

Aus der Poliklinik für Zahnärztliche Prothetik
(Prof. Dr. R. Bürgers)
im Zentrum Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

Das Vorkommen von Matrinen in dentalen und parodontalen
Geweben der Wildtyp-Maus und der DDR1-Knockout-Maus

INAUGURAL - DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades für Zahnheilkunde

der Medizinischen Fakultät der
Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Robert Eschholz

aus

Olpe

Göttingen 2014

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

I. Berichterstatter: Prof. Dr. Nicolai Miosge

II. Berichterstatter/in: Prof. Dr. Annette Wiegand

III. Berichterstatter/in: Prof. Dr. Martin Oppermann

Tag der mündlichen Prüfung: 13.01.2015

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	VI
1 Einleitung.....	1
1.1 Das Parodontium.....	1
1.1.1 Die Gingiva.....	1
1.1.2 Das Zement.....	2
1.1.3 Der Alveolarknochen.....	4
1.1.4 Das parodontale Ligament.....	4
1.1.4.1 Zelluläre Bestandteile.....	5
1.1.4.2 Komponenten der Extrazellulärmatrix.....	5
1.2 Die Matriline.....	8
1.2.1 Domänen der Matriline: Aufbau und Funktion.....	8
1.2.2 Struktur der Matrilinmoleküle.....	10
1.2.3 Heterogenität der Matrilinoligomere.....	11
1.2.4 Lokalisation von Matrilinen.....	12
1.2.5 Interaktionen der Matriline.....	13
1.2.6 Matriline in Mausmodellen.....	14
1.2.7 Matriline in pathologischen Prozessen.....	15
1.3 Die Discoidin-Domäne-Rezeptoren.....	16
1.3.1 Struktur.....	16
1.3.2 Expression.....	17
1.3.3 Bindung von Kollagenen.....	18
1.3.4 Rezeptoraktivierung.....	18
1.3.5 Interaktion mit anderen Signalwegen.....	19
1.3.6 Funktion.....	19
1.3.6.1 Erkenntnisse aus Erkrankungen.....	19
1.4 Aufgabenstellung.....	21
2 Material und Methoden.....	22
2.1 Versuchstiere.....	22
2.2 Gewebepreparation.....	22

2.3 Gewebefixierung.....	22
2.3.1 Gewebefixierung zur Einbettung in Paraffin.....	23
2.3.2 Gewebefixierung zur Einbettung in Epon.....	23
2.4 Entkalkung.....	23
2.5 Einbettung	24
2.5.1 Einbettung in Paraffin.....	24
2.5.2 Einbettung in Epon.....	26
2.6 Gewebeschnitte.....	27
2.6.1 Gewebeschnitte der Paraffinblöcke	27
2.6.2 Gewebeschnitte der Eponblöcke.....	27
2.7 Hämatoxylin-Eosin-Färbung.....	28
2.8 Immunhistochemie	29
2.8.1 Verwendete Antikörper.....	29
2.8.2 Entparaffinierung und Rehydrierung	30
2.8.3 Protokoll Immunhistochemie.....	31
2.8.4 Dehydrierung der Präparate.....	33
2.8.5 Auswertung der immunhistochemischen Ergebnisse	34
2.9 Richardson-Färbung der Semidünnschnitte	34
2.10 Eindecken der Präparate	34
2.11 Kontrastierung der Ultradünnschnitte	35
2.12 Mikroskopische Auswertung	36
3 Ergebnisse	37
3.1 Dentale und parodontale Gewebe der Wildtyp-Maus und der DDR1-Knockout-Maus.....	37
3.2 Immunhistochemischer Nachweis der Matriline an Molaren in Kiefersegmenten der Wildtyp-Maus.....	41
3.3 Immunhistochemischer Nachweis der Matriline an Molaren in Kiefersegmenten der DDR1-Knockout-Maus.....	49

4 Diskussion	56
4.1 Dentale und parodontale Gewebe der DDR1-Knockout-Maus.....	57
4.2 Matriline in Kiefersegmenten der Wildtyp-Maus	60
4.3 Matriline in Kiefersegmenten der DDR1-Knockout-Maus	64
5 Zusammenfassung	66
6 Anhang	67
6.1 Tabellenverzeichnis	67
6.2 Abbildungsverzeichnis.....	68
7 Literaturverzeichnis	69

Abkürzungsverzeichnis

ADAMTS	<i>a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs</i>
Aqua dest.	destilliertes Wasser
BSA	bovines Serumalbumin
CAP	<i>cementum attachment protein</i>
CD44	<i>cluster of differentiation 44</i>
COMP	<i>cartilage oligomeric matrix protein</i>
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DDR	Discoidin-Domäne-Rezeptor
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
EJXM	extrazelluläre Juxtamembrandomäne
EZM	Extrazellulärmatrix
GVMGFO	Aminosäuresequenz: Glycin-Valin-Methionin-Glycin-Phenylalanin-Hydroxyprolin
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
IJXM	intrazelluläre Juxtamembrandomäne
kDa	Kilodalton
MED	Multiple Epiphyseale Dysplasie
MIDAS	<i>metal ion-dependant adhesion site</i>
MMP13	Matrixmetalloproteinase 13
PDL	parodontales Ligament

Abkürzungsverzeichnis

pH	<i>potentia hydrogenii</i>
RT	Raumtemperatur
SLRP	<i>small reucine-rich proteoglycan</i>
TBS	<i>Tris-buffered saline</i>
TBS-T	<i>Tris-buffered saline</i> und Tween 20
Wnt	<i>wingless integration 1</i>

1 Einleitung

In der vorliegenden Arbeit wird die Struktur der dentalen und parodontalen Gewebe der Wildtyp-Maus und der DDR1-Knockout-Maus vergleichend untersucht. Anschließend werden Matrilin, kollagenbindende Proteine der Extrazellulärmatrix (EZM), in dentalen und parodontalen Geweben der Wildtyp-Maus und der DDR1-Knockout-Maus nachgewiesen.

In der folgenden Einleitung werden die Matrilin, die Discoidin-Domäne-Rezeptoren (DDRs) und das Parodontium, das ein zentrales Untersuchungsgut dieser Arbeit darstellt, beschrieben.

1.1 Das Parodontium

Der Begriff des Parodontiums beschreibt alle den Zahn umfassenden und den Zahn tragenden Gewebe (Nanci und Bosshardt 2006). Es wird durch die beiden Hartgewebe Zement und Alveolarknochen sowie die beiden Weichgewebe Gingiva und parodontales Ligament (PDL) gebildet. Dentales Zement, Alveolarknochen und PDL bilden sowohl entwicklungsgeschichtlich als auch funktionell eine Einheit (Schroeder 2000). Jede parodontale Komponente weist einen besonderen Aufbau und eine charakteristische Struktur auf. Die Funktion des Parodontiums ist nur durch strukturelle Integrität und Interaktion zwischen den parodontalen Komponenten möglich (Nanci und Bosshardt 2006).

1.1.1 Die Gingiva

Die Gingiva ist der Teil der oralen Mukosa, der den Zahnhals und den zahntragenden Teil des Alveolarknochens bedeckt (Cho und Garant 2000) und wird klinisch in interdentale Gingiva, freie marginale und befestigte Gingiva unterteilt. Grundsätzlich beinhaltet die Gingiva epitheliale Strukturen sowie das darunter liegende Bindegewebe.

Das orale Epithel bildet die epitheliale Auskleidung der freien marginalen sowie der befestigten Gingiva (Bartold et al. 2000). Es zeigt den typischen vierschichtigen Aufbau eines verhornten Plattenepithels (Schroeder und Theilade 1966). In

oralem Epithel finden sich neben den strukturgebenden Keratinozyten Langerhans-Zellen (DiFranco et al. 1985), Melanozyten (Barrett und Raja 1997) und Merkel-Zellen (Righi et al. 2006).

Das orale Sulkusepithel stellt die Fortführung des oralen Gingivaepithels in den gingivalen Sulkus dar und bildet dessen laterale epitheliale Auskleidung. Im Gegensatz zum oralen Gingivaepithel verhornt das Plattenepithel des oralen Sulkusepithels nicht (Hassell 1993). Orales Epithel und orales Sulkusepithel sorgen für eine kontinuierliche epitheliale Auskleidung und üben vor allem eine Schutzfunktion aus (Bartold et al. 2000).

Das nicht keratinisierte Saumepithel gestaltet die Anheftung epithelialer Zellen an die Zahnoberfläche ebenso wie zum umliegenden gingivalen Bindegewebe (Hassell 1993). Es bildet mit basalen und suprabasalen Zellen zwei Zellschichten aus, die mit ihrer hohen mitotischen Aktivität stetig in Richtung des Sulkusbodens migrieren (Cho und Garant 2000). Zusätzlich spielt das Saumepithel eine zentrale Rolle in der Wirtsantwort auf bakterielle Infektionen (Page et al. 1997). Dies zeigt sich in der Existenz von Abwehrzellen im Saumepithel entzündeter wie auch gesunder Parodontien (Schroeder und Listgarten 1997).

Die EZM der gingivalen Lamina propria beinhaltet Kollagen I, insbesondere als Bestandteil des suprakrestalen Faserapparats, sowie Kollagen III, IV, V und VI (Narayanan et al. 1983, Romanos et al. 1991). Glykosaminoglykane wie Dermatan sulfat und Chondroitin sulfat (Bartold et al. 1981) und Proteoglykane wie Decorin und Biglykan (Häkkinen et al. 1993) sind ebenfalls Bestandteile des gingivalen Bindegewebes. Die große Anzahl an Blutgefäßen in der Lamina propria zeigt die gute Blutversorgung der Gingiva (Schroeder und Listgarten 1997).

1.1.2 Das Zement

Das Zement ist ein mineralisiertes, nicht vaskularisiertes Gewebe, das die dentalen Wurzeloberflächen bedeckt (Hassell 1993). Gemäß ihrem Gehalt an Zementozyten und Kollagenfasern können generell vier Zementtypen beschrieben werden, die an kennzeichnenden Stellen an der Zahnwurzel vorkommen:

Azelluläres, afibrilläres Zement findet sich in Zementinseln auf zervikalem Schmelz nahe der Schmelz-Zement-Grenze (Hassell 1993). Aufgrund des Fehlens von Zementozyten sowie kollagener Bestandteile erfüllt dieser Zementtyp keine klare Funktion und kann als entwicklungsbedingte Besonderheit gesehen werden (Bosshardt und Selvig 1997).

Azelluläres, fibrilläres Zement bedeckt vor allem das koronale Drittel der Wurzeloberfläche und beinhaltet die desmodontalen kollagenen Faserbündel, die als Sharpey-Fasern in das Zement inserieren. Es sorgt für die Verankerung des Zahns in der Alveole (Cho und Garant 2000).

Zelluläres Eigenfaserzement beinhaltet Zementozyten sowie von Zementoblasten sezernierte kollagene Fasern. Es fungiert vor allem als Reparaturzement (Hassell 1993).

Zelluläres Gemischtfaserzement beinhaltet neben Zementozyten auch von Zementoblasten sezernierte Fasern sowie Sharpey-Fasern desmodontaler Herkunft. Es findet sich interradiikulär und im apikalen Wurzel Drittel (Bosshardt und Selvig 1997).

Apatitkristalle bilden den größten Anteil der anorganischen EZM von dentalem Zement. Die organische Matrix besteht indessen zu großen Teilen aus Kollagen I und geringen Mengen an Kollagen III (Birkedal-Hansen et al. 1977). Glykosaminoglykane und Proteoglykane kommen nur in zellhaltigem Zement sowie in Assoziation mit den kollagenen Sharpey-Fasern vor (Ababneh et al. 1998, Ababneh et al. 1999). Osteonectin, Osteocalcin, Osteopontin und Bone Sialoprotein zeigen sich assoziiert mit Zementoblasten (MacNeil et al. 1995, Takano-Yamamoto et al. 1994). Zusätzlich kann in dentalem Zement das *cementum attachment protein* (CAP), ein kollagenes Attachmentprotein, nachgewiesen werden, das keine Ähnlichkeit mit anderen bekannten Kollagenen oder Attachmentproteinen zeigt (Wu et al. 1996).

1.1.3 Der Alveolarknochen

Der Alveolarknochen sorgt für die knöcherne Verankerung des Zahns (Cho und Garant 2000) und stellt zudem ein dynamisches Gewebe dar, das aufgrund der funktionellen Reize von Zahnbewegungen einem ständigen Remodellierungsprozess unterliegt (Saffar et al. 1997). Der knöcherne Alveolarfortsatz kann in den Alveolarknochen, der dem Zahn zugewandt ist und das knöcherne Zahnfach auskleidet, sowie eine zentrale Spongiosa und eine äußere Kortikalis unterteilt werden (Sodek und McKee 2000).

Der dem Zahn zugewandte Alveolarknochen wird als Bündelknochen beschrieben, in dem einerseits ein zum Zahnfach paralleles System kollagener Fasern besteht und in dem andererseits die kollagenen Fasern des Desmodonts als Sharpey-Fasern inserieren (Nanci und Bosshardt 2006). Der Alveolarkamm stellt die Verbindung von Bündelknochen und äußerer Kortikalis dar (Hassell 1993). Durch die zahlreichen Perforationen des Alveolarknochens besteht eine vaskuläre und nervale Versorgung des Desmodonts (Cho und Garant 2000).

Kollagene machen den größten Anteil der EZM des Alveolarknochens aus. Kollagen I, III, V, VI und XII können im Bündelknochen des Alveolarknochens nachgewiesen werden (Karimbux et al. 1992, Lukinmaa und Waltimo 1992, Wang et al. 1980). Osteopontin, Osteocalcin (Bronckers et al. 1994), Bone Sialoprotein (Chen et al. 1991) und Proteoglykane (Bartold 1990) machen den größten Anteil nicht-kollagener Proteine im Alveolarknochen aus.

1.1.4 Das parodontale Ligament

Das PDL stellt ein hoch spezialisiertes, faserreiches Bindegewebe dar, das sich zwischen Alveolarknochen und dentalem Zement erstreckt. Mit seinem Aufbau wird das Desmodont seiner Hauptaufgabe, der Verankerung des Zahns in seiner Alveole, gerecht (Nanci und Bosshardt 2006). Die Faserbündel des PDL zeigen in entspanntem Zustand einen gewellten Verlauf und inserieren als Sharpey-Fasern in die mineralisierte Matrix des Zahnzements sowie des Alveolarknochens (Hassell 1993). Histologisch kann das PDL in drei Regionen eingeteilt werden: Die dem Knochen zugewandte Region ist reich an Zellen und Blutgefäßen, die ze-

mentnahe Seite ist durch dichte, gut geordnete Kollagenbündel charakterisiert, während die mittlere Zone eher dünne Kollagenfasern und wenige Zellen beinhaltet (Cho und Garant 2000).

Das PDL steht in der vorliegenden Arbeit im Zentrum der strukturellen Untersuchung der dentalen und parodontalen Gewebe der Wildtyp-Maus und der DDR1-Knockout-Maus. Zelluläre Komponenten und die Bestandteile der EZM des PDL werden somit im Folgenden detailliert beschrieben.

1.1.4.1 Zelluläre Bestandteile

Fibroblasten bilden den größten zellulären Anteil des PDL (Beertsen 1975) und sind im histologischen Bild mit ihren Zelleibern parallel zur Richtung der desmodontalen Kollagenfasern ausgerichtet (Beertsen et al. 1997). Im elektronenmikroskopischen Bild stellen sich Fibroblasten des PDL mit einem großen Anteil an endoplasmatischem Retikulum dar (Cho und Garant 2000). Die hohe Proteinsyntheseleistung der desmodontalen Fibroblasten zeigt sich in einem im Vergleich mit anderen Bindegeweben ungewöhnlich hohen Kollagenturnover (Sodek 1977). *In-vitro*-Experimente belegen, dass desmodontale Fibroblasten durch Zugbelastungen, ähnlich der Belastung bei Mastikation, zur Synthese von Kollagen I stimuliert werden (Howard et al. 1998).

Undifferenzierte, mesenchymale Zellen stellen Progenitorzellen des PDL dar, die sich in Osteoblasten, Zementoblasten und desmodontale Fibroblasten differenzieren können (Roguljic et al. 2013). Die Funktion epithelialer Zellen der Malassez-Epithelreste im Desmodont ist unklar, sie scheinen jedoch eine einzigartige Stammzellpopulation innerhalb des PDL darzustellen (Xiong et al. 2012).

Außerdem beinhaltet das PDL Osteoblasten, Osteoklasten, Monozyten, Zementoblasten und Odontoklasten (Nanci und Bosshardt 2006).

1.1.4.2 Komponenten der Extrazellulärmatrix

Die Komponenten der parodontalen EZM lassen sich in kollagene und nicht-kollagene Bestandteile unterteilen.

Kollagene Komponenten

Die desmodontalen Hauptfasern bestehen aus Kollagen I und Kollagen III (Huang et al. 1991). Kollagen V kann ebenfalls als Bestandteil des desmodontalen Faserapparats nachgewiesen werden. Einerseits zeigt sich Kollagen V mit Kollagen I assoziiert in heterotypischen Filamenten der Kollagenfasern (Birk et al. 1988), andererseits kann Kollagen V in Bereichen zwischen den kollagenen Hauptfasern nachgewiesen werden (Becker et al. 1991). Der Anteil von Kollagen V hat einen modulierenden Einfluss auf den Durchmesser der Hybridfibrillen (Adachi und Hayashi 1986).

Als fibrillenassoziiertes Kollagen kann Kollagen XII ebenso im Desmodont nachgewiesen werden (Karimbux et al. 1992) und ist für die Entwicklung eines regulären desmodontalen Faserapparats essentiell (Reichenberger et al. 2000). Neben der Entwicklung des kollagenen Faserapparats spielt Kollagen XII zusammen mit Kollagen I auch in der desmodontalen Regeneration als Antwort auf orthodontische Zahnbewegung eine Rolle (Karimbux und Nishimura 1995).

Das fibrillenassoziierte Kollagen XIV kann ebenfalls in Assoziation mit den kollagenen Hauptfasern aus Kollagen I, III und V gefunden werden (Zhang et al. 1993).

Kollagen VI ist hingegen in einem mikrofibrillären Netzwerk im Desmodont vertreten (Becker et al. 1991), das mit Oxytalanfasern assoziiert ist. Oxytalanfasern weisen einen Aufbau aus Mikrofibrillen auf (Cotta-Pereira et al. 1976) und zeigen mit ihren Hauptfasern eine Orientierung in koronal-apikaler Richtung (Sims 1973). Oxytalanfasern verbinden das dentale Zement mit weiter apikal liegenden Blutgefäßen (Sims 1975).

Nicht-kollagene Komponenten

Zu den nicht-kollagenen Proteinen der EZM des PDL zählen Glykoproteine, Glykosaminoglykane und Proteoglykane.

Die Glykoproteine Fibronectin (Connor et al. 1984) und Vitronectin (Matsuura et al. 1995) sind im PDL weit verbreitet. Hingegen sind Tenascin (Lukinmaa et al. 1991), Osteonectin und Bone Sialoprotein (Matsuura et al. 1995) insbesondere in den At-

tachmentzonen von Desmodont und Knochen sowie Desmodont und Zement nachweisbar. Laminine sind Bestandteile von Basalmembranen desmodontaler Blutgefäße. Zusätzlich sind Integrine wie Integrin alpha2beta1 an Zelloberflächen desmodontaler Fibroblasten nachweisbar (Steffensen et al. 1992).

Im Allgemeinen zeigen im PDL nachweisbare Glykoproteine Interaktionen mit kollagenen Bestandteilen der EZM. Während Integrin alpha2beta1 generell als Kollagenrezeptor fungiert (Staatz et al. 1990), beeinflusst der Tenascin-X-Subtyp *in vitro* die Expression von Kollagen VI (Minamitani et al. 2004). Zudem modulieren Osteonectin (Rentz et al. 2007) und Fibronectin (Speranza et al. 1987) *in vitro* die Ausbildung von Kollagen I-Fibrillen.

Im PDL finden sich die Glykosaminoglykane Chondroitinsulfat, Dermatansulfat, Hyaluronsäure und Heparansulfat (Munemoto et al. 1970).

Neben Versican, einem großen, Chondroitinsulfatseitenketten beinhaltenden Proteoglykan (Häkkinen et al. 1993, Zimmermann und Ruoslahti 1989), sind im PDL vor allem *small leucine-rich proteoglycans* (SLRPs), also Proteoglykane, die aus einem leucinreichen Kernprotein bestehen, nachweisbar. Decorin, Biglykan (Häkkinen et al. 1993) sowie Lumican und Fibromodulin (Matheson et al. 2005) sind Bestandteile der desmodontalen EZM. Als Zelloberflächen-assoziierte Proteoglykane können sowohl Syndecan-1 und -2 (Worapamorn et al. 2002) als auch CD44 (Häkkinen et al. 1993) im PDL nachgewiesen werden.

Lumican, Fibromodulin und Decorin beeinflussen die Ausbildung parodontaler Kollagenfibrillen (Matheson et al. 2005). Zudem spielt Biglykan in der Fibrillogene-
se in Sehnen eine entscheidende Rolle (Zhang et al. 2006). Decorin interagiert zusätzlich mit Kollagen VI-Mikrofibrillen (Bidanset et al. 1992). Des Weiteren zeigt das integrale Membranproteoglykan Syndecan *in vitro* eine Bindungsaffinität zu Kollagen I (Sanderson et al. 1992).

Da in der vorliegenden Arbeit Matrilin in dentalen und parodontalen Geweben der Maus nachgewiesen werden, wird im Folgenden die Familie der Matrilin näher beschrieben.

1.2 Die Matriline

Matriline sind nicht-kollagene Glykoproteine der EZM, die als Matrilin-1 (Paulsson und Heinegård 1981), -2 (Deák et al. 1997), -3 (Wagener et al. 1997) und -4 (Wagener et al. 1998b) einer Proteinfamilie angehören. In Abhängigkeit vom Entwicklungsstand eines Individuums können Matriline in der EZM unterschiedlicher Gewebe nachgewiesen werden (Klatt et al. 2002).

1.2.1 Domänen der Matriline: Aufbau und Funktion

Als Proteine gleicher Herkunft bestehen Matriline aus ähnlichen Domänen, deren Anzahl sich je nach Matrilinform unterscheidet: von-Willebrand-Faktor-A-ähnlichen Domänen, *epidermal growth factor* (EGF)-ähnlichen Domänen und c-terminalen Alphahelices.

Von-Willebrand-Faktor-A-ähnliche Domänen sind nicht nur in Matrilinen (Kiss et al. 1989) zu finden, sondern unter anderem auch als von-Willebrand-Faktor im Blutgerinnungssystem (Sadler et al. 1985), als Domänen nicht-fibrillärer Kollagene (Chu et al. 1990), in Proteinen des Komplementsystems (Hinshelwood et al. 1999) oder in Integrin alpha-Untereinheiten (Calderwood et al. 1997). Diese Domänen zeigen die Fähigkeit, Proteine der EZM wie fibrilläre Kollagene (Pareti et al. 1987), Hyaluronsäure (Kielty et al. 1992) oder Proteoglykane (Paulsson und Heinegård 1979) zu binden. Die Existenz von je einer *metal ion-dependent adhesion site* (MIDAS)-Sequenz in den von-Willebrand-Faktor-A-ähnlichen Domänen der Matriline unterstützt die Annahme einer dortigen kationenabhängigen Bindung von EZM-Komponenten (Chen et al. 1999). Neben der Bindung von Komponenten der EZM ermöglichen die von-Willebrand-Faktor-A-ähnlichen Domänen eine Filamentbildung der Matriline (Chen et al. 1995) sowie zusammen mit der c-terminalen Alphahelix die Ausbildung von Oligomeren (Zhang et al. 2008).

EGF-ähnliche Domänen beinhalten unter anderem eine kalziumbindende Struktur, die für die Protein-Protein-Interaktion EGF-ähnlicher Domänen essentiell ist (Handford et al. 1991). Den EGF-ähnlichen Domänen der Matriline fehlen in ihrer Primärstruktur essentielle Basen für diese Kalziumbindung (Wagener et al. 1997), weshalb Interaktionen über die EGF-ähnlichen Domänen in Matrilinen nicht erfol-

gen. Die EGF-ähnlichen Domänen haben darüber hinaus keinen Einfluss auf die Oligomerbildung der Matrilin (Zhang und Chen 2000). Es liegt die Vermutung nahe, dass die EGF-ähnlichen Domänen in Matrilinen vor allem als Abstandhalter zwischen den von-Willebrand-Faktor-A-ähnlichen Strukturen fungieren (Deák et al. 1999).

Am c-terminalen Ende eines Matrilinmoleküls finden sich fünf Heptadensequenzen, die in einer alpha-helikalen Sekundärstruktur mit gleichartigen Sequenzen coiled-coil-Strukturen ausbilden können (Dames et al. 1998). Als Oligomerisationsdomänen befähigen sie Matrilin, sowohl Homo- als auch Heterooligomere auszubilden. Diese werden über Disulfidbrücken zwischen zwei c-terminalen Cysteinen stabilisiert, die den Heptadensequenzen der Alphahelix direkt vorgeschaltet sind (Beck et al. 1996, Wu und Eyre 1998). Ionische Wechselwirkungen zwischen den Matrilinmolekülen, die aus der besonderen Anordnung von Ladungen der Aminosäuren innerhalb der Heptaden resultieren, modulieren zusätzlich die Ausbildung von Oligomeren (Beck et al. 1997).

