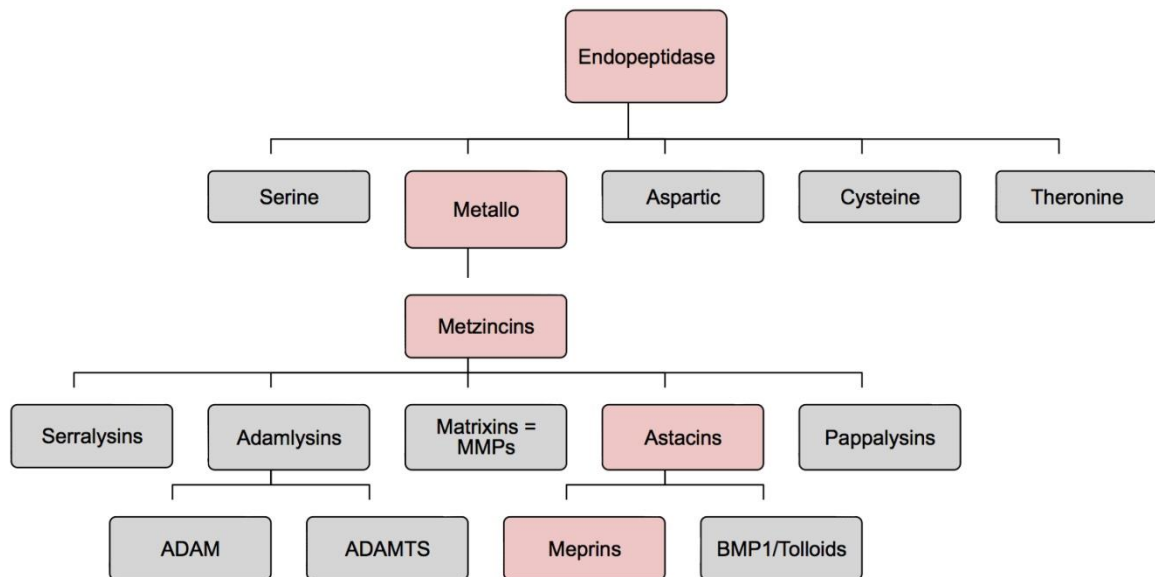


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Herkunft der Meprine

Durch unterschiedliche Gene entstehen im Aufbau der Meprine zwei verschiedene Strukturen, Meprin α und Meprin β (Dumermuth et al. 1991; Broder und Becker-Pauly 2013; Jefferson et al. 2013). Beide zeigen zwar einen ähnlichen Aufbau und sind komplex und stark glykosyliert, jedoch wird Meprin α während der Sekretion proteolytisch prozessiert und liegt anschließend löslich in der extrazellulären Matrix vor. Meprin β hingegen bleibt vorerst membrangebunden (Broder und Becker-Pauly 2013). Erst durch Proteasen wie zum Beispiel ADAM 10 kommt es zur proteolytischen Abtrennung der extrazellulären Domänen und zur Freisetzung einer löslichen Form von Meprin β (Abbildung 3; Jefferson et al. 2013).

Für Meprin β ist die Röntgenkristallstruktur der Ektodomäne und die Substratspezifität geklärt (Arolas et al. 2012). Als Substrat der Meprine wurde Prokollagen Typ I entdeckt (Becker-Pauly et al. 2011). Prokollagen Typ I hat die Eigenschaft nach Aktivierung Kollagenfasern zu bilden. Es konnte in Versuchen an Knockout Mäusen von Meprin α und Meprin β gezeigt werden, dass diese eine verringerte Kollageneinlagerung in der Haut aufweisen (Broder et al. 2013).

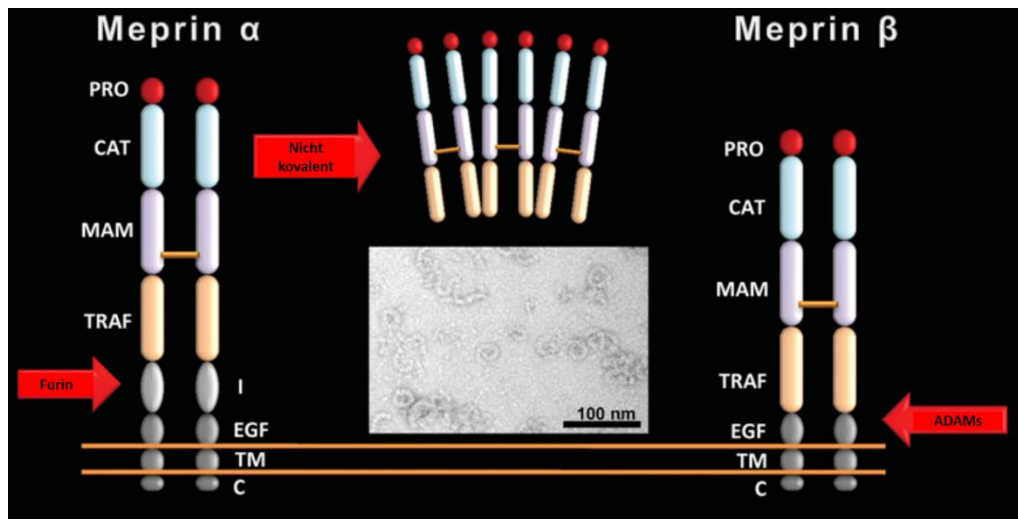


Abbildung 3: Schematischer Aufbau von Meprin α und β

Beide Proteasen sind anfänglich membranständig und zeigen einen ähnlichen Aufbau. Meprin α (links in der Abbildung) besitzt eine zusätzliche Domäne, die von Furin geschnitten werden kann. Dadurch kann Meprin α in eine lösliche Form übergehen, die mittels Elektronenmikroskopie erkennbar ist (mittig in der Abbildung). Meprin β (rechts in der Abbildung) besitzt diese zusätzliche Domäne nicht und bleibt somit membranständig. Erst durch Shedding mittels ADAMs erfolgt ein Übergang in die lösliche Form (Broder und Becker-Pauly 2013).

Das Kollagen des Typ I besteht aus einer Dreifachhelix, die sich aus zwei α_1 und einem α_2 Strang zusammensetzt. Kommt es hier zu Mutationen der dazugehörigen Gene, können Krankheiten wie *Osteogenesis imperfecta* (OI) auftreten. Liegt eine OI als Grunderkrankung vor und es kommt zudem zur Fehlentwicklung des Dentins, spricht man von einer *Dentinogenesis imperfecta Typ 1* (Tsuchiya et al. 2011).

Meprin β hat sowohl eine wichtige Rolle bei der Maturierung des Prokollagens (Broder et al. 2013) als auch bei der Mineralisation des DSPP. Die Mineralisation des Dentins durch Einlagerung von Hydroxylapatit wird durch das DPP unterstützt, welches wiederum von Meprin β calciumabhängig abgebaut werden kann (Tsuchiya et al. 2011).

Das DPP bildet vor der Prozessierung das C-terminale Ende des DSPP und besitzt multiple Bindungsstellen für Calcium. Das N-terminale Ende bildet das DSP, welches wiederum durch das Dentinglycoprotein (DGP) von DPP getrennt ist (Abbildung 4; Tsuchiya et al. 2011). Prozessiert wird die Vorstufe DSPP durch Matrix-Metalloproteasen wie MMP-20, MMP-2 und BMP-1.

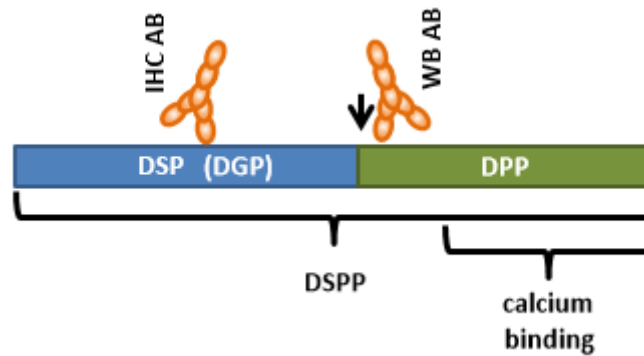


Abbildung 4: Aufbau des Dentinsilaphosphoprotein (DSPP).

Nach Spaltung des DSPP (schwarzer Pfeil) entstehen die einzelnen Spaltprodukte, das Dentinsialoprotein (DSP) mit dem Dentineglykoprotein (DGP) und dem Dentinphosphoprotein (DPP). Das DPP besitzt als einziges Spaltprodukt eine Calcium Bindungsstelle. Außerdem sind die Bindungsstellen der Antikörper für die immunhistochemische Analyse (IHC AB) und die Western-Blot-Analyse (WB AB) abgebildet (Arnold et al. 2016).

DSPP spielt eine wichtige Rolle in der Dentinogenese vor allem bei der Mineralisation (Tsuchiya et al. 2011). Im Gegensatz zur Schmelzbildung, die nur während der Zahnentwicklung durch die Ameloblasten abläuft, wird das Dentin lebenslang weitergebildet. Entstehen Mutationen im DSPP, kann es zu autosomal dominanten Erbkrankheiten der Zahnanlage wie zum Beispiel *Dentindysplasie Typ 2* (Rajpar et al. 2002) und *Dentinogenesis imperfecta Typ 2* und *Typ 3* kommen (Zhang et al. 2001; Kim et al. 2005). Die letzten beiden Krankheiten äußern sich durch starke Abrasionen der Zähne, die dem Funktionsverlust der Odontoblasten geschuldet sind. Durch das Fehlen einer funktionierenden Dentinogenese entsteht ein hoher Wasseranteil von 60%, der normalerweise bei 10% liegt. Somit sind die Zähne nicht druck- und zugfest und besitzen auch nicht ihre normale Härte, sondern weisen ein atypisches Dentin auf.

Als Tiermodell dient bei unseren Versuchen die Maus. Bei den verwendeten Knockout-Mäusen sind entweder Meprin α (Mep1a^{-/-}) oder Meprin β (Mep1b^{-/-}) deaktiviert und werden stets mit den Wildtyp (WT) Mäusen verglichen.

Die Maus gehört zu der Ordnung der Nagetiere (Rodentia), besitzt insgesamt 16 Zähne, die sich aus 4 Incisivi und 12 Molaren zusammensetzen. Bei der Spezies ist es üblich, dass es durch Schmelzreduktion zum Wachstum sowohl an den Inzisivi als auch im Molarenbereich im permanenten Gebiss kommt (vgl. Tabelle 1 Muster 4).

Zahnformel der Maus: 1003/1003

Tabelle 1: Variationsmuster der Heterodontie bei Säugetieren (Ehrenfeld 2010)

Muster	Beschreibung	Beispiel
1	Formvariabilität des „Urkonus“ ohne wesentliche Invagination	Fast alle Inzisivi und Canini
2	Geringe Invagination	Prämolaren und Molaren der Karnivoren und Omnivoren
3	Multiple Invagination, oft mit Kronenzement	Molaren der Herbivoren
4	Partielle Schmelzreduktion als Voraussetzung für permanentes Wachstum ohne Invagination	Inzisivi und Molaren der meisten Rodentia verschiedener „Hauer“- Canini, Unpaarhufer
5	Totale Schmelzreduktion ohne Invagination	Niedere Säugetiere wie Gürteltiere, sekundäre Homodontie bei Zahnwalen
6	Partielle Schmelzreduktion mit Invagination	Molaren der Ratte, deshalb begrenzt permanentes Wachstum und adaptiver Ausgleich durch Pseudowachstum mit Zementapposition an der Wurzel

Fragestellung

Ziel dieser Arbeit ist es, durch histologische und biochemische Verfahren herauszufinden, ob durch Mangel an DSPP und Prokollagen I spaltenden Enzymen Meprin α und Meprin β eine Missbildung des Dentins entsteht. Darüber hinaus soll untersucht werden, ob Unterschiede im Dentin von Mep1a^{-/-} und Mep1b^{-/-} Mäusen und dem des Wildtyps bestehen. Bestenfalls kann ein Phänotyp der Zähne von Knockout-Mäusen bestimmt werden.

II. MATERIAL UND METHODEN

2.1 VERWENDETE MATERIALIEN

Tabelle 2: Auflistung verwendeter Geräte

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Eismaschine	Scotsman AF80	Frimont S.P.A., Milano (IT)
Elektrophorese-Apparatur für <ul style="list-style-type: none"> • Western-Blots • SDS-Page 	Trans-Blot Turbo Transfer System Mini-PROTEAN Tetra System	BioRad, München (D) BioRad, München (D)
Heizblock	Thermostat 5320	Eppendorf, Hamburg (D)
Lichtmikroskop	TELAVAL 31	Zeiss, Oberkochen (D)
Magnetrührer	RH basic 2	IKA, Staufen (D)
Mikro- Computertomografie	VivaCT-80 Mikro-CT-System	Scanco Medical AG, Brüttisellen (CH)
Mikropipetten	Eppendorf Research Plus 1000, 200, 100, 10, 2.5	Eppendorf, Hamburg (D)
Mikrotom	Rotationsmikrotom Leica RM 2155	Leica Biosystems, Wetzlar (D)
pH-Meter	766 Calimatic	Knick, Berlin (D)
Pipetboy	Easypet	Eppendorf, Hamburg (D)
Probenroller	Roller Mixer SRT9	Stuart, Staffordshire (UK)
Rasterelektronenmikroskop	XL20 Scanning Electron Microscope	Philips, Eindhoven (NL)

Schüttler	Thermomixer compact Vortex Genie 2	Eppendorf, Hamburg (D) Scientific Industries, Bohemia (New York, USA)
Spannungseinheit	PowerPac Basic	BioRad, München (D)
Spektrophotometer	Nano Drop ND-1000	Peqlab, Erlangen (D)
Sterilbank	Biological Safety Cabinets	NUAIRE, Plymouth (Minnesota, USA)
Waage	Adventurer	Ohaus Europe, Nänikon (CH)
Wasserreinigungsanlage	Milli Q Plus Ultra- Pure Water System	Millipore, Billerica (Massachusetts, USA)
Zellinkubator	CO ₂ Water-Jacked Incubator	NUAIRE, Plymouth (Minnesota, USA)
Zentrifugen	Centrifuge 5415 R Biofuge pico	Eppendorf, Hamburg (D) Heraeus Instruments, Hanau (D)

Tabelle 3: Auflistung verwendeter Software

Software	Hersteller
Adobe Photoshop CS6	Adobe System Incorporated, San Jose (Kalifornien, USA)
AxioVision Rel. 48	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena (D)
Excel 2016	Microsoft Corporation, Redmond (Washington, USA)
Image Reader LAS-1000	Fujifilm, Tokio (JP)
PowerPoint 2016	Microsoft Corporation, Redmond (Washington, USA)
Word 2016	Microsoft Corporation, Redmond (Washington, USA)

Tabelle 4: Auflistung verwendeter Labor- und Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller
96-well-Platte	Sarstedt, Nümbrecht (D)
Bechergläser	Fisherbrand, Schwerte (D)

Reaktionsgefäße (1,5 ml und 2 ml)	Sarstedt, Nümbrecht (D)
Röhrchen (15 ml und 50 ml)	Sarstedt, Nümbrecht (D)
Serologische Pipetten (5 ml und 10 ml)	Sarstedt, Nümbrecht (D)
Transfermembran Immobilon-FL	Millipore, Billerica (Massachusetts, USA)
Whatman-Papier	Roth, Karlsruhe (D)
Zellkulturschale (100 x 20 mm)	Sarstedt, Nümbrecht (D)
Zellschaber	Sarstedt, Nümbrecht (D)

Tabelle 5: Auflistung verwendeter Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller
2-Propanol	Roth, Karlsruhe (D)
Acrylamid Rotiphorese Gel 30	Roth, Karlsruhe (D)
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Merck, Darmstadt (D)
Anilin	Merck, Darmstadt (D)
Anilinblau	Chroma-Gesellschaft Schmid GmbH & Co, Stuttgart (D)
Azokarmin	Bayer, Leverkusen (D)
Bromphenolblau	Roth, Karlsruhe (D)
Complete Protease Inhibitor Cocktail	Roche, Rotkreuz (CH)
DAB-Kit	Vector Laboratories, Burlingame (Kalifornien, USA)
Di-Natriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4)	Roth, Karlsruhe (D)
Dithiothreitol (DTT)	Roth, Karlsruhe (D)
Eisessig	Merck, Darmstadt (D)
Eosin (0,1% in dH_2O)	Merck, Darmstadt (D)
Essigsäure	Roth, Karlsruhe (D)
Ethanol	Roth, Karlsruhe (D)
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) (0,1% in dH_2O)	Roth, Karlsruhe (D)

Glycin (86 %)	Merck, Darmstadt (D)
Hämalaun nach Mayer	Merck, Darmstadt (D)
Kaliumchlorid (KCL)	Roth, Karlsruhe (D)
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Roth, Karlsruhe (D)
Magermilchpulver	Roth, Karlsruhe (D)
Methanol	Rudolf-Walder, Kiel (D)
N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Roth, Karlsruhe (D)
Natriumchlorid (NaCl)	Roth, Karlsruhe (D)
Orange G	Merck, Darmstadt (D)
Paraformaldehyd (4% und 10%)	Merck, Darmstadt (D)
Phosphorwolframsäure (5% in dH ₂ O)	Merck, Darmstadt (D)
Pierce™ BCA Protein Assay Kit	Thermo Scientific, Waltham (Massachusetts, USA)
Salzsäure (HCl)	Roth, Karlsruhe (D)
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Roth, Karlsruhe (D)
Super Signal West Femto Maximum Sensitivity Substrate	Thermo Scientific, Waltham (Massachusetts, USA)
TRIS (Tris(hydroxymethyl)-aminomethan)	Roth, Karlsruhe (D)
Triton X 100	Roth, Karlsruhe (D)
Tween 20	Roth, Karlsruhe (D)
Wasserstoffperoxid (3% in dH ₂ O)	Roth, Karlsruhe (D)
Xylol	Roth, Karlsruhe (D)

