

Aus der Orthopädischen Klinik und Poliklinik
der Universität Würzburg
Direktor: Prof. Dr. med. M. Rudert

**Parathormon als potentielle Therapiestrategie der
Odonto-Hypophosphatasie – Untersuchungen in einem
dentogenen *in-vitro*-Modell**

Inauguraldissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Jana Schiffmaier

aus Würzburg

Würzburg, Juli 2023

Referent: Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Marietta Herrmann
Korreferent: Prof. Dr. med. dent. Yvonne Jockel-Schneider
Dekan: Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 02.02.2024

Die Promovendin ist Zahnärztin.

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1	Hypophosphatasie	1
1.1.1	Klinische Aspekte der HPP und Klassifikation	1
1.1.2	Die Gewebeunspezifische Alkalische Phosphatase (TNAP)	3
1.1.2.1	TNAP-Struktur	4
1.1.2.2	Molekulare Rolle der TNAP im Mineralisierungsprozess	5
1.1.2.3	TNAP in dentalen Geweben	7
1.1.3	Genetik der HPP	9
1.1.4	Diagnostik und therapeutisches Management der HPP	10
1.2	Parathormon und das Parathormon-verwandte Peptid	12
1.2.1	Der PTH1-Rezeptor	13
1.2.2	Der Einfluss von PTH, PTHrP und PTH1R auf dentale Gewebe	15
1.3	Die hTERT PDL Zelllinie und transgene Varianten mit Mutationen im <i>ALPL</i> -Gen	17
1.4	Zielsetzung der Arbeit	19
2	Material und Methoden	20
2.1	Ethikvotum	20
2.2	Zellbiologische Methoden	20
2.2.1	Aufarbeitung und Isolation der PDLSCs	20
2.2.2	Zellkultivierung	21
2.2.3	Bestimmung der Zellzahl	22
2.2.4	Berechnung der Populationsverdopplung pro Tag	22
2.2.5	Stimulation mit PTH	23
2.2.5.1	Untersuchung der Kurzzeiteffekte von PTH	23
2.2.5.2	Evaluation der funktionellen Auswirkungen durch intermittierende PTH-Zugabe	23
2.3	Analyse von Off-Target Effekten	24
2.3.1	DNA-Isolation	24
2.3.2	Polymerase Kettenreaktion (PCR)	25
2.3.3	Aufreinigung des PCR-Produkts	26
2.3.4	Sequenzierung	27
2.4	Molekularbiologische Methoden	28
2.4.1	RNA-Isolation und Konzentrationsbestimmung	28

2.4.2	Synthese der cDNA	28
2.4.3	Quantitative real-time PCR (qPCR).....	29
2.4.4	Proteinisolation und Konzentrationsbestimmung.....	31
2.4.5	CSPD-Assay: Messung der Aktivität der AP	31
2.4.6	ATP-Assay	32
2.4.7	Western Blot	33
2.4.7.1	Isolation von Proteinen und Vorbereitung der Zellysate.....	33
2.4.7.2	Nachtriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	33
2.4.7.3	Transfer	34
2.4.7.4	Antikörper-Färbung und Detektion.....	35
2.4.8	Färbungen.....	35
2.4.8.1	Alizarin-Färbung zum Nachweis der osteogenen Differenzierung.....	35
2.4.8.2	Immunzytochemische Färbung.....	36
2.5	Statistik	37
3	Ergebnisse	38
3.1	Basale Charakterisierung der <i>ALPL</i> -defizienten dentogenen Zelllinien.....	38
3.1.1	Analyse von Off-Target Mutationen.....	38
3.1.2	TNAP-Nachweis in der Immunfluoreszenzfärbung und im Western Blot..	41
3.1.3	Wachstumsverhalten	43
3.1.4	Messung des intrazellulären ATP-Gehalts.....	44
3.1.5	Immunzytochemischer Nachweis von HSP60	44
3.2	Vorversuche in PDLSCs zur Etablierung der PTH-Protokolle.....	47
3.2.1	Kurzzeiteffekte in den PDLSCs	47
3.2.1.1	Genexpressionsanalysen.....	47
3.2.1.2	Bestimmung der TNAP-Aktivität mittels CSPD-Assay	49
3.2.2	Funktionelle Veränderungen durch intermittierende PTH-Stimulation	50
3.2.2.1	Genexpressionsanalyse von <i>ALPL</i>	50
3.2.2.2	Osteogene Differenzierung der PDLSCs.....	50
3.3	Auswirkung der PTH-Stimulation auf die <i>ALPL</i> -defizienten Zelllinien.....	53
3.3.1	Kurzzeiteffekte in den <i>ALPL</i> -defizienten Zelllinien.....	53
3.3.1.1	Genexpressionsanalysen.....	53
3.3.1.2	Bestimmung der TNAP-Aktivität mittels CSPD-Assay	58
3.3.2	Funktionelle Veränderungen durch intermittierende PTH-Stimulation	59
3.3.2.1	Genexpressionsanalyse von <i>ALPL</i>	59
3.3.2.2	Osteogene Differenzierung der Zelllinien mit <i>ALPL</i> -Mutationen.....	61

4	Diskussion	64
4.1	Basale Charakterisierung des dentogenen <i>in-vitro</i> -Modells der HPP	64
4.1.1	Die Bedeutung des <i>ALPL</i> -Genotyps für den HPP-Phänotyp.....	65
4.1.2	Der Einfluss der TNAP-Defizienz auf den Zellmetabolismus	68
4.2	Der Einfluss von PTH auf das dentogene <i>in-vitro</i> -Modell der HPP	70
4.3	Off-Target Mutationen durch CRISPR/Cas9-basiertes Genediting.....	75
4.4	Ausblick	78
5	Zusammenfassung	81
6	Literaturverzeichnis	83
	I Abkürzungsverzeichnis	
	II Abbildungsverzeichnis	
	III Tabellenverzeichnis	
	IV Danksagung	
	V Lebenslauf	
	VI Eigene Veröffentlichungen	

1. Einleitung

1.1 Hypophosphatasie

Die Hypophosphatasie (HPP) ist eine seltene hereditäre Erkrankung, die durch Mutationen im *ALPL*-Gen (1p36.12) hervorgerufen wird, welches für den gewebeunspezifischen Typ der Alkalischen Phosphatasen (Tissue-nonspecific Alkaline Phosphatase, TNAP) kodiert (Millan and Whyte, 2016). Erstmals geprägt wurde der Begriff HPP 1948 von John C. Rathbun, der das Krankheitsbild seines jungen Patienten mit einer verminderten Enzymaktivität der TNAP in Verbindung brachte (Rathbun, 1948). Kennzeichnende Symptomatik bei HPP-Patienten ist ein Mineralisierungsdefizit von Knochen und Zähnen, die auf das charakteristische Merkmal einer verminderten enzymatischen Aktivität der TNAP zurückzuführen sind. Daneben ist der vorzeitige Verlust von Milchzähnen mit intakter Wurzel vor dem 4. Lebensjahr ein weiteres Leitsymptom für die Erkrankung. Neben Knochen und Zähnen können auch Muskulatur, Lunge, Leber und das zentrale Nervensystem von der multisystemischen Krankheit betroffen sein (Millan and Whyte, 2016).

Heute sind bereits über 400 Mutationen im *ALPL*-Gen beschrieben (<https://alplmutationdatabase.jku.at>; aufgerufen am 05.03.2023). Diese große genetische Variabilität führt zu einer hohen klinischen Heterogenität, die von sehr schweren, lebensbedrohlichen bis hin zu sehr milden Formen reicht. Glücklicherweise ist die schwere Variante mit einer Inzidenz von 1:300 000 selten, während die Prävalenz der moderaten bei 1:2430 und der milden Form bei 1:508 in Europa liegt (Mornet et al., 2021).

Obwohl inzwischen viel über HPP bekannt ist, führen die Seltenheit der Erkrankung und das Fehlen charakteristischer Symptome, insbesondere bei der kürzlich neu entdeckten milden Form, häufig zu Fehldiagnosen und falschen Therapieansätzen.

1.1.1 Klinische Aspekte der HPP und Klassifikation

Das klinische Erscheinungsbild der Erkrankung ist hinsichtlich des Manifestationsalters sowie der Schwere und Variabilität der Symptome sehr unterschiedlich. Auffälligste aller Folgen eines TNAP-Defizits sind Mineralisierungsstörungen, die zu Hypomineralisierung des Knochens und der Zahnhartsubstanz führen. Außerdem ist das Krankheitsbild durch eine verminderte Enzymaktivität im Serum gekennzeichnet (Mornet, 2018).

Derzeit wird eine Klassifizierung verwendet, die in erster Linie auf dem Alter beim Auftreten der ersten Symptome basiert und für die Prognose maßgeblich ist (Whyte,

2016, Fraser, 1957). Dabei werden fünf Formen der HPP unterschieden: perinatale, infantile, kindliche, adulte und Odonto-HPP, die auf orodentale Manifestationen beschränkt ist (Whyte, 2016). Der Schweregrad der Erkrankung ist sehr variabel, aber in der Regel umgekehrt proportional zum Alter beim Auftreten erster Symptome (Rockman-Greenberg, 2013).

Perinatale HPP

Die perinatale Form ist die am stärksten ausgeprägte Form der HPP und manifestiert sich bereits *in utero*. Vor Einführung der Enzymersatztherapie (s. Kapitel 1.1.4) verstarben die Betroffenen in der Regel noch vor der Geburt oder wenige Tage bis Wochen danach. Schwere Atemprobleme aufgrund einer Thoraxdeformation in Verbindung mit Muskelinsuffizienz sind in der Regel die Ursache für die Todesfälle (Castells et al., 2018, Millan and Whyte, 2016). Allerdings wurden auch Fälle beobachtet, bei denen sich die gestörte Mineralisierung ab dem dritten Trimenon der Schwangerschaft verbesserte (Linglart and Bioso-Duplan, 2016). Diese Form ist als pränatal benigne Form beschrieben und führt zu einem infantilen bis odontogenen Phänotyp und geht somit mit einer wesentlich günstigeren Prognose einher (Wenkert et al., 2011). In der fetalen Sonographie ähneln sich die beiden Formen sehr und zeigen verkürzte, gekrümmte Röhrenknochen. Die benigne Form geht jedoch trotz der Knochen- deformation nicht mit Frakturen einher (Pauli et al., 1999). Daher ist es obligat die benigne Form als Differentialdiagnose in Betracht zu ziehen.

Infantile HPP

Bei Patienten mit infantiler HPP manifestiert sich das Krankheitsbild innerhalb der ersten sechs Lebensmonate (Fraser, 1957). Neben skelettalen Symptomen wie Hypomineralisation, Frakturen und Knochenschmerzen sind auch respiratorische Komplikationen charakteristisch. Diese führen zusammen mit Pyridoxin-abhängigen Krampfanfällen in etwa 50 % der Fälle zu einem letalen Verlauf (Whyte, 2017, Baumgartner-Sigl et al., 2007). Vorzeitige Verknöcherungen der Schädelnähte, sogenannte Kraniosynostosen, sind ebenfalls häufig und führen zu einem erhöhten intrakraniellen Druck (Collmann et al., 2009).

Juvenile HPP

Die HPP im Kindesalter zeigt ihre ersten Symptome zwischen dem 6. Lebensmonat und dem 18. Lebensjahr und kann von klinisch leichter bis schwerer Ausprägung sein

(Mornet, 2018). Der vorzeitige Verlust der Milchzähne ist häufig das erste offensichtliche Symptom, welches zu einem zahnmedizinischen Konsil führt (Bloch-Zupan, 2016). Rachitis, Knochenbrüche, skelettale Deformationen wie gekrümmte Beine oder ein skaphozephaler Schädel, Gelenk- und Knochenschmerzen und gelegentlich eine kleine Statur sind weitere Symptome, unter denen die jungen Patienten leiden können (Mornet, 2018).

Adulte HPP

Klassischerweise manifestiert sich diese Form im mittleren Lebensalter. Die klinische Ausprägung der HPP ist bei Erwachsenen sehr heterogen, aber deutlich milder als die frühen Formen. Erwachsene können asymptomatisch sein, unspezifische Symptome wie Gelenkschmerzen oder den Verlust von bleibenden Zähnen aufweisen (Whyte et al., 1982, Villa-Suarez et al., 2021, Shapiro and Lewiecki, 2017, Mornet, 2018). Meistens werden die Patienten wegen Schmerzen aufgrund von Belastungsfrakturen vorstellig (Briot and Roux, 2017). Bei weiterer Anamnese berichten Betroffene häufig über eine leichte Rachitis im Kindesalter und frühzeitigen Milchzahnverlust (Berkseth et al., 2013, Villa-Suarez et al., 2021). Weitere charakteristische Symptome sind muskuloskelettale Schmerzen, multiple Frakturen sowie Chondrokalzinosen, die zu Gelenkschmerzen und Bewegungseinschränkungen führen (Berkseth et al., 2013).

Odonto-HPP

Die Odonto-HPP ist die mildeste und häufigste Form der Erkrankung (Whyte et al., 2015). Das Hauptmerkmal ist der vorzeitige Verlust eines oder mehrerer Milchzähne ohne Resorption der Wurzel (Lundgren et al., 1991, Whyte et al., 2015). Skelettale Anomalien sowie Hinweise auf Rachitis oder Osteomalazie treten bei dieser Form nicht auf (Mornet, 2018). Darüber hinaus zeigt das klinische Bild Abweichungen in der Zahnform (bauchige Krone, zervikale Verengungen, vergrößertes Pulpenkavum), sowie Farbe und Struktur der Zahnhartsubstanz, die sowohl den Schmelz und das Dentin als auch das Zement betreffen können und somit das Kariesrisiko erhöhen (Kramer et al., 2021, van den Bos et al., 2005). Reibel et al. berichteten bei einigen der untersuchten Patienten auch über einen horizontalen Attachmentverlust (Reibel et al., 2009).

1.1.2 Die Gewebeunspezifische Alkalische Phosphatase (TNAP)

Alkalische Phosphatasen (AP) gehören zu einer großen Familie von dimeren Enzymen, die Monophosphatester bei hohem pH-Optimum hydrolysieren (Millan, 2006). Im

Menschen kodieren insgesamt vier verschiedene Gene für unterschiedliche Isoformen der AP (Harris, 1990). Das *ALPL*-Gen (NCBI Gene-ID: 1p36.1-p34), das sich auf Chromosom 1 befindet, kodiert hierbei für den gewebeunspezifischen Typ der AP (Millan, 2006). Das Gen besitzt eine Länge von mehr als 50 kb und umfasst 12 Exons, von denen jedoch nur 11 (Exon 2-12) translatiert werden, sowie zwei alternative nicht-kodierende Varianten von Exon 1 (1A und 1B, Knochen- und Lebervariante) (Weiss et al., 1986, Whyte, 2017). Die drei weiteren Isotypen sind gewebespezifisch und auf Chromosom 2 lokalisiert (Harris, 1990). Es wird zwischen einer intestinalen (*ALPI*), plazentaren (*ALPP*) und einer Keimzell-AP (*ALPP2*) unterschieden, welche bei HPP nicht betroffen sind. Wie bereits aus der Nomenklatur hervorgeht, wird die TNAP ubiquitär exprimiert: Außer in Niere, Leber, Lunge und ZNS ist das Enzym besonders häufig in Zellen von mineralisiertem Gewebe, nämlich Knochen und Zähnen, zu finden (Millan and Whyte, 2016).

1.1.2.1 TNAP-Struktur

Die TNAP ist ein homodimeres Ektoenzym mit insgesamt fünf strukturell und funktionell wichtigen Domänen. Für die katalytische Aktivität und die Stabilität der Struktur ist die Homodimerisierung des Enzyms erforderlich (Le Du and Millan, 2002). Die stark hydrophobe Monomer-Monomer-Grenzfläche wird durch zwei Disulfidbrücken aufrechterhalten und erstreckt sich von der sogenannten Kronendomäne bis zum N-Terminus der Alpha-Helix (Hoylaerts et al., 2006, Hummer and Millan, 1991). Diese beiden Domänen leisten einen entscheidenden Anteil zur Stabilisierung der dimeren Struktur (Hoylaerts et al., 1997). Zusätzlich verfügt das Enzym über eine Kronendomäne, die die Interaktion mit der Extrazellulärmatrix (ECM), insbesondere Kollagen, ermöglicht und für das allosterische Verhalten essentiell ist. Entscheidend für die Freisetzung von anorganischem Phosphat (Pi) ist das biochemisch aktive Zentrum. Dieses besitzt drei Metallbindestellen, die während der TNAP-vermittelten Katalyse von zwei Zink-Ionen und einem Magnesium-Ion besetzt sind (Mornet et al., 2001). Außerdem ist eine Calcium-Bindestelle beschrieben, die jedoch keinen direkten Einfluss auf die katalytische Enzymaktivität zu haben scheint (Hoylaerts et al., 2015).

Verankert sind die beiden Monomere des Enzyms über einen Glykosylphosphatidyl-inositol-Anker (GPI) auf der äußeren Oberfläche der Plasmamembran. Es handelt sich hierbei um eine posttranslationale Modifikation des Proteins, die entscheidend für die Beweglichkeit des Enzyms ist (Sharom and Lehto, 2002). Außerdem wird die Wirksamkeit der TNAP auch durch die Stabilität des Ankers bestimmt (Garcia et al.,

2015). Die Verbindung zwischen dem Protein und dem GPI-Anker kann von Phospholipasen gespalten werden, was die Freisetzung von TNAP in den Blutkreislauf erklärt. Auch ohne Membranverankerung weist die TNAP eine katalytische Aktivität auf (Buchet et al., 2013, Lehto and Sharom, 2002, Low and Huang, 1991).

1.1.2.2 Molekulare Rolle der TNAP im Mineralisierungsprozess

Im Mineralisierungsprozess kommt der TNAP eine entscheidende Schlüsselfunktion zu: Das Enzym reduziert zum einen die Menge des Mineralisierungsinhibitors Pyrophosphat (PPi) (Meyer, 1984) und erzeugt dabei zum anderen Pi für die Synthese von Hydroxylapatit (HA), das das zentrale Molekül der Biomineralisierung darstellt (s. Abbildung 1) (Millan and Whyte, 2016). PPi wird sowohl intrazellulär gebildet und über das Transportprotein ANKH (Ankylosis Progressive Homolog) in den Extrazellularraum exportiert, die Mehrheit wird jedoch durch die Ektonukleotid Pyrophosphatase Phosphodiesterase 1 (ENPP1) aus extrazellulärem Adenosintriphosphat (ATP) erzeugt (Bessueille et al., 2020).

Zusätzlich dephosphoryliert die TNAP Pyrodoxal-5'-Phosphat (PLP), die aktive Form von Vitamin B6 (Whyte et al., 1985). Zur Bereitstellung von Pi baut das Enzym auch Nucleotide wie ATP schrittweise zu Adenosin ab, wobei Adenosindi- und monophosphat (ADP/AMP) als Zwischenprodukte entstehen (Millan and Whyte, 2016, Abbracchio et al., 2009). Ein weiteres Substrat der TNAP ist das phosphorylierte Osteopontin (p-OPN) (Narisawa et al., 2013), welches die Kristallisation von HA in seinem phosphorylierten Zustand verhindert (Addison et al., 2007). Darüber hinaus besitzt die ubiquitär vorkommende TNAP die katalytische Fähigkeit das Lipopolysaccharid gramnegativer Bakterien zu dephosphorylieren (Pettengill et al., 2017).

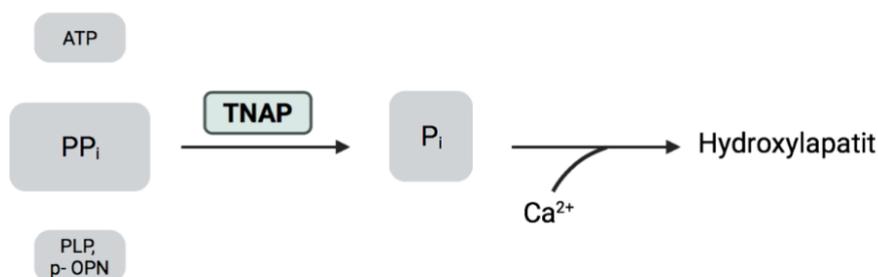


Abbildung 1: **Substrate der TNAP.** Zur Bereitstellung von Pi für die HA-Synthese spaltet die TNAP das inhibitorische PPi, ATP, PLP und OPN. Die Abbildung wurde mit dem Programm Biorender (<https://biorender.com>) erstellt und basiert inhaltlich auf den im vorhergehenden Abschnitt genannten Quellen.