Phylogenetische Analysen weisen auf eine gemeinsame Abstammung aller Matrilin von einem Vorläufermolekül hin. Innerhalb der von-Willebrand-Faktor-A-ähnlichen Strukturen weisen die n-terminale Faktor-A-Struktur von Matrilin-1 und die Faktor-A-Struktur von Matrilin-3 sowie beide Faktor-A-ähnlichen Strukturen von Matrilin-2 und Matrilin-4 die größten Übereinstimmungen auf (Deák et al. 1999).

1.2.2 Struktur der Matrilinmoleküle

Matrilin-1 wurde zunächst als *cartilage matrix protein* (CMP), gebunden an Proteoglykane in fetalem Knorpel der Rindertrachea, beschrieben (Paulsson und Heinegård 1979). Ein murines Matrilin-1-Molekül hat ein Molekulargewicht von 52 kDa (Paulsson und Heinegård 1981) und beinhaltet ein n-terminales Signalpeptid, zwei von-Willebrand-Faktor-A-ähnliche Strukturen, die durch eine zentrale EGF-ähnliche Domäne getrennt sind, sowie eine c-terminale Alpha-helix (Aszódi et al. 1996, Jenkins et al. 1990, Kiss et al. 1989).

Mit einem Molekulargewicht von 104 kDa in der Maus ist Matrilin-2 das größte Matrilinmolekül (Piecha et al. 1999) und unterscheidet sich durch seine zehn EGF-ähnlichen Domänen sowie eine eigene kennzeichnende Sequenz von den anderen Matrilinformen (Deák et al. 1997, Muratoglu et al. 2000). Alternatives Spleißen in der eigenen, kennzeichnenden Sequenz des Matrilin-2-Moleküls resultiert in zwei Proteinvarianten, deren jeweiliges Vorkommen die Oligomerbildung und die posttranslationale Modifikation von Matrilin-2 beeinflusst (Li et al. 2012).

Im Vergleich zu Matrilin-1, -2 und -4 fehlt Matrilin-3 die zweite von-Willebrand-Faktor-A-ähnliche Struktur (Belluoccio und Trueb 1997, Belluoccio et al. 1998, Wagener et al. 1997) und beinhaltet vier EGF-ähnliche Sequenzen. Matrilin-3 weist zudem, ebenso wie Matrilin-2 (Deák et al. 1997), im Anschluss an das n-terminale Signalpeptid eine positiv geladene Sequenz auf (Wagener et al. 1997). In der Maus besitzt ein Matrilin-3-Molekül ein Molekulargewicht von 49 kDa (Wagener et al. 1997).

Ein Matrilin-4-Molekül beinhaltet ebenfalls vier EGF-ähnliche Domänen und besitzt in der murinen Form ein Molekulargewicht von 66 kDa. Während in der Maus Splicingvarianten auftreten, in denen die n-terminale Faktor-A-Domäne fehlt (Wagener et al. 1998b), existieren im Menschen Varianten, in denen lediglich drei, zwei oder eine EGF-ähnliche Domäne vorhanden sind (Wagener et al. 1998a).

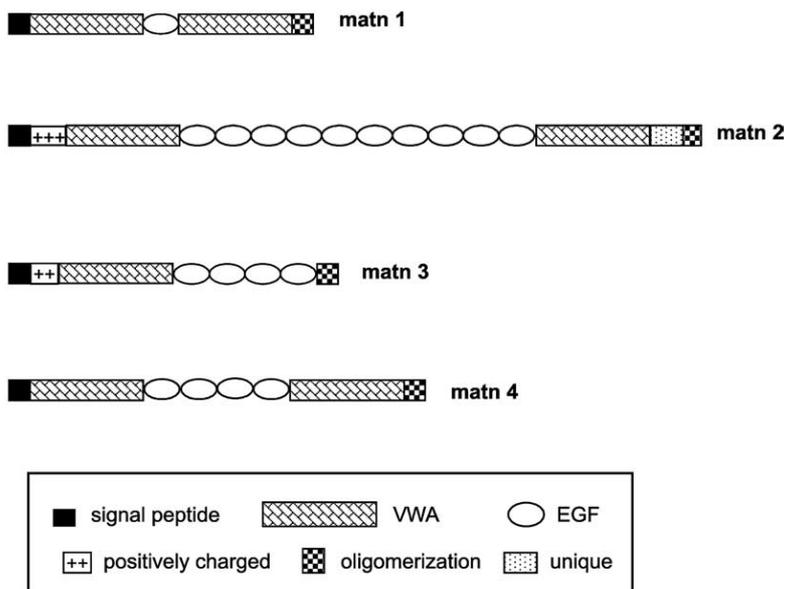


Abbildung 1: Struktur der Matrilinmoleküle (modifiziert nach Wagener et al. 2005, S. 3324).

Die Matrilinmoleküle Matrilin-1, -2, -3 und -4 (matn 1, matn 2, matn 3, matn 4) setzen sich aus von-Willebrand-Faktor-A-ähnlichen Domänen (VWA), aus EGF-ähnlichen Domänen (EGF), aus Oligomerisationsdomänen (*oligomerization*) und aus eigenen, kennzeichnenden Sequenzen (*unique*) zusammen. Alle Matrilinformen beinhalten ein n-terminales Signalpeptid (*signal peptide*). Matrilin-2 und Matrilin-3 beinhalten zudem im Anschluss an das Signalpeptid eine positiv geladene Sequenz (*positively charged*).

1.2.3 Heterogenität der Matrilinoligomere

Während Matrilin-1 im Gewebe vergleichsweise homogen als Trimer zu finden ist (Paulsson und Heinegård 1981), zeigen Matrilin-2 (Deák et al. 1997), -3 (Wagener et al. 1997) und -4 (Klatt et al. 2001) *in vivo* bezüglich der Oligomerbildung eine Heterogenität. Die Region zwischen von-Willebrand-Faktor-A-ähnlicher Domäne und coiled-coil-Domäne ist eine Region, die in allen Matrilinen eine potentielle Prozessierungsstelle darstellt (Ehlen et al. 2009, Klatt et al. 2001, Zhang et al. 2008). *In-vitro*-Untersuchungen belegen eine mögliche Prozessierung von Matrilin-3 und -4 durch die Aggrecanasen ADAMTS4 und ADAMTS5 (Ehlen et al. 2009). *In vivo* ist ADAMTS5 an der intrazellulären Prozessierung von Matrilin-4 beteiligt (Groma et al. 2011). Weitere Möglichkeiten, die zur Heterogenität der Matrilin im Gewebe beitragen können, sind eine unvollständige Oligomerisierung

der Untereinheiten (Zhang und Chen 2000) sowie alternatives Spleißen (Li et al. 2012).

1.2.4 Lokalisation von Matrilinen

Matrilin zeigen während der Embryonalentwicklung eine weite Lokalisation. Matrilin-1 (Mundlos und Zabel 1994), -2 (Deák et al. 1997), -3 (Kleemann-Fischer et al. 2001) und -4 (Klatt et al. 2002) sind in den knorpeligen Embryonalanlagen der Extremitäten nachweisbar. In embryonalem Schädelknochen können ebenfalls alle Matrilin lokalisiert werden (Klatt et al. 2002). Im Gegensatz zu Matrilin-1 und Matrilin-3 ist Matrilin-2 nicht innerhalb des Mesenchyms embryonaler Extremitäten zu finden, sondern in Mesenchym, welches die embryonalen Anlagen umschließt (Segat et al. 2000).

Matrilin-3 ist zusammen mit Matrilin-1 im embryonalen Ileum nachweisbar, ist sonst jedoch embryonal wie postnatal vornehmlich in skelettalen Strukturen lokalisiert (Klatt et al. 2000, Klatt et al. 2002). Hingegen kommt Matrilin-1 während der Embryonalentwicklung zusätzlich transient im Herzen, an Bänderinsertionsstellen in den Knochen sowie in der Haut vor (Segat et al. 2000) und kann in Retinaschichten von Mensch- und Hühnerembryonen nachgewiesen werden (Mundlos und Zabel 1994, Tsonis und Goetinck 1988). Matrilin-2 und Matrilin-4 zeigen eine weite extraskelettale Verteilung in embryonalen Geweben. Sie sind in der Haut sowie im Stroma embryonaler Organe wie Lunge und Niere nachweisbar (Klatt et al. 2002). Darüber hinaus ist Matrilin-4 als am weitesten verbreitete Matrilinform in embryonalem Gehirnmesenenchym und Somiten vertreten (Klatt et al. 2001).

Alle Matrilin sind zudem in Epiphysenknorpel nachweisbar. Sie weisen hier in ihrer Verteilung neben Überlappungen auch Unterschiede auf. Dies deutet auf eine unterschiedliche Expression während der Differenzierung von Chondrozyten in Wachstumsknorpel hin. Matrilin-1 kann sowohl in der Reservezone als auch in der proliferativen Zone und der oberen hypertrophen Zone von Wachstumsfugen nachgewiesen werden (Aszódi et al. 1996, Klatt et al. 2002). Im Vergleich zu Matrilin-1 ist das Auftreten von Matrilin-2 in der Reservezone geringer, Matrilin-4 hingegen weist eine geringere Expression in der oberen hypertrophen Zone auf (Klatt

et al. 2002). Die Verteilung von Matrilin-3 in der Epiphyse ähnelt der von Matrilin-1. Die Ausbildung von Heterooligomeren aus Matrilin-1 und Matrilin-3 zeigt deren Koexpression in der Epiphyse (Wu und Eyre 1998). Auf mRNA- (Zhang und Chen 2000) sowie auf Proteinebene (Klatt et al. 2002) bestehen jedoch ebenfalls Unterschiede in der Verteilung.

Nach der Geburt sind Matrilin-1 (Paulsson und Heinegård 1981) und Matrilin-3 (Wagener et al. 1997) in der EZM von Knorpelstrukturen nachweisbar. Während Matrilin-1 in Knorpelstrukturen, die lebenslang Knorpel bleiben, fortdauernd vertreten ist, ist das Auftreten von Matrilin-3 in diesen Strukturen mit der Geburt beginnend verringert (Klatt et al. 2002). Komplementär dazu findet sich Matrilin-2 postnatal in skelettalen Strukturen im Perichondrium, im Periost und in der Osteoblastenschicht trabekulären Knochens (Deák et al. 1997).

Im Gegensatz zu Matrilin-1, das lediglich im Auge adulter Mäuse nachweisbar ist (Aszódi et al. 1996), zeigen Matrilin-2 und Matrilin-4 in extraskelettalen Strukturen postnatal eine weite Verteilung. Matrilin-2 und Matrilin-4 sind unter anderem in lockerem Bindegewebe, in straffem Bindegewebe, in glatter Muskulatur, Herzmuskulatur sowie in neuralen Strukturen nachweisbar (Deák et al. 1997, Klatt et al. 2001, Piecha et al. 1999). Während Matrilin-4 in den Anlagen der Inzisivi nachgewiesen werden kann (Klatt et al. 2001), zeigt sich Matrilin-2 im in Entwicklung befindlichen PDL der Inzisivi neugeborener Mäuse (Piecha et al. 1999). Im menschlichen Zahn ist Matrilin-2 in der gesamten Pulpa nachweisbar. Das Vorkommen von Matrilin-4 ist in der menschlichen Pulpa indessen auf den Odontoblastensaum beschränkt (Chen et al. 2011).

1.2.5 Interaktionen der Matriline

Matrilin-1 (Chen et al. 1999), -2 (Piecha et al. 1999), -3 (Klatt et al. 2000) und -4 (Klatt et al. 2001) bilden in der EZM filamentöse Netzwerke aus. Filamente von Matrilin-1 und Matrilin-3 sind *in vitro* sowohl kollagenabhängiger als auch kollagenunabhängiger Beschaffenheit (Chen et al. 1999, Klatt et al. 2000).

Kollagene Strukturen sind bedeutende Bindungspartner aller Matriline. Die vornehmlich in Knorpelstrukturen vorkommenden Matrilin-1 (Winterbottom et al.

1992) und Matrilin-3 binden an Kollagen II-Filamente (Fresquet et al. 2007). Matrilin-1 ist sogar als integrale Komponente an deren Aufbau beteiligt (Winterbottom et al. 1992). Im Gegensatz dazu interagiert Matrilin-2, das eine breite Verteilung in faserreichen Bindegeweben zeigt, mit Kollagen I (Piecha et al. 2002).

Matrilin-1 (Fresquet et al. 2010), -3 (Budde et al. 2005) und -4 (Brachvogel et al. 2013) zeigen Bindungsaffinitäten zu Kollagen IX. Zusätzlich bindet Matrilin-1 über einen Komplex mit Decorin oder Biglykan an Kollagen VI. Aufgrund der gleichzeitigen Affinität von Matrilin-1 zu Kollagen II kann dieser Komplex zur Vernetzung von Kollagen VI-Mikrofibrillen und Kollagen II-Filamenten führen. Matrilin-3 und Matrilin-4 sind ebenfalls in Komplexen mit Decorin oder Biglykan und Kollagen VI zu finden (Wiberg et al. 2003).

Matriline interagieren ebenfalls mit nicht-kollagenen Bestandteilen der EZM. Matrilin-1 formiert mit dem Proteoglykan Aggrecan kovalente Bindungen, deren Anzahl sich mit steigendem Alter des Knorpelgewebes erhöht (Hauser et al. 1996). Über Integrin $\alpha 1\beta 1$ interagiert Matrilin-1 *in vitro* mit Chondrozyten und Fibroblasten und moduliert so Zelladhäsion und Zellausbreitung (Makihira et al. 1999). Matrilin-1, -3 und -4 weisen außerdem Bindungsaffinitäten zum *cartilage oligomeric matrix protein* (COMP) auf (Mann et al. 2004). Matrilin-2 zeigt hingegen *in vitro* Fähigkeiten zur Bindung von Fibronectin, Fibrillin-2 und zur Bildung von Komplexen mit Laminin-1 und Nidogen-1 (Piecha et al. 2002).

Aufgrund der Fähigkeit, filamentöse Netzwerke zu bilden und kollagene wie nicht-kollagene Bestandteile der EZM zu binden, können Matriline die strukturellen Bestandteile der EZM verknüpfen.

1.2.6 Matriline in Mausmodellen

Knockout-Versuche an Mäusen zeigen, dass Matrilin-1 (Aszódi et al. 1999), -2 (Mátés et al. 2004) und -3 (Ko et al. 2004) ohne Effekt für die skelettale Entwicklung sind. Bezüglich Matrilin-4 sind keine Knockout-Versuche publiziert. Das Fehlen eines Matrilins wird nicht durch eine vermehrte Expression der anderen Matrilinformen kompensiert (Ko et al. 2004).

Ultrastrukturell weisen Matrilin-1-Knockout-Mäuse interessanterweise in Epiphysenknorpel dickere Kollagen II-Fibrillen auf, denen im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen die netzwerkähnliche Organisation fehlt. Ein funktioneller Knockout des Matrilin-3-Gens in Mäusen scheint die Differenzierung embryonaler Knorpelzellen und die Knochendichte adulter Knockout-Mäuse zu beeinflussen sowie in einer erhöhten Prävalenz von Osteoarthritis bei Fehlen eines funktionalen Proteins zu resultieren (Nicolae et al. 2007).

1.2.7 Matrilin in pathologischen Prozessen

Matrilin-1 und Matrilin-3 spielen in der Pathologie entzündlicher Gelenkerkrankungen eine Rolle. In arthrotischem Knorpel ist die Expression von Matrilin-1 (Okimura et al. 1997) wie auch von Matrilin-3 (Pullig et al. 2002) im Vergleich zu gesundem Knorpel erhöht. Darüber hinaus ist Matrilin-1 im Serum von Patienten mit rezidivierender Polychondritis nachweisbar (Saxne und Heinegård 1995). Die von-Willebrand-Faktor-A-ähnliche Domäne aus Matrilin-3 fördert *in vitro* in Chondrozyten die Expression von Osteoarthritis-assoziierten Genen (Klatt et al. 2009), insbesondere die Ausschüttung von Interleukin-6 (Klatt et al. 2013).

Mutationen im für die von-Willebrand-Faktor-A-Struktur des Matrilin-3 kodierenden Genlokus können zur Ausbildung des Krankheitsbilds einer Multiplen Epiphysalen Dysplasie (MED) führen, einer Osteochondrodysplasie, die durch früh einsetzende Osteoarthritis und irreguläre Verknöcherung im Bereich der Epiphysen charakterisiert ist (Chapman et al. 2001, Unger et al. 2001). Mutationen, die zu einer MED führen, betreffen Basen des Matrilin-3-Gens, die für die Ausbildung der Sekundärstruktur der von-Willebrand-Faktor-A-ähnlichen Domäne essentiell zu sein scheinen (Mabuchi et al. 2004). Eine intrazelluläre Akkumulation der falsch gefalteten Proteine im rauen endoplasmatischen Retikulum und eine gestörte Differenzierung der epiphysalen Chondrozyten ist die Folge (Leighton et al. 2007). Mutationen im Matrilin-3-Gen sind außerdem mit dem Auftreten einer Bilateralen Hereditären Mikroepiphysalen Dysplasie (Mostert et al. 2003) und einer idiopathischen Handosteoarthritis (Stefánsson et al. 2003) assoziiert.

Matrilin-2 kann hingegen im Zuge regenerativer Prozesse nachgewiesen werden. Es zeigt sich in Assoziation mit der Regeneration peripherer Nerven (Malin et al. 2009), in Wundheilung (Ichikawa et al. 2008) und Leberregeneration (Szabó et al. 2007). Im Pulpa-Dentin-Komplex kann Matrilin-2 zusammen mit Matrilin-4 in der Gewebsantwort auf einen kariösen Reiz nachgewiesen werden (Chen et al. 2011).

Matrilin-4 zeigt sich in Umbauprozessen der EZM. Es kann während des fibrotischen Umbaus der Herzmuskulatur nach myokardialer Ischämie nachgewiesen werden (Barallobre-Barreiro et al. 2012) und spielt in Reorganisationsprozessen des Stromas bei kornealen Typ I-Dystrophien eine Rolle (Szalai et al. 2012).

Im Folgenden wird die Familie der DDRs beschrieben. Ihre Funktion wird in der vorliegenden Arbeit anhand eines Knockout-Modells in dentalen und parodontalen Geweben der Maus näher untersucht.

1.3 Die Discoidin-Domäne-Rezeptoren

Die Familie der DDRs umfasst die Rezeptortyrosinkinasen DDR1 und DDR2 (Johnson et al. 1993), deren charakteristische extrazelluläre Discoidin-Domäne eine Homologie zu Discoidin I, einem Lectin aus dem Schleimpilz *Dictyostelium discoideum* (Poole et al. 1981), zeigt.

1.3.1 Struktur

DDRs sind Rezeptortyrosinkinasen, die aus sechs Proteindomänen bestehen. Die n-terminale, extrazelluläre Discoidin-Domäne beinhaltet kollagenbindende Regionen für sowohl fibrilläre als auch nicht-fibrilläre Kollagene (Xu et al. 2011). Es folgt eine Discoidin-ähnliche Domäne, die an der kollageninduzierten Rezeptoraktivierung beteiligt ist (Carafoli et al. 2012). Die Discoidin-ähnliche Domäne und die darauf folgende extrazelluläre Juxtamembrandomäne (EJXM) beinhalten Glykosylierungsstellen (Carafoli und Hohenester 2013). Die EJXM-Domäne stellt die Verbindung zur Transmembrandomäne des Proteins her und fungiert als Angriffsstelle für membranständige Matrixmetalloproteinasen. Im Zuge dieses sogenannten *sheddings* kann die kollageninduzierte Aktivierung der Rezeptortyrosinkinase re-

guliert werden (Fu et al. 2013b). Die Transmembrandomäne ist für die Ausbildung ligandenunabhängiger Dimere essentiell und spielt mit ihrer Leucin-Zipper-Region eine Rolle in der Rezeptoraktivierung (Noordeen et al. 2006). Die intrazelluläre Juxtamembrandomäne (IJXM) als Verbindung der Transmembrandomäne mit der Kinasedomäne stellt mit ihren Tyrosinbasen Bindungsstellen für Effektoren dar, die essentiell für die Signaltransduktion sind (Fu et al. 2013a). Es folgt die katalytische Kinasedomäne sowie ein kurzer c-terminaler Schwanz (Valiathan et al. 2012).

Die Untergruppe der DDR1 umfasst fünf Isoformen. Die Isoformen DDR1a, DDR1b und DDR1c sind funktionale Rezeptortyrosinkinasen, die sich durch alternatives Spleißen in der IJXM-Domäne, beziehungsweise der Kinasedomäne unterscheiden (Playford et al. 1996). Im Gegensatz dazu stellen DDR1d und DDR1e inaktive Rezeptortyrosinkinasen dar (Alves et al. 2001). Die DDR2-Untergruppe wird lediglich durch ein Protein repräsentiert (Valiathan et al. 2012).

1.3.2 Expression

Während der Embryonalentwicklung ist DDR1 vor allem in Gehirn, aber auch in embryonalen Organen, skelettalen Strukturen und interessanterweise auch in den Zahnanlagen nachweisbar (Sánchez et al. 1994). In der frühen Mausentwicklung wird DDR1 besonders von neuroektodermalen Zellen exprimiert (Zerlin et al. 1993). In adultem Gewebe kann DDR1 insbesondere in Gehirn, Lunge, Placenta und Niere lokalisiert werden (Di Marco et al. 1993, Perez et al. 1994). DDR2 zeigt sich in embryonalen wie adulten neuralen Geweben (Lai und Lemke 1994) und kann darüber hinaus vor allem in adulten Geweben wie Herz und Lunge, aber auch in Niere, Placenta, Leber und Skelettmuskel nachgewiesen werden (Karn et al. 1993).

DDR1 ist in maligne entarteten Geweben epithelialen Ursprungs überexprimiert (Alves et al. 1995). Dies weist auf eine mögliche Rolle in der Tumorentwicklung hin. DDR1 ist unter anderem in Bronchialkarzinomen (Ford et al. 2007), Gehirntumoren (Weiner et al. 2000) und serösen Ovarialkarzinomen hochreguliert (Quan et al. 2011). Eine hohe Expression von DDR2 zeigt sich in malignen Tumoren wie

Mammakarzinomen (Ren et al. 2013), Schilddrüsenkarzinomen (Rodrigues et al. 2007) und in Hodgkin-Lymphomen (Willenbrock et al. 2006).

1.3.3 Bindung von Kollagenen

DDRs werden durch Kollagen I, II, III und V aktiviert (Shrivastava et al. 1997). Während DDR1 zusätzlich Kollagen IV (Vogel et al. 1997) und Kollagen VIII (Hou et al. 2001) bindet, zeigt DDR2 Bindungsaffinität für Kollagen X (Leitinger und Kwan 2006). Die Ausbildung der nativen, tripel-helikalen Form fibrillärer Kollagene ist für die Aktivierung der DDRs essentiell (Vogel et al. 1997).

DDR1 und DDR2 interagieren mit Kollagen II und III an dessen GVMGFO-Motiv (Xu et al. 2011). Osteonectin (Giudici et al. 2008) und von-Willebrand-Faktor (Lisman et al. 2006) binden an mit dem GVMGFO-Motiv überlappenden Domänen. Darüber hinaus weist DDR2 an fibrillären Kollagenen weitere Bindungsstellen auf (Konitsiotis et al. 2008). Da das GVMGFO-Motiv nicht in Kollagen IV vorhanden ist (Parkin et al. 2011), bindet DDR1 hier ebenfalls anderweitig.

1.3.4 Rezeptoraktivierung

DDR1 liegt ligandenunabhängig in Dimeren vor (Abdulhusein et al. 2008), deren Ausbildung für die Interaktion mit extrazellulären Kollagenen wichtig zu sein scheint (Leitinger 2003). Eine Aktivierung der DDRs führt zu einer Autophosphorylierung, welche, verglichen mit anderen Rezeptortyrosinkinasen wie dem EGF-Rezeptor (Dengjel et al. 2007), ungewöhnlich langsam und lang andauernd ist (Vogel et al. 1997). Experimente mit dem Tyrosinphosphataseinhibitor Pervanadat weisen auf eine mögliche Relevanz der Aktivität von Phosphatasen für die Phosphorylierung von DDR1 hin (L'hôte et al. 2002). Darüber hinaus stellt die endozytotische Aufnahme kollagenaktivierter Rezeptortyrosinkinasen und deren anschließende Rückführung in die Zellmembran einen wichtigen Schritt in der Autophosphorylierung dar (Mihai et al. 2009).

1.3.5 Interaktion mit anderen Signalwegen

Die Phosphorylierung von DDR1 ist in epithelialen Brustzellen abhängig vom Wnt5a/Frizzled-Signalweg (Jönsson und Andersson 2001). DDR1 zeigt des Weiteren eine Interaktion mit dem Notch-Signalweg (Kim et al. 2011) und interagiert in glatten Muskelzellen mit dem Src-Signalweg (Lu et al. 2011). DDR2 benötigt ebenfalls die Aktivität von Src, um die maximale Tyrosinphosphorylierung zu erreichen (Ikeda et al. 2002).

Während die kollageninduzierte Aktivierung der Rezeptortyrosinkinasen unabhängig von Integrinen abläuft (Vogel et al. 2000), beeinflussen aktive DDRs die Aktivität von Integrinen (Xu et al. 2012).

