

Aus der Poliklinik für Zahnärztliche Prothetik

(Prof. Dr. R. Bürgers)

im Zentrum Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde  
der medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

---

Vergleichende histologische Untersuchungen oraler Gewebe der  
Wildtyp- und der DDR1-Knockout-Maus hinsichtlich ihrer Struktur und  
der Expression von Fibulin-3, -4 und -5

INAUGURAL - DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades  
für Zahnheilkunde

der Medizinischen Fakultät der  
Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von  
Andrea Schubert  
aus  
Lohr am Main  
Göttingen 2014

Dekan:

Prof. Dr. rer. nat. H. K. Kroemer

I. Berichterstatter:

Prof. Dr. med. N. Miosge

II. Berichterstatter/in:

III. Berichterstatter/in:

Tag der mündlichen Prüfung:

# Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	V
<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 Der Zahnhalteapparat	1
1.1.1 Die Gingiva	1
1.1.2 Das Zement	3
1.1.3 Der Alveolarknochen	5
1.1.4 Das parodontale Ligament	6
1.2 Die Fibuline	14
1.2.1 Struktur	14
1.2.2 Lokalisation und Funktion von Fibulin-1 und -2	15
1.2.3 Lokalisation und Funktion von Fibulin-3, -4, -5 und -7	17
1.3 Die Discoidin-Domäne-Rezeptoren	20
1.3.1 Struktur	20
1.3.2 Lokalisation	21
1.3.3 Rezeptoraktivierung durch Kollagene	22
1.3.4 Funktion	23
1.4 Aufgabenstellung	25
<b>2 Material und Methoden</b>	<b>26</b>
2.1 Versuchstiere	26
2.2 Gewebepräparation	26
2.3 Fixierung	27
2.3.1 Fixierung für Paraffineinbettung	27
2.3.2 Fixierung für Epon einbettung	27
2.4 Entkalkung	28
2.5 Einbettung	29
2.5.1 Einbettung in Paraffin	29
2.5.2 Einbettung in Epon	30
2.6 Gewebeschnitte	31
2.6.1 Schneiden der Paraffinblöcke	31
2.6.2 Schneiden der Eponblöcke	32
2.7 Hämalaun-Eosin-Färbung	33
2.8 Elastica-van-Gieson-Färbung	34
2.9 Richardson-Färbung	36
2.10 Elektronenmikroskopische Untersuchungen	37

2.11	Immunhistochemische Nachweisreaktionen	39
2.11.1	Herkunft und Beschaffenheit der verwendeten Antikörper	39
2.11.2	Protokoll zum immunhistochemischen Nachweis für Fibulin-3, -4 und -5	40
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>44</b>
3.1	Licht- und elektronenmikroskopische Strukturuntersuchungen	44
3.2	Immunhistochemischer Nachweis für Fibulin-3, -4 und -5	49
3.2.1	Fibulin-3 in Wildtyp-Mäusen	51
3.2.2	Fibulin-4 in Wildtyp-Mäusen	53
3.2.3	Fibulin-5 in Wildtyp-Mäusen	55
3.2.4	Fibulin-3 in DDR1-Knockout-Mäusen	57
3.2.5	Fibulin-4 in DDR1-Knockout-Mäusen	59
3.2.6	Fibulin-5 in DDR1-Knockout-Mäusen	61
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>63</b>
4.1	Licht- und elektronenmikroskopische Strukturuntersuchungen	64
4.2	Immunhistochemischer Nachweis für Fibulin-3, -4 und -5	67
4.2.1	Fibulin-3, -4 und -5 in oralen Geweben der Wildtyp-Maus	68
4.2.2	Fibulin-3, -4 und -5 in oralen Geweben der DDR1-Knockout-Maus	74
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>76</b>
<b>6</b>	<b>Anhang</b>	<b>77</b>
6.1	Abbildungsverzeichnis	77
6.2	Tabellenverzeichnis	78
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>79</b>

## Abkürzungsverzeichnis

Aqua dest.	destilliertes Wasser
BSA	bovines Serumalbumin
cbEGF	<i>calcium-binding epidermal growth factor</i>
CD44	<i>cluster of differentiation 44</i>
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DDR	Discoidin-Domäne-Rezeptor
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EZM	extrazelluläre Matrix
fließ.	fließend
GVMGFO-Domäne	Aminosäuresequenz aus Glycin, Valin, Methionin, Glycin, Phenylalanin und Hydroxyprolin
IFN- $\gamma$	Interferon gamma
IL-1 $\beta$	Interleukin 1beta
kDa	Kilodalton
MMP13	Matrix-Metallo-Proteinase 13
p53	Tumorprotein 53
PDL	parodontales Ligament
PGE <sub>2</sub>	Prostaglandin E <sub>2</sub>
pH	<i>potentia hydrogenii</i>
RT	Raumtemperatur
RTK	Rezeptor-Tyrosinkinase
SLRP	<i>small leucine-rich proteoglycan</i>
TBS	<i>Tris buffered saline</i>
TBS-T	<i>Tris buffered saline Tween</i>

## Abkürzungsverzeichnis

---

TGF- $\beta$	<i>transforming growth factor beta</i>
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor alpha
Wnt	<i>Wingless integration 1</i>

# 1 Einleitung

Der Zahnhalteapparat stellt ein zentrales Untersuchungsgut in der vorliegenden Arbeit dar; seine Komponenten werden darum im Folgenden beschrieben. Weiterhin wird die Proteinfamilie der Fibuline erläutert, welcher in der extrazellulären Matrix (EZM) vieler Gewebe eine bedeutende Rolle zukommt. Fibulin-3, -4 und -5 werden im Rahmen dieser Arbeit sowohl in Wildtyp- als auch in DDR1-Knockout-Mäusen immunhistochemisch untersucht. DDR1 ist ein weit verbreiteter Zelloberflächenrezeptor aus der Gruppe der Discoidin-Domäne-Rezeptoren (DDR), die im letzten Abschnitt der Einleitung vorgestellt wird.

## 1.1 Der Zahnhalteapparat

Der Zahnhalteapparat (= das Parodontium) beinhaltet vier grundsätzliche Bestandteile: die Gingiva, das Zement, den Alveolarknochen und das parodontale Ligament (PDL). Jede dieser Komponenten unterscheidet sich bezüglich Lokalisation, Gewebearchitektur, biochemischer und zellulärer Zusammensetzung, und doch funktionieren sie gemeinsam als Einheit (Bartold et al. 2000).

Zu den Hauptaufgaben des Zahnhalteapparats gehören die Verankerung des Zahns im Knochen, die Dämpfung der Kaukräfte, die Abwehr äußerer Noxen und die Trennung zwischen Mundhöhlenmilieu und Zahnwurzel (Hellwig et al. 2009).

### 1.1.1 Die Gingiva

Die gesunde Gingiva bedeckt den Alveolarfortsatz und die Zahnwurzel bis zu einem Niveau, das leicht koronal der Schmelz-Zement-Grenze liegt. Eine anatomische Einteilung kann in drei verschiedene Bereiche erfolgen: die befestigte, die freie marginale und die interdentale Gingiva (Listgarten 1972).

Die befestigte Gingiva erstreckt sich koronal von der mukogingivalen Grenzlinie bis zur gingivalen Furche und ist mit dem darunterliegenden Periost durch Kollagenfasern fest verbunden (Hassell 1993). Die gingivale Furche ist eine flache V-förmige Einbuchtung auf der fazialen Gingivaoberfläche, die in 0,5 bis 1,5 mm Abstand parallel zum Gingivasaum verläuft (Orban 1948). Individuell sehr variabel ist die Höhe

der befestigten Gingiva in koronal-apikaler Richtung; makroskopisch ist häufig eine oberflächliche Stippelung sichtbar (Bergström 1984).

Die freie marginale Gingiva besitzt eine koronal-apikale Ausdehnung von zirka 1,5 mm (Ainamo und Loe 1966) und liegt jedem Zahn an, ohne aber mit ihm befestigt zu sein. Folglich bildet ihre Innenfläche eine Seitenwand des gingivalen Sulkus. Anhand der gingivalen Furche ist die freie marginale Gingiva oft klinisch zu erkennen (Hassell 1993).

Interdental passt sich die Gingiva der Form, der Größe sowie der Position der angrenzenden Zähne an (Schroeder und Listgarten 1997). Im gesunden Zustand füllt die Gingiva - als sogenannte interdentale Gingiva oder Papille - den Zahnzwischenraum vollständig aus. Die koronale Ausdehnung der Papille erstreckt sich bis zu einem Punkt, der unmittelbar apikal von der Kontaktfläche zweier benachbarter Zähne liegt. Im posterioren Bereich des Mundes, wo die Kontaktfläche zwischen den Zähnen im Normalfall breit ist, besteht die interdentale Gingiva aus zwei Papillen, einer vestibulären und einer oralen, die durch den Col (Sattel) - einen Bereich nicht keratinisierten Epithels - verbunden sind (Hassell 1993).

Histologisch besteht die Gingiva aus zwei unterschiedlichen Komponenten: den oberflächlichen epithelialen Strukturen und dem darunter liegenden Bindegewebe. Die Gingivaepithelien können aufgrund ihrer Lokalisation und Zusammensetzung in drei verschiedene Arten unterteilt werden: das orale Epithel, das orale Sulkusepithel und das Saumepithel (Nanci und Bosshardt 2006).

Das orale Epithel erstreckt sich von der mukogingivalen Grenzlinie bis zum Rand des Gingivasaums und lässt sich in die freie marginale Gingiva und die befestigte Gingiva unterteilen. Das orale Sulkusepithel kleidet den gingivalen Sulkus aus und verläuft vom Rand des Gingivasaums bis koronal des Saumepithels. Dieses erstreckt sich vom Boden des Sulkus bis zu einem Punkt, der etwa 2 mm koronal des Alveolar-kamms liegt und ist fest mit der Zahnoberfläche verbunden, um Verschluss- und Anheftungsfunktionen zu erfüllen (Bartold et al. 2000).

Während das Saumepithel nicht keratinisiert ist, handelt es sich bei den beiden oralen Epithelien um leicht keratinisierte, mehrschichtige Plattenepithelien mit dem typi-



schen Aufbau der Haut: Stratum basale, Stratum spinosum, Stratum granulosum und Stratum corneum (Listgarten 1964). Neben epithelialen Zellen finden sich im oralen Epithel und im Sulkusepithel Langerhans'sche Zellen (DiFranco et al. 1985), Melanozyten (Barrett und Raja 1997) sowie Merkelzellen (Ramieri et al. 1992). Im Saumepithel kann ein schnell proliferierendes Stratum basale von einem mitotisch inaktiven Stratum suprabasale unterschieden werden (Bartold et al. 2000). Neben polymorphkernigen Leukozyten lassen sich hier - auch in klinisch gesunden Geweben - Lymphozyten nachweisen (Tonetti et al. 1995).

Das Bindegewebe (Lamina propria) der gesunden Gingiva besteht zu etwa 60 bis 65 % aus den Kollagenen I und III, die hochorganisierte, in Orientierung und Durchmesser verschiedenartige Faserbündel bilden. Es lassen sich dentogingivale, dento-periostale, alveologingivale, zirkuläre und semizirkuläre, transgingivale, interzirkuläre, interpapilläre, periosteogingivale, intergingivale und transseptale Fasern unterscheiden (Schroeder und Listgarten 1997). Weiterhin sind die Kollagene IV, V und VI vertreten (Romanos et al. 1991).

Neben Fibroblasten enthält das gingivale Bindegewebe neutrophile Granulozyten, Monozyten, Mastzellen, Lymphozyten und Makrophagen. Das restliche Volumen wird von Blut- und Lymphgefäßen, Nerven und Proteoglykanen eingenommen (Schroeder et al. 1973). Letztere sind vertreten durch Dekorin und Biglykan (Häkkinen et al. 1993). Auch Glykosaminoglykane wie Dermatansulfat sind im gingivalen Bindegewebe lokalisierbar (Bartold et al. 1981).

Die gingivalen Gewebe mit ihrer besonderen Beziehung zur Zahnoberfläche stellen die bedeutendste periphere Abwehr gegen mikrobielle Infektionen dar, die zu parodontalen Erkrankungen führen können (Schroeder und Listgarten 1997).

### **1.1.2 Das Zement**

Das Zement umgibt das Dentin im Zahnwurzelbereich und ist somit anatomisch betrachtet ein Bestandteil des Zahns. Aufgrund seiner Position zwischen Wurzel-dentin und PDL gehört das Zement funktionell jedoch zum Zahnhalteapparat. Eine der Hauptfunktionen des Zements ist es, die Kollagenfasern des PDL mit der Wurzeloberfläche zu verbinden. Neben seiner unverzichtbaren Rolle bei der Zahnveranke-

zung besitzt das Zement wichtige adaptive und reparative Funktionen (Bosshardt und Selvig 1997).

Bestehend aus einer 20-200 µm dicken Schicht mineralisierter organischer Matrix, ist das Zement ein avaskuläres, alymphatisches, nicht innerviertes Gewebe, das ungleichmäßig von Zementozyten enthaltenden Lakunen durchsetzt ist (Mariotti 1993). Etwa 90 % der organischen Matrix bestehen aus Kollagen I und III (Becker et al. 1991). Die vorherrschenden nicht-kollagenen Proteine der Zementmatrix sind Knochen-Sialoprotein, Osteopontin (Bosshardt et al. 1998), Osteokalzin (Kagayama et al. 1997) und Osteonektin (Reichert et al. 1992). Außerdem enthält die EZM des Zements Fibronektin (Komboli et al. 2009), das auch in perizellulären Bereichen in Zementlakunen nachweisbar ist (Steffensen et al. 1992). Es wird über das Vorhandensein eines sogenannten *collagenous attachment protein* in der Zementmatrix berichtet, das die Adhäsion und Verbreitung parodontaler Zellen fördert, jedoch keine Verwandtschaft zu bekannten Kollagenen oder Verbindungsproteinen zeigt (Wu et al. 1996).

Es existieren drei grundlegend verschiedene Zementformen. Die Lokalisation dieser Formen zeigt zahnspezifische Verteilungsmuster, kann aber auch an der Oberfläche eines einzelnen Zahns variieren:

Azelluläres afibrilläres Zement enthält weder Kollagenfibrillen noch Zellen und bedeckt kleine Schmelzbereiche, insbesondere an der Schmelz-Zement-Grenze und um sie herum.

Azelluläres Fremdfaserzement besteht aus dicht gepackten, kurzen kollagenen Fasern, die etwa senkrecht zur Zahnoberfläche orientiert sind; es findet sich hauptsächlich an zervikalen und mittleren Wurzelbereichen (Bosshardt und Selvig 1997).

Charakteristisch für das zelluläre Eigenfaserzement sind Zementozyten, die in Lakunen sitzen und eine kollagenreiche Matrix produzieren, von der sie umgeben sind. Diese Zementform kann an Furkationen und in apikalen Wurzelbereichen beobachtet werden (Nanci und Bosshardt 2006). Im zellulären Zement sind im Gegensatz zum azellulären Zement Dekorin, Versikan, Biglykan und Lumican in den Lakunen um die

Zementozyten und an den Insertionsstellen der Sharpey'schen Fasern nachweisbar (Ababneh et al. 1999).

Es gibt Bereiche, in denen sich zelluläres Eigenfasierzement und azelluläres Fremdfasierzement schichtweise überlagern, um dort das sogenannte zelluläre Gemischtfasierzement zu bilden (Bosshardt und Selvig 1997).

### 1.1.3 Der Alveolarknochen

Der Alveolarfortsatz besteht aus äußeren Kortikalisplatten (bukkal, lingual und palatal), die aus Kompakta aufgebaut sind, zentral liegender Spongiosa und dem Knochen, der die Alveolen auskleidet (Alveolarknochen). Die Kortikalisplatte und der Alveolarknochen treffen am Alveolarkamm aufeinander (Nanci und Bosshardt 2006). Die bukkalen und oralen Kortikalisplatten sind durch interradiikuläre und interdentale spongiöse Septen verbunden, wobei letztere von Kompakta bedeckt sind (Saffar et al. 1997).

Der Alveolarknochen ist ein spezialisierter Teil des Unter- und Oberkieferknochens, der die grundlegende Befestigungsstruktur für die Zähne darstellt. Prinzipiell ist er mit anderen Knochengeweben des Körpers vergleichbar, jedoch ist der Alveolarknochen stetigen und schnellen Umbauprozessen ausgesetzt, die mit dem Zahndurchbruch und der anschließenden funktionellen Beanspruchung durch den Kauvorgang in Zusammenhang stehen (Sodek und McKee 2000). Häufig wird der Alveolarknochen als Bündelknochen (*bundle bone*) bezeichnet (Schroeder 1992), der aus zwei Schichten verschiedenartiger Faserbündel besteht. Die äußere, dem PDL anliegende Schicht enthält die Sharpey'schen Fasern - dicke, kollagene Faserbündel, die von den Fibroblasten des PDL produziert werden - die senkrecht in den Alveolarknochen inserieren. Ein inneres, weniger engmaschiges Fasernetzwerk wird von Osteoblasten synthetisiert und verläuft zwischen den Sharpey'schen Fasern (Saffar et al. 1997).

Kollagen I (Rao et al. 1979) und V (Bronckers et al. 1986) sind die vorherrschenden organischen Bestandteile des Knochens, gemeinsam bilden sie heterotypische Faserbündel (Sodek und McKee 2000). Ebenfalls im Alveolarknochen nachweisbares Kollagen III (Wang et al. 1980) formt mit Kollagen I heterotypische Fasern, die als Sharpey'sche Fasern in den Alveolarknochen eintreten (Huang et al. 1991). Für mine-

ralisierte Gewebe wie den Alveolarknochen typische nicht-kollagene Proteine sind Knochen-Sialoprotein (Chen et al. 1993), Osteokalzin (Sodek und McKee 2000), Osteopontin (McKee et al. 1992), Osteonektin (Termine et al. 1981), Biglykan und Dekorin (Bianco et al. 1990). In perizellulären Bereichen in Knochenlakunen ist Fibronektin detektierbar (Steffensen et al. 1992). Neben Chondroitinsulfat finden sich auch Hyaluronsäure, Dermatansulfat und Heparansulfat in der EZM des Alveolarknochens (Bartold 1990). Osteoblasten sind für die Produktion nicht-mineralisierter Knochenmatrix (Osteoid) verantwortlich, nach dem Mineralisationsvorgang verbleiben sie als Osteozyten in Lakunen (Franz-Odendaal et al. 2006). Resorptive Prozesse werden von Osteoklasten bewerkstelligt (Nanci und Bosshardt 2006).

#### **1.1.4 Das parodontale Ligament**

Als PDL wird das Bindegewebe bezeichnet, das sich von der Zahnwurzel bis zur inneren Wand des Alveolarfachs erstreckt. Die Fasern des PDL bilden ein engmaschiges Geflecht und inserieren als Sharpey'sche Fasern in das Wurzelzement und den Alveolarknochen, um so mit beiden Geweben fest verankert zu sein. Es entsteht eine Verbindung zwischen Zahn und Knochen, die Befestigung, Schutz und sensorische Signale für das Kausystem bietet (Beertsen et al. 1997). Diese herausragende funktionelle Bedeutung zeichnet das PDL als besonders wichtige Komponente des Parodontiums aus. Deshalb stellt sie das zentrale Untersuchungsgut in der vorliegenden Arbeit dar und wird im Folgenden eingehend beschrieben.

#### **Zelluläre Bestandteile**

Malassez'sche Epithelreste (Xiong et al. 2013), Osteoblasten, Osteoklasten, Zementoblasten, Odontoklasten, Monozyten und Makrophagen sind anzutreffende Zellarten des PDL (Nanci und Bosshardt 2006). Auch Progenitorzellen sind detektierbar (Roguljic et al. 2013). Der vorherrschende Zelltyp ist der Fibroblast, der etwa 35 % des Volumens im PDL eines Nagermolars einnimmt (Beertsen 1975). Zu seinen Hauptaufgaben zählt die Produktion und Homöostase der EZM (Bartold und Narayanan 2006). Verglichen mit gingivalen Fibroblasten zeigen die Fibroblasten des PDL eine deutlich höhere Proliferationsrate (Ogata et al. 1995).

## Bestandteile der extrazellulären Matrix

Die EZM setzt sich aus einem dichten Netzwerk kollagener Fasern und Fasern des elastischen Systems zusammen, die von Glykosaminoglykanen, Proteoglykanen und anderen Glykoproteinen umgeben sind (Bartold und Narayanan 2006). Der EZM kommt eine Vielzahl bedeutender Aufgaben zu: Durch den Kontakt mit allen Zellen des Gewebes gewährleistet sie mechanische Stabilität (Hynes 2009), und ist darüber hinaus an vielen biochemischen Prozessen beteiligt, die nachstehend im Zusammenhang mit den beschriebenen Komponenten erläutert werden.

### Proteoglykane, Glykosaminoglykane und Glykoproteine

Proteoglykane sind eine Gruppe besonders stark glykosylierter Glykoproteine auf Zelloberflächen und in der EZM. Sie sind aus einem Kernprotein aufgebaut, an das mindestens eine Kette aus Glykosaminoglykanen angehängt ist. Glykosaminoglykane sind Mukopolysaccharide aus sich wiederholenden Disacchariden und lassen sich in vier Gruppen einteilen: Heparin/Heparansulfat, Chondroitinsulfat/Dermatansulfat und Keratansulfat sind sulfatiert, während Hyaluronsäure die einzige unsulfatierte Untergruppe darstellt und als freies, nicht an ein Protein gebundenes Glykosaminoglykan in der EZM vorkommt. Hyaluronsäure hat hervorragende Wasserbindungseigenschaften und nimmt so einen im Verhältnis zum Molekulargewicht sehr großen Raum in der EZM ein (Ruoslahti 1988).

Proteoglykane erfüllen eine Vielzahl von Aufgaben in der EZM: Sie binden andere Matrixmoleküle wie Kollagene und Fibronectin, regulieren den Durchmesser von Kollagenfibrillen (Vogel et al. 1984), assemblieren und stabilisieren die EZM-Komponenten (Oldberg und Ruoslahti 1982) und beeinflussen die Zelladhäsion (Cole et al. 1985), die Zelldifferenzierung (San Antonio et al. 1987) und die Zellproliferation (Castellot et al. 1982).

Das kleine leucinreiche Proteoglykan (*small leucine-rich proteoglycan* = SLRP) Dekorin ist in vielen Bindegeweben präsent (Bianco et al. 1990), bindet an Fibronectin (Schmidt et al. 1987), TGF- $\beta$  (Yamaguchi et al. 1990) sowie fibrilläre Kollagene und inhibiert die Fibrillogenese in vitro (Vogel et al. 1984). Dekorin befindet sich um die kollagenen Fasern im PDL, CD44 auf der Oberfläche von Fibroblasten (Häkkinen et

al. 1993). CD44 fungiert als Verbindungsprotein zwischen Zellen und Matrixproteinen wie beispielsweise Hyaluronsäure (Aruffo et al. 1990) oder Kollagenen (Wayner und Carter 1987).

Weitere Proteoglykane in der EZM des PDL sind die SLRPs Fibromodulin (Ababneh et al. 1998, Watanabe und Kubota 1998) und Biglykan, die an Kollagen I binden und die Fibrillogenese beeinflussen (Kalamajski und Oldberg 2007, Schönherr et al. 1995).

Die Heparansulfat-Proteoglykane Syndecan-1, -2, -4 und Glypikane sind sowohl auf der Oberfläche von Fibroblasten als auch in der EZM nachweisbar. Mit ihnen werden Aufgaben in der Zell-Zell-, Zell-Matrix- und Zell-Wachstumsfaktoren-Interaktion assoziiert (Worapamorn et al. 2000). Syndecan-1 bindet an Kollagen I, III und V (Koda et al. 1985), Fibronectin (Saunders und Bernfield 1988), Thrombospondin (Sun et al. 1989) und Tenascin (Salmivirta et al. 1991). Die Expression von Syndecan-1 wird durch Wachstumsfaktoren und Zytokine wie TGF- $\beta$ 1, IL-1 $\beta$  und IFN- $\gamma$  reguliert (Worapamorn et al. 2001a). Gemeinsam mit Syndecan-4 ist es relevant für Wundheilungsprozesse (Subramanian et al. 1997). Syndecan-2 ist an der kontrollierten Bildung von EZM-Komponenten beteiligt (Klass et al. 2000) und steht während der Entwicklung des Parodontiums bevorzugt mit der EZM von Hartgeweben in Verbindung (Worapamorn et al. 2001b). Glypikan fungiert als Regulator diverser Zellsignalwege, unter anderem beeinflusst es den Wnt-Signalweg (Avanesov et al. 2012).

Neben Proteoglykanen kommen im PDL weitere Glykoproteine vor. Tenascin ist vor allem in den Anheftungsbereichen entlang des Zements und des Alveolarknochens nachweisbar (Lukinmaa et al. 1991) und moduliert Zelladhäsions- und Zellwachstumsvorgänge (Chiquet-Ehrismann et al. 1986, Chiquet-Ehrismann und Tucker 2004). Neben Vitronectin (Steffensen et al. 1992) ist auch Fibronectin im PDL vertreten und zeigt ein homogenes Verteilungsmuster (Lukinmaa et al. 1991). Es ist mit Kollagenfibrillen assoziiert (Bartold und Narayanan 2006) und an der EZM-Organisation sowie an Zelladhäsionsvorgängen beteiligt (Yamada 1983).

## Kollagene Bestandteile

Kollagene Faserbündel machen den Großteil der EZM des PDL aus; sie durchspannen das PDL in verschiedenen Ebenen, um als Sharpey'sche Fasern in den Alveolar-knochen und das Zement einzutreten (Nanci und Bosshardt 2006).

Strukturelle Hauptkomponenten dieser Fasern sind Kollagen I und III (Butler et al. 1975), die sich im Prozess der Fibrogenese an Kernfasern aus Kollagen V anlagern. Kollagen V erzeugt darüber hinaus ein mikrofibrilläres Netzwerk zwischen diesen so entstandenen Hauptfasern (Becker et al. 1991), die außerdem mit Kollagen XII (Karimbux et al. 1992) und XIV (Zhang et al. 1993b) in Verbindung stehen. Im PDL ist auch Kollagen VI nachweisbar, das Mikrofibrillen ausbildet, die vor allem Nervenfasern und Blutgefäße umgeben (Becker et al. 1991). Außerdem ist Kollagen VI an der mikrofibrillären Struktur der Oxytalanfasern beteiligt (Everts et al. 1998).

Im entspannten Zustand verlaufen die Kollagenfasern nicht geradlinig von Zement zu Alveole, sondern wellenförmig. Da Kollagenfasern unelastisch sind, gewährleistet der wellige Verlauf Anpassungsfähigkeit an die Zahnbewegungen in der Alveole, wie sie etwa beim Kauen, Sprechen und Schlucken auftreten (Hassell 1993).

Neben kollagenen Fasern enthält die EZM des PDL auch Fasern des elastischen Systems.

## Das System elastischer Fasern

Strukturell sind alle Fasern des elastischen Systems aus Mikrofibrillen aufgebaut, Unterschiede bestehen in der Assoziation dieser Fibrillen mit Elastin. So lassen sich drei Faserarten voneinander abgrenzen: reife elastische Fasern, Elauninfasern und Oxytalanfasern (Cotta-Pereira et al. 1976, Fullmer und Lillie 1958, Montes 1996).

Elastische Fasern sind unlösliche Bestandteile der EZM in dynamischen Bindegeweben wie Arterien, Haut, Lungen und Bändern (Kielty 2006). Sie verleihen diesen Geweben besondere elastische Eigenschaften, um der lebenslangen Belastung durch Dehnung und Stauchung standzuhalten (Sherratt et al. 2003). Weitere Funktionen elastischer Fasern bestehen in der Regulation der TGF- $\beta$ -Aktivität (Charbonneau et al. 2004) sowie der Interaktion mit endothelialen Zellen (Davis 1993a) und glatten

Muskelzellen (Davis 1993b). In der Literatur sind bisher nur spärliche Angaben über das Vorhandensein reifer elastischer Fasern im PDL verschiedener Spezies zu finden - belegt ist das Vorkommen unter anderem im Alligator (Soule 1967).

Reife elastische Fasern besitzen einen Kern aus quervernetztem Elastin, das in Mikro-fibrillen eingebettet ist (Kielty 2006). Die Hauptkomponente der Mikro-fibrillen bilden die Fibrilline, eine Gruppe von 350-kDa-Glykoproteinen, die von Fibroblasten in die EZM sezerniert werden (Sakai et al. 1986). Von den drei bisher bekannten Fibrillinen sind Fibrillin-1 und -2 für die Elastogenese relevant (Ramirez und Pereira 1999). Sezernierte Fibrillin-1-Moleküle lagern sich in Zellnähe zu lateral und axial konfigurierten Kopf-zu-Schwanz-Verbindungen zusammen, indem der N-Terminus eines Moleküls mit dem C-Terminus eines anderen Moleküls direkte Bindungen eingeht (Marson et al. 2005). Fibrillin-1 kann auch mit Fibrillin-2 interagieren, was in Geweben, in denen beide Fibrilline exprimiert sind, zur Entstehung heterotypischer Mikro-fibrillen führt (Lin et al. 2002). An der Formation von Mikro-fibrillen sind außerdem Fibronectin, Integrine (Kinsey et al. 2008), Mikro-fibrillen-assoziiertes Glykoprotein-1 (Jensen et al. 2001) sowie Heparansulfat beteiligt (Cain et al. 2008). Die so entstehenden Bündel aus Mikro-fibrillen können Makrostrukturen mit einem Kern aus amorphem Elastin bilden oder - in nicht-elastischen Geweben - unabhängig von Elastin vorkommen (Sakai et al. 1986).

Elastin macht etwa 90 % der reifen elastischen Faser aus (Baldwin et al. 2013). Es wird in Form des 60- bis 70-kDa-Vorläuferproteins Tropoelastin von Fibroblasten und glatten Muskelzellen synthetisiert (Pasquali-Ronchetti und Baccarani-Contri 1997). Tropoelastin ist stark hydrophob. Diese Hydrophobie ist auf das reichliche Vorkommen apolarer Aminosäuren wie Alanin, Valin, Glycin und Prolin in der Primärstruktur des Proteins zurückzuführen und zeichnet für die besonderen elastischen Eigenschaften verantwortlich (Bashir et al. 1989). Zwischen den hydrophoben Aminosäuresequenzen kommen periodisch lysinreiche Abschnitte vor (Foster et al. 1973).