Expressiert wird die TNAP auf der Zelloberfläche von Osteo-, Chondro-, und Odontoblasten, einschließlich der sekretierten Matrix Vesikel (MV) (Hoshi et al., 1997, Miao and Scutt, 2002). Letztere sind ebenfalls am frühen Stadium des Mineralisierungsprozesses beteiligt (Millan, 2013, Roberts et al., 2004).

MVs sind extrazelluläre membranumhüllte Körper, in denen die HA-Kristallbildung beginnt. Diese erste Phase der Kristallisierung wird durch eine Reihe von molekularen Interaktionen gesteuert, die auf intravesikuläre Anreicherung von Calcium und Phosphat, den beiden Hauptbestandteilen des HA, abzielen. In einem zweiten Schritt rupturiert das Vesikel und setzt HA in den Extrazellularraum frei, welches anschließend in Kollagenfibrillen eingelagert wird (Anderson, 1995, Boskey, 1998). Abbildung 2 zeigt eine modellhafte Darstellung des zweiphasigen Mineralisierungsprozesses.

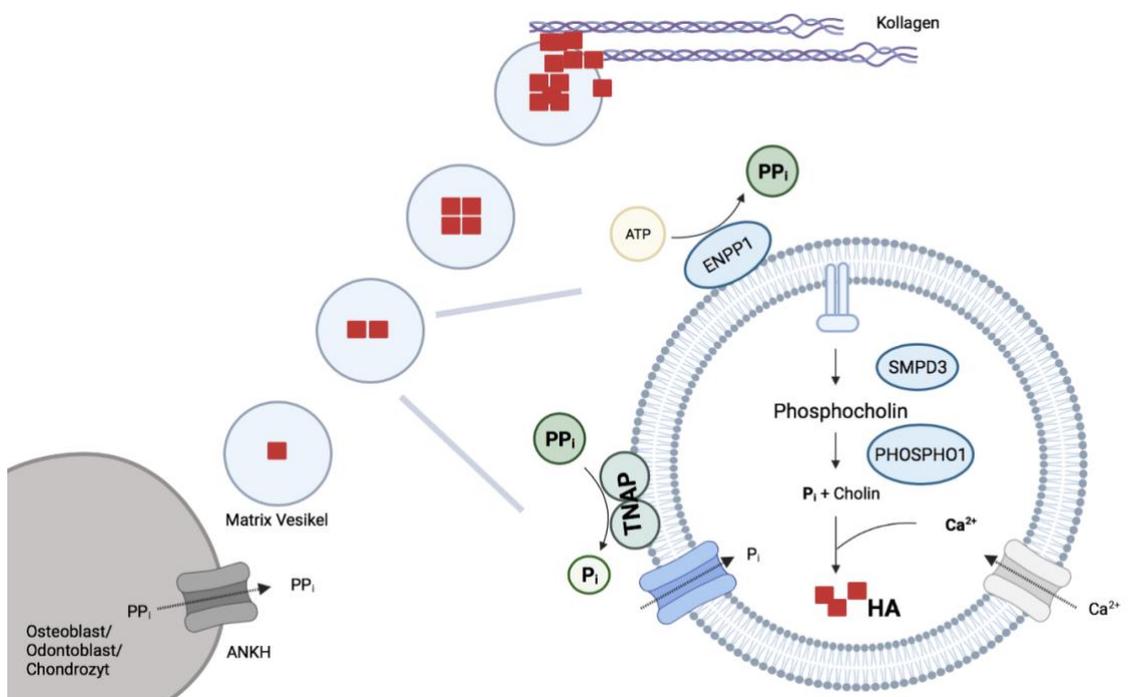


Abbildung 2: **Modell des Mineralisierungsprozess.** Dargestellt ist der zweiphasige Ablauf der Mineralisierung. Das frühe Stadium beinhaltet die HA-Synthese im MV. Das hierfür benötigte Pi wird über zweierlei Prozesse angereichert: intravesikulär durch das enzymatische Zusammenspiel von SMPD3 und PHOSPHO1 und extravesikulär von TNAP. In der späten Phase des Prozesses rupturiert das MV und setzt HA in den Extrazellularraum frei. Die Abbildung wurde mit dem Programm Biorender (<https://biorender.com>) erstellt und basiert inhaltlich auf den im vorhergehenden Abschnitt genannten Quellen.

In Studien mit *ALPL*^{-/-} Mäusen konnte gezeigt werden, dass die HA-Synthese im MV auch in Abwesenheit der TNAP stattfindet, die Mineralisierung der extrazellulären Matrix jedoch scheitert (Anderson et al., 2004, Millan, 2013). Diese Erkenntnis deutet darauf hin, dass TNAP nicht essentiell für die frühe Phase der Mineralisierung ist und legt nahe,

dass auch andere Phosphatasen für die Bereitstellung von Pi verantwortlich sind. So wurde beispielsweise beschrieben, dass die intravesikuläre Phosphatase Orphan 1 (PHOSPHO1) in mineralisierenden Geweben 100-fach stärker exprimiert wird (Houston et al., 2004). Der endgültige Nachweis dafür, dass das Enzym PHOSPHO1 einen wichtigen Part im Mineralisierungsprozess übernimmt, wurde von Yadav et al. geliefert. Durch den Vergleich von *PHOSPHO1^{-/-}* und *ALPL^{-/-}* Mäusen mit *PHOSPHO1^{-/-}* und *ALPL^{+/-}* Mäusen konnte gezeigt werden, dass die doppelte Ablation zu einem vollständigen Fehlen der Mineralisierung führte und die Überexpression von PHOSPHO1 den Knochenphänotyp nicht korrigierte (Yadav et al., 2011).

PHOSPHO1 hat eine hohe Spezifität gegenüber Phosphocholin (PCh) und Phosphoethanolamin (PEA) und kann somit durch Abbau der Phospholipide aus der Vesikelmembran die Anhäufung von Pi fördern (Roberts et al., 2004). Unterstützt wird das Enzym durch die Sphingomyelin Phosphodiesterase 3 (SMPD3), einem zellmembrangebundenen Enzym im Vesikel (Murshed, 2018). SMPD3 katalysiert den Abbau des Sphingomyelins zu Ceramid und PCh und liefert somit zusätzliche Phosphocholine zur Bereitstellung von Pi (Merrill et al., 1997).

1.1.2.3 TNAP in dentalen Geweben

Zähne sind mineralisierte Organe, die aus drei einzigartigen Hartsubstanzen bestehen: Schmelz, Dentin und Zement. Obwohl sich die Odontogenese in einigen Aspekten von der Osteogenese unterscheidet, ist der Mineralisierungsprozess in ähnlicher Weise anfällig für Entwicklungsstörungen wie der Knochen (Foster et al., 2014). Der Isotyp Odonto-HPP mit lediglich dentaler Symptomatik liefert Evidenz dafür, dass Zahnhartschubstanzen noch sensitiver auf einer Funktionseinschränkung der TNAP reagieren als der Knochen (Reibel et al., 2009). Sicherlich spricht hierfür auch die hohe Aktivität des Enzyms im dentoalveolären Komplex. So konnte der Knochen-Isotyp der TNAP in der Pulpa, dem parodontalen Ligament und dem Zahnsäckchen nachgewiesen werden (Goseki-Sone et al., 1999). Auch in Zemento-, Odonto- und Ameloblasten ist die TNAP vorhanden (Yadav et al., 2012, Hasselgren et al., 1978). Die Ameloblasten synthetisieren den Schmelz der Zahnkrone, das härteste Gewebe im ganzen Körper, das einen Mineralgehalt von 95 % aufweist (Simmer et al., 2010, Frank, 1979). Die Synthese des Dentins, das den Großteil des Zahnes bildet, wird von den Odontoblasten übernommen (Goldberg et al., 2011). Zur ordnungsgemäßen Entwicklung dieser Gewebe erfordert es die Kontrolle des Pi/PPi-Verhältnis einschließlich Calciums und

weiteren Kofaktoren der Biomineralisierung (Foster et al., 2008, Martin et al., 2021, Zweifler et al., 2015, Millan, 2013).

Bei HPP kommt es aufgrund der eingeschränkten TNAP-Funktion zu einer Anhäufung des Mineralisierungsinhibitors PPI und dadurch auch zu Beeinträchtigungen in der orodontalen Gesundheit (Millan, 2013). So zeigen Patienten einen vorzeitigen Verlust der Milchzähne ohne Resorption der Wurzel, hypomineralisierten Alveolarknochen mit horizontalem Attachmentverlust, sowie verminderte Mineralisierung des kraniofazialen Knochens. Auch ein verzögerter Zahndurchbruch, vergrößerte Pulpenkammern und Defizite in der Mineralisierung von Schmelz, Dentin und Zement sind üblich (Reibel et al., 2009, Olsson et al., 1996, Liu et al., 2014, Foster et al., 2013, Kramer et al., 2021).

Das Wurzelzement ist ein Bestandteil des Zahnhalteapparates. Der Zahnhalteapparat, der zur Verankerung des Zahnes im Knochenfach dient, besteht aus Zement, das der Wurzeloberfläche aufliegt, dem parodontalen Ligament (PDL) und dem Alveolarknochen (Hassell, 1993). In der Literatur wird häufig darauf verwiesen, dass die gestörte Mineralisierung des azellulären Zementes wahrscheinlich ursächlich für die verfrühte Exfoliation der Milchzähne ist (Foster et al., 2012, Bruckner et al., 1962, Olsson et al., 1996, Zweifler et al., 2015, McKee et al., 2011, Yadav et al., 2012). Der azelluläre Zement bedeckt den zervikalen Bereich des Zahnes und ist entscheidend für die Befestigung des Zahnes im Desmodont über Sharpey'sche Fasern, wohingegen der apikal gelegene zelluläre Anteil bei HPP nicht betroffen ist (Colard et al., 2017). Eine weitere Erklärung für den vorzeitigen Milchzahnverlust bei HPP-Patienten könnte auch die Tatsache sein, dass die Erkrankung eine genetische Disposition für eine Parodontitis-Erkrankung darstellt. Die Parodontitis kann als eine Störung der mikrobiellen Ökologie betrachtet werden, die zunächst zu einer Entzündung und in der Folge zu einer Zerstörung des zahntragenden Gewebes führt. Die bakterielle Dysbiose hat aufgrund einem Überwachen von gramnegativen und anaeroben Bakterien im Sulkus eine proinflammatorische Wirkung und begünstigt die Einleitung des entzündlichen Prozesses (Hajishengallis, 2020). In der Literatur werden hierzu verschiedene Meinungen vertreten: Es konnte gezeigt werden, dass das subgingivale Mikrobiom von HPP-Patienten mit der gesunden Kontrolle vergleichbar ist und diese nur leicht erhöhte Sondierungstiefen von 4-5 mm aufwies (Valenza et al., 2006). In anderen Fallberichten wurden wiederum Zusammenhänge zwischen HPP und einer Parodontitis beschrieben (Watanabe et al., 1993, Baab et al., 1985).

Kürzlich konnte gezeigt werden, dass eine gehemmte TNAP-Aktivität im Zellkulturmodell mit parodontalen Stammzellen (PDLSCs) zu einer Unterdrückung von osteogenen

Marker genen und darüber hinaus zu einer gesteigerten proinflammatorischen Aktivität führt, die den Knochenverlust wahrscheinlich zusätzlich fördert (Melms et al., 2020). Levamisol bewirkte in diesem Experiment eine gesteigerte Expression des ATP-Rezeptors P2X7 und reduzierte die Genexpression von DMP1, welches eine schützende Wirkung gegen Entzündungen hat.

Das entzündungsfördernde extrazelluläre ATP ist allerdings auch Substrat der TNAP und kann in das entzündungshemmende Adenosin gespalten werden (Graser et al., 2021). Eine Störung des Gleichgewichts, wie dies beim Krankheitsbild der HPP der Fall ist, begünstigt die Verstärkung der Entzündung zusätzlich: Extrazelluläres ATP interagiert mit dem P2X7-Purinrezeptor und induziert zum einen die Synthese von RANKL, dem Schlüsselmolekül bei der Regulation des Knochenumbaus und fördert zum anderen die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen wie Interleukin-1 in den Entzündungszellen (Boyce and Xing, 2007, Binderman et al., 2017). Außerdem wird extrazelluläres ATP auch von Bakterien produziert und an Orten der Entzündung von geschädigten Zellen freigesetzt, die den ATP-Spiegel weiterhin erhöhen (Kawase et al., 2007).

Darüber hinaus wird die Prädisposition für entzündliche Prozesse aufgrund der Akkumulation von PPI in Geweben und Gelenken zusätzlich erhöht (Bianchi et al., 2020, Beck et al., 2009a, Watanabe et al., 1993).

1.1.3 Genetik der HPP

Die molekulare Grundlage der HPP stellen variable Mutationen im *ALPL*-Gen dar. Seit der Identifizierung der ersten Mutation, sind mittlerweile über 400 Mutationen für die klinische Variabilität verantwortlich (<https://alplmutationdata-base.jku.at>, 05.03.2023) (Weiss et al., 1988). Die Prävalenz von HPP in Europa wird auf 1:300 000 bei schweren und 1:6370 bei moderaten Fällen geschätzt (Mornet et al., 2011). In einer kürzlich veröffentlichten Studie wurde eine neue Form der HPP entdeckt: Die milde, adulte HPP, die bisher aufgrund unspezifischer Symptome in Kombination mit einer geringen AP-Aktivität unterdiagnostiziert wurde, hat eine Prävalenz von 1:508 (Mornet et al., 2021). Dies impliziert, dass die einst seltene Erkrankung gar nicht so selten ist.

HPP ist eine autosomal-vererbte Krankheit, die durch homozygote, heterozygote oder compound-heterozygote Mutationen verursacht werden kann, die entweder dominant oder rezessiv sind. Schwere Varianten (infantil und perinatal) werden autosomal-rezessiv, moderate (juvenile, adulte und Odonto-HPP) dominant oder rezessiv und milde Formen (adulte) dominant vererbt (Mornet, 2017, Brun-Heath et al., 2005).

Die meisten Genotypen sind heterozygot und führen zu Missense-Mutationen, die zu einer Veränderung einer Aminosäure (AS) führen und dem Enzym je nach betroffener Aminosäuresequenz im Protein ein unterschiedliches Maß an Restaktivität verleihen können (Mornet, 2017). Bei den übrigen Mutationen handelt es sich um viel seltenere kleine Deletionen und Insertionen, sowie Nonsense- und Spleißmutationen (Brun-Heath et al., 2005, Liu et al., 2021a).

Die Problematik, die Heterozygote mit sich bringen, ist der dominant-negative Effekt (DNE). Dabei unterdrückt eine dominante Mutation das Wildtyp-Allel. In diesem Fall dimerisiert das gesunde Protein mit dem strukturell veränderten Protein und interagiert negativ (Lia-Baldini et al., 2001, Fauvert et al., 2009). Häufig befinden sich diese sensiblen Positionen in funktionell und strukturell wichtigen Regionen des Proteins wie dem aktivem Zentrum, dem Homodimer-Interface, der Kronendomäne oder der Calcium-Bindungsstelle und führen dann zu schwerwiegenden Phänotypen ohne enzymatische Restaktivität (Silvent et al., 2014, Zurutuza et al., 1999). Mutationen in weniger kritischen Domänen ermöglichen eine deutlich höhere Restaktivität der TNAP und sind häufig im Genotyp moderater Varianten der HPP zu finden (Mornet, 2007). Homozygote Mutationen, die bei perinataler und infantiler HPP einen hohen Anteil ausmachen, sind ebenfalls ein erschwerender Faktor für die Erkrankung (Mornet et al., 2021).

Trotz der Vielzahl an Studien, in denen die klinische Auswirkung von Mutationen untersucht wurden, lässt sich für die meisten keine eindeutige Korrelation zwischen Genotyp und Phänotyp herstellen. Sowohl die Koexistenz beider Vererbungsarten, die hohe genetische Heterogenität der *ALPL*-Varianten, als auch die Variabilität der klinischen Ausprägung, einschließlich innerfamiliärer, machen diese Beurteilung sehr komplex und erschweren die genetische Beratung immens (Hofmann et al., 2014).

1.1.4 Diagnostik und therapeutisches Management der HPP

Die Diagnose der HPP bereitet häufig erhebliche Schwierigkeiten. Einerseits ist HPP eine seltene Erkrankung, jedoch weisen die unterschiedlichen Subtypen variable klinische Symptome auf, die viele differentialdiagnostische Überlegungen aufwerfen (Mornet et al., 2011): Hierzu zählen beispielsweise die Osteoporose, Rachitis, Osteogenesis imperfecta oder bei lediglich dentaler Problematik die Amelogenesis oder Dentinogenesis imperfecta (Bloch-Zupan, 2016). So sind Bisphosphonate, die die übermäßige Knochenresorption bei Osteoporose verhindern sollen, aufgrund ihrer PPI-ähnlichen chemischen Struktur bei der Therapie der HPP absolut kontraindiziert (Flanagan and Chambers, 1991, Sutton et al., 2012). Ihr Ausschluss ist daher obligat

und unterstreicht nochmals die Wichtigkeit der richtigen Diagnose in diesem komplexen Krankheitsbild.

Die Diagnostik schwerer Formen der HPP basiert hauptsächlich auf der Anamnese, der körperlichen Untersuchung und laborchemischen Parametern. Jedoch sind insbesondere klinisch milde Ausprägung schwierig zu diagnostizieren (Bianchi, 2015, Cole, 2008). Die genetische Sequenzierung des *ALPL*-Gens ist daher für eine zweifelsfreie Diagnose unerlässlich, gerade wenn klinische und labordiagnostische Daten nicht eindeutig sind (Mornet, 2007).

Eine verringerte AP-Aktivität im Serum ist der wichtigste Laborparameter, der den Verdacht einer HPP-Erkrankung aufkommen lässt. Dabei ist zu bedenken, dass AP-Spiegel alters- und geschlechtsabhängig sind. Für eine gesicherte Diagnose ist dieser Wert jedoch nicht ausreichend, da Schwankungen des Enzyms auch bei Erkrankungen wie Zöliakie und Hyperthyreose, aber auch bei einer Schwangerschaft und der Einnahme bestimmter Medikamente auftreten können (Mornet, 2007, Hofmann et al., 2013). Darüber hinaus kann die Anhäufung von TNAP-Substraten (PLP, PEA) ein Indikator für eine niedrige AP-Aktivität sein. In vielen Fällen kann ein erhöhter Wert des nicht-pathognomonischen Markers PEA im Urin nachgewiesen werden (Whyte, 2012). Ein wesentlich sensitiverer Marker ist dagegen ein erhöhter PLP-Plasmaspiegel (Whyte et al., 1985). Außerdem können auch bildgebende Verfahren, die beispielsweise hypomineralisierten Knochen zeigen können, hilfreich sein (Offiah et al., 2019).

Obwohl das Verständnis für die Erkrankung weit vorangeschritten ist, gibt es bislang keine kurative Behandlung. Aufgrund der multisystemischen Symptomatik umfasst die Therapie eines HPP-Patienten ein interdisziplinäres Monitoring.

Eine Linderung der klinischen Merkmale, insbesondere der starken Schmerzen, Frakturen, neurologischen und dentalen Symptome kann lediglich durch therapeutische Intervention erreicht werden (Bianchi, 2015). Der intermittierende Einsatz von nicht-steroidalen Antirheumatika eignet sich sehr gut für die Reduktion von Gelenk- und Knochenschmerzen und führt zu einer Normalisierung des Prostaglandin-E₂-Spiegels (Girschick et al., 1999).