1.3.6 Funktion

DDRs modulieren als transmembranöse Rezeptoren zelluläre Aktivitäten wie Adhäsion (Xu et al. 2012), Migration (Herrera-Herrera und Quezada-Calvillo 2012), Differenzierung (Zhang et al. 2011) und Proliferation (Kawai et al. 2012).

1.3.6.1 Erkenntnisse aus Erkrankungen

Mutationen im menschlichen Gen für DDR2 können zur Ausbildung einer Sonderform der Spondylo-Meta-Epiphysealen Dysplasie führen, die durch kurze Gliedmaßen und abnorme Kalzifizierung gekennzeichnet ist (Bargal et al. 2009). DDR1- und DDR2-Knockout-Mäuse sind ebenfalls kleinwüchsig (Labrador et al. 2001, Vogel et al. 2001). Während der Knockout von DDR1 in Kalzifizierungsstörungen der Fibula resultiert (Vogel et al. 2001), führt ein Knockout von DDR2 zu verkürzten Gliedmaßen als Folge einer Chondrozytenproliferationsstörung (Labrador et al. 2001).

Darüber hinaus weisen DDR1- und DDR2-Knockout-Mäuse eine beeinträchtigte Fortpflanzung auf. DDR1-Knockout-Mäuse zeigen Implantationsstörungen der Blastozyste und Laktierungsstörungen der Brustdrüse (Vogel et al. 2001). DDR2-Knockout-Mäuse weisen Ovulationsstörungen (Matsumura et al. 2009) und eine Beeinträchtigung der Spermatogenese auf (Kano et al. 2010).

DDR1-Knockout-Mäuse entwickeln im Kiefergelenk eine Osteoarthritis, die sich ultrastrukturell in einer Desorganisation des Kollagennetzwerks im Knorpel zeigt (Schminke et al. 2014). Außerdem weisen DDR1-Knockout-Mäuse strukturelle Veränderungen sowohl im cochleären System, die zu Innenohrschwerhörigkeit führen (Meyer zum Gottesberge et al. 2008), als auch in der glomerulären Basalmembran der Niere, die in einer Proteinurie resultieren, auf (Gross et al. 2004). Der Knockout von DDR1 führt in an Alport-Syndrom leidenden Mäusen zu einer verzögerten Ausbildung einer renalen Fibrose (Gross et al. 2010). Dagegen sind DDR2-Knockout-Mäuse anfälliger für die Ausbildung einer experimentell induzierten Leberfibrose (Olaso et al. 2011b). In DDR2-Knockout-Mäusen ist zudem die dermale Wundheilung beeinträchtigt (Olaso et al. 2011a).

1.4 Aufgabenstellung

DDRs sind Rezeptortyrosinkinasen, die sowohl Kollagene binden als auch durch fibrilläre Kollagene aktiviert werden. Im Folgenden soll mithilfe eines Knockout-Modells untersucht werden, wie sich das Fehlen des DDR1 auf die Struktur dentaler und parodontaler Gewebe der Maus auswirkt. Insbesondere das PDL, ein hoch spezialisiertes Gewebe, dessen EZM von fibrillären Kollagenen dominiert wird, soll in der Wildtyp-Maus und der DDR1-Knockout-Maus eingehender untersucht werden. Hier kommen neben lichtmikroskopischen auch elektronenmikroskopische Methoden zum Einsatz. Zudem wird die Struktur der weiteren dentalen und parodontalen Gewebe der Wildtyp-Maus und der DDR1-Knockout-Maus lichtmikroskopisch vergleichend untersucht.

Matriline sind Proteine der EZM, die in Wachstumsprozessen, insbesondere während der Embryonalentwicklung und im Wachstumsknorpel, eine Rolle spielen. Sie zeigen filamentbildende sowie kollagenbindende Eigenschaften. In diesem Zusammenhang stellt sich die Frage, ob anhand immunhistochemischer Methoden Matriline in der hauptsächlich aus Kollagenen bestehenden EZM dentaler und parodontaler Gewebe der Wildtyp-Maus nachweisbar sind. Der immunhistochemische Nachweis von Matrilinen in der DDR1-Knockout-Maus soll zudem Hinweise darauf geben, ob der DDR1-Knockout zu einer veränderten biochemischen Zusammensetzung der EZM dentaler und parodontaler Gewebe führt.

2 Material und Methoden

In der vorliegenden Arbeit wurden dentale und parodontale Gewebe der Maus lichtmikroskopisch untersucht. Zudem wurde die Ultrastruktur des PDL der Wildtyp-Maus und der DDR1-Knockout-Maus mithilfe elektronenmikroskopischer Methoden eingehend untersucht. Neben der strukturellen Darstellung der dentalen und parodontalen Strukturen sowie der ultrastrukturellen Darstellung des PDL lag das Hauptaugenmerk auf dem immunhistochemischen Nachweis von Matrilinen in dentalen und parodontalen Geweben der Wildtyp-Maus und der DDR1-Knockout-Maus.

2.1 Versuchstiere

Die lichtmikroskopischen Untersuchungen wurden an Geweben 22 bis 35 Wochen alter Sv/129 Wildtyp-Mäuse und DDR1-Knockout-Mäuse durchgeführt. Die elektronenmikroskopischen Untersuchungen wurden an Geweben 31 bis 47 Wochen alter Sv/129 Wildtyp-Mäuse und DDR1-Knockout-Mäuse vorgenommen. Insgesamt konnte auf einen Pool von 11 Wildtyp- und 14 DDR1-Knockout-Mäusen zurückgegriffen werden.

Das angewandte Verfahren zur Generierung von DDR1-Knockout-Mäusen ist in der Literatur eingehend beschrieben (Vogel et al. 2001).

2.2 Gewebepräparation

Die Mäuse wurden nach Betäubung durch zervikale Dislokation getötet. Anschließend wurden Maxilla und Mandibula präpariert und die Gingiva entfernt. Zwecks verbesserter Fixierung und Entkalkung wurden die Präparate in Segmente von je einem Molar und den diesen umgebenden Alveolarknochen getrennt.

2.3 Gewebefixierung

Im Folgenden wird die unterschiedliche Vorgehensweise der gewählten Gewebefixierung zur Einbettung in Paraffin und in Epon beschrieben.

2.3.1 Gewebefixierung zur Einbettung in Paraffin

Die Gewebe wurden für mindestens sechs Stunden bei 4 °C in gepuffertem Formalin nach Lillie inkubiert.

gepuffertes Formalin nach Lillie, pH 7,4:

20 ml 37 % Formaldehyd (# P733.3, Roth, Karlsruhe, DE)

66,6 ml 0,3 M Sörensen-Puffer

mit Aqua dest. auf 200 ml auffüllen

0,3 M Sörensen-Puffer:

Lösung A: 20,42 g 0,3 M KH_2PO_4 (# 3904-1, Roth, Karlsruhe, DE)

mit Aqua dest. auf 500 ml

Lösung B: 85,18 g 0,3 M Na_2HPO_4 (# A3599,0500, AppliChem, Darmstadt, DE)

mit Aqua dest. auf 2000 ml

182 ml Lösung A + 818 ml Lösung B, pH 7,4 einstellen

2.3.2 Gewebefixierung zur Einbettung in Epon

Die Gewebe wurden für 1 h bei 4 °C in Karnovsky-Fixans fixiert.

Karnovsky-Fixans:

58 ml 0,3 M Sörensen-Puffer

12 ml 25 % Glutaraldehyd (# 23114, Serva, Heidelberg, DE)

30 ml 10 % Paraformaldehyd

10 % Paraformaldehyd:

10 g Paraformaldehyd (# 0335.5, Roth, Karlsruhe, DE)

in 100 ml Aqua dest. lösen bei 70 °C

mit 1 N NaOH klären und fixieren, pH 7,5-7,8 einstellen

NaOH (# 6885.2, Roth, Karlsruhe, DE)

2.4 Entkalkung

Die Gewebe wurden anschließend für vier bis sechs Wochen in 20 % Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) entkalkt.

20 % EDTA pH 7,4:

895 ml Aqua dest.

105 ml 5 N NaOH

200 g EDTA (# CN06.3, Roth, Karlsruhe, DE)

in lichtgeschützter Flasche für 1-2 h bei 50-70 °C auf Magnetrührer rühren, pH 7,4 einstellen

Die Kiefersegmente einer Maus wurden in je 15 ml 20 % EDTA entkalkt. Während der gesamten Entkalkung wurden die EDTA-Röhrchen lichtgeschützt auf einer Wippe gelagert. In der ersten Entkalkungswoche wurde das Medium täglich, in der zweiten Woche an jedem zweiten Tag und ab der dritten Woche jeden dritten Tag gewechselt. Als Erfolgskontrolle diente eine Nadelprobe, mit der die Durchgängigkeit einer Nadel durch das entkalkte, erweichte Gewebe getestet wurde.

Anschließend wurden die Präparate zwei Mal für 10 min in Leitungswasser gewaschen und bis zur Einbettung in 70 % Ethanol bei 4 °C gelagert.

2.5 Einbettung

Die lichtmikroskopisch untersuchten Präparate wurden in Paraffin eingebettet. Die elektronenmikroskopisch untersuchten Präparate wurden hingegen in Epon eingebettet.

2.5.1 Einbettung in Paraffin

Die fixierten und entkalkten Gewebe wurden in einem Einbettautomaten (Duplex Processor, Shandon Southern Products LTD, Runcorn, UK) gemäß folgendem Protokoll über eine aufsteigende Alkoholreihe in Paraffin überführt:

Tabelle 1: Aufsteigende Alkoholreihe im Einbettautomaten

Position	Medium	Inkubationszeit
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

99% Ethanol (# 603-002-00-5, Chemievertrieb Hannover, Hannover, DE), Ethanolverdünnungen hergestellt über Verdünnung mit Aqua dest.

Isopropylalkohol (# 67-63-0, Chemievertrieb Hannover, Hannover, DE)

Xylol (# CN80.2, Roth, Karlsruhe, DE)

Paraplast 52 °C (# X882.1, Paraplast X-tra, Roth, Karlsruhe, DE)

Paraplast 56 °C (# 6774060, ThermoScientific, Runcorn, UK)

Jedes Kiefersegment wurde anschließend mithilfe eines Paraffinerhitzers (# 43900, Medax, Rendsburg, DE) und einer Kälteplatte (PARA COOLER B, RWW Medizintechnik, Forchheim, DE) in Paraffin (1/3 Paraplast 52 °C, 2/3 Paraplast 56 °C) gegossen. Die Präparate wurden so in den der Präparatgröße entsprechenden Förmchen positioniert, dass die spätere Schnittrichtung in koronal-apikaler Richtung verlief. Es folgte die Aushärtung der Paraffinblöcke über Nacht bei Raumtemperatur (RT).

2.5.2 Einbettung in Epon

Die fixierten und entkalkten Gewebe wurden zur Vorbereitung der Epon-Einbettung für 10 min in 0,15 M Sörensen-Puffer (1 Teil 0,3 M Sörensen + 1 Teil Aqua dest.) bei 4 °C gegeben. Es schloss sich die Einbettung gemäß folgendem Protokoll an:

1. 1,5 h bei 4 °C in Osmium
2. 10 min in 0,15 M Sörensen-Puffer bei 4 °C
3. 10 min in 30 % Ethanol bei 4 °C
4. 10 min in 50 % Ethanol bei 4 °C
5. 10 min in 70 % Ethanol bei 4 °C
6. 10 min in 90 % Ethanol bei 4 °C
7. 2x10 min in 99 % Ethanol bei 4 °C
8. 2x15 min in Propylenoxid (# 33715, Serva, Heidelberg, DE) bei 4 °C
9. 1 h in 1:1 Epon und Propylenoxid
10. 16 h in 3:1 Epon und Propylenoxid

Anschließend wurden die Gewebe in Epon eingebettet. Auf eine mögliche Schnitt-richtung in koronal-apikaler Richtung wurde geachtet. Im Folgenden wurden die Präparate bei 60 °C für 24 h im Trockenschrank (VT 6060 M, Heraeus, Hanau, DE) gehärtet.

Osmium:

1 Teil wässriges OsO₄ (# 74361.1, Roth, Karlsruhe, DE)

1 Teil 0,3 M Sörensen-Puffer

Epon:

6 Teile Epon A + 4 Teile Epon B

pro 100 ml Zugabe von 1,8 ml Accelerator 2,4,6-Tris(dimethylaminomethyl)phenol (# 36975.01, EPON accelerator DMP-30, Serva, Heidelberg, DE), 5 min blasenfrei rühren

Epon A:

31 ml Glycidether 100 (# 21045, Serva, Heidelberg, DE)

50 ml Dodecenylnbernsteinsäureanhydrid (# 20755.01, Serva, Heidelberg, DE)

Epon B:

25 ml Glycidether 100

22,5 ml Methylnadicanhydrid (# 29452.02, Serva, Heidelberg, DE)

Epon A und Epon B jeweils 5 min separat rühren.

2.6 Gewebeschnitte

Im Folgenden werden die gewählten Methoden zur Anfertigung von Gewebeschnitten der Paraffinblöcke und der Eponblöcke sowie deren Weiterverarbeitung erläutert.

2.6.1 Gewebeschnitte der Paraffinblöcke

Mit einem Mikrotom (Jung Biocut 2035, Leica, Wetzlar, DE) wurden Gewebeschnitte einer Dicke von 6 μm angefertigt. Wichtig für die Beurteilung der Schnittqualität war ein durchgehender Parodontalspalt in koronal-apikaler Richtung. Die Schnitte wurden in ein 40 °C warmes Wasserbad (# 1052, GFL, Burgwedel, DE) gegeben und anschließend auf SuperFrost® plus Objektträger (# J1800AMNZ, Menzel, Braunschweig, DE) überführt. Einer Lagerung auf einem Heiztisch (# 14801, Medax, Rendsburg, DE) bei 37 °C schloss sich eine Lagerung der Objektträger im Trockenschrank (# B5042, Heraeus, Hanau, DE) über Nacht bei 37 °C an.

2.6.2 Gewebeschnitte der Eponblöcke

Mit dem Ultramikrotom (Ultracut E, Reichert-Jung, Wetzlar, DE) wurden sowohl Semidünnschnitte einer Dicke von 900 nm als auch Ultradünnschnitte einer Dicke von 80 nm angefertigt. Die Semidünnschnitte wurden mithilfe eines Glasstabs auf Objektträger (# VA31110 002FKB, Knittel Glass, Braunschweig, DE), die Ultradünnschnitte hingegen mithilfe einer Wimper auf mit 0,3 % Formvar in Chloroform beschichtete Nickelgrids (# G201N, Agar Scientific, Essex, UK) überführt.

0,3 % Formvar Chloroform:

0,3 g Formvar (# R1202, Agar Scientific, Essex, UK)

in 100 ml Chloroform (# 49618-9, Sigma-Aldrich, St.-Louis, Missouri, USA) lösen,
abschließend filtrieren

2.7 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

In der Färbemaschine (Linearfärber LS-15, Weinkauf Medizintechnik, Forchheim, DE) wurden die in Paraffin eingebetteten Gewebe gemäß nachstehendem Protokoll einer Hämatoxylin-Eosin-Färbung unterzogen:

Tabelle 2: Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Position	Medium	Inkubationszeit
1	Xylol	10 min
2	Xylol	10 min
3	Ethanol 99 %	3 min
4	Ethanol 80 %	3 min
5	Ethanol 60 %	3 min
6	Aqua dest.	3 min
7	Hämalaun (1:4)	5 min
8	fließendes Leitungswasser	15 min
9	Eosin	6 min
10	Aqua dest.	0,5 min
11	Ethanol 60 %	0,5 min
12	Ethanol 80 %	1 min
13	Ethanol 99 %	2 min
14	Xylol	10 min
15	Xylol	10 min

Hämalaun (1:4):

Mayers Hämalaunlösung (# 109249, Merck, Darmstadt, DE)

gebrauchsfertige Lösung

Eosin:

1 g Eosin yellowish (# E-6003, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)

1000 ml Aqua dest.

2 Tropfen 100 % Essigsäure (# A0662,1000, AppliChem, Darmstadt, DE) vor Färbung hinzugeben

Das anschließende Eindecken der Präparate erfolgte wie unter 2.10 beschrieben.

2.8 Immunhistochemie

Anhand der gewählten immunhistochemischen Methode erfolgte ein Nachweis der Matrilin in dentalen und parodontalen Geweben der Maus.

2.8.1 Verwendete Antikörper

Bei dem verwendeten Antikörper gegen Matrilin-1 handelt es sich um einen polyklonalen Antikörper aus Rohserum des Kaninchens. Die Antikörper gegen Matrilin-2, -3 und -4 stellen affinitätsgereinigte, polyklonale Antikörper aus dem Kaninchen dar.

Die verwendeten Antikörper wurden freundlicherweise von Prof. Susanne Grässel, Zentrum für Medizinische Biotechnologie, Universität Regensburg, sowie der Forschungsgruppe Prof. Raimund Wagener, Institut für Biochemie II, Universität Köln zur Verfügung gestellt. Die spezifischen Bindungseigenschaften der verwendeten Antikörper gegen Matrilin-1 (Hauser und Paulsson 1994), -2 (Deák et al. 1997) , -3 (Klatt et al. 2000) und -4 (Klatt et al. 2001) sind publiziert, die verwendeten Antikörper zeigten zudem keine Kreuzreaktivitäten zu anderen Matrilinisformen.

In der folgende Tabelle sind die verwendeten Antikörper gegen Matrilin-1, -2, -3 und -4 aufgeführt:

Tabelle 3: Verwendete Antikörper

Antikörper	Spezies	Klonalität	Wirtstier	Herkunft
Matrilin-1	Mensch, Maus	polyklonal	Kaninchen	Prof. Grässel, Regensburg
Matrilin-2	Mensch, Maus	polyklonal	Kaninchen	Prof. Wagener, Köln
Matrilin-3	Mensch, Maus	polyklonal	Kaninchen	Prof. Wagener, Köln
Matrilin-4	Mensch, Maus	polyklonal	Kaninchen	Prof. Wagener, Köln

2.8.2 Entparaffinierung und Rehydrierung

In der Färbemaschine (Linearfärber LS-15, Weinkauf Medizintechnik, Forchheim, DE) wurden die in Paraffin eingebetteten Präparate gemäß nachfolgendem Protokoll entparaffiniert und rehydriert:

Tabelle 4: Entparaffinierung und Rehydrierung der Präparate

Position	Medium	Inkubationszeit
1	Xylol	10 min
2	Xylol	10 min
3	Ethanol 99 %	3 min
4	Ethanol 80 %	3 min
5	Ethanol 60 %	3 min
6	Aqua dest.	3 min

2.8.3 Protokoll Immunhistochemie

1. Entparaffinierung mit Maschine (siehe 2.8.2 Entparaffinierung und Dehydrierung)
2. 10 min Waschen in 1xTBS-T
3. Objektträger möglichst nah an Präparatrand trockenwischen
4. 30 min Zugabe von Universalblock (# 71-00-61, KPL, Gathersburg, USA), 25 µl pro Schnitt
5. 3x3 min Waschen in 1xTBS-T
6. 20 min Antigendemaskierung in Citratpuffer bei 95 °C
7. 3x3 min Waschen in 1xTBS-T
8. 20 min Blocken in 3 % H₂O₂-Methanol unter Lichtausschluss
9. 3x3 min Waschen in 1xTBS-T
10. Objektträger möglichst nah an Präparatrand trockenwischen
11. 2 min Vorverdau, Zugabe von Protease 24, 25 µl pro Schnitt
12. 3x3 min Waschen in 1xTBS-T
13. Objektträger möglichst nah an Präparatrand trockenwischen
14. 10 min Blocken, Zugabe von 1 % TBS/BSA, 25µl pro Schnitt
15. Präparate abklopfen
16. Zugabe des primären Antikörpers, 1:100 verdünnt in Antibody Diluent (# 938B-03, Cell Marque, Rocklin, USA) über Nacht bei RT, 25 µl pro Schnitt
17. 3x5 min waschen in 1xTBS-T
18. Objektträger möglichst nah an Präparatrand trockenwischen
19. 10 min Zugabe HiDef Detection™ Amplifier (Mouse & Rabbit) (# 954D-11, Cell Marque, Rocklin, USA), 25 µl pro Schnitt
20. 3x3 min Waschen in 1xTBS-T
21. Objektträger möglichst nah an Präparatrand trockenwischen
22. 10 min Zugabe HiDef Detection™ HRP Polymer Detector (# 954D-12, Cell Marque, Rocklin, USA), 25 µl pro Schnitt
23. 3x3 min Waschen in 1xTBS-T
24. Objektträger möglichst nah an Präparatrand trockenwischen
25. Zugabe DAB unter Sicht, 25 µl pro Schnitt
26. 10 min Waschen in 1xTBS-T

27.2 min Gegenfärben in Hämalaun (1:4)

28.10 min Bläuen in Leitungswasser

1xTBS-T:

1000 ml 1xTBS

500 µl 0,5 % Tween 20 (# P2287, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)

1xTBS:

100 ml 10xTBS

mit Aqua dest. auf 1000 ml auffüllen

10xTBS:

24,2 g 200 mM Tris (# 5429.3, Roth, Karlsruhe, DE)

87,6 g 1,5 M NaCl

mit Aqua dest. auf 1000 ml auffüllen, pH 7,4 einstellen

Citratpuffer, pH 6:

Lösung A: 4,2 g Zitronensäuremonohydrat (# 100244.0500, Merck,
Darmstadt, DE)

200 ml Aqua dest.

Lösung B: 29,4 g Trinatriumdicitrat (#3580.3, Roth, Karlsruhe, DE)

1000 ml Aqua dest.

18 ml Lösung A + 82 ml Lösung B

mit 900 ml Aqua dest. auf 1000 ml auffüllen, pH 6 einstellen

3 % H₂O₂-Methanol:

7 ml 30 % H₂O₂ (# 1.07210.1000, Merck, Darmstadt, DE)

63 ml Methanol

in lichtgeschützter Küvette mischen

1 % TBS/BSA:

1 g BSA (# A9647-50G, Sigma-Aldrich, St.-Louis, USA)

mit 100 ml 1xTBS mischen

Protease 24:

25 mg Protease XXIV (# P8038, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)

45 ml Aqua dest.

25 mg CaCl₂

5 ml 0.05 M Tris-HCl

pH 7,6 einstellen

0.05 M Tris-HCl:

6 g Tris (# 5429.3, Roth, Karlsruhe, DE)

250 ml Aqua dest.

36 ml 1 N HCl

mit Aqua dest. auf 1000 ml auffüllen, pH 7,6 einstellen

DAB:

1 Tropfen Chromogen DAB (# 957D-11, CellMarque, Rocklin, USA)

1 ml Substratpuffer (# 957D-12, CellMarque, Rocklin, USA)

2.8.4 Dehydrierung der Präparate

In der Färbemaschine wurden die Präparate gemäß nachstehendem Protokoll dehydriert:

Tabelle 5: Dehydrierung der Präparate

Position	Medium	Inkubationszeit
1	Ethanol 60 %	3 min
2	Ethanol 80 %	3 min
3	Ethanol 99 %	3 min
4	Xylol	10 min
5	Xylol	10 min

2.8.5 Auswertung der immunhistochemischen Ergebnisse

Pro Antikörper wurden mindestens drei voneinander unabhängige immunhistochemische Reaktionen an Schnitten unterschiedlicher Wildtyp-Mäuse beziehungsweise DDR1-Knockout-Mäuse ausgewertet. Es konnte auf einen Pool von 11 Wildtyp- und 14 Knockout-Mäusen zurückgegriffen werden.

Im Sinne einer Erfolgskontrolle der immunhistochemischen Ergebnisse wurde in jeder Versuchsreihe mindestens ein Präparat als Negativkontrolle mitgeführt. Die Negativkontrolle wurde anstatt einer Inkubation mit Antikörper über Nacht mit Antibody Diluent inkubiert. Falsch positive Reaktionsergebnisse konnten somit ausgeschlossen werden.

2.9 Richardson-Färbung der Semidünnschnitte

Die angefertigten Semidünnschnitte wurden mithilfe von Richardson-Lösung kontrastiert. Die Schnitte wurden auf einer Heizplatte (# 2541, Janke & Kunkel, Staufen) bei 60 °C für 10 s mit der Lösung inkubiert. Anschließend folgte das Spülen der Schnitte mit Aqua dest. und das Trocknen bei 60 °C auf einer Heizplatte.

Richardson-Lösung:

Lösung A: 1 g Azur II (# C.I.52010/52015, Merck, Darmstadt, DE)
auf 100 ml Aqua dest.

Lösung B: 2 g Methylenblau (# C.I.52015, Merck, Darmstadt, DE)
auf 100 ml Aqua dest.

Lösung C: 2 g $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ (# 1.06309.0025, Merck, Darmstadt, DE)
auf 100 ml Aqua dest.

20 ml Lösung A + 10 ml Lösung B + 10 ml Lösung C mischen und filtrieren

2.10 Eindecken der Präparate

Das Eindecken der Präparate erfolgte mit Deckgläsern (# BB018018A1, Menzel Gläser, Braunschweig, DE) und dem Eindeckmedium Eukitt® (# 03989-100ML, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA).