Der Prozess der Elastogenese läuft wie folgt ab: Frisch sezernierte Tropoelastin-Moleküle lagern sich in der EZM nach und nach an vorhandene Mikro-fibrillen an (Kielty 2006) und werden durch Transglutaminase mit Fibrillin-1 quervernetzt (Rock et al. 2004). Der reversible Vorgang der Koazervation beschreibt einen von der Tempe-



ratur, der Natriumchlorid-Konzentration und dem pH-Wert abhängigen Prozess, bei dem einzelne Tropoelastin-Moleküle miteinander aggregieren, um somit die Voraussetzung für die spätere Quervernetzung zu Elastin zu schaffen (Vrhovski et al. 1997). Die Aktivität des Enzyms Lysyl-Oxidase führt zur Querverbindung der Lysinreste des Tropoelastins. Dieser Vorgang resultiert in der Bildung amorphen Elastins im Kern der elastischen Faser (Wagenseil und Mecham 2007).

Weitere Moleküle, die mit dem Entstehungsprozess elastischer Fasern assoziiert werden, sind Fibulin-3, -4 und -5 (Kobayashi et al. 2007).

In Abbildung 1 ist der Ablauf der Elastogenese schematisch dargestellt.

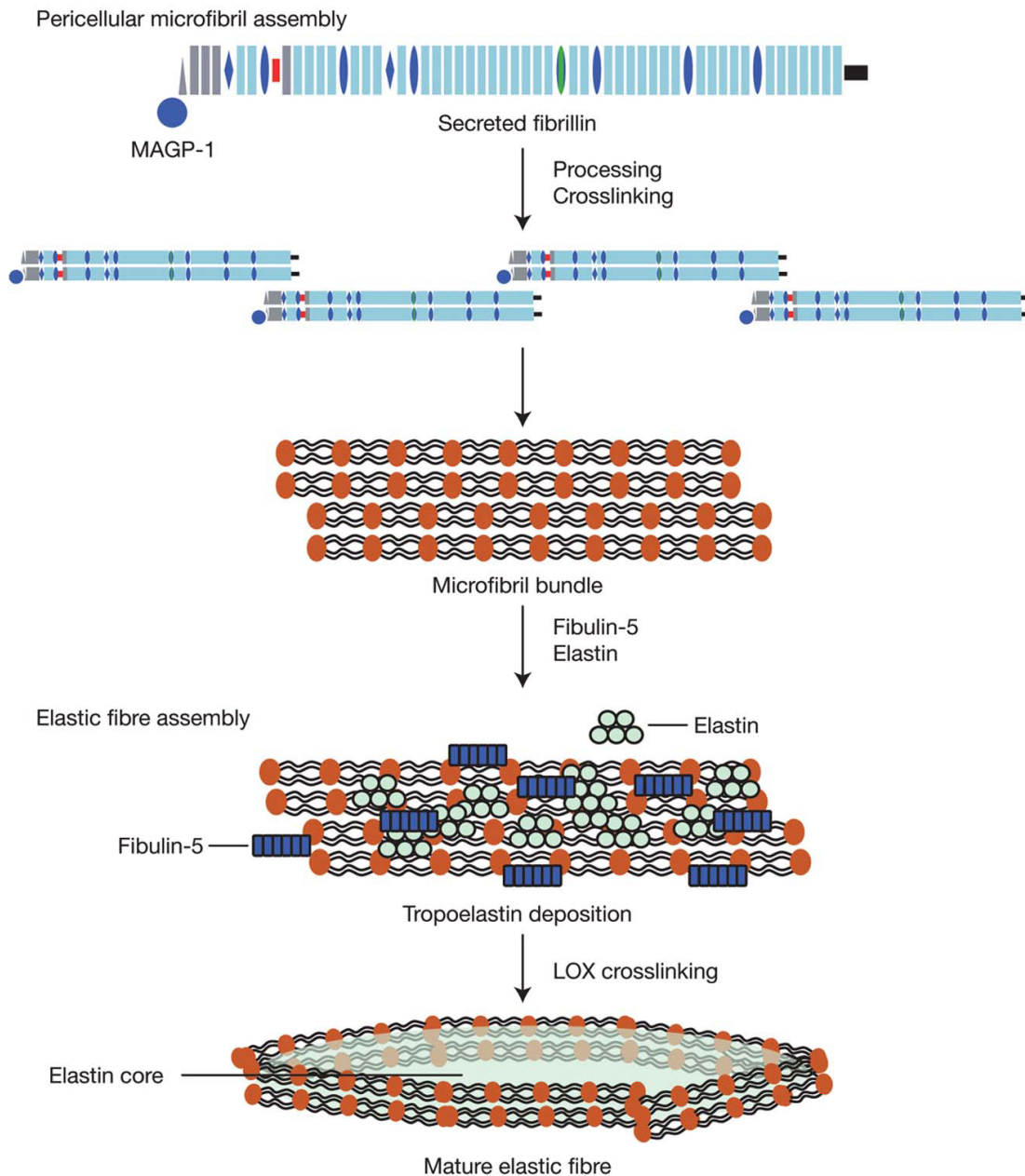


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Assemblierung von Mikrofibrillen und elastischen Fasern (entnommen aus Klety 2006, S. 3).

Sezernierte Fibrillin-Moleküle lagern sich unter Beteiligung von Mikrofibrillen-assoziiertem Glykoprotein-1 (MAGP-1) in Zellnähe zu Mikrofibrillen zusammen. In diese lagern sich Tropoelastin-Moleküle ein, die durch die Aktivität des Enzyms Lysyl-Oxidase (LOX) quervernetzt werden. Dies führt zur Bildung amorphen Elastins im Kern der reifen elastischen Faser.

Elauninfasern sind strukturell identisch mit reifen elastischen Fasern, jedoch fällt ihr Elastinanteil deutlich geringer aus. Nachweisbar sind sie in Sehnen, im Faserknorpel und in den elastischen Schichten der sich entwickelnden Aorta (Gawlik 1965). Im PDL der Maus wurde gezeigt, dass ein Geflecht aus Elauninfasern mit benachbarten kollagenen Hauptfaserbündeln, der Adventitia von Blutgefäßen, dem Wurzelzement und dem Alveolarknochen verbunden ist. Unterstützt durch Oxytalanfasern, die als Ankerfilamente fungieren, wird den Elauninfasern eine Bedeutung bei der gleichmäßigen Verteilung der auf die Zähne wirkenden Kräfte zugesprochen (Johnson und Pylypas 1992).

Oxytalanfasern sind rein mikrofibrilläre Strukturen mit einem Durchmesser von etwa 12 nm (Berkovitz 1990) ohne eingelagertes Elastin (Carmichael und Fullmer 1966) und konnten 1958 erstmals im menschlichen PDL nachgewiesen werden. Nach Oxidation mit Peressigsäure ließen sich diese bislang unbekanntes Fasern in Gewebeschnitten mit Aldehydfuchsin, Orcein oder Resorcinfuchsin anfärben und waren in der Folge lichtmikroskopisch detektierbar (Fullmer und Lillie 1958). Obwohl die exakte biochemische Zusammensetzung der Oxytalanfasern noch nicht eindeutig definiert ist, so ist über den Aufbau von Mikrofibrillen in Bindegeweben generell bekannt, dass sie Fibrilline (Sakai et al. 1986), Mikrofibrillen-assoziiertes Glykoprotein (Gibson et al. 1986), Proteoglykane (Streeten et al. 1983, Völker et al. 1987) und Fibronectin (Schwartz et al. 1985) enthalten. Ultrastrukturell wird im Aufbau der Oxytalanfasern außerdem eine Kollagen VI-Komponente vermutet (Everts et al. 1998).

Die Oxytalanfasern des PDL bilden zwischen den kollagenen Fasern ein dichtes dreidimensionales Netzwerk, das sich von der Dentin-Zement-Grenze zu weiter apikal gelegenen Blutgefäßen erstreckt und nach einem kurzen Verlauf senkrecht zur Zementoberfläche in eine koronal-apikale Faserausrichtung übergeht. Die Assoziation mit Blutgefäßen (Sims 1975) sowie die Beobachtung, dass mechanische Belastung die Synthese von Oxytalanfasern anregt (Jonas und Riede 1980), legen nahe, dass diesem Fasertyp eine Rolle bei der Wahrung der mechanischen Stabilität des PDL zukommt (Strydom et al. 2012).

Außer im PDL können Oxytalanfasern auch in Sehnen und Bändern, in der Adventitia von Blutgefäßen, im Bindegewebe um die Hautanhangsgebilde, im Epi- und Perineu-

rium (Fullmer und Lillie 1958) sowie in den oberen Hautschichten (Cotta-Pereira et al. 1976) gefunden werden.

Im Folgenden werden die Fibuline als eine Proteingruppe, die an der Ausbildung elastischer Fasern entscheidend beteiligt ist, näher beschrieben.

## 1.2 Die Fibuline

Fibuline sind eine Familie extrazellulärer Glykoproteine, die sechs Mitglieder umfasst und eine Vielzahl von Aufgaben in der EZM verschiedener Gewebe erfüllt (de Vega et al. 2007, Kobayashi et al. 2007).

### 1.2.1 Struktur

Fibuline besitzen eine fibulintypische C-terminale Domäne (Domäne I), der Tandemwiederholungen von kalziumbindenden epidermalem Wachstumsfaktor (*calcium-binding epidermal growth factor* = cbEGF)-ähnlichen Bausteinen (Domäne II) vorangehen. Die sechs Mitglieder der Proteinfamilie können weiter in zwei Klassen unterteilt werden:

Klasse I beinhaltet Fibulin-1 und -2, die aufgrund einer Extradomäne mit drei Anaphylatoxin-Einheiten (Domäne III) und einer höheren Anzahl von cbEGF-ähnlichen Bausteinen deutlich größer als die Fibuline der Klasse II sind (Argraves et al. 1990). Nur Fibulin-2 besitzt am N-Terminus eine N-Domäne, die in ein cysteinreiches Segment und ein cysteinreiches Segment unterteilt werden kann (Pan et al. 1993b). Die Struktur von Fibulin-1 kann durch alternatives Spleißen in der Domäne III modifiziert werden, wodurch vier verschieden lange Varianten entstehen (Argraves et al. 1990). Fibulin-2 kann in Domäne II durch die Eliminierung eines cbEGF-ähnlichen Bausteins alternativ modifiziert sein (Pan et al. 1993b).

Klasse II umfasst die kürzesten Isoformen der Fibulinfamilie: Fibulin-3, -4, -5 und -7, die aus einem zentralen Segment mit fünf cbEGF-ähnlichen Bausteinen und einer C-terminalen fibulintypischen Domäne aufgebaut sind. Am N-Terminus tragen sie eine modifizierte cbEGF-ähnliche Domäne (Giltay et al. 1999), einzig Fibulin-7 besitzt hier stattdessen eine sogenannte Sushi-Domäne (de Vega et al. 2007). Hierbei handelt es sich um eine 60 Aminosäuren umfassende Sequenz mit einer speziellen drei-

dimensionalen Struktur, die einer  $\beta$ -Sandwich-Anordnung entspricht (Norman et al. 1991). Somit hebt sich Fibulin-7 strukturell von den anderen drei kurzen Fibulinen ab. Durch teilweise oder komplette Entfernung von Domäne I entstehen fünf verschiedene Splicingvarianten aus Fibulin-3 (Lecka-Czernik et al. 1995).

Hemicentin-1 und -2 wurden aufgrund struktureller Ähnlichkeiten zu den anderen Fibulinen zwischenzeitlich als Fibulin-6 und -8 bezeichnet (Argraves et al. 2003, Vogel und Hedgecock 2001). Neuerliche Studien haben jedoch gezeigt, dass die beiden Proteine einzigartige Eigenschaften und eine neue N-terminale Domäne besitzen, die sie von den Fibulinen unterscheiden (Xu et al. 2013).

### **1.2.2 Lokalisation und Funktion von Fibulin-1 und -2**

Fibulin-1 und -2 weisen teilweise identische Expressionsmuster auf, das Distributionsspektrum von Fibulin-2 ist jedoch insgesamt begrenzter (Tsuda et al. 2001). Beide Proteine sind in vielen Basalmembranen und Gefäßwänden vorhanden (Kluge et al. 1990). Fibulin-1 umgibt außerdem glatte Muskelzellen (Roark et al. 1995) und ist im Serum nachweisbar, was für ein EZM-Protein untypisch ist (Kluge et al. 1990). Bereits in frühen embryonalen Entwicklungsstadien zeigt Fibulin-1 eine weit verbreitete Expression in den Basalmembranen vieler Organe (Spence et al. 1992). Fibulin-2 wird erst in späteren Embryonalstadien exprimiert und ist ein spezifischer Marker der Knorpelentwicklung. Beide Fibuline kommen im Rahmen der Zahnentwicklung an Orten der Mesenchym-Epithel-Interaktion vor (Zhang et al. 1996). Während der avianen und murinen Herzentwicklung ist sowohl Fibulin-1 als auch Fibulin-2 in den endokardialen Polstern nachweisbar, aus denen sich später die Herzklappen und Herzsepten entwickeln (Bouchey et al. 1996, Miosge et al. 1998, Spence et al. 1992, Zhang et al. 1993a, Zhang et al. 1995).

Das Bindungsverhalten von Fibulin-1 und -2 zu anderen EZM-Proteinen ist sehr gut studiert und erfordert in vielen Fällen die Anwesenheit von Kalzium. Das Bindungsspektrum stimmt teilweise überein. So zeigen beide Proteine eine Affinität zu Fibronektin, Nidogen (Balbona et al. 1992, Sasaki et al. 1995a, Sasaki et al. 1995b), Aggrekan und Versikan (Aspberg et al. 1999, Olin et al. 2001), Kollagen IV (Pan et al. 1993a, Sasaki et al. 1995a) sowie zu Tropoelastin (Sasaki et al. 1999). Darüber hin-

aus ist Fibulin-1 zur Selbstinteraktion fähig und bindet außerdem an Laminin-1 (Sasaki et al. 1995b) und Fibrinogen (Tran et al. 1995). Fibulin-2 kann mit Perlekan (Hopf et al. 2001) und Fibrillin-1 (Reinhardt et al. 1996) Bindungen eingehen, außerdem kann es durch kovalente Bindung zweier Moleküle eine Dimerstruktur ausbilden (Sasaki et al. 1997).

Aus dem Bindungsverhalten der beiden Proteine lassen sich ihre biologischen Funktionen ableiten. So verfügen Fibulin-1 und Fibulin-2 durch ihre Beteiligung am Aufbau makromolekularer Strukturen über wichtige stabilisierende Eigenschaften in der EZM. Die Bindung an Fibronectin führt zur Ausbildung eines mikrofibrillären Netzwerks, an dem insbesondere Fibulin-2 beteiligt ist (Sasaki et al. 1995a). Auch elastische Fasern enthalten sowohl Fibulin-1 als auch Fibulin-2, wie die Bindungsaffinität zu Tropoelastin respektive Fibrillin-1 bereits vermuten lässt, wobei Fibulin-2 30-fach stärker an Tropoelastin bindet (Sasaki et al. 1999). Fibulin-1 befindet sich im amorphen Elastinkern der elastischen Fasern, es bindet jedoch nicht an Fibrillin-1 (Roark et al. 1995). Fibulin-2 hingegen zeigt eine hohe Bindungsbereitschaft zu Fibrillin-1 und kann nach Immunogold-Markierung am Übergang vom Elastinkern zu den Mikrofibrillen in den elastischen Fasern der Haut gefunden werden (Reinhardt et al. 1996). Die genaue Funktion der beiden Fibuline in der Elastogenese beziehungsweise Fibrogenese ist noch weitgehend unbekannt. Studien konnten jedoch bereits zeigen, dass Fibulin-2 für die Entstehung elastischer Fasern entbehrlich ist, da Fibulin-2-Knockout-Mäuse keine anatomischen oder strukturellen Abnormitäten in elastischen Geweben aufweisen (Sicot et al. 2008).

Die Bindungsaffinität zu den Basalmembranproteinen Nidogen, Laminin, Kollagen IV und Perlekan legt eine Bedeutung der Fibuline-1 und -2 beim Aufbau von Basalmembranen nahe (Pan et al. 1993a, Sasaki et al. 1995a).

Fibulin-1 kann als einziges im Serum nachweisbares Mitglied der Fibulinfamilie über eine Fibrinogenbrücke an Thrombozyten binden. Dieses Phänomen könnte einen Mechanismus darstellen, wie Thrombozyten nach Endothelverletzung mit der subendothelialen Matrix interagieren (Godyna et al. 1996).

### 1.2.3 Lokalisation und Funktion von Fibulin-3, -4, -5 und -7

Die Fibuline-3, -4 und -5 erfüllen verschiedene Funktionen in nicht-elastischen und elastischen Geweben. In nicht-elastischen Geweben wird Fibulin-3 in der olfaktorischen Glia der Nase (Vukovic et al. 2009) sowie in den inneren und äußeren Segmenten von Photorezeptorzellen und Nervenfaserbündeln des Auges exprimiert (Marmorstein et al. 2002). Eine Punktmutation an Fibulin-3 führt zu einer degenerativen Netzhauterkrankung, der sogenannten Doyme'schen Honigwaben-Dystrophie (Stone et al. 1999). Fibulin-4 ist in Chondrozyten nachweisbar und wird bei Osteoarthritispatienten verstärkt exprimiert (Xiang et al. 2006). Die Proliferation und Migration von Endothelzellen und glatten Muskelzellen wird durch Fibulin-5 inhibiert (Preis et al. 2006, Spencer et al. 2005). Die Bindung an glatte Muskelzellen erfolgt vermittelt durch die Integrine  $\alpha 5\beta 1$  und  $\alpha 4\beta 1$  (Lomas et al. 2007). Fibulin-7 wird von Präodontoblasten und Odontoblasten während der Zahnentwicklung exprimiert und zeigt eine Bindungsaffinität zu dentalen Mesenchymzellen und Odontoblasten. Es lagert sich vor allem in der Prädentinmatrix und um die Dentintubuli an. Außerdem interagiert es mit Heparin, Fibronectin, Dentin-Sialophosphoprotein und Fibulin-1. Es wird vermutet, dass Fibulin-7 eine Rolle bei der Differenzierung von Odontoblasten und bei der Dentinbildung zukommt (de Vega et al. 2007).

In elastischen Geweben wie der Aorta adulter Mäuse ist die Expression von Fibulin-5 10-fach höher als die von Fibulin-3 und 12-fach höher als die von Fibulin-4. In der Lunge ist Fibulin-5 3-fach stärker exprimiert als Fibulin-3 und sogar 50-fach stärker als Fibulin-4. Fibulin-3 ist in der Haut das meist exprimierte kurze Fibulin, 1,5-fach stärker exprimiert als Fibulin-5 und 2-fach stärker als Fibulin-4 (Kobayashi et al. 2007). Die Expression von Fibulin-5 ist in der elastischen Schicht großer Arterien stark (Yanagisawa et al. 2002). Während Fibulin-4 in der Gefäßwand großer Arterien und Venen sowie kleiner Kapillaren nachweisbar ist, beschränkt sich die Expression von Fibulin-3 auf kapilläre Gefäßwände. Alle drei Proteine kommen in Basalmembranen vor sowie im Perichondrium sich entwickelnder Knochen im Mäuseembryo (Kobayashi et al. 2007).

Sowohl Fibulin-4 als auch -5 werden bereits in frühen Embryonalstadien exprimiert; ihre Synthese nimmt in adulten Stadien ab, wird aber durch arterielle Verletzungen erneut angeregt (Gallagher et al. 1999, Kowal et al. 1999).

Die bedeutendste Funktion der kurzen Fibuline manifestiert sich in ihrer Beteiligung an der Bildung elastischer Fasern.

### **Die Rolle der Klasse II-Fibuline in der Elastogenese**

Die Bedeutung der Klasse II-Fibuline für die Elastogenese wird in Knockout-Versuchen deutlich. Fibulin-4-Knockout-Mäuse bilden keine elastischen Fasern und sterben perinatal (McLaughlin et al. 2006). Das Fehlen von Fibulin-5 führt zu einem Phänotyp, der sich durch irreguläre und fragmentierte elastische Fasern in der Haut, den Lungen und der Aorta auszeichnet (Nakamura et al. 2002). Fibulin-5-Knockout-Mäuse reagieren außerdem auf Gefäßverletzungen mit einem veränderten vaskulären Remodellierungsprozess, der durch eine verstärkte Neointimabildung, eine unterentwickelte Media und eine verdickte Adventitiaschicht gekennzeichnet ist (Spencer et al. 2005). Genmutationen in Fibulin-4 oder Fibulin-5 führen in beiden Fällen zu Cutis laxa, einem Krankheitsbild, das durch schlaffe, unelastische, oft in großen Falten herabhängende Haut geprägt ist (Hu et al. 2006, Huchtagowder et al. 2006). Ein Knockout von Fibulin-3 führt zu vergleichsweise schwachen Veränderungen des elastischen Gewebes, einzig die Bruchmembran im Auge (Fu et al. 2007) und das Vaginalgewebe sind in ihren elastischen Strukturen verändert (Rahn et al. 2009). Diese Erkenntnisse deuten darauf hin, dass Fibulin-4 und -5 für den Prozess der Elastogenese von großer Bedeutung sind, während Fibulin-3 hier eher untergeordnete Funktionen zukommen und für Fibulin-7 bisher keine Aufgaben beschrieben sind.

Die jeweilige Rolle von Fibulin-4 und -5 bei der Bildung elastischer Fasern wurde durch Choudhury et al. (2009) an Mäusen untersucht. Dazu wurde die Interaktion beider Fibuline mit Tropoelastin, Lysyl-Oxidase und Fibrillin-1 analysiert: Die Bindungsaffinität von Tropoelastin ist gegenüber Fibulin-5 deutlich höher als gegenüber Fibulin-4, im Fall von Lysyl-Oxidase verhält es sich invers. Außerdem bindet Fibulin-4 Fibulin-5 mit moderater Affinität. Beide Proteine zeigen eine starke Bindung an den N-Terminus von Fibrillin-1. Darüber hinaus wurde dargelegt, dass Lysyl-Oxidase eine



hohe Bindungsaffinität gegenüber Fibrillin-1 und Tropoelastin besitzt. Anschließend wurden diese Interaktionen hinsichtlich kompetitiver Verhaltensmuster untersucht, mit dem Ergebnis, dass Fibulin-4 einen ternären Komplex mit Lysyl-Oxidase und Tropoelastin bildet, der durch Fibrillin-1 inhibiert werden kann. Dieser Hemmprozess könnte die Anlagerung von quervernetztem Elastin an Mikrofibrillen verstärken. Weiterhin inhibiert Fibrillin-1 die Bindung von Fibulin-5 an Tropoelastin. Fibulin-5 kann somit entweder an Tropoelastin oder an Fibrillin-1 binden. Dieses kompetitive Verhalten wird dahingehend gedeutet, dass Fibulin-5 bei der Heranführung von Elastin an die Mikrofibrillen eine Rolle als Chaperon innehat.

Es wird angenommen, dass Fibulin-4 durch seine Fähigkeit zur Komplexbildung ein zentraler Regulator bei der Quervernetzung von Tropoelastin zu Elastin ist, wahrscheinlich indem es die Lysyl-Oxidase-Aktivität kontrolliert und das Enzym in enge räumliche Beziehung zu Tropoelastin setzt (Choudhury et al. 2009, McLaughlin et al. 2006). In einer Studie an Fibulin-5-Knockout-Mäusen bildeten sich in der Dermis Elastinkügelchen, die nicht in Mikrofibrillen integriert waren. Dies deutet darauf hin, dass Fibulin-5 essenziell für die Ausbildung gleichmäßig geformten Elastins und dessen Anlagerung an Mikrofibrillen ist (Choi et al. 2009). Fibulin-5 beschleunigt des Weiteren den Prozess der Koazervation von Tropoelastin (Wachi et al. 2008). Sobald Elastin und Mikrofibrillen in enger räumlicher Beziehung stehen kommt es vermutlich zur direkten Interaktion der beiden Strukturen, da sie eine hohe Bindungsaffinität zueinander aufweisen (Cain et al. 2008).

Elektronenmikroskopische Immunogold-Untersuchungen lokalisieren Fibulin-5 in reifen elastischen Fasern am Übergang vom Elastinkern zu den Mikrofibrillen, Fibulin-4 ist hingegen vor allem innerhalb der Mikrofibrillen detektierbar (Kobayashi et al. 2007).

In humanem PDL wurde gezeigt, dass die Induktion mechanischen Stresses durch Dehnung des Gewebes zu einer vermehrten Expression von Fibulin-5 führt. Ein Unterdrücken der Fibulin-5-Expression von Fibroblasten führt zu einer verminderten Anzahl von Oxytalanfasern, die irregulär orientiert sind (Nakashima et al. 2009). Fibulin-5 kommt somit nicht nur eine bedeutende Rolle bei der Bildung reifer elastischer Fasern zu, auch an der Entstehung quantitativ und strukturell regulär ausgebildeter Oxytalanfasern ist es beteiligt.

Kollagenfasern und Fasern des elastischen Systems sind strukturgebende Komponenten der EZM und interagieren mit Zellen durch Zelloberflächenrezeptoren. Zu diesen gehört auch die Gruppe der DDRs, die im Folgenden vorgestellt wird.

### 1.3 Die Discoidin-Domäne-Rezeptoren

Die Familie der DDRs beinhaltet zwei Mitglieder - DDR1 und DDR2 - die Anfang der 1990er Jahre entdeckt wurden und zu einer Gruppe von Zelloberflächenrezeptoren, den Rezeptor-Tyrosinkinasen (RTK), gehören (Johnson et al. 1993). Im Menschen sind 58 RTKs bekannt, welche in 20 Untergruppen unterteilt werden können. Alle RTKs haben eine ähnliche Molekülstruktur mit einer ligandenbindenden Domäne in der extrazellulären Region, einer einzigen Transmembranhelix, einer zytosolischen Region, die die Tyrosinkinase enthält, und anderen C-terminalen und juxtamembranen Regionen (Lemmon und Schlessinger 2010). Die Bindung von Wachstumsfaktoren induziert die Rezeptordimerisierung und folglich die Rezeptoraktivierung. Die daraufhin aktivierten Signalwege involvieren RTKs in verschiedenste zelluläre Prozesse wie Proliferation und Differenzierung, Zellmigration, Zellmetabolismus und Zellzykluskontrolle (Blume-Jensen und Hunter 2001, Ullrich und Schlessinger 1990).

#### 1.3.1 Struktur

Der strukturelle Aufbau der DDRs stellt sich folgendermaßen dar: Am N-Terminus befindet sich eine Discoidin-Domäne, die homolog zu Discoidin I ist, einem Protein, das von *Dictyostelium discoideum* sezerniert wird (Kiedziarska et al. 2007). In dieser Amöbe fungiert Discoidin I als Lektin, das für die Zellmorphologie, Zelladhäsion und die Zytoskelettorganisation verantwortlich ist (Alexander et al. 1992). In DDRs besteht die Discoidin-Domäne aus zwei antiparallelen Faltblattstrukturen mit insgesamt acht  $\beta$ -Strängen in einer sogenannten Jelly-Roll-Anordnung, in der sich sechs Schleifen befinden. Diese bilden eine Kollagenbindungsstelle, welche die Spezifität von DDRs für bestimmte Kollagene vermittelt (Abdulhusein et al. 2004, Curat et al. 2001). Im Anschluss an die Discoidin-Domäne befindet sich eine Discoidin-ähnliche Domäne, die ebenfalls aus zwei  $\beta$ -Faltblattstrukturen mit acht  $\beta$ -Strängen in Jelly-Roll-Konfiguration aufgebaut ist. Als Funktion für diese Domäne wird eine Beteiligung bei der Rezeptoraktivierung durch Kollagene angenommen (Carafoli et al. 2012). Eine

extrazelluläre juxtamembrane Domäne unbekannter Struktur verbindet die Discoidin-ähnliche Domäne mit der Transmembran-Domäne (Laval et al. 1994) und kann durch bestimmte membrangebundene Proteasen, sogenannte Sheddasen, geschnitten werden (Vogel 2002). Eine kurze, nur zirka 20 Aminosäuren umfassende Transmembran-Domäne verbindet die Ektodomäne mit den intrazellulären Bestandteilen der DDRs und beinhaltet viele Leucinreste, die einen Leucin-Zipper bilden, der für die Rezeptoraktivierung essenziell ist (Noordeen et al. 2006). Intrazellulär schließt sich eine zytosolische juxtamembrane Domäne an, die reich an Tyrosin und mit etwa 140 Aminosäuren ungewöhnlich lang ist. C-terminal befindet sich eine Kinase-Domäne mit katalytischer Funktion (Di Marco et al. 1993).

Die DDR1-Untergruppe besteht aus fünf membranverankerten Isoformen, die durch alternatives Spleißen entstehen, während die DDR2-Untergruppe nur ein einziges Protein umfasst. DDR1a, DDR1b und DDR1c sind funktionale Rezeptoren mit voller Proteinelänge, DDR1d und DDR1e hingegen sind verkürzte oder Kinase-inaktive Rezeptoren (Alves et al. 2001, Playford et al. 1996).

### **1.3.2 Lokalisation**

Beide DDRs sind in adulten menschlichen und murinen Geweben weit verbreitet. DDR1 ist in Epithel- und Bindegeweben (Alves et al. 1995) sowie im Gehirn, in der Lunge (Perez et al. 1994), in der Niere, in Keratinozyten (Di Marco et al. 1993), im Herz, im Muskel, in der Leber und im Pankreas (Laval et al. 1994) exprimiert. In der Entwicklung der Maus dient DDR1 als früher Marker für die Bildung neuroektodermaler Zellen (Zerlin et al. 1993). DDR2 zeigt ein teilweise übereinstimmendes Expressionsmuster mit hohem Vorkommen in Herz und Lunge von Mensch und Maus und geringeren Expressionslevels in Gehirn, Plazenta, Leber, Skelettmuskulatur und Niere humanen Ursprungs. In murinen Geweben ist DDR2 im Gehirn und in den Hoden exprimiert (Karn et al. 1993). Für DDR1 wird eine Rolle bei der Tumordinvasion angenommen (Alves et al. 1995). Eine Überexpression von DDR1 ist in humanen Tumorgeweben beschrieben, insbesondere bei Brustkrebs (Barker et al. 1995), jedoch auch in Ovarial- (Laval et al. 1994) und Ösophagustumoren (Nemoto et al. 1997) sowie in Gehirntumoren von Kindern (Weiner et al. 1996) und Erwachsenen (Weiner et

al. 2000). Im nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom ist die Expression von DDR1 gegenüber gesundem Gewebe hochreguliert, jene von DDR2 herunterreguliert (Ford et al. 2007). In bereits metastasierenden Schilddrüsenkarzinomen ist DDR2 eines der wenigen Gene, das stark überexprimiert ist (Rodrigues et al. 2007), auch für das Hodgkin-Lymphom ist eine Überexpression von DDR2 beschrieben (Renné et al. 2005). Zwei Studien zeigen Mutationen in DDR1 bei Patienten, die an akuter myeloischer Leukämie leiden und legen somit eine potenzielle Beteiligung von DDR1 in der Pathogenese dieser Erkrankung nahe (Loriaux et al. 2008, Tomasson et al. 2008). Eine Expression von DDR1 kann durch  $\gamma$ -Bestrahlung von Maus-Astrozyten (Sakuma et al. 1995) und durch die Überexpression von p53 in Osteosarkomzellen (Sakuma et al. 1996) experimentell induziert werden.