Die zahnärztliche Problematik betrifft in erster Linie den vorzeitigen Verlust der Milchzähne ohne die Resorption der Wurzel. Dies ist ein äußerst charakteristisches Merkmal der HPP, weshalb Zahnärzte nicht selten die vorläufige Verdachtsdiagnose stellen. Die Folgen einer vorzeitigen Exfoliation sind in der Literatur zahlreich beschrieben und sollten durch Zahnersatz oder kieferorthopädische Maßnahmen

verhindert werden. Neben Platzmangel im bleibenden Gebiss und einer eingeschränkten transversalen Entwicklung der Kiefer, führt der Verlust der Milchzähne zu ästhetischen und funktionellen Einschränkungen, die beispielsweise die Phonation des Patienten beeinflussen (Magnusson, 1979, Hoffding and Kisling, 1978, Gable et al., 1995). Darüber hinaus sind eine ordentliche Mundhygiene und der Einsatz von Fluoriden bei HPP-Patienten noch deutlich essentieller als üblich.

Ein großer Fortschritt in der Therapie der Erkrankung wurde durch die Zulassung der Enzymersatztherapie (ERT) mit Asfotase alfa (Strensiq®) erreicht. Es handelt sich bei diesem Medikament, das für die Behandlung der HPP mit kindlicher Manifestation eingesetzt wird, um eine rekombinante humane TNAP (Whyte, 2017). Im Tiermodell mit TNAP-null-Mäusen konnte die infantile HPP verhindert werden, wenn die Mäuse von Geburt an mit subkutanen Injektionen des Enzyms behandelt werden. Die ERT verhinderte sowohl die skelettalen als auch dentalen Probleme und hatte positiven Einfluss auf die Überlebensrate der Mäuse und der HPP-Patienten (Narisawa et al., 1997, Millan et al., 2008, McKee et al., 2011, Yadav et al., 2012, Whyte et al., 2016).

1.2 Parathormon und das Parathormon-verwandte Peptid

Das Parathormon (PTH) ist ein Polypeptidhormon der Nebenschilddrüse, das eine Schlüsselfunktion bei der Vermittlung des Knochenumbaus hat und die Calcium-Homöostase reguliert (Chorev, 2002, Silva and Bilezikian, 2015, Martin et al., 2021, Sammon et al., 1970). Das 84 AS lange Peptid wird im rauen endoplasmatischen Retikulum (ER) als Prä-Pro-PTH translatiert. Cotranslational wird die Prä-Sequenz abgespalten, sodass Pro-PTH entsteht. Eine weitere Abspaltung erfolgt nach der Translokation in den Golgi-Apparat, wo das Pro-PTH in das reife PTH umgewandelt wird (Habener et al., 1984, Sakwe et al., 2002). Bei Absinken des Calciumspiegels unter den physiologischen Normalbereich sorgt PTH durch Einwirkung auf den Knochen und die Niere für die Bereitstellung von Calcium (Gesek and Friedman, 1992, Sammon et al., 1970, Swarthout et al., 2002).

Das Parathormon-related Protein (PTHrP) ist ein parakriner / autokriner Mediator, der im Gegensatz zu PTH, ubiquitär gebildet wird (Philbrick et al., 1996, Martin et al., 1997). Neben der physiologischen Bedeutung von PTHrP in der embryonalen Skelettentwicklung, übernimmt der lokale Faktor vielfältige Aktivitäten, unter anderem bei dem plazentaren Calciumtransfer, der Laktation, der Relaxation der glatten Muskulatur und

dem Wachstum von Epithelzellen (Moseley and Gillespie, 1995, Kronenberg, 2006, de Papp and Stewart, 1993, Martin et al., 2021, Karaplis et al., 1994).

Trotz ihrer unterschiedlichen Funktionen teilen sich die beiden Polypeptide den PTH1-Rezeptor, was sich durch die strukturelle Ähnlichkeit von acht AS in ihrer Amino-terminalen Sequenz erklären lässt (Burtis, 1992).

Viele Daten weisen darauf hin, dass PTH an der Regulation von Genen beteiligt ist, die eine katabole oder anabole Wirkung auf das Skelett haben (Silva and Bilezikian, 2015, Partridge et al., 1994). Jedoch gibt es nur wenige Studien über die Effekte von PTH auf die Expression des osteogenen Markers *ALPL*, welcher eine wichtige Komponente des erfolgreichen Mineralisierungsprozesses ist. Houston et al. untersuchte die Auswirkung der kontinuierlichen PTH-Stimulation während der osteogenen Differenzierung in einer murinen Osteoblasten-Zelllinie. Die Stimulation bewirkte eine gesteigerte Expression von *ALPL* und reduzierte die von *SMPD3* und *PHOSPHO1* (Houston et al., 2016). In einer weiteren Studie wurde durch kurzzeitige PTH-Stimulation die Aktivität der AP in PDL Stammzellen über den PKC-Signalweg moduliert (Wolf et al., 2013). Zum besseren Verständnis der Regulation von *ALPL* durch PTH sollen in vorliegender Arbeit *in-vitro*-Zellkulturuntersuchungen an nicht-mutierten und TNAP-defizienten Zelllinien durchgeführt werden.

1.2.1 Der PTH1-Rezeptor

Der PTH1-Rezeptor (PTH1R) ist ein G-Protein gekoppelter Rezeptor mit sieben Transmembrandomänen und einer extrazellulären Domäne, sowie einem intrazellulären C-terminalen Schwanz (Juppner et al., 1991, Chorev, 2002). Das Gen, welches für den Rezeptor kodiert, ist auf Chromosom 3 lokalisiert und besteht aus 15 Exons und 14 Introns (Kong et al., 1994). Die Aktivierung erfolgt durch die Interaktion der C-terminalen Region des Hormons bzw. Peptids mit dem N-Terminus des Rezeptors und führt anschließend zu einer Konformationsänderung, die die Bindung des G-Proteins fördert (Pal et al., 2012). Der Proteinkinase-A-(PKA)-Signalweg und der Proteinkinase-C-(PKC)-Signalweg, die durch heterotrimere G-Proteine vermittelt werden, sind für den größten Teil der regulatorischen Effekte von PTH verantwortlich (s. Abbildung 3) (Abou-Samra et al., 1992).

Die Bindung von Gas stimuliert die Bildung von zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP) durch Aktivierung der Adenylatzyklase. Das cAMP bindet wiederum an die Untereinheit der PKA und setzt eine Signalkaskade in Gang, die in der Transkription von Genen resultiert, die ein auf cAMP reagierendes Element (CRE) in ihrem Promoter

besitzen (Chase and Aurbach, 1970, Datta and Abou-Samra, 2009). Nach der Bindung von PTH kann aber auch der PKC-Signalweg aktiviert werden. So führt die Verknüpfung des Rezeptors mit Gαq zur Aktivierung der Phospholipase Cβ und folglich zur Anhäufung von Inositoltrisphosphat (IP3) und Diacylglycerol (DAG) (Civitelli et al., 1988). IP3 erhöht die intrazelluläre Calcium-Konzentration und ermöglicht so die Verlagerung der PKC zur Plasmamembran, wo diese dann durch DAG aktiviert wird. Welche der beiden Kaskaden letztendlich ausgelöst wird, hängt vom Zelltyp ab. Jedoch wird davon ausgegangen, dass der cAMP/PKA-Signalweg der dominante Mechanismus für die Knochenbildung ist (Khundmiri et al., 2016, Barros et al., 2003, Siddappa et al., 2008).

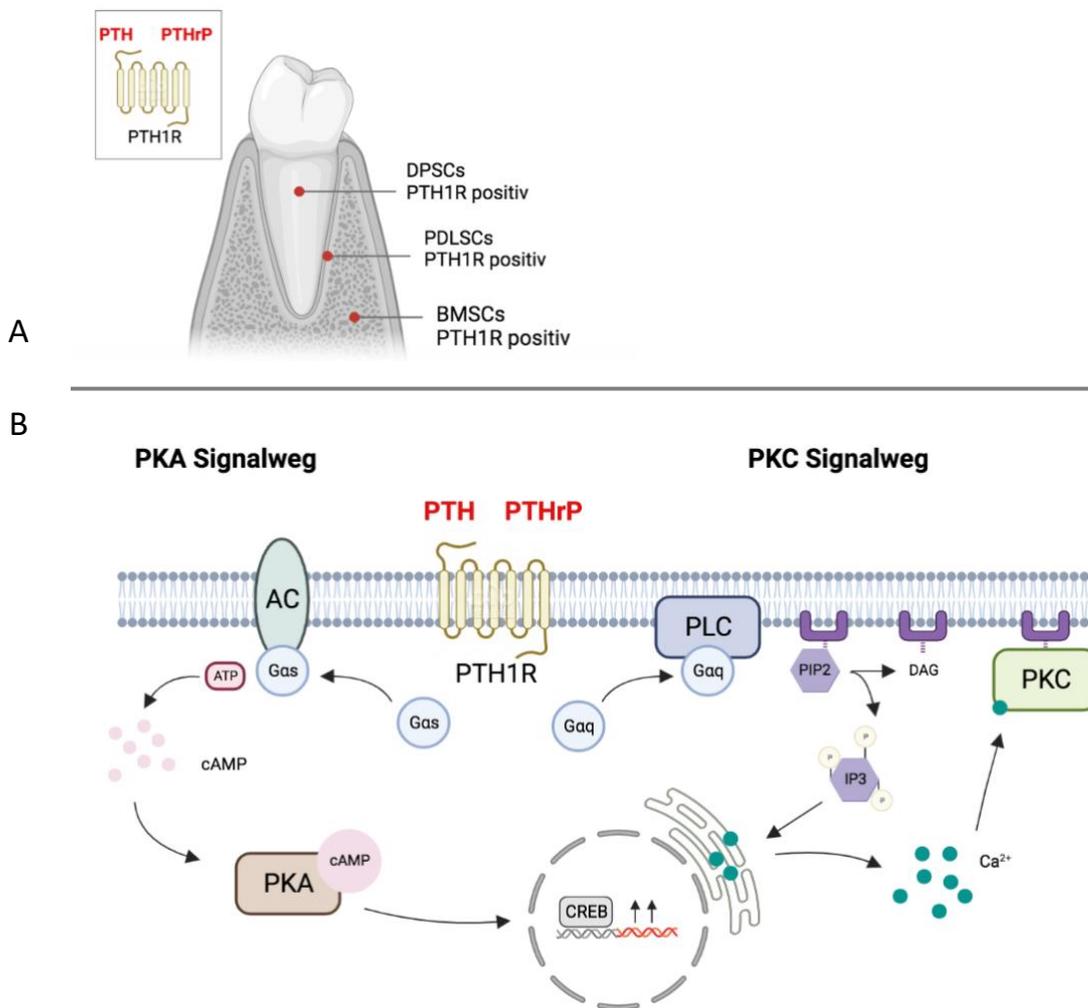


Abbildung 3: **Signalwege des PTH1R.** A: PTH1R-positive dentale Stammzellen der Pulpa (DPSCs), des parodontalen Ligaments (PDLSCs) und des Knochens (BMSCs). B: Dargestellt ist das allgemeine Prinzip der Signalübertragung nach Aktivierung des PTH1R. Die Bindung von PTH oder PTHrP induziert eine PTH1R-Konformationsänderung, die die Kopplung und Aktivierung von heterotrimeren G-Proteinen fördert. Gαs aktiviert die Adenylatzyklasen, was zur cAMP-Synthese und zur Aktivierung der Proteinkinase A (PKA) führt. Gαq aktiviert die Phospholipase C (PLC), die Phosphatidylinositolbisphosphat (PIP2) in DAG und IP3 spaltet. IP3 diffundiert dann

durch das Zytosol und aktiviert IP₃-gesteuerte Calcium-Kanäle in der Membran des ERs, wodurch gespeichertes Calcium in das Zytosol freigesetzt wird. Ein Anstieg des zytosolischen Calciums fördert die Translokation der Proteinkinase C (PKC) zur Plasmamembran und die anschließende Aktivierung durch DAG. Die Abbildung wurde mit dem Programm Biorender (<https://biorender.com>) erstellt und basiert inhaltlich auf den im vorhergehenden Absatz genannten Quellen.

Beide Polypeptide binden über denselben Rezeptor und können abhängig von dem Verabreichungsmodus unterschiedliche Gruppen von Genen regulieren (Chen et al., 2021, Silva et al., 2011). Die Umsetzung der verschiedenen Effekte auf der Ebene der Signaltransduktion ist bisher jedoch noch nicht geklärt. In vielen Studien konnte gezeigt werden, dass kontinuierliche PTH-Stimulation zur Knochenresorption führt, während intermittierende Gabe einen anabolen Effekt hatte und die Knochenapposition förderte (Silva and Bilezikian, 2015, Wein and Kronenberg, 2018, Greenfield, 2012).

Die Fähigkeit von PTH die Knochenbildung zu steigern, eignet sich daher sehr gut für die Therapie von Krankheiten, die mit einem Knochenverlust verbunden sind (Neer et al., 2001, Lindsay et al., 1997). Seit 2003 steht das PTH-Fragment Teriparatid (PTH 1-34, Forsteo®) zur Therapie der postmenopausalen Osteoporose zur Verfügung. Das PTHrP-Analogon Abaloparatid (PTH 1-34, Tymlos®) eignet sich ebenfalls für die Steigerung der Knochenmineraldichte (Miller et al., 2016). Die Zulassung auf Genehmigung des Medikamentes wurde jedoch 2018 durch die Europäischen Arzneimittel-Agentur abgelehnt.

Aufgrund des Einflusses des Hormons auf die Expression von osteogenen Markern über den PKA-Signalweg wurde rekombinantes humanes PTH auch in der Therapie der adulten HPP eingesetzt, allerdings mit unterschiedlichen Ergebnissen (Tascau et al., 2016, Silva et al., 2011, Ishizuya et al., 1997): In einigen Fällen wurden die Symptome gelindert, in anderen wiederum zeigte das Medikament keinen Effekt (Camacho et al., 2008, Laroche, 2012, Whyte et al., 2007, Schalin-Jantti et al., 2010).

1.2.2 Der Einfluss von PTH, PTHrP und PTH1R auf dentale Gewebe

Auch im dentalen Bereich hat der PTH1R-Signalweg weitreichende Auswirkungen und ist dort an der Zahneruption, der Wurzelbildung, der Reparatur des Zahnhalteapparates und der Alveolarknochenregeneration beteiligt (Aggarwal and Zavras, 2012, Iwasaki et al., 2019, Nagata et al., 2020, Ono et al., 2016, Zhang et al., 2020).

Dass der PTH1R in PDLSCs exprimiert wird, wurde bereits mehrfach nachgewiesen (Lossdorfer et al., 2006, Abuduwali et al., 2014). Auf die hormonelle Stimulation mit PTH reagieren die PDLSCs ähnlich wie Osteoblasten, jedoch ist die Wirkung abhängig von

der Konfluenz der Zellen. Ein präkonfluenten Zustand ermöglicht den Anstieg des Osteoprotegerin, einem physiologischen Inhibitor der Knochenresorption und die Zunahme der Differenzierung, wohingegen diese bei konfluenten Zellen abnimmt (Ouyang et al., 2000, Aggarwal and Zavras, 2012, Lossdorfer et al., 2005).

Vieles spricht dafür, dass die PTH1R-Signalübertragung eine entscheidende Rolle während des Zahndurchbruchs spielt. So wurden heterozygote Mutationen im PTH1R mit dem Krankheitsbild der Primären Durchbruchsstörung in Verbindung gebracht. Dabei bricht ein primär nicht ankylosierter Zahn aufgrund einer beeinträchtigten Signalübertragung nicht oder nur teilweise durch (Subramanian et al., 2016, Stellzig-Eisenhauer et al., 2010). Verschiedene Studien im Mausmodell unterstreichen die Bedeutung des PTH1R-Gens, denn die Ablation führt nicht nur zur Primären Durchbruchsstörung, sondern bedingt auch einen verengten Parodontalspalt mit unregelmäßig ausgerichteten Kollagenfasern (Cui et al., 2020, Ono et al., 2016).

Weitere vielversprechende Erkenntnisse aus *in-vitro*-Studien unterstützen das Potenzial des PTH in der Therapie der HPP. Beispielsweise wurde durch intermittierende PTH-Applikation die Zementbildung durch Aktivierung von zementogenese- und differenzierungsrelevanten Markern gefördert. (Li et al., 2017). Ebenso begünstigte diese Applikationsweise die odontogene bzw. osteogene Differenzierung von Stammzellen aus der dentalen apikalen Papille, die für die Dentinbildung im Bereich der Wurzel verantwortlich sind (Pang et al., 2020). Ein exemplarisches Protokoll für die intermittierende PTH-Administration im Zellkulturmodell ist in Abbildung 4 dargestellt (Chen et al., 2016, Lossdorfer et al., 2011).

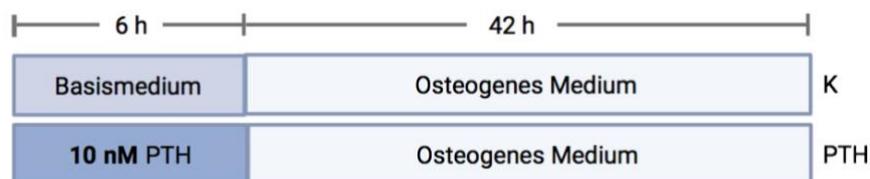


Abbildung 4: **Exemplarisches *in-vitro*-Applikationsprotokoll von PTH.** Die Zellen der Kontrollgruppe (K) werden zunächst 6 h in Basismedium kultiviert und anschließend für die verbleibenden 42 h des 48 h-Zyklus mit PTH-freiem osteogenen Medium versorgt. In der PTH-Gruppe (PTH) werden die Zellen in den ersten 6 h mit 10 nM PTH in Basismedium behandelt und erhalten ebenso osteogenes Medium für die weiteren 42 h. Die Abbildung wurde mit dem Programm Biorender (<https://biorender.com>) erstellt (Chen et al., 2016, Lossdorfer et al., 2011).

Das Hauptziel der intermittierenden PTH-Behandlung bei Parodontitis oder Knochendefekten aufgrund von Kiefernekrosen sind die PTH1R-positiven Stammzellen des Alveolarknochens (Sim et al., 2020, Bashutski et al., 2010). In einer Tiermodell-Studie

von Barros et al. wurde gezeigt, dass die intermittierende Gabe von PTH den Parodontitis-assoziierten Knochenverlust verringert (Barros et al., 2003). Zudem lässt sich auch die Infiltrationsrate von Entzündungszellen in die Gingiva mit diesem Administrationsverfahren vermindern (Chen et al., 2017). Darüber hinaus konnten auch durch lokale Injektionen von PTH verbesserte Ergebnisse bei der chronischen Form der Parodontitis erzielt werden (Yoshida et al., 2019).

Diese Daten weisen darauf hin, dass viele orofaziale Gewebe durch PTH1R-Signale reguliert werden und erklärt, warum PTH bzw. PTHrP immer häufiger therapeutische Anwendung im dentalen Bereich finden.

1.3 Die hTERT PDL Zelllinie und transgene Varianten mit Mutationen im ALPL-Gen

Zum besseren Verständnis der Auswirkungen eines TNAP-Mangels im dentalen Bereich wurden in vorliegender Arbeit Untersuchungen an primär isolierten Stammzellen (PDLSCs) und immortalisierten Zellen des parodontalen Ligaments (hTERT PDLs) und davon abgeleiteten TNAP-defizienten Zelllinien durchgeführt.

PDLSCs sind Stammzellen des PDL, einem faserreichen Bindegewebe, welches sich zwischen dem Wurzelzement und dem Alveolarknochen befindet und der Verankerung des Zahnes in der Alveole dient (Nanci and Bosshardt, 2006, Lyu et al., 2021, Fleischmannova et al., 2010). Es konnte bereits mehrfach nachgewiesen werden, dass diese Zellen mesenchymale Stammzellmarker exprimieren und ein mehrschichtiges Differenzierungspotenzial aufweisen (Lekic et al., 2001, Seo et al., 2004, Melms et al., 2020). *In-vivo* tragen die PDLSCs zur Bildung von parodontalen Gewebe bei und sind *in-vitro* in der Lage knochenähnliche Strukturen zu bilden (Ninomiya et al., 2014, Seo et al., 2004, Iwasaki et al., 2019). Darüber hinaus gibt es Hinweise darauf, dass das regenerative Potenzial der Zellen die Verbindung zwischen Alveole und Zement bei Parodontitis wiederherstellen kann (Hernandez-Monjaraz et al., 2018).