2.11 Kontrastierung der Ultradünnschnitte

Die Kontrastierung der Ultradünnschnitte wurde mit Uranylacetat und Bleicitrat gemäß nachstehendem Protokoll durchgeführt:

1. in feuchter Kammer Parafilm (# PM-996, Bemis, Neenah, Wisconsin, USA) platzieren
2. jedes Grid auf einem Tropfen Uranylacetat in feuchter Kammer für 10 min bei RT platzieren
3. waschen in 300 ml Aqua dest. je Grid, anschließend Grids mit Papierserviette vom Rand ansaugen
4. in zweiter Petrischale Parafilm platzieren
5. jedes Grid auf einem Tropfen Bleicitrat in feuchter Kammer für 10 min bei RT platzieren
6. waschen in 300 ml Aqua dest. je Grid, anschließend Grids mit Papierserviette vom Rand ansaugen, 30 min trocknen lassen

Uranylacetat 1 %:

0,1 g Uranylacetat-Dihydrat (# 1.08473, Merck, Darmstadt, DE)

auf 10 ml Aqua dest.

30 min auf Plattformschüttler (# 543-32205-00, Heidolph, Schwabach, DE) lösen, anschließend filtrieren

Bleicitrat:

1,33 g $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ (# 228621, Sigma-Aldrich, St.-Louis, Missouri, USA)

in 30 ml Aqua dest. lösen

1,76 g $\text{N}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ (# 3580.3, Roth, Karlsruhe, DE) hinzugeben, 1 min lang schütteln

30 min zur Umwandlung in Bleicitrat stehen lassen, gelegentlich schütteln

8 ml 1 N NaOH zugeben

mit Aqua dest. auf 50 ml auffüllen und mischen

leichte Trübung abzentrifugieren

pH 12 kontrollieren, abschließend filtrieren

2.12 Mikroskopische Auswertung

Die lichtmikroskopische Auswertung erfolgte mithilfe eines Primostar Lichtmikroskops (# 415500-0004-000, Zeiss, Göttingen, DE). Die elektronenmikroskopische Auswertung erfolgte am Transmissionselektronenmikroskop (EM10, Zeiss, Jena, DE).

3 Ergebnisse

Im Folgenden werden die Ergebnisse der licht- und elektronenmikroskopischen Untersuchungen der dentalen und parodontalen Gewebe der Wildtyp-Maus und der DDR1-Knockout-Maus dargestellt. Zudem erfolgt eine Darstellung der Ergebnisse der immunhistochemischen Nachweisreaktionen der Matriline in dentalen und parodontalen Geweben der Wildtyp-Maus sowie der DDR1-Knockout-Maus.

3.1 Dentale und parodontale Gewebe der Wildtyp-Maus und der DDR1-Knockout-Maus

Die Hämatoxylin-Eosin-Übersichtsaufnahmen der zahntragenden Kiefersegmente zeigen die Struktur der dentalen und parodontalen Gewebe der Wildtyp-Maus und der DDR1-Knockout-Maus (Abbildung 2: A, C). Die murinen Molaren wiesen einen regelrechten Zahnaufbau auf. Die zentrale Pulpa, das die Pulpa umgebende Dentin und das Wurzelzement der Wildtyp-Maus und der DDR1-Knockout-Maus waren regelrecht ausgebildet und zeigten eine vergleichbare Histologie. Der Zahnschmelz der murinen Molaren wurde durch die unter 2.4 aufgeführte Entkalkung der Zähne in EDTA herausgelöst, er fehlt somit in den histologischen Abbildungen.

Das PDL, der Alveolarknochen und das dentale Zement als Komponenten des Parodonts der Wildtyp-Maus und der DDR1-Knockout-Maus zeigten sich in Übersichtsaufnahmen sowie in Detailaufnahmen in intaktem Zustand und in vergleichbarer Histologie. Die Gingiva als vierte Komponente des Zahnhalteapparats fehlte aufgrund der unter 2.2 aufgeführten Präparation der Gewebe.

Die Zellen des PDL, vornehmlich Fibroblasten, waren in eine dichte azidophile EZM eingebunden (Abbildung 2: B, D). Zudem lagen die zellulären Komponenten im PDL der Wildtyp-Maus und der DDR1-Knockout-Maus in vergleichbarer Anzahl vor. Die EZM des PDL beinhaltete insbesondere Kollagen, das die parodontalen Hauptfasern (Abbildung 2: B, D, schwarze Pfeile) bildet. Die parodontalen Hauptfasern durchspannten das PDL und inserierten in das dentale Zement sowie in den Alveolarknochen. Die Insertionsstellen der desmodontalen Kollagenfasern

in das dentale Zement befanden sich apikal der Insertionsstellen in den Alveolarknochen. Der zusätzlich gewellte Verlauf der Kollagenfaserbündel ist insbesondere in Abbildung 2, Detailaufnahme B zu erkennen. Abweichungen in der Breite des Parodontalspalts waren den leicht abweichenden Schnittebenen der Präparate geschuldet.

Im Alveolarknochen wurden in der Wildtyp-Maus und in der Knockout-Maus vereinzelt Osteozyten in ihren Lakunen angeschnitten. Der Alveolarknochen wies zudem eine dichte, azidophile EZM auf. Auch das dentale Zement der Wildtyp-Maus und der DDR1-Knockout-Maus zeigte sich in intaktem Zustand sowie in vergleichbarer Histologie. Das dentale Zement stellte sich im koronalen Drittel der Zahnwurzel zellfrei, somit als azelluläres, fibrilläres Zement dar (Abbildung 2, B, D). In weiter apikal gelegenen Bereichen und im Bereich von Wurzelfurkationen konnten hingegen Anschnitte von Zementozyten im Sinne zellulären Zements gefunden werden. Im Parodont der Wildtyp-Maus und der DDR1-Knockout-Maus fiel außerdem die große Anzahl angeschnittener Blutgefäße auf. Diese befanden sich im PDL, im Alveolarknochen, im Übergang zwischen beiden Geweben sowie in tieferen Regionen des Kieferknochens in vergleichbarer Anzahl.

Die Richardson-Färbung der Semidünnschnitte zeigte das dentale Zement, das PDL und den Alveolarknochen in intakten Verhältnissen (Abbildung 3: A, C). Während sich das abgebildete azelluläre Faserzement zellfrei darstellte, befanden sich im Alveolarknochen Osteozyten, die in ihren Knochenlakunen angeschnitten wurden. Anschnitte von Blutgefäßen fanden sich, vereinbar mit der Darstellung in den Hämatoxylin-Eosin-Färbungen, im Alveolarknochen wie auch im PDL (Abbildung 3: A, C, nicht ausgefüllte Pfeile). Die spindelförmigen Zelleiber der desmodontalen Fibroblasten waren in der oben genannten Verlaufsrichtung der parodontalen Kollagenfasern angeordnet. Die Fibroblasten des PDL der Wildtyp-Maus und der DDR1-Knockout-Maus zeigten eine vergleichbare Form und Orientierung (Abbildung 3: A, C, schwarze Pfeile). Die Zellform und deren Ausrichtung in der Richardson-Färbung der Semidünnschnitte ließ, ebenso wie die Darstellung des Zements und des Alveolarknochens, auf eine vergleichbare Struktur der parodontalen Komponenten der Wildtyp-Maus und der DDR1-Knockout-Maus schließen.

Die elektronenmikroskopische Darstellung des desmodontalen Faserapparats der Wildtyp-Maus und der DDR1-Knockout-Maus zeigte kollagene Mikrofibrillen, die sich zu den Faserbündeln des PDL zusammenlagern (Abbildung 3: B, D). Die Mikrofibrillen innerhalb eines Faserbündels wiesen eine gleichförmige Orientierung auf. Die Organisation der Mikrofibrillen zu Faserbündeln zeigte im Vergleich von Wildtyp-Maus zu DDR1-Knockout-Maus keine Unterschiede.

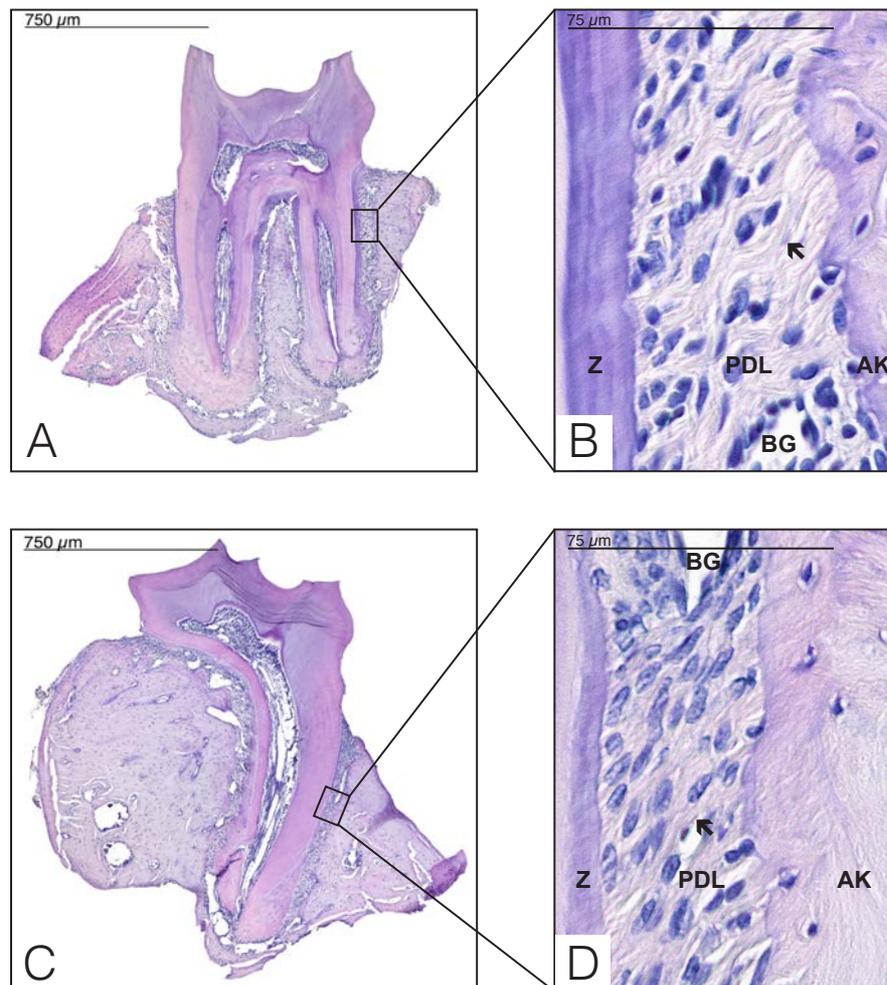


Abbildung 2: Hämatoxylin-Eosin-Färbungen von Zahn und Zahnhalteapparat der Maus.

Übersichtsaufnahmen von Molaren der Wildtyp-Maus (A) und der DDR1-Knockout-Maus (C). Beide Präparate mit regulärem Zahnaufbau: intakte Gewebe der Pulpa, des Dentins und des Zements sowie intaktes Knochengewebe und PDL. Zahnschmelz durch Entkalkung in EDTA herausgelöst. Detailaufnahmen von Molaren der Wildtyp-Maus (B) und der Knockout-Maus (D). Kollagene Faserbündel des PDL (schwarze Pfeile) durchspannen den Parodontalspalt und inserieren in dentales Zement (Z) und Alveolarknochen (AK). Anschnitte desmodontaler Blutgefäße (BG) sowohl in der Wildtyp-Maus als auch in der DDR1-Knockout-Maus.

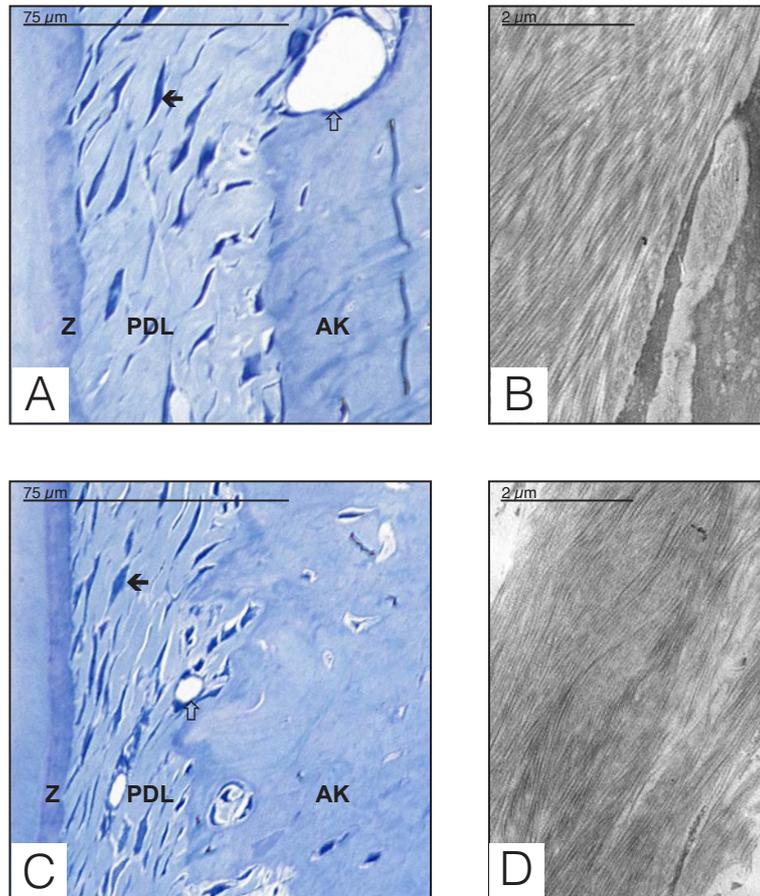


Abbildung 3: Richardson-Färbungen und Elektronenmikroskopie des PDL.

Richardson-Färbungen des PDL der Wildtyp-Maus (A) und der DDR1-Knockout-Maus (C). Anordnung der spindelförmigen Zelleiber der Fibroblasten (schwarze Pfeile) des PDL in Verlaufsrichtung der kollagenen Hauptfasern. Zement (Z) und Alveolarknochen (AK) in intaktem Zustand. Angeschnittene Gefäße (nicht ausgefüllte Pfeile) in Alveolarknochen und PDL.

Elektronenmikroskopie des PDL der Wildtyp-Maus (B) und der DDR1-Knockout-Maus (D). Kollagenfibrillen des PDL der Wildtyp-Maus und der DDR1-Knockout-Maus in vergleichbarer Orientierung und Organisation.

3.2 Immunhistochemischer Nachweis der Matrilin an Molaren in Kiefersegmenten der Wildtyp-Maus

Die Auswertung der immunhistochemischen Nachweisreaktionen für Matrilin-1, -2, -3 und -4 wurde in den verschiedenen Geweben der zahntragenden Kiefersegmente der Wildtyp-Maus durchgeführt. Die Auswertung erfolgte in den Geweben Pulpa, Dentin, Zement, PDL und Knochen. Im Detail erfolgte eine weitere Aufgliederung der Auswertung im Bereich des Dentins in Kronen- und Wurzel-dentin, im dentalen Zement in EZM und Zementozytenlakunen, im PDL in EZM und Gefäßwände sowie im Knochen in EZM, Osteozytenlakunen und Gefäßwände.

Matrilin-1 konnte in Wildtyp-Mäusen sowohl in der EZM der dentalen Pulpa als auch im koronalen Dentin nachgewiesen werden. Während sich in der gesamten pulpalen EZM eine positive Immunhistochemie für Matrilin-1 zeigte, konnte Matrilin-1 lediglich im koronalen Dentin lokalisiert werden. Im Wurzel-dentin konnte Matrilin-1 hingegen nicht nachgewiesen werden. Die EZM des dentalen Zements zeigte ebenfalls ein negatives Ergebnis der Immunhistochemie für Matrilin-1. Allerdings konnte Matrilin-1 in Zementozytenlakunen des Zements nachgewiesen werden. Matrilin-1 konnte in der EZM des PDL lokalisiert werden. Das Reaktionsergebnis zeigte hier einen faserartigen Charakter. Zudem konnte Matrilin-1 im PDL nicht auf einzelne Bereiche begrenzt, sondern homogen im gesamten PDL nachgewiesen werden. Eine ebenfalls positive Immunhistochemie für Matrilin-1 zeigte sich in desmodontalen Gefäßwänden. In der EZM des Knochens konnte Matrilin-1 hingegen nicht nachgewiesen werden. In Osteozytenlakunen zeigte sich dagegen ein positives Ergebnis der Immunhistochemie für Matrilin-1. Matrilin-1 konnte allerdings nicht in allen Osteozytenlakunen lokalisiert werden. In Gefäßwänden im Knochengewebe konnte Matrilin-1 nachgewiesen werden. Abbildung 4 zeigt das Ergebnis einer immunhistochemischen Nachweisreaktion von Matrilin-1 in den dentalen und parodontalen Geweben einer Wildtyp-Maus.

Matrilin-2 konnte in Wildtyp-Mäusen in der EZM der dentalen Pulpa nachgewiesen werden. Die Immunhistochemie für Matrilin-2 zeigte hier ein über die gesamte EZM der Pulpa verbreitetes positives Ergebnis. Hingegen konnte Matrilin-2 im Kronen- wie Wurzel-dentin nicht lokalisiert werden. In der EZM des dentalen Ze-

ments konnte Matrilin-2 ebenfalls nicht nachgewiesen werden. Aufgrund fehlender Anschnitte war der immunhistochemische Nachweis von Matrilin-2 in Zementozytenlakunen nicht beurteilbar. Im PDL zeigte sich sowohl in Gefäßwänden als auch in der EZM eine positive Immunhistochemie für Matrilin-2. Matrilin-2 konnte in der gesamten EZM des PDL nachgewiesen werden und war im PDL nicht auf einzelne Bereiche begrenzt. Es fiel im PDL zudem ein faserartiges Reaktionsergebnis auf. In der EZM des Knochens konnte Matrilin-2 hingegen nicht lokalisiert werden. In Gefäßwänden im Knochengewebe und in Osteozytenlakunen zeigte sich ein positives Ergebnis des immunhistochemischen Nachweises von Matrilin-2. Matrilin-2 konnte allerdings nicht in allen Osteozytenlakunen lokalisiert werden. Abbildung 5 zeigt die Ergebnisse zweier immunhistochemischer Nachweisreaktionen von Matrilin-2 in den dentalen und parodontalen Geweben zweier Wildtyp-Mäuse.

Matrilin-3 konnte in Wildtyp-Mäusen in der gesamten EZM der dentalen Pulpa in homogener Verteilung lokalisiert werden. Die Immunhistochemie für Matrilin-3 zeigte hingegen im koronalen wie radikulären Dentin ein negatives Ergebnis. Ein ebenfalls negatives Reaktionsergebnis zeigte sich in der EZM des dentalen Zements, während der immunhistochemische Nachweis von Matrilin-3 in Zementozytenlakunen aufgrund fehlender Anschnitte nicht beurteilbar war. In der Gefäßwand desmodontaler Gefäße und in der EZM des PDL konnte Matrilin-3 nachgewiesen werden. In der desmodontalen EZM zeigte der positive immunhistochemische Nachweis von Matrilin-3 eine homogene Verteilung im gesamten PDL. Es fiel hier ein faserartiges Reaktionsergebnis auf. In der EZM des Knochens und in Osteozytenlakunen konnte Matrilin-3 nicht nachgewiesen werden. Ein positives Ergebnis zeigte die Immunhistochemie für Matrilin-3 hingegen in Gefäßwänden im Knochen. Abbildung 6 zeigt das Ergebnis einer immunhistochemischen Nachweisreaktion von Matrilin-3 in den dentalen und parodontalen Geweben einer Wildtyp-Maus.

Matrilin-4 konnte in Wildtyp-Mäusen in der gesamten EZM der dentalen Pulpa in homogener Verteilung lokalisiert werden. Im koronalen wie radikulären Dentin zeigte sich dagegen ein negatives immunhistochemisches Ergebnis für Matrilin-4. In der EZM des Zements konnte Matrilin-4 ebenfalls nicht nachgewiesen werden.

Der immunhistochemische Nachweis von Matrilin-4 in Zementozytenlakunen war aufgrund fehlender Anschnitte nicht beurteilbar. In der EZM des PDL konnte Matrilin-4 lokalisiert werden und zeigte in der EZM des gesamten PDL eine homogene Verteilung. Der immunhistochemische Nachweis von Matrilin-4 zeigte im PDL zudem ein faserartiges Reaktionsergebnis. Des Weiteren konnte Matrilin-4 in Gefäßwänden im PDL lokalisiert werden. Im Knochen konnte Matrilin-4 dagegen weder in der EZM noch in Osteozytenlakunen nachgewiesen werden. In Gefäßwänden im Knochen zeigte sich ein positives Ergebnis der Immunhistochemie für Matrilin-4. Abbildung 7 zeigt das Ergebnis einer immunhistochemischen Nachweisreaktion von Matrilin-4 in den dentalen und parodontalen Geweben einer Wildtyp-Maus.

In der folgenden Tabelle ist die Auswertung des immunhistochemischen Nachweises der Matrilin in den untersuchten Geweben der Wildtyp-Maus dargestellt. In die Auswertung wurden alle durchgeführten immunhistochemischen Reaktionen einbezogen. Pro Antikörper wurden mindestens drei voneinander unabhängige Reaktionen an Schnitten unterschiedlicher Mäuse ausgewertet. Es konnte auf einen Pool von 11 Wildtyp-Mäusen zurückgegriffen werden.

Tabelle 6: Immunhistochemischer Nachweis von Matrilinen an Molaren in Kiefersegmenten der Wildtyp-Maus

Gewebe		Matrilin- 1	Matrilin- 2	Matrilin- 3	Matrilin- 4
Pulpa		+	+	+	+
Dentin	koronal	+	-	-	-
	radikulär	-	-	-	-
Zement	EZM	-	-	-	-
	Zementozytenlakunen	+	n. b.	n. b.	n. b.
PDL	EZM	+	+	+	+
	Gefäßwände	+	+	+	+
Knochen	EZM	-	-	-	-
	Osteozytenlakunen	+	+	-	-
	Gefäßwände	+	+	+	+

+ = positive Reaktion; - = negative Reaktion; n. b. = nicht beurteilbar.

Während die oben aufgeführte Tabelle auf Grundlage der Auswertung aller durchgeführten immunhistochemischen Reaktionen erstellt wurde, zeigen die folgenden Abbildungen 4 bis 7 exemplarisch immunhistochemische Reaktionen an ausgewählten Präparaten und repräsentieren daher nicht ausschließlich das mehrheitliche Reaktionsergebnis.

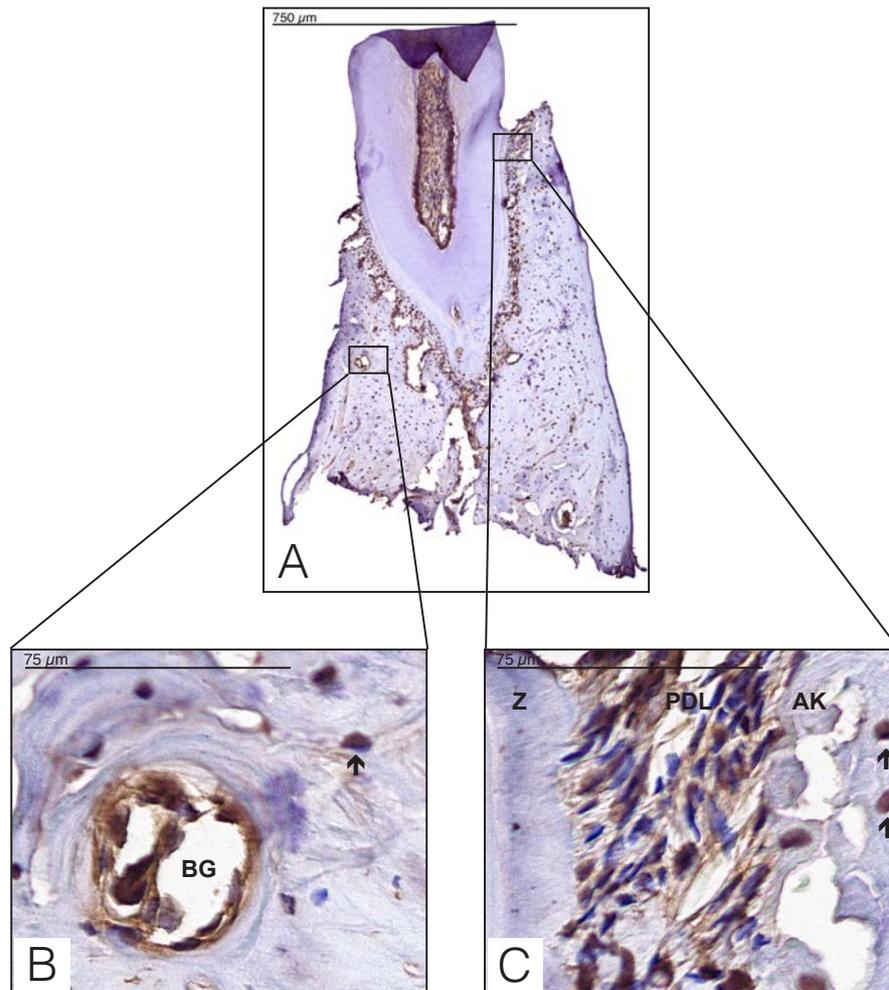


Abbildung 4: Immunhistochemischer Nachweis von Matrilin-1 an Molar in Kiefersegment der Wildtyp-Maus.

Übersichtsaufnahme (A) und Detailaufnahmen (B, C).