Tabelle 6: Auflistung verwendeter Zellkulturmaterialien

Material	Katalogbezeichnung	Hersteller
DMEM Medium	Dulbecco´s Modified Eagle Medium	Life Technologies, Carlsbad (Kalifornien, USA)
Fötales Kälberserum (FCS)	Heat Inactivated Fetal Bovine Serum	Life Technologies, Carlsbad (Kalifornien, USA)

GlutaMax-I		Life Technologies, Carlsbad (Kalifornien, USA)
Medium 106	Medium 106	Life Technologies, Carlsbad (Kalifornien, USA)
PBS	Dulbecco´s Phosphate-Buffered Saline	Life Technologies, Carlsbad (Kalifornien, USA)
PEI	Polyethylenimin	Polyscience, Hirschberg an der Bergstrasse (D)
Penicillin, Streptomycin	Penicillin-Streptomycin (10,000 U/mL)	Life Technologies, Carlsbad (Kalifornien, USA)
Trypsin, EDTA	Trypsin-EDTA (0.5 %)	Life Technologies, Carlsbad (Kalifornien, USA)

Tabelle 7: Auflistung verwendeter Antikörper, Enzyme und Proteine

Produktnummer	Spezifität	Spezies	Hersteller	Anwendung
LF 42	Humanes α I (1) C Propeptid	Kaninchen	NIH, Bethesda (Maryland, USA)	1:2000
LF 68	Humanes α I (1) C Telopeptid	Kaninchen	NIH, Bethesda (Maryland, USA)	1:2000
LFMb-21	DSPP	Maus	Santa Cruz Biotechnology	1:500
Anti-rabbit	Rabbit IgG	Kaninchen	Thermo Scientific, Waltham (Massachusetts, USA)	1:5000
	Anti-Meprin β	Kaninchen	selbst hergestellt	1:800
	Anti- BMP-1	Kaninchen	selbst hergestellt	1:1000

Tabelle 8: Auflistung verwendeter Größenstandards

Bezeichnung	Hersteller
Page Ruler Plus Prestained Protein Ladder	Thermo Scientific, Waltham (Massachusetts, USA)

Tabelle 9: Auflistung verwendeter Puffer, Lösungen und Nährmedien

Bezeichnung	Zusammensetzung
Anilinblau-Orange G-Essigsäure	0,5 g Anilinblau (wasserlöslich) 2 g Orange G in 100 ml H ₂ O lösen 8 ml Eisessig
Anilin-Ethanol 0,1 %	100 ml Ethanol (90%) 0,1 ml Anilin
Anodenpuffer für Western Blots	0,3 M TRIS pH 10,4
Azokarminlösung	0,1 g Azokarmin in 100 ml H ₂ O erhitzen bis zum Siedepunkt 1 ml Eisessig hinzugeben
Blockierungslösung für Western Blots	5 % Magermilchpulver TBS
essigsaurer Alkohol	100 ml Ethanol (96%) 1 ml Eisessig
Kathodenpuffer für Western Blots	25 mM TRIS 40 mM Glycin 20 % Methanol pH 8,0
phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS)	137 mM NaCl 2,7 mM KCl 4,3 mM Na ₂ HPO ₄ 1,2 mM KH ₂ PO ₄ pH 7,4
Probenpuffer 3-fach	2,5 ml TRIS - HCl 1 g SDS 2,5 ml ddH ₂ O 0,05 g Bromphenolblau 5 ml Glycerin 200 mM DTT 200 µl β-Mercaptoethanol
Sammelgelpuffer für SDS-Gele	0,5 M TRIS – HCl 0,4 % SDS pH 6,8

SDS-Laufpuffer	0,1 % SDS 0,192 M Glycin 0,025 M TRIS pH 8,3
Trenngelpuffer für SDS-Gele	1,5 M TRIS – HCl 0,4 % SDS pH 8,8
TRIS-buffered saline (TBS)	100 mM TRIS - HCl 685 mM NaCl pH 7,5
TRIS-buffered saline with Tween (TBS-T)	100 mM TRIS 500 mM NaCl 0,25 % Tween 20 1 % Triton X

2.2 METHODEN

2.2.1 HISTOLOGISCHE METHODEN

Präparation des Unterkiefers und Längenbestimmung

Die Knochenentnahme aus Knockout-Mäusen und Wildtypmäusen erfolgt im biochemischen Institut der Universität Kiel. Hierbei wird stets nach dem deutschen Tierschutzgesetz gehandelt (Genehmigungsnummer: 750).

Um den Unterkieferknochen repräsentativ für das Foto herzurichten, wird mit einem herkömmlichen Präparationsbesteck der Unterkieferknochen von Haut und Muskeln befreit. Behutsam trennt man den Oberkiefer vom Unterkiefer. Für den Vergleich aller verschiedenen Unterkiefer ist es wichtig, dass ein gleicher Maßstab in Form eines Lineals verwendet wird, damit man die genauen Längen bestimmen kann. Die Längenbestimmung und der Dimensionsvergleich der Nagezähne sind so einheitlich.

Fixierung und Entkalkung

Vor Beginn der Entkalkung müssen zunächst die entnommenen Knochen für einen Tag in 4% Paraformaldehyd (PFA) fixiert werden und danach in eine 0,1% EDTA-Lösung zur Entkalkung für 6 Wochen.

Paraffineinbettung und Herstellung von Paraffinschnitten

Die fixierten und entkalkten Präparate werden zunächst durch eine aufsteigende Alkoholreihe Ethanol 70% (2 Stunden), Ethanol 85% (2 Stunden), 2 x Ethanol 96% (1 Stunde), 2 x Ethanol 100% (2 Stunden) entwässert. Da Paraffin unlöslich in Alkohol ist, wird Xylol (10 Min) als organisches Lösungsmittel verwendet. Das Xylol verdampft während des Eintauchens der Präparate in flüssiges Paraffin, sodass sich das Paraffin anstelle des Xylols befindet.

Aus den auf Raumtemperatur abgekühlten Paraffinblöcken wurden unter Verwendung eines Mikrotoms 7 µm dicke Schnitte angefertigt.

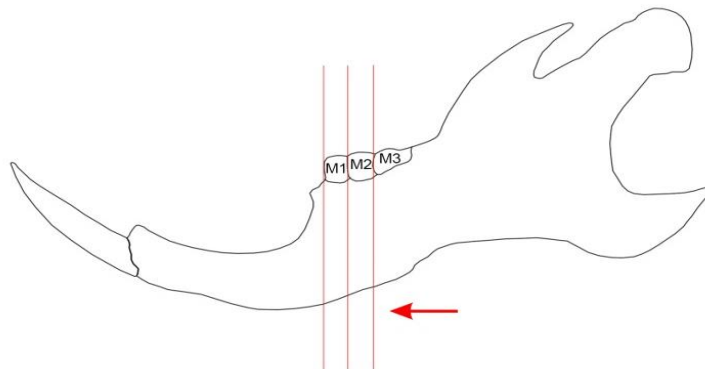


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Schnittführung

Zur Herstellung vergleichbarer Ebenen wird ein Schnitt zwischen dem zweiten und dem dritten Molaren durchgeführt und ein weiterer vor dem ersten Molaren in Schnittrichtung des roten Pfeils.

Um vergleichbare Abschnitte und Ebenen in allen Unterkieferknochen der verschiedenen Mäuse zu erhalten, wurde immer zwischen den Molaren (M1, M2, M3) bei gleicher Schnitt- richtung geschnitten (roter Pfeil Abbildung 5).

Entparaffinierung

Bevor die Schnitte gefärbt werden, müssen sie vorerst noch mit einer absteigenden Alkohol- reihe 3 x Xylol (10 Min), 95% Ethanol (10 Min), 85% Ethanol (5 Min), 70% Ethanol (5 Min) behandelt werden, um so die Schnitte von Paraffin zu befreien.

Vor der Färbung werden zunächst vergleichbare Schnittebenen von den verschiedenen Präparaten festgelegt.

Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung) nach Mayer

Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung, eine Standardfärbung, verschafft einen Überblick über die Schnittebenen. Im Ergebnis dieser Färbung erscheinen die Zellkerne mit der dort enthaltenen basophilen Desoxyribonukleinsäure (DNA) und dem ribosomreichen rauen endoplasmatischen Retikulum, in blauvioletterm Ton. Diese Farbreaktion entsteht dadurch, dass der natürliche Farbstoff Hämatoxylin zunächst oxidiert wird und dann in wässriger Lösung sich zu Hämalaun entwickelt. Diese basische Lösung färbt alle basophilen Strukturen blauviolett. Das azidophile Zytoplasma wird durch den synthetischen sauren Farbstoff Eosin rosarot gefärbt.

Ablauf:

1. Kernfärbung mit Hämalaun nach Mayer für 20 Min
2. dH₂O spülen
3. Bläuen in fließendem Leitungswasser für 15 Min
4. In Eosin (0,1%) für 30 Min inkubieren
5. dH₂O spülen
6. Absteigende Alkoholreihe, zur Beendigung der Farbreaktion

Azokarmin G und Anilinblau-Goldorange (Azan) Färbung nach Heidenhain

Die Azan Färbung, eine Trichromfärbung, wird zur Darstellung der Kollagenstrukturen im Knochen angewendet. Bei dieser Trichromfärbung werden drei unterschiedliche Farbstoffe verwendet, wodurch sich die Zellbestandteile und Gewebe verschieden darstellen.

Der basische Farbstoff Azokarmin färbt die Zellkerne rot und das Zytoplasma rötlich. Dieser Prozess wird gestoppt durch einen essigsäuren Alkohol. Um Azokarmin aus dem Gewebe zu entfernen, verwendet man Phosphorwolframsäure (5%) und beizt so das Bindegewebe. Das nun entfärbte Gewebe wird mit dem sauren Farbstoff Anilinblau gefärbt. Als Ergebnis stellen sich die retikulären und kollagenen Fasern in blauer Farbe da. Der dritte Farbstoff Orange G färbt das Zytoplasma, Erythrozyten und Muskelgewebe orange. Dabei wird er durch die zwei anderen Farbstoffe überlagert.

Ablauf:

1. In Anilinalkohol bei 38°C für 15 Min
2. dH₂O spülen
3. Azokarmin erwärmen auf 56°C für 40 Min
4. dH₂O spülen
5. Differenzieren in Anilinalkohol bis Kerne deutlich erkennbar
6. Unterbrechen der Differenzierung in essigsauerm Alkohol ca. 1 Min
7. Phosphorwolframsäure 5% entfärbt und beizt das Bindegewebe 60 Min
8. dH₂O spülen
9. Anilinblau-Orange G- Essigsäure Lösung für 1 Stunde
10. Schnitte abkühlen durch Spülen mit dH₂O
11. Differenzieren in 96% Alkohol
12. Entwässern in 100% Alkohol, Xylol, Eukitt

Immunhistochemische Färbungen

Unter Verwendung dieser Verfahren wird versucht, durch Antikörper die Lage, Form und Dichte von Meprin α und β darzustellen.

Dafür werden nach Anwendung der absteigenden Alkoholreihe (96%, 90%, 80%, 70%, 50% Ethanol für jeweils 5 Min) die Schnitte in Wasserstoffperoxid Lösung (3%) für 30 Min eingelegt, um die endogene Peroxidaseaktivität zu blockieren. Anschließend folgt ein dreimaliges Waschen mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS). Danach wird der erste Antikörper (Anti-DSPP 1:500; Anti-Meprin β 1:800; Anti BMP-1 1:1000) über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wird drei Mal mit PBS gespült und anschließend der zweite biotinylierte Antikörper (anti-rabbit im Verhältnis 1:5000) für 45 Min aufgetragen. Danach werden die Schnitte 3 Mal mit PBS gewaschen und anschließend in ein ABC-Reagenz für 45 Min eingelegt. Erneut folgt eine dreimalige Spülung mit PBS, um dann die Schnitte für 10 Min mit einem DAB (3,3'-Diamino-

benzidin) -Kit zu behandeln. Das DAB bildet durch Oxidation am Antikörper ein braunes Präzipitat, das in wässrigen oder organischen Lösungsmitteln unlöslich ist, aber mit dem Lichtmikroskop sichtbar. Nach der Behandlung mit dem DAB-Kit folgt eine Spülung mit destilliertem Wasser (3 Mal). Anschließend folgt die Gegenfärbung mit Hämalaun nach Mayer für 30 Sekunden und ein weiteres Spülen mit destilliertem Wasser. Zum Schluss werden die Schnitte 10 Min mit Leitungswasser gebläut, dann erfolgt eine letzte Spülung mit destilliertem Wasser und im Anschluss die Deckelung der Schnitte mit Aquatex.

Ablauf:

1. Xylol 1, 2, 3 je 5 Min
2. 100% Ethanol 2 Mal 5 Min
3. 96%, 90%, 80%, 70%, 50% Ethanol je 5 Min
4. 3% H₂O₂ für 30 Min
5. 1. Antikörper über Nacht
6. Spülen mit PBS 3 Mal
7. 2. Antikörper biotinyliert für 45 Min
8. Spülen mit PBS 3 Mal
9. ABC-Reagenz für 45 Min
10. Spülen mit PBS 3 Mal
11. DAB-Kit für 10 Min
12. Spülen mit dH₂O 3 Mal
13. Hämalaun im Verhältnis 1:1 mit dH₂O für 30 sek
14. Spülen mit dH₂O 3 Mal
15. Bläuen in lauwarmen H₂O für 10 Min
16. Spülen mit dH₂O 2 Mal
17. Eindecken mit Aquatex

2.2.2 BIOCHEMISCHE METHODEN

Zellbiologische Arbeiten

Die Arbeiten mit den Zellsystemen erfolgen unter einer Sicherheitswerkbank, um so unter sterilen Bedingungen zu arbeiten und Kontaminationen vorzubeugen. Als Zelllinien werden menschliche embryonale Nierenzellen (HEK293-Zellen), als auch Fibroblasten der Niere (Cos-7-Zellen) verwendet.

Die Zelllinien werden in einem standardisierten Nährmedium DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium - GlutaMax-I, 10% hitze-inaktivierten fötalem Kälberserum (FCS), 5% CO₂ und 1% Penicillin/Streptomycin) bei 37 °C kultiviert. Die Zellen werden 48 Stunden mit einer Transfektionsreagenz behandelt. Dieser Transfektionsansatz setzt sich aus einem Plasmid 5 µg pcDNA3.1, 300 µl DMEM und 15 µl Polyethylenimin (PEI) zusammen. Anschließend folgen eine kurze Zentrifugation und eine Inkubation bei Raumtemperatur für 30 Min. Durch das Plasmid ist es möglich die cDNA von DSPP in voller Länge in die Zelle einzubringen.

Die spätere Lyse bei 4 °C durch EDTA freien Lysepuffer schließt die Zellen auf und erhält die Aktivität von Meprin α und Meprin β . Die anschließende Zugabe der rekombinanten Meprin Protease bei 37 °C und 50 nM ermöglicht die Spaltung von DSPP und wird durch die Erwärmung auf 98 °C für 10 Min beendet. Die rekombinanten Meprin Proteasen werden aus Insektenzellen gewonnen (Becker-Pauly et al. 2007; Becker et al. 2003). Außerdem erfolgt eine Kontrollprobe, um proteolytische Spaltung anderer Proteasen auszuschließen. Daran schließt sich ein SDS-Page Verfahren und ein Western Blot an.

Proteinbiochemische Methoden

Quantitative Proteinkonzentrationsbestimmung (Smith et al. 1985)

Um die Konzentrationen der verschiedenen Proteinlösungen zu ermitteln wird das Pierce Bicinchoninsäure (BCA)-Assay Kit von Thermo Scientific verwendet. Die BCA- Reaktion beruht darauf, dass Cystein, Cystin, Tryptophan und Tyrosin sowie die Peptidbindungen in alkalischer Umgebung Cu²⁺ zu Cu⁺ reduzieren. Cu⁺ bildet wiederum mit BCA einen lilafarbenen Komplex, der sein Absorptionsmaximum bei 562 nm besitzt.

Ablauf (nach Herstellerangaben verfahren):

1. 10 μ l der Probe bzw. des Proteinstandards als Duplikat mit einer Pipette in ein Well einer 96-Well-Platte vorgelegt
2. Lösung A und B im Verhältnis 1:20 angesetzt und 200 μ l pro Well zugegeben
3. Proben wurden für 20 Min bei 37 °C inkubiert
4. Messung der Absorption bei 562 nm

Da die Absorption des Farbstoffes proportional zur Proteinkonzentration verläuft, lassen sich mittels linearer Regression die Proteinkonzentrationen der Proben bestimmen.

Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide Gel (SDS)- Page

SDS-Page ist ein analytisches Verfahren, um Proteine in einem Acrylamidgel nach ihrem Molekulargewicht aufzutrennen.

Die Proben werden mit entsprechender Menge 3-fachen Probenpuffers versetzt und danach auf 95 °C für 15 Min erhitzt. Durch das Erhitzen der Proben wird die Sekundär- und Tertiärstruktur der Proteine zerstört. Die vorhandenen Disulfidbrücken werden durch das im Puffer enthaltene Dithiothreitol (DTT) zudem aufgelöst. Die Proteine liegen somit in einer denaturierten Form vor. Um ein gleichmäßiges Verhältnis zwischen Masse und Ladung zu erreichen, erhalten die Proteine einen negativen Ladungsmantel durch das SDS.

Beim Gießen des Trenngels wird dieses mit Isopropanol überschichtet, um eine möglichst ebene Oberfläche zu schaffen. Dies gewährleistet, dass alle Proteine gleichzeitig in das Trenngel eintreten. Nach dem Abgießen des Isopropanols wird die Lösung des Sammelgels zwischen zwei Glasplatten eingegossen. Der Abstand zwischen den Platten beträgt 1,5 mm. Nach dem Eingießen des Sammelgels wird ein Kamm in die Spalte eingesetzt, wodurch die Kammern für die Proben entstehen. Die Gele werden in eine Elektrophoresekammer eingehängt, diese wird mit Laufpuffer gefüllt und anschließend folgt die Befüllung der Probetaschen. Bei einer Spannung von 130 Volt für 60 Min werden die Proteine aufgetrennt. Die Laufgeschwindigkeit ist abhängig von Ladung, Größe und Form der Proteine. Niedermolekulare Proteine können das Gel leicht passieren, hochmolekulare dagegen haben eine geringe Laufgeschwindigkeit. Somit sind im oberen Bereich des Gels die größeren Moleküle angelagert und im unteren die kleineren Moleküle (Laemmli 1970).