Die begrenzte *in-vitro* Lebensdauer von Stammzellen erschwert jedoch langfristige Studien, weshalb die Arbeitsgruppe um Docheva et al. PDLSCs durch lentiviralen Gentransfer mit hTERT (humane Telomerase-Reverse-Transkriptase) immortalisierten. Verglichen mit den primären PDLSCs wiesen die hTERT PDLs eine ähnliche Morphologie und Populationsverdopplungszeit auf und hatten die gewünschte längere Lebensspanne (Docheva et al., 2010).

Zur Generierung eines *in-vitro*-Zellkulturmodells für HPP wurde in einer vorangegangenen Dissertation ein CRISPR/Cas9-basiertes Genomediting im *ALPL* Gen der hTERT PDL Zelllinie durchgeführt (Dissertation Sofia Paulus, 2021). Hierfür wurden zwei unterschiedliche CRISPR-RNA-Konstrukte (crRNA) mit verschiedenen Zielen im *ALPL*-Gen verwendet.

Das CRISPR/Cas9-System wurde auf der Grundlage der RNA-gesteuerten Cas9-Endonuklease entwickelt, die im Immunsystem von Bakterien vorkommt (Barrangou and Horvath, 2012). Die Anwendung dieses Systems *in-vitro* erfordert zum einen die Cas9 und zum anderen die Single Guide RNA (sgRNA), die sich aus einer Target-spezifischen crRNA und einer trans-aktivierenden cRNA (tracrRNA) zusammensetzt (Ran et al., 2013). Damit dieser Komplex an die Ziel-DNA binden kann, muss diese unmittelbar vor einer 5'-NGG PAM (protospacer-adjacent motif) liegen, die im menschlichen Genom durchschnittlich alle 8-12 Basenpaare zu finden ist (Cong et al., 2013). Durch Veränderung der 20-Nukleotid-Leitsequenz innerhalb der sgRNA kann die Cas9 auf nahezu jedes Ziel von Interesse in unmittelbarer Nähe der PAM-Sequenz umgelenkt werden, was CRISPR zu einem äußerst präzisen Werkzeug des Genomeditings macht.

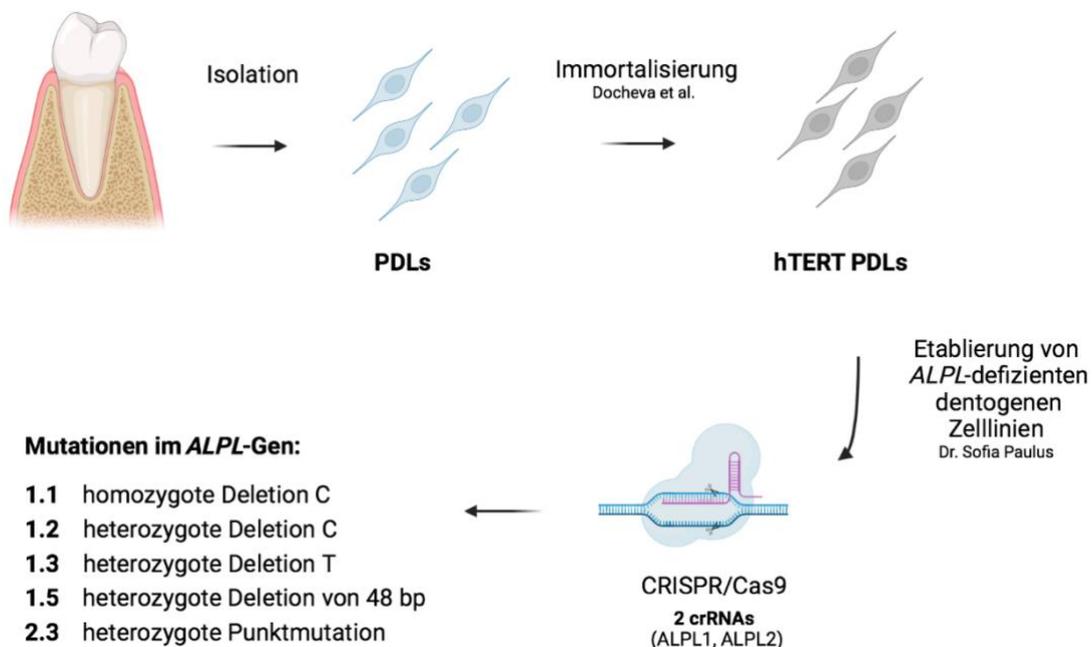


Abbildung 5: **Zellen in Kultur.** Diese Abbildung visualisiert den Entstehungsprozess der Zelllinien, die in vorliegender Arbeit zur Erforschung dentaler Aspekte der HPP verwendet wurden. Die Abbildung wurde mit dem Programm Biorender (<https://biorender.com>) erstellt.

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Die molekularbiologischen Auswirkungen von PTH im Zusammenhang mit der HPP-Erkrankung sind derzeit nur unzureichend erforscht. In der Literatur wurde bereits einige Male gezeigt, dass das Hormon positiven Einfluss auf die Genexpression von *ALPL* und die Enzymaktivität nehmen kann (Houston et al., 2016, Wolf et al., 2013).

HPP-Patienten weisen häufig schwere dentogene Symptome auf, weshalb in der vorliegenden Arbeit ein *in-vitro*-Modell aus Zelllinien des parodontalen Ligaments mit Mutationen im *ALPL*-Gen verwendet wurde, um die Effekte des Hormons in dentalen Bereich genauer zu analysieren.

Im ersten Teil der Arbeit sollen die Zelllinien zunächst weiterführend charakterisiert werden. Hierbei ist von Interesse, ob CRISPR/Cas9 bereits Mutationen in Genabschnitten erzeugt hat, die die Differenzierungsprozesse weiter beeinträchtigen könnten, sowie eine weitere Analyse des Phänotyps des *ALPL*-Genotyps.

Im zweiten Teil liegt der Fokus der Experimente auf der Ergründung der Effekte von PTH einige Stunden nach der Stimulation sowie der Evaluierung der funktionellen Auswirkungen bei intermittierender Supplementierung des Hormons. Um einschätzen zu können, wie sich das Hormon auf die Genexpression, Proteinlevel und Differenzierungsprozesse in gesunden Zellen auswirkt, sollen die Kultivierungsmodelle zunächst in PDLSCs etabliert und anschließend auf die transgenen Zelllinien mit Mutationen im *ALPL*-Gen angewandt werden.

Nach aktuellem Kenntnisstand könnte die Analyse molekularbiologischer Mechanismen nach PTH-Administration zweifellos wichtige Informationen zum besseren Verständnis des Krankheitsbildes liefern und somit Ansatzpunkte für neue Therapiestrategien der dentalen Symptome bei HPP offenlegen.

2 Material und Methoden

2.1 Ethikvotum

Für die biologischen Versuche wurden primäre Stammzellen verwendet, die aus dem PDL frisch extrahierter Zähne isoliert wurden. Die hier verwendeten Zähne fielen als Abfallprodukt nach Extraktionen an und wurden freundlicherweise aus der Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie der Universität Würzburg zur Verfügung gestellt.

Das Material wurde anonymisiert verwendet und fortlaufend nummeriert. Es wurden keine Daten zu den Spendern erhoben oder gespeichert. Eine Unbedenklichkeitsbescheinigung der Ethikkommission (20210819 01) zur Verwendung des Patiententmaterials liegt vor.

2.2 Zellbiologische Methoden

Die im nachfolgenden Abschnitt beschriebene Arbeit mit Zellen erfolgte stets in einer Reinraumwerkbank (Thermo Fisher, MSC-Advantage™) unter Verwendung von steriler Glas- und Plastikausstattung sowie Lösungen. Als Kulturgefäße dienten belüftete, aus Polyesterol gefertigte Monolayer-Zellkulturflaschen unterschiedlicher Größe mit Filterdeckel (CELLSTAR® Filter, Greiner Bio-One, 25 cm², 75 cm², 150 cm²), die in einem New Brunswick™ Galaxy 170S Inkubator bei konstanten Standardbedingungen von 37 °C, einer Atmosphäre von 5 % CO₂ und gesättigter Luftfeuchtigkeit aufbewahrt wurden. Ferner wurden die Zellen in regelmäßigen Abständen mikroskopisch (Zeiss, Axio Vert.A1) auf Proliferation, Konfluenz und Kontaminationen überprüft.

2.2.1 Aufarbeitung und Isolation der PDLSCs

Zur Isolation der PDLSCs wurde zunächst das Desmodont von den unteren beiden Dritteln der Wurzel abpräpariert und anschließend in die Verdauungslösung, bestehend aus Phosphatgepufferter Salzlösung (PBS, Dulbecco's Phosphat Buffered Saline modified without calcium chloride and magnesium chloride, Sigma-Aldrich, D8537-500 ml) und dem Zusatz von 0,4 mg/ml Kollagenase ($\geq 0,1$ U/mg) (Nordmark, S1745402) und 4 mg/ml Dispase ($\geq 0,5$ U/mg) (Sigma Aldrich, D4693) überführt. In dieser verblieb das Gewebe für 1 h bei 37 °C. Anschließend folgte die Überführung in eine T25 Zellkulturflasche. Hier wurde bereits ein entsprechendes Volumen an Stammzell-Medium (s. Kapitel 2.2.2) vorgelegt, sodass das Gewebestück vollständig mit Medium

bedeckt war. Zusätzlich wurde diesem Amphotericin B (Sigma Aldrich, A2942-20ML) in einer 1:100-fachen Verdünnung beigefügt.

2.2.2 Zellkultivierung

Für optimale *in-vitro*-Bedingungen, die Proliferation, Wachstum und Differenzierung ermöglichen, bedarf es Kulturmedien, die eine solche Umgebung schaffen. Die in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien sind in Tabelle 1 aufgeführt.

Für die hTERT PDL Zelllinie und die transgenen Zelllinien mit Mutationen im *ALPL*-Gen wurde DMEM High Glucose Medium (DMEM 1x+4,5 g/L D-Glucose, L-Glutamin, - Pyruvat, Gibco, 41965-039) ausgewählt, dem 10 % Fetales Kälberserum (FCS, Bio&Sell, BS.FCS 0.500 EUA) und 1 % Penicillin/Streptomycin (Pen/Strep, Sigma Aldrich, P4333) beigefügt wurde.

Die PDLSCs wurden mit DMEM/F-12 (1:1) (DMEM 1x + GlutaMax-I, Gibco, 31331-028) versorgt, ebenfalls mit Zusatz von 10 % FCS und 1 % Pen/Strep. Zusätzlich enthielt das Kulturmedium der PDLSCs zur Neutralisierung der Stoffwechselprodukte 5 % der Puffersubstanz HEPES (Sigma-Aldrich, H0887-100ML).

Zur Förderung des Wachstums wurde den Zellen 5 ng/ml Fibroblast Growth Factor (FGF, PeproTech, 100-18C-500 µg) zugefügt.

Tabelle 1: **Übersicht der verwendeten Zelllinien.** WT = Wildtyp; C = Cytosin; T = Thymin; bp = Basenpaare.

Zelllinie	Mutation
hTERT PDL	Nicht mutiert (nicht transfiziert)
WT	Nicht mutiert, Transfektion mit ALPL2
1.1	Homozygote Deletion C
1.2	Heterozygote Deletion C
1.3	Heterozygote Deletion T
1.5	Heterozygote Deletion von 48 bp
2.3	Heterozygote Punktmutation

Zwei- bis dreimal wöchentlich wurde das Kulturmedium erneuert. Vor dem Wechsel wurden die Medien stets in einem Wasserbad auf 37 °C vorgewärmt, um einen möglichst schonenden Umgang mit den Zellen zu gewährleisten.

Nach Erreichen der Konfluenz mussten die Zellen passagiert werden, um einer Wachstumshemmung entgegen zu wirken. Hierfür wurde das Medium zunächst mit Hilfe von Pasteurpipetten (Brand, 747720) oberhalb des Zellrasens abgesaugt, bevor

anschließend ein Waschschrift mit 10 ml PBS folgte. Um die Zellen dann von ihrer adhärennten Unterlage zu lösen, wurde 3 ml Trypsin-EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure, 0,05 %, Gibco, 15400- 54) in PBS hinzu pipettiert und das Kulturgefäß für 3 Minuten im Brutschrank inkubiert. Daraufhin konnten die Zellen mit kräftigem Klopfen auf die Seitenwände der Kulturflasche abgelöst und in Suspension gebracht werden. Die enzymatische Wirkung des Trypsins wurde mit 7 ml des entsprechenden Mediums abgestoppt, bevor die Zellen in ein 15 ml Falcon-Röhrchen (CELLSTAR® Röhrchen, Greiner Bio-One, 15 ml, 50 ml) überführt und anschließend für 5 min bei 1200 rpm (290 x g) zentrifugiert wurden. Das Zellpellet wurde in 3 ml frischem Medium resuspendiert und folgend die Zellzahl, wie in Kapitel 2.2.3 beschrieben, bestimmt. Danach wurden 25 ml Medium in eine neue T150 Zellkulturflasche vorgelegt und $0,5 \cdot 10^6$ Zellen ausgesät.

2.2.3 Bestimmung der Zellzahl

Zur Schaffung vergleichbarer Konditionen in den Experimenten wurde vor Aussaat die Zellzahl manuell mittels Neubauer Zählkammer bestimmt. 10 µl Zellsuspension wurden hierfür mit 90 µl Trypanblau 0,4 % (Gibco, 15250-061) vermischt und anschließend 10 µl in die Zählkammer pipettiert. Trypanblau eignet sich zur Bestimmung der Zellviabilität, da die Substanz von abgestorbenen Zellen aufgenommen wird und diese folglich dunkelblau verfärben. Bei der Zellzählung wurden diese Zellen nicht berücksichtigt. Die Gesamtsumme der gezählten Zellen wurde durch die vier Eckquadranten geteilt, anschließend mit dem Verdünnungsfaktor 10 und dem Kammerfaktor 10000 multipliziert, um die Zellzahl pro Milliliter zu errechnen.

2.2.4 Berechnung der Populationsverdopplung pro Tag

Zur Bestimmung der Populationsverdopplung pro Tag wurden die Zellen im Rahmen der Passagierung gezählt. Es wurden jeweils $0,5 \cdot 10^6$ Zellen in einer T150 Flasche ausgesät und nach erreichter Konfluenz erneut gezählt nachdem die Zellen abgelöst worden waren. Anhand der Gesamtzellzahl und der Anzahl der Tage konnte mit untenstehender Formel die Populationsverdopplung pro Tag bestimmt werden.

$$\frac{\text{Populationsverdopplung}}{\text{Tag}} = \frac{\ln\left(\frac{\text{Zellzahl}}{0,5 \cdot 10^6}\right) \cdot 3,33}{x \text{ Tage}}$$

2.2.5 Stimulation mit PTH

Die im Folgenden beschriebenen Behandlungen wurden alle unter gleichen Bedingungen durchgeführt. Zunächst wurden die Wells einer Zellkulturplatte (Techno Plastic Products) mit 10 µg/ml Fibronectin (Promocell, C43060) in sterilem PBS beschichtet, um einem Ablösen der Zellen im Verlauf der osteogenen Differenzierung entgegenzuwirken. Anschließend wurden die Platten bei 37 °C inkubiert und die überschüssige Lösung nach zehn Minuten abgesaugt. Um den Einfluss des Peptidhormons PTH auf die unterschiedlichen Zelllinien zu untersuchen, wurden diese mit einer Dichte von 20 000 Zellen/ cm² in 6-Well Zellkulturplatten für die RNA- und Protein-Ernte bzw. 24-Well Platten (Techno Plastic Products) für den Nachweis der Differenzierung (Alizarin-Färbung) ausgesät.

2.2.5.1 Untersuchung der Kurzzeiteffekte von PTH

Zur Analyse der kurzfristigen Auswirkungen des Hormons wurden pro Probe und Zeitpunkt je 2 Wells für die Analyse der Genexpression bzw. 3 Wells für die Analyse auf Proteinebene ausgesät. Nach erreichter Konfluenz wurden die Zellen zunächst für vier Tage mit osteogenem Medium vorbehandelt, um der differenzierungshemmenden Wirkung von PTH auf die Zellkultur entgegenzuwirken. Das Differenzierungsmedium bestand aus Basalmedium (vgl. Kapitel 2.2.2) mit Zusatz von 10 mM β-Glycerophosphat (Sigma-Aldrich, G9422-100G), 100 nM L-Ascorbinsäure (Sigma-Aldrich, A8960-5G) und 100 nM Dexamethason (Sigma-Aldrich, D4902-25MG). Vor der Stimulation erfolgte ein Mediumwechsel. Hierfür wurden entsprechendem Basalmedium 10 nM bzw. 50 nM Parathormon (Fragment 1-34, Sigma Aldrich, P3796 0.1MG) beigefügt und anschließend auf die Wells gegeben (s. Abbildung 6A). Die Kontrolle wurde mit reinem Basalmedium versorgt. Proben wurden zu Beginn des Mediumwechsels und nach 1, 3 und 6 Stunden geerntet.

2.2.5.2 Evaluation der funktionellen Auswirkungen durch intermittierende PTH-Zugabe

Zur Untersuchung der funktionellen Einflüsse des Hormons wurden die Zellen nach Erreichen von Konfluenz in Präsenz von 50 nM PTH kultiviert. Die Zellen wurden innerhalb eines 48-stündigen Inkubationszyklus für 6 Stunden mit PTH in Basismedium (vgl. Kapitel 2.2.2) kultiviert und für die restlichen 42 Stunden jedes 48 h-Zyklus mit PTH-freiem osteogenem Medium versorgt (s. Abbildung 6B). Das Medium wurde vor Gebrauch frisch angesetzt. Zellen, deren Kulturmedium kein PTH enthielt, dienten als

Kontrollgruppe. Proben für die Analyse der Genexpression wurden an Tag 0, 8, 14 und 22 gesammelt bzw. für die Analyse der Proteinaktivität an Tag 0, 8 und 22.

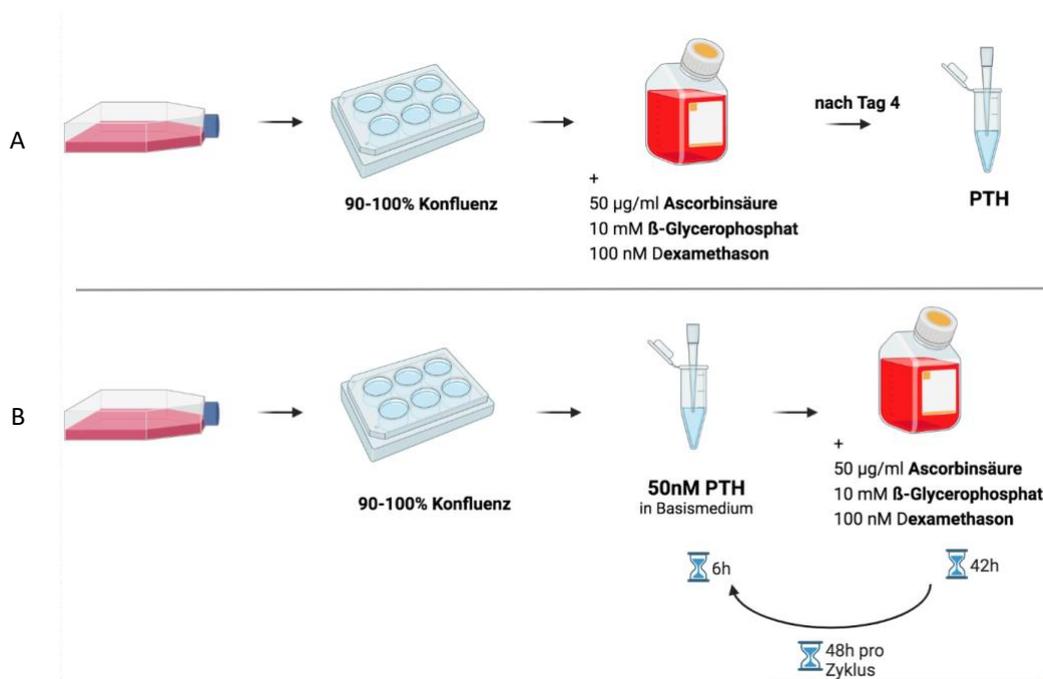


Abbildung 6: **Administration von Parathormon auf die Zellkulturmodelle.** Die Abbildung stellt schematisch das Protokoll der PTH-Administration dar. A: PTH-Stimulation zur Untersuchung der kurzfristigen Auswirkungen des Hormons. B: PTH-Stimulation im 48 h-Zyklus. Die Abbildung wurde mit dem Programm Biorender (<https://biorender.com>) erstellt.