A: Positive Reaktion insbesondere in Pulpa und PDL.

B: Positives Reaktionsergebnis in Osteozytenlakune (schwarzer Pfeil) und in Gefäßwand eines Blutgefäßes (BG). Negatives Ergebnis in EZM des Knochens.

C: Positive Reaktion in EZM des PDL, hier faserartiges Ergebnis, und in Osteozytenlakunen des Alveolarknochens (schwarze Pfeile). EZM von Zement (Z) und Alveolarknochen (AK) negativ.

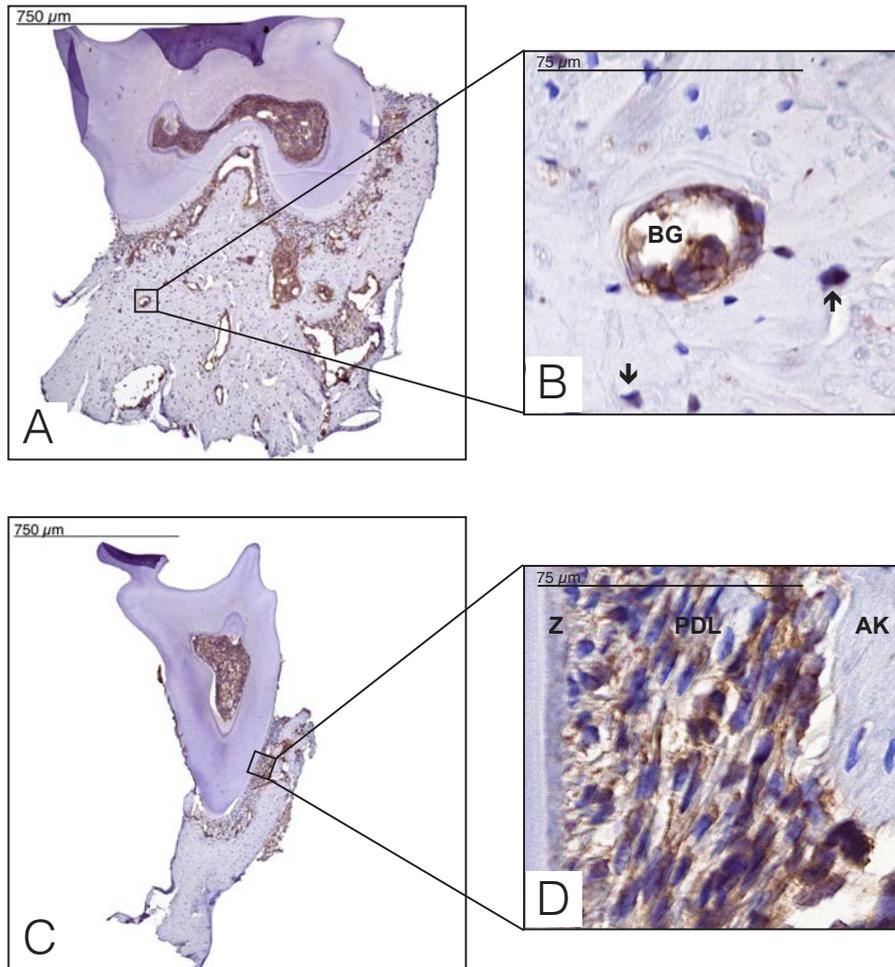


Abbildung 5: Immunhistochemischer Nachweis von Matrilin-2 an Molaren in Kiefersegmenten der Wildtyp-Maus.

Übersichtsaufnahmen (A, C) und Detailaufnahmen (B, D).

A, C: Positive Reaktion insbesondere in Pulpa und PDL.

B: Positives Ergebnis in Gefäßwand eines Blutgefäßes (BG) und in Osteozytenlakunen (schwarze Pfeile). EZM des Knochens negativ.

D: Positives, faserartiges Reaktionsergebnis in EZM des PDL. EZM von Zement (Z) und Alveolarknochen (AK) negativ.

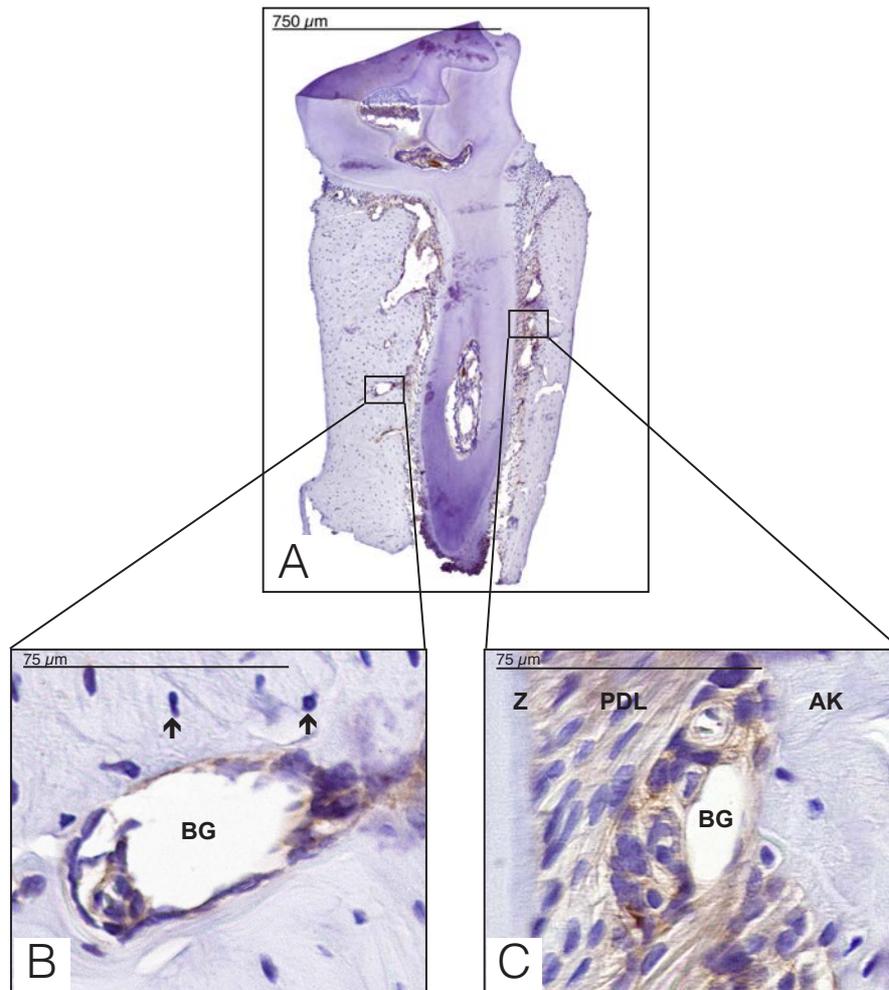


Abbildung 6: Immunhistochemischer Nachweis von Matrilin-3 an Molar in Kiefersegment der Wildtyp-Maus.

Übersichtsaufnahme (A) und Detailaufnahmen (B, C).

A: Positive Reaktion insbesondere in Pulpa und PDL.

B: Positives Ergebnis in Gefäßwand eines Blutgefäßes (BG). Osteozytenlakunen (schwarze Pfeile) und EZM des Knochens negativ.

C: Positives, faserartiges Ergebnis in EZM des PDL und in Gefäßwand eines desmodontalen Blutgefäßes (BG). EZM von Zement (Z) und Alveolarknochen (AK) negativ.

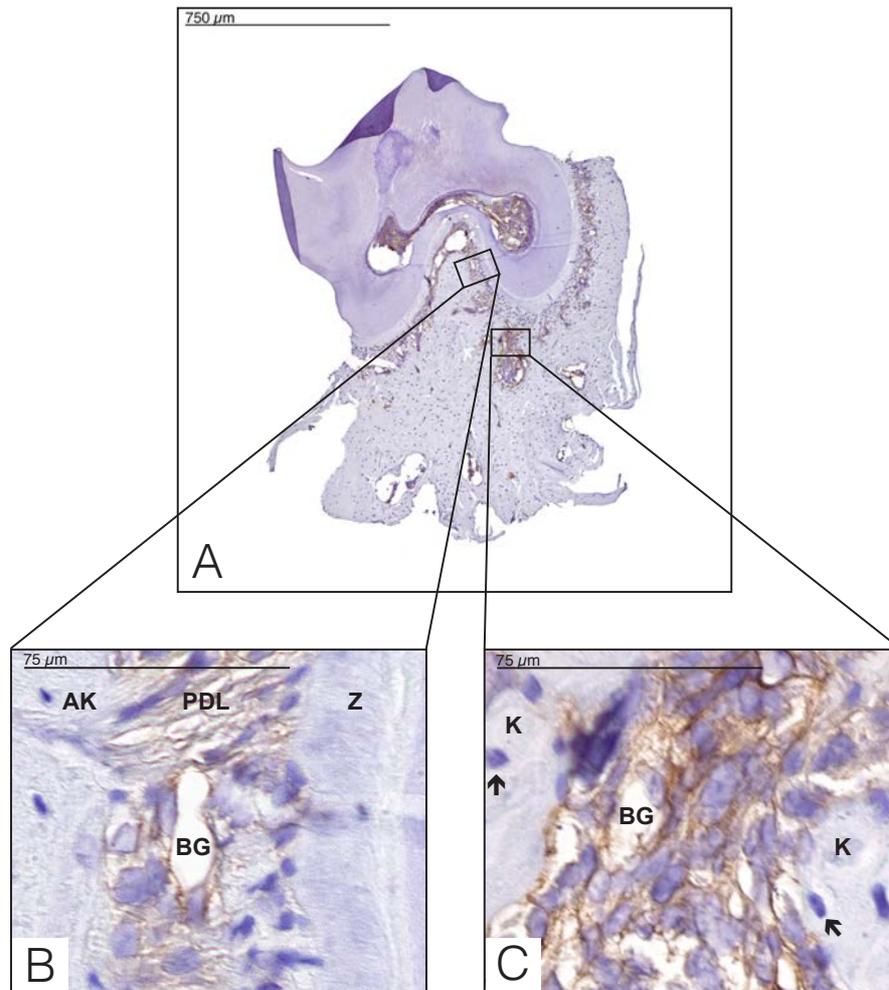


Abbildung 7: Immunhistochemischer Nachweis von Matrilin-4 an Molar in Kiefersegment der Wildtyp-Maus.

Übersichtsaufnahme (A) und Detailaufnahmen (B, C).

A: Positive Reaktion insbesondere in Pulpa und PDL.

B: Positives Ergebnis in Gefäßwand eines desmodontalen Blutgefäßes (BG) und in EZM des PDL, hier faserartig. EZM von Alveolarknochen (AK) und Zement (Z) negativ.

C: Positives Ergebnis in apikalem Blutgefäß (BG). Osteozytenlakunen (schwarze Pfeile) und EZM des Kieferknochens (K) negativ.

3.3 Immunhistochemischer Nachweis der Matrilin an Molaren in Kiefersegmenten der DDR1-Knockout-Maus

Die Auswertung der immunhistochemischen Nachweisreaktionen für Matrilin-1, -2, -3 und -4 wurde in der DDR1-Knockout-Maus, analog der Auswertung in der Wildtyp-Maus, in den Geweben Pulpa, Dentin, Zement, PDL und Knochen durchgeführt. Im Detail erfolgte ebenfalls eine weitere Aufgliederung der Auswertung im Bereich des Dentins in Kronen- und Wurzeldentin, im Zement in EZM und Zementozytenlakunen, im PDL in EZM und Gefäßwände sowie im Knochen in EZM, Osteozytenlakunen und Gefäßwände.

In DDR1-Knockout-Mäusen konnte Matrilin-1 in der gesamten EZM der dentalen Pulpa in homogener Verteilung nachgewiesen werden. Zudem zeigte sich im koronalen Dentin ein positives Ergebnis des immunhistochemischen Nachweises von Matrilin-1. Im Wurzeldentin konnte Matrilin-1 hingegen nicht nachgewiesen werden. In der EZM des dentalen Zements konnte Matrilin-1 ebenfalls nicht lokalisiert werden. Hingegen konnte Matrilin-1 in Zementozytenlakunen des Zements, in der EZM des PDL und in desmodontalen Gefäßwänden lokalisiert werden. Das Reaktionsergebnis zeigte in der EZM des PDL einen faserartigen Charakter und im gesamten PDL eine homogene Verteilung. In der EZM des Knochens konnte Matrilin-1 hingegen nicht nachgewiesen werden. Dagegen konnte Matrilin-1 in Osteozytenlakunen lokalisiert werden, allerdings konnte Matrilin-1 nicht in allen Osteozytenlakunen nachgewiesen werden. Zudem zeigte der immunhistochemische Nachweis von Matrilin-1 in Gefäßwänden im Knochengewebe ein positives Ergebnis. Abbildung 8 zeigt das Ergebnis einer immunhistochemischen Nachweisreaktion von Matrilin-1 in den dentalen und parodontalen Geweben einer DDR1-Knockout-Maus.

In DDR1-Knockout-Mäusen konnte Matrilin-2 in der gesamten EZM der dentalen Pulpa in homogener Verteilung lokalisiert werden. Im koronalen und radikulären Dentin konnte Matrilin-2 hingegen nicht nachgewiesen werden. In der EZM des dentalen Zements konnte Matrilin-2 ebenfalls nicht nachgewiesen werden. In Zementozytenlakunen konnte Matrilin-2 dagegen lokalisiert werden. Auch in der EZM des PDL und in desmodontalen Gefäßwänden zeigte sich ein positives im-

munhistochemisches Reaktionsergebnis. In der desmodontalen EZM zeigte sich ein faserartiges Reaktionsergebnis mit einer Verteilung über das gesamte PDL. In der EZM des Knochens konnte Matrilin-2 dagegen nicht lokalisiert werden. In Osteozytenlakunen zeigte sich hingegen ein positives Reaktionsergebnis des immunhistochemischen Nachweises von Matrilin-2. Jedoch konnte Matrilin-2 nicht in allen Osteozyten nachgewiesen werden. Eine positive Immunhistochemie für Matrilin-2 zeigte sich in Gefäßwänden im Knochengewebe. Abbildung 9 zeigt das Ergebnis einer immunhistochemischen Nachweisreaktion von Matrilin-2 in den dentalen und parodontalen Geweben einer DDR1-Knockout-Maus.

Matrilin-3 zeigte in DDR1-Knockout-Mäusen in der gesamten EZM der dentalen Pulpa ein positives immunhistochemisches Reaktionsergebnis. Weder im koronalen und radikulären Dentin noch in der EZM des dentalen Zements konnte Matrilin-3 lokalisiert werden. Hingegen konnte Matrilin-3 in Zementozytenlakunen nachgewiesen werden. Matrilin-3 konnte in der EZM des PDL und in desmodontalen Gefäßwänden lokalisiert werden. In der desmodontalen EZM fiel ein faserartiges Reaktionsergebnis der Immunhistochemie für Matrilin-3 auf. Zudem zeigte das positive Reaktionsergebnis in der gesamten EZM des PDL eine homogene Verteilung. In der EZM des Knochens und in Osteozytenlakunen konnte Matrilin-3 hingegen nicht nachgewiesen werden. In Gefäßwänden im Knochen zeigte der immunhistochemische Nachweis von Matrilin-3 dagegen ein positives Reaktionsergebnis. Abbildung 10 zeigt das Ergebnis einer immunhistochemischen Nachweisreaktion von Matrilin-3 in den dentalen und parodontalen Geweben einer DDR1-Knockout-Maus.

Matrilin-4 konnte in DDR1-Knockout-Mäusen in der gesamten EZM der dentalen Pulpa nachgewiesen werden. Hingegen konnte Matrilin-4 weder im Kronen- und Wurzel-dentin noch in der EZM des Zements und in Zementozytenlakunen nachgewiesen werden. Im PDL zeigte sich in der EZM sowie in Gefäßwänden ein positives immunhistochemisches Ergebnis für Matrilin-4. Das Reaktionsergebnis zeigte in der gesamten EZM des PDL eine homogene Verteilung. Es fiel ein faserartiges Reaktionsergebnis in der desmodontalen EZM auf. In der EZM des Knochens und in Osteozytenlakunen konnte Matrilin-4 hingegen nicht lokalisiert werden. Jedoch zeigte der immunhistochemische Nachweis von Matrilin-4 in Gefäßwänden

im Knochen ein positives Ergebnis. Abbildung 11 zeigt das Ergebnis einer immunhistochemischen Nachweisreaktion von Matrilin-4 in den dentalen und parodontalen Geweben einer DDR1-Knockout-Maus.

In der folgenden Tabelle ist die Auswertung des immunhistochemischen Nachweises der Matrilin in den untersuchten Geweben der DDR1-Knockout-Maus dargestellt. In die Auswertung wurden alle durchgeführten immunhistochemischen Reaktionen einbezogen. Pro Antikörper wurden mindestens drei voneinander unabhängige Reaktionen an Schnitten unterschiedlicher DDR1-Knockout-Mäuse ausgewertet. Es konnte auf einen Pool von 14 DDR1-Knockout-Mäusen zurückgegriffen werden.

Tabelle 7: Immunhistochemischer Nachweis von Matrilinen an Molaren in Kiefersegmenten der DDR1-Knockout-Maus

Gewebe		Matrilin-1	Matrilin-2	Matrilin-3	Matrilin-4
Pulpa		+	+	+	+
Dentin	koronal	+	-	-	-
	radikulär	-	-	-	-
Zement	EZM	-	-	-	-
	Zementozytenlakunen	+	+	+	-
PDL	EZM	+	+	+	+
	Gefäßwände	+	+	+	+
Knochen	EZM	-	-	-	-
	Osteozytenlakunen	+	+	-	-
	Gefäßwände	+	+	+	+

+ = positive Reaktion; - = negative Reaktion.

Während die oben aufgeführte Tabelle auf Grundlage der Auswertung aller durchgeführten immunhistochemischen Reaktionen erstellt wurde, zeigen die folgenden Abbildungen 8 bis 11 exemplarisch immunhistochemische Reaktionen an ausgewählten Präparaten und repräsentieren daher nicht ausschließlich das mehrheitliche Reaktionsergebnis.

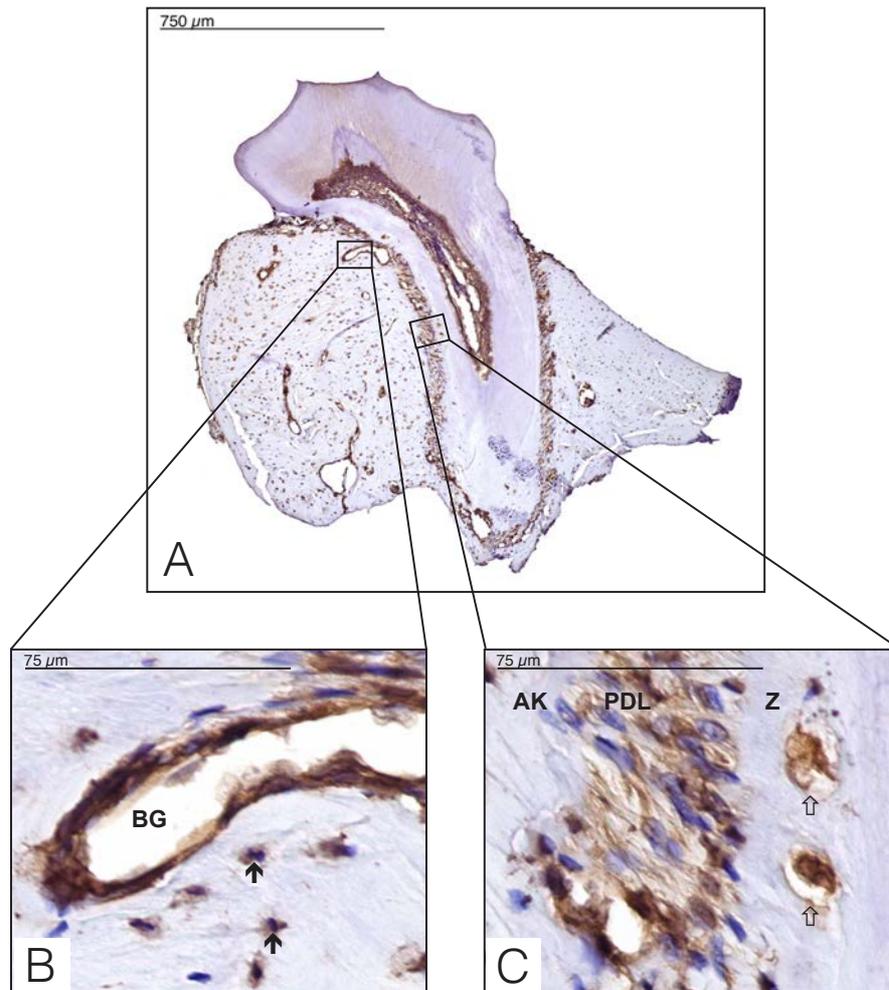


Abbildung 8: Immunhistochemischer Nachweis von Matrilin-1 an Molar in Kiefersegment der DDR1-Knockout-Maus.

Übersichtsaufnahme (A) und Detailaufnahmen (B, C).

A: Positive Reaktion insbesondere in Pulpa, koronalem Dentin und PDL.

B: Positives Reaktionsergebnis in Osteozytenlakunen (schwarze Pfeile) und in Gefäßwand eines Blutgefäßes (BG). Negatives Reaktionsergebnis in EZM des Knochens.

C: Positive Reaktion in Zementozytenlakunen (nicht gefüllte Pfeile) und in EZM des PDL, hier faserartiges Reaktionsergebnis. EZM von Alveolarknochen (AK) und Zement (Z) negativ.

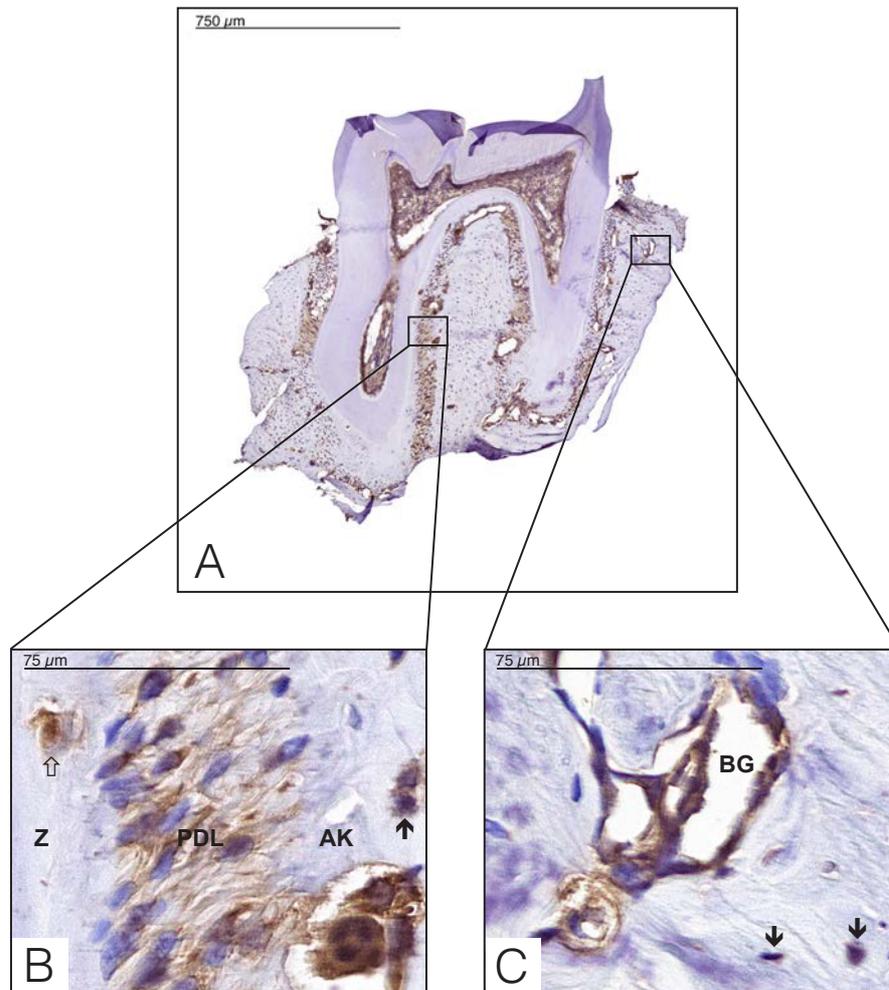


Abbildung 9: Immunhistochemischer Nachweis von Matrilin-2 an Molar in Kiefersegment der DDR1-Knockout-Maus.

Übersichtsaufnahme (A) und Detailaufnahmen (B, C).

A: Positives Ergebnis insbesondere in Pulpa und PDL.

B: Positives Reaktionsergebnis in Zementozytenlakune (nicht gefüllter Pfeil), in EZM des PDL, hier faserartig, und in Osteozytenlakunen (schwarzer Pfeil). EZM von Zement (Z) und Alveolarknochen (AK) negativ.

C: Positives Ergebnis in Gefäßwand eines Blutgefäßes (BG) und in Osteozytenlakunen (schwarze Pfeile). EZM des Knochens negativ.