### 1.3.3 Rezeptoraktivierung durch Kollagene

Den DDRs kommt innerhalb der Gruppe der RTKs eine Sonderstellung zu, da sie durch Kollagene aktiviert werden und nicht durch Wachstumsfaktoren wie für andere RTKs üblich. DDRs können Kollagene nur in ihrer nativen, tripelhelikalen Form binden, hitzedenaturierte Proteine werden nicht erkannt (Vogel et al. 1997). Sowohl DDR1 als auch DDR2 binden an die fibrillären Kollagene I, II, III und V und werden durch diese aktiviert. Das Basalmembran-Kollagen IV aktiviert einzig DDR1 (Vogel et al. 1997), wohingegen das nicht-fibrilläre Kollagen X vor allem DDR2 aktiviert (Leitinger und Kwan 2006). DDR1 bindet außerdem an Kollagen VIII (Hou et al. 2001). Die Kollagene I, II und III enthalten für die Bindung beider DDRs eine sechs Aminosäuren umfassende Sequenz, die GVMGFO-Domäne (O steht für Hydroxyprolin). Für DDR2 existieren darüber hinaus noch weitere Bindungsstellen in Kollagen II und III, die noch nicht genau sequenziert sind (Konitsiotis et al. 2008, Xu et al. 2011).

In der Struktur der DDRs sind bestimmte Kollagenbindungsstellen detektierbar. Konservierte Aminosäurereste innerhalb der Schleifen 1, 2 und 4 in der Discoidin-Domäne sind für die Bindung fibrillärer Kollagene verantwortlich (Ichikawa et al. 2007, Xu et al. 2011), bestimmte Molekül-Domänen innerhalb der Schleifen 4 und 6 hingegen sind essenziell für die Aktivierung durch Kollagen IV und existieren nur in DDR1 (Xu et al. 2011). Es wird außerdem angenommen, dass für die kollagenvermittelte

Aktivierung Molekül-Domänen benötigt werden, die außerhalb der Kollagenbindungsstelle auf der Oberfläche der Discoidin-Domäne liegen (Carafoli et al. 2012). Die Beteiligung von Korezeptoren am Aktivierungsprozess der DDRs ist noch nicht abschließend erforscht. Bereits durchgeführte Untersuchungen an  $\beta$ 1-Integrinen, die ebenfalls Kollagene binden können und eine Kinaseaktivität besitzen, zeigten, dass sie für die Aktivierung von DDR1 entbehrlich sind (Vogel et al. 2000).

Die Kollagenbindung führt zur Autophosphorylierung der DDRs; dieser Prozess verläuft sehr langsam und stetig über viele Stunden hinweg, nach 90 bis 120 Minuten erreicht er sein Maximum (Vogel et al. 1997). Der Grund für diese zögerliche Reaktion bleibt genau wie der exakte Ablauf der Aktivierung der Kinase-Domäne weiterhin unklar. Bekannt ist, dass DDR1 auch ligandenunabhängig, also in Abwesenheit von Kollagenen, in einer stabilen Dimerform vorliegt (Noordeen et al. 2006), die zugleich Voraussetzung für die Aktivierung der Kinase-Domäne ist (Leitinger 2003). Außerdem werden spezifische Interaktionen der Leucin-Zipper-Sequenz der Transmembran-Domäne für die Rezeptoraktivierung verantwortlich gemacht, die extrazellulären und zytosolischen Domänen sind für diesen Vorgang jeweils entbehrlich (Noordeen et al. 2006). Es wird vermutet, dass es nach Kollagenbindung zu Konformationsänderungen innerhalb der Molekülstruktur des Rezeptors kommt, die zu einer Rotation von Helices der Transmembran-Domäne im Dimer führen und somit Einfluss auf den Aktivierungsprozess nehmen (Fu et al. 2013). Die Autophosphorylierung von DDR1b resultiert in der Ausbildung von Bindungsstellen für die Phosphotyrosin-Bindungs-Domäne des Downstream-Signalmoleküls Shc (Vogel et al. 1997). Weitere Beispiele für Signalmoleküle, die an aktiviertes DDR1 binden, sind Nck2 und Shp-2 (Koo et al. 2006) sowie Pyk2 (Shintani et al. 2008). Aktiviertes DDR2 interagiert mit ShcA und Src (Ikeda et al. 2002).

#### 1.3.4 Funktion

Die aktivierten Signalwege involvieren die DDRs so in eine Vielzahl unterschiedlicher Aufgaben. Sowohl DDR1 als auch DDR2 üben proliferative (Labrador et al. 2001, Olaso et al. 2001) und antiproliferative Funktionen (Franco et al. 2010, Olaso et al. 2011a) an diversen Zelltypen aus. Auch Differenzierungsprozesse werden beeinflusst,

beispielsweise ist DDR1 während der neuronalen Differenzierung von murinen embryonalen Stammzellen hochreguliert (Suzuki et al. 2011). Weiterhin werden Zelladhäsionsvorgänge durch DDR1 reguliert: Die durch DDR1 gesteuerte Bindung von Melanozyten an Kollagen IV spielt eine entscheidende Rolle bei der Platzierung dieser Zellen auf der Basalmembran der Epidermis (Fukunaga-Kalabis et al. 2006). DDR1 wird auch für Zellmigrationsprozesse benötigt, zum Beispiel bei humanen Lungenepithelzellen (Roberts et al. 2011). Unabhängig von ihrer Fähigkeit zur Kollagenbindung können DDRs die Zell-Zell-Adhäsion beeinflussen. So stabilisiert DDR1 das Adhäsionsprotein E-Cadherin auf Zelloberflächen und reguliert die E-Cadherin-vermittelte Zellaggregation (Eswaramoorthy et al. 2010).

Die Bedeutung der DDRs als Kollagenrezeptoren wird in Knockout-Versuchen deutlich, da DDR1- und DDR2-Knockout-Mäuse kleiner als Wildtyp-Mäuse sind und skelettale Abnormitäten aufweisen (Labrador et al. 2001, Vogel et al. 2001). Darüber hinaus liegen bei DDR-Knockout-Mäusen Fortpflanzungsstörungen vor. So ist die Einnistung der Blastozyste in die Gebärmutterwand bei weiblichen DDR1-Knockout-Mäusen gestört, außerdem sind sie aufgrund fehlentwickelter Brustdrüsen nicht zur Laktation fähig (Vogel et al. 2001). Die Nieren sind ebenso fehlgebildet wie das Innenohr von DDR1-Knockout-Mäusen (Gross et al. 2004, Meyer zum Gottesberge et al. 2008). DDR2-Knockout-Mäuse zeigen eine beeinträchtigte Wundheilung, die mit verminderter EZM-Remodellierung assoziiert ist (Olaso et al. 2011b). Schminke et al. (2014) haben gezeigt, dass DDR1-Knockout-Mäuse als Modell für Osteoarthritis im Kiefergelenk dienen. Bereits neun Wochen alte Tiere entwickeln diese Erkrankung, wobei andere Gelenke, wie etwa das Kniegelenk, nicht betroffen sind.

Auch auf viele pathologische Bedingungen reagieren Knockout-Mäuse anders als Wildtyp-Mäuse. DDR1-Knockout-Mäuse weisen nach Gefäßverletzung eine verminderte Schichtdicke in der Neointima auf (Hou et al. 2001), die Funktion der glatten Gefäßmuskelzellen ist ebenfalls herabgesetzt (Hou et al. 2002). Bei Bluthochdruck zeigen DDR1-Knockout-Mäuse eine reduzierte entzündliche und fibrotische Antwort in der Niere (Flamant et al. 2006), eine Fibrose des Lungengewebes bei Bleomycin-induzierter Lungenerkrankung bleibt in DDR1-Knockout-Mäusen aus (Avivi-Green et al. 2006).

Diese Erkenntnisse lassen den Schluss zu, dass DDR1 an der Regulation entzündlicher, fibrotischer und degenerativer Prozesse beteiligt ist.

## 1.4 Aufgabenstellung

Die vorliegende Arbeit hat zum einen das Ziel Wildtyp- und DDR1-Knockout-Mäuse hinsichtlich ihrer strukturellen Unterschiede im Bereich des Zahns und des Zahnhalteapparats zu untersuchen. Ein Erkenntnisgewinn ist erstrebenswert, da DDR1-Knockout-Mäuse diesbezüglich gänzlich unerforscht sind und im Bereich des Kiefergelenkknorpels bereits gezeigt werden konnte, dass der kollagene Faserapparat dieser Tiere im Gegensatz zu Wildtyp-Mäusen unstrukturiert ist (Schminke et al. 2014). Es werden histologische Untersuchungen an Schnittpräparaten zahntragender Kiefersegmente beider Versuchstiergruppen durchgeführt, die anschließend licht- und elektronenmikroskopisch ausgewertet werden. Besonderes Augenmerk wird dabei auf das PDL gerichtet.

Zum anderen wird mittels einer immunhistochemischen Nachweismethode das Vorkommen der Fibuline-3, -4 und -5 in den Strukturen des Zahns und des Zahnhalteapparats von Wildtyp- und DDR1-Knockout-Mäusen untersucht. Ein Nachweis dieser Glykoproteine in dentalen und parodontalen Strukturen der Wildtyp-Maus ist in der Literatur noch nicht beschrieben und daher von Interesse, zumal Fibuline funktionell und strukturell wichtige Komponenten in der EZM vieler Gewebe darstellen. Für das strukturverwandte Fibulin-7 konnte bereits eine Assoziation mit dentalen Geweben gezeigt werden (de Vega et al. 2007). Die anschließende lichtmikroskopische Auswertung zielt außerdem darauf ab, Übereinstimmungen und Unterschiede im Vorkommen der drei genannten Proteine zwischen beiden Versuchstiergruppen zu erkennen.

## 2 Material und Methoden

Hämatoxylin-Eosin- und Elastica-van-Gieson-Färbungen von Paraffinschnitten sowie Richardson-Färbungen von semidünn geschnittenen Eponpräparaten wurden lichtmikroskopisch untersucht. Ultrastrukturelle Untersuchungen erfolgten an Ultradünnschnitten, die mit Bleicitrat und Uranylacetat kontrastiert und anschließend transmissionselektronenmikroskopisch ausgewertet wurden. Außerdem wurden immunhistochemische Proteinnachweise mit einem Meerrettich-Peroxidase basierten Polymer-system durchgeführt.

### 2.1 Versuchstiere

Alle Versuchstiere gehörten dem Mausstamm Sv/129 an. Bei den für die Lichtmikroskopie verwendeten Tieren handelte es sich um fünf Wildtyp-Mäuse und fünf DDR1-Knockout-Mäuse im Alter von 21 bis 35 Wochen. Für elektronenmikroskopische Untersuchungen wurden eine Wildtyp-Maus im Alter von 31 Wochen und eine DDR1-Knockout-Maus im Alter von 47 Wochen herangezogen. Die DDR1-Knockout-Mäuse wurden entsprechend einer bereits beschriebenen Methode generiert (Vogel et al. 2001). Alle Versuchstiere entstammen dem Tierstall des Max-Planck-Institutes für experimentelle Medizin mit Sitz in der Hermann-Rein-Straße 3 in 37075 Göttingen. Die Versuchstiere wurden ad libitum mit Trockenfutter sowie mit Leitungswasser versorgt.

### 2.2 Gewebepräparation

Das Töten der Tiere erfolgte durch zervikale Dislokation nach Betäubung. Anschließend wurden die Ober- und Unterkiefer freipräpariert. Nach Ablösen der Gingiva wurden die so erhaltenen Präparate zu Gewebeproben weiterzerkleinert, welche jeweils einen Molar inklusive umgebendem PDL und Alveolarknochen umfassten.



## 2.3 Fixierung

Bei der anschließenden Fixierung erfolgte eine Trennung der Gewebeproben in Proben, die für eine spätere Paraffineinbettung vorgesehen waren und Proben, die im weiteren Verlauf in Epon eingebettet wurden.

### 2.3.1 Fixierung für Paraffineinbettung

Die Präparate von fünf Wildtyp- und fünf DDR1-Knockout-Mäusen wurden unmittelbar nach ihrer Präparation in gepuffertes Formalin nach Lillie überführt und über Nacht bei 4 °C fixiert.

#### Gepuffertes Formalin nach Lillie

30 ml 37 % Formaldehyd (Bestellnummer P733.3, Roth, Karlsruhe) und 100 ml 0,3 M Sörensen Puffer mit 170 ml Aqua dest. mischen.

#### 0,3 M Sörensen-Puffer

Lösung A:

20,42 g 0,3 M Kaliumdihydrogenphosphat (Bestellnummer 3904-1, Roth, Karlsruhe) in 500 ml Aqua dest. lösen.

Lösung B:

85,18 g 0,3 M Dinatriumhydrogenphosphat (Bestellnummer A3599,0500, Appli-Chem, Darmstadt) in 2000 ml Aqua dest. lösen.

Für 100 ml Sörensen-Puffer 18,2 ml Lösung A und 81,8 ml Lösung B mischen und auf pH 7,4 einstellen.

### 2.3.2 Fixierung für Eponeinbettung

Die Gewebeproben von jeweils einer Wildtyp- und einer DDR1-Knockout-Maus wurden unmittelbar nach ihrer Präparation in Karnovsky-Fixans überführt und dort für 1 h bei 4 °C gelagert.

### Karnovsky-Fixans

58 ml 0,3 M Sörensen-Puffer mit 12 ml 25 % Glutaraldehyd (Bestellnummer 23114, Serva, Heidelberg) und 30 ml 10 % Formaldehyd mischen.

### 10 % Formaldehyd

10 g Paraformaldehyd (Bestellnummer 0335.5, Roth, Karlsruhe) in 100 ml Aqua dest. lösen bei 70 °C, mit 1 N Natronlauge (Bestellnummer K021.1, Roth, Karlsruhe) klären und fixieren, pH auf 7,5 bis 7,8 einstellen.

## 2.4 Entkalkung

Anschließend durchliefen alle Präparate unabhängig von ihrem späteren Einbettmedium eine zirka 5-wöchige Entkalkungsphase in 20 % Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA), um die Zahnhartsubstanz und den Alveolarknochen für spätere Gewebeschnitte ausreichend zu entkalkifizieren. Die exakte Entkalkungsdauer variierte aufgrund geringfügiger Größenunterschiede der Gewebeproben um einige Tage. Die suffiziente Entkalkung der Präparate wurde durch eine regelmäßig durchgeführte Nadelprobe sichergestellt. Bei widerstandslosem Eindringen einer Präpariernadel in das Präparat wurde die Entkalkung beendet. Es folgte 2-mal 10-minütiges Waschen der Präparate in Leitungswasser mit anschließender Lagerung in 70 % Ethanol bei 4 °C über Nacht.

### 20 % EDTA, pH 7,4

400 g EDTA-Dinatriumsalz-Dihydrat (Bestellnummer E5134, Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA) in 2000 ml Aqua dest. bei 50-70 °C lösen.

Tabelle 1: Protokoll zur EDTA-Entkalkung

Entkalkungswoche	EDTA-Wechsel
1	täglich
2	jeden zweiten Tag
3 bis 5	jeden dritten Tag

## 2.5 Einbettung

Die entkalkten Gewebeproben wurden anschließend in Paraffin beziehungsweise Epon eingebettet.

### 2.5.1 Einbettung in Paraffin

Mithilfe eines Einbettautomaten (Duplex Processor, Shandon Elliot, Cheshire, England) erfolgte das Dehydrieren und Paraffinieren der Präparate:

**Tabelle 2: Protokoll des Einbettautomaten**

Position	Küvetteninhalt	Verweildauer
1	70 % Ethanol	3 h
2	80 % Ethanol	1 h
3	90 % Ethanol	1 h
4	96 % Ethanol	1 h
5	99 % Ethanol	2 h
6	Isopropylalkohol	2 h
7	Isopropylalkohol	1,5 h
8	Xylol	0,5 h
9	Xylol	0,75 h
10	Xylol	0,75 h
11	Paraplast (52 °C)	6 h
12	Paraplast (56 °C)	4,5 h

Ethanol 99 % (Bestellnummer 603-002-00-5, Chemie-Vertrieb Hannover, Hannover) jeweils der entsprechenden Konzentration mit Aqua dest. verdünnt.

Xylol 98,5 % (CN80.2, Roth, Karlsruhe).

Isopropylalkohol (Bestellnummer 67-63-0, Chemie-Vertrieb Hannover, Hannover).

Paraplast (52 °C) (Paraplast X-tra, Bestellnummer X882.1, Roth, Karlsruhe), Paraplast (56 °C) (Shandon Histoplast, Bestellnummer 6774060, Thermoscientific, Runcorn, England).

Die paraffinierten Gewebeproben wurden daraufhin in vorgefertigte Einbettkassetten überführt, die mittels eines Paraffinspenders (Bestellnummer 43900, Medax, Rendsburg) mit Paraffin aufgefüllt wurden. Die so entstandenen Paraffinblöcke wurden über Nacht bei RT ausgehärtet.

### **2.5.2 Einbettung in Epon**

Der Einbettvorgang wurde manuell durchgeführt. Nach einer Entwässerung in Ethanol folgte die schrittweise Überführung der Proben in Epon, zunächst über ein propylenoxidhaltiges Intermedium und schließlich in reines Epon:

#### **Protokoll zur Einbettung in Epon**

1. 10 min in 0,15 M Sörensen-Puffer bei 4 °C puffern
2. 1,5 h in Osmium bei 4 °C lagern
3. 10 min in 0,15 M Sörensen-Puffer bei 4 °C puffern
4. 10 min in 30 % Ethanol bei 4 °C lagern
5. 10 min in 50 % Ethanol bei 4 °C lagern
6. 10 min in 70 % Ethanol bei 4 °C lagern
7. 10 min in 90 % Ethanol bei 4 °C lagern
8. 2x10 min in 99 % Ethanol bei 4 °C lagern
9. 2x10 min in Propylenoxid (33715, Serva, Heidelberg) bei 4 °C lagern
10. 1 h bei 4 °C in Gemisch aus 1 Teil Propylenoxid mit 1 Teil Epon aufbewahren
11. 16 h bei 4 °C in Gemisch aus 1 Teil Propylenoxid und 3 Teile Epon aufbewahren
12. in spezielle Kunststoffeinhaltformen überführen, mit Epon auffüllen, 24 h bei 60 °C in Wärmeschrank (Bestellnummer VT 6060 M, Heraeus, Hanau) polymerisieren

#### **0,15 M Sörensen-Puffer**

1 Teil 0,3 M Sörensen Puffer mit 1 Teil Aqua dest. mischen.

## Osmium

1 Teil 2 % Osmium-Tetraoxydlösung (Bestellnummer 7436.1, Roth, Karlsruhe) mit 1 Teil 0,3 M Sörensen-Puffer mischen.

## Epon

Epon A:

31 ml Glycidether (Bestellnummer 21045, Serva, Heidelberg) mit 50 ml Dodecenylnbernsteinsäureanhydrid (Bestellnummer 20755.01, Serva, Heidelberg) mischen, 5 min sorgfältig rühren.

Epon B:

25 ml Glycidether mit 22,5 ml Methylnadicanhydrid (Bestellnummer 29452.02, Serva, Heidelberg) mischen, 5 min sorgfältig rühren.

60 ml Epon A mit 40 ml Epon B mischen, 1,8 ml 2,4,6-Tris(dimethylaminomethyl)phenol zugeben (Bestellnummer 36975.01, Serva, Heidelberg), mindestens 5 min sorgfältig rühren bis ein homogenes, blasenfreies Gemisch entsteht.

## 2.6 Gewebeschnitte

Von den vollständig ausgehärteten Paraffin- beziehungsweise Eponblöcke wurden Gewebeschnitte angefertigt.

### 2.6.1 Schneiden der Paraffinblöcke

Zum Anfertigen der 6 µm dicken Gewebeschnitte wurde das Mikrotom Jung Biocut 2035 (Leica, Nussloch) genutzt, in das die Paraffinblöcke eingespannt wurden. Die Schnittebene verlief dabei entweder in Längsrichtung der Zahnwurzel oder senkrecht zu dieser, wodurch Wurzellängsschnitte und Wurzelquerschnitte entstanden. Nach kurzem Verweilen in einem Streckbad (Bestellnummer 1052, Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel) bei 40 °C wurden die Schnittpräparate auf Objektträger (Super-Frost® Plus, Menzel-Gläser, Braunschweig) überführt. Diese wurden zunächst für eine Stunde auf einer Wärmeplatte (Bestellnummer 14801, Medax, Rendsburg) bei 37 °C gelagert, danach erfolgte das vollständige Trocknen der Präparate über Nacht

in einem Wärmeschrank (Typ B 5042, Bestellnummer 26061010, Heraeus, Hanau) bei 37 °C.

### **2.6.2 Schneiden der Eponblöcke**

Mittels des Mikrotoms Ultracut E (Reichert-Jung, Wetzlar) wurden Semidünnschnitte mit einer Dicke von 0,9 µm und Ultradünnschnitte mit einer Dicke von 80 nm angefertigt. Die Schnittebene verlief hierbei in Wurzellängsrichtung. Die Semidünnschnitte wurden anschließend unter Benutzung eines Glasstabes auf Objektträger (Bestellnummer VA31110 002FKB, Knittel Glas, Braunschweig) überführt und einer Richardson-Färbung unterzogen (siehe 2.10). Die Ultradünnschnitte wurden mithilfe einer Wimper auf Nickelgrids (Athene® Grids, Bestellnummer G201N, Agar Scientific, Essex, England) aufgebracht, die zuvor mit 0,3 % Formvar in Chloroform beschichtet worden waren. Die Trocknung und Lagerung der Grids erfolgte in einer dafür vorgesehenen Grid-Box.

### **0,3 % Formvar in Chloroform**

0,3 g Formvar-Pulver (Bestellnummer R1202, Agar Scientific, Essex, England) in 100 ml Chloroform (Bestellnummer 49,618-9, Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA) lösen, anschließend filtrieren.

## 2.7 Hämalaun-Eosin-Färbung

Der für die Durchführung der Färbung verwendete Färbeautomat (Linearfärber LS-15, Artikelnummer 15000, Weinkauf Medizin- und Umwelttechnik, Forchheim) war folgendermaßen programmiert:

**Tabelle 3: Protokoll zur Hämalaun-Eosin-Färbung**

Schritt	Position	Küvetteninhalt	Verweildauer
1	1	Xylol	10 min
2	2	Xylol	10 min
3	3	99 % Ethanol	3 min
4	4	80 % Ethanol	3 min
5	5	60 % Ethanol	3 min
6	6	Aqua dest.	3 min
7	15	Hämalaun	5 min
8	14	fließ. Leitungswasser	15 min
9	7	Eosin	6 min
10	8	Aqua dest.	0,5 min
11	9	60 % Ethanol	0,5 min
12	10	80 % Ethanol	1 min
13	11	99 % Ethanol	2 min
14	12	Xylol	10 min
15	13	Xylol	10 min

### Hämalaunlösung

Hämalaun nach Mayer (Bestellnummer 1.09249, Merck, Darmstadt) 1:4 mit Aqua dest. verdünnen und anschließend filtrieren.

### Eosinlösung

1 g Eosin (Bestellnummer A0822,0025, AppliChem, Darmstadt) in 1000 ml Aqua dest. lösen, vor Gebrauch mit einigen Tropfen Essigsäure (Bestellnummer A0662,1000, AppliChem, Darmstadt) ansäuern.

Im Anschluss an den Färbeprozess wurden die Gewebeschnitte mit einem Eindeckmedium (Eukitt<sup>®</sup>, Bestellnummer 03989, Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA) und einem Deckglas eingedeckt. Nach dem Trocknen wurden die Präparate unter einem Lichtmikroskop (PrimoStar, Bestellnummer 415500-0004-00, Zeiss, Göttingen) ausgewertet.

## 2.8 Elastica-van-Gieson-Färbung

Zur Darstellung elastischer Fasern wurden Elastica-van-Gieson-Färbungen einiger Paraffinschnitte durchgeführt. Die Elastica-van-Gieson-Färbung ist eine Kombination aus einer Resorcinfärbung und einer van-Gieson-Färbung. Sie dient dem Nachweis elastischer Fasern, die Resorcinfuchsin elektropolar und über Grenzflächenadsorption binden. Somit bildet sich eine dunkelviolette Färbung der elastischen Fasern. Durch die van-Gieson-Färbung stellen sich Zellkerne schwarzbraun und kollagene Fasern rot dar.

### Protokoll zur Elastica-van-Gieson-Färbung

Die Elastica-van-Gieson-Färbung erfolgte gemäß nachstehendem Protokoll:

1. entparaffinieren und rehydrieren mit Färbeautomat (Linearfärber LS-15, Weinkauf Medizin- und Umwelttechnik, Forchheim):

Tabelle 4: Protokoll des Färbeautomaten zum Rehydrieren (Elastica-van-Gieson-Färbung)

Schritt	Position	Küvetteninhalt	Verweildauer
1	1	Xylol	10 min
2	2	Xylol	10 min
3	3	99 % Ethanol	3 min
4	4	80 % Ethanol	3 min
5	5	60 % Ethanol	3 min
6	6	Aqua dest.	3 min

2. 15 min mit Resorcinfuchsin-Lösung nach Weigert (Bestellnummer 2E-030, Waldeck GmbH & Co. Division Chroma, Münster) färben
3. mit Aqua dest. abspülen



4. 5 min mit Eisenhämatoxylin-Lösung nach Weigert (Bestellnummer 1159730002, Merck, Darmstadt) färben
5. 2 min bläuen in fließendem Leitungswasser
6. mit Aqua dest. abspülen
7. 10 min mit Pikrofuchsin-Lösung (Bestellnummer 2E-050, Waldeck GmbH & Co. Division Chroma, Münster) färben
8. mit Aqua dest. abspülen
9. dehydrieren mit Färbeautomat (Linearfärber LS-15, Weinkauf Medizin- und Umwelttechnik, Forchheim):

**Tabelle 5: Protokoll des Färbeautomaten zum Dehydrieren (Elastica-van-Gieson-Färbung)**

Schritt	Position	Küvetteninhalt	Verweildauer
10	8	Aqua dest.	3 min
11	9	60 % Ethanol	3 min
12	10	80 % Ethanol	3 min
13	11	99 % Ethanol	3 min
14	12	Xylol	10 min

10. eindecken mit Eukitt® und Deckglas

## 2.9 Richardson-Färbung

An den Semidünnschnitten wurden Richardson-Färbungen durchgeführt.

### Protokoll zur Richardson-Färbung

Im Folgenden ist das Verfahren der Richardson-Färbung protokollarisch aufgetragen:

1. mittels Spritze mit Filteraufsatz für 15 s auf 60 °C warmer Heizplatte (Bestellnummer 2541, Janke & Kunkel, Staufen im Breisgau) mit Richardson-Lösung inkubieren
2. mit Aqua dest. gründlich abspülen
3. auf Heizplatte bei 60 °C trocknen
4. eindecken mit Eukitt® und Deckglas

### Richardson-Lösung

Lösung A:

1 g Azur II (Bestellnummer C.I.52010/52015, Merck, Darmstadt) mit 100 ml Aqua dest. mischen.

Lösung B:

2 g Methylenblau (Bestellnummer C.I.52015, Merck, Darmstadt) mit 100 ml Aqua dest. mischen.

Lösung C:

2 g Dinatriumtetraborat-Decahydrat (Bestellnummer 1.06309.0025, Merck, Darmstadt) mit 100 ml Aqua dest. mischen.

Für 40 ml Richardson-Lösung 20 ml Lösung A mit 10 ml Lösung B und 10 ml Lösung C mischen, anschließend filtrieren.

## 2.10 Elektronenmikroskopische Untersuchungen

Für ultrastrukturelle Darstellungen wurden Ultradünnschnitte mit Uranylacetat und Bleicitrat kontrastiert und anschließend unter dem Transmissionselektronenmikroskop (EM 10, Zeiss, Jena) ausgewertet.

### Protokoll zum Kontrastieren der Ultradünnschnitte

Die Ultradünnschnitte wurden gemäß folgendem Protokoll kontrastiert:

1. feuchte Kammer (Petrischale mit angefeuchtetem Filterpapier) mit Parafilm (Bestellnummer PM-996, Bemis, Neenah, Wisconsin, USA) auslegen
2. für jedes Grid einen Tropfen Uranylacetat auf Parafilm platzieren
3. Grid mit der Oberfläche nach unten auf das Uranylacetat legen, 10 min inkubieren
4. mit Pinzette greifen, mit 300 ml Aqua dest. waschen; Wasserstrahl nicht direkt auf Gewebeschnitt richten, sondern über Pinzette abfließen lassen
5. trockentupfen
6. für jedes Grid einen Tropfen Bleicitrat auf Parafilm platzieren
7. Grid mit der Oberfläche nach unten auf das Bleicitrat legen, 10 min inkubieren
8. mit Pinzette greifen, mit 300 ml Aqua dest. waschen; Wasserstrahl nicht direkt auf Gewebeschnitt richten, sondern über Pinzette abfließen lassen
9. trockentupfen

Anschließend wurden die Grids in der Grid-Box aufbewahrt und konnten nach einer Trocknungsphase von 30 min transmissionselektronenmikroskopisch untersucht und ausgewertet werden.

### 1 % Uranylacetat

0,1 g Uranylacetat-Dihydrat (Bestellnummer 1.08473, Merck, Darmstadt) zu 10 ml Aqua dest. geben, 30 min auf einem wippenden Plattformschüttler (Duomax 1030, Bestellnummer 543-32205-00-3, Heidolph Instruments, Schwabach) lösen und anschließend filtrieren.

### **Bleicitrat**

1,33 g Blei(II)-nitrat (22862-1, Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA) in 30 ml Aqua dest. lösen, 1,76 g Trinatriumcitrat-Dihydrat (Bestellnummer 3580.3, Roth, Karlsruhe) hinzufügen und 1 min kräftig schütteln. Den Ansatz 30 min ruhen lassen bis zur Umwandlung in Bleicitrat, dabei gelegentlich schütteln. 8 ml 1 N Natronlauge zugeben, mit Aqua dest. auf 50 ml auffüllen und erneut schütteln, abschließend filtrieren.