2.3 Analyse von Off-Target Effekten

Off-Target Mutationen stellen eine häufige Problematik bei der Verwendung von CRISPR/Cas9 dar. Mit Hilfe des CRISPOR Tools (<https://crispor.tefor.net>) konnte für jedes Konstrukt nach Genloci mit Anfälligkeit für Off-Target Mutationen gesucht werden. Genauer analysiert wurden hier in den *ALPL*-defizienten Zelllinien nur die Genabschnitte, die auf kodierenden Bereichen der DNA liegen.

2.3.1 DNA-Isolation

Um festzustellen, ob das CRISPR/Cas9-basierte Genediting im *ALPL*-Gen zu unbeabsichtigten Mutationen geführt hat, wurden entsprechende Off-Target Lokalisationen sequenziert. Zur Bestimmung der Nukleotid-Abfolge musste zunächst genomische DNA aus den zu analysierenden Zelllinien isoliert werden. Hierfür wurde das NucleoSpin® Tissue Kit (Macherey-Nagel, 749052.50) nach Angaben des

Herstellers verwendet. Im letzten Schritt wurde die DNA in 50 µl Puffer eluiert und vor Zentrifugation eine vierminütige Inkubationszeit bei Raumtemperatur (RT) abgewartet. Die DNA-Proben wurden bei -20 °C gelagert.

2.3.2 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Zur Analyse eines entsprechenden Genabschnittes, musste dieser zunächst Sequenz-spezifisch amplifiziert werden.

Folgende Reagenzien wurden hierfür pro Probe angesetzt:

0,5 µl	dNTP Mix (10 mM, Promega, U1511)
0,5 µl	Sense Primer (10 µM)
0,5 µl	Antisense Primer (10 µM)
4 µl	MgCl ₂ (25 mM, Promega, A351H)
10 µl	5x Colorless GoTaq® Flexi Buffer (Promega, M890A)
0,2 µl	GoTaq® DNA Polymerase (5 U/µl) (Promega, M780B)
31,3 µl	Nuklease-freies H ₂ O (Promega, P199E)
3 µl	DNA

Die hierfür verwendeten Primer sind Tabelle 2 zu entnehmen. Einige der Off-Target Primer wurden von dem Tool CRISPOR (<http://crispor.tefor.net>) vorgeschlagen und konnten folgend übernommen werden, wohingegen der große Anteil über die Funktion Primerblast (NIH U.S. National Library of Medicine, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi>) entworfen wurde. Die Primer wurden über biomers.net bezogen.

Die PCR erfolgte in einem in einem Thermocycler (Labcycler Gradient, Sensoquest 011-101) und beinhaltete folgende Schritte:

95 °C	10 min	
95 °C	30 sec	} 40 Zyklen
55 °C	30 sec	
72 °C	30 sec	
72 °C	7 min	
4 °C	-	

Tabelle 2: **Primer zur Analyse von Off-Target Mutationen.** s: Sense Primer, as: Antisense Primer; Produktlänge in [bp]. RefSeq = Referenzsequenz.

Primer	Sequenz 5'-3'	[bp]	RefSeq
ALPL Konstrukt 1			
<i>CRELD2</i>	s: TCGATCCAGAGTCCCTCCAC as: TAGTCCTCAGGGAGAAGCCG	424	NM_001372060.1
<i>NCOR2</i>	s: TGGCCAGACGGTCCCT as: CCCCTCATTTACAGGACCC	400	NM_006312.6
<i>RNF168</i>	s: TCGTCGGCAGCGTCCCAACAACACGCCATGGTT as: GTCTCGTGGGCTCGGAGACGTGTTGGATGCTCCTG	483	NM_152617.4
<i>SVEP1</i>	s: TCGTCGGCAGCGTCTCTGAAGTCTGGGGAAGGCT as: GTCTCGTGGGCTCGGCCACTGGCACCACATAGGAG	757	NM_153366.4
<i>TRIM42</i>	s: TCGTCGGCAGCGTCCGTGCCCTTGGACTTTGTTG as: GTCTCGTGGGCTCGGCTTGGCAGCTCTTGGGTACA	439	NM_152616.5
<i>TSCC1</i>	s: TCAGACACAGACCTCCTCATCA as: AACCCGTTTTCCACTAATCAGC	393	NC_000002.12
<i>WDR1</i>	s: TCGTCGGCAGCGTCGAGACCCACAACCTTTCCGG as: GTCTCGTGGGCTCGGTCGCTGGCATAGAGTTAGCG	420	NM_017491.5
<i>WDR59</i>	s: TCGTCGGCAGCGTCCACACTGCAGCTTTCCAACC as: TCTCGTGGGCTCGGGGAAGAAACGAGGCTCACA	440	NM_030581.4
ALPL Konstrukt 2			
<i>ABCC8</i>	s: GAGAGGGGTGGGGAAGAGTC as: GAAAGATGGGCCCCACAG	430	NC_000011.10
<i>C3orf30</i>	s: CAACCTAGACCAGTCAGGGACG as: CTGACCATCACTCTGTTTCATGC	430	NC_000003.12
<i>C15orf41</i>	s: TCGTCGGCAGCGTCGAAACCACTGTCTTGGGCTG as: GTCTCGTGGGCTCGGGCAGGAAAACAGGAAGCTT	391	NM_001321759.2
<i>CHCHD2P8</i>	s: CCGCGTGACCCCTCTA as: TCAGCACCTCATTGAAACCC	386	NC_000013.11
<i>PTPRE</i>	s: TCGTCGGCAGCGTCGAGGCCTTCTGTAGTTGGGT as: GTCTCGTGGGCTCGGCCCTCAATGACTGGTCTT	484	NM_006504.6

2.3.3 Aufreinigung des PCR-Produkts

Für eine gezielte Weiterverarbeitung der PCR-Fragmente in der Sequenzierung musste das PCR-Produkt aufgereinigt werden, da dieses nicht nur aus dem gewünschten DNA-Fragment, sondern beispielsweise aus nicht-inkorporierten Primern oder unverbrauchten dNTPs bestand.

Die Aufreinigung erfolgte mittels einem kommerziell erwerblichen Kit von Macherey-Nagel (NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up, 740609.50) entsprechend dem vom Hersteller empfohlenen Protokoll. Die DNA wurde in 20 µl Puffer eluiert und vor dem letzten Zentrifugationsschritt eine vierminütige Inkubationszeit bei RT abgewartet. Anschließend wurde die DNA-Konzentration aller Proben an einem Tecan Infinte Lesegerät unter Verwendung einer NanoQuant Plate™ (Tecan) bestimmt.

2.3.4 Sequenzierung

Zur Sequenzierung wurden 150 ng des aufgereinigten PCR-Produkts, 1 µl Primer (10 µM), 4 µl BigDye Terminator-Mix (v 1.1. Applied Biosystems 4336774), 4 µl 5x BigDye Sequencing Buffer (v3.1 Applied Biosystems, 4336697) und Nuklease-freies H₂O vermischt, so dass sich ein Gesamtvolumen von 20 µl ergab. Die Besonderheit am BigDye sind die fluoreszenzmarkierten Didesoxynukleotide (ddNTPs). Aufgrund der fehlenden Hydroxylgruppe kommt es zu keiner DNA-Kettenverlängerung, sondern zum Kettenabbruch. Die Methodik folgt dabei dem Sequenzierungsprinzip nach Sanger (Sanger et al., 1977).

Die hierbei entstehenden Sequenzprodukte können dann mittels Kapillarelektrophorese aufgetrennt und die Fluoreszenz durch Laserstrahlen sichtbar gemacht werden.

Standardmäßig sind die nachfolgend aufgeführten Schritte zur Durchführung der Sequenzier-PCR angewandt worden:

94 °C	5 min	
94 °C	30 sec	} 30 Zyklen
50 °C	1 min	
60 °C	3 min	
72 °C	5 min	
12 °C	-	

Nach Beendigung der PCR wurden die Produkte mittels einer NucleoSEQ®-Säule (Macherey-Nagel, 740523.50) nach Herstellerangaben aufgereinigt. Anschließend wurde die DNA mit 2 µl Natriumacetat (Roth, 6733.2) und 80 µl 96 % Ethanol (Roth, 5054.4) ausgefällt und für 15 min bei 14000 rpm (14462 x g) zentrifugiert. Der Überstand konnte danach verworfen werden. Das Pellet wurde mit 200 µl 70 % Ethanol gewaschen und erneut für 3 Minuten bei 14000 rpm zentrifugiert. Überschüssiges Ethanol wurde

verworfen und das Pellet getrocknet, welches anschließend in 30 µl HiDi™-Formamid resuspendiert und in eine 96-Well Sequenzierplatte (Biozym, 710897) pipettiert wurde. Die Sequenzierung erfolgte im Institut für Humanetik in einem ABI 3730 Sequencer. Zur Darstellung der Ergebnisse wurde der SnapGene Viewer (Version 5.3.2, GSL Biotech LLC) verwendet.

2.4 Molekularbiologische Methoden

2.4.1 RNA-Isolation und Konzentrationsbestimmung

Für die Gewinnung von RNA wurden pro Probe und Zeitpunkt je zwei Wells einer 6-Well Platte geerntet und in diesem Schritt zusammengeführt. Zunächst wurde das Medium abgesaugt und die Zellen anschließend mit sterilem PBS gewaschen, um alle Mediumreste zu entfernen. Im darauffolgenden Schritt wurde ein Gemisch aus 175 µl Lysepuffer aus dem NucleoSpin RNA II Kit (Macherey-Nagel, NZ740955250) und 1,75 µl β-Mercaptoethanol (Roth, 42227.1) in entsprechende Wells pipettiert. Die Zellen wurden mit einem Zellschaber (SPL Life Sciences, 90020) abgelöst und in ein Reaktionsgefäß gegeben. Es resultierte ein Gesamtvolumen von 350 µl. Die Probe wurde anschließend bei -80 °C gelagert.

Die Isolierung und Aufreinigung erfolgte gemäß dem Protokoll des NucleoSpin RNA II Kits. Im letzten Schritt wurde die RNA in 20 µl RNase-freiem H₂O eluiert, um eine höhere Konzentrierung der Lösung zu erreichen. Die Proben wurden bei -80 °C gelagert.

Zur Messung der RNA-Konzentration wurde ein Tecan Infinite Reader verwendet. Hierfür wurden je 2 µl Probe auf eine NanoQuant Plate™ pipettiert. Als Nullabgleich diente RNase-freies Wasser.

2.4.2 Synthese der cDNA

Um quantitative PCRs durchzuführen, muss im Vorfeld die RNA mittels Reverse Transkriptase in cDNA umgeschrieben werden, um dann die gewünschten Zielsequenzen amplifizieren zu können.

In diesem Verfahren wird die RNA nach Konzentrationsbestimmung auf 1 µg in 17 µl Nuklease-freiem Wasser verdünnt. Anschließend werden 1 µl Oligo-DT Primer (50 pmol/µl, Promega, C110A) zugegeben. Diese sind zur Initiation der eigentlichen reversen Transkription notwendig, da sie der Reversen Transkriptase als Primer dienen, um den zur RNA komplementären cDNA Strang zu synthetisieren.

Nach dem ersten Denaturierungsschritt bei 70 °C für 5 min einem Thermocycler (Sensoquest) wurde jeder Probe 7 µl des Reaktionsansatzes zugefügt:

5 µl	M-MLV Reverse Transkriptase 5x Reaction Buffer (Promega, M531A)
1 µl	M-MLV Reverse Transkriptase (200 U/µl) (Promega, M170B)
0,8 µl	dNTP Mix (10 mM, Promega, U1511)
0,2 µl	Nuklease-freies Wasser

Diesem Schritt folgte eine Elongationsphase von 1 h bei 42 °C und zuletzt eine Hitzeinaktivierung der Reversen Transkriptase bei 92 °C für 10 min.

2.4.3 Quantitative real-time PCR (qPCR)

Bei der Echtzeit-PCR handelt es sich um eine Modifikation der klassischen PCR. Hier kommen in die DNA interkalierende Fluoreszenzfarbstoffe zum Einsatz, die eine Quantifizierung der PCR-Produkte ermöglichen.

Folgende Reagenzien wurden pro Probe angesetzt:

10 µl	GoTaq® qPCR Mastermix 2x (Promega, A6002)
0,5 µl	Sense Primer (10 µM)
0,5 µl	Antisense Primer (10 µM)
7 µl	Nuklease-freies Wasser

Dem Reaktionsmix wurden anschließend 16 ng cDNA beigefügt. Diese diente nun als Matrize in der PCR-Reaktion für Primer, die spezifisch für die gesuchte Zielsequenz sind. Als Negativkontrolle wurde dem Mix 2 µl des Nuklease-freien H₂O zugegeben. Jede Probe wurde als Duplikat pipettiert. Pro Replikat ergab sich ein Gesamtvolumen von 20 µl. Die verwendeten Primer können Tabelle 3 entnommen werden.

Die qPCR wurde nach dem folgenden Programm in einem qPCR-Thermocycler (CXF96, C100™ Thermal Cycler, BioRad) unter Verwendung der Software Bio-Rad CFX Manager (Bio-Rad) durchgeführt:

95 °C	4 min	
95 °C	30 sec	
60 °C	30 sec	} 40 Zyklen
72 °C	30 sec	
95 °C	10 min	
Schmelzkurve 65-95 °C		

Aufgrund der unspezifischen Einlagerung des Fluoreszenzmarkers in doppelsträngige DNA erfolgte im Anschluss an die Genexpressionsanalysen eine Aufnahme der Schmelzkurve, um Auskunft über die Spezifität der PCR-Produkte zu erhalten.

Tabelle 3: **Primer der qPCR.** s: Sense Primer, as: Antisense Primer; Produktlänge in [bp]. RefSeq = Referenzsequenz.

Primer	Sequenz 5'-3'	[bp]	RefSeq
House Keeping Gen			
<i>B2M</i>	s: GATGAGTATGCCGCCGTGT as: TCGGCATCTTCAAACCTCC	104	NM_004048.4
Osteogene Differenzierung			
<i>ALPL</i>	s: AGAACCCCAAAGGCTTCTTC as: CTTGGCTTTTCCTTCATGGT	74	NM_00127501.4
<i>RUNX2</i>	s: GAGTGGACGAGGCAAGAGTT as: CTGTCTGTGCCTTCTGGGTT	127	NM_001015051.4
<i>PPARG</i>	s: CGTGGCCGCAGAAATGAC as: CACGGAGCTGATCCCAAAGT	73	NM_005037.7
<i>PHOSPHO1</i>	s: CCCCACTTTCTTACACTCCAAAC as: GCCAGAACTGGAAAACAGC	153	NM_001143804.2
<i>SMPD3</i>	s: GCAGAAGGTCCTGGAGAGTGAG as: CTGAATTCTTCCACCTCGGCCTT	180	NM_018667.4
Sonstige			
<i>PTH1R</i>	s: GGGCTGCAGATGAGGAAACT as: GGCCAGTTGTGTGTCCTG	70	NM_000316.3

Die Auswertung der qPCR Daten erfolgte mittels der Livak-Methode ($2^{-\Delta\Delta CT}$) im Microsoft Office Programm Excel. Diese Methode eignet sich für die Analyse der relativen Veränderungen der Genexpression aus quantitativen Echtzeit-PCR-Experimenten. Die Werte der untersuchten Gene wurden in Relation zum Haushaltsgen Beta-2-Mikroglobulin (*B2M*) gesetzt.

2.4.4 Proteinisolation und Konzentrationsbestimmung

Pro Probe und Zeitpunkt wurden für die Proteinernte drei Wells einer 6-Well Platte geerntet und zusammengeführt. Nach Absaugen des Mediums wurden die Zellen zwei Mal mit sterilem PBS gewaschen. Die nachfolgenden Schritte erfolgten auf Eis: Pro Well wurden 300 µl PBS und Protease Inhibitor (PI) (Protease Inhibitor Cocktail Tablets, Roche 04693116001) entsprechend den Angaben des Herstellers hinzugegeben. Die Zellen wurden mittels Zellschaber gelöst und anschließend in ein Reaktionsgefäß überführt. Das Zelllysate wurde für 5 min bei 3000 rpm (664 x g) und 4 °C zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abgenommen und das Zellpellet in 350 µl + PI resuspendiert.

Die Proben konnten bei -20 °C gelagert oder direkt sonifiziert werden. Hierfür wurden die Proben unter permanenter Eiskühlung mit 10 Impulsen und einer Intensität von 80 % lysiert, anschließend bei 14000 x g und 4 °C für 10 min zentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Bis zur Weiterverarbeitung wurden die Proben bei -20 °C gelagert.

Die Proteinkonzentrationsbestimmung erfolgte unter Verwendung des Pierce BCA Protein Assay Kits (Thermo Fisher, 23225).

Das Kit sieht vor zunächst eine Reihe von Verdünnungen mit bekannten Konzentrationen des Bovinen Serumalbumin (BSA) herzustellen, welche als Referenz für den Proteingehalt der untersuchten Proben dienen. Die Messungen erfolgten als Triplikate.

Hierfür wurden 95 µl der Arbeitslösung bestehend aus 50 Teilen BCA Reagent A und 1 Teil BCA Reagent B in eine flache 96-Well Platte (TPP, 92696) gegeben. Anschließend wurden in die Wells je 5 µl Probe bzw. 5 µl Albuminstandard gegeben. Nach 30-minütiger Inkubationszeit bei 37 °C und nachfolgender Abkühlung auf RT konnte die Absorption bei 562 nm in einem Tecan Infinite Reader gemessen werden. Anhand der Standardkurve für Albumin wurden die Proteinkonzentrationen der unbekanntenen Proben errechnet.

2.4.5 CSPD-Assay: Messung der Aktivität der AP

Das CSPD-Assay stellt eine Möglichkeit dar, die Aktivität der AP auf Proteinebene zu messen. Das CSPD ist ein Chemilumineszenz-Substrat der AP und wird von dieser durch eine enzymatische Dephosphorylierung in ein metastabiles Phenolat-Anion umgewandelt. Dieses zersetzt sich und emittiert dabei Licht, welches als Lumineszenzsignal erfasst werden kann.

Hierfür wurden die Proben in einer finalen Konzentration von 10 µg in PBS + PI eingesetzt. Um die Aktivität der TNAP gegenüber den anderen Isoformen der AP abgrenzen zu können, wurde die Gesamtprobe geteilt. Einer Hälfte wurde 1 mM Levamisol (Merck 31742- 250MG), ein spezifischer TNAP-Inhibitor, und der anderen ein entsprechendes Volumen PBS + PI hinzugefügt. Je 100 µl der Proben mit und ohne Levamisol wurden in zweifacher Ausführung in eine 96-Well µClear® Platte (Greiner Bio-One, 655094) transferiert, anschließend 100 µl CSPD ready to use Reagenz (Merck, 11755633001) hinzugefügt und die Platte vorsichtig geschwenkt. Dem folgte eine Inkubationszeit von 5 min bei 37 °C. Zuletzt wurde das Lumineszenzsignal im Tecan Infinite Reader bestimmt.