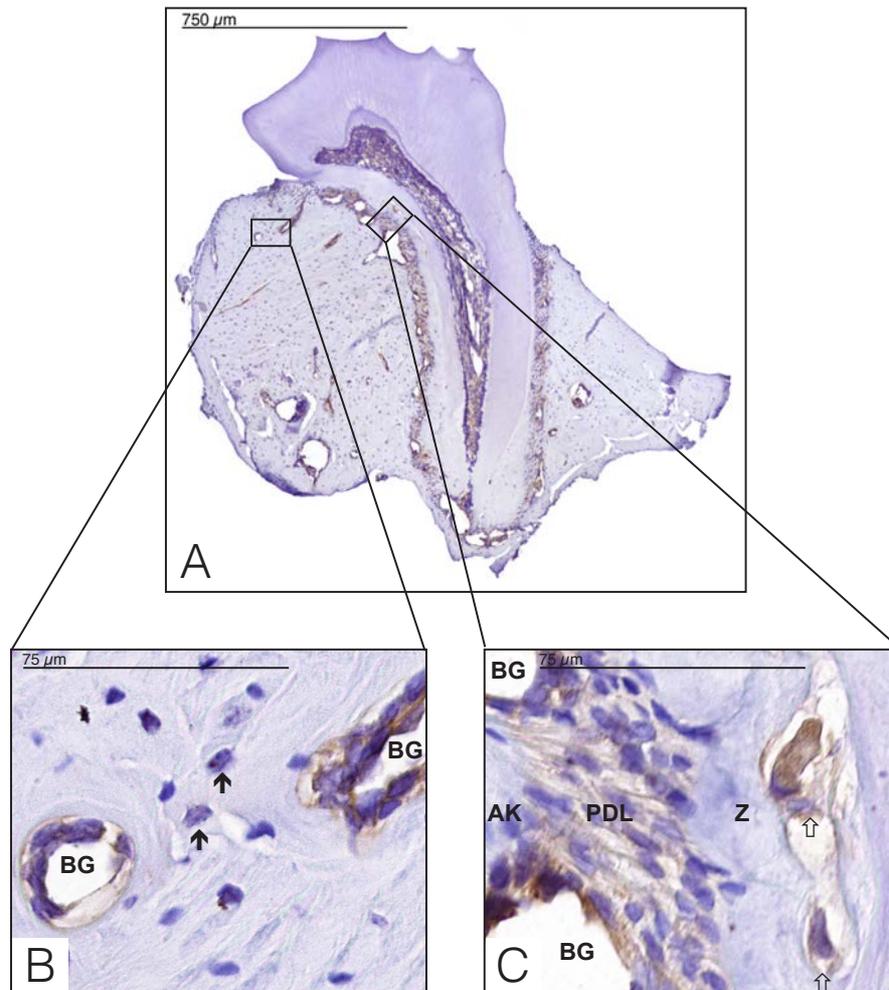


Abbildung 10: Immunhistochemischer Nachweis von Matrilin-3 an Molar in Kiefersegment der DDR1-Knockout-Maus.

Übersichtsaufnahme (A) und Detailaufnahmen (B, C).

A: Positives Reaktionsergebnis insbesondere in Pulpa und PDL.

B: Positives Ergebnis in Gefäßwand von Blutgefäßen (BG). Osteozytenlakunen (schwarze Pfeile) und EZM des Knochens negativ.

C: Positives Ergebnis in Zementozytenlakunen (nicht ausgefüllte Pfeile), in Gefäßwand desmodontaler Blutgefäße (BG) und in EZM des PDL, hier faserartiges Reaktionsergebnis. EZM von Zement (Z) und Alveolarknochen (AK) negativ.

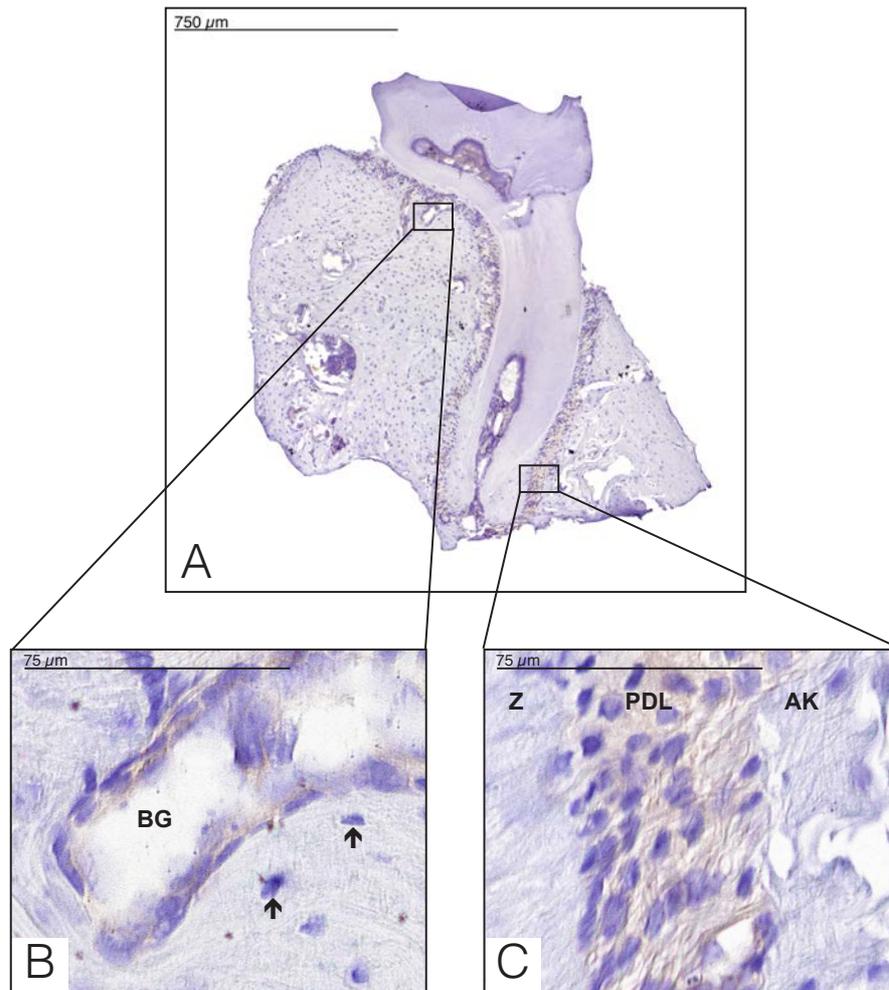


Abbildung 11: Immunhistochemischer Nachweis von Matrilin-4 an Molar in Kiefersegment der DDR1-Knockout-Maus.

Übersichtsaufnahme (A) und Detailaufnahmen (B, C).

A: Positives Reaktionsergebnis insbesondere in Pulpa und PDL.

B: Positives Ergebnis in Gefäßwand eines Blutgefäßes (BG). Osteozytenlakunen (schwarze Pfeile) und EZM des Knochens negativ.

C: Positives Ergebnis in EZM des PDL, hier faserartiges Reaktionsergebnis. EZM von Zement (Z) und Alveolarknochen (AK) negativ.

4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden anhand eines Knockout-Modells die Auswirkungen des Fehlens des Kollagenrezeptors DDR1 auf die Struktur dentaler und parodontaler Gewebe der Maus untersucht. Anhand des immunhistochemischen Nachweises von Matrinen wurde zudem die biochemische Zusammensetzung der dentalen und parodontalen Gewebe der Wildtyp-Maus und der DDR1-Knockout-Maus beschrieben.

Die Aufschlüsselung der biochemischen Komposition der EZM ist Voraussetzung für das Verständnis der Homöostase parodontaler und dentaler Gewebe. Auch Erkenntnisse hinsichtlich der Kollagenrezeptoren dienen dem Verständnis physiologischer Prozesse innerhalb der untersuchten dentalen und parodontalen Gewebe. Die Pathologie entzündlicher Erkrankungen des Parodonts ist ebenfalls nur vor dem Hintergrund detaillierter Kenntnisse der EZM-Zusammensetzung der beteiligten Gewebe verständlich.

Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit wurden an dentalen und parodontalen Geweben der Maus durchgeführt. Im Gegensatz zum Menschen weist das murine Gebiss pro Quadrant je einen Inzisivus und drei Molaren auf (Peterková et al. 1995). Lediglich die labiale Kronenfläche der murinen Inzisivi ist von Schmelz bedeckt (Beertsen und Niehof 1986). Murine Inzisivi wachsen konstant nach und weisen an ihrem proximalen Ende in der sogenannten zervikalen Schleife eine Nische für epitheliale Stammzellen auf (Harada et al. 1999). Sie nehmen somit eine Sonderstellung im murinen Gebiss ein, die sich des Weiteren in einer von murinen Molaren abzugrenzenden Modulation der Zahneruption zeigt (Popova et al. 2007). Trotz bestehender genetischer Unterschiede zwischen Maus und Mensch (Church et al. 2009) stellt das murine Gebiss ein geeignetes und verbreitetes Modell zur Untersuchung dentaler und parodontaler Gewebe dar.

Die Etablierung von Knockout-Modellen ist eine gängige Methode, um Rückschlüsse auf Funktionen von Proteinen *in vivo* zu gewinnen. Mithilfe von Knockout-Versuchen an Mäusen konnte die Relevanz von Proteinen der EZM für die Entwicklung und Struktur dentaler und parodontaler Gewebe aufgezeigt werden.

Die Ausbildung von Alveolarknochen und dentalem Zement (Ye et al. 2008) sowie physikalische Parameter wie die Härte der mineralisierten Gewebe Alveolarknochen und Schmelz (Chiu et al. 2012) werden durch extrazelluläre Proteine moduliert. Proteine der EZM wie Lumican, Fibromodulin oder Decorin beeinflussen zudem die reguläre Ausbildung desmodontaler Fasern (Matheson et al. 2005). Während die Funktion des Kollagenrezeptors Integrin $\alpha 11\beta 1$ mittels Knockout-Versuchen in dentalen und parodontalen Geweben der Maus untersucht ist (Popova et al. 2007), sind Knockout-Versuche der DDR-Familie bezüglich ihrer Auswirkungen auf dentale und parodontale Gewebe bisher nicht publiziert.

4.1 Dentale und parodontale Gewebe der DDR1-Knockout-Maus

DDR1 stellt in der heutigen onkologischen Forschung einen potentiellen prognostischen Marker für Tumorerkrankungen dar (Miao et al. 2013). DDRs sind zudem kollagenbindende Rezeptoren, die unter anderem Fähigkeiten zur Bindung der fibrillären Kollagene I, III und V zeigen (Shrivastava et al. 1997). Diese Kollagene sind wesentliche Bestandteile der Hauptfasern des PDL (Birk et al. 1988, Huang et al. 1991).

Die untersuchten dentalen und parodontalen Gewebe der Wildtyp-Maus und der DDR1-Knockout-Maus zeigten weder strukturelle noch ultrastrukturelle Unterschiede. Obwohl DDR1 während der Embryonalentwicklung in Zahnanlagen exprimiert wird (Sánchez et al. 1994), zeigten DDR1-Knockout-Mäuse einen zu Wildtyp-Mäusen vergleichbaren Zahnaufbau mit Pulpa, Dentin und Zement. Die Struktur des Zahnschmelzes konnte aufgrund der vorbereitenden Entkalkung nicht beurteilt werden. Alveolarknochen und PDL der DDR1-Knockout-Maus wiesen lichtmikroskopisch ebenfalls keine strukturellen Auffälligkeiten auf.

DDR1-Knockout-Mäuse entwickeln im Kiefergelenk eine Osteoarthritis, die sich durch ein desorganisiertes Kollagenetzwerk im Gelenkknorpel auszeichnet (Schminke et al. 2014). Im Gegensatz dazu waren im elektronenmikroskopischen Bild die kollagenen Mikrofibrillen und deren Ausrichtung in Faserbündeln im PDL der DDR1-Knockout-Maus im Vergleich zur Wildtyp-Maus nicht verändert. Während der Knockout extrazellulärer Matrixproteine in Veränderungen der Fibril-

lenultrastruktur resultiert (Matheson et al. 2005, Norris et al. 2007), hat der Knockout des Kollagenrezeptors DDR1 keinen Effekt auf die Ultrastruktur der Kollagenfasern des PDL.

Schminke et al. (2014) beschreiben eine kompensatorische Hochregulierung von DDR2 in Knorpelzellen und eine damit verbundene Hochregulierung von MMP13 und Matrixdegeneration als Pathomechanismus der Osteoarthritis im Kiefergelenk der DDR1-Knockout-Maus. DDR1 kann in Ratten während der Embryonalentwicklung in Zahnanlagen nachgewiesen werden (Sánchez et al. 1994). Somit ist auch von einer Expressierung von DDR1 in den untersuchten dentalen und parodontalen Geweben der Maus auszugehen. Parodontale Zellen sind außerdem grundsätzlich in der Lage, MMP13 zu exprimieren. Dies ist insbesondere im Zuge entzündlicher Parodontalerkrankungen der Fall (Trombone et al. 2009). Neben dem Nachweis von Entzündungsmarkern sind die Anzahl vorhandener Entzündungszellen, die Anzahl angeschnittener Blutgefäße sowie eine Degeneration der EZM Parameter, anhand derer eine Parodontitis lichtmikroskopisch nachgewiesen werden kann (de Molon et al. 2014). Die zellulären Komponenten des PDL der DDR1-Knockout-Maus wiesen im vorliegenden Fall auf entzündungsfreie Verhältnisse hin. Zudem gaben die lichtmikroskopische Struktur der EZM des PDL, des dentalen Zements und des Alveolarknochens sowie die Anzahl der angeschnittenen Blutgefäße im PDL keinen Hinweis auf das Bestehen einer Entzündung des Zahnhalteapparats. Somit kann von entzündungsfreien Verhältnissen in den parodontalen Strukturen der DDR1-Knockout-Maus ausgegangen werden.

Auch die Ultrastruktur der kollagenen Hauptfasern des PDL ist durch den Knockout von DDR1 unbeeinträchtigt. Möglich ist, dass aufgrund der geringeren Affinität von MMP13 zu den Kollagenen I und III, den Hauptkollagenen des PDL, im Vergleich zu Kollagen II (Knäuper et al. 1996) eine isolierte Hochregulierung von MMP13 *in vivo* nicht zu einer Hydrolyse parodontaler Kollagene führt. Die DDR1-Knockout-Maus entwickelt zwar im Kiefergelenk, jedoch interessanterweise nicht im Kniegelenk, eine Osteoarthritis (Schminke et al. 2014). Das Kiefergelenk weist im Vergleich zum Kniegelenk Unterschiede in der biochemischen Zusammensetzung der EZM des gesunden Gelenkknorpels auf. Diese äußern sich insbesondere in einer veränderten Expression von Kollagen I (Benjamin und Ralphs 2004). In

diesem Zusammenhang ist denkbar, dass das Ausbleiben eines Kollagendefekts in der EZM dentaler und parodontaler Gewebe der DDR1-Knockout-Maus mit der zum Kiefergelenk unterschiedlichen Komposition der EZM zu begründen ist. Insbesondere im PDL könnte der komplexe Aufbau der kollagenen Hauptfasern aus Kollagen I, III (Huang et al. 1991), V (Birk et al. 1988), XII (Karimbux et al. 1992) und XIV (Zhang et al. 1993) eine Hydrolyse durch MMP13 verhindern.

Die Hochregulierung von DDR2 und die damit einhergehende Expression von MMP13 in Knorpelzellen stellt ein Schlüsselereignis in der Pathogenese der Osteoarthritis dar (Xu et al. 2007). Zudem ist in Knorpelzellen die kompensatorische Hochregulierung von DDR2 bei Knockout von DDR1 beschrieben (Schminke et al. 2014). Ob in Fibroblasten des PDL eine Hochregulierung von DDR2 ebenfalls eine vermehrte Expression von MMP13 bewirkt und ob eine Hochregulierung von DDR2 bei Knockout von DDR1 in desmodontalen Fibroblasten überhaupt erfolgt, bedarf weiterer Untersuchungen.

Des Weiteren ist zu bedenken, dass neben DDR1 und DDR2 die Familie der Integrine eine weitere Gruppe kollagenbindender Rezeptoren darstellt. Integrine zeigen *in vitro* unter anderem Bindungsaffinitäten zu den desmodontalen Hauptkollagenen I (Xu et al. 2000) und III (Hamaia et al. 2012). Integrin alpha11beta1 spielt im PDL muriner Inzisivi während des Zahndurchbruchs eine entscheidende Rolle (Popova et al. 2007). Zusätzlich ist in Primaten Integrin alpha2beta1 an Zelloberflächen desmodontaler Fibroblasten nachweisbar (Steffensen et al. 1992). Obwohl DDR1 die Bindung von Beta1-Integrinen an fibrilläre Kollagene *in vitro* moduliert (Staudinger et al. 2013), ist aufgrund der unveränderten Struktur und Ultrastruktur des PDL der Molaren der DDR1-Knockout-Maus eine von Integrinen bestimmte Interaktion zwischen Fibroblasten und Kollagenfibrillen des PDL denkbar. Die Kompensation des DDR1-Knockouts durch die Aktivität von Kollagenrezeptoren wie der Integrine kann auch als Erklärungsansatz für die unveränderte Struktur der weiteren untersuchten dentalen und parodontalen Strukturen der DDR1-Knockout-Maus dienen.

4.2 Matrilin in Kiefersegmenten der Wildtyp-Maus

Matrilin sind Proteine der EZM, die in Wachstumsprozessen, insbesondere während der Embryonalentwicklung und im Wachstumsknorpel, eine Rolle spielen (Klatt et al. 2002). Matrilin-2 kann im PDL muriner Inzisivi lokalisiert werden (Piecha et al. 1999), während Matrilin-4 in den Anlagen von Inzisivi der Maus (Klatt et al. 2001) nachgewiesen werden kann. Die vorliegende Arbeit ist hingegen die erste Studie, die die Expression von Matrilin-1, -2, -3 und -4 systematisch an Molaren in Kiefersegmenten der Maus untersucht.

In der gesamten Pulpa menschlicher Zähne kann Matrilin-2 nachgewiesen werden. Matrilin-4 ist hingegen auf den pulpalen Odontoblastensaum menschlicher Zähne begrenzt (Chen et al. 2011). Matrilin-4 konnte in der vorliegenden Arbeit, ebenso wie Matrilin-1, -2 und -3, in murinen Molaren in der gesamten EZM der Pulpa in homogener Verteilung nachgewiesen werden. Im Vergleich mit der humanen Pulpa lässt dies auf eine breitere Expression von Matrilinen in der pulpalen EZM muriner Molaren schließen. Matrilin-2 und Matrilin-4 sind in der menschlichen Pulpa während der Gewebsantwort auf einen kariösen Reiz nachweisbar (Chen et al. 2011). Aufgrund ihrer Bindungseigenschaften und ihrer Fähigkeit filamentöse Netzwerke auszubilden, könnten Matrilin in diesem Zusammenhang in der Pulpa eine Rolle in der Vernetzung der Komponenten der EZM spielen.

Im Dentin muriner Molaren konnten Matrilin-2, -3 und -4 nicht lokalisiert werden. Matrilin-1 konnte dagegen im Dentin muriner Molaren auf koronale Bereiche begrenzt nachgewiesen werden. Anhand des unterschiedlichen Gehalts von Phosphoprotein in Kronen- und Wurzelzementin konnte die unterschiedliche biochemische Zusammensetzung von Kronen- und Wurzelzementin schon früh belegt werden (Steinfort et al. 1989). Die vorliegenden Ergebnisse in der Expression von Matrilin-1 unterstützen diese Feststellung. Inwiefern Matrilin-1 Funktionen innerhalb der koronalen Dentinmatrix von Mäusen übernimmt, bedarf weiterer Untersuchungen. Matrilin-2 wird *in vitro* von menschlichen Pulpazellen exprimiert, die sich zu Odontoblasten differenzieren (Wei et al. 2008). In diesem Zusammenhang ist es möglich, dass der Nachweis von Matrilin-1 im koronalen Dentin muriner

Molaren mit einer Expression durch die Odontoblastenfortsätze in den Dentinkanälchen zu begründen ist.

Alle Matriline zeigten in der mineralisierten EZM des dentalen Zements ein negatives immunhistochemisches Ergebnis. Während Matrilin-2, -3 und -4 aufgrund fehlender Anschnitte in Zementozytenlakunen nicht nachgewiesen werden konnten, zeigte Matrilin-1 in Zementozytenlakunen dagegen ein positives immunhistochemisches Ergebnis. Im menschlichen dentalen Zement weisen Proteoglykane wie Decorin und Lumican mit einem auf Zementozytenlakunen begrenzten Vorkommen ein ähnliches Expressionsmuster auf (Ababneh et al. 1999). Denkbar ist eine Interaktion der Matriline mit Proteoglykanen wie Decorin (Wiberg et al. 2003) in der EZM der Zementozytenlakunen. Der auf die nicht mineralisierten Bereiche der EZM in Zementozytenlakunen begrenzte Nachweis deutet außerdem auf eine mögliche Rolle von Matrilin-1 in der Mineralisation der Zementmatrix hin. Aufgrund der Fähigkeit Kollagene miteinander zu vernetzen könnte Matrilin-1, ähnlich wie Decorin (Mochida et al. 2009), die Mineralisation der EZM modulieren.

In der EZM des PDL konnten Matrilin-1, -2, -3 und -4 nachgewiesen werden. Der faserartige Charakter des immunhistochemischen Ergebnisses lässt auf eine Kollokalisierung mit kollagenen Hauptfasern des PDL schließen. Lediglich für Matrilin-2 ist eine Bindungsaffinität zu Kollagen I, dem Hauptvertreter der kollagenen Fasern des PDL, bekannt (Piecha et al. 2002). Eine Interaktion von Matrilin-4, das unter anderem in Geweben wie Bändern und Sehnen nachweisbar ist (Klatt et al. 2001), mit Kollagen I ist ebenfalls denkbar. Matrilin-1 (Winterbottom et al. 1992) und -3 (Fresquet et al. 2007) weisen hingegen insbesondere Bindungsaffinitäten zu Kollagen II auf, dessen Vorkommen typisch für Knorpelgewebe ist. Möglich ist, dass Matrilin-1 und -3 *in vivo* bis jetzt nicht nachgewiesene Bindungsaffinitäten zu Kollagenen des PDL aufweisen. Die Kollokalisierung mit kollagenen Hauptfasern ließe sich des Weiteren auch mit einer Interaktion der Matriline mit kollagenbindenden Proteoglykanen wie Decorin (Keene et al. 2000) oder Biglykan (Schönherr et al. 1995) erklären.

Während Matrilin-2 in regenerativen Prozessen nachgewiesen werden kann (Malin et al. 2009), ist Matrilin-4 insbesondere während Umbauprozessen der EZM loka-

lisierbar (Barallobre-Barreiro et al. 2012). Die EZM des PDL, die von kollagenen Fasern dominiert wird, unterliegt aufgrund der wirkenden mastikatorischen Kräfte einer konstanten Umstrukturierung, die sich in einem hohen Kollagenturnover zeigt (Sodek 1977). In diesem Zusammenhang kann sowohl der Nachweis von Matrilin-2 als auch von Matrilin-4 in der EZM des PDL als Zeichen einer konstant ablaufenden Neuorganisation der EZM interpretiert werden. Darüber hinaus konnten in der EZM des PDL auch Matrilin-1 und Matrilin-3 nachgewiesen werden, die im Gegensatz zu Matrilin-2 und Matrilin-4 im Zuge degenerativer Erkrankungen wie Osteoarthritis im Knorpel vermehrt lokalisierbar sind (Okimura et al. 1997, Pullig et al. 2002). Der parodontale Zustand der untersuchten Mäuse weist nicht auf das Bestehen einer entzündlichen Erkrankung hin. Somit ist der Nachweis von Matrilin-1 und Matrilin-3 im PDL weniger als Anzeichen einer Degeneration des Desmodonts zu sehen. Vielmehr ist der erfolgte Nachweis von Matrilin-1 und Matrilin-3 im PDL im Zusammenhang mit der oben genannten Assoziation der Matriline mit Kollagenen beziehungsweise mit kollagenbindenden Proteinen erklärbar. Ob sich im Zuge einer Parodontitis, einer chronisch-degenerativen Erkrankung des Parodonts (Yucel-Lindberg und Båge 2013), die Expression der Matriline - insbesondere von Matrilin-1 und Matrilin-3 - verändert, ist in weiterführenden Untersuchungen zu klären.

Alle Matriline konnten im Rahmen der durchgeführten Untersuchungen im Bereich der Gefäßwand desmodontaler Gefäße nachgewiesen werden. Da Endothelzellverbände generell keine EZM aufweisen, ist ein erfolgter Nachweis der Matriline als extrazelluläre Matrixproteine der subendothelialen Basalmembran wahrscheinlich. In der dermo-epidermalen Basalmembran ist Matrilin-2 nachweisbar und zeigt Bindungsaffinitäten zu den Basalmembrankomponenten Fibrillin-2, Fibronectin und Laminin-1-Nidogen-1-Komplexen (Piecha et al. 2002). Die bekannten Bindungsaffinitäten von Matrilin-2 wiesen auf eine Expressierung von Matrilin-2 in der Basalmembran desmodontaler Gefäße hin. Interessanterweise konnten auch Matrilin-1, -3 und -4 im Bereich von Gefäßwänden im PDL lokalisiert werden. Interaktionen mit Basalmembrankomponenten sind für diese Matrilinformen nicht publiziert.