## 2.11 Immunhistochemische Nachweisreaktionen

An paraffinierten Gewebeschnitten wurden immunhistochemische Nachweisreaktionen für Fibulin-3, -4 und -5 erbracht. Falsch positive Ergebnisse wurden dabei durch das Mitführen von Negativkontrollen ausgeschlossen.

### 2.11.1 Herkunft und Beschaffenheit der verwendeten Antikörper

Die verwendeten Antikörper sind eine freundliche Gabe von Prof. Rupert Timpl, Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried. Die Produktion der Kaninchen-Antiseren gegen Fibulin-3, -4 und -5 folgte einem Standardprotokoll. Alle untersuchten Antikörper waren affinitätsgereinigt (Timpl 1982). Sie zeigten keine Kreuzreaktivitäten mit anderen Fibulin-Isoformen (Giltay et al. 1999, Kadoya et al. 2005).

**Tabelle 6: Beschaffenheit und Herkunft der Antikörper**

Antikörper	Spezies	Klonalität	Wirtstier	Herkunft
Fibulin-3	Mensch, Maus	polyklonal	Kaninchen	Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried, Prof. Timpl
Fibulin-4	Mensch, Maus	polyklonal	Kaninchen	Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried, Prof. Timpl
Fibulin-5	Mensch, Maus	polyklonal	Kaninchen	Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried, Prof. Timpl

### 2.11.2 Protokoll zum immunhistochemischen Nachweis für Fibulin-3, -4 und -5

Bei den immunhistochemischen Nachweisreaktionen fand das nachstehende Protokoll Anwendung:

1. entparaffinieren und rehydrieren mit Färbeautomat:

Tabelle 7: Protokoll des Färbeautomaten zum Rehydrieren (immunhistochemischer Nachweis)

Schritt	Position	Küvetteninhalt	Verweildauer
1	1	Xylol	10 min
2	2	Xylol	10 min
3	3	99 % Ethanol	3 min
4	4	80 % Ethanol	3 min
5	5	60 % Ethanol	3 min
6	6	Aqua dest.	3 min

2. 10 min waschen mit 1-fach konzentriertem TBS-T
3. bis Präparatrand trockenwischen, 30 min blocken mit Universalblock (25 µl/Schnitt) bei RT in feuchter Kammer (Bestellnummer M920-2, Simport, Bernard-Pilon, Kanada)
4. 3x3 min waschen mit 1-fach konzentriertem TBS-T
5. 20 min demaskieren in Citratpuffer bei 95 °C in Wärmeschrank (UN 55, Bestellnummer 8419 8998, Memmert, Schwabach)
6. 25 min abkühlen lassen bei RT
7. 3x3 min waschen mit 1-fach konzentriertem TBS-T
8. 20 min blocken mit 3 % Wasserstoffperoxid-Methanol (abgedunkelte Küvette!)
9. 3x3 min waschen mit 1-fach konzentriertem TBS-T
10. bis Präparatrand trockenwischen, 2 min vorverdauen mit Protease XXIV (25 µl/Schnitt) bei RT in feuchter Kammer
11. 3x3 min waschen mit 1-fach konzentriertem TBS-T
12. bis Präparatrand trockenwischen, 10 min blocken in 1 % TBS/BSA (25 µl/Schnitt) bei RT in feuchter Kammer
13. bis Präparatrand trockenwischen, Antikörper in Antibody Diluent (Konzentration 1:100) (Bestellnummer 936B-03, Cell Marque, Rocklin, Kalifornien, USA) (25 µl/Schnitt) über Nacht bei RT in feuchter Kammer inkubieren

14. 3x5 min waschen mit 1-fach konzentriertem TBS-T
15. bis Präparatrand trockenwischen, 10 min inkubieren mit HiDef Detection™ Amplifier (Bestellnummer 954D-11, Cell Marque, Rocklin, Kalifornien, USA) (25 µl/Schnitt) bei RT in feuchter Kammer
16. 3x3 min waschen mit 1-fach konzentriertem TBS-T
17. bis Präparatrand trockenwischen, 10 min inkubieren mit HiDef Detection™ Horseradish Peroxidase Polymer Detector (Bestellnummer 954D-12, Cell Marque, Rocklin, Kalifornien, USA) (25 µl/Schnitt) bei RT in feuchter Kammer
18. 3x3 min waschen mit 1-fach konzentriertem TBS-T
19. bis Präparatrand trockenwischen, inkubieren mit 3,3'-Diaminobenzidin (DAB)-Lösung (25 µl/Schnitt) bei RT in abgedunkelter feuchter Kammer, Farbreaktion unter Lichtmikroskop beobachten, Inkubation abbrechen sobald Farbreaktion sichtbar
20. 10 min waschen mit 1-fach konzentriertem TBS-T
21. 2 min gegenfärben mit Hämalaun nach Mayer 1:4 verdünnt mit Aqua dest.
22. 10 min bläuen in fließendem Leitungswasser
23. dehydrieren mit Färbeautomat:

**Tabelle 8: Protokoll des Färbeautomaten zum Dehydrieren (immunhistochemischer Nachweis)**

Schritt	Position	Küvetteninhalt	Verweildauer
10	8	Aqua dest.	3 min
11	9	60 % Ethanol	3 min
12	10	80 % Ethanol	3 min
13	11	99 % Ethanol	3 min
14	12	Xylol	10 min

24. eindecken mit Eukitt® und Deckglas

### **1-fach konzentriertes TBS-T**

100 ml 10-fach konzentriertes TBS mit 900 ml Aqua dest. mischen, 500 µl Tween 20 (Bestellnummer P5927, Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA) zugeben.

### **10-fach konzentriertes TBS**

48,4 g 200 mM Tris (Bestellnummer 5429.3, Roth, Karlsruhe) mit 175,2 g 1,5 M Natriumchlorid (Bestellnummer 3957.1, Roth, Karlsruhe) auf 2000 ml Aqua dest. bei 50 °C lösen, pH 7,4 einstellen.

### **Citratpuffer**

Lösung A:

4,2 g Zitronensäuremonohydrat (Bestellnummer 100244.0500, Merck, Darmstadt) in 200 ml Aqua dest. lösen.

Lösung B:

29,4 g Trinatriumcitrat (Bestellnummer 3580.3, Roth, Karlsruhe) in 1000 ml Aqua dest. lösen.

Für 1000 ml Citratpuffer 18 ml von Lösung A und 82 ml von Lösung B mischen und mit Aqua dest. auffüllen, pH auf 6 einstellen.

### **3 % Wasserstoffperoxid-Methanol**

7 ml 30 % Wasserstoffperoxid (Bestellnummer CP26.5, Roth, Karlsruhe) mit 63 ml Methanol (Bestellnummer 4627.2, Roth, Karlsruhe) in lichtgeschützter Küvette mischen.

### **Protease XXIV**

45 ml Aqua dest. mit 5 ml 0,05 M Tris-Hydrogenchlorid (pH 7,6), 25 mg Protease XXIV (Bestellnummer P8038, Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA) und 25 mg Kalziumchlorid mischen.



### **Tris-Hydrogenchlorid**

6 g Tris in 250 ml Aqua dest. und 36 ml 1 N Hydrogenchlorid (Bestellnummer A0658,1000, AppliChem, Darmstadt) lösen, auf 1000 ml mit Aqua dest. auffüllen.

### **1 % TBS/BSA**

1 g BSA (Bestellnummer A9647-50G, Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA) mit 100 ml 1-fach konzentriertem TBS mischen.

### **DAB-Lösung**

1 Tropfen DAB-Chromogen (Bestellnummer 957D-11, Cell Marque, Rocklin, Kalifornien, USA) mit 1 ml DAB-Pufferlösung (Bestellnummer 957D-12, Cell Marque, Rocklin, Kalifornien, USA) in lichtgeschütztem Umfeld mischen.

### 3 Ergebnisse

Im Folgenden werden die Ergebnisse der licht- und elektronenmikroskopischen Strukturuntersuchungen sowie der immunhistochemischen Nachweisreaktionen dargestellt.

Für die lichtmikroskopischen strukturellen Untersuchungen wurden Hämalaun-Eosin-, Elastica-van-Gieson- und Richardson-Färbungen an Schnittpräparaten zahntragender Kiefersegmente von Wildtyp- und DDR1-Knockout-Mäusen durchgeführt. Die elektronenmikroskopische Auswertung erfolgte an mittels Uranylacetat und Bleicitrat kontrastierten Ultradünnschnitten von PDL-Ausschnitten beider Versuchstiergruppen.

Die immunhistochemischen Nachweisreaktionen für Fibulin-3, Fibulin-4 und Fibulin-5 wurden an Schnittpräparaten zahntragender Kiefersegmente von jeweils fünf Wildtyp- und DDR1-Knockout-Mäusen ausgewertet.

#### 3.1 Licht- und elektronenmikroskopische Strukturuntersuchungen

Die Hämalaun-Eosin-Färbungen zeigten in Übersichtsdarstellungen (Abbildung 2 A und C) sowohl bei den untersuchten Wildtyp-Mäusen als auch bei den DDR1-Knockout-Mäusen einen regulären und intakten Aufbau der Zähne und des Zahnhalteapparats mit histologisch entzündungsfreien Verhältnissen. Die zentral liegende Pulpa enthielt eine Vielzahl heterogen geformter Zellkerne und war umgeben von einer homogenen Dentinschicht, der sich im Bereich der Zahnwurzel eine Zementschicht anschloss. Eingebettet in eine homogene EZM befanden sich vereinzelte, in Lakunen liegende Zementozyten mit rundlichen Zellkernen. Variable Breiten der Zementschicht beruhten auf leicht differierenden Schnittebenen. In keiner der genannten Zahnkomponenten waren histologische Unterschiede zwischen Wildtyp- und DDR1-Knockout-Mäusen erkennbar. Im natürlichen Zustand ist der koronalen Dentinschicht der Zahnschmelz aufgelagert. Aufgrund des Entkalkungsprozesses der verwendeten Versuchsproben war dieser in den dargestellten Abbildungen nicht vorhanden.

Das PDL, das sich kontinuierlich von Zement zu Alveolarknochen erstreckte, wies lichtmikroskopisch keine Unterschiede zwischen Wildtyp- und DDR1-Knockout-Mäusen auf: Die Breite des Desmodontalspalts (scheinbare Abweichungen waren unterschiedlichen

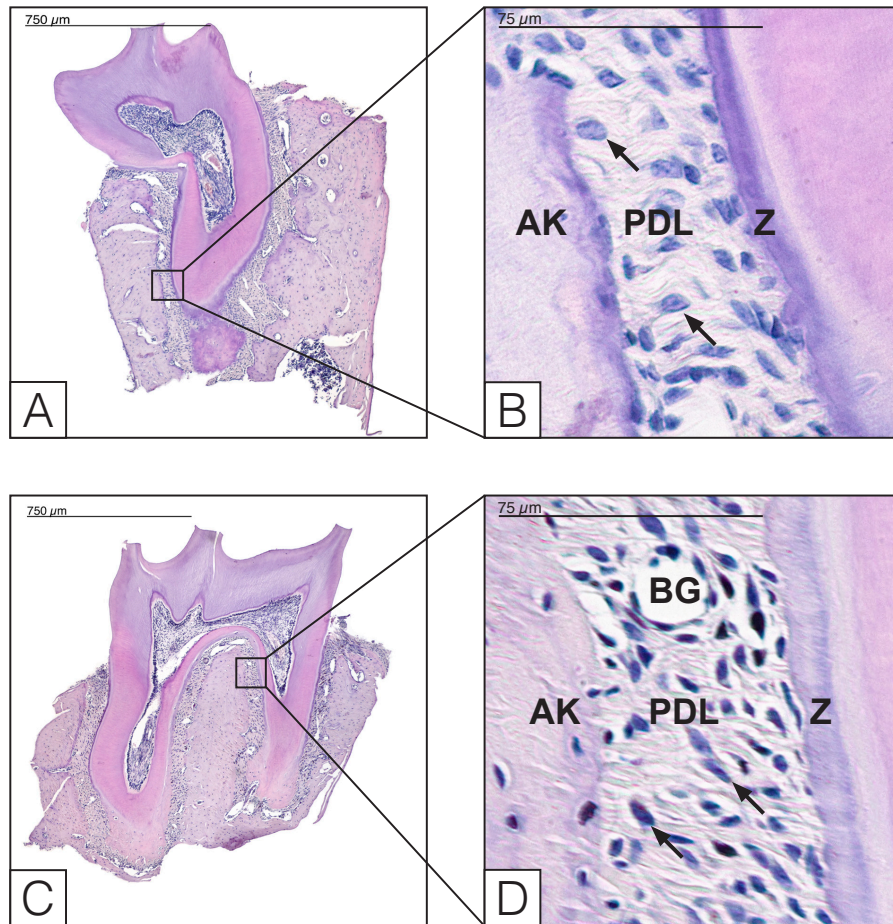
Schnittebenen geschuldet) sowie der Vaskularisationsgrad waren vergleichbar. In Detailaufnahmen (Abbildung 2 B und D) zeigten sich sowohl in Wildtyp- als auch in DDR1-Knockout-Mäusen geordnete, wellig verlaufende Fasern, die das PDL quer durchspannten und beiderseits in Hartgewebe inserierten: Zahnnahe traten die Fasern in das Zement ein, zahnfern in den Alveolarknochen. Zwischen den faserigen Anteilen des PDL lagen zahlreiche Fibroblasten mit langgestreckten, abgeflachten Zellkernen. Bezüglich der Zelldichte der Fibroblasten war kein Unterschied zwischen Wildtyp- und DDR1-Knockout-Mäusen feststellbar, die höhere Zelldichte in der DDR1-Knockout-Maus in Abbildung 2 D war zufällig und bestätigte sich bei Betrachtung aller Schnittpräparate nicht. Auch die abgeplatteten Endothelzellkerne der Blutgefäße im PDL ließen keine Abweichungen hinsichtlich ihrer Histologie zwischen den beiden Versuchstiergruppen erkennen.

Im Bereich des Alveolar- und Kieferknochens waren in Lakunen liegende Osteozyten mit rundlichen Zellkernen von einer homogenen knöchernen EZM konzentrisch umgeben. Es bestanden keine Unterschiede zwischen den untersuchten Wildtyp- und DDR1-Knockout-Mäusen. Die Endothelzellkerne der knöchernen Blutgefäße waren flach geformt, auch das Ausmaß der Vaskularisation des Alveolar- und Kieferknochens beider Versuchsgruppen war vergleichbar.

Bei lichtmikroskopischer Betrachtung der durchgeführten Elastica-van-Gieson-Färbungen (Abbildung 3) zeigte sich weder im PDL der Wildtyp- noch der DDR1-Knockout-Mäuse die für reife elastische Fasern charakteristische dunkelviolette Färbung.

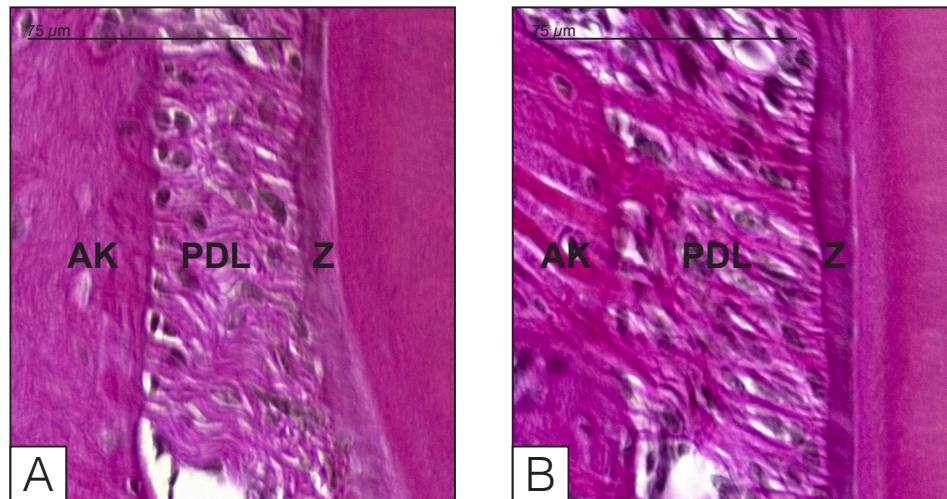
Die Richardson-Färbungen der Semidünnschnitte des PDL (Abbildung 4 A und C) erlaubten eine genauere Charakterisierung der Zellform der Fibroblasten. Ihre Zellkörper stellten sich langgestreckt und abgeflacht dar. Es zeigte sich eine Orientierung der Fibroblasten gemäß dem Verlauf der kollagenen Fasern. Unterschiede zwischen Wildtyp- und DDR1-Knockout-Mäusen waren nicht festzustellen.

Bei elektronenmikroskopischer Betrachtung des PDL (Abbildung 4 B und D) wurden dicht gebündelt liegende Kollagenfibrillen mit ihrer charakteristischen Querstreifung erkennbar. Sie verliefen geordnet und parallel zueinander. Die dazwischenliegenden Fibroblasten wiesen eine zur Faserverlaufsrichtung parallele Anordnung auf. Es waren keine Unterschiede zwischen beiden Versuchstiergruppen detektierbar.



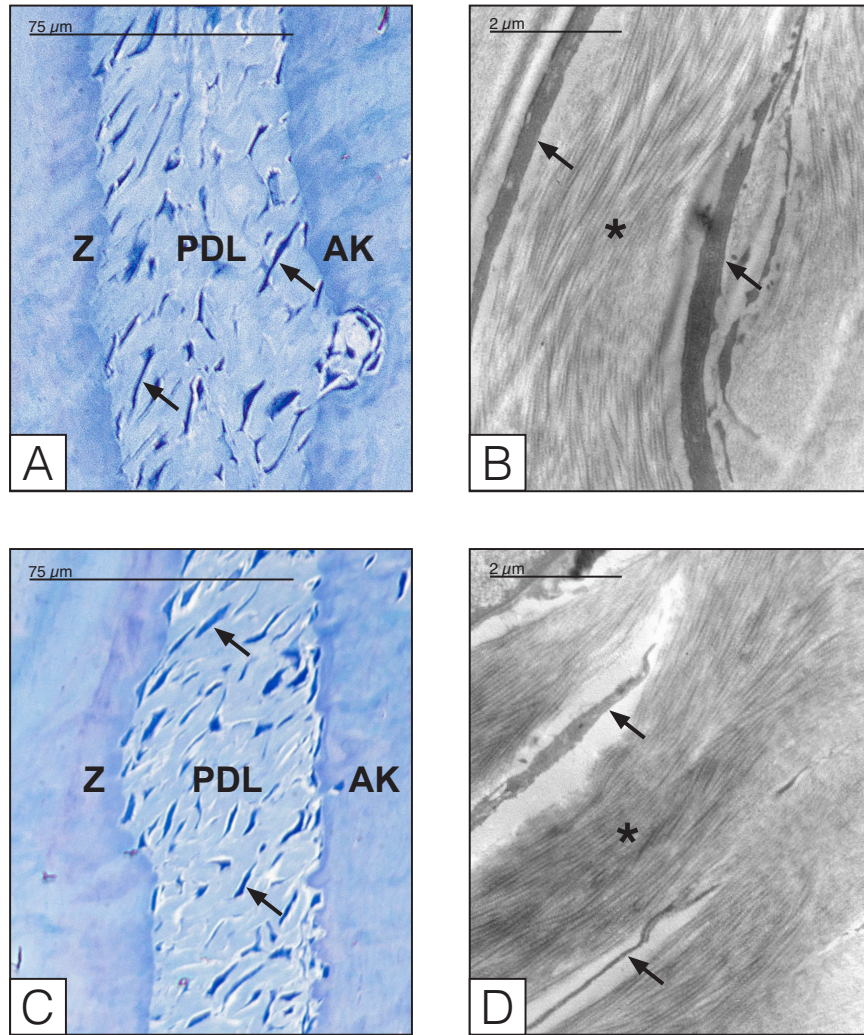
**Abbildung 2: Hämalaun-Eosin-Färbung.**

A, Kiefersegment einer Wildtyp-Maus mit einwurzeligem Molar. Verbindung zwischen Zahn und Knochen durch Zahnhalteapparat; reguläre Ausbildung von Pulpa, Dentin, Zement, PDL und Knochen. B, Strukturen des Zahnhalteapparats. Wellig verlaufende kollagene Fasern durchspannen PDL, Insertion der Fasern in Alveolarknochen (AK) und Zement (Z). Fibroblasten (Pfeile) liegen zwischen Fasern. C, Kiefersegment einer DDR1-Knockout-Maus mit zweiwurzeligem Molar. Zahn über Zahnhalteapparat mit Knochen verbunden; Pulpa, Dentin, Zement, PDL und Knochen regulär ausgebildet, keine Unterschiede zur Wildtyp-Maus. D, Strukturen des Zahnhalteapparats. PDL von wellig verlaufenden kollagenen Fasern durchspannt, Insertion in Alveolarknochen (AK) und Zement (Z). Fibroblasten (Pfeile) liegen zwischen Fasern, keine Unterschiede zur Wildtyp-Maus. BG=Blutgefäß.



**Abbildung 3: Elastica-van-Gieson-Färbung.**

A, PDL-Ausschnitt im zahntragenden Kiefersegment einer Wildtyp-Maus. Keine elastischen Fasern im PDL nachweisbar. AK=Alveolarknochen, Z=Zement. B, PDL-Ausschnitt im zahntragenden Kiefersegment einer DDR1-Knockout-Maus. Keine elastischen Fasern im PDL lokalisierbar, keine Unterschiede zur Wildtyp-Maus. AK=Alveolarknochen, Z=Zement.



**Abbildung 4: Richardson-Färbung und elektronenmikroskopische Aufnahmen.**

A, PDL-Ausschnitt im Kiefersegment einer Wildtyp-Maus, Richardson-Färbung. Zellkörper der Fibroblasten (Pfeile) langgestreckt. Z=Zement, AK=Alveolarknochen. B, Kollagener Faserapparat im PDL einer Wildtyp-Maus, elektronenmikroskopische Aufnahme. Gebündelte Kollagenfibrillen mit geordnetem Verlauf (\*), Fibroblasten (Pfeile) verlaufen parallel dazu. C, PDL-Ausschnitt im Kiefersegment einer DDR1-Knockout-Maus, Richardson-Färbung. Langgestreckte Fibroblasten (Pfeile), keine Unterschiede zur Wildtyp-Maus. Z=Zement, AK=Alveolarknochen. D, Kollagener Faserapparat im PDL einer DDR1-Knockout-Maus, elektronenmikroskopische Aufnahme. Kollagenfibrillen dicht gepackt und gleichmäßig angeordnet (\*), Fibroblasten (Pfeile) verlaufen parallel zur Faserrichtung, keine Unterschiede zur Wildtyp-Maus.

### 3.2 Immunhistochemischer Nachweis für Fibulin-3, -4 und -5

Zur Erstellung der folgenden Tabellen wurden die spezifischen Reaktionen der drei verwendeten Antikörper in verschiedenen Geweben des Zahns und des Zahnhalteapparats erfasst. Die erste Tabelle bezieht sich auf die Auswertung der Reaktionen in den untersuchten Wildtyp-Mäusen, die zweite Tabelle beinhaltet die Reaktionsergebnisse der DDR1-Knockout-Mäuse. Es wurden fünf verschiedene Mäuse je Versuchsgruppe ausgewertet. Bei der Anfertigung der Tabellen wurden die Ergebnisse aller Reaktionen einbezogen und das mehrheitlich festgestellte Reaktionsverhalten des Antikörpers im jeweiligen Gewebe aufgetragen. Die Abbildungen 5 bis 10 sind hingegen exemplarische Darstellungen der durchgeführten Reaktionen und repräsentieren daher nicht ausnahmslos das tabellarisch aufgetragene Reaktionsergebnis.

Tabelle 9: Auswertung der immunhistochemischen Nachweisreaktionen in Wildtyp-Mäusen

Gewebe		Fibulin-3	Fibulin-4	Fibulin-5
Pulpa		+	+	+
Dentin	Kronendentin	+	+	+
	Wurzeldentin	-	-	-
Zement	EZM	-	+	-
	Zementozytenlakunen	+	+	+
PDL	EZM	+	+	+
	Gefäßwände	+	+	+
Alveolar- und Kieferknochen	EZM	-	-	-
	Osteozytenlakunen	+	+	+
	Gefäßwände	+	+	+

+ = positives Reaktionsergebnis; - = negatives Reaktionsergebnis.

Tabelle 10: Auswertung der immunhistochemischen Nachweisreaktionen in DDR1-Knockout-Mäusen

Gewebe		Fibulin-3	Fibulin-4	Fibulin-5
Pulpa		+	+	+
Dentin	Kronendentin	-	+	+
	Wurzeldentin	-	-	-
Zement	EZM	-	-	-
	Zementozytenlakunen	+	+	+
PDL	EZM	+	+	+
	Gefäßwände	+	+	+
Alveolar- und Kieferknochen	EZM	-	-	-
	Osteozytenlakunen	+	+	+
	Gefäßwände	+	+	+

+ = positives Reaktionsergebnis; - = negatives Reaktionsergebnis.



### 3.2.1 Fibulin-3 in Wildtyp-Mäusen

In Wildtyp-Mäusen zeigte der Antikörper gegen Fibulin-3 eine positive immunhistochemische Reaktion in der Pulpa, die in der gesamten EZM gleichmäßig ausgeprägt war.

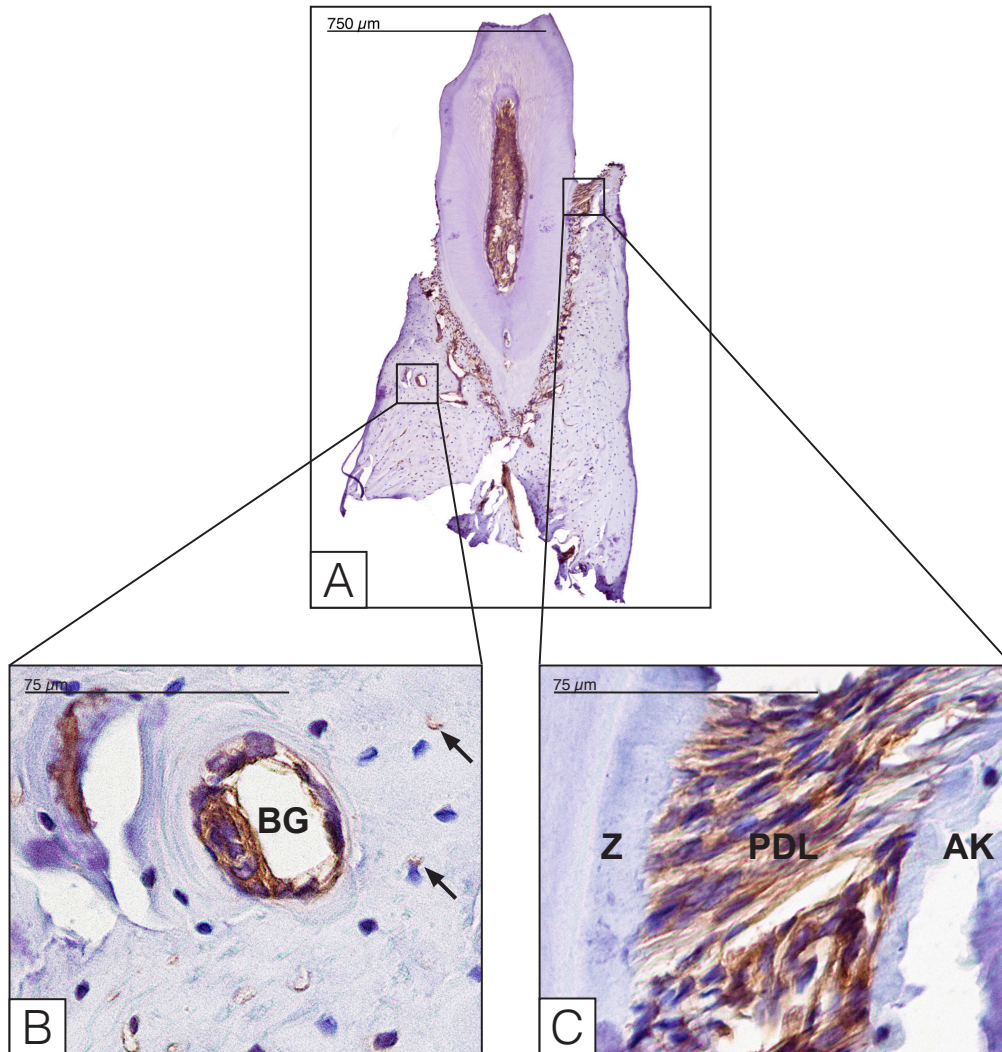
Im Dentin war Fibulin-3 nachweisbar. Es war auffällig, dass sich positive Reaktionen auf das Kronendentin beschränkten, das Wurzeldentin zeigte nie eine positive Reaktion.

Die EZM im Zement zeigte keine positive Reaktion für Fibulin-3. In der EZM innerhalb der Zementozytenlakunen lagen in perizellulären Bereichen neben positiven auch negative Reaktionen vor.

Im PDL konnte Fibulin-3 sowohl in der EZM als auch in den Gefäßwänden lokalisiert werden. Die positive Reaktion war dabei nicht auf bestimmte Bereiche des PDL begrenzt, sondern stellte sich in koronalen, mittleren, apikalen und interradiären Regionen homogen dar.

Im Alveolar- und Kieferknochen zeigte die EZM ein negatives Reaktionsergebnis für Fibulin-3. In perizellulären EZM-Bereichen in Osteozytenlakunen konnten positive Reaktionen festgestellt werden. Es waren allerdings auch Osteozytenlakunen mit negativem Reaktionsergebnis detektierbar. In den Gefäßwänden im Alveolar- und Kieferknochen war die immunhistochemische Nachweisreaktion durchweg positiv.

Abbildung 5 zeigt ein immunhistochemisches Reaktionsergebnis für Fibulin-3 im Kiefersegment einer Wildtyp-Maus.



**Abbildung 5: Immunhistochemischer Nachweis für Fibulin-3 in einer Wildtyp-Maus.**

A, Kiefersegment einer Wildtyp-Maus mit einwurzeligem Molar. Positive Reaktion in Pulpa, PDL und Gefäßwänden; schwach positive Reaktion im Kronendentin. B, Knochenausschnitt. Positive Reaktion in Wand eines Blutgefäßes (BG) und schwach positive Reaktion in einigen Osteozytenlakunen (Pfeile). C, PDL-Ausschnitt. Positive Reaktion in EZM des PDL. Z=Zement, AK=Alveolarknochen.