Tabelle 10: Pipettierschema (1,5 mm Gel)

Trenngel (10%)	Volumen
Trenngelpuffer	2 ml
ddH ₂ O	3,214 ml
Acrylamid (30%)	2,665 ml
TEMED	60 µl
APS	60 µl

Sammelgel (3,6 %)	Volumen
Sammelgelpuffer	1 ml
ddH ₂ O	2,44 ml
Acrylamid (30 %)	0,506 ml
TEMED	50 µl
APS	50 µl

Western Blot (Southern 1971)

Um die Proteine des Polyacrylamidgels zu übertragen, wird eine Spannung auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran angelegt. Für die Übertragung der Proteine auf die PVDF Membran verwendet man die Semidry Methode (Towbin et al. 1979).

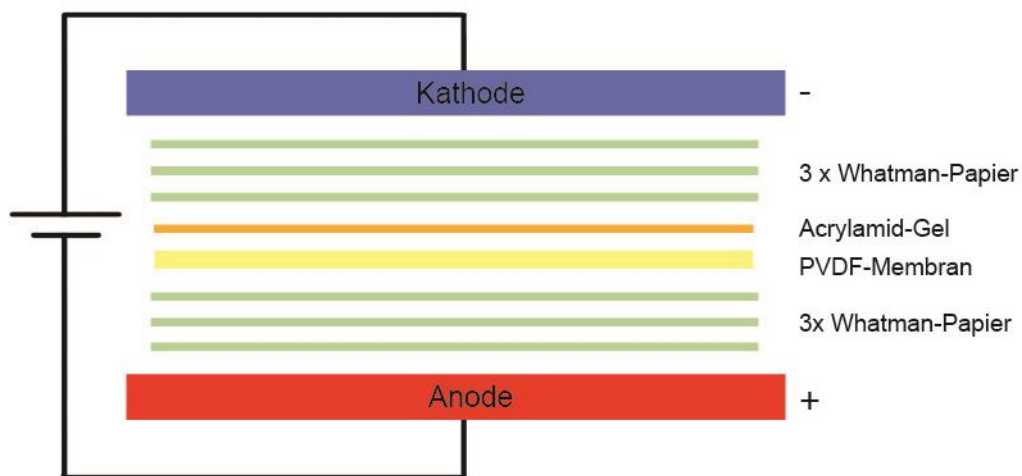


Abbildung 6: Versuchsaufbau einer Elektrophoresekammer für Western Blots (Blotsandwich)

Am Boden der Kammer liegt die Anode, auf die drei Whatman-Papiere folgen, die zuvor in Anodenpuffer getränkt werden. Darüber befindet sich die aktivierte PVDF-Membran, auf der wiederum das Acrylamid-Gel und drei Whatman-Papiere in Kathodenpuffer aufgelegt werden. Im Deckel der Kammer befindet sich die Kathode. Die einzelnen Schichten sollen luftblasenfrei aufeinandergelegt werden, bevor die Kammer verschlossen wird. Zwischen der Kathode und der Anode wird ein Stromfluss angelegt, wodurch die Proteine vom Gel auf die Membran wandern (Kyhse-Andersen 1984).

Als erstes werden drei Whatman-Papiere in den Anoden- bzw. Kathodenpuffer gelegt. Als nächstes folgt die Aktivierung der PVDF-Membran für 15 Sekunden in Ethanol und anschließend das Eintauchen in ddH₂O. Die einzelnen Schichten werden wie in Abbildung 6 abgebildet nacheinander geschichtet. Dabei ist zu beachten, dass sich zwischen den Schichten keine Luftblasen befinden. Falls vorhanden, werden diese mit Hilfe eines Rollers bzw. Gelschabers beseitigt. Durch Anlegen einer Spannung von 25 V bei einem konstanten Strom von 1 mA für 30 Min wird der Blot durchgeführt.

Entwickeln der Blots

Nach dem Blotting werden die Membranen aus der Elektrophoresekammer entnommen und mit Magermilchpulverlösung (5%) für 1 Stunde bei Raumtemperatur blockiert, umso unspezifische Bindungen zu verhindern. Nach Abgießen der Blockierungslösung folgt eine primäre Antikörperlösung (Konzentration DSPP 1:1000) bei 4 °C über Nacht. Am nächsten Tag werden vor dem Inkubationsschritt die Membranen zunächst drei Mal mit TBS gewaschen und anschließend mit einer sekundären Antikörperlösung (Konzentration 1:5000) für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Danach erfolgt eine dreimalige Waschung der Membranen mit TBS-T.

Der primäre Antikörper richtet sich gegen das untersuchte Protein und bindet an das spezifische Epitop. Der sekundäre Antikörper richtet sich dagegen gegen das FC-Fragment, welches spezifisch für die Spezies ist aus der der primäre Antikörper stammt. Außerdem ist der sekundäre Antikörper Peroxidase gekoppelt, wodurch eine Lichtreaktion von Luninol und Wasserstoffperoxid katalysiert wird, diese ist in der Dunkelkammer sichtbar.

Zur Auswertung der Blots wird Super Signal West Femto Maximum Sensitivity Substrate von Thermo Scientific genutzt. Die Lösungen werden 1:1 gemischt und pro Blot 300 µl verteilt. Zur Auswertung und Digitalisierung der Blots wird ein Luminiszenzdetektor (LAS-1000, Fujifilm) genutzt.

Rasterelektronenmikroskopie (REM)

Mit dem REM (Philips XL20 Scanning Electron Microscope) erfolgt eine Untersuchung der Probenoberflächen durch fein gebündelte Elektronenstrahlen. Hierfür werden die Proben in 4% PFA gelagert, bis sie mit flüssigem Stickstoff abgekühlt und anschließend mit zwei Zangen vor dem ersten Molaren zerbrochen werden. Die Kiefer müssen vor der Untersuchung ihren Wasseranteil verlieren, dies geschieht durch eine aufsteigende Alkoholreihe (50%, 70%, 80%, 90% und 96% Ethanol). Außerdem müssen die Proben mit einem Metallfilm (Gold) überzogen werden, um die Leitfähigkeit herzustellen. Dabei ist zu beachten, dass dieser nicht zu dick aufgedampft wird, um die Oberflächenstruktur nicht zu verfälschen.

Mikro- Computertomografie (Mikro- CT)

Das Mikro- CT gehört zu den Kegelstrahlröntgensystemen und ermöglicht eine 3-dimensionale Rekonstruktion des Bildes durch die Berechnung einer Reihe von Röntgen Absorptionsmessungen.

Der Aufbau besteht aus einer Röntgenröhre und einem Detektorarray zur Ermittlung der Elektronenenergie. Die Proben werden in 70 % Ethanol konserviert und auf dem Drehteller in der Messkammer platziert. Die Geräteeinstellungen (VivaCT-80 Mikro-CT-System) lagen bei 70 kVp, 114 mAs, 500 ms Integrationszeit, 1000 Vorsprünge / 180 °. Das Auflösungsvermögen ist abhängig von der Größe des Detektorarrays, der mechanischen Genauigkeit der Drehbewegung und der Röntgenfokusgröße. Letzteres wurde nochmals korrigiert auf 15,4 µm. Das Dentinvolumen und die Dentindichte werden in mg Hydroxylapatit pro cm³ (mgHA/ cm³) angegeben und mittels Herstellersoftware bewertet (Buzug 2005).

III. ERGEBNISSE

Für die Entwicklung und den Schutz der Pulpa ist die Dentinschicht von Bedeutung. Es gibt drei Arten von Dentin, die sich in ihrer Entwicklungszeit und ihren Auslösern unterscheiden. Während der Dentinogenese entsteht zunächst das primäre Dentin, es wird lebenslang weitergebildet und wird dann als Sekundärdentin bezeichnet. Kommt es zur Reizung des Zahnes durch zum Beispiel Karies oder freiliegendem Dentin bildet der Zahn Tertiärdentin zum Schutz der Pulpa, in der sich im Bindegewebe die Nerven, Lymph- und Blutgefäße befinden.

Durch vorherige Untersuchungen war bekannt, dass Meprin β eine Protease ist, die sowohl eine Rolle bei der Prokollagen I Maturierung als auch bei der DSPP Spaltung einnimmt (Broder und Becker-Pauly 2013; Tsuchiya et al. 2011).

Der Nachweis, dass Meprine DSPP spalten, konnte bisher nur beim DSPP des Schweins erbracht werden. In dem nachfolgenden Versuch (Western Blot) wurde es erstmals für humanes DSPP belegt. Hierfür wurde rekombinantes Meprin α oder Meprin β mit einem Zelllysate von DSPP überexprimierenden HEK- Zellen inkubiert. Nach 60 Minuten war bei Meprin α eine geringfügige Erhöhung des DSPP Spaltprodukts DPP zu beobachten (~ 55 kDa). Bei Meprin β war während des Experiments ein kontinuierlicher Verlust des gesamten DSPP (~ 120 kDa), sowie des DPP Signals zu erkennen (Abbildung 7).

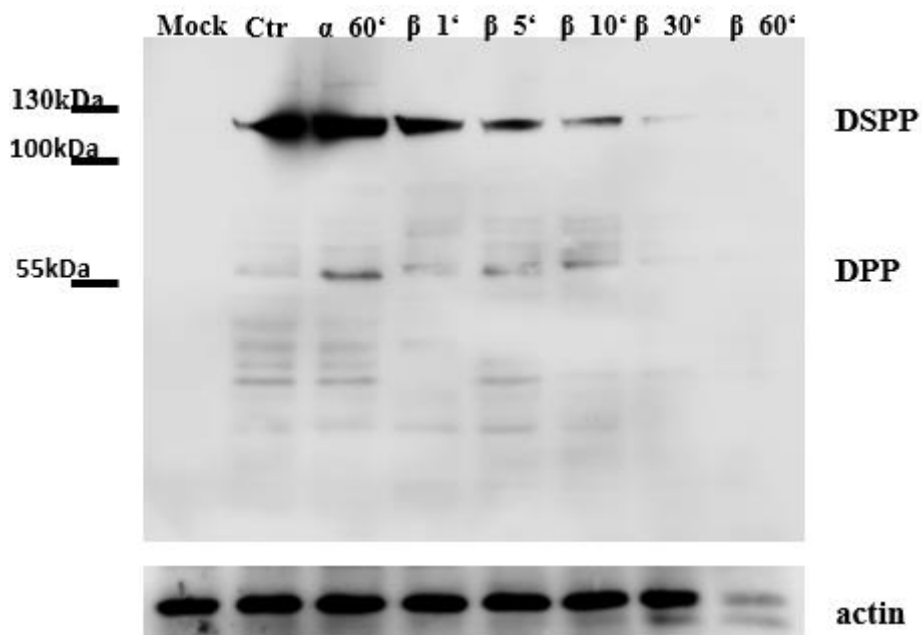


Abbildung 7: Western Blot Analyse der DSPP Spaltung

In HEK Zelllysaten mit rekombinantem Meprin α wurde nach 60 Minuten ein stärkeres Signal bei DPP nachgewiesen. Bei den aufgetragenen Proben mit rekombinantem Meprin β war ein Verlust des Signals für die vollständige Länge von DSPP und DPP zu beobachten.

Die Rolle der Meprine bei der Proteolyse von DSPP und Prokollagen I im Dentin sollte auch *in vivo* mittels Mep1a^{-/-} und Mep1b^{-/-} Mäusen überprüft werden.

Nach Entfernung der Kiefer wurden diese auf Unterschiede untersucht. Doch es bestanden keine Unterschiede in Größe, Form und Farbe (Abbildung 8).

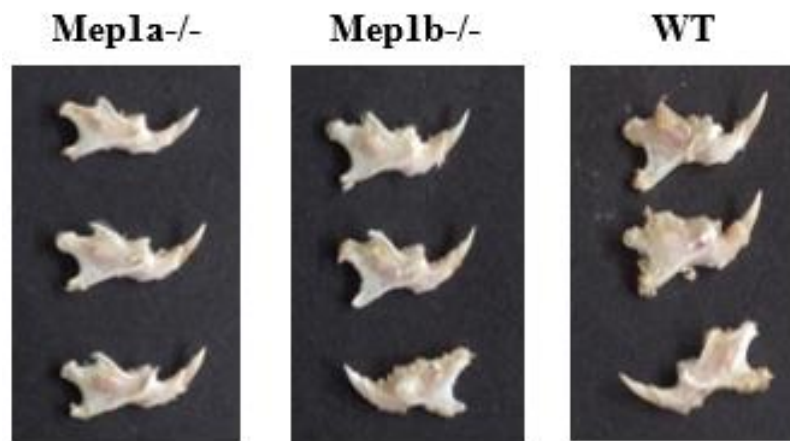


Abbildung 8: Makroskopische Bilder des Unterkiefers von Mep1a^{-/-}, Mep1b^{-/-} und WT Mäusen

Um die Schneidezähne, die Molaren und den Alveolarknochen nochmals zu vergleichen, wurden Mikro-CT Aufnahmen von den Kiefern der einzelnen Genotypen angefertigt. Durch diese dreidimensionale Bildgebung konnten in einem Querschnitt die einzelnen Komponenten verglichen werden, dabei war kein Unterschied festzustellen. Durch das Programm des Mikro CT war es möglich, die Dentindichte (BMD= bone mass density) und das Dentinvolumen zu bestimmen. Bei der Dentindichte wiesen Mep1a^{-/-} Tiere einen signifikant höheren Wert (1297 mgHA/cm³) als die anderen beiden Genotypen, Mep1b^{-/-} (1281 mgHA/cm³) und WT (1269 mgHA/cm³) auf (Abbildung 10). Beim Dentinvolumen war eine geringfügige Erniedrigung beim WT (7.93 mm³) erkennbar, diese jedoch war nicht signifikant im Vergleich zu Mep1a^{-/-} (7.81 mm³) und Mep1b^{-/-} Tieren (7.34 mm³) (Abbildung 11).

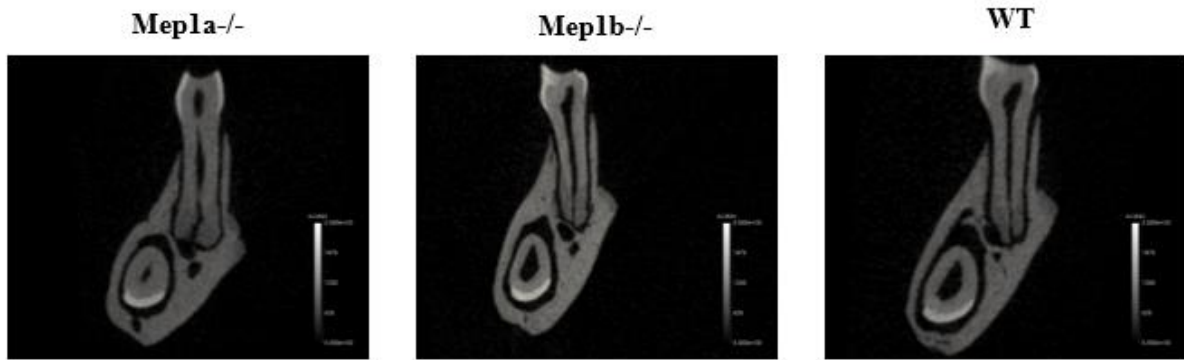
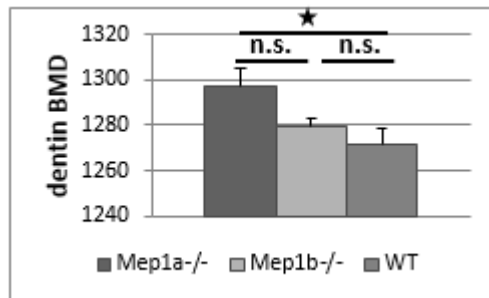


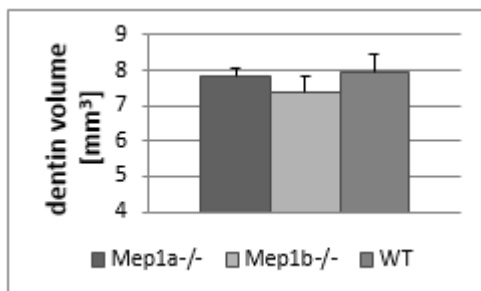
Abbildung 9: Querschnitt des Unterkiefers von Mep1a^{-/-}, Mep1b^{-/-} und WT durch Mikro-CT Analyse



Genotype	Mean BMD dentin
Mep1a ^{-/-}	1297 mgHA/cm ³
Mep1b ^{-/-}	1281 mgHA/cm ³
WT	1269 mgHA/cm ³

Abbildung 10: Beurteilung der Dentindichte (BMD = bone mass density) von Mep1a^{-/-}, Mep1b^{-/-} und WT-Tieren

Mep1a^{-/-} weist einen geringfügig höheren mittleren BMD Wert als die anderen zwei Genotypen auf (n = 3; * = p < 0,05 in ANOVA mit Tukey-Kramer-Test).



Genotype	Mean dentin volume
Mep1a ^{-/-}	7.81mm ³
Mep1b ^{-/-}	7.34mm ³
WT	7.93mm ³

Abbildung 11: Beurteilung des Dentin Volumens von Mep1a^{-/-}, Mep1b^{-/-} und WT-Tieren

Es zeigt sich kein wesentlicher Unterschied in den einzelnen Mittelwerten der Genotypen (n = 3, ANOVA mit Tukey-Kramer-Test).