Auch im Bereich von Gefäßwänden im Knochen konnten Matrilin-1, -2, -3 und -4 lokalisiert werden. In Verbindung mit dem erfolgten Nachweis der Matriline in desmodontalen Gefäßwänden weisen die vorliegenden Ergebnisse auf eine im Vergleich zum Menschen weitere Expression von Matrilinen in Basalmembranen von Mäusen hin.

In der EZM des Knochens zeigte die Immunhistochemie für alle Matriline ein negatives Ergebnis. Matrilin-1 und Matrilin-2 konnten hingegen in Osteozytenlakunen lokalisiert werden. Eine ähnliche Verteilung weisen sulfatreiche Proteoglykane auf, deren Expression im Alveolarknochen auf die unmineralisierte, Osteozyten umgebende EZM in Osteozytenlakunen begrenzt ist (Smith et al. 1997). Eine Interaktion der Matriline mit sulfatreichen Proteoglykanen in der nicht mineralisierten EZM der Osteozytenlakunen ist somit denkbar. Neben Aufgaben in der Mechanotransduktion (Tatsumi et al. 2007) modulieren Osteozyten die Mineralisation der Knochenmatrix (Powell et al. 2011). Möglich ist in diesem Zusammenhang, ähnlich der Vermutung zu Matrilin-1 in Zementozytenlakunen, eine Modulation der Mineralisation in Osteozytenlakunen durch Matrilin-1 und Matrilin-2. Beide Glykoproteine konnten nicht in allen Osteozytenlakunen immunhistochemisch nachgewiesen werden. Dies spricht einerseits für eine hochspezifische immunhistochemische Nachweisreaktion der Matriline. Andererseits lässt sich aus dem auf bestimmte Osteozytenlakunen begrenzten Nachweis von Matrilin-1 und Matrilin-2 schließen, dass der Kieferknochen ein dynamisches Gewebe darstellt, in dem sich einzelne Areale hinsichtlich ihrer biochemischen Zusammensetzung unterscheiden.

Bemerkenswert ist, dass der immunhistochemische Nachweis der vier unterschiedlichen Matrilinformen in dentalen und parodontalen Geweben der Wildtyp-Maus ein ähnliches Muster zeigte. In der EZM des PDL, in der EZM der Pulpa und in Gefäßwänden in PDL und Knochen konnten alle Matriline einheitlich nachgewiesen werden. Während der Nachweis der Matriline in Zementozytenlakunen aufgrund fehlender Anschnitte nicht verglichen werden konnte, wurden lediglich im koronalen Dentin und in Osteozytenlakunen Unterschiede festgestellt. Ähnlich der Expression der Matriline während der enchondralen Knorpelentwicklung (Klatt et al. 2002) konnten in dentalen und parodontalen Geweben der Wildtyp-Maus

somit neben Unterschieden viele Gemeinsamkeiten in der Nachweisbarkeit der Matriline festgestellt werden. Denkbar ist in diesem Zusammenhang, dass Matriline aufgrund ihrer ähnlichen Verteilung gleiche Funktionen ausüben. Knockout-Versuche bezüglich der Matriline und ihr Nachweis im Knorpel werfen die Frage nach einer funktionellen Redundanz der Matriline auf (Aszódi et al. 1999). Dagegen sprechen allerdings die auch in der vorliegenden Arbeit gezeigten Unterschiede in der Nachweisbarkeit der Matrilinformen.

Generell kann aus den Ergebnissen des immunhistochemischen Nachweises der Matriline geschlossen werden, dass Matrilin-1, -2, -3 und -4 in der EZM der untersuchten dentalen und parodontalen Gewebe der Wildtyp-Maus eine strukturelle Bedeutung zukommt.

4.3 Matriline in Kiefersegmenten der DDR1-Knockout-Maus

Um neben Erkenntnissen über die Struktur und Ultrastruktur dentaler und parodontaler Gewebe der DDR1-Knockout-Maus einen Einblick in deren biochemische Komposition zu erlangen, wurde der immunhistochemische Nachweis der Matriline in den Geweben der DDR1-Knockout-Maus im Vergleich zur Wildtyp-Maus durchgeführt. Der immunhistochemische Nachweis der Matriline eignet sich insofern zur Charakterisierung der EZM dentaler und parodontaler Gewebe der DDR1-Knockout-Maus, als dass Matriline Bindungsaffinitäten zu kollagenen sowie nicht-kollagenen Strukturen aufweisen, die in der EZM dentaler und parodontaler Gewebe vorhanden sind. Eine durch den DDR1-Knockout bedingte Veränderung der Bindungseigenschaften der Kollagene könnte, insbesondere in der EZM des PDL, in einem zur Wildtyp-Maus unterschiedlichen Ergebnis des immunhistochemischen Nachweises der Matriline resultieren. Eine mögliche, strukturell sowie ultrastrukturell nicht nachweisbare Veränderung der biochemischen Zusammensetzung der dentalen und parodontalen Gewebe der DDR1-Knockout-Maus könnte somit anhand des immunhistochemischen Nachweises der Matriline dargestellt werden.

Der vergleichende immunhistochemische Nachweis von Matrilinen an Molaren in Kiefersegmenten der DDR1-Knockout-Maus und der Wildtyp-Maus ergab in der

EZM der Pulpa, des Dentins, des Zements sowie des PDL und des Knochens vergleichbare Reaktionsergebnisse. Auch in Gefäßwänden von Knochen und PDL sowie in Osteozytenlakunen konnten übereinstimmende Ergebnisse festgestellt werden. Lediglich im Bereich der Zementozytenlakunen ergaben sich nicht einheitliche Ergebnisse, die jedoch den fehlenden Anschnitten von Zementozytenlakunen der Wildtyp-Maus geschuldet waren. Während Matrilin-1, -2 und -3 in Zementozytenlakunen der DDR1-Knockout-Maus nachgewiesen werden konnten, war das Ergebnis des immunhistochemischen Nachweises von Matrilin-4 negativ. Vergleichbar mit den Ergebnissen des immunhistochemischen Nachweises der Matriline in Osteozytenlakunen, sprechen die vorliegenden Ergebnisse in der DDR1-Knockout-Maus für eine nicht einheitliche Expression der Matriline im Bereich von Zementozytenlakunen.

Die immunhistochemische Nachweisbarkeit der Matriline in dentalen und parodontalen Geweben der Maus ist somit unabhängig von der Expression des Kollagenrezeptors DDR1. Im Gegensatz zur veränderten EZM des Kiefergelenks der DDR1-Knockout-Maus (Schminke et al. 2014) gibt der immunhistochemische Nachweis der Matriline in dentalen und parodontalen Geweben der DDR1-Knockout-Maus keinen Hinweis auf eine Veränderung der biochemischen Zusammensetzung der EZM. Auch eventuelle aus dem DDR1-Knockout resultierende veränderte Bindungseigenschaften parodontaler und dentaler Kollagene zeigten sich nicht in einem veränderten immunhistochemischen Nachweis der Matriline. Eine eventuelle durch den DDR1-Knockout bedingte Modulation der Interaktion von Matrilinen mit nicht-kollagenen Bindungspartnern, die gleichzeitig Bindungsaffinität zu Kollagenen aufweisen, ist somit ebenfalls unwahrscheinlich.

Die immunhistochemischen Ergebnisse stimmen mit den zuvor aufgeführten licht- und elektronenmikroskopischen Resultaten überein. Der DDR1-Knockout resultiert in dentalen und parodontalen Geweben der Maus weder in Auffälligkeiten in der Struktur und der Ultrastruktur, noch in der biochemischen Komposition hinsichtlich der Nachweisbarkeit von Matrilinen.

5 Zusammenfassung

DDRs stellen Rezeptortyrosinkinasen dar, die sowohl Kollagene binden als auch durch fibrilläre Kollagene aktiviert werden. Anhand eines Knockout-Modells konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass das Fehlen von DDR1 keinen Effekt auf die lichtmikroskopische Struktur dentaler und parodontaler Gewebe der Maus hat. Auch ultrastrukturell bestanden im Bereich des PDL, eines hoch spezialisierten Gewebes, dessen EZM von fibrillären Kollagenen dominiert wird, keine Auffälligkeiten.

Die vorliegende Arbeit ist die erste Studie, in der der immunhistochemische Nachweis von Matrilin-1, -2, -3 und -4 systematisch an Molaren in Kiefersegmenten der Wildtyp-Maus durchgeführt wurde. Matriline stellen filamentbildende und kollagenbindende Proteine der EZM dar, die insbesondere in Knorpelstrukturen und in embryonalen Geweben nachgewiesen werden können. Sie konnten einheitlich in der EZM der dentalen Pulpa, in der EZM des PDL sowie in Gefäßwänden im PDL und im Knochen lokalisiert werden. Unterschiede in der immunhistochemischen Nachweisbarkeit von Matrilin-1, -2, -3 und -4 bestanden in der Wildtyp-Maus im Bereich des koronalen Dentins und in Osteozytenlakunen. Generell kommt somit Matrilinen in der EZM dentaler und parodontaler Gewebe der Maus eine strukturelle Bedeutung zu.

Matrilin-1, -2, -3 und -4 konnten ebenfalls in dentalen und parodontalen Geweben der DDR1-Knockout-Maus nachgewiesen werden. Mittels des Vergleichs der immunhistochemischen Ergebnisse konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass der Knockout von DDR1 keinen Effekt auf die biochemische Zusammensetzung der dentalen und parodontalen Gewebe der Maus hinsichtlich der immunhistochemischen Nachweisbarkeit der Matriline hat.

6 Anhang

6.1 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Aufsteigende Alkoholreihe im Einbettautomaten	25
Tabelle 2: Hämatoxylin-Eosin-Färbung	28
Tabelle 3: Verwendete Antikörper	30
Tabelle 4: Entparaffinierung und Rehydrierung der Präparate	30
Tabelle 5: Dehydrierung der Präparate	33
Tabelle 6: Immunhistochemischer Nachweis von Matrinen an Molaren in Kiefersegmenten der Wildtyp-Maus	44
Tabelle 7: Immunhistochemischer Nachweis von Matrinen an Molaren in Kiefersegmenten der DDR1-Knockout-Maus	51

6.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Struktur der Matrilinmoleküle	11
Abbildung 2: Hämatoxylin-Eosin-Färbungen von Zahn und Zahnhalteapparat der Maus	39
Abbildung 3: Richardson-Färbungen und Elektronenmikroskopie des PDL	40
Abbildung 4: Immunhistochemischer Nachweis von Matrilin-1 an Molar in Kiefersegment der Wildtyp-Maus	45
Abbildung 5: Immunhistochemischer Nachweis von Matrilin-2 an Molaren in Kiefersegmenten der Wildtyp-Maus	46
Abbildung 6: Immunhistochemischer Nachweis von Matrilin-3 an Molar in Kiefersegment der Wildtyp-Maus	47
Abbildung 7: Immunhistochemischer Nachweis von Matrilin-4 an Molar in Kiefersegment der Wildtyp-Maus	48
Abbildung 8: Immunhistochemischer Nachweis von Matrilin-1 an Molar in Kiefersegment der DDR1-Knockout-Maus	52
Abbildung 9: Immunhistochemischer Nachweis von Matrilin-2 an Molar in Kiefersegment der DDR1-Knockout-Maus	53
Abbildung 10: Immunhistochemischer Nachweis von Matrilin-3 an Molar in Kiefersegment der DDR1-Knockout-Maus	54
Abbildung 11: Immunhistochemischer Nachweis von Matrilin-4 an Molar in Kiefersegment der DDR1-Knockout-Maus	55

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, Koo DH, Vogel WF (2008): Identification of disulfide-linked dimers of the receptor tyrosine kinase DDR1. *J Biol Chem* 283, 12026-33

Adachi E, Hayashi T (1986): In vitro formation of hybrid fibrils of type V collagen and type I collagen. Limited growth of type I collagen into thick fibrils by type V collagen. *Connect Tissue Res* 14, 257-66

Alves F, Vogel W, Mossie K, Millauer B, Höfler 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

Aszódi A, Hauser N, Studer D, Paulsson M, Hiripi L, Bösze Z (1996): Cloning, sequencing and expression analysis of mouse cartilage matrix protein cDNA. *Eur J Biochem* 236, 970-7

Aszódi A, Bateman JF, Hirsch E, Baranyi M, Hunziker EB, Hauser N, Bösze Z, Fässler R (1999): Normal skeletal development of mice lacking matrilin 1: redundant function of matrilins in cartilage? *Mol Cell Biol* 19, 7841-5

Barallobre-Barreiro J, Didangelos A, Schoendube FA, Drozdov I, Yin X, Fernández-Caggiano M, Willeit P, Puntmann VO, Aldama-López G, Shah AM (2012): Proteomics analysis of cardiac extracellular matrix remodeling in a porcine model of ischemia/reperfusion injury. *Circulation* 125, 789-802

Bargal R, Cormier-Daire V, Ben-Neriah Z, Le Merrer M, Sosna J, Melki J, Zangen DH, Smithson SF, Borochowitz Z, Belostotsky R (2009): Mutations in DDR2 gene cause SMED with short limbs and abnormal calcifications. *Am J Hum Genet* 84, 80-4

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, 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

Beck K, Gambiae JE, Bohan CA, Bächinger HP (1996): The C-terminal domain of cartilage matrix protein assembles into a triple-stranded alpha-helical coiled-coil structure. *J Mol Biol* 256, 909-23

Beck K, Gambiae JE, Kamawal A, Bächinger HP (1997): A single amino acid can switch the oligomerization state of the alpha-helical coiled-coil domain of cartilage matrix protein. *EMBO J* 16, 3767-77

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, Niehof A (1986): Root-analogue versus crown-analogue dentin: a radioautographic and ultrastructural investigation of the mouse incisor. *Anat Rec* 215, 106-18

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

Belluoccio D, Trueb B (1997): Matrilin-3 from chicken cartilage. *FEBS Lett* 415, 212-6

Belluoccio D, Schenker T, Baici A, Trueb B (1998): Characterization of human matrilin-3 (MATN3). *Genomics* 53, 391-4

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

Bidanset DJ, Guidry C, Rosenberg LC, Choi HU, Timpl R, Hook M (1992): Binding of the proteoglycan decorin to collagen type VI. *J Biol Chem* 267, 5250-6

Birk DE, Fitch JM, Babiarz JP, Linsenmayer TF (1988): Collagen type I and type V are present in the same fibril in the avian corneal stroma. *J Cell Biol* 106, 999-1008

Birkedal-Hansen H, Butler WT, Taylor RE (1977): Proteins of the periodontium. Characterization of the insoluble collagens of bovine dental cementum. *Calcif Tissue Res* 23, 39-44

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

Brachvogel B, Zaucke F, Dave K, Norris EL, Stermann J, Dayakli M, Koch M, Gorman JJ, Bateman JF, Wilson R (2013): Comparative proteomic analysis of normal and collagen IX null mouse cartilage reveals altered extracellular matrix composition and novel components of the collagen IX interactome. *J Biol Chem* 288, 13481-92

Bronckers AL, Farach-Carson MC, Van Waveren E, Butler WT (1994): Immunolocalization of osteopontin, osteocalcin, and dentin sialoprotein during dental root formation and early cementogenesis in the rat. *J Bone Miner Res* 9, 833-41

Budde B, Blumbach K, Ylöstalo J, Zaucke F, Ehlen HW, Wagener R, Ala-Kokko L, Paulsson M, Bruckner P, Grässel S (2005): Altered integration of matrilin-3 into cartilage extracellular matrix in the absence of collagen IX. *Mol Cell Biol* 25, 10465-78

Calderwood DA, Tuckwell DS, Eble J, Kühn K, Humphries MJ (1997): The integrin alpha1 A-domain is a ligand binding site for collagens and laminin. *J Biol Chem* 272, 12311-7

Carafoli F, Hohenester E (2013): Collagen recognition and transmembrane signalling by discoidin domain receptors. *Biochim Biophys Acta* 1834, 2187-94

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

Chapman KL, Mortier GR, Chapman K, Loughlin J, Grant ME, Briggs MD (2001): Mutations in the region encoding the von Willebrand factor A domain of matrilin-3 are associated with multiple epiphyseal dysplasia. *Nat Genet* 28, 393-6

Chen C, Wei X, Ling J, Xie N (2011): Expression of matrilin-2 and -4 in human dental pulps during dentin-pulp complex wound healing. *J Endod* 37, 642-9

Chen J, Zhang Q, McCulloch CA, Sodek J (1991): Immunohistochemical localization of bone sialoprotein in foetal porcine bone tissues: comparisons with secreted phosphoprotein 1 (SPP-1, osteopontin) and SPARC (osteonectin). *Histochem J* 23, 281-9

Chen Q, Johnson DM, Haudenschild DR, Tondravi MM, Goetinck PF (1995): Cartilage matrix protein forms a type II collagen-independent filamentous network: analysis in primary cell cultures with a retrovirus expression system. *Mol Biol Cell* 6, 1743-53

Chen Q, Zhang Y, Johnson DM, Goetinck PF (1999): Assembly of a novel cartilage matrix protein filamentous network: molecular basis of differential requirement of von Willebrand factor A domains. *Mol Biol Cell* 10, 2149-62

Chiu R, Li W, Herber RP, Marshall SJ, Young M, Ho SP (2012): Effects of biglycan on physico-chemical properties of ligament-mineralized tissue attachment sites. *Arch Oral Biol* 57, 177-87

Cho MI, Garant PR (2000): Development and general structure of the periodontium. *Periodontol 2000* 24, 9-27

Chu ML, Zhang RZ, Pan TC, Stokes D, Conway D, Kuo HJ, Glanville R, Mayer U, Mann K, Deutzmann R (1990): Mosaic structure of globular domains in the human type VI collagen alpha 3 chain: similarity to von Willebrand factor, fibronectin, actin, salivary proteins and aprotinin type protease inhibitors. *EMBO J* 9, 385-93

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

Connor NS, Aubin JE, Melcher AH (1984): The distribution of fibronectin in rat tooth and periodontal tissues: an immunofluorescence study using a monoclonal antibody. *J Histochem Cytochem* 32, 565-72

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

Dames SA, Kammerer RA, Wiltschek R, Engel J, Alexandrescu AT (1998): NMR structure of a parallel homotrimeric coiled coil. *Nat Struct Biol* 5, 687-91

de Molon RS, de Avila ED, Boas Nogueira AV, Chaves de Souza JA, Avila-Campos MJ, de Andrade CR, Cirelli JA (2014): Evaluation of the host response in various models of induced periodontal disease in mice. *J Periodontol* 85, 465-77

Deák F, Piecha D, Bachrati C, Paulsson M, Kiss I (1997): Primary structure and expression of matrilin-2, the closest relative of cartilage matrix protein within the von Willebrand factor type A-like module superfamily. *J Biol Chem* 272, 9268-74

Deák F, Wagener R, Kiss I, Paulsson M (1999): The matrilins: a novel family of oligomeric extracellular matrix proteins. *Matrix Biol* 18, 55-64

Dengjel J, Akimov V, Olsen JV, Bunkenborg J, Mann M, Blagoev B, Andersen JS (2007): Quantitative proteomic assessment of very early cellular signaling events. *Nat Biotechnol* 25, 566-8

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

Ehlen HW, Sengle G, Klatt AR, Talke A, Müller S, Paulsson M, Wagener R (2009): Proteolytic processing causes extensive heterogeneity of tissue matrilin forms. *J Biol Chem* 284, 21545-56

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

Fresquet M, Jowitt TA, Ylöstalo J, Coffey P, Meadows RS, Ala-Kokko L, Thornton DJ, Briggs MD (2007): Structural and functional characterization of recombinant matrilin-3 A-domain and implications for human genetic bone diseases. *J Biol Chem* 282, 34634-43

Fresquet M, Jowitt TA, Stephen LA, Ylöstalo J, Briggs MD (2010): Structural and functional investigations of Matrilin-1 A-domains reveal insights into their role in cartilage ECM assembly. *J Biol Chem* 285, 34048-61

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

Fu HL, Sohail A, Valiathan RR, Wasinski BD, Kumarasiri M, Mahasenan KV, Bernardo MM, Tokmina-Roszyk D, Fields GB, Mobashery S (2013b): Shedding of discoidin domain receptor 1 by membrane-type matrix metalloproteinases. *J Biol Chem* 288, 12114-29

Giudici C, Raynal N, Wiedemann H, Cabral WA, Marini JC, Timpl R, Bächinger HP, Farndale RW, Sasaki T, Tenni R (2008): Mapping of SPARC/BM-40/osteonectin-binding sites on fibrillar collagens. *J Biol Chem* 283, 19551-60

Groma G, Grskovic I, Schael S, Ehlen HW, Wagener R, Fosang A, Aszodi A, Paulsson M, Brachvogel B, Zaucke F (2011): Matrilin-4 is processed by ADAMTS-5 in late Golgi vesicles present in growth plate chondrocytes of defined differentiation state. *Matrix Biol* 30, 275-80

Gross O, Beirowski B, Harvey SJ, McFadden C, Chen D, Tam S, Thorne 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

Gross O, Girgert R, Beirowski B, Kretzler M, Kang HG, Kruegel J, Miosge N, Busse AC, Segerer S, Vogel WF (2010): Loss of collagen-receptor DDR1 delays renal fibrosis in hereditary type IV collagen disease. *Matrix Biol* 29, 346-56

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

Hamaia SW, Pugh N, Raynal N, Némóz B, Stone R, Gullberg D, Bihan D, Farndale RW (2012): Mapping of potent and specific binding motifs, GLOGEN and GVOGEA, for integrin $\alpha 1 \beta 1$ using collagen toolkits II and III. *J Biol Chem* 287, 26019-28

Handford PA, Mayhew M, Baron M, Winship PR, Campbell ID, Brownlee GG (1991): Key residues involved in calcium-binding motifs in EGF-like domains. *Nature* 351, 164-7

Harada H, Kettunen P, Jung HS, Mustonen T, Wang YA, Thesleff I (1999): Localization of putative stem cells in dental epithelium and their association with Notch and FGF signaling. *J Cell Biol* 147, 105-20

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

Hauser N, Paulsson M (1994): Native cartilage matrix protein (CMP). A compact trimer of subunits assembled via a coiled-coil alpha-helix. *J Biol Chem* 269, 25747-53

Hauser N, Paulsson M, Heinegård D, Mörgelin M (1996): Interaction of cartilage matrix protein with aggrecan. Increased covalent cross-linking with tissue maturation. *J Biol Chem* 271, 32247-52

Herrera-Herrera ML, Quezada-Calvillo R (2012): DDR2 plays a role in fibroblast migration independent of adhesion ligand and collagen activated DDR2 tyrosine kinase. *Biochem Biophys Res Commun* 429, 39-44

Hinshelwood J, Spencer DI, Edwards YJ, Perkins SJ (1999): Identification of the C3b binding site in a recombinant vWF-A domain of complement factor B by surface-enhanced laser desorption-ionisation affinity mass spectrometry and homology modelling: implications for the activity of factor B. *J Mol Biol* 294, 587-99

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

Howard PS, Kucich U, Taliwal R, Korostoff JM (1998): Mechanical forces alter extracellular matrix synthesis by human periodontal ligament fibroblasts. *J Periodontal Res* 33, 500-8

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

Ichikawa T, Suenaga Y, Koda T, Ozaki T, Nakagawara A (2008): DeltaNp63/BMP-7-dependent expression of matrilin-2 is involved in keratinocyte migration in response to wounding. *Biochem Biophys Res Commun* 369, 994-1000

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

Jenkins RN, Osborne-Lawrence SL, Sinclair AK, Eddy RL, Byers MG, Shows TB, Duby AD (1990): Structure and chromosomal location of the human gene encoding cartilage matrix protein. *J Biol Chem* 265, 19624-31

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

Jönsson M, Andersson T (2001): Repression of Wnt-5a impairs DDR1 phosphorylation and modifies adhesion and migration of mammary cells. *J Cell Sci* 114, 2043-53

Kano K, Kitamura A, Matsuwaki T, Morimatsu M, Naito K (2010): Discoidin domain receptor 2 (DDR2) is required for maintenance of spermatogenesis in male mice. *Mol Reprod Dev* 77, 29-37

Karimbux NY, Nishimura I (1995): Temporal and spatial expressions of type XII collagen in the remodeling periodontal ligament during experimental tooth movement. *J Dent Res* 74, 313-8

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

Kawai I, Hisaki T, Sugiura K, Naito K, Kano K (2012): Discoidin domain receptor 2 (DDR2) regulates proliferation of endochondral cells in mice. *Biochem Biophys Res Commun* 427, 611-7

Keene DR, San Antonio JD, Mayne R, McQuillan DJ, Sarris G, Santoro SA, Iozzo RV (2000): Decorin binds near the C terminus of type I collagen. *J Biol Chem* 275, 21801-4

Kielty CM, Whittaker SP, Grant ME, Shuttleworth CA (1992): Type VI collagen microfibrils: evidence for a structural association with hyaluronan. *J Cell Biol* 118, 979-90

Kim HG, Hwang SY, Aaronson SA, Mandinova A, Lee SW (2011): DDR1 receptor tyrosine kinase promotes pro-survival pathway through Notch1 activation. *J Biol Chem* 286, 17672-81

Kiss I, Deák F, Holloway RG, Delius H, Mebust KA, Frimberger E, Argraves WS, Tsonis PA, Winterbottom N, Goetinck PF (1989): Structure of the gene for cartilage matrix protein, a modular protein of the extracellular matrix. Exon/intron organization, unusual splice sites, and relation to alpha chains of beta 2 integrins, von Willebrand factor, complement factors B and C2, and epidermal growth factor. *J Biol Chem* 264, 8126-34