### 3.2.2 Fibulin-4 in Wildtyp-Mäusen

Fibulin-4 konnte in Wildtyp-Mäusen immunhistochemisch in der Pulpa lokalisiert werden. Die positive Reaktion war in allen Bereichen der pulpalen EZM homogen ausgeprägt.

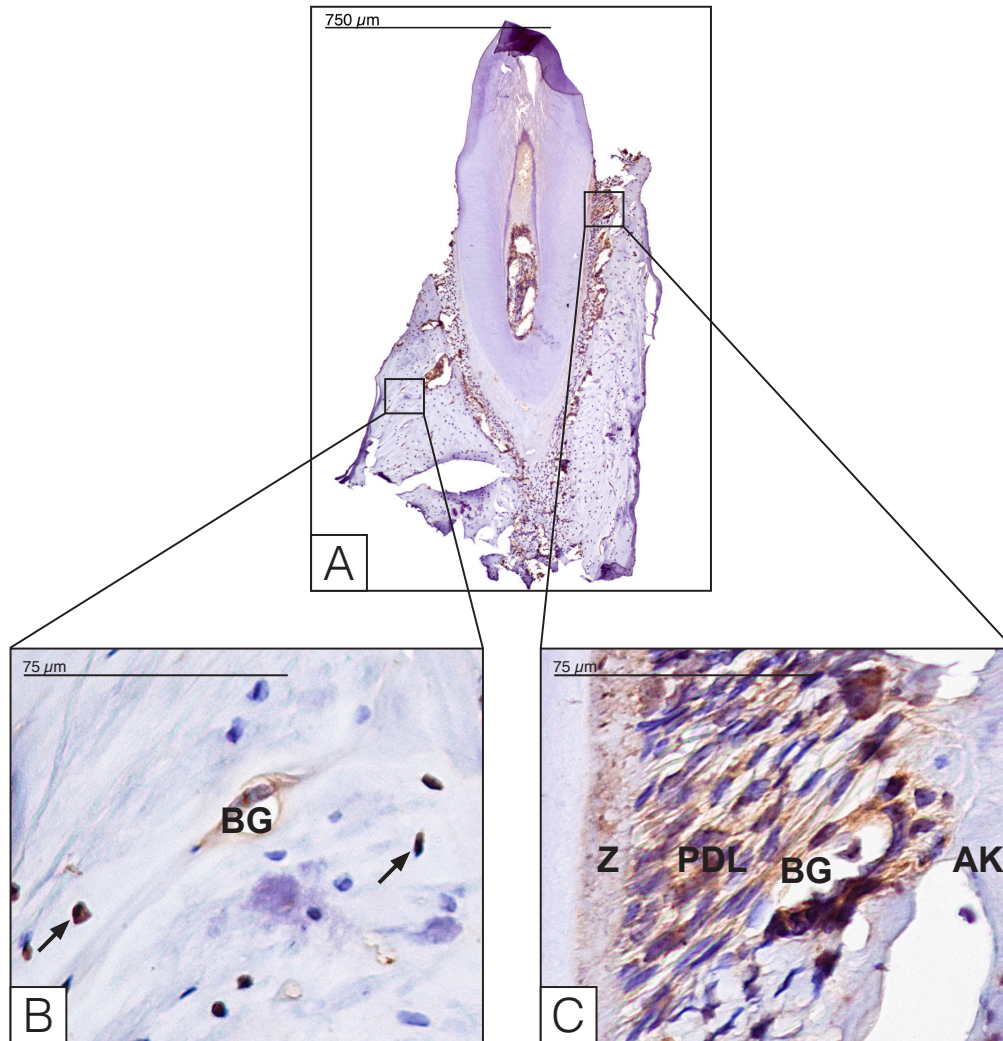
Im Dentin lag eine positive Reaktion im Kronendentin vor; das Wurzelzement zeigte nie eine positive Reaktion für Fibulin-4.

Im Zement konnte Fibulin-4 in der EZM nachgewiesen werden. Hierbei zeigten insbesondere koronale Zementbereiche eine positive Reaktion, in weiter apikal gelegenen Regionen war das Reaktionsergebnis hingegen schwächer positiv. In der perizellulären EZM in Zementozytenlakunen war Fibulin-4 lokalisierbar, es waren jedoch auch Lakunen mit negativem Reaktionsergebnis detektierbar.

Ein positiver immunhistochemischer Nachweis für Fibulin-4 lag in der EZM und in den Gefäßwänden des PDL vor. Die EZM zeigte dabei überall eine gleichmäßig positive Reaktion für Fibulin-4, lokale Unterschiede konnten nicht festgestellt werden.

Im Alveolar- und Kieferknochen war in der EZM Fibulin-4 nicht lokalisierbar. In Knochenlakunen zeigte sich in perizellulären EZM-Bereichen eine positive Reaktion. Es lagen jedoch auch Osteozytenlakunen mit negativem Reaktionsergebnis vor. In den Wänden knöcherner Gefäße konnte Fibulin-4 immer detektiert werden.

Abbildung 6 zeigt ein immunhistochemisches Reaktionsergebnis für Fibulin-4 im Kiefersegment einer Wildtyp-Maus.



**Abbildung 6: Immunhistochemischer Nachweis für Fibulin-4 in einer Wildtyp-Maus.**

A, Kiefersegment mit einwurzeligem Molar. Positive Reaktion in Pulpa, Zement, PDL und Gefäßwänden, schwach positive Reaktion im Kronendentin. B, Knochenausschnitt. Positive Reaktion in Wand eines Blutgefäßes (BG) und in einigen Osteozytenlakunen (Pfeile). C, PDL-Ausschnitt. Positive Reaktion in EZM von PDL und Zement (Z) sowie in Wand eines Blutgefäßes (BG). AK=Alveolarknochen.

### 3.2.3 Fibulin-5 in Wildtyp-Mäusen

In der Pulpa von Wildtyp-Mäusen war Fibulin-5 durch immunhistochemischen Nachweis lokalisierbar, die Reaktion war in der gesamten pulpalen EZM gleichmäßig positiv.

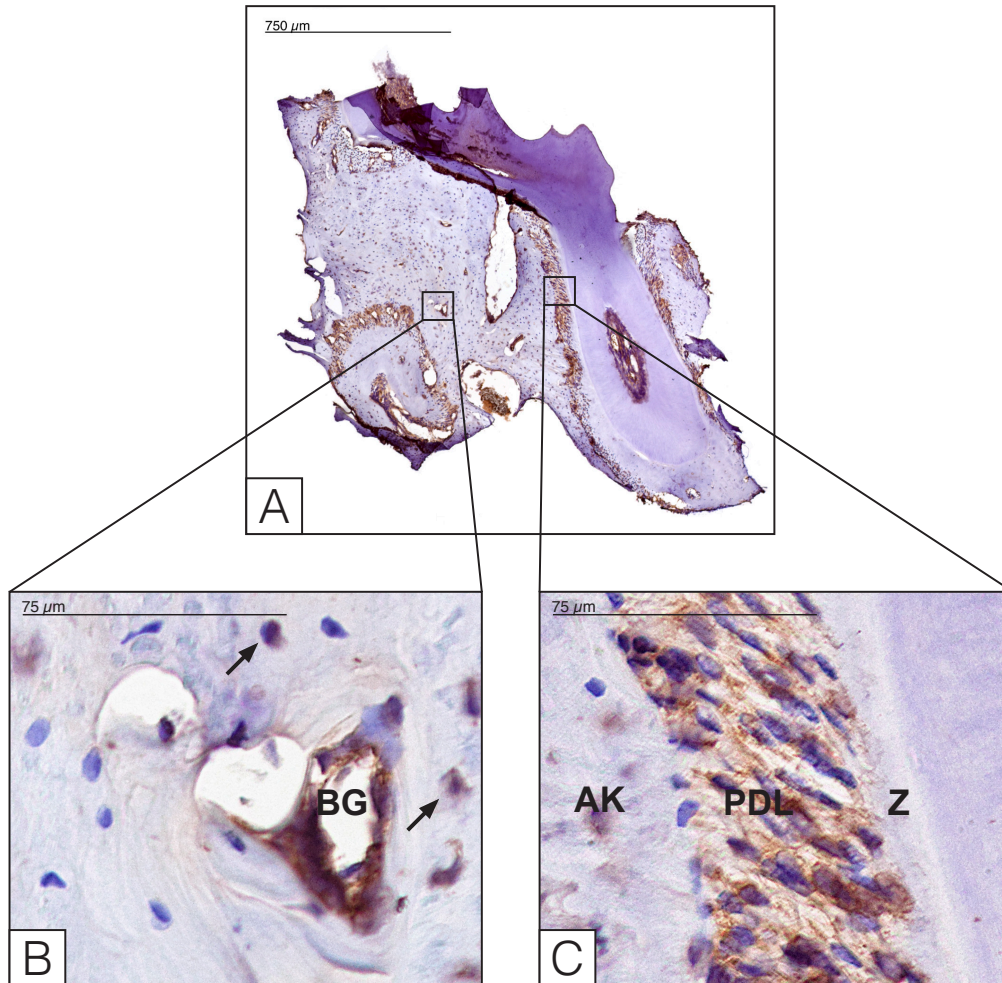
Im Kronendentin waren positive Reaktionsergebnisse feststellbar. Das Wurzelentin zeigte in keinem der untersuchten Schnittpräparate eine positive Reaktion für Fibulin-5.

In der EZM des Zements war die Reaktion für Fibulin-5 negativ. In der EZM in den Lakunen um die Zementozyten war ein positives Reaktionsverhalten detektierbar. Daneben lagen auch Zementozytenlakunen vor, die eine negative Reaktion zeigten.

Fibulin-5 konnte in der EZM und in den Gefäßwänden im PDL detektiert werden. Die positive Reaktion war dabei nicht auf bestimmte Bereiche des PDL begrenzt, sondern stellte sich in koronalen, mittleren, apikalen und interradiikulären Regionen des Zahnhalteapparats homogen dar.

Im Alveolar- und Kieferknochen lag in der EZM ein negatives Reaktionsergebnis für Fibulin-5 vor. In der lakunären EZM um die Osteozyten war die Nachweisreaktion häufig positiv, daneben waren auch negative Reaktionsergebnisse detektierbar. Fibulin-5 konnte in den Wänden der Blutgefäße des Alveolar- und Kieferknochens in allen untersuchten Schnittpräparaten lokalisiert werden.

Abbildung 7 zeigt ein immunhistochemisches Reaktionsergebnis für Fibulin-5 im Kiefersegment einer Wildtyp-Maus.



**Abbildung 7: Immunhistochemischer Nachweis für Fibulin-5 in einer Wildtyp-Maus.**

A, Kiefersegment mit zweiwurzeligem Molar. Positive Reaktion in Pulpa, PDL und Gefäßwänden. B, Knochenausschnitt. Positive Reaktion in Wand eines Blutgefäßes (BG) und in einigen Osteozytenlakunen (Pfeile). C, PDL-Ausschnitt. Positive Reaktion in EZM des PDL. AK=Alveolarknochen, Z=Zement.

### 3.2.4 Fibulin-3 in DDR1-Knockout-Mäusen

In der DDR1-Knockout-Maus konnte eine positive Reaktion für Fibulin-3 in der Pulpa gezeigt werden, die in allen EZM-Bereichen gleichmäßig ausgeprägt war.

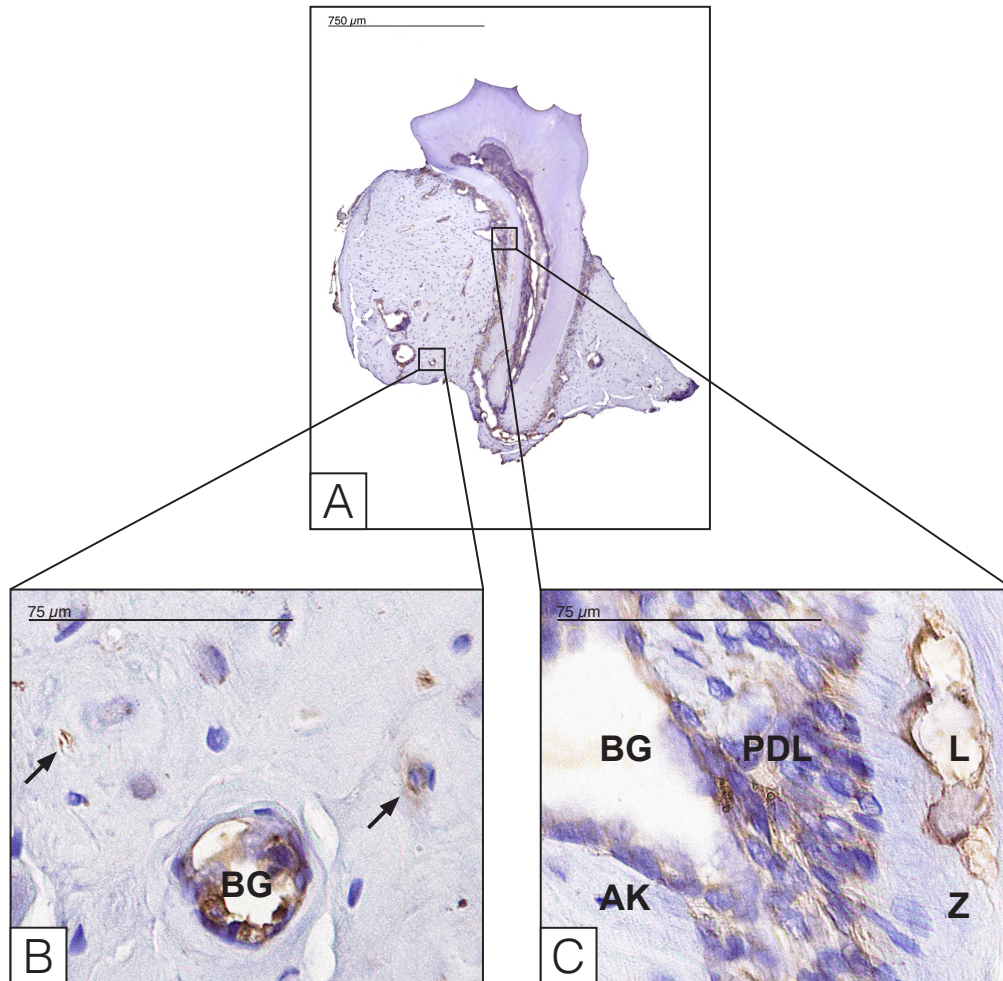
Im Kronen- und Wurzelkollagen waren die Reaktionsergebnisse durchweg negativ.

Fibulin-3 war in der EZM des Zements nicht lokalisierbar. Im Bereich der Lakunen um die Zementozyten zeigte die perizelluläre EZM positive Nachweisreaktionen für Fibulin-3, es waren dort jedoch auch negative Reaktionsergebnisse detektierbar.

Sowohl in der EZM als auch in den Gefäßwänden des PDL konnte Fibulin-3 nachgewiesen werden. Lokale Unterschiede in der Ausprägung der Reaktion waren zwischen koronalen, mittleren, apikalen und interradikulären PDL-Bereichen nicht feststellbar.

In der EZM von Alveolar- und Kieferknochen konnte Fibulin-3 nicht detektiert werden. Neben positiven Reaktionsergebnissen in perizellulären Bereichen der Osteozytenlakunen lagen dort auch negative Nachweisreaktionen vor. Eine positive Nachweisreaktion für Fibulin-3 war in den Wänden aller knöchernen Gefäße festzustellen.

Abbildung 8 zeigt ein immunhistochemisches Reaktionsergebnis für Fibulin-3 im Kiefersegment einer DDR1-Knockout-Maus.



**Abbildung 8: Immunhistochemischer Nachweis für Fibulin-3 in einer DDR1-Knockout-Maus.**

A, Kiefersegment mit einwurzeligem Molar. Positive Reaktion in Pulpa, PDL und Gefäßwänden. B, Knochenausschnitt. Positive Reaktion in Wand eines Blutgefäßes (BG) und schwach positive Reaktion in einigen Osteozytenlakunen (Pfeile). C, PDL-Ausschnitt. Positive Reaktion in EZM des PDL, in Wand eines Blutgefäßes (BG) und in Zementlakune (L). AK=Alveolarknochen, Z=Zement.



### 3.2.5 Fibulin-4 in DDR1-Knockout-Mäusen

In der Pulpa von DDR1-Knockout-Mäusen war Fibulin-4 nachweisbar, es zeigte sich eine homogene Reaktion in allen pulpalen EZM-Regionen.

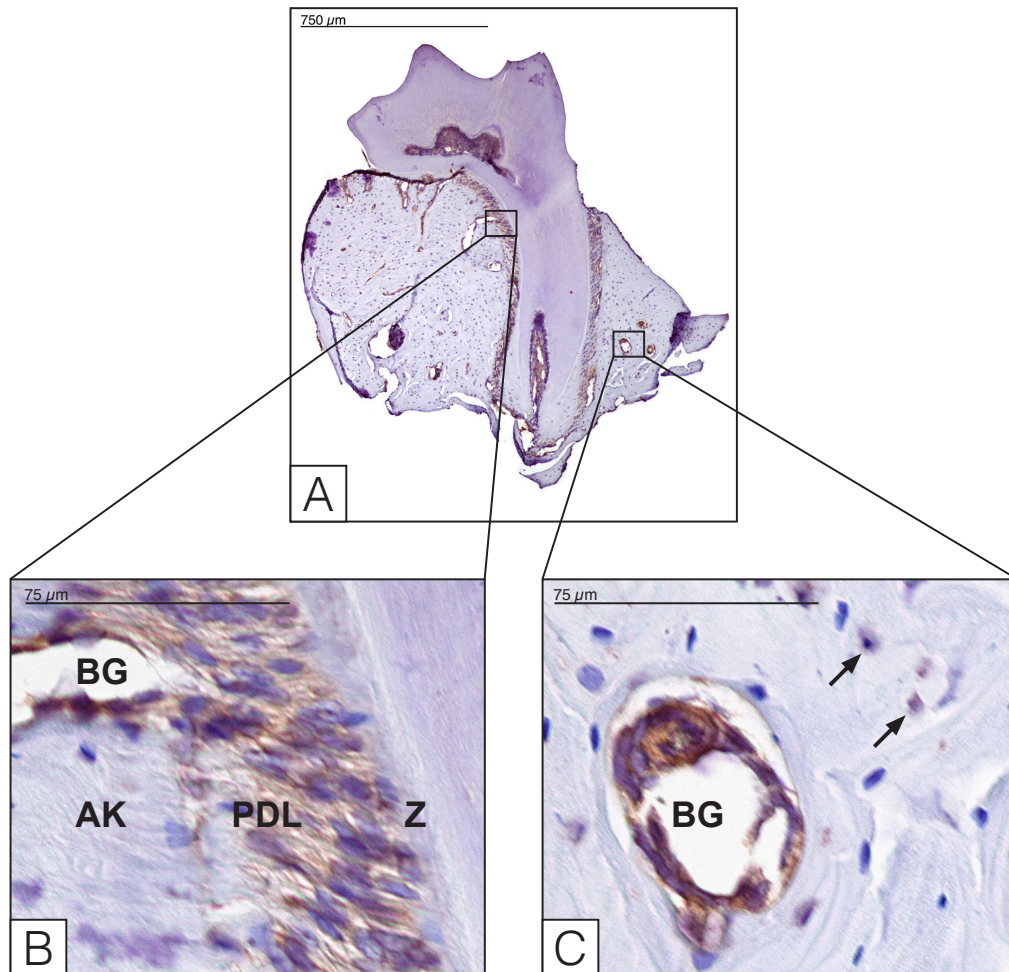
Im Kronendentin waren positive Reaktionen detektierbar. Im Wurzeldentin war Fibulin-4 nicht lokalisierbar.

In der EZM des Zements war die Reaktion für Fibulin-4 negativ. In den Lakunen um die Zementozyten war in perizellulären Bereichen eine positive Reaktion für Fibulin-4 feststellbar. Es lagen jedoch auch Zementozytenlakunen mit negativem Reaktionsergebnis vor.

Sowohl in der EZM als auch in den Gefäßwänden des PDL konnte Fibulin-4 immunhistochemisch nachgewiesen werden. Das positive Reaktionsergebnis stellte sich in allen Bereichen des PDL gleichmäßig dar und unterlag keinen lokalen Unterschieden.

Im Alveolar- und Kieferknochen zeigte sich eine negative Reaktion für Fibulin-4 in der EZM. In Osteozytenlakunen waren neben positiven auch negative Reaktionsergebnisse feststellbar. Fibulin-4 konnte in den Wänden knöcherner Gefäße stets lokalisiert werden.

Abbildung 9 zeigt ein immunhistochemisches Reaktionsergebnis für Fibulin-4 im Kiefersegment einer DDR1-Knockout-Maus.



**Abbildung 9: Immunhistochemischer Nachweis für Fibulin-4 in einer DDR1-Knockout-Maus.**

A, Kiefersegment einer DDR1-Knockout-Maus mit einwurzeligem Molar. Positive Reaktion in Pulpa, PDL und Gefäßwänden. B, PDL-Ausschnitt. Positive Reaktion in EZM des PDL und in Wand eines Blutgefäßes (BG). AK=Alveolarknochen, Z=Zement. C, Knochenausschnitt. Positive Reaktion in Wand eines Blutgefäßes (BG) und in einigen Osteozytenlakunen (Pfeile).

### 3.2.6 Fibulin-5 in DDR1-Knockout-Mäusen

In der DDR1-Knockout-Maus konnte ein positives Reaktionsergebnis für Fibulin-5 in der Pulpa gezeigt werden, das in allen EZM-Bereichen gleichmäßig ausgeprägt war.

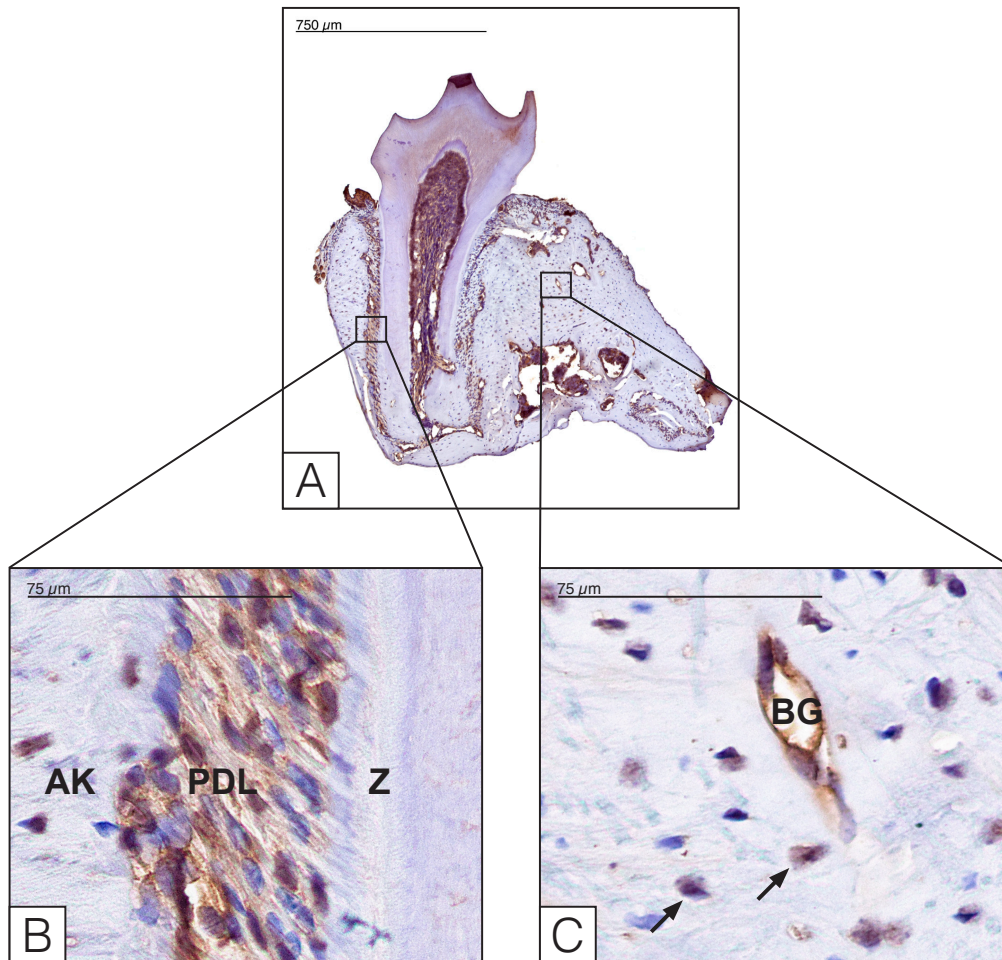
Positive Reaktionen im Dentin beschränkten sich auf das Kronendentin. Im Wurzel-dentin war Fibulin-5 nicht lokalisierbar.

Fibulin-5 war in der EZM des Zements nicht lokalisierbar. In den Lakunen der Zementozyten zeigte sich in perizellulären Bereichen ein positives Reaktionsergebnis für Fibulin-5. Es waren jedoch auch Zementozytenlakunen mit negativem Reaktionsergebnis detektierbar.

Sowohl in der EZM als auch in den Gefäßwänden des PDL konnte Fibulin-5 nachgewiesen werden. Die positive Reaktion war dabei nicht auf bestimmte Bereiche des PDL begrenzt, sondern stellte sich in koronalen, mittleren, apikalen und interradi-kulären Regionen des Zahnhalteapparats gleichmäßig dar.

Fibulin-5 konnte in der EZM von Alveolar- und Kieferknochen nicht nachgewiesen werden. In der EZM in den Lakunen um die Osteozyten zeigten sich neben positiven Reaktionsergebnissen für Fibulin-5 auch negative Reaktionen. Eine durchweg positive Reaktion für Fibulin-5 war in den Wänden knöcherner Gefäße feststellbar.

Abbildung 10 zeigt ein immunhistochemisches Reaktionsergebnis für Fibulin-5 im Kiefersegment einer DDR1-Knockout-Maus.



**Abbildung 10: Immunhistochemischer Nachweis für Fibulin-5 in einer DDR1-Knockout-Maus.**

A, Kiefersegment einer DDR1-Knockout-Maus mit einwurzeligem Molar. Positive Reaktion in Pulpa, Kronendentin, PDL und Gefäßwänden. B, PDL-Ausschnitt. Positive Reaktion in EZM des PDL. AK=Alveolarknochen, Z=Zement. C, Knochenausschnitt. Positive Reaktion in Wand eines Blutgefäßes (BG) und in einigen Osteozytenlakunen (Pfeile).

## 4 Diskussion

Die in dieser Arbeit vorgenommenen strukturellen und immunhistochemischen Untersuchungen wurden an dentalen und parodontalen Geweben von Wildtyp- und DDR1-Knockout-Mäusen durchgeführt. Obwohl eine vollständige Sequenzierung des Mausgenoms zeigen konnte, dass Maus und Mensch sich genetisch stärker voneinander unterscheiden als bislang angenommen (Church et al. 2009), wird das Mausmodell zur Erforschung humaner Phänotypen und Erkrankungen häufig herangezogen. Die Maus ist ein geeignetes Untersuchungsgut, um die genetischen und pathobiologischen Ursachen humaner Erkrankungen zu verstehen, da die Gene der Maus sowie ihre biochemischen Signalwege und ihre Organfunktionen mit denen des Menschen nahe verwandt sind und sich darüber hinaus hervorragende Möglichkeiten zur Genmanipulation bieten (Rossant und McKerlie 2001). Letzteres wurde sich auch in dieser Arbeit zunutze gemacht. Das Gen, welches die Expression von DDR1 codiert, wurde in einer der Versuchstiergruppen gezielt ausgeschaltet, was zur Bildung sogenannter DDR1-Knockout-Mäuse führte. In humanen Geweben wäre eine Untersuchung von DDR1-Knockout-Phänotypen nicht möglich gewesen.

Das Mausmodell wurde zur Untersuchung der Embryologie (de Vega et al. 2007), der Physiologie (Johnson und Pylypas 1992) und der Pathologie (Izawa et al. 2014) oraler Gewebe in der Literatur häufig gewählt, obwohl sich das murine Gebiss in einigen Aspekten deutlich vom humanen Gebiss unterscheidet: So weist das adulte murine Gebiss pro Quadrant lediglich einen Inzisivus und drei Molaren auf (Peterková et al. 1995). Der Inzisivus ist bogenförmig und besitzt ein kontinuierliches Wachstum, für das eine Stammzellnische am apikalen Ende des Zahns verantwortlich ist (Harada und Ohshima 2004). Außerdem ist nur die Labialfläche des Inzisivus mit Schmelz bedeckt, die Oralfläche hingegen mit Zement (Stern 1964, Warshawsky 1968). Da die deutlichsten Abweichungen zwischen humanem und murinem Gebiss im Bereich des Inzisivus liegen wurde dieser von den durchgeführten Untersuchungen ausgenommen. Es wurden somit nur Molaren und deren Zahnhalteapparate untersucht, wodurch sich die Vergleichbarkeit mit menschlichen oralen Geweben erhöhte.

#### 4.1 Licht- und elektronenmikroskopische Strukturuntersuchungen

Das Parodontium besteht aus den Bestandteilen Gingiva, Zement, PDL und Alveolarknochen (Bartold et al. 2000). Ein hochstrukturierter kollagener Faserapparat durchspannt das gesunde PDL und inseriert als sogenannte Sharpey'sche Fasern einerseits in das Zement und andererseits in den Alveolarknochen. Somit entsteht die Aufhängung des Zahns in seiner Alveole, aufgrund derer der Zahn den biomechanischen Belastungen beim Kauen, Sprechen und Schlucken standhält (Hassell 1993). Zwischen den faserigen Bestandteilen enthält das PDL Zellen, insbesondere Fibroblasten, die parallel zur Faserverlaufsrichtung orientiert und für die Produktion der sie umgebenden EZM verantwortlich sind (Bartold und Narayanan 2006, Beertsen 1975). Die Struktur der EZM wird vorwiegend durch Kollagene bestimmt, die durch eine Vielzahl von Kollagenrezeptoren Kontakt zu benachbarten Zellen aufnehmen (Gullberg und Lundgren-Akerlund 2002).

DDR1 ist einer dieser Rezeptoren, der in vielen Geweben exprimiert wird und durch die Bindung bestimmter Kollagene aktiviert wird (Vogel et al. 1997). Dass DDR1 auch auf der Oberfläche von Zellen adulter oraler Gewebe zu finden ist, erscheint somit wahrscheinlich, zumal eine Expression in embryonalen Zahnanlagen bekannt ist (Sanchez et al. 1994). Als Kollagene, die von DDR1 gebunden werden und zugleich den komplexen Faserapparat im PDL bilden, sind Kollagen I, III und V zu nennen (Becker et al. 1991, Butler et al. 1975, Vogel et al. 1997). Histologische Untersuchungen in dieser Arbeit gewährleisteten erstmals einen Einblick in die Strukturen des Zahns und des Zahnhalteapparats der DDR1-Knockout-Maus.