Nach den makroskopischen Untersuchungen wurden Schnitte von der Region des Schneidezahns und der Molaren angefertigt. Durch die Wahl der unterschiedlichen Regionen bekam man einen Einblick in die verschiedenen Entwicklungsstadien. Da es sich bei dem Schneidezahn der Maus um einen wurzellosen dauerwachsenden Schneidezahn handelt, sind hier die frühen Entwicklungsstadien gut zu erkennen. Bei den Molaren zeigen sich wiederum die späteren Entwicklungsstadien.

In den HE gefärbten Schnitten des Schneidezahns konnte man gut den Aufbau des Zahnes erkennen und vergleichen. In Abbildung 12 ist eine Schicht des Schmelzes zu erkennen, wo bei näherer Betrachtung auch die Schmelzprismen sichtbar werden (weißes Sternchen Abbildung 12). Der Schmelzschicht liegt das reife Dentin (schwarzer Pfeil Abbildung 12) an, welches sich in einem blauviolett darstellt. Das noch nicht mineralisierte Prädentin stellt sich weißlich da (schwarzer runder Pfeil Abbildung 12). Angrenzend an diese Schicht erkennt man, die in einer Reihe angeordneten Odontoblasten mit blauem Zellkern (Bereich zwischen den weiß gepunkteten Linien Abbildung 12). Dem wiederum liegt die Pulpa an, die mit ihren eher ungeordneten sonstigen Pulpazellen mit blauem Zellkern und rotem Zytoplasma ebenso gut zu erkennen ist. Alle Strukturen sind in den verschiedenen Genotypen wiederzufinden und es zeigen sich keine Unterschiede im Aufbau und auch nicht in den einzelnen Strukturen.

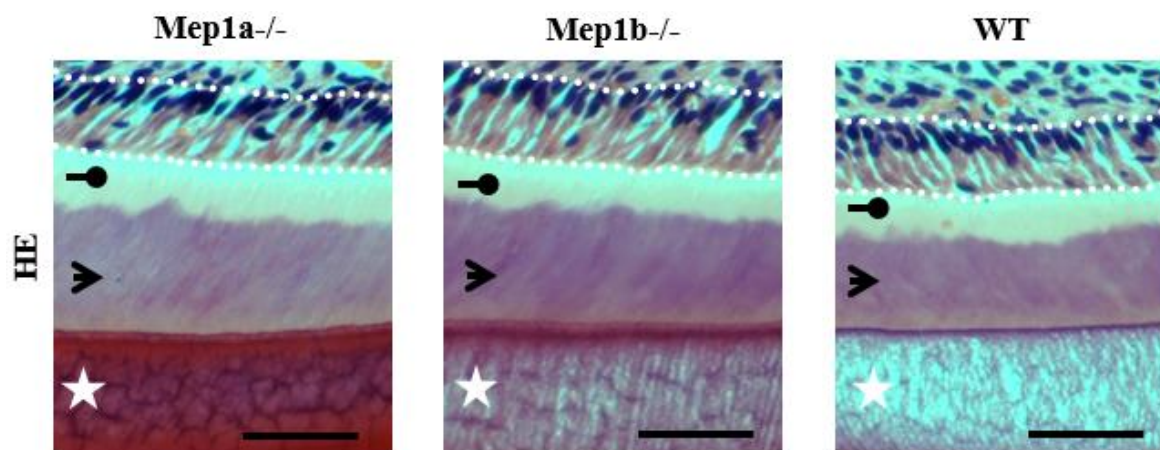


Abbildung 12: HE-Färbung der Schneidezähne von Mep1a^{-/-}, Mep1b^{-/-} und WT-Tieren

Diese Färbung dient der Beurteilung der Dentin-Mineralisation im frühen Entwicklungsstadium, sowie der einzelnen Schichten, Schmelz (weißer Stern), Dentin (schwarzer Pfeil) und Prädentin (runder schwarzer Pfeil) des Zahnes. In diesen Schnitten sind deutlich die in einer Reihe angeordneten Odontoblasten (Bereich zwischen den weiß gepunkteten Linien) zu erkennen. Der schwarze Balken entspricht 50 µm.

Der Ausschnitt des Schneidezahns wurde zudem mit Azan gefärbt, um die Kollagenfasern darzustellen und Unterschiede im reifen Dentin zu entdecken. Der Aufbau war identisch zu HE gefärbten Schnitten. In Abbildung 13 ist wieder eine Schicht Schmelz zu erkennen, gefolgt von dem reifen Dentin was sich aufgrund des hohen Kollagengehaltes in einem kräftigen blau darstellt (weißer Pfeil Abbildung 13). Darüber ist ein schmaler weißer Streifen erkennbar, der das Prädentin zeigt. Im oberen Teil des Schnittes zeigt sich wieder die Pulpa mit ihren Odontoblasten, wo sich typisch für die Azan Färbung Zytoplasma und Zellkerne rot darstellen. Auch bei dieser Färbung ließen sich keinerlei Unterschiede oder Defekte in den einzelnen Strukturen erkennen.

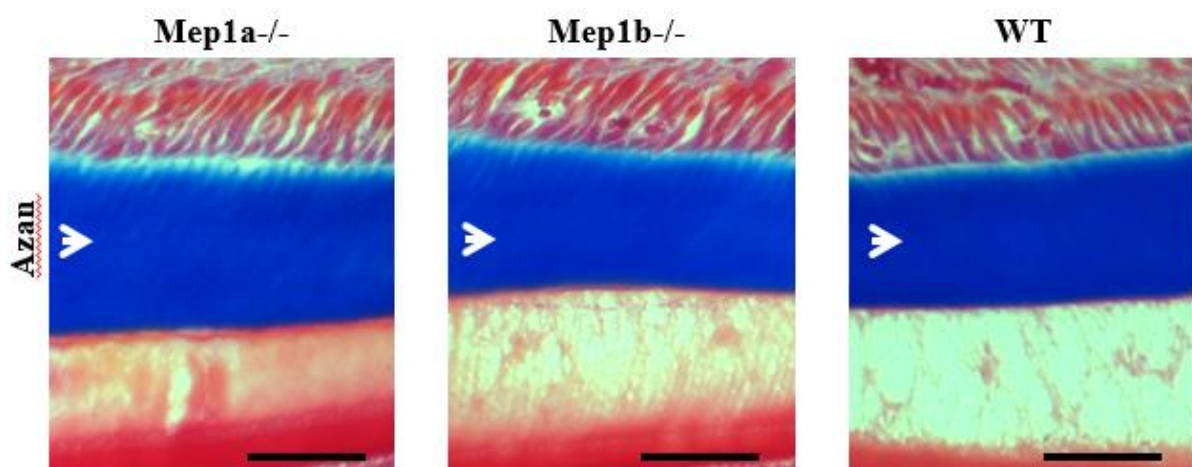


Abbildung 13: Azan Färbung der Schneidezähne von Mep1a^{-/-}, Mep1b^{-/-} und WT-Tieren

Diese Färbung dient der Darstellung der Kollagenstrukturen im frühen Entwicklungsstadium. Der weiße Pfeil weist auf die Schicht des Dentins. Der schwarze Balken entspricht 50 µm.

Zur Beurteilung der späteren Entwicklungsstadien wurden Schnitte der Molaren angefertigt. In Abbildung 14 mit HE gefärbten Molaren, sind die Schichten des Zahnes von links nach rechts zu betrachten. Links im Schnitt erkennt man die Odontoblasten mit blauem Zellkern und rötlichem Zytoplasma, die sich in einer Reihe anordnen (Bereich zwischen den weiß gepunkteten Linien in Abbildung 14). Angrenzend befindet sich eine dünne Schicht des Prädentins (weißer Pfeil Abbildung 14) gefolgt vom reifen mineralisierten Dentin. Hierbei sind bei höherer Vergrößerung auch Dentintubuli erkennbar. Unterschiede ließen sich in diesen Ausschnitten keine erkennen.

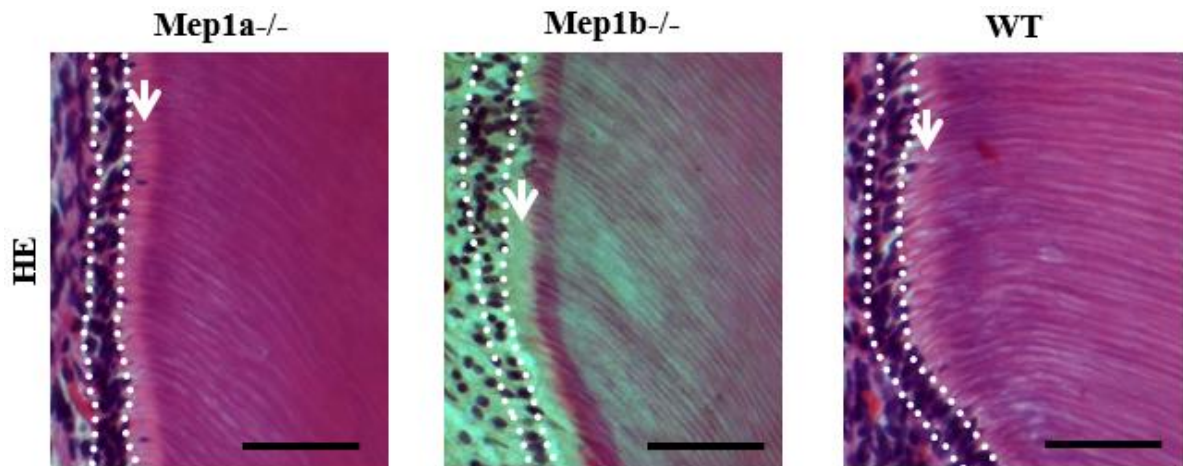


Abbildung 14: HE-Färbung der Molaren von Mep1a^{-/-}, Mep1b^{-/-} und WT-Tieren

Hier dient die Färbung der Beurteilung der Dentin-Mineralisation im späten Entwicklungsstadium, sowie der einzelnen Schichten des Zahnes. Der weiße Pfeil zeigt auch die Prädentin Schicht, die angrenzenden in einer Reihe angeordneten Odontoblasten befinden sich zwischen den weiß gepunkteten Linien. Es sind keine Unterschiede erkennbar. Der schwarze Balken entspricht 50 µm.

In den Azan gefärbten Schnitten der Molaren zeigten sich leicht gewellte feine Streifen des reifen Dentins, die Dentintubuli. Aufgrund der Kollagenfasern stellte sich das reife Dentin in einem kräftigen Blau dar. Das reife Dentin sah gleichmäßig gefärbt aus und wies keine Defekte in der Struktur des Dentins auf (weißen Pfeile in Abbildung 15). Die Pulpa färbte sich aufgrund ihres glycoprotein reichen, faserarmen, gallertigen Bindegewebes und dichten Kapillarnetz in einem rosaroten Ton (linke Seite der Schnitte in Abbildung 15).

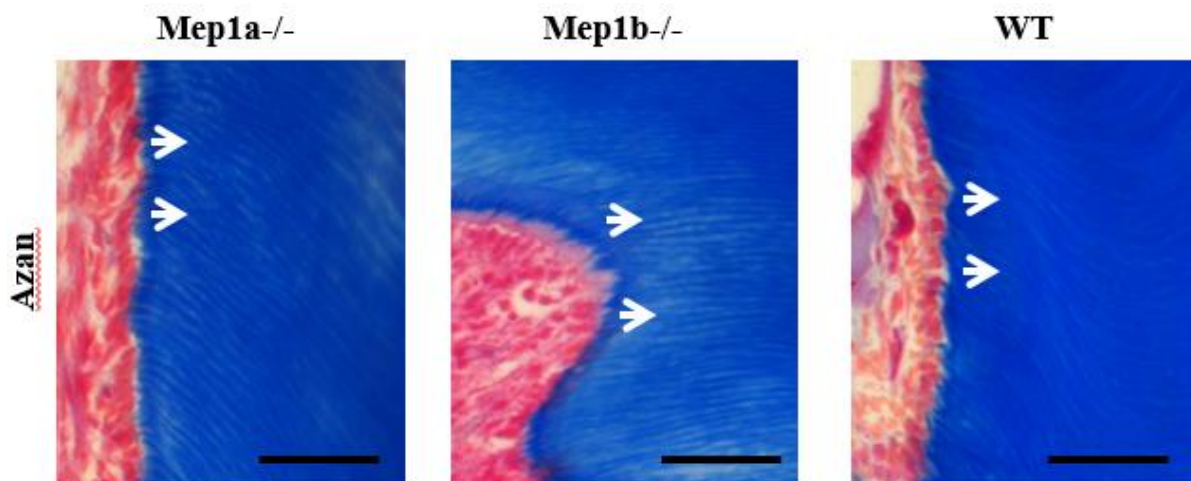


Abbildung 15: Azan Färbung der Molaren von Mep1a^{-/-}, Mep1b^{-/-} und WT- Tieren

Die Färbung dient der Darstellung der Kollagenstrukturen im späten Entwicklungsstadium. Die weißen Pfeile zeigen die Verlaufsrichtung der Dentintubuli an. Der schwarze Balken entspricht 50 µm.

Die bisher gefärbten Schnitte zeigten keine Unterschiede zwischen den einzelnen Genotypen. Durch das REM wurden die einzelnen Strukturen des Zahnes bei den verschiedenen Mauslinien analysiert. Bereits in der mittleren Vergrößerung war der genaue Aufbau des Schneidezahns zu identifizieren. In Abbildung 16 stellt sich im oberen Bereich der Alveolarknochen (1) dar, darunter angrenzend die Schicht des Dentins (2). Zentral in der Aufnahme befindet sich die Pulpa (3) und der Zahn wird einseitig von der Schmelzpfanne (4) begrenzt.

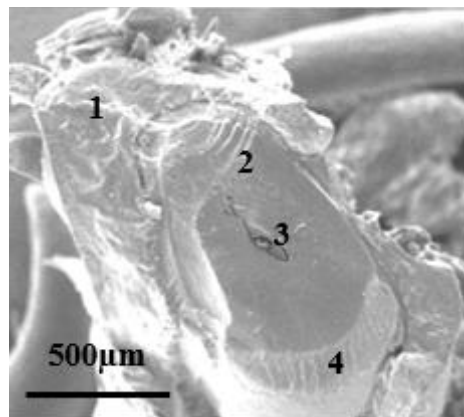


Abbildung 16: REM Aufnahme eines Schneidezahnes einer Maus

Bei mittlerer Vergrößerung (100x) lassen sich die einzelnen verschiedenen Strukturen, Alveolarknochen (1), Dentin (2), Pulpa (3) und Schmelz (4), darstellen.

Bei höherer Vergrößerung (6400x) erkennt man im Detail den Aufbau des Dentins mit seinen Dentintubuli (schwarze Pfeile Abbildung 17) umgeben von mineralisierter Kollagenmatrix.

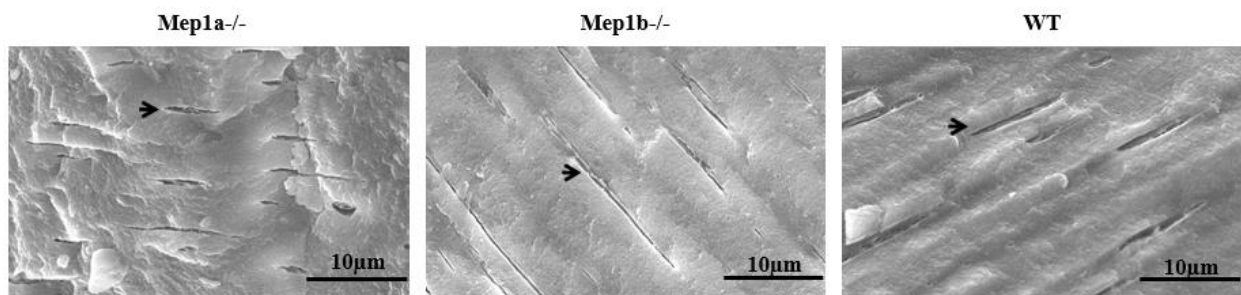


Abbildung 17: REM Aufnahmen der Dentin Schicht von Mep1a-/-, Mep1b-/- und WT Mäusen

Bei höherer (6400x) Vergrößerung des Dentins erkennt man deutlich die einzelnen Dentintubuli (schwarzer Pfeil), es sind zudem keine Defekte in den unterschiedlichen Genotypen zu erkennen.

Nach den makroskopischen, histologischen und ultrastrukturellen Untersuchungen wurde die Expression von Meprin β , BMP-1 und DSPP mittels Immunhistochemie untersucht. Bekannt war, dass DSPP zu DSP und DPP gespalten wird.

Bei den immunhistochemisch gefärbten Schneidezahnschnitten mit Anti-DSPP Antikörper war es wahrscheinlich, dass DSP in den Schichten des Prädentins nachgewiesen werden konnte. Darüber hinaus ließ sich sowohl DSPP als auch DSP im WT, Mep1a^{-/-} und Mep1b^{-/-} nachweisen. Bei der Betrachtung zeigte sich kein Unterschied in der Intensität des Signals (grauer runder Pfeil Abbildung 18). Auffällig war, dass in den Proben der WT und Mep1a^{-/-} Mäusen die Schichtdicke des DSPP/DSP Signals deutlich kleiner war als in Mep1b^{-/-} Tieren (weißer Pfeil Abbildung 18).