Klatt AR, Nitsche DP, Kobbe B, Mörgelin M, Paulsson M, Wagener R (2000): Molecular structure and tissue distribution of matrilin-3, a filament-forming extracellular matrix protein expressed during skeletal development. *J Biol Chem* 275, 3999-4006

Klatt AR, Nitsche DP, Kobbe B, Macht M, Paulsson M, Wagener R (2001): Molecular structure, processing, and tissue distribution of matrilin-4. *J Biol Chem* 276, 17267-75

Klatt AR, Paulsson M, Wagener R (2002): Expression of matrilins during maturation of mouse skeletal tissues. *Matrix Biol* 21, 289-96

Klatt AR, Klinger G, Paul-Klausch B, Kühn G, Renno JH, Wagener R, Paulsson M, Schmidt J, Malchau G, Wielckens K (2009): Matrilin-3 activates the expression of osteoarthritis-associated genes in primary human chondrocytes. *FEBS Lett* 583, 3611-7

Klatt AR, Paul-Klausch B, Klinger G, Hillebrand U, Kühn G, Kobbe B, Renno JH, Johannis W, Paulsson M, Wagener R (2013): The matrilin-3 VWA1 domain modulates interleukin-6 release from primary human chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage* 21, 869-73

Kleemann-Fischer D, Kleemann GR, Engel D, Yates JR, Wu JJ, Eyre DR (2001): Molecular properties of matrilin-3 isolated from human growth cartilage. *Arch Biochem Biophys* 387, 209-15

Knäuper V, López-Otin C, Smith B, Knight G, Murphy G (1996): Biochemical characterization of human collagenase-3. *J Biol Chem* 271, 1544-50

Ko Y, Kobbe B, Nicolae C, Miosge N, Paulsson M, Wagener R, Aszódi A (2004): Matrilin-3 is dispensable for mouse skeletal growth and development. *Mol Cell Biol* 24, 1691-9

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

L'hôte CG, Thomas PH, Ganesan TS (2002): Functional analysis of discoidin domain receptor 1: effect of adhesion on DDR1 phosphorylation. *FASEB J* 16, 234-6

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

Lai C, Lemke G (1994): Structure and expression of the Tyro 10 receptor tyrosine kinase. *Oncogene* 9, 877-83

Leighton MP, Nundlall S, Starborg T, Meadows RS, Suleman F, Knowles L, Wagener R, Thornton DJ, Kadler KE, Boot-Handford RP (2007): Decreased chondrocyte proliferation and dysregulated apoptosis in the cartilage growth plate are key features of a murine model of epiphyseal dysplasia caused by a *matn3* mutation. *Hum Mol Genet* 16, 1728-41

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

Li L, Zhang L, Shao Y, Wang G, Gong R, Wang Z, Peng J, Wang S, Genochio D, Zhao B (2012): Distinct roles of two alternative splice variants of matrilin-2 in protein oligomerization and proteolysis. *Mol Med Rep* 6, 1204-10

Lisman T, Raynal N, Groeneveld D, Maddox B, Peachey AR, Huizinga EG, de Groot PG, Farndale RW (2006): A single high-affinity binding site for von Willebrand factor in collagen III, identified using synthetic triple-helical peptides. *Blood* 108, 3753-6

Lu KK, Trcka D, Bendeck MP (2011): Collagen stimulates discoidin domain receptor 1-mediated migration of smooth muscle cells through Src. *Cardiovasc Pathol* 20, 71-6

Lukinmaa PL, Waltimo J (1992): Immunohistochemical localization of types I, V, and VI collagen in human permanent teeth and periodontal ligament. *J Dent Res* 71, 391-7

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

Mabuchi A, Haga N, Maeda K, Nakashima E, Manabe N, Hiraoka H, Kitoh H, Kosaki R, Nishimura G, Ohashi H (2004): Novel and recurrent mutations clustered in the von Willebrand factor A domain of MATN3 in multiple epiphyseal dysplasia. *Hum Mutat* 24, 439-40

MacNeil RL, Berry J, D'Errico J, Strayhorn C, Piotrowski B, Somerman MJ (1995): Role of two mineral-associated adhesion molecules, osteopontin and bone sialoprotein, during cementogenesis. *Connect Tissue Res* 33, 1-7

Makihira S, Yan W, Ohno S, Kawamoto T, Fujimoto K, Okimura A, Yoshida E, Noshiro M, Hamada T, Kato Y (1999): Enhancement of cell adhesion and spreading by a cartilage-specific noncollagenous protein, cartilage matrix protein (CMP/Matrilin-1), via integrin alpha1beta1. *J Biol Chem* 274, 11417-23

Malin D, Sonnenberg-Riethmacher E, Guseva D, Wagener R, Aszódi A, Irintchev A, Irintchev A, Riethmacher D (2009): The extracellular-matrix protein matrilin 2 participates in peripheral nerve regeneration. *J Cell Sci* 122, 995-1004

Mann HH, Ozbek S, Engel J, Paulsson M, Wagener R (2004): Interactions between the cartilage oligomeric matrix protein and matrilins. Implications for matrix assembly and the pathogenesis of chondrodysplasias. *J Biol Chem* 279, 25294-8

Mátés L, Nicolae C, Mörgelin M, Deák F, Kiss I, Aszódi A (2004): Mice lacking the extracellular matrix adaptor protein matrilin-2 develop without obvious abnormalities. *Matrix Biol* 23, 195-204

Matheson S, Larjava H, Häkkinen L (2005): Distinctive localization and function for lumican, fibromodulin and decorin to regulate collagen fibril organization in periodontal tissues. *J Periodontol Res* 40, 312-24

Matsumura H, Kano K, Marín de Evsikova C, Young JA, Nishina PM, Naggert JK, Naito K (2009): Transcriptome analysis reveals an unexpected role of a collagen tyrosine kinase receptor gene, *Ddr2*, as a regulator of ovarian function. *Physiol Genomics* 39, 120-9

Matsuura M, Herr Y, Han KY, Lin WL, Genco RJ, Cho MI (1995): Immunohistochemical expression of extracellular matrix components of normal and healing periodontal tissues in the beagle dog. *J Periodontol* 66, 579-93

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

Miao L, Zhu S, Wang Y, Li Y, Ding J, Dai J, Cai H, Zhang D, Song Y (2013): Discoidin domain receptor 1 is associated with poor prognosis of non-small cell lung cancer and promotes cell invasion via epithelial-to-mesenchymal transition. *Med Oncol* 30, 626

Mihai C, Chotani M, Elton TS, Agarwal G (2009): Mapping of *DDR1* distribution and oligomerization on the cell surface by FRET microscopy. *J Mol Biol* 385, 432-45

Minamitani T, Ariga H, Matsumoto K (2004): Deficiency of tenascin-X causes a decrease in the level of expression of type VI collagen. *Exp Cell Res* 297, 49-60

Mochida Y, Parisuthiman D, Pornprasertsuk-Damrongsri S, Atsawasawan P, Sricholpech M, Boskey AL, Yamauchi M (2009): Decorin modulates collagen matrix assembly and mineralization. *Matrix Biol* 28, 44-52

Mostert AK, Dijkstra PF, Jansen BRH, van Horn JR, de Graaf B, Heutink P, Lindhout D (2003): Familial multiple epiphyseal dysplasia due to a matrilin-3 mutation: further delineation of the phenotype including 40 years follow-up. *Am J Med Genet* 120A, 490-7

Mundlos S, Zabel B (1994): Developmental expression of human cartilage matrix protein. *Dev Dyn* 199, 241-52

Munemoto K, Iwayama Y, Yoshida M, Sera M, Aono M, Yokomizo I (1970): Isolation and characterization of acid mucopolysaccharides of bovine periodontal membrane. *Arch Oral Biol* 15, 369-82

Muratoglu S, Krysan K, Balázs M, Sheng H, Zákány R, Módis L, Kiss I, Deák F (2000): Primary structure of human matrilin-2, chromosome location of the MATN2 gene and conservation of an AT-AC intron in matrilin genes. *Cytogenet Cell Genet* 90, 323-7

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

Narayanan AS, Engel LD, Page RC (1983): The effect of chronic inflammation on the composition of collagen types in human connective tissue. *Coll Relat Res* 3, 323-34

Nicolae C, Ko YP, Miosge N, Niehoff A, Studer D, Enggist L, Hunziker EB, Paulsson M, Wagener R, Aszodi A (2007): Abnormal collagen fibrils in cartilage of matrilin-1/matrilin-3-deficient mice. *J Biol Chem* 282, 22163-75

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

Norris RA, Damon B, Mironov V, Kasyanov V, Ramamurthi A, Moreno-Rodriguez R, Trusk T, Potts JD, Goodwin RL, Davis J (2007): Periostin regulates collagen fibrillogenesis and the biomechanical properties of connective tissues. *J Cell Biochem* 101, 695-711

Okimura A, Okada Y, Makihira S, Pan H, Yu L, Tanne K, Imai K, Yamada H, Kawamoto T, Noshiro M (1997): Enhancement of cartilage matrix protein synthesis in arthritic cartilage. *Arthritis Rheum* 40, 1029-36

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

Olaso E, Arteta B, Benedicto A, Crende O, Friedman SL (2011b): 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

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

Pareti FI, Niiya K, McPherson JM, Ruggeri ZM (1987): Isolation and characterization of two domains of human von Willebrand factor that interact with fibrillar collagen types I and III. *J Biol Chem* 262, 13835-41

Parkin JD, San Antonio JD, Pedchenko V, Hudson B, Jensen ST, Savige J (2011): Mapping structural landmarks, ligand binding sites, and missense mutations to the collagen IV heterotrimers predicts major functional domains, novel interactions, and variation in phenotypes in inherited diseases affecting basement membranes. *Hum Mutat* 32, 127-43

Paulsson M, Heinegård D (1979): Matrix proteins bound to associatively prepared proteoglycans from bovine cartilage. *Biochem J* 183, 539-45

Paulsson M, Heinegård D (1981): Purification and structural characterization of a cartilage matrix protein. *Biochem J* 197, 367-75

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 J, Ruch J (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

Piecha D, Muratoglu S, Mörgelin M, Hauser N, Studer D, Kiss I, Paulsson M, Deák F (1999): Matrilin-2, a large, oligomeric matrix protein, is expressed by a great variety of cells and forms fibrillar networks. *J Biol Chem* 274, 13353-61

Piecha D, Wiberg C, Mörgelin M, Reinhardt DP, Deák F, Maurer P, Paulsson M (2002): Matrilin-2 interacts with itself and with other extracellular matrix proteins. *Biochem J* 367, 715-21

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

Poole S, Firtel RA, Lamar E, Rowekamp W (1981): Sequence and expression of the discoidin I gene family in *Dictyostelium discoideum*. *J Mol Biol* 153, 273-89

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

Powell WF, Jr., Barry KJ, Tulum I, Kobayashi T, Harris SE, Bringhurst FR, Pajevic PD (2011): Targeted ablation of the PTH/PTHrP receptor in osteocytes impairs bone structure and homeostatic calcemic responses. *J Endocrinol* 209, 21-32

Pullig O, Weseloh G, Klatt AR, Wagener R, Swoboda B (2002): Matrilin-3 in human articular cartilage: increased expression in osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 10, 253-63

Quan J, Yahata T, Adachi S, Yoshihara K, Tanaka K (2011): Identification of Receptor Tyrosine Kinase, Discoidin Domain Receptor 1 (DDR1), as a Potential Biomarker for Serous Ovarian Cancer. *Int J Mol Sci* 12, 971-82

Reichenberger E, Baur S, Sukotjo C, Olsen BR, Karimbux NY, Nishimura I (2000): Collagen XII mutation disrupts matrix structure of periodontal ligament and skin. *J Dent Res* 79, 1962-8

Ren T, Zhang J, Zhang J, Liu X, Yao L (2013): Increased expression of discoidin domain receptor 2 (DDR2): a novel independent prognostic marker of worse outcome in breast cancer patients. *Med Oncol* 30, 397

Rentz TJ, Poobalarahi F, Bornstein P, Sage EH, Bradshaw AD (2007): SPARC regulates processing of procollagen I and collagen fibrillogenesis in dermal fibroblasts. *J Biol Chem* 282, 22062-71

Righi A, Betts CM, Marchetti C, Marucci G, Montebugnoli L, Prati C, Eusebi LH, Muzzi L, Ragazzini T, Foschini MP (2006): Merkel cells in the oral mucosa. *Int J Surg Pathol* 14, 206-11

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

Sadler JE, Shelton-Inloes BB, Sorace JM, Harlan JM, Titani K, Davie EW (1985): Cloning and characterization of two cDNAs coding for human von Willebrand factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82, 6394-8

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

Sánchez 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

Sanderson RD, Sneed TB, Young LA, Sullivan GL, Lander AD (1992): Adhesion of B lymphoid (MPC-11) cells to type I collagen is mediated by integral membrane proteoglycan, syndecan. *J Immunol* 148, 3902-11

Saxne T, Heinegård D (1995): Serum concentrations of two cartilage matrix proteins reflecting different aspects of cartilage turnover in relapsing polyarthrititis. *Arthritis Rheum* 38, 294-6

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: Orale Strukturbiologie. 5. Auflage; Georg Thieme Verlag, Stuttgart 2000

Schroeder HE, Theilade J (1966): Electron microscopy of normal human gingival epithelium. *J Periodontal Res* 1, 95-119

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

Segat D, Frie C, Nitsche PD, Klatt AR, Piecha D, Korpos E, Deák F, Wagener R, Paulsson M, Smyth N (2000): Expression of matrilin-1, -2 and -3 in developing mouse limbs and heart. *Matrix Biol* 19, 649-55

Shrivastava A, Radziejewski C, Campbell E, Kovac L, McGlynn M, Ryan TE, Davis S, Goldfarb MP, Glass DJ, Lemke G (1997): An orphan receptor tyrosine kinase family whose members serve as nonintegrin collagen receptors. *Mol Cell* 1, 25-34

Sims MR (1973): Oxytalan fiber system of molars in the mouse mandible. *J Dent Res* 52, 797-802

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

Smith AJ, Singhrao SK, Newman GR, Waddington RJ, Embery G (1997): A biochemical and immuno-electron microscopical analysis of chondroitin sulphate-rich proteoglycans in human alveolar bone. *Histochem J* 29, 1-9

Sodek J (1977): A comparison of the rates of synthesis and turnover of collagen and non-collagen proteins in adult rat periodontal tissues and skin using a microassay. *Arch Oral Biol* 22, 655-65

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

Speranza ML, Valentini G, Calligaro A (1987): Influence of fibronectin on the fibrillogenesis of type I and type III collagen. *Coll Relat Res* 7, 115-23

Staatz WD, Walsh JJ, Pexton T, Santoro SA (1990): The alpha 2 beta 1 integrin cell surface collagen receptor binds to the alpha 1 (I)-CB3 peptide of collagen. *J Biol Chem* 265, 4778-81

Staudinger LA, Spano SJ, Lee W, Coelho N, Rajshankar D, Bendeck MP, Moriarty T, McCulloch CA (2013): Interactions between the discoidin domain receptor 1 and β 1 integrin regulate attachment to collagen. *Biol Open* 2, 1148-59

Stefánsson SE, Jónsson H, Ingvarsson T, Manolescu I, Jónsson HH, Olafsdóttir G, Pálsdóttir E, Stefánsdóttir G, Sveinbjörnsdóttir G, Frigge ML (2003): Genomewide scan for hand osteoarthritis: a novel mutation in matrilin-3. *Am J Hum Genet* 72, 1448-59

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

Steinfort 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

Szabó E, Lódi C, Korpos E, Batmunkh E, Rottenberger Z, Deák F, Kiss I, Tokés AM, Lotz G, László V (2007): Expression of matrilin-2 in oval cells during rat liver regeneration. *Matrix Biol* 26, 554-60

Szalai E, Felszeghy S, Hegyi Z, Módis L, Berta A, Kaarniranta K (2012): Fibrillin-2, tenascin-C, matrilin-2, and matrilin-4 are strongly expressed in the epithelium of human granular and lattice type I corneal dystrophies. *Mol Vis* 18, 1927-36

Takano-Yamamoto T, Takemura T, Kitamura Y, Nomura S (1994): Site-specific expression of mRNAs for osteonectin, osteocalcin, and osteopontin revealed by in situ hybridization in rat periodontal ligament during physiological tooth movement. *J Histochem Cytochem* 42, 885-96

Tatsumi S, Ishii K, Amizuka N, Li M, Kobayashi T, Kohno K, Ito M, Takeshita S, Ikeda K (2007): Targeted ablation of osteocytes induces osteoporosis with defective mechanotransduction. *Cell Metab* 5, 464-75

Trombone AP, Ferreira SB, Raimundo FM, de Moura KC, Avila-Campos MJ, Silva JS, Campanelli AP, De Franco M, Garlet GP (2009): Experimental periodontitis in mice selected for maximal or minimal inflammatory reactions: increased inflammatory immune responsiveness drives increased alveolar bone loss without enhancing the control of periodontal infection. *J Periodontal Res* 44, 443-51

Tsonis PA, Goetinck PF (1988): Expression of cartilage-matrix genes and localization of their translation products in the embryonic chick eye. *Exp Eye Res* 46, 753-64

Unger SL, Briggs MD, Holden P, Zabel B, Ala-Kokko L, Paassilta P, Lohiniva J, Rimoin DL, Lachman RS, Cohn DH (2001): Multiple epiphyseal dysplasia: radiographic abnormalities correlated with genotype. *Pediatr Radiol* 31, 10-8

Valiathan RR, Marco M, Leitinger B, Kleer CG, Fridman R (2012): Discoidin domain receptor tyrosine kinases: new players in cancer progression. *Cancer Metastasis Rev* 31, 295-321

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, Fässler 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, 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

Wagener R, Kobbe B, Paulsson M (1997): Primary structure of matrilin-3, a new member of a family of extracellular matrix proteins related to cartilage matrix protein (matrilin-1) and von Willebrand factor. *FEBS Lett* 413, 129-34

Wagener R, Kobbe B, Paulsson M (1998a): Genomic organisation, alternative splicing and primary structure of human matrilin-4. *FEBS Lett* 438, 165-70

Wagener R, Kobbe B, Paulsson M (1998b): Matrilin-4, a new member of the matrilin family of extracellular matrix proteins. *FEBS Lett* 436, 123-7

Wagener R, Ehlen HW, Ko YP, Kobbe B, Mann HH, Sengle G, Paulsson M (2005): The matrilins--adaptor proteins in the extracellular matrix. *FEBS Lett* 579, 3323-9

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

Wei X, Wu L, Ling J, Liu L, Liu S, Liu W, Li M, Xiao Y (2008): Differentially expressed protein profile of human dental pulp cells in the early process of odontoblast-like differentiation in vitro. *J Endod* 34, 1077-84

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

Wiberg C, Klatt AR, Wagener R, Paulsson M, Bateman JF, Heinegård D, Mörgelin M (2003): Complexes of matrilin-1 and biglycan or decorin connect collagen VI microfibrils to both collagen II and aggrecan. *J Biol Chem* 278, 37698-704

Willenbrock K, Küppers R, Renné C, Brune V, Eckerle S, Weidmann E, Bräuninger A, Hansmann ML (2006): Common features and differences in the transcriptome of large cell anaplastic lymphoma and classical Hodgkin's lymphoma. *Haematologica* 91, 596-604

Winterbottom N, Tondravi MM, Harrington TL, Klier FG, Vertel BM, Goetinck PF (1992): Cartilage matrix protein is a component of the collagen fibril of cartilage. *Dev Dyn* 193, 266-76

Worapamorn W, Tam SP, Li H, Haase HR, Bartold PM (2002): Cytokine regulation of syndecan-1 and -2 gene expression in human periodontal fibroblasts and osteoblasts. *J Periodontal Res* 37, 273-8

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

Wu JJ, Eyre DR (1998): Matrilin-3 forms disulfide-linked oligomers with matrilin-1 in bovine epiphyseal cartilage. *J Biol Chem* 273, 17433-8

Xiong J, Mrozik K, Gronthos S, Bartold PM (2012): Epithelial cell rests of Malassez contain unique stem cell populations capable of undergoing epithelial-mesenchymal transition. *Stem Cells Dev* 21, 2012-25

Xu H, Raynal N, Stathopoulos S, Myllyharju J, Farndale RW, Leitinger 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 H, Bihan D, Chang F, Huang PH, Farndale RW, Leitinger B (2012): Discoidin domain receptors promote $\alpha 1 \beta 1$ - and $\alpha 2 \beta 1$ -integrin mediated cell adhesion to collagen by enhancing integrin activation. PLoS One 7, e52209

Xu L, Peng H, Glasson S, Lee PL, Hu K, Ijiri K, Olsen BR, Goldring MB, Li Y (2007): Increased expression of the collagen receptor discoidin domain receptor 2 in articular cartilage as a key event in the pathogenesis of osteoarthritis. Arthritis Rheum 56, 2663-73

Xu Y, Gurusiddappa S, Rich RL, Owens RT, Keene DR, Mayne R, Höök A, Höök M (2000): Multiple binding sites in collagen type I for the integrins alpha1beta1 and alpha2beta1. J Biol Chem 275, 38981-9

Ye L, Zhang S, Ke H, Bonewald LF, Feng JQ (2008): Periodontal breakdown in the Dmp1 null mouse model of hypophosphatemic rickets. J Dent Res 87, 624-9

Yucel-Lindberg T, Båge T (2013): Inflammatory mediators in the pathogenesis of periodontitis. Expert Rev Mol Med 15, e7

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

Zhang G, Ezura Y, Chervoneva I, Robinson PS, Beason DP, Carine ET, Soslowsky LJ, Iozzo RV, Birk DE (2006): Decorin regulates assembly of collagen fibrils and acquisition of biomechanical properties during tendon development. J Cell Biochem 98, 1436-49

Zhang X, Schuppan D, Becker J, Reichart P, Gelderblom HR (1993): 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

Zhang Y, Chen Q (2000): Changes of matrilin forms during endochondral ossification. Molecular basis of oligomeric assembly. J Biol Chem 275, 32628-34

Zhang Y, Wang ZK, Luo JM, Kanbe K, Chen Q (2008): Multiple functions of the von Willebrand Factor A domain in matrilins: secretion, assembly, and proteolysis. J Orthop Surg Res 3, 21

Zhang Y, Su J, Yu J, Bu X, Ren T, Liu X, Yao L (2011): An essential role of discoidin domain receptor 2 (DDR2) in osteoblast differentiation and chondrocyte maturation via modulation of Runx2 activation. J Bone Miner Res 26, 604-17

Zimmermann DR, Ruoslahti E (1989): Multiple domains of the large fibroblast proteoglycan, versican. *EMBO J* 8, 2975-81

Danksagung

Ich möchte Herrn Prof Dr. med. Nicolai Miosge für die hervorragende wissenschaftliche Betreuung und Unterstützung danken.

Ebenfalls danke ich Herrn PD Dr. med. dent. Nikolaus Gersdorff, der meine Promotion in der Abteilung Prothetik erst ermöglicht hat.

Frau Andrea Bernhard und Frau Boguslawa Sadowski danke ich für die Hilfe und Anregungen bei den licht- und elektronenmikroskopischen Arbeiten. Frau Christa Bode möchte ich für die Unterstützung und den fachlichen Rat bei der Arbeit im Labor meinen Dank aussprechen.

Ich danke außerdem Herrn Dr. med. dent. Boris Schminke und Herrn Hayat Muhammad für die stetige Diskussions- und Hilfsbereitschaft. Herrn Gökhan Cingöz danke ich insbesondere für die Hilfe in technischen Fragen bei der Anfertigung meiner Dissertation.

Frau Andrea Schubert und Herrn Philipp Buderer möchte ich für den Zusammenhalt und schöne gemeinsame Stunden im Labor danken. Allen Mitarbeitern und Doktoranden der Arbeitsgemeinschaft orale Biologie und Geweberegeneration danke ich für die Hilfsbereitschaft und das immer gute Arbeitsklima.

Lebenslauf

Am 22. Februar 1988 wurde ich als zweites Kind meiner Eltern Eva Maria Eschholz und Winfried Michael Eschholz geboren. Meine Mutter, geboren am 11.04.1960, arbeitet als Ärztin im Fachdienst Gesundheit und Verbraucherschutz des Kreises Olpe, Nordrhein-Westfalen. Mein Vater, geboren am 13.04.1960, arbeitet als Gynäkologe in der Frauenklinik in Füssen, Bayern. Mein 27-jähriger Bruder Moritz ist Wirtschaftsingenieur, meine 16-jährige Schwester Lena Susann ist Schülerin.

Von 1994 bis 1998 besuchte ich die Katholische Grundschule am Gallenberg in Olpe. Danach wechselte ich auf das Städtische Gymnasium Olpe, an dem ich im Sommer 2007 mein Abitur ablegte. Anschließend absolvierte ich im Kinderheim Josefshaus in Olpe meinen Zivildienst.

Zum Sommersemester 2008 begann ich das Studium der Zahnmedizin an der Georg-August-Universität in Göttingen. Seit 2010 bin ich Doktorand in der Poliklinik für Zahnärztliche Prothetik, Arbeitsgemeinschaft orale Biologie und Geweberegeneration unter der Leitung von Prof. Dr. med. N. Miosge. Mein zahnmedizinisches Staatsexamen legte ich im Juni 2013 ab.