Interessanterweise waren weder auf licht- noch auf elektronenmikroskopischer Ebene Unterschiede zur Wildtyp-Maus bezüglich des Aufbaus von Zahn und Zahnhalteapparat feststellbar. Das PDL, das hier besonders eingehend betrachtet wurde, stellte sich strukturell und funktionell intakt und entzündungsfrei dar, elektronenmikroskopische Aufnahmen zeigten die für das Gewebe typischen parallel angeordneten und zu Fasern gebündelten Kollagenfibrillen, die regulär geformte Fibroblasten umschlossen. Das Fehlen von DDR1 hatte also histologisch keinerlei Konsequenzen für den Aufbau des PDL. In der Literatur ist vielfach beschrieben, dass DDR1 kollagenabhängige Zelladhäsionsvorgänge reguliert. So ist beispielsweise die durch

DDR1 gesteuerte Bindung von Melanozyten an Kollagen IV entscheidend für die Platzierung dieser Zellen auf der Basalmembran der Epidermis und die daraus resultierende intakte Hautstruktur (Fukunaga-Kalabis et al. 2006). Eine vergleichbare Bedeutung von DDR1 für die reguläre Organisation der PDL-Matrix kann durch die vorliegenden Ergebnisse jedoch nicht bestätigt werden. Die strukturelle Integrität des desmodontalen kollagenen Faserapparats ist vermutlich dadurch zu erklären, dass die genannten Kollagene neben DDR1 über eine Vielzahl anderer Bindungsproteine verfügen, die den Kontakt zu Zelloberflächen herstellen und somit für eine geordnete Faserstruktur ausreichend sind. Hier ist beispielsweise die Gruppe der Integrine anzuführen. Sie stellen eine Familie von Transmembranrezeptoren dar, die in viele biologische Prozesse involviert ist, insbesondere in die Zelladhäsion (Tamkun et al. 1986). Bisher sind  $18\alpha$ - und  $8\beta$ -Untereinheiten bekannt, die 24 Heterodimere ausbilden, von denen wiederum vier in der Lage sind, Kollagene zu binden. Namentlich handelt es sich hierbei um die Integrine  $\alpha1\beta1$ ,  $\alpha2\beta1$ ,  $\alpha10\beta1$  und  $\alpha11\beta1$  (Popova et al. 2007b). Die integrinvermittelte Zell-Matrix-Interaktion ist bei allen kernhaltigen Zellen vorhanden (Gullberg und Lundgren-Akerlund 2002). Kollagenbindende Integrine regulieren den Kollagen turnover (Lee et al. 1996) und sind an der Assemblierung und Reorganisation dreidimensionaler Kollagennetzwerke beteiligt (Lee et al. 1995, Velling et al. 2002). Popova et al. zeigten, dass ein Knockout von  $\alpha11\beta1$  in Mäusen ein unorganisiertes PDL im Bereich des Inzisivus zur Folge hat; interessanterweise bleibt hierbei das PDL der Molaren intakt (Popova et al. 2007a). Diese Ergebnisse geben einen Hinweis darauf, dass  $\alpha11\beta1$  für die Interaktion von PDL-Fibroblasten mit Kollagenen im Inzisivus von großer Bedeutung ist, während im Molarenbereich offenbar andere kollagenbindende Rezeptoren entscheidend für die EZM-Organisation sind. Die in dieser Arbeit dargelegten Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass auch DDR1 auf Zelloberflächen im PDL von Molaren nicht essenziell für die Integrität des kollagenen Faserapparats ist und die Abwesenheit von DDR1 diesbezüglich durch andere kollagenbindende Rezeptoren hinreichend kompensiert wird. Welche Rezeptoren hier von Relevanz sind, gilt es in weiterführenden Untersuchungen herauszufinden.

Schminke et al. (2014) zeigten, dass die DDR1-Knockout-Maus eine Osteoarthritis - also eine entzündlich-degenerative Erkrankung - im Kiefergelenk entwickelt. Phäno-

typisch äußert sich diese unter anderem in einem degenerierten kollagenen Faserapparat im Bereich des Kieferknorpels. Zurückgeführt wird dieses pathologische Bild darauf, dass bei Fehlen von DDR1 auf der Oberfläche von Chondrozyten eine kompensatorische Überexpression von DDR2 stattfindet. Diese wiederum resultiert in einem Anstieg der Expression der Matrix-Metallo-Proteinase 13 (MMP13), einem Enzym aus der Gruppe der Kollagenasen, das für den Abbau von Kollagen II in osteoarthritischen Gelenken verantwortlich ist (Xu et al. 2005). Die Ausbildung der so entstandenen Osteoarthritis bleibt bei der DDR1-Knockout-Maus auf das Kiefergelenk beschränkt, andere Gelenke, wie das Kniegelenk, sind unverändert (Schminke et al. 2014). In der vorliegenden Arbeit wurde der Zahnhalteapparat der DDR1-Knockout-Maus untersucht. Das Äquivalent einer entzündlich-degenerativen Erkrankung in diesem Gewebe ist die Parodontitis, die ebenfalls mit Gewebeerstörung einhergeht (Page et al. 1997). Auch hier ist MMP13 in aktiven Bereichen der Erkrankung überexprimiert (Hernandez et al. 2006) und mit dem Abbau der fibrillären Kollagene I und III assoziiert (Reynolds und Meikle 1997). Allerdings liegt der Parodontitis ein von der Osteoarthritis grundsätzlich unterschiedlicher Pathomechanismus zugrunde. Der Anstieg von Kollagenasen im parodontal erkrankten Gewebe ist durch die Präsenz pathogener Bakterien begründet, die eine Kaskade von Immunreaktionen des Wirtsorganismus in Gang setzen. Bei fortgeschrittener Inflammation werden in das Gewebe eingewanderte Makrophagen aktiviert, was zur Ausschüttung von Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), Tumor-Nekrose-Faktor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), Prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) und MMPs führt. IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  regen wiederum die ortsständigen Fibroblasten an, PGE<sub>2</sub> und MMPs freizusetzen. Die durch diesen Mechanismus sezernierten MMPs führen zur Destruktion der kollagenhaltigen EZM (Page et al. 1997). Im Gegensatz zu dem von Schminke et al. (2014) eingeführten Osteoarthritismodell, das sich die chondrozytäre Überexpression von MMP13 und DDR2 in der DDR1-Knockout-Maus zunutze macht, ist ein solcher Zusammenhang für die Entstehung der Parodontitis nicht beschrieben. Dass das Fehlen von DDR1 auf der Zelloberfläche von Fibroblasten des PDL zu einer kompensatorischen Überexpression von DDR2 mit anschließendem Anstieg der MMP13-Ausschüttung führt, ist nicht bekannt und bedarf weiterführender Untersuchung. Die vorliegenden Ergebnisse zeigten jedoch keinerlei Anzeichen eines Entzündungsprozesses im Zahnhalteapparat der DDR1-Knockout-Maus. Dies deutet



darauf hin, dass kein Zusammenhang zwischen dem Fehlen von DDR1 im murinen Zahnhalteapparat und der Entstehung pathologischer Prozesse mit Destruktion kollagener Fasern besteht. Zwar kommt Wirts- und Umweltfaktoren bei der Pathogenese der Parodontitis eine wichtige Bedeutung zu, die Anwesenheit parodontopathogener Bakterien ist für die Entstehung der Krankheit dennoch essenziell (Page et al. 1997) und war im Fall der vorliegenden Arbeit nicht gegeben.

Wie das Ausbleiben eines Kollagendefekts im Kniegelenk der DDR1-Knockout-Maus nahelegt, spielt die Komposition der EZM eine entscheidende Rolle für diese strukturelle Veränderung. Die EZM des Knorpels im Kiefergelenk besitzt im Vergleich zum Knorpel größerer Gelenke einen höheren Kollagen I- (Benjamin und Ralphs 2004) sowie einen geringeren Kollagen II-Anteil (Wadhwa et al. 2005) und scheint daher für osteoarthritische Prozesse besonders anfällig zu sein. Da das PDL eine vom hyalinen Knorpel des Kiefergelenks deutlich abweichende EZM-Zusammensetzung besitzt ist das Fehlen eines Kollagendefekts in der DDR1-Knockout-Maus auch durch diese biochemischen Unterschiede zu erklären.

#### **4.2 Immunhistochemischer Nachweis für Fibulin-3, -4 und -5**

Erstmals wurde das Vorkommen von Fibulin-3, -4 und -5 in dentalen und parodontalen Geweben von Wildtyp-Mäusen gezeigt. Dies trägt zur detaillierten Analyse der biochemischen Zusammensetzung oraler Gewebe bei, die insbesondere für das Verständnis parodontaler Erkrankungen wichtig ist. Obwohl sich in den oben diskutierten strukturellen Untersuchungen keine Unterschiede zwischen Wildtyp- und DDR1-Knockout-Maus zeigten, wurden die immunhistochemischen Nachweisreaktionen auch in DDR1-Knockout-Mäusen durchgeführt. Ziel dieses Vorgehens war es anhand der nachgewiesenen Proteine exemplarisch zu untersuchen, ob sich die licht- und elektronenmikroskopisch gezeigte strukturelle Übereinstimmung der beiden Versuchstiergruppen auch auf biochemischer Ebene fortsetzte.

Die Fibuline-3, -4 und -5 gehören zu den Klasse II-Fibulinen, die bislang insbesondere mit der Bildung elastischer Fasern assoziiert werden. In Knockout-Versuchen wurde gezeigt, dass speziell Fibulin-4 und -5 für die Elastogenese von großer Bedeutung sind, denn das Fehlen der Proteine führt zu einem gestörten elastischen Faserappa-

rat (McLaughlin et al. 2006, Nakamura et al. 2002). Da sich im Rahmen der in der vorliegenden Arbeit durchgeführten immunhistochemischen Nachweisreaktionen in vielen der untersuchten Geweben das Vorhandensein der Fibuline-3, -4 und -5 bestätigte, stellte sich die Frage, ob diese Expression mit dem Vorkommen elastischer Fasern vergesellschaftet war. Deshalb wurden im Zuge der strukturellen Untersuchungen Elastica-van-Gieson-Färbungen durchgeführt, die das Vorhandensein reifer elastischer Fasern belegen sollten. Weder in der Wildtyp- noch in der DDR1-Knockout-Maus konnten diese jedoch in oralen Geweben gezeigt werden. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die untersuchten Klasse II-Fibuline auch mit EZM-Komponenten außerhalb reifer elastischer Fasern assoziiert sind.

Im Folgenden werden zunächst die Ergebnisse der Untersuchungen an Wildtyp-Mäusen diskutiert, anschließend wird auf Unterschiede im Expressionsverhalten der Fibuline-3, -4 und -5 in DDR1-Knockout-Mäusen eingegangen.

#### **4.2.1 Fibulin-3, -4 und -5 in oralen Geweben der Wildtyp-Maus**

In der Pulpa der Wildtyp-Maus waren Fibulin-3, -4 und -5 nachweisbar. Für Fibulin-1 und -2 wurde bereits ein Vorkommen im Rahmen der Epithel-Mesenchym-Interaktion bei der Zahnentwicklung beschrieben. Beide Proteine sind im dentalen Mesenchym, aus dem später die Pulpa hervorgeht, exprimiert (Zhang et al. 1996).

Bei der Expression der untersuchten Fibuline im Dentin war auffällig, dass diese stets auf das Kronendentin beschränkt war, das im natürlichen Gebisszustand von Schmelz umgeben ist. Im von Zement umgebenen Wurzelndentin war keine positive Reaktion für eines der Proteine feststellbar. Steinfort et al. (1989) zeigten, dass das Dentin im Inzisivus der Ratte lokale Unterschiede bezüglich seiner biochemischen Komposition aufweist. Dabei unterscheidet sich schmelzumgebenes Dentin von zementumgebenem Dentin insbesondere hinsichtlich seiner Phosphoprotein-Zusammensetzung. Das lokal abweichende Expressionsmuster der untersuchten Fibuline gibt einen Hinweis darauf, dass sich schmelzassoziiertes und zementassoziiertes Dentin auch in Molaren in ihrer biochemischen Zusammensetzung unterscheiden.

Für Fibulin-7, das ebenfalls zur Gruppe der Klasse II-Fibuline gehört und daher nahe strukturverwandt zu Fibulin-3, -4 und -5 ist, wird in einer Studie von de Vega et al. (2007) über eine Assoziation mit dentalen Geweben berichtet. Es lagert sich vor allem in der Prädentinmatrix und um die Dentintubuli an. Ihm wird deshalb eine Rolle bei der Differenzierung von Odontoblasten und bei der Dentinbildung zugeschrieben. Die in dieser Arbeit gezeigte Lokalisation in der Pulpa und dem Kronendentin adulter Mäuse wirft die Frage auf, ob auch Fibulin-3, -4 und -5 eine Rolle bei der Zahnentwicklung zukommt. Dazu sind weiterführende Untersuchungen an embryonalen Geweben erforderlich.

In den Zementlakunen, welche die Zementozyten beherbergen, waren alle drei Proteine perizellulär lokalisierbar. Neben positiven waren dort auch negative Reaktionsergebnisse detektierbar, die Ausdruck hochspezifischer immunhistochemischer Nachweisreaktionen in lakunären Bereichen des Zements sind. Das Vorkommen von Fibulin-3, -4 und -5 in perizellulären Bereichen ist ein Hinweis darauf, dass die drei Proteine von Zementozyten exprimiert werden. Auch andere Proteine sind speziell in der EZM der Zementlakunen nachweisbar, nicht jedoch in der angrenzenden Zementmatrix, so beispielsweise Versikan (Ababneh et al. 1999). Aufgrund ihrer Position am Übergang von Zelle zu mineralisierter Matrix besitzt die EZM der Lakunen offenbar eine besondere biochemische Zusammensetzung, die möglicherweise den Mineralisationsprozess der angrenzenden Matrix reguliert. Für Fibulin-1 wurde eine Interaktion mit Versikan bereits gezeigt (Aspberg et al. 1999). Wegen der positiven Ergebnisse der immunhistochemischen Nachweisreaktionen in diesem Bereich ist es denkbar, dass auch Fibulin-3, -4 und -5 Bindungsaffinitäten zu diesem Protein der perizellulären Zementmatrix aufweisen. Daneben ist eine Vielzahl weiterer Proteine als Bindungspartner in Betracht zu ziehen, beispielsweise Fibronectin, das in der EZM der Lakunen lokalisierbar ist (Steffensen et al. 1992) und sowohl mit Fibulin-1 und -2 (Balbona et al. 1992, Sasaki et al. 1995a) als auch mit Fibulin-7 (de Vega et al. 2007) interagiert. Auch in den Lakunen um die Osteozyten war der Nachweis für Fibulin-3, -4 und -5 positiv. Im Hinblick auf die vergleichbare Zusammensetzung von Zement und Knochen war das Expressionsmuster der untersuchten Fibuline erwartungsgemäß ähnlich. In perizellulären Bereichen von Osteozyten in Knochenlakunen ist eben-

so Fibronectin nachweisbar (Steffensen et al. 1992); somit kommt es als potenzieller Bindungspartner für die untersuchten Proteine auch dort in Frage. Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten auf eine strukturelle Bedeutung der Fibuline-3, -4 und -5 in der EZM der Lakunen hin, die außerhalb der Elastogenese zu suchen ist, da ein Vorkommen elastischer Fasern weder für Zement- noch für Knochenlakunen in der Literatur beschrieben ist. In den durchgeführten Elastica-van-Gieson-Färbungen konnten dort ebenfalls keine Fasern vom elastischen Typ detektiert werden. Möglicherweise sind die untersuchten Fibuline am Mineralisationsprozess der EZM von Zement beziehungsweise Knochen beteiligt.

Während für die untersuchten Fibuline in den meisten dentalen und parodontalen Geweben der Wildtyp-Maus ein vergleichbares Vorkommen festzustellen war, zeigte sich in der EZM des Zements ein deutlicher Unterschied: Einzig Fibulin-4 konnte dort nachgewiesen werden, weder Fibulin-3 noch -5 waren lokalisierbar. Dabei zeigte sich eine Lokalisation von Fibulin-4 insbesondere in koronalen Zementbereichen. In dieser Region herrscht azelluläres Fremdfasermaterial vor, das hauptsächlich aus dicht gepackten Kollagenfasern besteht (Bosshardt und Selvig 1997). Das Ergebnis der immunhistochemischen Untersuchung legt nahe, dass Fibulin-4 mit einer für diesen Zementtyp spezifischen Strukturkomponente interagiert, die vermutlich nicht-kollagen ist, denn eine Interaktion von Fibulinen mit Kollagenen konnte bisher nicht gezeigt werden. Bislang wurde für Fibulin-4 ein Bindungsverhalten zu Tropoelastin beschrieben (Kobayashi et al. 2007), das ein zentrales Molekül in der Elastogenese darstellt. Da elastische Fasern im Zement nicht beschrieben sind, muss Fibulin-4 auch zur Interaktion mit EZM-Bestandteilen außerhalb des Systems elastischer Fasern fähig sein. Hier kommt erneut Fibronectin in Frage, das nicht nur auf die oben diskutierten perizellulären EZM-Bereiche beschränkt, sondern in der gesamten Zementmatrix homogen verteilt ist (Komboli et al. 2009). Aufgrund des bereits beschriebenen Interaktionsverhaltens von Fibulin-1, -2 und -7, ist auch für Fibulin-4 eine Interaktion mit Fibronectin denkbar. Die Annahme einer spezifischen Affinität von Fibulin-4 zu Fibronectin, die für Fibulin-3 und -5 nicht gilt, steht allerdings in Konflikt zu der oben diskutierten Möglichkeit, dass Fibronectin in perizellulären EZM-Bereichen von Zement und Knochen als Bindungspartner für alle drei untersuchten Proteine in Betracht

kommt. Ein Erkenntnisgewinn bezüglich der Interaktionsfähigkeit von Fibulin-3, -4 und -5 mit Fibronektin ist vor diesem Hintergrund erstrebenswert.

Aus dem abweichenden Expressionsmuster der drei untersuchten Fibuline kann gefolgert werden, dass sich die Klasse II-Fibuline in ihrer biochemischen Struktur in einem Maße voneinander unterscheiden, das ein breiteres Reaktionsspektrum von Fibulin-4 mit EZM-Komponenten des Zements zur Folge hat. Bemerkenswert ist, dass Kobayashi et al. bereits durch die Durchführung von Bindungsassays ein breiteres Bindungsspektrum für Fibulin-4 als für Fibulin-3 und -5 beschrieben haben. So ist es als einziges der drei Proteine zur Interaktion mit Kollagen IV, Nidogen-2 und Endostatin fähig (Kobayashi et al. 2007). Die vorliegende Arbeit zeigt, dass Fibulin-4 auch in parodontalen Geweben der Wildtyp-Maus ein im Vergleich zu Fibulin-3 und -5 erweitertes Expressionsmuster aufweist.

Interessanterweise war Fibulin-4, genau wie Fibulin-3 und -5, in der EZM von Alveolar- und Kieferknochen ungeachtet der großen strukturellen Ähnlichkeit zur EZM des Zements nicht detektierbar. Somit ist anzunehmen, dass Zement- und Knochenmatrix Unterschiede in ihrer jeweiligen biochemischen Zusammensetzung besitzen, die Grundlage für das positive Reaktionsverhalten von Fibulin-4 im Zement wie auch für das negative Reaktionsverhalten im Knochen sind und näherer Ergründung bedürfen.

In der EZM des PDL waren Fibulin-3, -4 und -5 nachweisbar. Die Expression der Proteine war in allen Bereichen der PDL-Matrix homogen ausgeprägt und zeigte keine lokalen Unterschiede. Die dominanteste Komponente der EZM des PDL ist das dichte Netzwerk kollagener Fasern, das hauptsächlich aus den Kollagenen I und III besteht (Butler et al. 1975). Da für keines der bekannten Fibuline bisher eine direkte Interaktion mit diesen Kollagenen gezeigt werden konnte, ist es unwahrscheinlich, dass das Expressionsverhalten von Fibulin-3, -4 und -5 durch eine Assoziation mit kollagenen Bestandteilen des PDL begründet ist. Neben kollagenen Fasern sind im PDL Fasern des elastischen Systems vorzufinden. Diese werden zum einen durch Oxytalanfasern verkörpert (Fullmer und Lillie 1958). Dabei handelt es sich um rein mikrofibrilläre Strukturen (Berkovitz 1990), die im Gegensatz zu reifen elastischen Fasern und Elauninfasern kein Elastin enthalten (Carmichael und Fullmer 1966). Ne-

ben der Gewebemöostase werden sie mit der Gewährleistung von Gewebeelastizität in Verbindung gebracht (Sawada 2010). Zum anderen wurden im PDL der Maus auch Elauninfasern, also elastische Fasern mit einem geringen Elastinanteil, detektiert, die die Oxytalanfasern funktionell unterstützen (Johnson und Pylypas 1992). Das PDL unterscheidet sich also von den anderen in dieser Arbeit untersuchten Geweben, da es das einzige ist, welches Fasern des elastischen Systems enthält. Daher stellt es hinsichtlich des Vorkommens der Fibuline-3, -4 und -5 ein besonders interessantes Untersuchungsgewebe dar. Fibulin-4 und -5 wurden hinsichtlich ihrer Beteiligung bei der Bildung reifer elastischer Fasern eingehend untersucht. Die Hauptaufgaben der beiden Proteine werden im Zusammenhang mit der regulären Bildung von strukturell intaktem Elastin aus dessen Vorläuferprotein Tropoelastin gesehen (Choi et al. 2009, Choudhury et al. 2009, McLaughlin et al. 2006, Wachi et al. 2008). Aufgrund der gezeigten Expression kann eine Beteiligung von Fibulin-4 und -5 an der Ausbildung der Elastinkomponente der Elauninfasern im PDL angenommen werden.

In humanem PDL wurden bereits erste Untersuchungen über die Beziehung von Fibulin-5 zu Oxytalanfasern angestellt. So wurde gezeigt, dass die Induktion mechanischen Stresses durch Dehnung des Gewebes zu einer vermehrten Expression von Fibulin-5 führt. Ein Unterdrücken der Fibulin-5-Expression von Fibroblasten hat eine Reduktion der Oxytalanfasern zur Folge; außerdem sind sie irregulär orientiert (Nakashima et al. 2009). Daraus kann gefolgert werden, dass Fibulin-5 nicht nur eine wichtige Rolle bei der Bildung reifer elastischer Fasern zukommt, auch für die Entstehung quantitativ und strukturell regulär ausgebildeter Oxytalanfasern ist es bedeutungsvoll.

Für Fibulin-4 und -5 sind auch Interaktionen mit mikrofibrillären Bestandteilen der EZM beschrieben. Am Aufbau von Mikrofibrillen, welche die überwiegende Komponente der Oxytalanfasern im PDL bilden, sind Fibrillin-1 und -2 hauptsächlich beteiligt (Sawada 2010). Sowohl Fibulin-4 als auch Fibulin-5 zeigen eine hohe Bindungsaffinität gegenüber Fibrillin-1 (Choudhury et al. 2009). Diese bereits bekannte Interaktion stellt eine mögliche Erklärung für die positiven immunhistochemischen Nachweise für Fibulin-4 und -5 dar.

Das Expressionsverhalten im PDL war für alle drei untersuchten Fibuline sehr ähnlich. Es waren keine Unterschiede in der Lokalisation oder Intensität der Reaktionen erkennbar. Bemerkenswert ist dies, da Fibulin-3 in der Literatur eine untergeordnete Bedeutung für die Bildung von elastischen Fasern zugeschrieben wird, die demnach auch für die Bildung der im PDL ansässigen Oxytalan- und Elauninfasern anzunehmen ist. Daher liegt die Vermutung nahe, dass die Ergebnisse der immunhistochemischen Reaktionen nicht einzig auf eine Interaktion der Fibuline mit den genannten Hauptkomponenten des elastischen Fasersystems zurückzuführen sind. Wie in der EZM der Zementlakunen und des Zements ist auch im PDL Fibronectin vorhanden und weist dort ein homogenes Verteilungsmuster auf (Lukinmaa et al. 1991). Zum einen ist Fibronectin mit Kollagenfibrillen assoziiert (Bartold und Narayanan 2006), zum anderen besteht für das Protein auch eine Verknüpfung zu Mikrofibrillen. Schwartz et al. (1985) vermuten eine Ummantelung von EZM-Mikrofibrillen mit Fibronectin (Schwartz et al. 1985). Aufgrund der Interaktionsfähigkeit von Fibulin-1, -2 und -7 mit Fibronectin, kann vermutet werden, dass dies auch für Fibulin-3, -4 und -5 gilt. Eine Bindung an das im PDL ubiquitäre Fibronectin würde das homogene und vergleichbare Expressionsmuster erklären.

Zusammengefasst enthält das PDL diverse Strukturkomponenten, die als Bindungspartner für Fibulin-3, -4 und -5 potenziell in Frage kommen. Neben ubiquitären EZM-Proteinen, die auch in anderen oralen Geweben vorkommen, sind hier außerdem mikrofibrilläre Bestandteile und Elastin als Vertreter des elastischen Fasersystems in Betracht zu ziehen.

Auch in den Gefäßwänden des PDL und des Alveolar- und Kieferknochens waren Fibulin-3, -4 und -5 lokalisierbar. Endothelzellen konstituieren Gefäßwände und sitzen auf einer Basalmembran, die sie mit dem darunterliegenden Bindegewebe verknüpfen (Yousif et al. 2013). Die Hauptkomponenten von Basalmembranen sind Kollagen IV (Pöschl et al. 2004) und Laminine (Miner 2008), die Netzwerke ausbilden (Kruegel und Miosge 2010), welche durch Perlekan (Hopf et al. 1999) und Nidogene (Fox et al. 1991) stabilisiert werden. Neben diesen Proteinen existiert noch eine Vielzahl weiterer EZM-Komponenten, die am komplexen Aufbau von Basalmembranen beteiligt sind. Hier sind auch Fibulin-1 und -2 anzuführen. Für Fibulin-1 ist eine Interaktion mit

Laminin-1 beschrieben (Sasaki et al. 1995b), für Fibulin-2 hingegen mit Perlekan (Hopf et al. 2001). Beide Fibuline können Bindungen mit Nidogenen eingehen (Sasaki et al. 1995a, Sasaki et al. 1995b). Fibulin-7, das mit Fibulin-3, -4 und -5 nah strukturverwandt ist, interagiert mit Endothelzellen (de Vega et al. 2014). Fibulin-4 kann Bindungen mit Kollagen IV und Nidogen-2 eingehen (Kobayashi et al. 2007). Gefäßwände im PDL sind darüber hinaus von einem Netzwerk aus Oxytalanfasern umgeben, das die positive Reaktion für die untersuchten Fibuline aus den oben diskutierten Gründen ebenfalls erklären könnte. Die verwendete lichtmikroskopische Methode zum Proteinnachweis zeigte eine positive Reaktion der gesamten Gefäßwand und ließ nicht erkennen, ob diese auf eine spezifische Interaktion der untersuchten Fibuline mit der Basalmembran, den Endothelzellen oder Gefäß-assoziierten Oxytalanfasern zurückzuführen war. Dies könnte elektronenmikroskopisch in Immunogold-Nachweisreaktionen eingehender analysiert werden.

Die immunhistochemischen Ergebnisse stimmen mit den dargelegten Erkenntnissen aus der Literatur bezüglich der Interaktion von Fibulinen mit Komponenten von Gefäßwänden überein. Sie bestärken die Annahme, dass Fibuline über ein komplexes Bindungsrepertoire mit wichtigen strukturgebenden EZM-Komponenten verfügen.

#### **4.2.2 Fibulin-3, -4 und -5 in oralen Geweben der DDR1-Knockout-Maus**

Bei Betrachtung der Ergebnisse des Nachweises für Fibulin-3, -4 und -5 in der DDR1-Knockout-Maus waren neben weitgehender Übereinstimmung mit den Ergebnissen in der Wildtyp-Maus auch Unterschiede zwischen beiden Versuchstiergruppen feststellbar. So zeigte sich im Kronendentin der DDR1-Knockout-Maus eine positive Reaktion für Fibulin-4 und -5, wohingegen Fibulin-3 hier nicht lokalisiert werden konnte. In der Wildtyp-Maus waren alle der untersuchten Fibuline im Kronendentin detektierbar. Die auffälligste Abweichung zwischen beiden Versuchstiergruppen war im Expressionsverhalten von Fibulin-4 in der EZM des Zements feststellbar. Hier war das Reaktionsergebnis in der DDR1-Knockout-Maus negativ, in der Wildtyp-Maus positiv. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass sich die dentalen und parodontalen Gewebe der DDR1-Knockout-Maus - trotz histologisch festgestellter Übereinstimmungen im strukturellen Aufbau - auf biochemischer Ebene von denen der Wildtyp-



Maus unterscheiden. Auch Schminke et al. (2014) stellten in der DDR1-Knockout-Maus im Bereich des hyalinen Knorpels im Kiefergelenk eine veränderte biochemische Komposition der EZM fest. Dabei ist der Anstieg von MMP13 mit der Destruktion von Kollagen II im Sinne eines osteoarthritischen Prozesses verknüpft. In der vorliegenden Arbeit ergaben sich im Gegensatz dazu keine Hinweise auf pathologische Prozesse im Parodontium der DDR1-Knockout-Maus. Trotzdem sind Unterschiede im biochemischen Aufbau der dentalen und parodontalen Gewebe anzunehmen, die eine genauere Spezifizierung erforderlich machen. Dabei sollte insbesondere Augenmerk auf die Zusammensetzung der Zementmatrix gelegt werden, um zu klären, warum das Fehlen von DDR1 in einer Unterexpression von Fibulin-4 in der EZM des Zements resultierte.