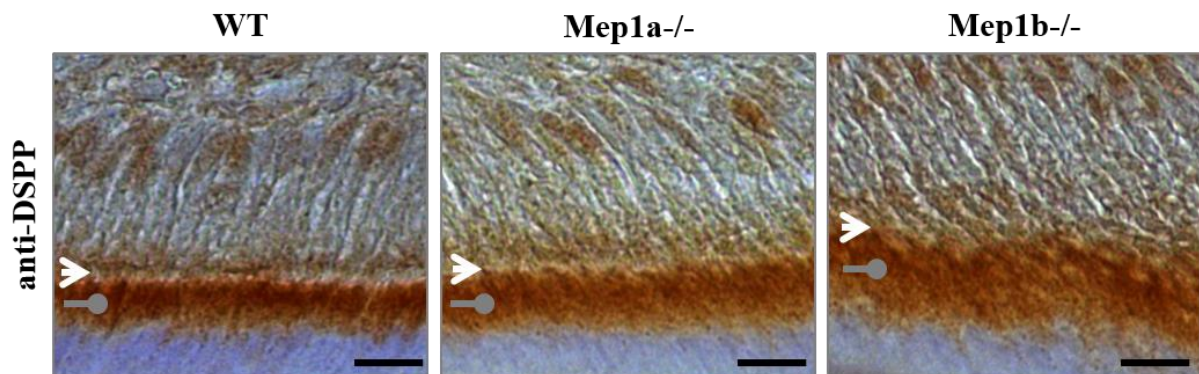


Abbildung 18: Immunhistochemische Färbung mit Anti- DSPP Antikörper der Schneidezähne von Mep1a^{-/-}, Mep1b^{-/-} und WT Mäusen

Ein eindeutiges Signal für DSPP ist in der jungen Prädentin Schicht (weißer Pfeil) von Mep1a^{-/-} und WT zu erkennen. In der Prädentin Schicht ist das DSPP Signal (grauer runder Pfeil) nicht zu finden. Im Schnitt von Mep1b^{-/-} ist kein Signal zu sehen. Der schwarze Balken entspricht 40 µm.

In den Schnitten des Schneidezahns, gefärbt mit Anti-Meprin β Antikörper, war ein schwaches Signal von Meprin β in den Schnitten des WTs als auch bei den Mep1a^{-/-} Mäusen zu erkennen. Dieses fand man deutlich abgeschwächt in dem Schnitt von Mep1b^{-/-} (weißer Pfeil Abbildung 19).

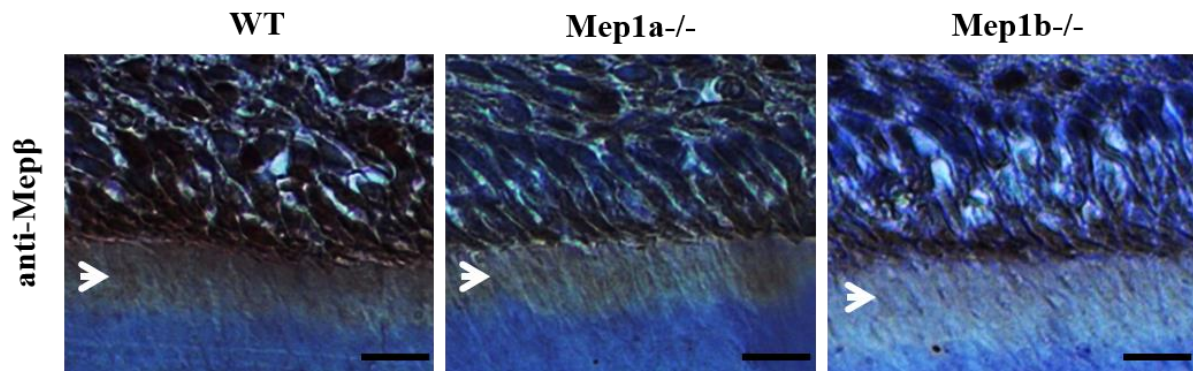


Abbildung 19: Immunhistochemische Färbung mit Anti-Meprin β Antikörper der Schneidezähne von Mep1a^{-/-}, Mep1b^{-/-} und WT Mäusen

In den Schnitten der Mep1a^{-/-} und WT Mäusen ist ein Signal in der Schicht des Prädentins (weißer Pfeil) erkennbar. Bei dem Schnitt von Mep1b^{-/-} ist nur eine allgemeine Hintergrundfärbung zu sehen. Der schwarze Balken entspricht 40 μ m.

Bei Verwendung eines Anti-BMP-1 Antikörper, kam wie erhofft ein deutlich stärkeres Signal im Schneidezahnschnitt der Mep1b^{-/-} zustande. In allen Schnitten war ein Signal zu erkennen, welches im apikalen Zellpol der Odontoblasten lokalisiert war (weißer Pfeil Abbildung 20).

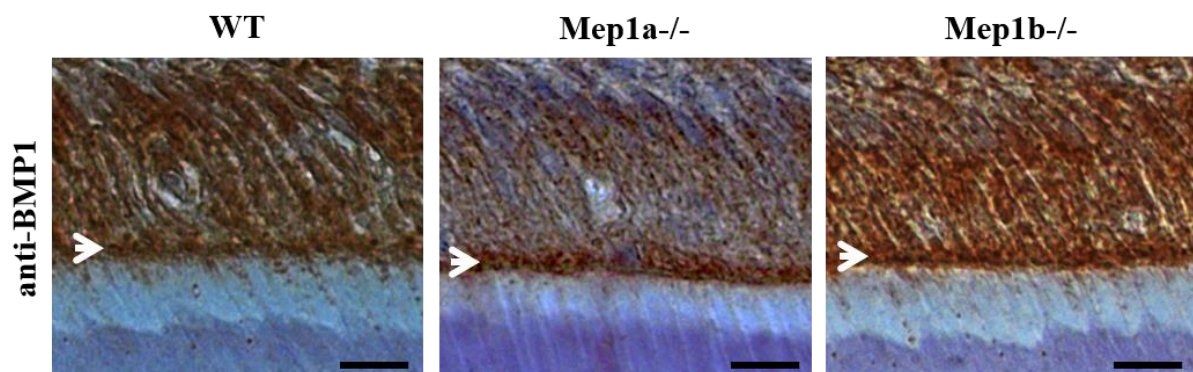


Abbildung 20: Immunhistochemische Färbung mit Anti BMP-1 Antikörper der Schneidezähne von Mep1a^{-/-}, Mep1b^{-/-} und WT Mäusen

In den Schnitten von WT und Mep1a^{-/-} ist ein schwächeres Signal in der Schicht des Prädentins (weißer Pfeil) nachweisbar als im Schnitt von Mep1b^{-/-}. Der schwarze Balken entspricht 40 μ m.

Auch in den immunhistochemischen Schnitten der Molaren gab es Unterschiede in der Intensität der Signale. Bei den Schnitten mit Anti-DSPP Antikörper war im Gegensatz zu den Schneidezahnschnitten das Signal für DSPP und DSP als auch die Höhe der Prädentinschicht in den unterschiedlichen Genotypen gleich (weißer Pfeil Abbildung 21).

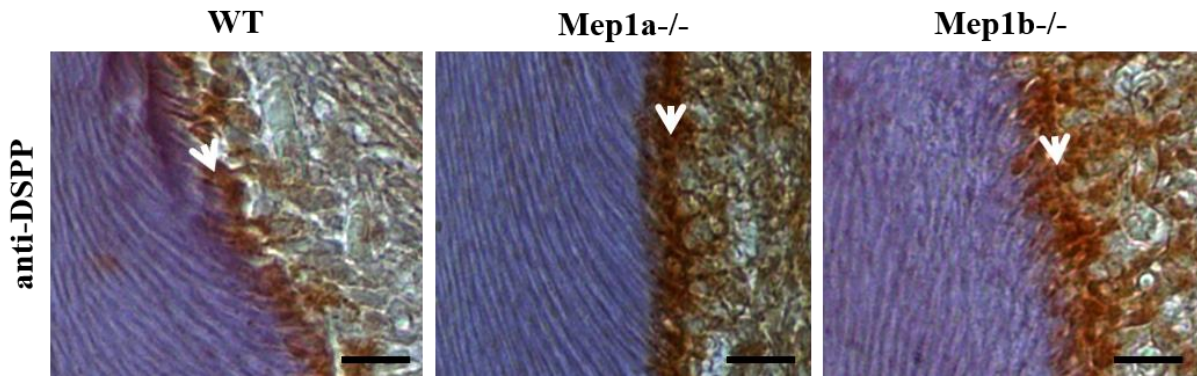


Abbildung 21: Immunhistochemische Färbung mit Anti- DSPP Antikörper der Molaren von Mep1a-/-, Mep1b-/- und WT Mäusen

In den verschiedenen Schnitten ist kein Signalunterschied in den unterschiedlichen Schichten des Prädentins (weißer Pfeil) zu erkennen. Der schwarze Balken entspricht 40 μ m.

In den mit Anti- Meprin β Antikörper behandelten Molarenschnitten zeigte sich das gleiche Ergebnis wie in den Schneidezahnschnitten. Auch hier war ein abgeschwächtes Signal in den Schnitten der Mep1b-/- Mäusen zu erkennen (weißer Pfeil Abbildung 22).

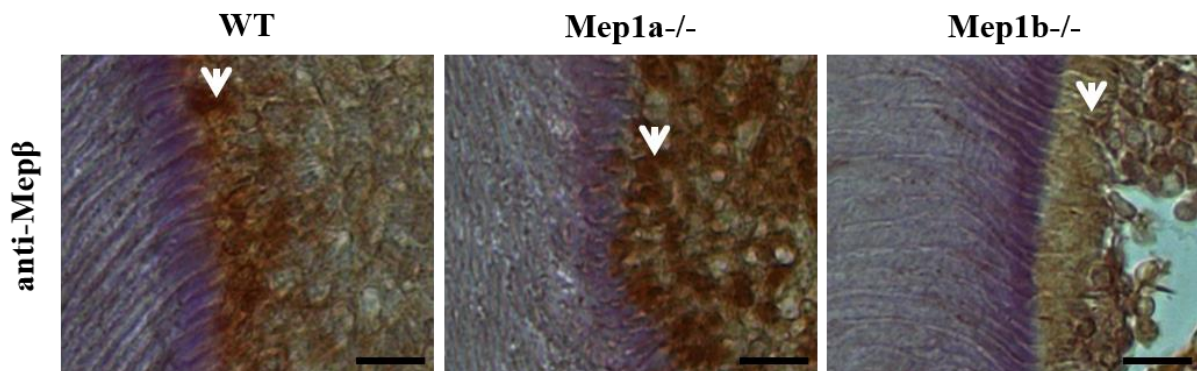


Abbildung 22: Immunhistochemische Färbung mit Anti-Meprin β Antikörper der Molaren von Mep1a-/-, Mep1b-/- und WT Mäusen

In den Schnitten von Mep1a-/- und WT ist eine Signalanhebung in den Schichten des Prädentins (weißer Pfeil) zu erkennen, aber nicht beim Schnitt von Mep1b-/- . Der schwarze Balken entspricht 40 μ m.

In den Molarenschnitten, die mit Anti-BMP-1 Antikörper inkubiert wurden, kam ein anderes Ergebnis als in den Schneidezahnschnitten zustande. Hier zeigte sich zwar ein Signal in allen Mäusestämmen, aber dieses war deutlich stärker bei den Mep1a-/- und Mep1b-/- Mäusen (weißer Pfeil Abbildung 23).

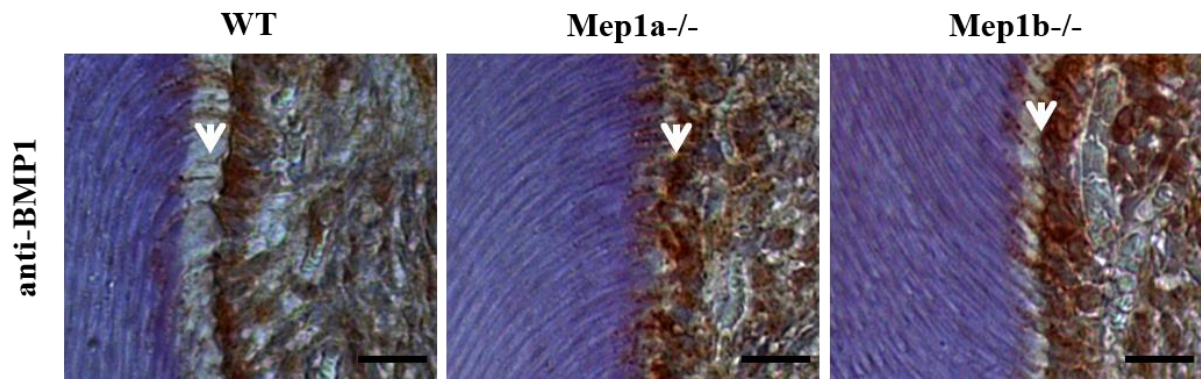


Abbildung 23: Immunhistochemische Färbung mit Anti BMP-1 Antikörper der Molaren von Mep1a^{-/-}, Mep1b^{-/-} und WT Mäusen

In den Schnitten von Mep1a^{-/-} und WT ist ein schwaches Signal in den Schichten des Prädentins (weißer Pfeil) zu erkennen, dieses scheint beim Schnitt von Mep1b^{-/-} stärker zu sein. Der schwarze Balken entspricht 40 µm.

IV. DISKUSSION

Die beiden Metalloproteasen Meprin α und Meprin β unterstützen sowohl die Reifung von Prokollagen I als auch von Prokollagen III zu Kollagenfibrillen (Broder et al. 2013). Darüber hinaus sind sie in der Lage das dentinspezifische Protein DSPP zu spalten. Dieses konnte sowohl für Meprin α und Meprin β als auch BMP-1 im Schwein nachgewiesen werden (Tsuchiya et al. 2011). Bei der Proteolyse des DSPPs entsteht das Spaltprodukt DPP. Dieses besitzt an seinem negativ geladenen C-terminalen Ende mehrere Calciumbindungsstellen. Ein weiterer Abbau des DPP Fragments ist nur durch Meprin β nachgewiesen. Dieser Prozess ist wiederum abhängig von der vorliegenden Calciumkonzentration (Tsuchiya et al. 2011). Da in Gegenwart von Calcium die Meprin β Aktivität nachlässt und die Proteolyse schwächer ist, wird vermutet, dass Calcium eine direkte Wirkung auf die Meprin β Aktivität besitzt (Arnold et al. 2015).

In den Versuchen mit humanem DSPP können die bisherigen Ergebnisse im Vergleich zum Zahnmaterial des Schweins bestätigt werden. Es wäre daher denkbar, dass das Dentin durch das freie Calcium vor zu hoher Meprin β Aktivität geschützt wird.

Die Propeptide des Prokollagens können zum einen durch Meprine, Meprin α und β , gespalten werden oder spezifisch durch N- oder C-Propeptidasen wie ADAMTS 2, 3 und 14 und BMP-1 (Colige et al. 1996; Kessler et al. 1996). BMP-1 ist in der Lage das C-terminale Ende des Prokollagen Typ 1 abzuspalten. Dieser proteolytische Vorgang kann dabei bis zu 20fach durch den Prokollagen-C-Proteinase-Enhancer-1 (PCPE-1) stimuliert werden (Vadon-Le Goff et al. 2015). Somit werden sowohl Meprin α und Meprin β als auch BMP-1 bei der Prokollagensynthese und damit bei der Dentinogenese als wichtige Komponenten angenommen (Tsuchiya et al. 2011). Diese Annahme bedurfte weiterer Nachforschung.

In den Versuchen mit Mep1a^{-/-}, Mep1b^{-/-} und WT Mäusen sollte die Bedeutung der Meprine für die Dentinogenese und damit Prokollagensynthese im Zahn herausgefunden werden. Hierfür haben wir makroskopisch und mikroskopisch die einzelnen Molaren und Schneidezähne der einzelnen Genotypen auf Defekte im jungen und reifen Prädentin sowie dem späteren mineralisierten reifen Dentin untersucht. Doch es zeigten sich keine Unterschiede zwischen den einzelnen Genotypen.

Im Mikro-CT hingegen zeigte sich ein erhöhter Wert bei der Dentindichte bei Mep1a^{-/-} Tieren und ein geringeres Dentinvolumen bei den Wildtyp Mäusen. Auch bei den immunhistochemischen Analysen konnte ein Signal für Meprin β bei den Genotypen des WT und bei Mep1a^{-/-} Tieren nachgewiesen werden. Dieses ist nicht bei den Mep1b^{-/-} Tieren zu finden.

Trotz der Ergebnisse zeigte sich der Anstieg des BMDs, sowie der Verlust des Dentinvolumens nicht wie erhofft in einem Phänotyp des Dentins. Man kann natürlich nicht komplett ausschließen, dass geringfügige Defekte im Dentin vorlagen, die nicht mit unseren Methoden erfassbar waren.

Auch muss man überdenken, ob die Knockout-Mäuse als geeignetes Tiermodell herangezogen werden können. Wir konnten nicht an die bisherigen Untersuchungen, die bei defizienten Mäusen signifikante Defekte im Bindegewebe nachweisen konnten (Broder et al. 2013), anknüpfen. Es muss in Betracht gezogen werden, dass die Aufgaben der Meprine bei der Prokollagensynthese und der Mineralisation des Dentins in den Knockout-Mäusen durch eine andere Protease kompensiert werden können. Somit wäre erklärlich, warum unsere untersuchten Mäuse auch keine Fehlbildungen des Dentins wie zum Beispiel bei *Dentinogenesis imperfecta* oder *Dentindysplasie Typ 2* aufweisen.

Mit hoher Wahrscheinlichkeit wird das proteolytische Potential der Meprine durch die Protease BMP-1 ersetzt. Ein Indiz dafür ist, dass bei unseren immunhistochemischen Schnitten mit dem Anti-BMP-1 Antikörper ein stärkeres Signal bei den Mep1a^{-/-} und Mep1b^{-/-} Mäusen zu finden war. Diese Annahme erfordert zur Klärung weitere Untersuchungen.

Eine Arbeit von Muir aus dem Jahre 2014, bei der mit BMP-1 Knockout-Mäusen experimentiert wurde, zeigt einen Phänotyp des Knochens, der einen *Osteogenesis imperfecta* ähnlichen Phänotyp ausbildet, der durch reduzierte Maturierung von Prokollagen und Dentin-Matrix-Protein 1, hohem Knochenumsatz und eine defekte Osteozyten Reifung ausgelöst wird (Muir et al. 2014). Da BMP-1 und Meprine beide zur Astacin Familie der Metalloproteasen gehören, kann sich dieses Tiermodell zur Weitererforschung eignen.