Zur Auswertung der generierten Daten wurde zunächst die Differenz aus den Mittelwerten der Lumineszenzsignale mit und ohne den Zusatz von Levamisol errechnet. Die Kontrollen der untersuchten Zeitpunkte wurden als 100 % angesetzt und die Differenzwerte der behandelten Proben darauf bezogen, um die Effekte des PTHs besser zu visualisieren.

2.4.6 ATP-Assay

ATP ist die Energiequelle aller lebender Zellen und dient der TNAP als Substrat. Dieses Assay stellt eine Möglichkeit dar, um zum einen Rückschlüsse auf die Auswirkungen der TNAP-Defizienz auf die ATP-Konzentration in entsprechenden Zelllinien zu ziehen, aber auch um Erkenntnisse bezüglich metabolischer Eigenschaften wie beispielsweise dem Wachstum zu gewinnen.

Das Reagenz CellTiter-Glo® (Promega, G7570) kann zur Quantifizierung des ATP-Gehalts verwendet werden. Dabei wird die enzymatische Reaktion der Luciferasen genutzt, deren ATP-abhängiger Zerfall zu Biolumineszenz führt. Für dieses Assay wurden pro Replikat 1000 Zellen in 25 µl Medium in eine 384-Well Platte (Greiner Bio-One, 781074) pipettiert und anschließend das gleiche Volumen des CellTiter-Glo®-Reagenz hinzugegeben, bevor das Lumineszenzsignal nach 10-minütiger Inkubationszeit bei RT an einem Tecan Infinite Reader gemessen wurde.

Anhand der ATP-Standardkurve (Bereich 0-1000 nM) wurde die Konzentration des ATPs der unbekanntenen Proben errechnet. Die Standards wurden in Duplikaten, die Proben in Triplikaten gemessen.

2.4.7 Western Blot

Zum Nachweis der gewebespezifischen AP auf Proteinlevel in den *ALPL*-defizienten Zelllinien wurden Western Blots durchgeführt.

2.4.7.1 Isolation von Proteinen und Vorbereitung der Zelllysate

Zur Durchführung des Experimentes wurde Protein aus einem Pellet von $1,0 \cdot 10^6$ Zellen isoliert. Hierfür wurde konstant auf Eis gearbeitet. Zunächst wurde das Pellet zwei Mal mit kaltem PBS gewaschen. Anschließend wurden 300 μ l Lysepuffer, bestehend aus Pierce™ RIPA Puffer (Thermo Fisher, 89900), dem Protease Inhibitor und EDTA (Thermo Fisher, 78440) im Verhältnis 10 μ l/ml zugefügt wurden, auf die Zellen gegeben. Nach 15-minütiger Inkubationszeit auf Eis, wurde das Lysat für 15 Minuten bei 10000 $\times g$ und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde daraufhin in ein neues Eppendorf-Behältnis transferiert und bei -20 °C aufbewahrt. Die Konzentration des Proteingehalts wurde mittels BCA Kit ermittelt.

Für die Auftrennung per SDS-Page der untersuchten Proteine wurden die Zelllysate 1:4 mit 5x Ladepuffer (340 mM Tris Base pH 6,8, 10 % SDS, 30 % Glycerin, 6 mg Bromphenol-blau Natriumsalz (Sigma-Aldrich, SAFSB5525-10G)) und 5 % β -Mercaptoethanol (Sigma-Aldrich 444203) versetzt und bei 95 °C für 5 min verkocht.

2.4.7.2 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Für eine semiquantitative Bestimmung der TNAP wurden die Proteine aus den Lysaten der Größe nach in einer SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt.

Zur Herstellung des Gels wurde zunächst der Gießstand zusammengebaut und anschließend auf Dichtheit überprüft. Im nächsten Schritt wurde ein 10 % Trenngel vorbereitet. Die Reagenzien wurden der Reihenfolge des untenstehenden Rezeptes (s. Tabelle 4) hinzugefügt.

Die Reagenzien APS 40 % (Ammoniumperoxodisulfat) und TEMED (Tetramethylethyldiamin) wurden jeweils kurz vor dem Gießen des Gels zugegeben.

Anschließend wurde VE-Wasser auf das Trenngel gegeben, um eine gerade Grenze zwischen Trenn- und Sammelgel gewährleisten zu können. Dieses wurde nach erfolgter Polymerisation entfernt. Folgend wurde direkt das Sammelgel vorbereitet, gegossen und der Kamm vorsichtig in das Gel eingebracht. Dabei entstehen Taschen, in denen später die Proben aufgetragen werden können.

Nach erfolgter Polymerisation wurde der Kamm aus dem Sammelgel entfernt, unpolymersierte Reste des Polyacrylamids mit 1x Laufpuffer (10x: 250 mM Tris Base

pH 6,8, 1,5 % SDS, 1,9 M Glycerin ad 1 l H₂O) ausgespült und das Gel in eine Elektrolysekammer (PeqLab) eingesetzt. Diese wurde mit 1x Laufpuffer befüllt. Anschließend wurden die vorbereiteten Proben und ein Proteinmarker (ProtLadder ProSieve QuadColor, 00193837) aufgetragen und eine Stromstärke von 25 mA bei maximaler Wattzahl und Spannung für 1 Stunde angelegt.

Tabelle 4: **Zusammensetzung der Gele für die SDS-Page.**

	Volumen	Reagenz	Zusammensetzung
Sammel- gel	1,25 ml	Upper Tris Puffer	0,5 M Tris base (Sigma T6066-5kG) 0,4 % SDS (Sigma, 74255-250G)
	0,5 ml	Acrylamid Rothiphorse Gel 30 (Roth, 3029.1)	
	3,2 ml	Wasser	
	12 µl	APS 40 % (Roth, 9592.1)	4 g APS in 10 ml H ₂ O
	12 µl	TEMED (Sigma, T9281)	
	Trenngel 10 %	2,5 ml	Lower Tris Puffer
3,3 ml		Acrylamid Rothiphorse Gel 30	
2,2 ml		Wasser	
2 ml		Glycerol (Sigma, G5516-500ml)	
14 µl		APS 40 %	
14 µl		TEMED	

2.4.7.3 Transfer

Die aufgetrennten Proteine wurden anschließend durch einen Western Blot auf eine Nitrozellulosemembran (Amersham Protran 0,2 µm NitroCellulose, 10600001) übertragen.

Für den Transfer der Proteine auf die Membran über ein Semi-Dry Verfahren wurde Whatman Filterpapier (GE Healthcare), die Membran und das Gel in 1x Transferpuffer (5x: 960 mM Glycin (Roth, 3790.1), 125 mM Tris Base, ad 1l H₂O) mit Zusatz von 20 % Methanol getränkt. Anschließend wurden je 3 Filterpapiere, gefolgt von der Membran, die dem Gel aufliegt und nochmals 3 Whatman-Filterpapieren auf die Blotting-Apparatur (Analytik Jena) aufgelegt. Der Kammer wurde für die elektrophoretische Übertragung der Proteinbanden eine Stromstärke von 1 mA/cm² Membran bei 11 - 14 V für 1 Stunde angelegt. Die Fertigstellung des Blots wurde anhand des Transfer des ProSieve[®] QuadColor Protein Marker (4.6-300 kDa, Biozym, 830537) auf die Trägerfolie überprüft.

2.4.7.4 Antikörper-Färbung und Detektion

In einem dritten Arbeitsschritt wurden die Proteine mittels spezifischer Antikörper detektiert und anschließend durch einen Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper sichtbar gemacht.

Hierfür wurden die Membranen für 2 h in 4 ml der Blockierungslösung, bestehend aus 5 % Milchpulver (Roth, T145.2) und 5 % BSA (Roche, 10735086001) in 1x TBST (1x TBS (10x: 250 mM Tris Base, 1,5 M NaCl (Roth P029.5) ad 1l H₂O) + 0,1 % Tween-20 (Sigma-Aldrich, P1379- 500ML)) auf einem Schüttler bei RT inkubiert. Nach erfolgreicher Blockierung unspezifischer Bindestellen wurden die Membranen über Nacht bei 4 °C auf einem Schüttler mit je einem der folgenden primären Antikörper inkubiert: Maus-TNAP (~80 kDa, 5 µg/ml, R&D Systems, MAB 290921, 928929) und Maus-Beta-Aktin (~45 kDa, 1:1000, Cell Signaling Technology, 3700). Nach dreimaligem Waschen für je 10 Minuten mit TBST wurden die Membranen für 1 h mit anti-Maus-IgG HRP-gebundenen Sekundärantikörper (1:1000, Cell Signaling Technology, 7076) inkubiert bevor sie erneut 3 x 10 Minuten gewaschen wurden. Zur Detektion der Proteine wurde das WesternSure[®] Premium Chemilumineszenz Substrat (Li-Cor, 926-9500) im Verhältnis 1:1 miteinander vermischt und für 5 Minuten auf die Membranen gegeben. Das resultierende Signal wurde mit dem C-DiGit[®] Blot Scanner (Li-Cor) erfasst und in der Software Image Studio visualisiert. Die Banden wurden durch optische Densitometrie unter Verwendung des Fiji-Gel-Plugin-Menüs (Version 2.1.0/1.53f) semiquantifiziert. Die Expression der einzelnen Proteine wurde mit Beta-Aktin als Ladekontrolle in Beziehung gesetzt.

2.4.8 Färbungen

2.4.8.1 Alizarin-Färbung zum Nachweis der osteogenen Differenzierung

Die Alizarinrot-Färbung eignet sich zum Nachweis der osteogenen Differenzierung und ermöglicht eine Beurteilung von Mineralablagerungen in der ECM (Gilmore et al., 1986). Der Farbstoff enthält eine Sulfonatgruppe, die unter alkalischen Bedingungen eine hohe Affinität zu Kationen wie Calcium aufweist. Nach Herauslösen der roten Farbe, kann diese quantifiziert werden und somit ein Rückschluss auf den Erfolg der osteogenen Differenzierung gezogen werden, die im Rahmen der intermittierenden PTH-Administration genauer untersucht wurde.

Nach 22 bzw. 28 Tagen Kultivierung wurde mit der Färbung begonnen. Hierfür wurden die kultivierten Zelllinien zunächst zwei Mal mit PBS gewaschen bevor sie für 1 h bei

-20 °C mit 1 ml kaltem 70 % Ethanol fixiert wurden. Anschließend wurden die Wellplatten an der Luft getrocknet und 2 x mit destilliertem H₂O (dH₂O) gewaschen. Zur Färbung wurden je 150 µl 2 % Alizarin Rot S (pH 4,2, ScienCell, 0223) auf das Well gegeben und für 15 Minuten bei RT auf einem Schüttler inkubiert. Folgend wurde die Färbelösung abgenommen und die Zellen drei Mal mit dH₂O gewaschen. Nach erfolgter Bewertung der Färbung unter dem Mikroskop, wurde das Alizarin mit 400 µl einer 10 % Cetylpyridiniumchlorid Lösung (CPC), bestehend aus 10 g CPC (Sigma, C0732) in 100 ml Natriumphosphat (pH 7,0), für 20 min auf einem Schüttler eluiert. Zur Quantifizierung wurde die Absorption in Duplikaten bei 570 nm in einem Tecan Infinite Reader gemessen. Hierfür wurden je 100 µl der Proben und des Standards, einer Verdünnungsreihe der Alizarinrot-Färbelösung, in eine 96-Well Platte mit flachem Boden aufgetragen. Anhand einer Standardkurve für Alizarin (0-1000 µg/ml) wurde die Konzentration in den Proben errechnet.

2.4.8.2 Immunzytochemische Färbung

Zur Durchführung einer Immunfluoreszenzfärbung wurden zunächst 30 000 Zellen in 24-Well Zellkulturplatten auf Glas-Coverslips (Hartenstein, DKR1) ausgesät und zwei Tage später fixiert: Nach Absaugen des Mediums wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und anschließend mit 4 % Paraformaldehyd (PFA, Morphisto, 11762.01000) fixiert. Nach 6 Minuten wurde das PFA abgenommen und erneut mit PBS gewaschen. Nach Zugabe von 1 ml PBS mit 0,1 % Azid (Sigma Aldrich, S2002-25G) pro Well konnten die Zellen für 1 Woche bei 4 °C gelagert werden.

Um den Färbeprozess fortzusetzen, mussten die Zellen ein weiteres Mal mit PBS gewaschen werden. Im nächsten Schritt wurden die Zellen mit 300 µl 0,1 % Triton-X 100 (Carl-Roth, 3051.3) in PBS für 15 Minuten bei RT permeabilisiert. Folgend wurde der Überstand verworfen und 500 µl der Blockierungslösung PBST (0,1 % Tween 20, 1 % BSA in PBS) in die Wellplatten gegeben und für 30 min bei 4 °C inkubiert. Kurz vor Beendigung der Inkubationszeit wurde die Färbelösung bestehend aus Primärantikörper in PBST angesetzt. Hierbei wurden Antikörper unterschiedlicher Spezies kombiniert. Zur Färbung der gewebeunspezifischen AP wurde ein Anti-Maus-TNAP-Antikörper (Verdünnung 1:100, Santa Cruz, sc-81754) verwendet und mit einem Anti-Kaninchen-HSP60-Antikörper (Verdünnung 1:500, Cell Signaling Technology, 12165) zum Nachweis des HSP60-Proteins kombiniert. Pro Well wurden je 85 µl Färbelösung vorbereitet. Negativkontrollen erhielten nur PBST ohne Antikörper. Die Zellen mit Primärantikörper in PBST wurden über Nacht bei 4 °C auf einer Schüttelplatte inkubiert.

Am nächsten Morgen wurde die Färbung mit drei PBS Waschschriften für je 5 min fortgesetzt. Nach dem Waschen wurden die Proben mit Sekundärantikörpern in PBST (Verdünnung 1:350, Ziege Anti-Maus efluor 488, Abcam, ab150113; Ziege Anti-Kaninchen efluor 594, Abcam, ab150080) für 1 h bei RT im Dunkeln inkubiert. In den letzten 10 Minuten der Inkubationszeit wurde den Wells DAPI (Sigma Aldrich, D9542) beigefügt, um die Zellkerne zu färben. Wells der Negativkontrolle wurden ebenfalls mit sekundärem Antikörper und DAPI behandelt. Final wurden die Wells erneut dreifach im Dunkeln mit PBS für je eine Dauer von 5 Minuten gewaschen, bevor die Coverslips auf Objektträgern (Thermo Fisher, 10748721) montiert wurden. Eine mikroskopische Inspektion erfolgte unter dem Leica DMI8 Mikroskop.

Mithilfe der Software Fiji (Version 1.0) konnten die Intensitäten der HSP60-Färbungen miteinander verglichen werden. Zur Bewertung des Anteils an TNAP-positiven Zellen wurde eine manuelle Auswertung durchgeführt. In drei exemplarisch gewählten Aufnahmen wurde die Anzahl an TNAP-positiven Zellen mit der Gesamtzellzahl in Relation gesetzt und als Prozentsatz angegeben.

2.5 Statistik

In der hier vorliegenden Arbeit wurden statistische Auswertung eigenständig mit dem Programm GraphPad Prism 9 durchgeführt. Die Daten werden als Mittelwert \pm Standardabweichung dargestellt. Da in keiner der analysierten Daten eine Normalverteilung festgestellt werden konnte, wurde der Kruskal-Wallis Test mit Dunn's Posthoc-Test angewandt. Das Signifikanzniveau wurde auf $\alpha = 0,05$ festgelegt und somit eine Fehlerwahrscheinlichkeit von 5 % in Kauf genommen. Statistische Signifikanzen sind unter den entsprechenden Abbildungen vermerkt.

3 Ergebnisse

3.1 Basale Charakterisierung der *ALPL*-defizienten dentogenen Zelllinien

Im ersten Teil dieser Arbeit lag der Schwerpunkt auf der weiteren Charakterisierung der *ALPL*-defizienten Zelllinien, die als *in-vitro*-Modell zur Erforschung der dentalen Aspekte der HPP dienen. Von besonderem Interesse war dabei, ob das CRISPR/Cas9-basierte Genediting zu Mutationen außerhalb des *ALPL*-Gens geführt hat. Darüber hinaus sollte der Phänotyp des *ALPL*-Genotyps untersucht werden. Hierfür wurden die TNAP-Expression mittels immunzytochemischer Färbung und Western Blot sowie das metabolische Profil der Zelllinien genauer analysiert.

3.1.1 Analyse von Off-Target Mutationen

Bei der Anwendung von CRISPR/Cas9 stellen Off-Target Mutationen einen limitierenden Faktor für den Einsatz dieser Methode dar. Um das Vorhandensein unkontrollierter Mutationen jenseits der Zielsequenz der beiden verwendeten crRNAs in den *ALPL*-defizienten Zelllinien auszuschließen, wurden potenzielle Off-Target Gene mit dem Online-Tool CRISPOR.org ermittelt. Die zwei crRNA Konstrukte werden im Folgenden als ALPL1 bzw. ALPL2 bezeichnet.

Für ALPL1 identifizierte das Programm insgesamt 72 Off-Target Gene, von denen sich jedoch nur neun in Exons befanden (*CRELD2*, *EML4*, *NCOR2*, *RNF168*, *SVEP1*, *TRIM42*, *TSCC1*, *WDR1* und *WDR59*). Für ALPL2 waren es insgesamt 73, wobei nur sechs (*ABCC8*, *C3orf30*, *C15orf41*, *CHCHD2P8*, *HBEGF* und *PTPRE*) in kodierenden Bereichen lagen. Sowohl für ALPL1 als auch für ALPL2 müsste die crRNA mindestens drei oder vier Basenfehlpaarungen eingehen, damit Off-Target Effekte auftreten.

Neben der hTERT PDL Zelllinie wurden die Klone 1.1, 1.2, 1.3 und 1.5 auf mögliche Off-Target Mutationen von ALPL1 bzw. WT und Klon 2.3 von ALPL2 untersucht. In den analysierten Genen *NCOR2*, *RNF168*, *SVEP1*, *TSCC1*, *WDR1* und *WDR59* wurden keine Mutationen nachgewiesen. In der Sequenzierung des Gens *CRELD2* konnte downstream der PAM-Sequenz eine heterozygote Mutation nachgewiesen werden, bei der ein Cytosin anstelle eines Thymins detektiert wurde. Ebenso ging aus der Analyse des Gens *TRIM42* upstream des PAM-Motivs eine weitere heterozygote Punktmutation hervor. Statt eines Cytosins tritt an dieser Position ein Adenin auf. Beide Mutationen

waren in der nicht-mutierten Zelllinie sowie allen Klonen nachweisbar. Repräsentativ gewählte Analyseergebnisse für ALPL1 sind in Abbildung 7 dargestellt.