## 5 Zusammenfassung

DDR1 ist ein ubiquitärer Zelloberflächenrezeptor, der Kollagene bindet und durch diese aktiviert wird. In der DDR1-Knockout-Maus entwickelt sich im Knorpel des Kiefergelenks eine Osteoarthritis, die sich unter anderem in einem unstrukturierten kollagenen Faserapparat manifestiert. Diese Erkenntnis gab Anlass für die vorliegende Arbeit, in der erstmals dentale und parodontale Gewebe der DDR1-Knockout-Maus histologisch untersucht und mit denen der Wildtyp-Maus verglichen wurden. Es zeigten sich zwischen beiden Versuchstiergruppen keine Unterschiede in der strukturellen Konzeption der EZM der untersuchten Gewebe Pulpa, Dentin, Zement, PDL und Alveolar- beziehungsweise Kieferknochen. Besonderes Augenmerk wurde bei den Untersuchungen auf das kollagene Faserwerk des PDL gelegt. Es war regulär ausgebildet und wies keine Merkmale pathologischer Prozesse auf. Daraus kann gefolgert werden, dass das Fehlen von DDR1 auf Oberflächen von Zellen oraler Gewebe phänotypisch keine strukturellen Veränderungen mit sich bringt.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde erstmals das Expressionsverhalten der Klasse II-Fibuline-3, -4 und -5 in oralen Geweben der Wildtyp- und der DDR1-Knockout-Maus untersucht. Fibuline sind wichtige strukturgebende EZM-Komponenten, die Klasse II-Fibuline werden hauptsächlich mit der Bildung elastischer Fasern assoziiert. Es zeigte sich ein Vorkommen von Fibulin-3, -4 und -5 in der EZM der Pulpa, des Kronendentins, des PDL und in perizellulären Bereichen von Lakunen in Zement und Alveolar- beziehungsweise Kieferknochen. In der Zementmatrix war einzig Fibulin-4 lokalisierbar. Die Lokalisation der untersuchten Fibuline war in der DDR1-Knockout-Maus weitgehend übereinstimmend, im Bereich des Dentins und der Zementmatrix waren jedoch Abweichungen feststellbar. Jene Unterschiede deuten darauf hin, dass sich die oralen Gewebe von Wildtyp- und DDR1-Knockout-Maus trotz struktureller Vergleichbarkeit biochemisch voneinander unterscheiden. Die vorliegende Arbeit zeigt, dass Fibulin-3, -4 und -5 in der EZM oraler Gewebe weit verbreitet sind und sich in ihrem Expressionsverhalten voneinander unterscheiden. Weiterhin geben die dargestellten Ergebnisse einen Hinweis darauf, dass den untersuchten Proteinen neben einer Bedeutung in elastischen Fasern auch eine bislang unbekannte Rolle bei der EZM-Zusammensetzung außerhalb des Systems elastischer Fasern zukommt.

## 6 Anhang

### 6.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Schematische Darstellung der Assemblierung von Mikrofibrillen und elastischen Fasern	12
Abbildung 2:	Hämalaun-Eosin-Färbung	46
Abbildung 3:	Elastica-van-Gieson-Färbung	47
Abbildung 4:	Richardson-Färbung und elektronenmikroskopische Aufnahmen	48
Abbildung 5:	Immunhistochemischer Nachweis für Fibulin-3 in einer Wildtyp-Maus	52
Abbildung 6:	Immunhistochemischer Nachweis für Fibulin-4 in einer Wildtyp-Maus	54
Abbildung 7:	Immunhistochemischer Nachweis für Fibulin-5 in einer Wildtyp-Maus	56
Abbildung 8:	Immunhistochemischer Nachweis für Fibulin-3 in einer DDR1-Knockout-Maus	58
Abbildung 9:	Immunhistochemischer Nachweis für Fibulin-4 in einer DDR1-Knockout-Maus	60
Abbildung 10:	Immunhistochemischer Nachweis für Fibulin-5 in einer DDR1-Knockout-Maus	62

## 6.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Protokoll zur EDTA-Entkalkung	28
Tabelle 2: Protokoll des Einbettautomaten	29
Tabelle 3: Protokoll zur Hämalaun-Eosin-Färbung	33
Tabelle 4: Protokoll des Färbeautomaten zum Rehydrieren (Elastica-van-Gieson-Färbung)	34
Tabelle 5: Protokoll des Färbeautomaten zum Dehydrieren (Elastica-van-Gieson-Färbung)	35
Tabelle 6: Beschaffenheit und Herkunft der Antikörper	39
Tabelle 7: Protokoll des Färbeautomaten zum Rehydrieren (immunhistochemischer Nachweis)	40
Tabelle 8: Protokoll des Färbeautomaten zum Dehydrieren (immunhistochemischer Nachweis)	41
Tabelle 9: Auswertung der immunhistochemischen Nachweisreaktionen in Wildtyp-Mäusen	50
Tabelle 10: Auswertung der immunhistochemischen Nachweisreaktionen in DDR1-Knockout-Mäusen	50

## 7 Literaturverzeichnis

Ababneh KT, Hall RC, Embery G (1998): Immunolocalization of glycosaminoglycans in ageing, healthy and periodontally diseased human cementum. *Arch Oral Biol* 43, 235-46

Ababneh KT, Hall RC, Embery G (1999): The proteoglycans of human cementum: immunohistochemical localization in healthy, periodontally involved and ageing teeth. *J Periodontal Res* 34, 87-96

Abdulhussein R, McFadden C, Fuentes-Prior P, Vogel WF (2004): Exploring the collagen-binding site of the DDR1 tyrosine kinase receptor. *J Biol Chem* 279, 31462-70

Ainamo J, Loe H (1966): Anatomical characteristics of gingiva. A clinical and microscopic study of the free and attached gingiva. *J Periodontol* 37, 5-13

Alexander S, Sydow LM, Wessels D, Soll DR (1992): Discoidin proteins of *Dictyostelium* are necessary for normal cytoskeletal organization and cellular morphology during aggregation. *Differentiation* 51, 149-61

Alves F, Vogel W, Mossie K, Millauer B, Hofler H, Ullrich A (1995): Distinct structural characteristics of discoidin I subfamily receptor tyrosine kinases and complementary expression in human cancer. *Oncogene* 10, 609-18

Alves F, Saupe S, Ledwon M, Schaub F, Hiddemann W, Vogel WF (2001): Identification of two novel, kinase-deficient variants of discoidin domain receptor 1: differential expression in human colon cancer cell lines. *FASEB J* 15, 1321-3

Argraves WS, Tran H, Burgess WH, Dickerson K (1990): Fibulin is an extracellular matrix and plasma glycoprotein with repeated domain structure. *J Cell Biol* 111, 3155-64

Argraves WS, Greene LM, Cooley MA, Gallagher WM (2003): Fibulins: physiological and disease perspectives. *EMBO Rep* 4, 1127-31

Aruffo A, Stamenkovic I, Melnick M, Underhill CB, Seed B (1990): CD44 is the principal cell surface receptor for hyaluronate. *Cell* 61, 1303-13

Aspberg A, Adam S, Kostka G, Timpl R, Heinegård D (1999): Fibulin-1 is a ligand for the C-type lectin domains of aggrecan and versican. *J Biol Chem* 274, 20444-9

Avanesov A, Honeyager SM, Malicki J, Blair SS (2012): The role of glypicans in Wnt inhibitory factor-1 activity and the structural basis of Wif1's effects on Wnt and Hedgehog signaling. *PLoS Genet* 8, e1002503

Avivi-Green C, Singal M, Vogel WF (2006): Discoidin domain receptor 1-deficient mice are resistant to bleomycin-induced lung fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 174, 420-7

Balbona K, Tran H, Godyna S, Ingham KC, Strickland DK, Argraves WS (1992): Fibulin binds to itself and to the carboxyl-terminal heparin-binding region of fibronectin. *J Biol Chem* 267, 20120-5

Baldwin AK, Simpson A, Steer R, Cain SA, Kielty CM (2013): Elastic fibres in health and disease. *Expert Rev Mol Med* 15, e8

Barker KT, Martindale JE, Mitchell PJ, Kamalati T, Page MJ, Phippard DJ, Dale TC, Gusterson BA, Crompton MR (1995): Expression patterns of the novel receptor-like tyrosine kinase, DDR, in human breast tumours. *Oncogene* 10, 569-75

Barrett AW, Raja AM (1997): The immunohistochemical identification of human oral mucosal melanocytes. *Arch Oral Biol* 42, 77-81

Bartold PM (1990): A biochemical and immunohistochemical study of the proteoglycans of alveolar bone. *J Dent Res* 69, 7-19

Bartold PM, Narayanan AS (2006): Molecular and cell biology of healthy and diseased periodontal tissues. *Periodontol 2000* 40, 29-49

Bartold PM, Wiebkin OW, Thonard JC (1981): Glycosaminoglycans of human gingival epithelium and connective tissue. *Connect Tissue Res* 9, 99-106

Bartold PM, Walsh LJ, Narayanan AS (2000): Molecular and cell biology of the gingiva. *Periodontol 2000* 24, 28-55

Bashir MM, Indik Z, Yeh H, Ornstein-Goldstein N, Rosenbloom JC, Abrams W, Fazio M, Uitto J, Rosenbloom J (1989): Characterization of the complete human elastin gene. Delineation of unusual features in the 5'-flanking region. *J Biol Chem* 264, 8887-91

Becker J, Schuppan D, Rabanus JP, Rauch R, Niechoy U, Gelderblom HR (1991): Immunoelectron microscopic localization of collagens type I, V, VI and of procollagen type III in human periodontal ligament and cementum. *J Histochem Cytochem* 39, 103-10

Beertsen W (1975): Migration of fibroblasts in the periodontal ligament of the mouse incisor as revealed by autoradiography. *Arch Oral Biol* 20, 659-66

Beertsen W, McCulloch CA, Sodek J (1997): The periodontal ligament: a unique, multifunctional connective tissue. *Periodontol 2000* 13, 20-40

Benjamin M, Ralphs JR (2004): Biology of fibrocartilage cells. *Int Rev Cytol* 233, 1-45

Bergström J (1984): The topography of papillary gingiva in health and early gingivitis. *J Clin Periodontol* 11, 423-31

Berkovitz BK (1990): The structure of the periodontal ligament: an update. *Eur J Orthod* 12, 51-76

Bianco P, Fisher LW, Young MF, Termine JD, Robey PG (1990): Expression and localization of the two small proteoglycans biglycan and decorin in developing human skeletal and non-skeletal tissues. *J Histochem Cytochem* 38, 1549-63

Blume-Jensen P, Hunter T (2001): Oncogenic kinase signalling. *Nature* 411, 355-65

Bosshardt DD, Selvig KA (1997): Dental cementum: the dynamic tissue covering of the root. *Periodontol 2000* 13, 41-75

Bosshardt DD, Zalzal S, McKee MD, Nanci A (1998): Developmental appearance and distribution of bone sialoprotein and osteopontin in human and rat cementum. *Anat Rec* 250, 13-33

Bouche D, Argraves WS, Little CD (1996): Fibulin-1, vitronectin, and fibronectin expression during avian cardiac valve and septa development. *Anat Rec* 244, 540-51

Bronckers AL, Gay S, Lyaruu DM, Gay RE, Miller EJ (1986): Localization of type V collagen with monoclonal antibodies in developing dental and peridental tissues of the rat and hamster. *Collagen Relat Res* 6, 1-13

Butler WT, Birkedal-Hansen H, Beegle WF, Taylor RE, Chung E (1975): Proteins of the periodontium. Identification of collagens with the [alpha1(I)]2alpha2 and [alpha1(III)]3 structures in bovine periodontal ligament. *J Biol Chem* 250, 8907-12

Cain SA, Baldwin AK, Mahalingam Y, Raynal B, Jowitt TA, Shuttleworth CA, Couchman JR, Kielty CM (2008): Heparan sulfate regulates fibrillin-1 N- and C-terminal interactions. *J Biol Chem* 283, 27017-27

Carafoli F, Mayer MC, Shiraishi K, Pecheva MA, Chan LY, Nan R, Leitinger B, Hohenester E (2012): Structure of the discoidin domain receptor 1 extracellular region bound to an inhibitory Fab fragment reveals features important for signaling. *Structure* 20, 688-97

Carmichael GG, Fullmer HM (1966): The fine structure of the oxytalan fiber. *J Cell Biol* 28, 33-6

Castellot JJ, Favreau LV, Karnovsky MJ, Rosenberg RD (1982): Inhibition of vascular smooth muscle cell growth by endothelial cell-derived heparin. Possible role of a platelet endoglycosidase. *J Biol Chem* 257, 11256-60

Charbonneau NL, Ono RN, Corson GM, Keene DR, Sakai LY (2004): Fine tuning of growth factor signals depends on fibrillin microfibril networks. *Birth Defects Res C Embryo Today* 72, 37-50

Chen J, McCulloch CA, Sodek J (1993): Bone sialoprotein in developing porcine dental tissues: cellular expression and comparison of tissue localization with osteopontin and osteonectin. *Arch Oral Biol* 38, 241-9

Chiquet-Ehrismann R, Tucker RP (2004): Connective tissues: signalling by tenascins. *Int J Biochem Cell Biol* 36, 1085-9



Chiquet-Ehrismann R, Mackie EJ, Pearson CA, Sakakura T (1986): Tenascin: an extracellular matrix protein involved in tissue interactions during fetal development and oncogenesis. *Cell* 47, 131-9

Choi J, Bergdahl A, Zheng Q, Starcher B, Yanagisawa H, Davis EC (2009): Analysis of dermal elastic fibers in the absence of fibulin-5 reveals potential roles for fibulin-5 in elastic fiber assembly. *Matrix Biol* 28, 211-20

Choudhury R, McGovern A, Ridley C, Cain SA, Baldwin A, Wang M-C, Guo C, Mironov A, Drymoussi Z, Trump D (2009): Differential regulation of elastic fiber formation by fibulin-4 and -5. *J Biol Chem* 284, 24553-67

Church DM, Goodstadt L, Hillier LW, Zody MC, Goldstein S, She X, Bult CJ, Agarwala R, Cherry JL, DiCuccio M (2009): Lineage-specific biology revealed by a finished genome assembly of the mouse. *PLoS Biol* 7, e1000112

Cole GJ, Schubert D, Glaser L (1985): Cell-substratum adhesion in chick neural retina depends upon protein-heparan sulfate interactions. *J Cell Biol* 100, 1192-9

Cotta-Pereira G, Guerra Rodrigo F, Bittencourt-Sampaio S (1976): Oxytalan, elaunin, and elastic fibers in the human skin. *J Invest Dermatol* 66, 143-8

Curat CA, Eck M, Dervillez X, Vogel WF (2001): Mapping of epitopes in discoidin domain receptor 1 critical for collagen binding. *J Biol Chem* 276, 45952-8

Davis EC (1993a): Endothelial cell connecting filaments anchor endothelial cells to the subjacent elastic lamina in the developing aortic intima of the mouse. *Cell Tissue Res* 272, 211-9

Davis EC (1993b): Smooth muscle cell to elastic lamina connections in developing mouse aorta. Role in aortic medial organization. *Lab Invest* 68, 89-99

de Vega S, Iwamoto T, Nakamura T, Hozumi K, McKnight DA, Fisher LW, Fukumoto S, Yamada Y (2007): TM14 is a new member of the fibulin family (fibulin-7) that interacts with extracellular matrix molecules and is active for cell binding. *J Biol Chem* 282, 30878-88

de Vega S, Suzuki N, Nonaka R, Sasaki T, Forcinito P, Arikawa-Hirasawa E, Yamada Y (2014): A C-terminal fragment of fibulin-7 interacts with endothelial cells and inhibits their tube formation in culture. *Arch Biochem Biophys* 545, 148-53

Di Marco E, Cutuli N, Guerra L, Cancedda R, De Luca M (1993): Molecular cloning of *trkE*, a novel *trk*-related putative tyrosine kinase receptor isolated from normal human keratinocytes and widely expressed by normal human tissues. *J Biol Chem* 268, 24290-5

DiFranco CF, Toto PD, Rowden G, Gargiulo AW, Keene JJ, Connelly E (1985): Identification of Langerhans cells in human gingival epithelium. *J Periodontol* 56, 48-54

Eswaramoorthy R, Wang CK, Chen WC, Tang MJ, Ho ML, Hwang CC, Wang HM, Wang CZ (2010): DDR1 regulates the stabilization of cell surface E-cadherin and E-cadherin-mediated cell aggregation. *J Cell Physiol* 224, 387-97

Everts V, Niehof A, Jansen D, Beertsen W (1998): Type VI collagen is associated with microfibrils and oxytalan fibers in the extracellular matrix of periodontium, mesenterium and periosteum. *J Periodontol Res* 33, 118-25

Flamant M, Placier S, Rodenas A, Curat CA, Vogel WF, Chatziantoniou C, Dussaule JC (2006): Discoidin domain receptor 1 null mice are protected against hypertension-induced renal disease. *Clin J Am Soc Nephrol* 17, 3374-81

Ford CE, Lau SK, Zhu CQ, Andersson T, Tsao MS, Vogel WF (2007): Expression and mutation analysis of the discoidin domain receptors 1 and 2 in non-small cell lung carcinoma. *Br J Cancer* 96, 808-14

Foster JA, Bruenger E, Gray WR, Sandberg LB (1973): Isolation and amino acid sequences of tropoelastin peptides. *J Biol Chem* 248, 2876-9

Fox JW, Mayer U, Nischt R, Aumailley M, Reinhardt D, Wiedemann H, Mann K, Timpl R, Krieg T, Engel J (1991): Recombinant nidogen consists of three globular domains and mediates binding of laminin to collagen type IV. *EMBO J* 10, 3137-46

Franco C, Ahmad PJ, Hou G, Wong E, Bendeck MP (2010): Increased cell and matrix accumulation during atherogenesis in mice with vessel wall-specific deletion of discoidin domain receptor 1. *Circ Res* 106, 1775-83

Franz-Odendaal TA, Hall BK, Witten PE (2006): Buried alive: how osteoblasts become osteocytes. *Dev Dyn* 235, 176-90

Fu HL, Valiathan RR, Arkwright R, Sohail A, Mihai C, Kumarasiri M, Mahasenan KV, Mobashery S, Huang P, Agarwal G (2013): Discoidin domain receptors: unique receptor tyrosine kinases in collagen-mediated signaling. *J Biol Chem* 288, 7430-7

Fu L, Garland D, Yang Z, Shukla D, Rajendran A, Pearson E, Stone EM, Zhang K, Pierce EA (2007): The R345W mutation in EFEMP1 is pathogenic and causes AMD-like deposits in mice. *Hum Mol Genet* 16, 2411-22

Fukunaga-Kalabis M, Martinez G, Liu ZJ, Kalabis J, Mrass P, Weninger W, Firth SM, Planque N, Perbal B, Herlyn M (2006): CCN3 controls 3D spatial localization of melanocytes in the human skin through DDR1. *J Cell Biol* 175, 563-9

Fullmer HM, Lillie RD (1958): The oxytalan fiber: a previously undescribed connective tissue fiber. *J Histochem Cytochem* 6, 425-30

Gallagher WM, Argentini M, Sierra V, Bracco L, Debussche L, Conseiller E (1999): MBP1: a novel mutant p53-specific protein partner with oncogenic properties. *Oncogene* 18, 3608-16

Gawlik Z (1965): Morphological and morphochemical properties of the elastic system in the motor organ of man. *Folia Histochem Cytochem (Krakow)* 3, 233-51

Gibson MA, Hughes JL, Fanning JC, Cleary EG (1986): The major antigen of elastin-associated microfibrils is a 31-kDa glycoprotein. *J Biol Chem* 261, 11429-36

Giltay R, Timpl R, Kostka G (1999): Sequence, recombinant expression and tissue localization of two novel extracellular matrix proteins, fibulin-3 and fibulin-4. *Matrix Biol* 18, 469-80

Godyna S, Diaz-Ricart M, Argraves WS (1996): Fibulin-1 mediates platelet adhesion via a bridge of fibrinogen. *Blood* 88, 2569-77

Gross O, Beirowski B, Harvey SJ, McFadden C, Chen D, Tam S, Thorner PS, Smyth N, Addicks K, Bloch W (2004): DDR1-deficient mice show localized subepithelial GBM thickening with focal loss of slit diaphragms and proteinuria. *Kidney Int* 66, 102-11

Gullberg DE, Lundgren-Akerlund E (2002): Collagen-binding I domain integrins-- what do they do? *Prog Histochem Cytochem* 37, 3-54

Häkkinen L, Oksala O, Salo T, Rahemtulla F, Larjava H (1993): Immunohistochemical localization of proteoglycans in human periodontium. *J Histochem Cytochem* 41, 1689-99

Harada H, Ohshima H (2004): New perspectives on tooth development and the dental stem cell niche. *Arch Histol Cytol* 67, 1-11

Hassell TM (1993): Tissues and cells of the periodontium. *Periodontol 2000* 3, 9-38

Hellwig E, Klimek J, Attin T: Einführung in die Zahnerhaltung. 5. Auflage; Deutscher Zahnärzte Verlag, Köln 2009

Hernandez M, Valenzuela MA, Lopez-Otin C, Alvarez J, Lopez JM, Vernal R, Gamonal J (2006): Matrix metalloproteinase-13 is highly expressed in destructive periodontal disease activity. *J Periodontol* 77, 1863-70

Hopf M, Göhring W, Kohfeldt E, Yamada Y, Timpl R (1999): Recombinant domain IV of perlecan binds to nidogens, laminin-nidogen complex, fibronectin, fibulin-2 and heparin. *FEBS J* 259, 917-25

Hopf M, Göhring W, Mann K, Timpl R (2001): Mapping of binding sites for nidogens, fibulin-2, fibronectin and heparin to different IG modules of perlecan. *J Mol Biol* 311, 529-41

Hou G, Vogel W, Bendeck MP (2001): The discoidin domain receptor tyrosine kinase DDR1 in arterial wound repair. *J Clin Invest* 107, 727-35

Hou G, Vogel WF, Bendeck MP (2002): Tyrosine kinase activity of discoidin domain receptor 1 is necessary for smooth muscle cell migration and matrix metalloproteinase expression. *Circ Res* 90, 1147-9

Hu Q, Reymond JL, Pinel N, Zobot MT, Urban Z (2006): Inflammatory destruction of elastic fibers in acquired cutis laxa is associated with missense alleles in the elastin and fibulin-5 genes. *J Invest Dermatol* 126, 283-90

Huang YH, Ohsaki Y, Kurisu K (1991): Distribution of type I and type III collagen in the developing periodontal ligament of mice. *Matrix* 11, 25-35

Huchtagowder V, Sausgruber N, Kim KH, Angle B, Marmorstein LY, Urban Z (2006): Fibulin-4: a novel gene for an autosomal recessive cutis laxa syndrome. *Am J Hum Genet* 78, 1075-80

Hynes RO (2009): The extracellular matrix: not just pretty fibrils. *Science* 326, 1216-9

Ichikawa O, Osawa M, Nishida N, Goshima N, Nomura N, Shimada I (2007): Structural basis of the collagen-binding mode of discoidin domain receptor 2. *EMBO J* 26, 4168-76

Ikeda K, Wang LH, Torres R, Zhao H, Olaso E, Eng FJ, Labrador P, Klein R, Lovett D, Yancopoulos GD (2002): Discoidin domain receptor 2 interacts with Src and Shc following its activation by type I collagen. *J Biol Chem* 277, 19206-12

Izawa A, Ishihara Y, Mizutani H, Kobayashi S, Goto H, Okabe E, Takeda H, Ozawa Y, Kamiya Y, Sugita Y (2014): Inflammatory bone loss in experimental periodontitis induced by *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* in IL-1Ra knockout mice. (*Infect Immun*, im Druck)

Jensen SA, Reinhardt DP, Gibson MA, Weiss AS (2001): Protein interaction studies of MAGP-1 with tropoelastin and fibrillin-1. *J Biol Chem* 276, 39661-6

Johnson JD, Edman JC, Rutter WJ (1993): A receptor tyrosine kinase found in breast carcinoma cells has an extracellular discoidin I-like domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 5677-81

Johnson RB, Pylypas SP (1992): A re-evaluation of the distribution of the elastic meshwork within the periodontal ligament of the mouse. *J Periodontal Res* 27, 239-49

Jonas IE, Riede UN (1980): Reaction of oxytalan fibers in human periodontium to mechanical stress. A combined histochemical and morphometric analysis. *J Histochem Cytochem* 28, 211-6

Kadoya K, Sasaki T, Kostka G, Timpl R, Matsuzaki K, Kumagai N, Sakai LY, Nishiyama T, Amano S (2005): Fibulin-5 deposition in human skin: decrease with ageing and ultraviolet B exposure and increase in solar elastosis. *Br J Dermatol* 153, 607-12

Kagayama M, Li HC, Zhu J, Sasano Y, Hatakeyama Y, Mizoguchi I (1997): Expression of osteocalcin in cementoblasts forming acellular cementum. *J Periodontal Res* 32, 273-8

Kalamajski S, Oldberg A (2007): Fibromodulin binds collagen type I via Glu-353 and Lys-355 in leucine-rich repeat 11. *J Biol Chem* 282, 26740-5

Karimbux NY, Rosenblum ND, Nishimura I (1992): Site-specific expression of collagen I and XII mRNAs in the rat periodontal ligament at two developmental stages. *J Dent Res* 71, 1355-62

Karn T, Holtrich U, Bräuninger A, Böhme B, Wolf G, Rübsamen-Waigmann H, Strebhardt K (1993): Structure, expression and chromosomal mapping of TKT from man and mouse: a new subclass of receptor tyrosine kinases with a factor VIII-like domain. *Oncogene* 8, 3433-40

Kiedziarska A, Smietana K, Czepczynska H, Otlewski J (2007): Structural similarities and functional diversity of eukaryotic discoidin-like domains. *Biochim Biophys Acta* 1774, 1069-78

Kielty CM (2006): Elastic fibres in health and disease. *Expet Rev Mol Med* 8, 1-23

Kinsey R, Williamson MR, Chaudhry S, Mellody KT, McGovern A, Takahashi S, Shuttleworth CA, Kielty CM (2008): Fibrillin-1 microfibril deposition is dependent on fibronectin assembly. *J Cell Sci* 121, 2696-704

Klass CM, Couchman JR, Woods A (2000): Control of extracellular matrix assembly by syndecan-2 proteoglycan. *J Cell Sci* 113 (Pt 3), 493-506

Kluge M, Mann K, Dziadek M, Timpl R (1990): Characterization of a novel calcium-binding 90-kDa glycoprotein (BM-90) shared by basement membranes and serum. *FEBS J* 193, 651-9

Kobayashi N, Kostka G, Garbe JH, Keene DR, Bächinger HP, Hanisch FG, Markova D, Tsuda T, Timpl R, Chu ML (2007): A comparative analysis of the fibulin protein family. Biochemical characterization, binding interactions, and tissue localization. *J Biol Chem* 282, 11805-16

Koda JE, Rapraeger A, Bernfield M (1985): Heparan sulfate proteoglycans from mouse mammary epithelial cells. Cell surface proteoglycan as a receptor for interstitial collagens. *J Biol Chem* 260, 8157-62

Komboli MG, Kodovazenitis GJ, Katsorhis TA (2009): Comparative immunohistochemical study of the distribution of fibronectin in healthy and diseased root surfaces. *J Periodontol* 80, 824-32

Konitsiotis AD, Raynal N, Bihan D, Hohenester E, Farndale RW, Leitingner B (2008): Characterization of high affinity binding motifs for the discoidin domain receptor DDR2 in collagen. *J Biol Chem* 283, 6861-8

Koo DH, McFadden C, Huang Y, Abdulhussein R, Friese-Hamim M, Vogel WF (2006): Pinpointing phosphotyrosine-dependent interactions downstream of the collagen receptor DDR1. *FEBS Lett* 580, 15-22

Kowal RC, Richardson JA, Miano JM, Olson EN (1999): EVEC, a novel epidermal growth factor-like repeat-containing protein upregulated in embryonic and diseased adult vasculature. *Circ Res* 84, 1166-76

Kruegel J, Miosge N (2010): Basement membrane components are key players in specialized extracellular matrices. *Cell Mol Life Sci* 67, 2879-95

Labrador JP, Azcoitia V, Tuckermann J, Lin C, Olaso E, Mañes S, Brückner K, Goergen JL, Lemke G, Yancopoulos G (2001): The collagen receptor DDR2 regulates proliferation and its elimination leads to dwarfism. *EMBO Rep* 2, 446-52

Laval S, Butler R, Shelling AN, Hanby AM, Poulsom R, Ganesan TS (1994): Isolation and characterization of an epithelial-specific receptor tyrosine kinase from an ovarian cancer cell line. *Cell Growth Differ* 5, 1173-83

Lecka-Czernik B, Lumpkin CK, Goldstein S (1995): An overexpressed gene transcript in senescent and quiescent human fibroblasts encoding a novel protein in the epidermal growth factor-like repeat family stimulates DNA synthesis. *Mol Cell Biol* 15, 120-8

Lee RT, Berditchevski F, Cheng GC, Hemler ME (1995): Integrin-mediated collagen matrix reorganization by cultured human vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 76, 209-14

Lee W, Sodek J, McCulloch CA (1996): Role of integrins in regulation of collagen phagocytosis by human fibroblasts. *J Cell Physiol* 168, 695-704

Leitinger B (2003): Molecular analysis of collagen binding by the human discoidin domain receptors, DDR1 and DDR2. Identification of collagen binding sites in DDR2. *J Biol Chem* 278, 16761-9

Leitinger B, Kwan AP (2006): The discoidin domain receptor DDR2 is a receptor for type X collagen. *Matrix Biol* 25, 355-64

Lemmon MA, Schlessinger J (2010): Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* 141, 1117-34

Lin G, Tiedemann K, Vollbrandt T, Peters H, Batge B, Brinckmann J, Reinhardt DP (2002): Homo- and heterotypic fibrillin-1 and -2 interactions constitute the basis for the assembly of microfibrils. *J Biol Chem* 277, 50795-804

Listgarten MA (1964): The ultrastructure of human gingival epithelium. *Am J Anat* 114, 49-69

Listgarten MA (1972): Normal development, structure, physiology and repair of gingival epithelium. *Oral Sci Rev* 1, 3-67



Lomas AC, Mellody KT, Freeman LJ, Bax DV, Shuttleworth CA, Kielty CM (2007): Fibulin-5 binds human smooth-muscle cells through alpha5beta1 and alpha4beta1 integrins, but does not support receptor activation. *Biochem J* 405, 417-28

Loriaux MM, Levine RL, Tyner JW, Fröhling S, Scholl C, Stoffregen EP, Wernig G, Erickson H, Eide CA, Berger R (2008): High-throughput sequence analysis of the tyrosine kinome in acute myeloid leukemia. *Blood* 111, 4788-96

Lukinmaa PL, Mackie EJ, Thesleff I (1991): Immunohistochemical localization of the matrix glycoproteins--tenascin and the ED-sequence-containing form of cellular fibronectin--in human permanent teeth and periodontal ligament. *J Dent Res* 70, 19-26

Mariotti A (1993): The extracellular matrix of the periodontium: dynamic and interactive tissues. *Periodontol* 2000 3, 39-63

Marmorstein LY, Munier FL, Arsenijevic Y, Schorderet DF, McLaughlin PJ, Chung D, Traboulsi E, Marmorstein AD (2002): Aberrant accumulation of EFEMP1 underlies drusen formation in Malattia Leventinese and age-related macular degeneration. *Proc Natl Acad Sci USA* 99, 13067-72