Dieses Tiermodell wurde in einer neuen Studie von Wang, die im Januar des Jahres 2017 veröffentlicht wurde, verwendet. Diese Arbeit lieferte die Bestätigung unserer Vermutung bezüglich der Rolle des BMP-1 an der Dentinogenese. Die Besonderheit bei den Knockout-Mäusen lag darin, dass sowohl BMP-1 als auch tolloid-like 1 (TLL1) deaktiviert wurde. BMP-1 und TLL1 gehören wie auch Meprin α und Meprin β zu den extrazellulären Matrixproteasen (Ge

und Greenspan 2006). Sie sind somit in der Lage DSPP und das Dentin-Matrix-Protein 1 zu spalten, wodurch sie zu wichtigen Proteasen der Dentinogenese werden (Steiglitz et al. 2004; Tsuchiya et al. 2011).

Die frühen Entwicklungsstadien der Dentinogenese wurden anhand von drei Wochen alten Mäusen untersucht. Diese wiesen Defekte in der Dentinmineralisation, eine Reduzierung der Wurzellänge des ersten Molaren um die Hälfte, Veränderungen der Molarenkrone, expandierte Prädentinschichten und eine verzögerte Zahneruption auf. Die späten Entwicklungsstadien bei acht Wochen alten Mäusen zeigten einen ähnlichen Phänotyp, nur die verzögerte Zahneruption erwies sich als vorübergehender Defekt und wurde in den späten Entwicklungsstadien nicht bestätigt (Wang et al. 2017).

Zusammenfassend wurde durch die Arbeit von Wang bewiesen, dass durch Deaktivierung von BMP-1 und TLL1 das homöostatische Gleichgewicht des Extrazellulärraumes gestört wird. Durch diese Gleichgewichtsstörung kommt es zu Kollagenansammlungen und zu einer Reduktion der nichtkollagenen Proteine wie DSPP und Dentin-Matrix-Protein 1. Dies hat zur Folge, dass die Wurzelbildung und Dentinmineralisation herabgesetzt ist und sich dadurch ein Phänotyp des Dentins ähnlich *Dentinogenesis imperfecta* ausbildet (Wang et al. 2017).

Somit ist dadurch erhärtet, dass bei unseren Versuchen die fehlende proteolytische Aktivität der Meprine durch BMP-1 ersetzt wurde und als Folge keine Störungen in der Dentinogenese der Knockout-Mäuse sichtbar waren.

V. ZUSAMMENFASSUNG

Für die Dentinogenese, die Bildung des Dentins, ist zum einen die Kollagensynthese mit der Reifung von Prokollagen I und III und zum anderen die Proteolyse der dentinspezifischen Proteine, vor allem des DSPP und seiner Spaltprodukte, von Bedeutung. Diese Vorgänge werden durch Proteasen, wie Metalloproteinasen Meprin α und Meprin β als auch BMP-1, katalysiert. In vorherigen Untersuchungen konnte ein Nachweis über die Relevanz der Proteasen *in vivo* für die Kollagen I Reifung und *in vitro* für die DSPP Spaltung geliefert werden. Dadurch wurden die Proteasen als Ursache für die Dentinmalformationen wie zum Beispiel bei *Osteogenesis imperfecta* in Betracht gezogen.

In der vorliegenden Arbeit sollte die *in vivo* Relevanz von Meprin α und Meprin β in dem Knockout-Mausmodell untersucht werden. Hierfür wurden die Schneidezähne und Molaren von Mep1a^{-/-} und Mep1b^{-/-} Mäusen im Vergleich zu Wildtyp Mäusen untersucht. Hierzu wurden makroskopische und mikroskopische Untersuchungen herangezogen. Weiter wurde die Schicht des Prädentins und des reifen Dentins durch Mikro- CT und REM Aufnahmen auf Dentindichte (BMD), Dentinvolumen und Defekte im Kollagengerüst überprüft. In den immunhistochemischen Untersuchungen wurde bei den Schnitten der Wildtyp Kontrollmäuse ein Signal in der Prädentin Schicht von Meprin β , BMP-1 und DSPP nachgewiesen. Damit ist die Lokalisation von Meprin β in der Schicht des Dentins gesichert.

Trotz allen Untersuchungen konnte kein Phänotyp des Dentins für Mep1a^{-/-} und Mep1b^{-/-} Mäusen beschrieben werden. Eine Hypothese ist, dass die Metalloprotease BMP-1 die Rolle der Meprine im Dentin übernimmt. Dies ist nun durch die Arbeit von Wang im Januar 2017 bestätigt worden.

VI. SUMMARY

For the dentinogenesis, which is the formation of dentin, two aspects are of importance: firstly, the collagen synthesis with the maturation of procollagen I and III and secondly the proteolysis of the dentin specific protein DSPP and its cleavage products. These are catalyzed by proteases such as metalloproteinases Meprin α and Meprin β as well as BMP-1. The relevance of these proteases has been proven *in vivo* for procollagen I maturation and *in vitro* for the cleavage of DSPP. Therefore, the proteases were considered to be involved in dentin malformations such as in *Osteogenesis imperfecta*.

The aim of the work presented here was to study the relevance of Meprin α and Meprin β *in vivo* in the knockout mouse model. For this purpose, the incisors and molars of Meprin α and Meprin β knockout mice were compared to those of wild type mice. For this we used macroscopic and microscopic examinations. In addition, the layer of predentin and the mature dentin was assessed with Micro CT and SEM micrographs regarding dentin density (BMD), dentin volume and defect in the collagen scaffold. The immunohistochemistry studies showed a signal in the predentin layer of Meprin β , BMP-1 and DSPP in the histological sections of wild-type control mice. Thus, the localization of Meprin β in the layer of dentin was determined.

Despite all experiments no dentin phenotype could be discovered in the knockout mice Meprin α and Meprin β . One explanation could be that the metalloproteinases BMP-1 takes over the function of the meprins inside the dentin. This was proved by the study of Wang in January 2017.

VII. LITERATURVERZEICHNIS

- Arnold, P., Koopmann, L., Peters, F., Birkenfeld, F., Vadon-Le Goff, S., Damm, T., Qin, C., Moali, C., Lucius, R., Becker-Pauly, C. (2016)** „Deficiency of the DSPP-cleaving enzymes meprin α and meprin β does not result in dentin malformation in mice.“ *Cell Tissue Res* 367(2): 351-358
- Arnold, P., Schmidt, F., Prox, J., Zunke, F., Pietrzik, C., Lucius, R., Becker-Pauly, C. (2015)** „Calcium negatively regulates meprin beta activity and attenuates substrate cleavage.“ *FASEB J* 29: 3549-3557
- Arolas, J.L., Broder, C., Jefferson, T., Guevara, T., Sterchi, E.E., Bode, W., Stöcker, W., Becker-Pauly, C., Gomis-Rüth X.F. (2012)** „Structural basis for the sheddase function of human meprin β metalloproteinase at the plasma membrane.“ *PNAS* vol. 109, no. 40: 16131-16136
- Becker, C., Kruse, M.N., Slotty, K.A., Kohler, D., Harris, J.R., Rosmann, S., Sterchi, E.E., Stocker, W. (2003)** „Differences in the activation mechanism between the alpha and beta subunits of human meprin.“ *Biol Chem* 384: 825-831
- Becker-Pauly, C., Barre, O., Schilling, O., Auf dem Keller, U., Ohler, A., Broder, C., Schutte, A., Kappelhoff, R., Stocker, W., Overall, C.M. (2011)** „Proteomic analyses reveal an acidic prime side specificity for the astacin metalloprotease family reflected by physiological substrates.“ *Mol Cell Proteomics* 10 (M111): 009233
- Becker-Pauly, C., Höwel, M., Walker, T., Vlad, A., Aufenvenne, K., Oji, V., Lottaz, D., Sterchi, E.E., Debela, M., Magdolen, V., Traupe, H., Stöcker, W. (2007)** „The alpha and beta subunits of the metalloprotease meprin are expressed in separate layers of human epidermis, revealing different functions in keratinocyte proliferation and differentiation.“ *J Invest Dermatol* 127: 1115-1125
- Beynon, R.J., Shannon, J.D., Bond, J.S. (1981)** „Purification and characterization of a metallo-endoproteinase from mouse kidney.“ *Biochem J* 199: 591-598
- Broder, C., Becker-Pauly, C. (2013)** „The metalloproteases meprin α and meprin β : unique enzymes in inflammation, neurodegeneration, cancer and fibrosis.“ *Biochem J* 450: 253–264
- Broder, C., Arnold, P., Vadon-Le Goff, S., Konerding, M.A., Bahr, K., Muller, S., Overall, C.M., Bond, J.S., Koudelka, T., Tholey, A. et al. (2013)** „Metalloproteases meprin alpha and meprin beta are C- and N-procollagen proteinases important for collagen assembly and tensile strength.“ *Proc Natl Acad Sci U S A* 110: 14219-14224
-

- Buddecke, E. (1981)** „Biochemische Grundlagen der Zahnmedizin.“ Reprint 2012, De Gruyter, Berlin
- Buzug, T.M. (2005)** „Einführung in die Computertomographie: mathematisch-physikalische Grundlagen der Bildrekonstruktion.“ S.56-58, Springer, Berlin
- Colige, A., Li, S.W., Sieron, A.L., Nusgens, B.V., Prockop, D.J. (1996)** „cDNA cloning and expression of bovine procollagen I N-proteinase: A new member of the superfamily of zinc-metalloproteinases with binding sites for cells and other matrix components.“ Proc Natl Acad Sci U S A 94(6): 2374–2379
- Dumermuth, E., Sterchi, E.E., Jiang, W.P., Wolz, R.L., Bond, J.S., Flannery, A.V., Beynon, R.J. (1991)** „The astacin family of metalloendopeptidases.“ J Biol Chem 266(32): 21381-21385
- Ehrenfeld, M., Gängler, P., Hoffmann, T., Schwenger, N., Willershausen, B. (2010)** „Konservierende Zahnheilkunde und Parodontologie.“ 3. unveränderte Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart
- Ge, G., Greenspan, D.S. (2006)** „Developmental roles of the BMP1/TLD metalloproteinases.“ Birth Defects Res C Embryo Today 78(1): 47-68
- Jefferson, T., Auf dem Keller, U., Bellac, C., Metz, V.V., Broder, C., Hedrich, J., Ohler, A., Maier, W., Magdolen, V. et al. (2013)** „The substrate degradome of meprin metalloproteases reveals an unexpected proteolytic link between meprin β and ADAM10.“ Cell Mol Life Sci 70(2): 309-333
- Kessler, E., Takahara, K., Biniaminov, L., Brusel, M., Greenspan, D.S. (1996)** „Bone morphogenetic protein-1: the type I procollagen C-proteinase.“ Science 271: 360-362
- Kim, J.W., Hu, J.C., Lee, J.I., Moon, S.K., Kim, Y.J., Jang, K.T., Lee, S.H., Kim, C.C., Hahn, S.H., Simmer, J.P. (2005)** „Mutational hot spot in the DSPP gene causing dentinogenesis imperfecta type II.“ Hum Genet 116(3): 186–191
- Kyhse-Andersen, J.J. (1984)** „Electroblotting of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose.“ J Biochem Biophys Meth 10: 203–209
- Laemmli, U.K. (1970)** „Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.“ Nature Bd 227, S. 680–685
- Muir, A.M., Ren, Y., Butz, D.H., Davis, N.A., Blank, R.D., Birk, D.E., Lee, S.J., Rowe, D., Feng, J.Q., Greenspan, D.S. (2014)** „Induced ablation of Bmp1 and Tll1 produces osteogenesis imperfecta in mice.“ Hum Mol Genet 23: 3085-3101
-

- Rajpar, M.H., Koch, M.J., Davies, R.M. et al. (2002)** „Mutation of the signal peptide region of the bicistronic gene DSPP affects translocation to the endoplasmic reticulum and results in defective dentine biomineralization.“ *Hum Mol Genet* 11: 2559–2565
- Schröder, H. (2000)** „Orale Strukturbiologie.“: Georg Thieme Verlag, Stuttgart
- Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J., Klenk, D.C. (1985)** „Measurement of protein using bicinchoninic acid.“ *Anal Biochem* Bd 150, no. 1, S. 76–85
- Steiglitz, B.M., Ayala, M., Narayanan, K., George, A., Greenspan, D.S. (2004)** „Bone morphogenetic protein-1/Tolloid-like proteinases process dentin matrix protein-1.“ *J Biol Chem* 279(2): 980-6
- Stöcker, W., Grams, F., Baumann, U., Reinemer, P., Gomis-Rüth, F., McKay, D.B., Bode, W. (1995)** „The metzincins--topological and sequential relations between the astacins, adamalysins, serralysins, and matrixins (collagenases) define a superfamily of zinc-peptidases.“ *Protein Sci* 4: 823-840
- Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J. (1979)** „Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications.“ *Proc Natl Acad Sci U S A* 76: 4350-4354
- Tsuchiya, S., Simmer, J.P., Hu, J.C., Richardson, A.S., Yamakoshi, F., Yamakoshi, Y. (2011)** „Astacin proteases cleave dentin sialophosphoprotein (Dspp) to generate dentin phosphoprotein (Dpp).“ *J Bone Miner Res* 26: 220-228
- Vadon-Le Goff, S., Hulmes, D.J., Moali, C. (2015)** „BMP-1/tolloid-like proteinases synchronize matrix assembly with growth factor activation to promote morphogenesis and tissue remodeling.“ *Matrix Biol* 44-46: 14-23
- Wang, J., Muir, A.M., Ren, Y., Massoudi, D., Greenspan, D.S., Feng, J.Q. (2017)** „Essential Roles of Bone Morphogenetic Protein-1 and Mammalian Tolloid-like 1 in Postnatal Root Dentin Formation.“ *J Endod.* 43(1): 109-115
- Welsch, D. (2010)** „Sobotta Lehrbuch Histologie.“ 3. Auflage, S.298-299, Elsevier GmbH, München
- Zhang, X., Zhao, J., Li, C., Gao, S., Qiu, C., Liu, P., Wu, G., Qiang, B., Lo, W.H., Shen, Y. (2011)** „DSPP mutation in dentinogenesis imperfecta Shields type II.“ *Nat Genet* 27: 151–152
-

VIII. DANKSAGUNG

Danken möchte ich meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Ralph Lucius für die Zurverfügungstellung dieses interessanten Themas. Seine freundliche, interessierte Betreuung wird mir immer in positiver Erinnerung bleiben.

Mein nächster Dank geht an Herrn Dr. rer. nat. Philipp Arnold, der die Betreuung meines Themas übernahm. Hervorheben möchte ich dabei seine behutsame, nette Art mich an meine Aufgaben heranzuführen, die stetige Begleitung bei der Durchführung und besonders die Tatsache immer ein offenes Ohr für mich zu haben. Sehr geschätzt habe ich auch sein immer konstruktiv vermitteltes Wissen und die kritische Durchsicht dieser Arbeit.

Danken möchte ich auch den verständnisvollen, hilfsbereiten Mitarbeitern im Anatomischen Institut der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel. Hier insbesondere Frau Inez Götting, Frau Monika Kölln, Frau Katrin Neblung-Masuhr und Frau Bettina Facompré für die Hilfestellung bei der Herstellung der Schnitte und Färbungen und die Weitergabe ihres anatomischen-histologischen Wissens.

Die biochemischen Versuche der Dissertation fertigte ich im Biochemischen Institut der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel an, auch hier hatte ich wieder freundliche und hilfsbereite wissenschaftliche Mitarbeiter an meiner Seite, die mich geduldig in die Geräte und Versuche einwiesen. Ein besonderer Dank geht an Prof. Dr. rer. nat. Christoph Becker-Pauly und seine Forschungsgruppe für die reibungslose Zusammenarbeit mit den Versuchstieren.

Nicht vergessen möchte ich meinen Freundeskreis der mir in den kritischen Phasen immer Rückhalt gegeben hat und in Person von Frau Kaja Wieghardt zudem durch konstruktive, inhaltliche Kritik immer an meiner Seite stand.

Mein letzter großer Dank geht an meine Eltern. Ohne sie und ihre unermüdliche Unterstützung zum Studium und während der Studienzeit gäbe es diese Arbeit nicht.

IX. ANHANG

9.1 LEBENS LAUF

Persönliche Daten:

Name	Lara Koopmann
Geburtsdatum	23.10.1989
Geburtsort	Hamburg, Deutschland
Nationalität	deutsch

Schulbildung:

2000 - 2009	Gymnasium Grootmoor, Hamburg Abschluss: Allgemeine Hochschulreife
-------------	--

Studium:

10/2009 - 4/2010	Bachelor of Science Chemie, Universität Hamburg
9/2010 - 9/2011	Studium der Zahnmedizin, Universität Pécs, Ungarn
9/2011 - 7/2016	Studium der Zahnmedizin, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel Approbation: 18. Juli 2016
10/2016 - 04/2017	Promotionssemester, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

Beruf:

seit April 2017	Assistenz Zahnärztin in der Praxis von Herrn Dr. Skorzinski in Berlin
-----------------	---



Deficiency of the DSPP-cleaving enzymes meprin α and meprin β does not result in dentin malformation in mice

Philipp Arnold¹ · Lara Koopmann¹ · Florian Peters² · Falk Birkenfeld³ · Sandrine Vadon-Le Goff⁴ · Timo Damm⁵ · Chunlin Qin⁶ · Catherine Moali⁴ · Ralph Lucius¹ · Christoph Becker-Pauly²

Received: 14 December 2015 / Accepted: 19 August 2016
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2016

Abstract Formation of dentin requires the maturation of procollagen I and the proteolytic processing of the dentin sialophosphoprotein (DSPP). These cleavage events can be facilitated by the metalloproteinases meprin α and meprin β as well as by bone morphogenetic protein 1 (BMP-1). All three enzymes have been shown to play important roles during collagen I maturation in vivo and their potential in cleaving DSPP was demonstrated in vitro. Hence, it has been discussed whether meprin α , meprin β , BMP-1 or all three are crucial factors in the onset and progression of dentin-related diseases and this issue is addressed here. In this study, we compare the incisors and molars of meprin α (*Mep1a*^{-/-}) and meprin β (*Mep1b*^{-/-}) deficient mice with wild-type (WT) controls on the macroscopic and microscopic level. The dentin was evaluated towards the bone mineral density, dentin volume, calcification and collagen matrix integrity. Using immunohistochemistry, we could

identify meprin β , BMP-1 and DSPP/DSP in the pre-dentin of WT mice. Nevertheless, no significant dentin malformation was observed in *Mep1b*^{-/-} or *Mep1a*^{-/-} deficient mice.