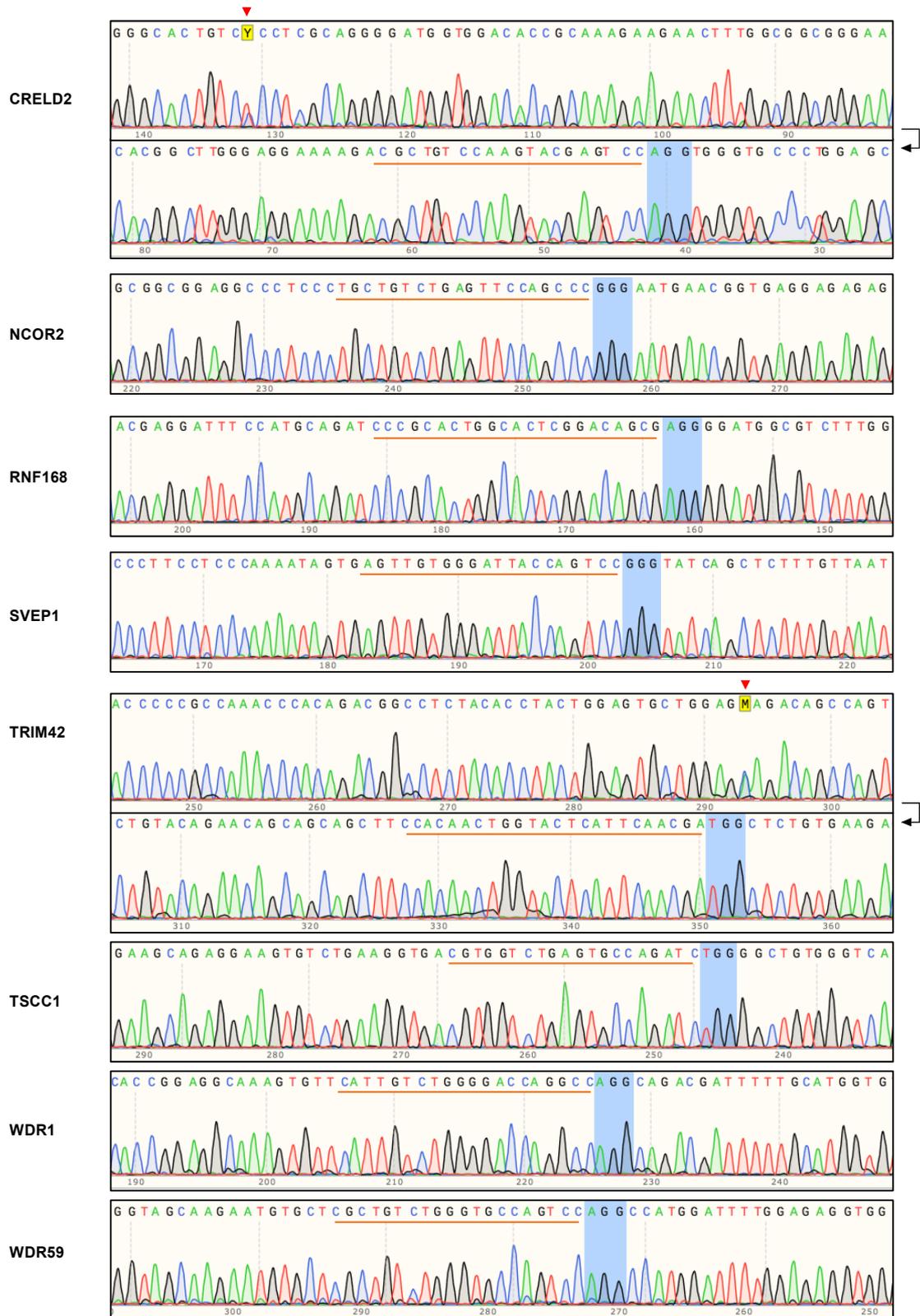


Abbildung 7: **Exemplarische Ergebnisse der Analyse kodierender Bereiche nach CRISPR/Cas9-basierter Geneditierung mit dem ALPL1 Konstrukt.** Dargestellt sind hier Ausschnitte der Sequenzierung des Klons 1.3 in 5'-3' Richtung mit hellblau hinterlegter PAM-Sequenz und orange unterstrichener Zielsequenz (entspricht Bindungsstelle der sgRNA) des entsprechenden Gens. Mutationen sind mit einem roten Pfeil markiert. Im Gen *CRELD2* und *TRIM42* wurden heterozygote Punktmutationen festgestellt, die bereits in der hTERT PDL Zelllinie zu finden war.

In den hTERT PDL Zellen, dem WT und Klon 2.3 wurden in den analysierten Genen *ABCC8*, *C3orf30*, *C15orf41* und *CHCHD2P8* keine Mutationen nachgewiesen. Aus der Untersuchung des Gens *PTPRE* ging upstream der PAM eine eindeutige heterozygote Variante hervor. Statt eines Cytosins trat an dieser Position ein Thymin auf. Die Mutation konnte ebenfalls in der nicht-mutierten hTERT PDL Zelllinie sowie dem WT und Klon 2.3 festgestellt werden (s. Abbildung 8).

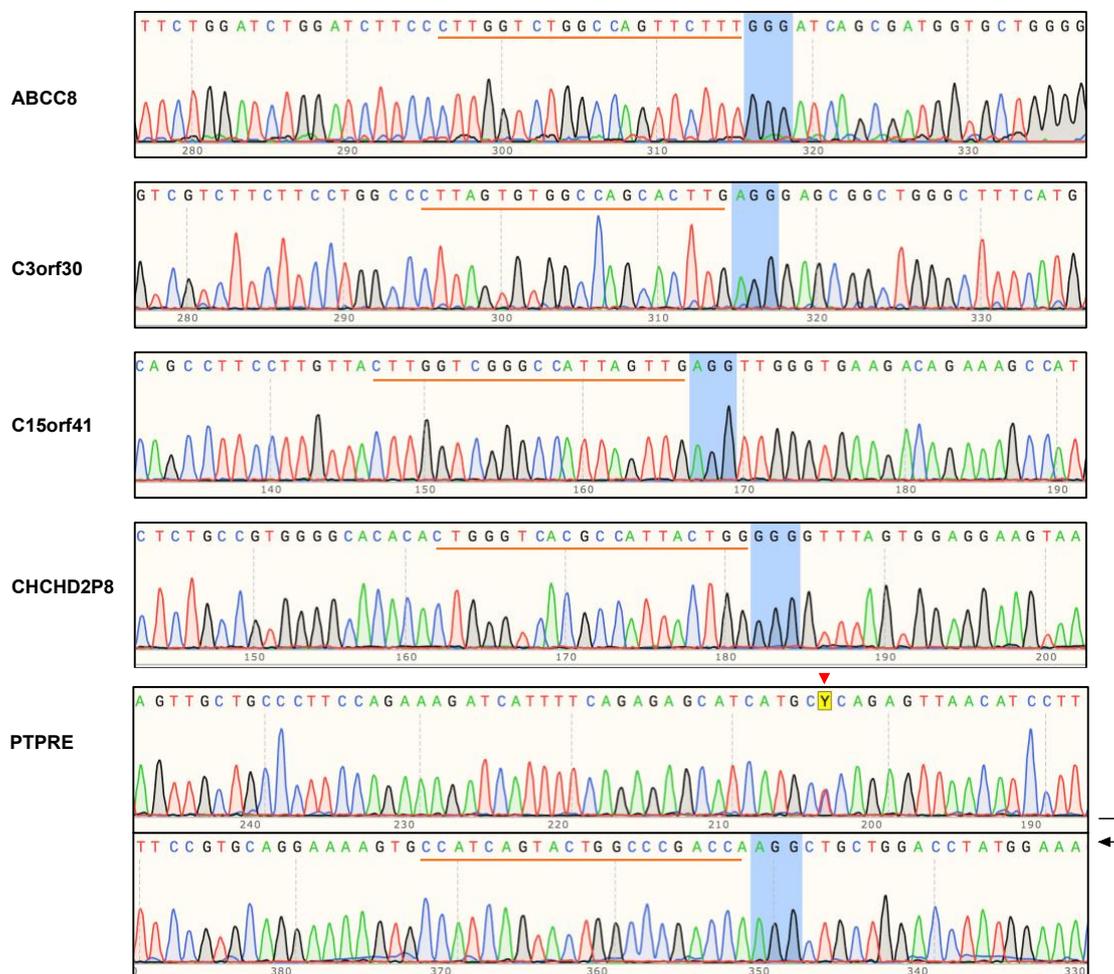


Abbildung 8: **Exemplarische Ergebnisse der Analyse kodierender Bereiche nach CRISPR/Cas9-basierter Geneditierung mit dem ALPL2 Konstrukt.** Dargestellt sind hier Ausschnitte der Sequenzierung des Klons 2.3 in 5'-3' Richtung mit hellblau hinterlegter PAM-Sequenz und orange unterstrichener Zielsequenz des entsprechenden Gens. Mutationen sind mit einem roten Pfeil markiert. Im Gen *PTPRE* wurde eine heterozygote Punktmutation in allen analysierten Zelllinien detektiert.

Anhand dieser Sequenzierungen konnte nachgewiesen werden, dass CRISPR/Cas9 keine Off-Target Effekte in den analysierten Bereichen der Zelllinien hatte. Heterozygote Punktmutationen waren bereits in der nicht mutierten hTERT PDL Zelllinie in den Genen *CRELD2*, *TRIM42* und *PTPRE* auffindbar.

Für die Gene *EML4* und *HBEGF* waren trotz erfolgreicher PCR, die durch eine klare Bande im Agarosegel bestätigt wurde, keine Sequenzdaten generierbar.

3.1.2 TNAP-Nachweis in der Immunfluoreszenzfärbung und im Western Blot

Wie und in welchem Maße die Mutation die TNAP-Expression beeinflusst, wurde anhand von Immunfluoreszenzfärbungen untersucht. Abbildung 9 zeigt deutlich, dass das Enzym ein variables Expressionsmuster aufweist.

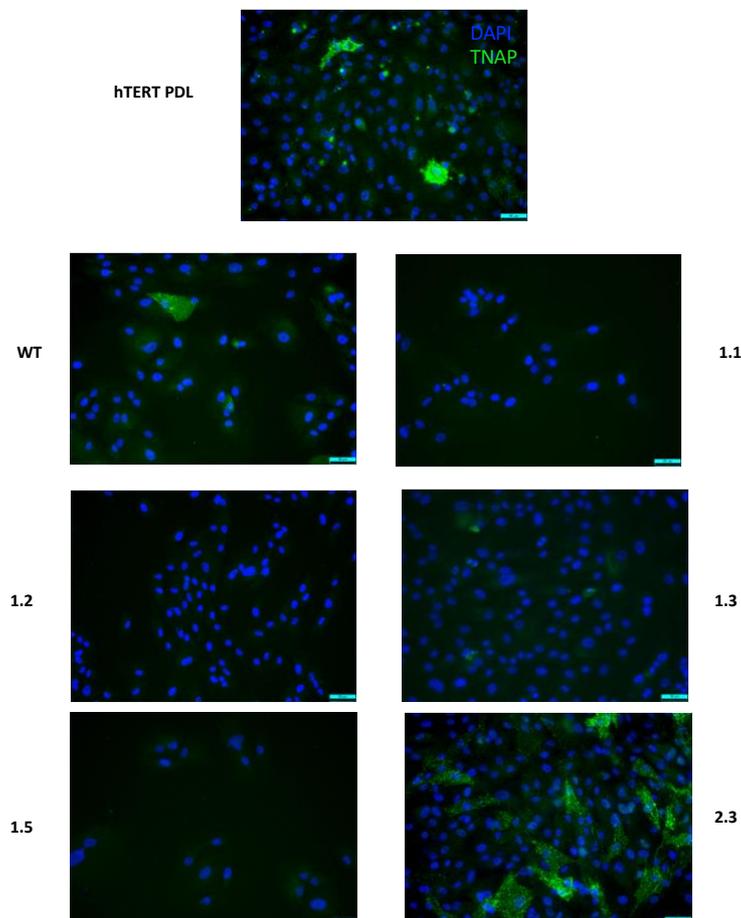


Abbildung 9: **Immunzytochemische Färbung der TNAP.** Dargestellt sind hier repräsentativ gewählte Aufnahmen, die den unterschiedlichen Anteil an TNAP-positiven Zellen (grün) in den untersuchten Zelllinien veranschaulichen sollen. Zellkerne wurden mit DAPI (blau) gegengefärbt. Klon 2.3 wies eine erhöhte Anzahl an TNAP-positiven Zellen auf. In den Klonen 1.1, 1.2, 1.3 und 1.5 konnten kein positives Signal für das Enzym festgestellt werden. Die Zellen wurden in einer 20-fachen Vergrößerung mit einem Fluoreszenzmikroskop untersucht. Der Maßstabsbalken beträgt 50 μ M.

Klon 2.3 mit einer heterozygoten Punktmutation hatte einen 7-fach erhöhten Anteil an TNAP-positiven Zellen verglichen zu den hTERT PDLs und WT (hTERT: 1,48 %; WT: 1,25 %; 2.3: 7,19 %). Bei allen anderen *ALPL*-defizienten Zelllinien mit Deletionen von einer oder mehreren Basen war basal kein positives Signal für TNAP nachweisbar.

Parallel dazu wurde eine Western-Blot Analyse zum semiquantitativen Nachweis des Enzyms durchgeführt. Das variable Expressionsmuster konnte auch im Western Blot bestätigt werden (vgl. Abbildung 10), während das Haushaltsprotein Beta-Aktin in allen Lysaten mit Ausnahme von Klon 1.2 gleichmäßig nachweisbar war. Die Feststellung, dass der Klon 2.3 eine erhöhte TNAP-Expression aufweist, wurde auch mit diesem Experiment bestätigt.

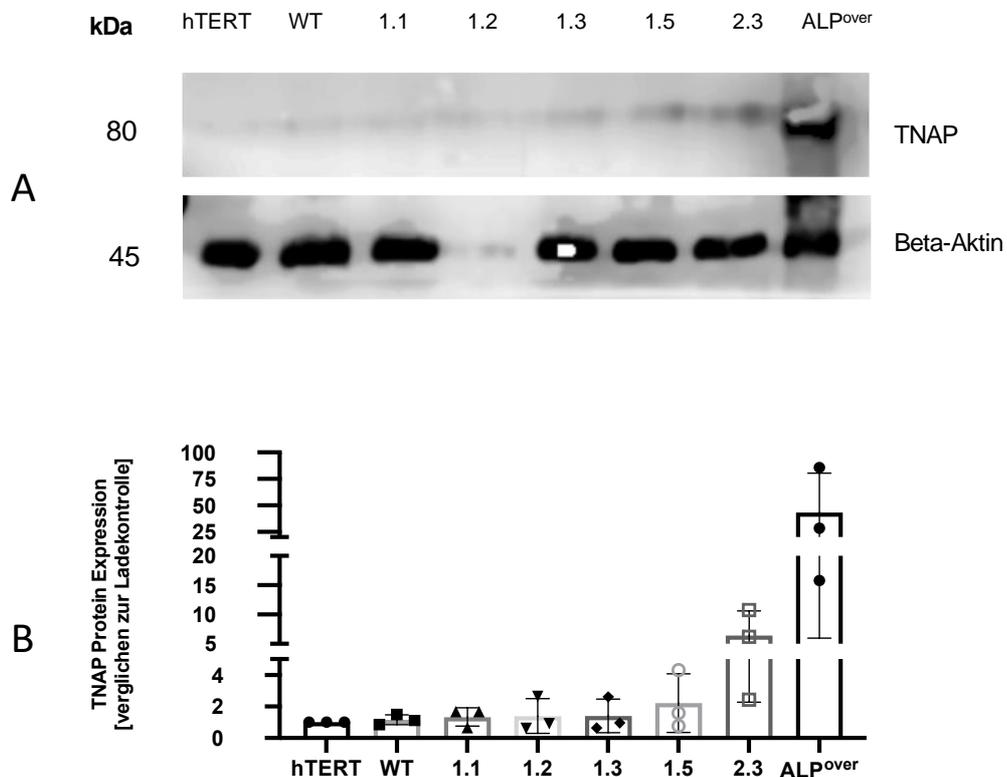


Abbildung 10: **Semiquantitativer Nachweis der TNAP im Western Blot.** A: Repräsentative Darstellung der Western Blot Ergebnisse mit Banden des Haushaltsproteins Beta-Aktin und TNAP. Es wurde jeweils eine Proteinmenge von 10 µg aufgetragen. B: Die Quantifizierung der Ergebnisse zeigt eine signifikant erhöhte Expression von TNAP im Klon 2.3. Ein Lysat einer TNAP-überexprimierenden Zelllinie (ALP^{over}) wurde als zusätzliche Kontrolle verwendet. Die Daten sind relativ zum WT dargestellt. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung. n = 3.

Auffällig war in der Analyse der Western Blot Ergebnisse, dass trotz zweifach durchgeführter Proteinisolation für Klon 1.2 nur sehr schwache Signale für fast alle untersuchten Proteine vorhanden waren. Dies zeichnete sich bereits bei der Untersuchung von Beta-Aktin ab und wurde für zusätzliche Targetproteine (Alpha-Tubulin und TOMM20), die hier jedoch nicht dargestellt werden, bestätigt. Interessanterweise war dies bei mitochondrialen Extrakten aus diesem Klon nicht der Fall.

3.1.3 Wachstumsverhalten

Bei der basalen Charakterisierung von Zellen mit TNAP-Mangel wurde mit Ausnahme von Klon 1.5 eine konstante Populationsverdopplung festgestellt. Pro Tag verdoppelten sich die Zelllinien um das 1,1- bis 1,6-fache. Das Wachstumsverhalten von Klon 1.5 war signifikant reduziert. Mit Ausnahme des Klons 1.2 konnte für alle anderen *ALPL*-defizienten Zelllinien ein ähnlicher Trend beobachtet werden.

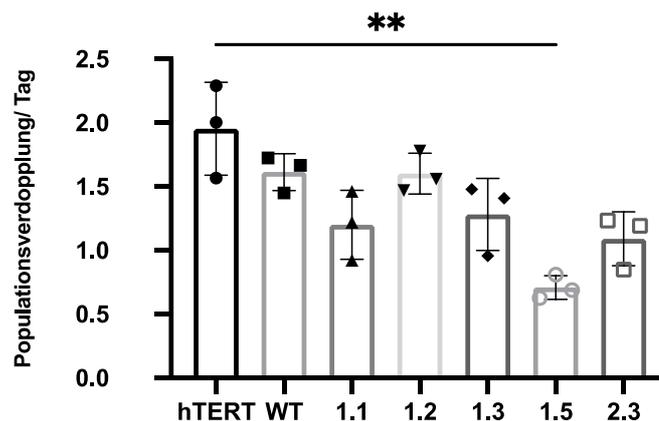


Abbildung 11: **Populationsverdopplung/Tag**. Mit Ausnahme der Zelllinie 1.5 ist das Wachstumsverhalten konstant. Das Wachstumsverhalten von Klon 1.5 ist signifikant reduziert. (**) $p < 0,01$. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung. $n = 3$.

3.1.4 Messung des intrazellulären ATP-Gehalts

Um die Auswirkungen des TNAP-Mangels auf den ATP-Spiegel zu untersuchen, wurde dieser mittels CellTiter-Glo®-Assay bestimmt. Verglichen mit der hTERT PDL Zelllinie zeichnete sich in den Klonen 1.2, 1.3 und 1.5 ein abnehmender Trend bezüglich intrazellulärem ATP-Gehaltes (hTERT: 1.0 vs. 0.38 ± 0.2 , 0.35 ± 0.25 und 0.39 ± 0.18) ab.

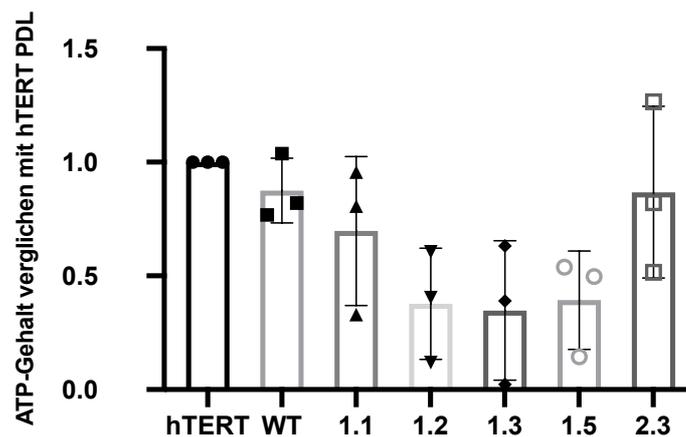


Abbildung 12: **Messung des intrazellulären ATP-Gehalts.** Der Graph zeigt das ATP-Level der Zelllinien verglichen zur hTERT PDL Zelllinie. Die Klone 1.2, 1.3 und 1.5 weisen einen reduzierten intrazellulären ATP-Gehalt auf. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung. n = 3.

3.1.5 Immunzytochemischer Nachweis von HSP60

Bei der Basalanalyse der Klone fiel auf, dass TNAP-defiziente Zellen neben einer verlangsamten Populationsverdopplung (s. Abbildung 11) auch einen reduzierten Trend des intrazellulären ATP-Gehaltes (s. Abbildung 12) aufzeigen. Zum besseren Verständnis des metabolischen Profils wurde daher eine immunzytochemische Färbung von HSP60 als Mitochondrienmarker durchgeführt. Die Färbung des Chaperons erlaubte somit Rückschlüsse auf die mitochondriale Verteilung in den Zellen.