Marson A, Rock MJ, Cain SA, Freeman LJ, Morgan A, Mellody K, Shuttleworth CA, Baldock C, Kielty CM (2005): Homotypic fibrillin-1 interactions in microfibril assembly. *J Biol Chem* 280, 5013-21

McKee MD, Glimcher MJ, Nanci A (1992): High-resolution immunolocalization of osteopontin and osteocalcin in bone and cartilage during endochondral ossification in the chicken tibia. *Anat Rec* 234, 479-92

McLaughlin PJ, Chen Q, Horiguchi M, Starcher BC, Stanton JB, Broekelmann TJ, Marmorstein AD, McKay B, Mecham R, Nakamura T (2006): Targeted disruption of fibulin-4 abolishes elastogenesis and causes perinatal lethality in mice. *Mol Cell Biol* 26, 1700-9

Meyer zum Gottesberge AM, Gross O, Becker-Lendzian U, Massing T, Vogel WF (2008): Inner ear defects and hearing loss in mice lacking the collagen receptor DDR1. *Lab Invest* 88, 27-37

Miner JH (2008): Laminins and their roles in mammals. *Microsc Res Tech* 71, 349-56

Miosge N, Sasaki T, Chu ML, Herken R, Timpl R (1998): Ultrastructural localization of microfibrillar fibulin-1 and fibulin-2 during heart development indicates a switch in molecular associations. *Cell Mol Life Sci* 54, 606-13

Montes G (1996): Structural biology of the fibres of the collagenous and elastic systems. *Cell Biol Int* 20, 15-27

Nakamura T, Lozano PR, Ikeda Y, Iwanaga Y, Hinek A, Minamisawa S, Cheng CF, Kobuke K, Dalton N, Takada Y (2002): Fibulin-5/DANCE is essential for elastogenesis in vivo. *Nature* 415, 171-5

Nakashima K, Tsuruga E, Hisanaga Y, Ishikawa H, Sawa Y (2009): Stretching stimulates fibulin-5 expression and controls microfibril bundles in human periodontal ligament cells. *J Periodontal Res* 44, 622-7

Nanci A, Bosshardt DD (2006): Structure of periodontal tissues in health and disease. *Periodontol 2000* 40, 11-28

Nemoto T, Ohashi K, Akashi T, Johnson JD, Hirokawa K (1997): Overexpression of protein tyrosine kinases in human esophageal cancer. *Pathobiology* 65, 195-203

Noordeen NA, Carafoli F, Hohenester E, Horton MA, Leitinger B (2006): A transmembrane leucine zipper is required for activation of the dimeric receptor tyrosine kinase DDR1. *J Biol Chem* 281, 22744-51

Norman DG, Barlow PN, Baron M, Day AJ, Sim RB, Campbell ID (1991): Three-dimensional structure of a complement control protein module in solution. *J Mol Biol* 219, 717-25

Ogata Y, Niisato N, Sakurai T, Furuyama S, Sugiya H (1995): Comparison of the characteristics of human gingival fibroblasts and periodontal ligament cells. *J Periodontol* 66, 1025-31

Olaso E, Ikeda K, Eng FJ, Xu L, Wang LH, Lin HC, Friedman SL (2001): DDR2 receptor promotes MMP-2-mediated proliferation and invasion by hepatic stellate cells. *J Clin Invest* 108, 1369-78

Olaso E, Arteta B, Benedicto A, Crende O, Friedman SL (2011a): Loss of discoidin domain receptor 2 promotes hepatic fibrosis after chronic carbon tetrachloride through altered paracrine interactions between hepatic stellate cells and liver-associated macrophages. *Am J Pathol* 179, 2894-904

Olaso E, Lin HC, Wang LH, Friedman SL (2011b): Impaired dermal wound healing in discoidin domain receptor 2-deficient mice associated with defective extracellular matrix remodeling. *Fibrogenesis Tissue Repair* 4, 5

Oldberg A, Ruoslahti E (1982): Interactions between chondroitin sulfate proteoglycan, fibronectin, and collagen. *J Biol Chem* 257, 4859-63

Olin AI, Mörgelin M, Sasaki T, Timpl R, Heinegård D, Aspberg A (2001): The proteoglycans aggrecan and Versican form networks with fibulin-2 through their lectin domain binding. *J Biol Chem* 276, 1253-61

Orban B (1948): Clinical and histologic study of the surface characteristics of the gingiva. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1, 827-41

Page RC, Offenbacher S, Schroeder HE, Seymour GJ, Kornman KS (1997): Advances in the pathogenesis of periodontitis: summary of developments, clinical implications and future directions. *Periodontol 2000* 14, 216-48

Pan TC, Kluge M, Zhang RZ, Mayer U, Timpl R, Chu ML (1993a): Sequence of extracellular mouse protein BM-90/fibulin and its calcium-dependent binding to other basement-membrane ligands. *FEBS J* 215, 733-40

Pan TC, Sasaki T, Zhang RZ, Fässler R, Timpl R, Chu ML (1993b): Structure and expression of fibulin-2, a novel extracellular matrix protein with multiple EGF-like repeats and consensus motifs for calcium binding. *J Cell Biol* 123, 1269-77

Pasquali-Ronchetti I, Baccarani-Contri M (1997): Elastic fiber during development and aging. *Microsc Res Tech* 38, 428-35

Perez JL, Shen X, Finkernagel S, Sciorra L, Jenkins NA, Gilbert DJ, Copeland NG, Wong TW (1994): Identification and chromosomal mapping of a receptor tyrosine kinase with a putative phospholipid binding sequence in its ectodomain. *Oncogene* 9, 211-9

Peterková R, Peterka M, Vonesch JL, Ruch JV (1995): Contribution of 3-D computer-assisted reconstructions to the study of the initial steps of mouse odontogenesis. *Int J Dev Biol* 39, 239-47

Playford MP, Butler RJ, Wang XC, Katso RM, Cooke IE, Ganesan TS (1996): The genomic structure of discoidin receptor tyrosine kinase. *Genome Res* 6, 620-7

Popova SN, Barczyk M, Tiger CF, Beertsen W, Zigrino P, Aszodi A, Miosge N, Forsberg E, Gullberg D (2007a): Alpha11 beta1 integrin-dependent regulation of periodontal ligament function in the erupting mouse incisor. *Mol Cell Biol* 27, 4306-16

Popova SN, Lundgren-Akerlund E, Wiig H, Gullberg D (2007b): Physiology and pathology of collagen receptors. *Acta Physiol (Oxf)* 190, 179-87

Pöschl E, Schlötzer-Schrehardt U, Brachvogel B, Saito K, Ninomiya Y, Mayer U (2004): Collagen IV is essential for basement membrane stability but dispensable for initiation of its assembly during early development. *Development* 131, 1619-28

Preis M, Cohen T, Sarnatzki Y, Ben Yosef Y, Schneiderman J, Gluzman Z, Koren B, Lewis BS, Shaul Y, Flugelman MY (2006): Effects of fibulin-5 on attachment, adhesion, and proliferation of primary human endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 348, 1024-33

Rahn DD, Acevedo JF, Roshanravan S, Keller PW, Davis EC, Marmorstein LY, Word RA (2009): Failure of pelvic organ support in mice deficient in fibulin-3. *Am J Pathol* 174, 206-15

Ramieri G, Panzica GC, Viglietti-Panzica C, Modica R, Springall DR, Polak JM (1992): Non-innervated Merkel cells and Merkel-neurite complexes in human oral mucosa revealed using antiserum to protein gene product 9.5. *Arch Oral Biol* 37, 263-9

Ramirez F, Pereira L (1999): The fibrillins. *Int J Biochem Cell Biol* 31, 255-9

Rao LG, Wang HM, Kalliecharan R, Heersche JN, Sodek J (1979): Specific immunohistochemical localization of type I collagen in porcine periodontal tissues using the peroxidase-labelled antibody technique. *Histochem J* 11, 73-82

Reichert T, Störkel S, Becker K, Fisher LW (1992): The role of osteonectin in human tooth development: an immunohistological study. *Calcif Tissue Int* 50, 468-72

Reinhardt DP, Sasaki T, Dzamba BJ, Keene DR, Chu ML, Göhring W, Timpl R, Sakai LY (1996): Fibrillin-1 and fibulin-2 interact and are colocalized in some tissues. *J Biol Chem* 271, 19489-96

Renné C, Willenbrock K, Küppers R, Hansmann ML, Bräuninger A (2005): Autocrine- and paracrine-activated receptor tyrosine kinases in classic Hodgkin lymphoma. *Blood* 105, 4051-9

Reynolds JJ, Meikle MC (1997): Mechanisms of connective tissue matrix destruction in periodontitis. *Periodontol 2000* 14, 144-57

Roark EF, Keene DR, Haudenschild CC, Godyna S, Little CD, Argraves WS (1995): The association of human fibulin-1 with elastic fibers: an immunohistological, ultrastructural, and RNA study. *J Histochem Cytochem* 43, 401-11

Roberts ME, Magowan L, Hall IP, Johnson SR (2011): Discoidin domain receptor 1 regulates bronchial epithelial repair and matrix metalloproteinase production. *Eur Respir J* 37, 1482-93

Rock MJ, Cain SA, Freeman LJ, Morgan A, Mellody K, Marson A, Shuttleworth CA, Weiss AS, Kielty CM (2004): Molecular basis of elastic fiber formation. Critical interactions and a tropoelastin-fibrillin-1 cross-link. *J Biol Chem* 279, 23748-58

Rodrigues R, Roque L, Espadinha C, Pinto A, Domingues R, Dinis J, Catarino A, Pereira T, Leite V (2007): Comparative genomic hybridization, BRAF, RAS, RET, and oligo-array analysis in aneuploid papillary thyroid carcinomas. *Oncol Rep* 18, 917-26

Roguljic H, Matthews BG, Yang W, Cvija H, Mina M, Kalajzic I (2013): In vivo identification of periodontal progenitor cells. *J Dent Res* 92, 709-15

Romanos G, Schröter-Kermani C, Hinz N, Bernimoulin JP (1991): Immunohistochemical distribution of the collagen types IV, V, VI and glycoprotein laminin in the healthy rat, marmoset (*Callithrix jacchus*) and human gingivae. *Matrix* 11, 125-32

Rossant J, McKerlie C (2001): Mouse-based phenogenomics for modelling human disease. *Trends Mol Med* 7, 502-7

Ruoslahti E (1988): Structure and biology of proteoglycans. *Annu Rev Cell Biol* 4, 229-55

Saffar JL, Lasfargues JJ, Cherruau M (1997): Alveolar bone and the alveolar process: the socket that is never stable. *Periodontol 2000* 13, 76-90

Sakai LY, Keene DR, Engvall E (1986): Fibrillin, a new 350-kD glycoprotein, is a component of extracellular microfibrils. *J Cell Biol* 103, 2499-509

Sakuma S, Saya H, Ijichi A, Tofilon PJ (1995): Radiation induction of the receptor tyrosine kinase gene Ptk-3 in normal rat astrocytes. *Radiat Res* 143, 1-7

Sakuma S, Saya H, Tada M, Nakao M, Fujiwara T, Roth JA, Sawamura Y, Shinohe Y, Abe H (1996): Receptor protein tyrosine kinase DDR is up-regulated by p53 protein. *FEBS Lett* 398, 165-9

Salmivirta M, Elenius K, Vainio S, Hofer U, Chiquet-Ehrismann R, Thesleff I, Jalkanen M (1991): Syndecan from embryonic tooth mesenchyme binds tenascin. *J Biol Chem* 266, 7733-9

San Antonio JD, Winston BM, Tuan RS (1987): Regulation of chondrogenesis by heparan sulfate and structurally related glycosaminoglycans. *Dev Biol* 123, 17-24

Sanchez MP, Tapley P, Saini SS, He B, Pulido D, Barbacid M (1994): Multiple tyrosine protein kinases in rat hippocampal neurons: isolation of Ptk-3, a receptor expressed in proliferative zones of the developing brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 1819-23

Sasaki T, Göhring W, Pan TC, Chu ML, Timpl R (1995a): Binding of mouse and human fibulin-2 to extracellular matrix ligands. *J Mol Biol* 254, 892-9

Sasaki T, Kostka G, Göhring W, Wiedemann H, Mann K, Chu ML, Timpl R (1995b): Structural characterization of two variants of fibulin-1 that differ in nidogen affinity. *J Mol Biol* 245, 241-50

Sasaki T, Mann K, Wiedemann H, Göhring W, Lustig A, Engel J, Chu ML, Timpl R (1997): Dimer model for the microfibrillar protein fibulin-2 and identification of the connecting disulfide bridge. *EMBO J* 16, 3035-43

Sasaki T, Göhring W, Miosge N, Abrams WR, Rosenbloom J, Timpl R (1999): Tropoelastin binding to fibulins, nidogen-2 and other extracellular matrix proteins. *FEBS Lett* 460, 280-4

Saunders S, Bernfield M (1988): Cell surface proteoglycan binds mouse mammary epithelial cells to fibronectin and behaves as a receptor for interstitial matrix. *J Cell Biol* 106, 423-30

Sawada T (2010): Ultrastructural localization of fibrillin-1 and fibrillin-2 in oxytalan fibers in periodontal ligament of Japanese *Macaca fuscata* monkey. *J Mol Histol* 41, 225-31

Schmidt G, Robenek H, Harrach B, Glössl J, Nolte V, Hörmann H, Richter H, Kresse H (1987): Interaction of small dermatan sulfate proteoglycan from fibroblasts with fibronectin. *J Cell Biol* 104, 1683-91

Schminke B, Muhammad H, Bode C, Sadowski B, Gerter R, Gersdorff N, Bürgers R, Monsonego-Ornan E, Rosen V, Miosge N (2014): A discoidin domain receptor 1 knock-out mouse as a novel model for osteoarthritis of the temporomandibular joint. *Cell Mol Life Sci* 71, 1081-96

Schönherr E, Witsch-Prehm P, Harrach B, Robenek H, Rauterberg J, Kresse H (1995): Interaction of biglycan with type I collagen. *J Biol Chem* 270, 2776-83

Schroeder HE (1992): Biological problems of regenerative cementogenesis: synthesis and attachment of collagenous matrices on growing and established root surfaces. *Int Rev Cytol* 142, 1-59

Schroeder HE, Listgarten MA (1997): The gingival tissues: the architecture of periodontal protection. *Periodontol 2000* 13, 91-120

Schroeder HE, Münzel-Pedrazzoli S, Page R (1973): Correlated morphometric and biochemical analysis of gingival tissue in early chronic gingivitis in man. *Arch Oral Biol* 18, 899-923

Schwartz E, Goldfischer S, Coltoff-Schiller B, Blumenfeld OO (1985): Extracellular matrix microfibrils are composed of core proteins coated with fibronectin. *J Histochem Cytochem* 33, 268-74

Sherratt MJ, Baldock C, Haston JL, Holmes DF, Jones CJ, Shuttleworth CA, Wess TJ, Kielty CM (2003): Fibrillin microfibrils are stiff reinforcing fibres in compliant tissues. *J Mol Biol* 332, 183-93

Shintani Y, Fukumoto Y, Chaika N, Svoboda R, Wheelock MJ, Johnson KR (2008): Collagen I-mediated up-regulation of N-cadherin requires cooperative signals from integrins and discoidin domain receptor 1. *J Cell Biol* 180, 1277-89

Sicot FX, Tsuda T, Markova D, Klement JF, Arita M, Zhang RZ, Pan TC, Mecham RP, Birk DE, Chu ML (2008): Fibulin-2 is dispensable for mouse development and elastic fiber formation. *Mol Cell Biol* 28, 1061-7

Sims MR (1975): Oxytalan-vascular relationships observed in histologic examination of the periodontal ligaments of man and mouse. *Arch Oral Biol* 20, 713-6

Sodek J, McKee MD (2000): Molecular and cellular biology of alveolar bone. *Periodontol 2000* 24, 99-126

Soule JD (1967): Oxytalan fibers in the periodontal ligament of the Caiman and the Alligator (Crocodylia, Reptilia). *J Morphol* 122, 169-73

Spence SG, Argraves WS, Walters L, Hungerford JE, Little CD (1992): Fibulin is localized at sites of epithelial-mesenchymal transitions in the early avian embryo. *Dev Biol* 151, 473-84

Spencer JA, Hacker SL, Davis EC, Mecham RP, Knutsen RH, Li DY, Gerard RD, Richardson JA, Olson EN, Yanagisawa H (2005): Altered vascular remodeling in fibulin-5-deficient mice reveals a role of fibulin-5 in smooth muscle cell proliferation and migration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 2946-51



Steffensen B, Duong AH, Milam SB, Potempa CL, Winborn WB, Magnuson VL, Chen D, Zardeneta G, Klebe RJ (1992): Immunohistological localization of cell adhesion proteins and integrins in the periodontium. *J Periodontol* 63, 584-92

Steinfors J, van den Bos T, Beertsen W (1989): Differences between enamel-related and cementum-related dentin in the rat incisor with special emphasis on the phosphoproteins. *J Biol Chem* 264, 2840-5

Stern IB (1964): An electron microscopic study of the cementum, Sharpey's fibers and periodontal ligament in the rat incisor. *Am J Anat* 115, 377-409

Stone EM, Lotery AJ, Munier FL, Héon E, Piguet B, Guymer RH, Vandenberg K, Cousin P, Nishimura D, Swiderski RE (1999): A single EFEMP1 mutation associated with both Malattia Leventinese and Doyme honeycomb retinal dystrophy. *Nat Genet* 22, 199-202

Streeten BW, Swann DA, Licari PA, Robinson MR, Gibson SA, Marsh NJ, Vergnes JP, Freeman IL (1983): The protein composition of the ocular zonules. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 24, 119-23

Strydom H, Maltha JC, Kuijpers-Jagtman AM, Von den Hoff JW (2012): The oxytalan fibre network in the periodontium and its possible mechanical function. *Arch Oral Biol* 57, 1003-11

Subramanian SV, Fitzgerald ML, Bernfield M (1997): Regulated shedding of syndecan-1 and -4 ectodomains by thrombin and growth factor receptor activation. *J Biol Chem* 272, 14713-20

Sun X, Mosher DF, Rapraeger A (1989): Heparan sulfate-mediated binding of epithelial cell surface proteoglycan to thrombospondin. *J Biol Chem* 264, 2885-9

Suzuki N, Ando S, Sumida K, Horie N, Saito K (2011): Analysis of altered gene expression specific to embryotoxic chemical treatment during embryonic stem cell differentiation into myocardial and neural cells. *J Toxicol Sci* 36, 569-85

Tamkun JW, DeSimone DW, Fonda D, Patel RS, Buck C, Horwitz AF, Hynes RO (1986): Structure of integrin, a glycoprotein involved in the transmembrane linkage between fibronectin and actin. *Cell* 46, 271-82

Termine JD, Kleinman HK, Whitson SW, Conn KM, McGarvey ML, Martin GR (1981): Osteonectin, a bone-specific protein linking mineral to collagen. *Cell* 26, 99-105

Timpl R (1982): Antibodies to collagens and procollagens. *Methods Enzymol* 82 Pt A, 472-98

Tomasson MH, Xiang Z, Walgren R, Zhao Y, Kasai Y, Miner T, Ries RE, Lubman O, Fremont DH, McLellan MD (2008): Somatic mutations and germline sequence variants in the expressed tyrosine kinase genes of patients with de novo acute myeloid leukemia. *Blood* 111, 4797-808

Tonetti MS, Straub AM, Lang NP (1995): Expression of the cutaneous lymphocyte antigen and the alpha IEL beta 7 integrin by intraepithelial lymphocytes in healthy and diseased human gingiva. *Arch Oral Biol* 40, 1125-32

Tran H, Tanaka A, Litvinovich SV, Medved LV, Haudenschild CC, Argraves WS (1995): The interaction of fibulin-1 with fibrinogen. A potential role in hemostasis and thrombosis. *J Biol Chem* 270, 19458-64

Tsuda T, Wang H, Timpl R, Chu ML (2001): Fibulin-2 expression marks transformed mesenchymal cells in developing cardiac valves, aortic arch vessels, and coronary vessels. *Dev Dyn* 222, 89-100

Ullrich A, Schlessinger J (1990): Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell* 61, 203-12

Velling T, Risteli J, Wennerberg K, Mosher DF, Johansson S (2002): Polymerization of type I and III collagens is dependent on fibronectin and enhanced by integrins alpha 11beta 1 and alpha 2beta 1. *J Biol Chem* 277, 37377-81

Vogel BE, Hedgecock EM (2001): Hemicentin, a conserved extracellular member of the immunoglobulin superfamily, organizes epithelial and other cell attachments into oriented line-shaped junctions. *Development* 128, 883-94

Vogel KG, Paulsson M, Heinegård D (1984): Specific inhibition of type I and type II collagen fibrillogenesis by the small proteoglycan of tendon. *Biochem J* 223, 587-97

Vogel W, Gish GD, Alves F, Pawson T (1997): The discoidin domain receptor tyrosine kinases are activated by collagen. *Mol Cell* 1, 13-23

Vogel W, Brakebusch C, Fassler R, Alves F, Ruggiero F, Pawson T (2000): Discoidin domain receptor 1 is activated independently of beta(1) integrin. *J Biol Chem* 275, 5779-84

Vogel WF (2002): Ligand-induced shedding of discoidin domain receptor 1. *FEBS Lett* 514, 175-80

Vogel WF, Aszódi A, Alves F, Pawson T (2001): Discoidin domain receptor 1 tyrosine kinase has an essential role in mammary gland development. *Mol Cell Biol* 21, 2906-17

Völker W, Schmidt A, Buddecke E (1987): Mapping of proteoglycans in human arterial tissue. *Eur J Cell Biol* 45, 72-9

Vrhovski B, Jensen S, Weiss AS (1997): Coacervation characteristics of recombinant human tropoelastin. *FEBS J* 250, 92-8

Vukovic J, Ruitenber MJ, Roet K, Franssen E, Arulpragasam A, Sasaki T, Verhaagen J, Harvey AR, Busfield SJ, Plant GW (2009): The glycoprotein fibulin-3 regulates morphology and motility of olfactory ensheathing cells in vitro. *Glia* 57, 424-43

Wachi H, Nonaka R, Sato F, Shibata-Sato K, Ishida M, Iketani S, Maeda I, Okamoto K, Urban Z, Onoue S (2008): Characterization of the molecular interaction between tropoelastin and DANCE/fibulin-5. *J Biochem* 143, 633-9

Wadhwa S, Embree M, Ameye L, Young MF (2005): Mice deficient in biglycan and fibromodulin as a model for temporomandibular joint osteoarthritis. *Cells Tissues Organs* 181, 136-43

Wagenseil JE, Mecham RP (2007): New insights into elastic fiber assembly. *Birth Defects Res C Embryo Today* 81, 229-40

Wang HM, Nanda V, Rao LG, Melcher AH, Heersche JN, Sodek J (1980): Specific immunohistochemical localization of type III collagen in porcine periodontal tissues using the peroxidase-antiperoxidase method. *J Histochem Cytochem* 28, 1215-23

Warshawsky H (1968): The fine structure of secretory ameloblasts in rat incisors. *Anat Rec* 161, 211-29

Watanabe T, Kubota T (1998): Characterization of fibromodulin isolated from bovine periodontal ligament. *J Periodontal Res* 33, 1-7

Wayner EA, Carter WG (1987): Identification of multiple cell adhesion receptors for collagen and fibronectin in human fibrosarcoma cells possessing unique alpha and common beta subunits. *J Cell Biol* 105, 1873-84

Weiner HL, Rothman M, Miller DC, Ziff EB (1996): Pediatric brain tumors express multiple receptor tyrosine kinases including novel cell adhesion kinases. *Pediatr Neurosurg* 25, 64-71; discussion 71-2

Weiner HL, Huang H, Zagzag D, Boyce H, Lichtenbaum R, Ziff EB (2000): Consistent and selective expression of the discoidin domain receptor-1 tyrosine kinase in human brain tumors. *Neurosurgery* 47, 1400-9

Worapamorn W, Li H, Pujic Z, Xiao Y, Young WG, Bartold PM (2000): Expression and distribution of cell-surface proteoglycans in the normal Lewis rat molar periodontium. *J Periodontal Res* 35, 214-24

Worapamorn W, Haase HR, Li H, Bartold PM (2001a): Growth factors and cytokines modulate gene expression of cell-surface proteoglycans in human periodontal ligament cells. *J Cell Physiol* 186, 448-56

Worapamorn W, Li H, Young WG, Bartold PM (2001b): Differential expression and distribution of syndecan-1 and -2 in the developing periodontium of the rat. *Connect Tissue Res* 42, 39-48

Wu D, Ikezawa K, Parker T, Saito M, Narayanan AS (1996): Characterization of a collagenous cementum-derived attachment protein. *J Bone Miner Res* 11, 686-92

Xiang Y, Sekine T, Nakamura H, Imajoh-Ohmi S, Fukuda H, Yudoh K, Masuko-Hongo K, Nishioka K, Kato T (2006): Fibulin-4 is a target of autoimmunity predominantly in patients with osteoarthritis. *J Immunol* 176, 3196-204

Xiong J, Gronthos S, Bartold PM (2013): Role of the epithelial cell rests of Malassez in the development, maintenance and regeneration of periodontal ligament tissues. *Periodontol 2000* 63, 217-33

Xu H, Raynal N, Stathopoulos S, Myllyharju J, Farndale RW, Leiting B (2011): Collagen binding specificity of the discoidin domain receptors: binding sites on collagens II and III and molecular determinants for collagen IV recognition by DDR1. *Matrix Biol* 30, 16-26

Xu L, Peng H, Wu D, Hu K, Goldring MB, Olsen BR, Li Y (2005): Activation of the discoidin domain receptor 2 induces expression of matrix metalloproteinase 13 associated with osteoarthritis in mice. *J Biol Chem* 280, 548-55

Xu X, Xu M, Zhou X, Jones OB, Moharomd E, Pan Y, Yan G, Anthony DD, Isaacs WB (2013): Specific structure and unique function define the hemicentin. *Cell Biosci* 3, 27

Yamada KM (1983): Cell surface interactions with extracellular materials. *Annu Rev Biochem* 52, 761-99

Yamaguchi Y, Mann DM, Ruoslahti E (1990): Negative regulation of transforming growth factor-beta by the proteoglycan decorin. *Nature* 346, 281-4

Yanagisawa H, Davis EC, Starcher BC, Ouchi T, Yanagisawa M, Richardson JA, Olson EN (2002): Fibulin-5 is an elastin-binding protein essential for elastic fibre development in vivo. *Nature* 415, 168-71

Yousif LF, Di Russo J, Sorokin L (2013): Laminin isoforms in endothelial and perivascular basement membranes. *Cell Adh Migr* 7, 101-10

Zerlin M, Julius MA, Goldfarb M (1993): NEP: a novel receptor-like tyrosine kinase expressed in proliferating neuroepithelia. *Oncogene* 8, 2731-9

Zhang HY, Kluge M, Timpl R, Chu ML, Ekblom P (1993a): The extracellular matrix glycoproteins BM-90 and tenascin are expressed in the mesenchyme at sites of endothelial-mesenchymal conversion in the embryonic mouse heart. *Differentiation* 52, 211-20

Zhang HY, Chu ML, Pan TC, Sasaki T, Timpl R, Ekblom P (1995): Extracellular matrix protein fibulin-2 is expressed in the embryonic endocardial cushion tissue and is a prominent component of valves in adult heart. *Dev Biol* 167, 18-26

Zhang HY, Timpl R, Sasaki T, Chu ML, Ekblom P (1996): Fibulin-1 and fibulin-2 expression during organogenesis in the developing mouse embryo. *Dev Dyn* 205, 348-64

Zhang X, Schuppan D, Becker J, Reichart P, Gelderblom HR (1993b): Distribution of undulin, tenascin, and fibronectin in the human periodontal ligament and cementum: comparative immunoelectron microscopy with ultra-thin cryosections. *J Histochem Cytochem* 41, 245-51

## Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Nicolai Miosge für die außergewöhnlich gute wissenschaftliche Betreuung bei der Entstehung dieser Arbeit und für die Möglichkeit, einen intensiven Einblick in den Arbeitsalltag einer Forschungsgruppe zu erlangen.

Ich danke Herrn PD Dr. med. dent. Nikolaus Gersdorff, der mir die Promotion in der Abteilung erst ermöglicht hat.

Außerdem danke ich Frau Boguslawka Sadowski und Frau Andrea Bernhard für die kompetente Hilfe bei der Durchführung der immunhistochemischen und elektronenmikroskopischen Methoden. Frau Christa Bode danke ich für ihr bemerkenswertes Organisationstalent, das allen Mitarbeitern und Doktoranden ein reibungsloses Arbeiten im Labor ermöglicht.

Ich danke Herrn Hayat Muhammad für seine große Diskussions- und Hilfsbereitschaft, Herrn Dr. med. dent. Boris Schminke für die geduldige Beantwortung fachlicher und methodischer Fragen sowie Herrn Gökhan Cingöz für seine freundliche Hilfe bei technischen Fragestellungen.

Meinen Mitdoktoranden Robert Eschholz und Philipp Buderer danke ich für die gegenseitige Unterstützung und Motivation sowie für die vielen gemeinsamen Stunden im Labor, bei denen stets ein sehr angenehmes Arbeitsklima herrschte.

## Lebenslauf

Am 05.07.1988 wurde ich als zweites von drei Kindern meiner Eltern Cornelia Schubert und Christfried Pumm-Schubert, geborener Pumm, in Lohr am Main geboren. Meine Mutter arbeitet als Lehrerin, mein Vater ist Entwicklungsleiter in einem Maschinenbauunternehmen.

Von 1994 bis 1998 besuchte ich die Grundschule Partenstein. Anschließend trat ich auf das Franz-Ludwig von Erthal-Gymnasium über, an dem ich im Juni 2007 mein Abitur absolvierte. Von August bis Dezember 2004 verbrachte ich ein halbes Schuljahr bei einer Gastfamilie in Tucson, Arizona und besuchte dort die örtliche High-School.

Im April 2008 nahm ich das Studium der Zahnheilkunde an der Georg-August-Universität Göttingen auf. Die naturwissenschaftliche Vorprüfung legte ich im März 2009 ab, das Physikum im August 2010. In den anschließenden Semesterferien begann ich mit meiner Dissertation im Fach Zahnmedizin in der Arbeitsgruppe orale Biologie und Geweberegeneration der Abteilung Prothetik unter der Leitung von Herr Prof. Dr. med. Nicolai Miosge. Das zahnärztliche Staatsexamen absolvierte ich im Juni 2013.