Keywords Dentin · Meprin β · Dentinsialophosphoprotein (DSPP) · Collagen I · Dentinogenesis imperfecta

Introduction

The dentin sialophosphoprotein (DSPP) is a calcium binding protein that plays a crucial role in mammalian dentin calcification (Suzuki et al. 2012). DSPP is expressed as a precursor molecule and is proteolytically processed by different metalloproteinases, such as matrix metalloproteinases MMP-2, MMP-20 and BMP-1. DSPP consists in an N-terminal part termed dentin sialoprotein (DSP) (containing the dentin glycoprotein DGP) and a C-terminal cleavage product termed dentin phosphoprotein (DPP) (Fig. 1a; cleavage site indicated by black arrow) (Tsuchiya et al. 2011). The DPP consists in a rather short neutral N-terminal part and a long negatively charged C-terminus. This C-terminal part accounts for the binding of calcium ions and subsequent calcification of the dentin collagen matrix (Suzuki et al. 2009). DSPP (and its first cleavage product DSP) is mainly expressed by odontoblasts during tooth development and is located within the pre-dentin. DPP, the second cleavage product, on the other hand, is mainly located in the mineralized phase of the dentin. Loss of DSPP leads to a severe calcification phenotype in a mouse model (Suzuki et al. 2009, 2012). Recently, it was shown that isolated porcine DPP can be further processed by the metalloproteinases meprin α , meprin β and BMP-1 in vitro (Tsuchiya et al. 2011). Meprins α and β have been reported to cleave many proteins of the extracellular matrix including pro-collagens I and III, fibronectin and collagen IV (Broder

✉ Philipp Arnold
p.arnold@anat.uni-kiel.de

¹ Anatomical Institute, Kiel University, Otto-Hahn-Platz 8, 24118 Kiel, Germany

² Biochemical Institute, Kiel University, Otto-Hahn-Platz 9, 24118 Kiel, Germany

³ Department of Oral and Maxillofacial Surgery, University Hospital Schleswig-Holstein, Arnold-Heller-Str. 16, 24105 Kiel, Germany

⁴ Department of Tissue Biology and Therapeutic Engineering, Unité Mixte de Recherche 5305, Centre National de la Recherche Scientifique/University of Lyon, 69367 Lyon Cedex 7, France

⁵ Section Biomedical Imaging, Department of Radiology and Neurology, University Hospital Schleswig-Holstein, Am Botanischen Garten 18, 24118 Kiel, Germany

⁶ Department of Biomedical Sciences, Texas A&M University Baylor College of Dentistry, 3302 Gaston Avenue, 75246 Dallas, TX, USA

et al. 2013; Kruse et al. 2004; Prox et al. 2015) and BMP-1 was reported to be an important procollagen C-proteinase in vivo (Muir et al. 2014; Suzuki et al. 1996). With a high specificity for negatively charged amino acids around the scissile bond, DPP would be an ideal substrate for meprins (Becker-Pauly et al. 2011).

In this study, we used an overexpression cell culture system to demonstrate that addition of recombinant meprin β leads to reduced DSPP levels in HEK293 cell lysates, whereas meprin α had almost no effect. Additionally, we used jaws isolated from *Mep1a*^{-/-}, *Mep1b*^{-/-} and WT control mice and analyzed incisors and molars macro- and microscopically, as well as by micro-CT. For all animals, the BMD and the dentin volume were investigated. The dentin structure was evaluated using H&E and azan staining and scanning electron microscopy (SEM). Moreover, DSPP, meprin β and BMP-1 were stained immunohistochemically in *Mep1a*^{-/-}, *Mep1b*^{-/-} and WT mice to evaluate the potential of these animals as murine models for *dentinogenesis imperfecta* or other dentin-related diseases.

Materials and methods

Cell culture

HEK293 cells were kept in DMEM (1 \times) + GlutaMax-I (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) substituted with 10 % heat inactivated fetal calve serum (Life Technologies) and 1 % penicillin/streptomycin (Life Technologies) at 37 °C and 5 % CO₂. Cells were harvested 48 h post-transfection with a pcDNA3.1 plasmid carrying the full length cDNA of DSPP. They were lysed (4 °C) using an EDTA-free lysis buffer to allow for meprin β activity. Recombinant meprin proteases were added at 50 nM for the time indicated at 37 °C and the reaction was then stopped by the addition of loading dye and heating to 98 °C for 10 min. The control sample was incubated for 1 h to exclude proteolytic cleavage by other proteases. Subsequently, samples were loaded on a SDS gel, transferred to a PVDF membrane (0.2 μ m pore size) and proteins were detected using a DSPP-specific antibody (Santa Cruz Biotechnology) binding the DPP region of the protein. Recombinant meprin proteases were produced in insect cells as described previously (Becker et al. 2003; Becker-Pauly et al. 2007).

Animal handling, jaw removal and preparation

All animal work was performed in accordance with the local animal protection law. After animals were sacrificed, the lower jaws were removed and fleshed using fine surgical tools. Jaws were transferred into 4 % paraformaldehyde (PFA) prior to decalcification in 0.1 % EDTA solution for 6 weeks, embedded in paraffin and sectioned. Each experiment was performed with three animals per genotype.

Fig. 1 a Domain composition of the dentin sialophosphoprotein (DSPP). After proteolytic processing (black arrow) DSPP is separated into dentin sialoprotein (DSP) with the dentin glycoprotein (DGP) and the dentin phosphoprotein (DPP). DPP accounts for the binding of calcium via its negatively charged C-terminal part. Additionally the binding sites for the two antibodies used in this study are shown. One for immunohistochemical analysis (IHC AB) and one for western blot analysis (WB AB). b Western blot analysis of DSPP cleavage. A shift of the full length DSPP towards DPP could be detected in HEK cell lysates incubated with recombinant meprin α . The addition of meprin β results in a loss of the signal for the full-length DSPP and of the DPP (50nM). c–c' Macroscopic images of jaws from meprin α -deficient (*Mep1a*^{-/-}), meprin β -deficient (*Mep1b*^{-/-}) and wild-type (WT) animals. d Three-dimensional representation of a mouse jaw with the enamel in yellow. Dotted line indicates sampling plane for SEM images, boxes indicate sampling area for microscopic analysis and line indicates sampling plane for micro-CT slice representation. e–e' Slice representation of micro-CT analyzed mouse jaws from the three different genotypes. f Quantification of the dentin bone mineral density (BMD) for all three genotypes. *Mep1a*^{-/-} mice have significantly higher BMD than WT animals ($n = 3$; $*p < 0.05$ in ANOVA with Tukey–Kramer test). g Mean dentin BMD for all genotypes analyzed. h The dentin volume for *Mep1a*^{-/-}, *Mep1b*^{-/-} and WT animals showed no significant difference ($n = 3$, ANOVA with Tukey–Kramer test). i Mean dentin volume for all three genotypes

Micro-computed-tomography (micro-CT)

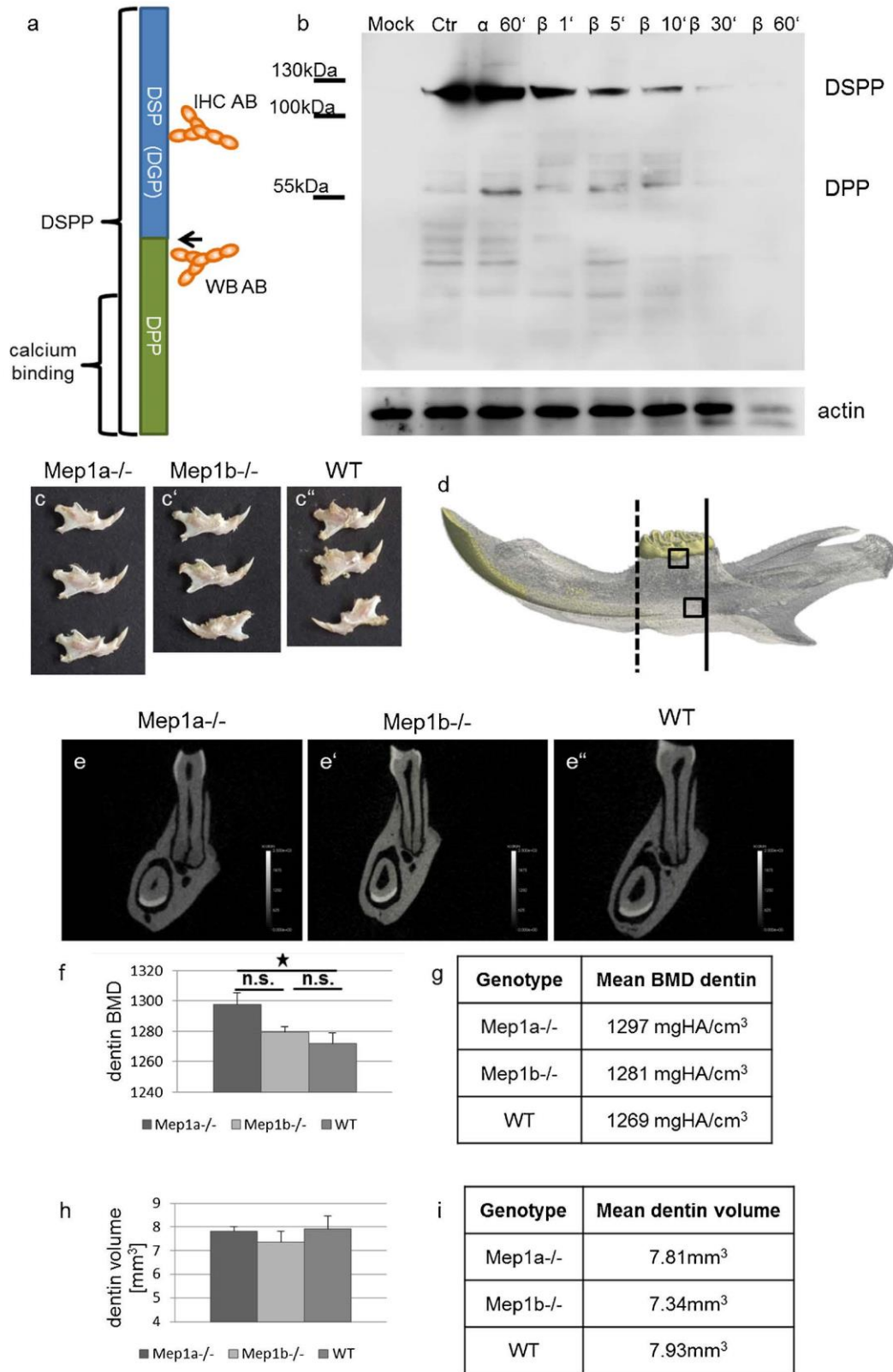
After jaw removal, the samples were stored in 70 % ethanol for short-term preservation and scanned in a VivaCT-80 micro-CT system (Scanco Medical, Brüttisellen, Switzerland) at 70 kVp, 114 mAs, 500 ms integration time, 1000 projections/180° using bone calibration scale and beam hardening corrected reconstruction and 15.4 μ m isotropic voxel size. Dentin volume and bone-equivalent dentin mineral density in mg hydroxylapatite per cm³ (mgHA/cm³) were evaluated using the manufacturer's software. Volumes cover the complete dentin of both incisors per specimen and the mineral density is the average over that volume.

Scanning electron microscopy (SEM)

The samples were stored in 4 % PFA until further use. They were then cooled to liquid nitrogen temperature and broken between two forceps at the dotted line indicated in Fig. 1d. The jaw was then dehydrated in increasing concentrations of ethanol, critical point dried and sputtered with a gold target. Samples were transferred to an XL20 scanning electron microscope (Philips, Eindhoven, Netherlands).

Histology

Azan and H&E staining was performed as described previously (e.g., Birkenfeld et al. 2010). Immunohistochemistry was performed as described before using meprin β (in house) or DSPP (GenTex) specific antibodies (Brandenburg et al. 2008). A BMP-1 antiserum was produced in rabbits by Covalab (Lyon, France) against the N-terminal peptide of mature



BMP-1 (AATSRPERVWPD), as previously described (Garrigue-Antar et al. 2001). It was purified using protein-A Sepharose (GE Healthcare) and antigen affinity chromatography (SulfoLink Immobilization Kit for Peptides, Thermo Scientific). Prior to staining, sections were dewaxed and rehydrated before peroxidase activity was blocked using 3 %H₂O₂. Then, primary antibody (anti-DSPP 1:500, anti-meprin β 1:800, and anti BMP-1 1:1000) was added overnight and subsequently sections were incubated with secondary antibody coupled to horseradish peroxidase. Sections were then incubated with 3,3'-Diaminobenzidine, washed in Aqua_{dest} and counterstained with hemalum.

Results

Calcification and production of collagen fibers are crucial steps from pre-dentin to mature dentin formation. As meprins have been shown to be efficient proteases to achieve both collagen I maturation and DSPP cleavage (Broder et al. 2013; Tsuchiya et al. 2011) (Fig. 1a), we added recombinant meprin α or meprin β to the cell lysate of DSPP overexpressing HEK cells. For meprin α , only a slight increase in the DPP signal could be detected after 60 min of incubation (Fig. 1b). For meprin β , a stronger degradation of the full-length DSPP was observed. Here, the time course experiment revealed a progressive loss of the full-length DSPP as well as the DPP signal in western blot analysis in the presence of meprin β (Fig. 1b). These results confirm the capability of meprins to cleave DSPP into DSP and DPP and for meprin β to completely degrade DPP. Next, we investigated the in vivo relevance of these proteases for DSPP cleavage. Mouse jaws were removed and examined macroscopically. No obvious differences in size, shape or color were observed between the animals (Fig. 1b). As the murine incisor is constantly rebuilt, it can be used to visualize developmental stages even in the adult mouse (Leblond, 1979). To gain a general overview, micro-CT analysis was carried out to determine the BMD and the volume of the dentin in each mouse line. A slice projection of the respective genotypes revealed no obvious differences between the genotypes with regard to the overall organization of the incisor, molar and surrounding alveolar bone (Fig. 1e–e"). However, for *Mep1a*^{-/-} mice, a significantly higher BMD (1297 mgHA/cm³) was found compared to WT (1269 mgHA/cm³) animals (Fig. 1f, g). This was not observed with *Mep1b*^{-/-} mice (1281 mgHA/cm³). For the dentin volume, no significant difference was seen between the different genotypes (Fig. 1h, i). However, a trend was seen towards a lower dentin volume in WT animals. To further investigate the pre-dentin, dentin distribution and structure of two different areas of the murine dental system were examined microscopically. The incisor represents an early developmental stage of the tooth and the second molar an adult stage (for regions, see

Fig. 2 a–c H&E staining of an incisor section of *Mep1a*^{-/-}, *Mep1b*^{-/-} and WT mice. Enamel (asterisk), dentin (arrow) and pre-dentin (round arrow) are marked. d–f As in (a–c) with azan staining. Dentin is marked with an arrow. g–i H&E-stained section taken from *Mep1a*^{-/-}, *Mep1b*^{-/-} and WT animal molars. The thin layer of pre-dentin is marked with an arrow. There was no difference detectable between both samples regarding the dentin calcification. j–l As in (g–i) but stained with azan. In the dentin layer, the single dentin channels could be observed. In all three genotypes, they run parallel in the direction indicated by the arrows. Bars 50 μ m

Fig. 1d). In H&E stained sections of the incisors, the three layers of enamel (asterisk), dentin (arrow) and pre-dentin (round arrow) were detected (Fig. 2a–c). There was no difference seen between the three genotypes in the developmental stage of the incisor (Fig. 2a–c). The same holds true for sections stained in azan (Fig. 2d–f). The heavily collagen loaded pre- and mature dentin is stained in blue (Fig. 2d, arrow). For molars, a similar picture was observed. The pre-dentin layer is smaller as most of the pre-dentin has already been mineralized (arrow Fig. 2g–i). In azan staining, there are no defects visible in the continuously blue-stained pre-dentin and dentin area (Fig. 2j–l, arrows). To examine the dentin at the ultrastructural level, mouse jaws were cooled to liquid nitrogen temperature and broken at the first molar (Fig. 1d, dotted line). All components of the incisor were identified at medium magnification (Fig. 3a). At higher magnification ($\times 6400$) the dentin channels could be identified (Fig. 3b–b", arrows). The mineralized collagen matrix comprises the rest of the dentin structure. There were no defects detectable at this resolution for any of the mouse strains (Fig. 3b–b"). To localize the expression site of DSPP, meprin β and BMP-1, immunohistochemistry was performed using *Mep1a*^{-/-}, *Mep1b*^{-/-} and WT animals. As the antibody used binds to the DSP part of DSPP and as DSPP is rapidly processed into DSP and DPP, DSP was most likely detected here. The protein localized within the pre-dentin (Fig. 3c–c") as has been described before. There was no difference in intensity detected for DSPP/DSP between WT and meprin deficient animals (Fig. 3c–c", arrow). Nevertheless, there was a less stained area in the outer layer of the pre-dentin in WT and *Mep1a*^{-/-} compared to *Mep1b*^{-/-} animals (Fig. 3c–c", round arrow). A weak signal for meprin β was detected in WT and in *Mep1a*^{-/-} but not in the *Mep1b*^{-/-} animals (Fig. 3d–d", arrow). BMP-1 was localized at the apical tip of the odontoblast layer (Fig. 3e–e", arrow) with a slightly stronger signal detected in *Mep1b*^{-/-} animals. Comparison of the immunohistochemically stained molars of WT, *Mep1a*^{-/-} and *Mep1b*^{-/-} animals revealed differences between the mouse strains (Fig. 3f–h). For DSPP/DSP, equally strong signals were detected for all three genotypes (Fig. 3f–f", arrow). For meprin β , a weak signal was detected that was absent in the *Mep1b*^{-/-} mice (Fig. 3g–g", arrow). BMP-1 was detected in the pre-dentin layer of all three animals with a slightly stronger signal in *Mep1a*^{-/-} and *Mep1b*^{-/-} animals (Fig. 3g–g", h–h").

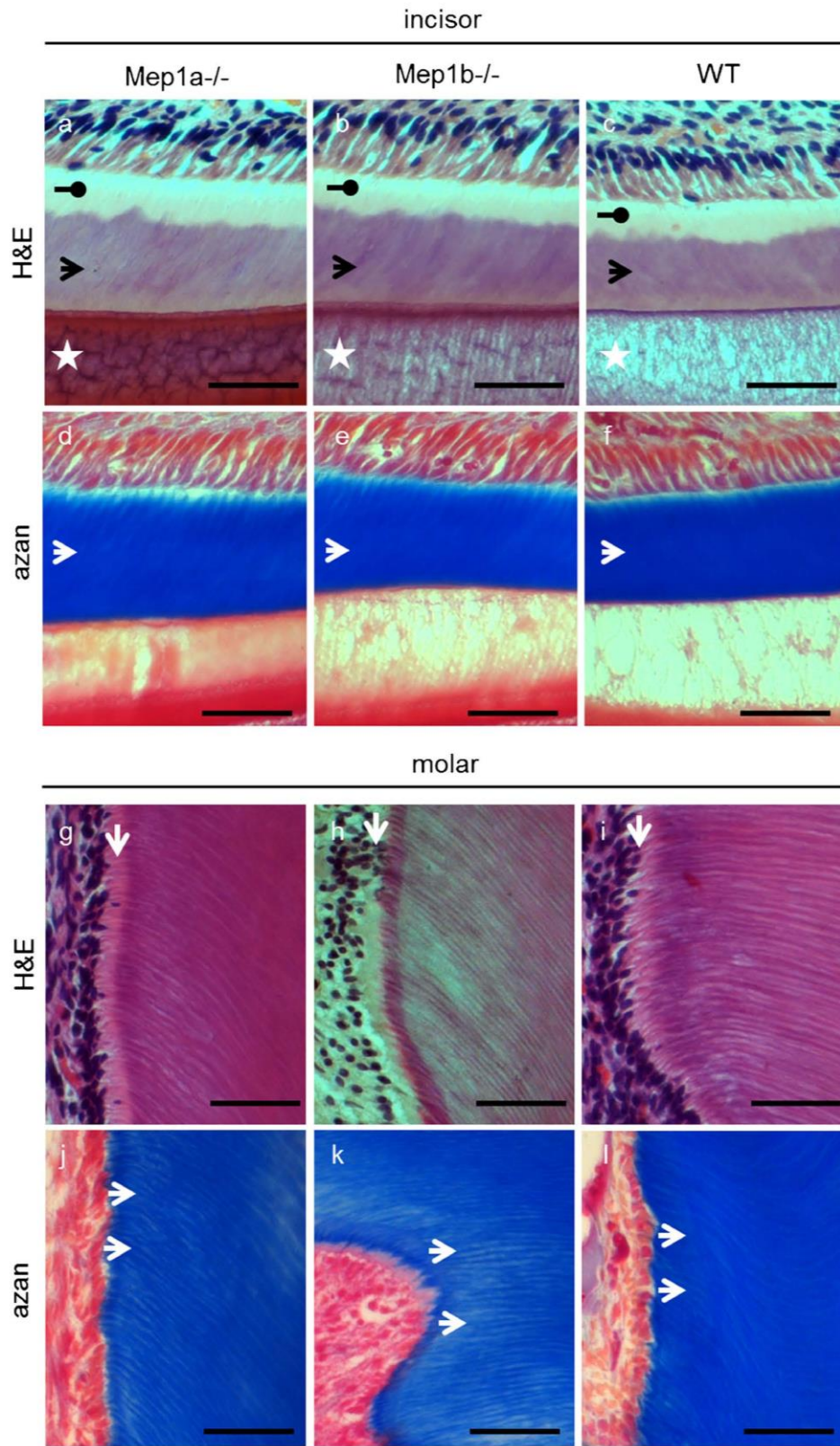
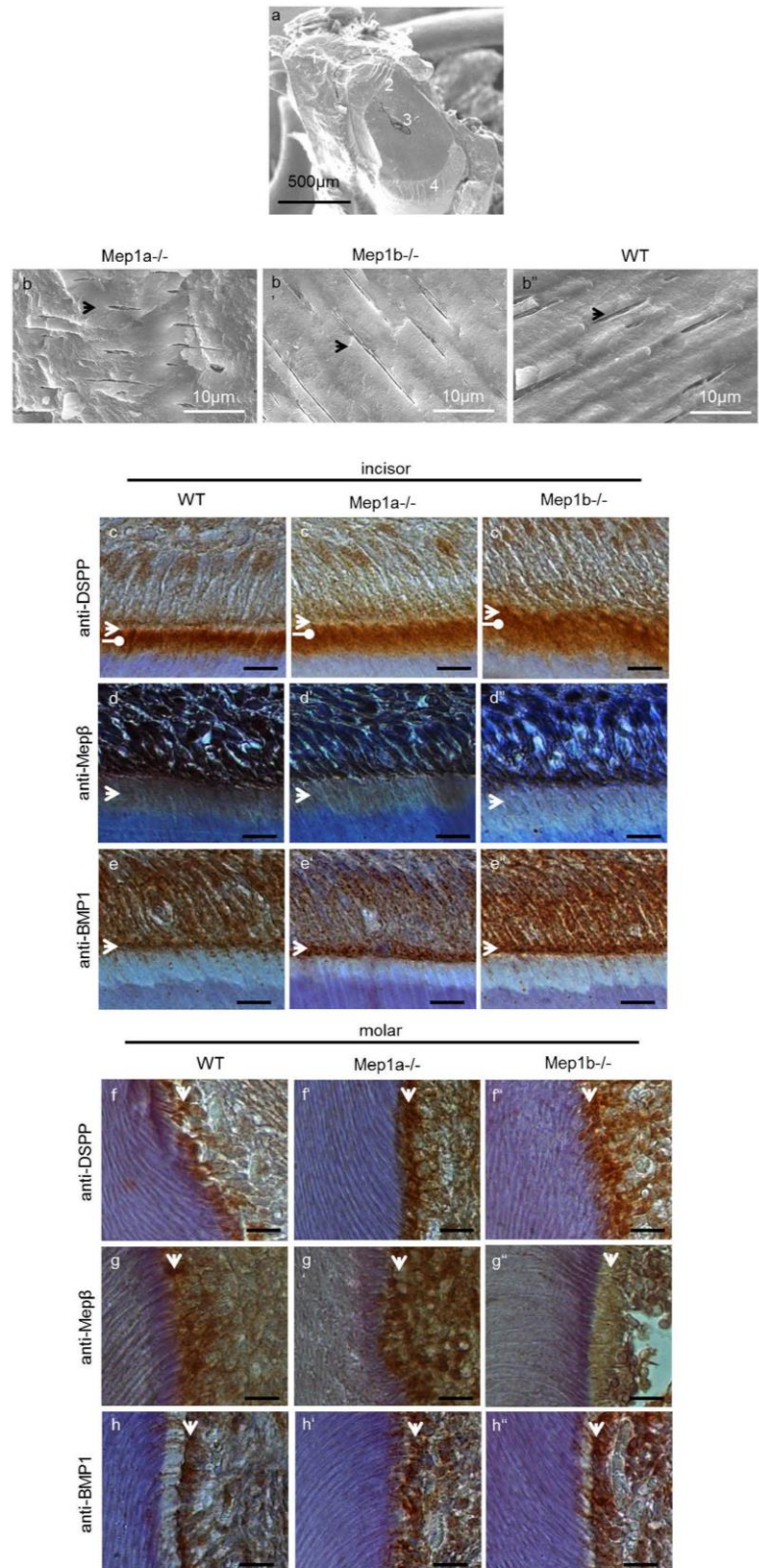


Fig. 3 **a** Scanning electron microscopic image of a mouse incisor. The alveolar bone (1), the dentin (2) the pulpa (3) and the enamel (4) can be clearly separated at this magnification ($\times 100$). **b–b''** Representative image at higher ($\times 6400$) magnification of the dentin from the individual genotypes. The dentin channels are clearly visible in all three genotypes and there are no obvious defects seen. **c–c''** Anti-DSPP staining in WT, *Mep1a*^{-/-} and *Mep1b*^{-/-} incisor sections. A clear signal for DSPP was detected in the pre-dentin region (*arrow*) in WT and *Mep1a*^{-/-} animals, whereas the DSPP signal was vanished in the outer layer of the pre-dentin (*round arrow*), which is not seen in *Mep1b*^{-/-} animals. **d–d''** Meprin β (anti-Mep β) staining in incisor sections. In WT and *Mep1a*^{-/-} animals, a signal could be detected for meprin β in pre-dentin (*arrow*). In *Mep1b*^{-/-} animals, there is only background staining detectable. **e–e''** Anti BMP-1 staining in WT and *Mep1a*^{-/-} animals displays a weaker signal than the one detected in *Mep1b*^{-/-} animals. **f–f''** Anti-DSPP staining revealed an equally stained area in the pre-dentin. There was no difference between WT, *Mep1a*^{-/-} and *Mep1b*^{-/-} animals. **g** Anti-Mep β staining in the molars revealed a signal for WT and *Mep1a*^{-/-}, but not for *Mep1b*^{-/-} animals in the pre-dentin (*arrow*). **h–h''** Only a weak signal can be detected for BMP-1 that appears slightly more pronounced in *Mep1b*^{-/-} animals compared to WT and *Mep1a*^{-/-}. All images are representative for $n = 3$ animals. Bars (**c–h**) 40 μm



Discussion and conclusion

Meprin α and meprin β are potent procollagen proteinases that convert procollagens I and III to mature collagen thereby inducing collagen fibril formation (Broder et al. 2013). Additionally, meprins and BMP-1 were shown to cleave isolated porcine DSPP and generate a DPP fragment (Tsuchiya et al. 2011). This DPP fragment was not further cleaved by meprin α and BMP-1, whereas meprin β seemed to completely degrade DPP under calcium-free conditions (Tsuchiya et al. 2011). This fits with a recent finding indicating that meprin β activity can be modulated by calcium ions (Arnold et al. 2015). Here, we could demonstrate that meprins cleave human DSPP and meprin β degrades DPP further, which fits nicely to the cleavage specificity for negatively charged substrates as previously demonstrated (Becker-Pauly et al. 2011). Our experiment with human DSPP additionally confirms the findings gained for the porcine DSPP/DPP (Tsuchiya et al. 2011). We therefore assume that free calcium might protect DPP from degradation by meprin β in dentin. As meprin β is primarily membrane-bound, the cleavage of DSPP has to occur close to the membrane (Broder and Becker-Pauly 2013). BMP-1 was shown to cleave porcine DSPP and to remove the C-terminal domain of collagen I, a proteolytic process that can be stimulated by the procollagen C-proteinase enhancer-1 (Tsuchiya et al. 2011; Vadon-Le Goff et al. 2015). Both meprins and BMP-1 have already been discussed as potential players in dentin maturation (Tsuchiya et al. 2011), which required further investigation of the issue. We therefore analyzed the dentin status of *Mep1a*^{-/-} and *Mep1b*^{-/-} animals in comparison to WT control mice. Using micro-CT analysis, we found a significantly higher BMD for *Mep1a*^{-/-} mice compared to WT animals. For the dentin volume, a clear trend was found towards a lower volume in WT animals. Incisors and molars from both genotypes were compared on the macroscopic, microscopic and ultrastructural levels. There were no defects in the formation of dentin or pre-dentin regarding the dentin channel formation or calcification despite the loss of meprin α or meprin β . Immunohistochemistry revealed a slight yet clear signal for meprin β in WT and *Mep1a*^{-/-} mice that was missing in *Mep1b*^{-/-} animals. Although there seems to be an effect in dentin BMD and volume, the loss of meprin α or meprin β seems not to manifest in a clear dentin phenotype. Thus, despite the capability of meprin α and meprin β to mature pro-collagen I + III and to cleave DSPP/DPP, we show that meprin deficient mice are not appropriate models to investigate dentin-related malformations, such as, for example, found in *dentinogenesis imperfecta*. However, minor defects, not detectable by the methods used, cannot be excluded. If meprins do contribute to DSPP cleavage under physiological conditions, it might also be compensated by other proteases in the KO mice. Here, BMP-1 seems to be the most likely candidate, as conditional BMP-1-deficient mice show a bone

phenotype similar to the effects seen in *osteogenesis imperfecta* (Muir et al. 2014). Therefore, a conditional BMP-1 knock-out in odontoblasts may represent a suitable animal model for dentin-related diseases and should be evaluated further.

Acknowledgments We acknowledge Bettina Facompré, Frank Lichte, Marion Kölln and Katrin Neblung-Mashur for superb technical support. This work was supported by the SFB877 “Proteolysis as a Regulatory Event in Pathophysiology” (project A9), grant BE 4086/2-1 (to C.B.-P.) and a young research investigator grant of the medical faculty of CAU Kiel (to P.A.).

References

- Arnold P, Schmidt F, Prox J, Zunke F, Pietrzik C, Lucius R, Becker-Pauly C (2015) Calcium negatively regulates meprin beta activity and attenuates substrate cleavage. *FASEB J* 29:3549–3557
- Becker C, Kruse MN, Slotty KA, Kohler D, Harris JR, Rosmann S, Sterchi EE, Stocker W (2003) Differences in the activation mechanism between the alpha and beta subunits of human meprin. *Biol Chem* 384:825–831
- Becker-Pauly C, Howel M, Walker T, Vlad A, Aufvenne K, Oji V, Lottaz D, Sterchi EE, Debela M, Magdolen V et al (2007) The alpha and beta subunits of the metalloprotease meprin are expressed in separate layers of human epidermis, revealing different functions in keratinocyte proliferation and differentiation. *J Invest Dermatol* 127:1115–1125
- Becker-Pauly C, Barre O, Schilling O, Auf dem Keller U, Ohler A, Broder C, Schutte A, Kappelhoff R, Stocker W, Overall CM (2011) Proteomic analyses reveal an acidic prime side specificity for the astacin metalloprotease family reflected by physiological substrates. *Mol Cell Proteomics* 10(M11):009233
- Birkenfeld F, Becker ME, Kurz B, Harder S, Kern M, Lucius R (2010) Changes in human mandibular bone morphology after heat application. *Ann Anat* 192:227–231
- Brandenburg LO, Varoga D, Nicolaeva N, Leib SL, Wilms H, Podschun R, Wruck CJ, Schroder JM, Pufe T, Lucius R (2008) Role of glial cells in the functional expression of LL-37/rat cathelin-related antimicrobial peptide in meningitis. *J Neuropathol Exp Neurol* 67: 1041–1054
- Broder C, Becker-Pauly C (2013) The metalloproteases meprin alpha and meprin beta: unique enzymes in inflammation, neurodegeneration, cancer and fibrosis. *Biochem J* 450:253–264
- Broder C, Arnold P, Vadon-Le Goff S, Konerding MA, Bahr K, Muller S, Overall CM, Bond JS, Koudelka T, Tholey A et al (2013) Metalloproteases meprin alpha and meprin beta are C- and N-procollagen proteinases important for collagen assembly and tensile strength. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110:14219–14224
- Garrigue-Antar L, Barker C, Kadler KE (2001) Identification of amino acid residues in bone morphogenetic protein-1 important for procollagen C-proteinase activity. *J Biol Chem* 276:26237–26242
- Kruse MN, Becker C, Lottaz D, Kohler D, Yiallouris I, Krell HW, Sterchi EE, Stocker W (2004) Human meprin alpha and beta homo-oligomers: cleavage of basement membrane proteins and sensitivity to metalloprotease inhibitors. *Biochem J* 378:383–389
- Leblond CP, Warshawsky H (1979) Dynamics of enamel formation in the rat incisor tooth. *J Dent Res* 58:950–975
- Muir AM, Ren Y, Butz DH, Davis NA, Blank RD, Birk DE, Lee SJ, Rowe D, Feng JQ, Greenspan DS (2014) Induced ablation of *Bmp1* and *Tll1* produces osteogenesis imperfecta in mice. *Hum Mol Genet* 23:3085–3101

- Prox J, Arnold P, Becker-Pauly C (2015) Meprin alpha and Meprin beta: procollagen proteinases in health and disease. *Matrix Biol* 44–46:7–13
- Suzuki N, Labosky PA, Furuta Y, Hargett L, Dunn R, Fogo AB, Takahara K, Peters DM, Greenspan DS, Hogan BL (1996) Failure of ventral body wall closure in mouse embryos lacking a procollagen C-proteinase encoded by *Bmp1*, a mammalian gene related to *Drosophila* *tolloid*. *Development* 122:3587–3595
- Suzuki S, Sreenath T, Hariyama N, Honeycutt C, Terse A, Cho A, Kohler T, Muller R, Goldberg M, Kulkarni AB (2009) Dentin sialoprotein and dentin phosphoprotein have distinct roles in dentin mineralization. *Matrix Biol* 28:221–229
- Suzuki S, Hariyama N, Nishimura F, Kulkarni AB (2012) Dentin sialophosphoprotein and dentin matrix protein-1: Two highly phosphorylated proteins in mineralized tissues. *Arch Oral Biol* 57:1165–1175
- Tsuchiya S, Simmer JP, Hu JC, Richardson AS, Yamakoshi F, Yamakoshi Y (2011) Astacin proteases cleave dentin sialophosphoprotein (Dspp) to generate dentin phosphoprotein (Dpp). *J Bone Miner Res* 26:220–228
- Vadon-Le Goff S, Hulmes DJ, Moali C (2015) BMP-1/tolloid-like proteinases synchronize matrix assembly with growth factor activation to promote morphogenesis and tissue remodeling. *Matrix Biol* 44–46:14–23