Die Zelllinien zeigten in der immunzytochemischen Färbung (s. Abbildung 13) unterschiedliche Signale für HSP60. Hinsichtlich der Anwesenheit des mitochondrialen Markers pro Fläche war lediglich das Signal in Klon 2.3 mit einer Punktmutation im *ALPL*-Gen signifikant erhöht. Im Hinblick auf die hTERT PDL Zelllinie zeigten der Wildtyp und alle transgenen Zelllinien in der Gegenüberstellung der Analyse einen ansteigenden Trend in der Signalintensität pro Fläche (vgl. Abbildung 14).

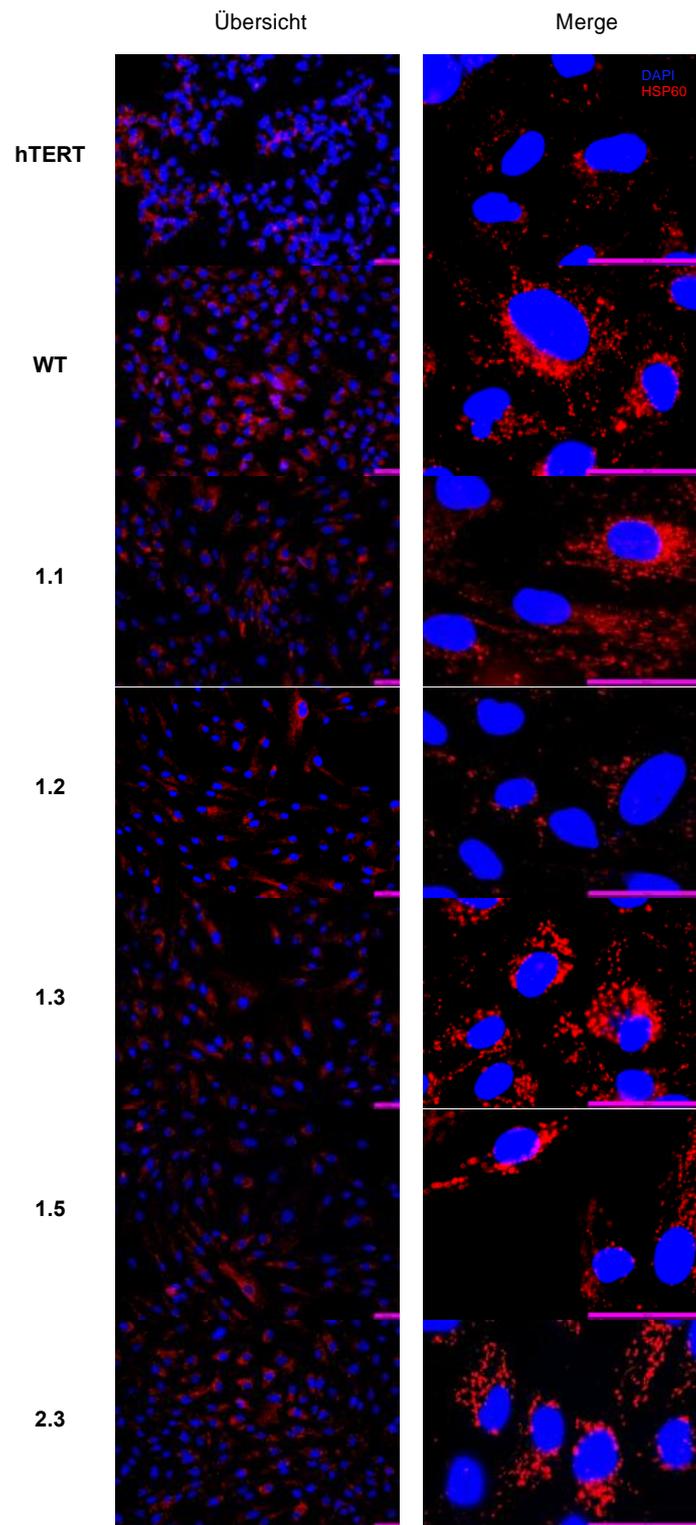


Abbildung 13: **Immunzytochemische Färbung des HSP60**. Dargestellt sind Färbungen von HSP60 durch indirekte Immunfluoreszenz mit Anti-Kaninchen-HSP60-Antikörper und Anti-Kaninchen-eFluor594-Sekundärantikörper (rot), während alle Zellkerne mit DAPI (blau) gegengefärbt wurden. Die Zelllinien zeigen in der Färbung unterschiedliche Signale für HSP60. Gegenübergestellt sind hier eine 20-fache und eine 50-fache Vergrößerung. Die Zellen wurden mit einem Fluoreszenzmikroskop untersucht. Der Maßstabsbalken beträgt 50 μm .

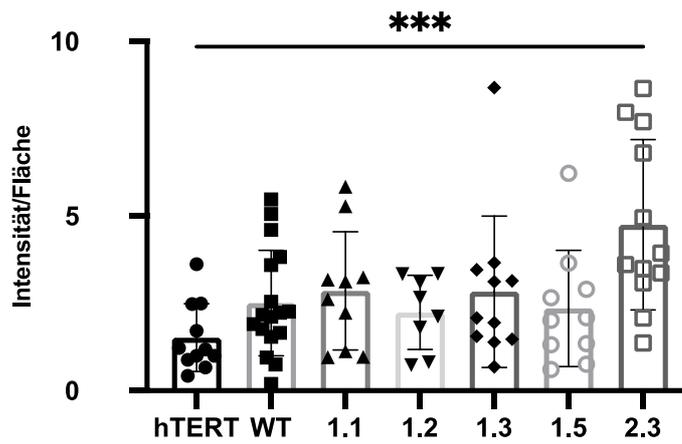


Abbildung 14: **HSP60-Quantifizierung.** Die Quantifizierung zeigt bezüglich der Präsenz des mitochondrialen Markers HSP60 pro gemessener Fläche ein signifikant erhöhtes Signal für Zelllinie 2.3. (***) $p < 0,001$. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung.

3.2 Vorversuche in PDLSCs zur Etablierung der PTH-Protokolle

Das Ziel dieser Arbeit war es, die Einflüsse des PTH auf *ALPL*-defiziente Zelllinien genauer zu untersuchen. In der Literatur wurde bereits über positive Auswirkungen des Hormons auf die *ALPL*-Genexpression und Proteinaktivität der TNAP berichtet: In einer Studie von Houston et al. führte die ein- bis sechsstündige Stimulation mit PTH zu einer Hochregulation des *ALPL*-Gens in einer murinen Osteoblasten-Zelllinie (Houston et al., 2016). Eine gesteigerte Genexpression von *ALPL* und Enzymaktivität als Reaktion auf eine kontinuierliche PTH-Exposition wurde auch in PDLSCs nachgewiesen (Wolf et al., 2013). Eine bessere Ergründung molekularbiologischer Mechanismen könnten daher Ansatzpunkte für neue Therapien der HPP liefern.

Um einzuschätzen, ob und inwieweit Veränderungen in der Genexpression und auf Proteinniveau in Zellen ohne Mutation im *ALPL*-Gen auftreten, wurde zunächst in Vorversuchen die Reaktion von PDLSCs auf das Hormon untersucht. Hierfür wurden Genexpressionsanalysen durchgeführt, die TNAP-Aktivität bestimmt und Färbungen zum Nachweis der osteogenen Differenzierung eingesetzt. Letztere und die Genexpression im Langzeitversuch mit PTH wurden lediglich exemplarisch durchgeführt ($n = 1$), weswegen diese Vorversuche nur als grobe Einschätzung gewertet werden können.

3.2.1 Kurzzeiteffekte in den PDLSCs

Um die kurzfristigen Auswirkungen von PTH zu untersuchen, wurden die Zellen mit 10 nM bzw. 50 nM PTH behandelt und Proben 1 h, 3 h und 6 h nach der Stimulation gesammelt.

3.2.1.1 Genexpressionsanalysen

Für die Genexpressionsbestimmung von *ALPL*, *SMPD3*, *PHOSPHO1*, *PTH1R*, *RUNX2* und *PPARG* wurden die Ergebnisse der qPCR mittel $2^{-\Delta\Delta ct}$ Methode analysiert. Die Veränderungen der Expression, normalisiert zum Haushaltsgen *B2M*, wurden zu den Zeitpunkten 1 h, 3 h und 6 h untersucht. Um die Einflüsse des Parathormons besser hervorzuheben, wurden diese zusätzlich in Relation zur Kontrolle des jeweiligen Zeitpunktes gesetzt. .

fasst die Ergebnisse der qPCR-Analysen zusammen.

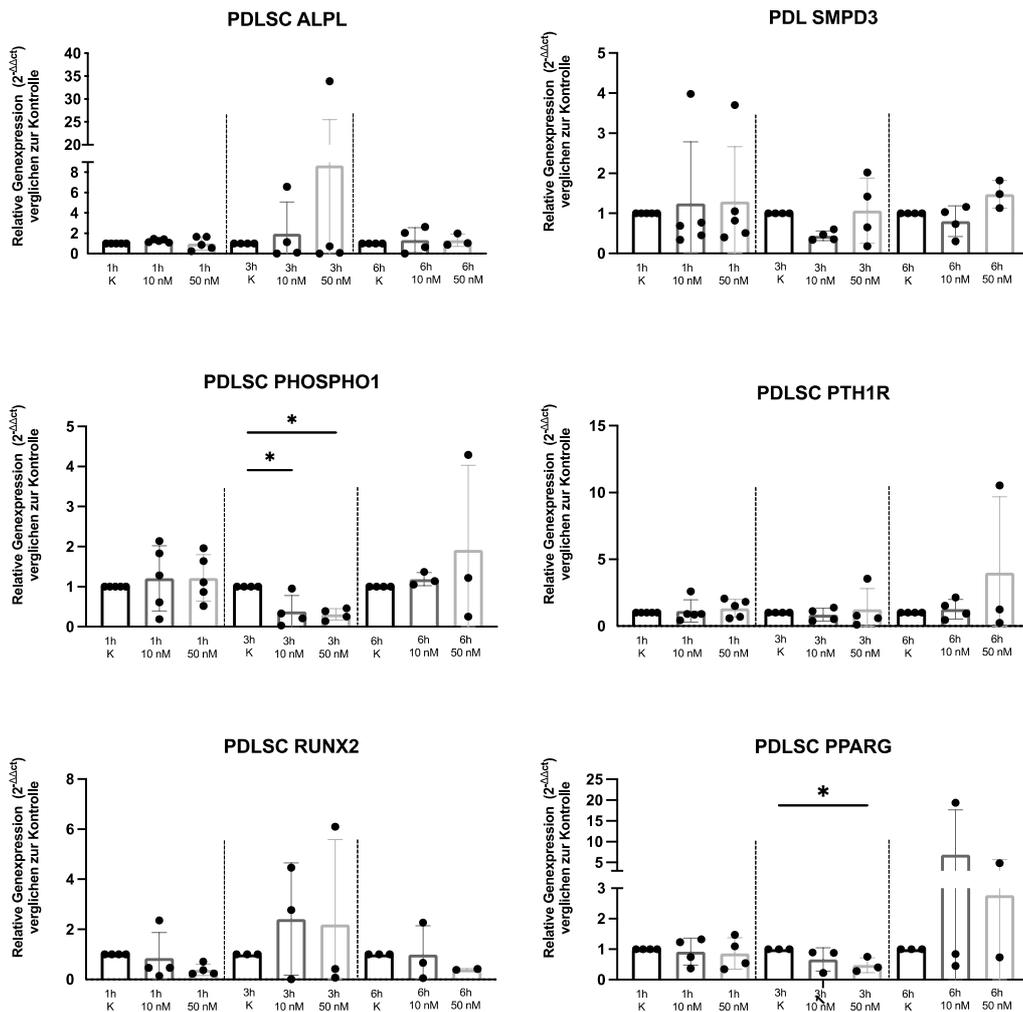


Abbildung 15: **Relative Genexpression unmittelbar nach PTH-Stimulation in PDLSCs.** Die Proben wurden zur Kontrolle an den jeweiligen Zeitpunkten normalisiert. Da die Daten aufgrund der kleinen Gruppenzahl nicht normalverteilt sind, wurde die Statistik mit dem Kruskal-Wallis mit dem Dunn's Posthoc-Test berechnet. (*) $p < 0,05$. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung. $n = 4-5$.

In den PDLSCs war nur bei einem Spender nach 3 Stunden und der Zugabe von 10 nM bzw. 50 nM PTH eine Steigerung der Expression von *ALPL* feststellbar. Zu den übrigen Zeitpunkten war die Expression in den PTH-Gruppen im Vergleich zur Kontrolle konstant.

Die Zugabe von PTH hatte keinen Einfluss auf das Expressionsmuster von *SMPD3*. Lediglich nach 1 h und dem Zusatz von 10 nM PTH wurde das Gen tendenziell herunterreguliert.

Das Gen *PHOSPHO1* zeigte nach 1 h keine Veränderung in der Expression. Nach 3 Stunden konnte eine signifikante Herunterregulierung sowohl bei Zugabe von 10 nM als auch bei 50 nM PTH im Vergleich zur Kontrolle festgestellt werden. Nach 6 Stunden stieg die Expression in diesen Proben verglichen zum vorherigen Zeitpunkt wieder an. Die Expression des *PTH1R*-Gens wurde durch die Zugabe von Parathormon verglichen zur Kontrolle der jeweiligen Untersuchungszeitpunkte nicht beeinflusst. Der Zusatz von PTH beeinflusste verglichen zur Kontrolle auch kaum die Expression der frühen Marker für osteogene und adipogene Differenzierung in den PDLSCs. Der osteogene Marker *RUNX2* wird tendenziell nach 3 h durch PTH hochreguliert, hingegen wird *PPARG* nach 3 h signifikant herabreguliert.

3.2.1.2 Bestimmung der TNAP-Aktivität mittels CSPD-Assay

Neben der Analyse der Genexpression von *ALPL* wurde auch die Aktivität der TNAP wenige Stunden nach PTH-Stimulation in den PDLSCs mittels CSPD-Assay untersucht. Hierfür wurde jede Probe mit und ohne den Zusatz des TNAP-spezifischen Inhibitors Levamisol analysiert. Zu allen Zeitpunkten konnte hierdurch eine Aktivitätsminderung erreicht werden, was aufzeigt, dass ein Großteil der Enzymaktivität auf die TNAP zurückzuführen ist. Aus den generierten Daten wurde eine Differenz berechnet und diese anschließend zur Kontrolle normiert. Pro Zeitpunkt wurden Zellen von 4-5 verschiedenen Spendern analysiert.

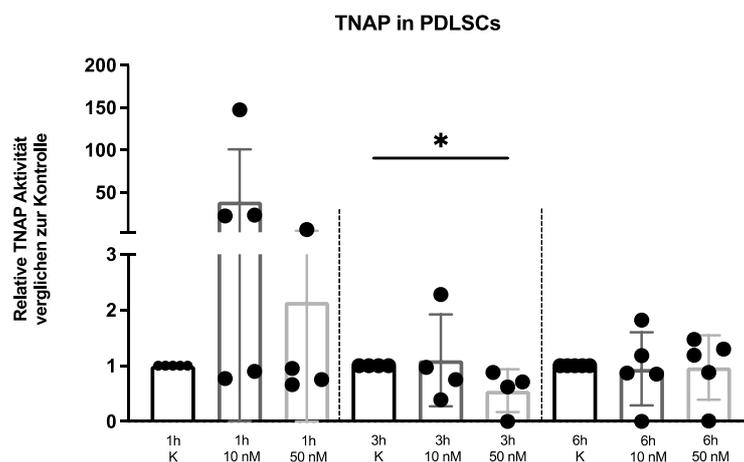


Abbildung 16: **Messung der TNAP-Aktivität mittels CSPD-Assay wenige Stunden nach PTH-Exposition.** Dargestellt ist hier Differenz des Lumineszenzsignals der Proben mit und ohne den Zusatz von Levamisol. Die Proben wurden zur unbehandelten Kontrolle an den jeweiligen Zeitpunkten normiert. Die Aktivität des Enzyms wurde zum Zeitpunkt 3 h bei Zugabe von 50 nM PTH signifikant verringert. Die Statistik wurde aufgrund keiner Normalverteilung der Proben mit dem Kruskal-Wallis mit dem Dunn's Posthoc-Test berechnet. (*) $p < 0,05$. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung. $n = 4-5$.

Im Graph (s. Abbildung 16) wird ersichtlich, dass die Zugabe von 10 nM PTH die Aktivität des Enzyms nach 1 h in einigen Donoren steigerte. An den Zeitpunkten 3 h und 6 h bewirkte die PTH-Stimulation keinen positiven Effekt auf das Enzym. Nach 3 h und Zusatz von 50 nM PTH wurde die TNAP auf Proteinniveau sogar signifikant herunterreguliert.

3.2.2 Funktionelle Veränderungen durch intermittierende PTH-Stimulation

Basierend auf den Ergebnissen des Kurzzeitversuchs war auch von Interesse, ob die intermittierende Zugabe von 50 nM PTH während mehreren 48-Stunden-Zyklen zu funktionellen Veränderungen in der *ALPL*-Genexpression führt.

3.2.2.1 Genexpressionsanalyse von *ALPL*

Die Genexpression von *ALPL* wurde an den Tagen 0, 8, 12 und 22 untersucht. Dargestellt ist in Abbildung 17 die relative Expression verglichen zu Tag 0 mit und ohne dem Zusatz von PTH. Durch die intermittierende Stimulation mit PTH (s. 2.2.5.2) wurde die *ALPL*-Genexpression in den PDLSCs beeinflusst: Verglichen zur Kontrolle stieg das Expressionslevel bis zum Tag 8 auf das 46-fache an, normalisierte sich annähernd an Tag 14 und stieg an Tag 22 erneut an.

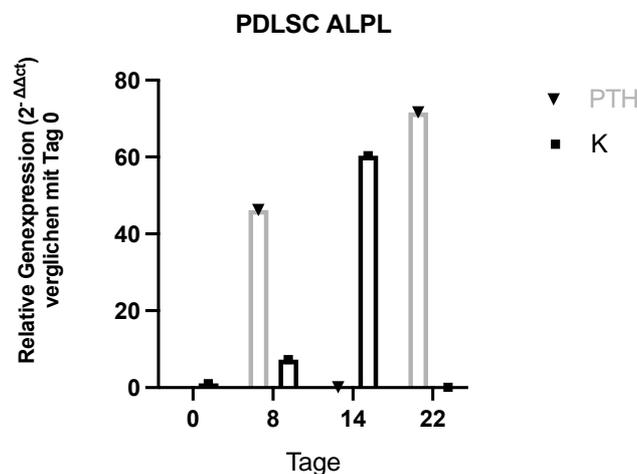


Abbildung 17: **Relative Genexpression von *ALPL* im Langzeitversuch mit PTH in den PDLSCs.** Die Ergebnisse wurden verglichen mit Tag 0 dargestellt. n = 1.

3.2.2.2 Osteogene Differenzierung der PDLSCs

In der Literatur wurde bereits mehrfach beschrieben, dass Stammzellen aus dentalen Geweben die Fähigkeit besitzen osteogen zu differenzieren (Seo et al., 2004, Li et al.,

2010, Melms et al., 2020). Ob dies durch die intermittierende Zugabe von PTH zusätzlich beeinflusst werden kann, wurde in dem folgenden Experiment exemplarisch untersucht. In der Gegenüberstellung der Ergebnisse, die in Abbildung 18A dargestellt sind, wird sowohl nach 22 und 28 Tagen ersichtlich, dass die PDLSCs lediglich in Gruppe B (osteogenes Medium) und C (osteogenes Medium ohne Dexamethason) erfolgreich differenziert sind. Dies weist darauf hin, dass eine erfolgreiche Mineralisierung nur mit osteogenem Medium möglich ist. Bei Kultivierung der Zellen mit osteogenem Medium aber ohne Zusatz von Dexamethason lösten sich die Zellen bereits vorzeitig ab (Abbildung 18A Abschnitt C). Dies zeichnete sich bereits nach 22 Tagen für beide untersuchten Gruppen ab und verstärkte sich, insbesondere in der PTH-Gruppe, bis zu Tag 28 der Differenzierung.

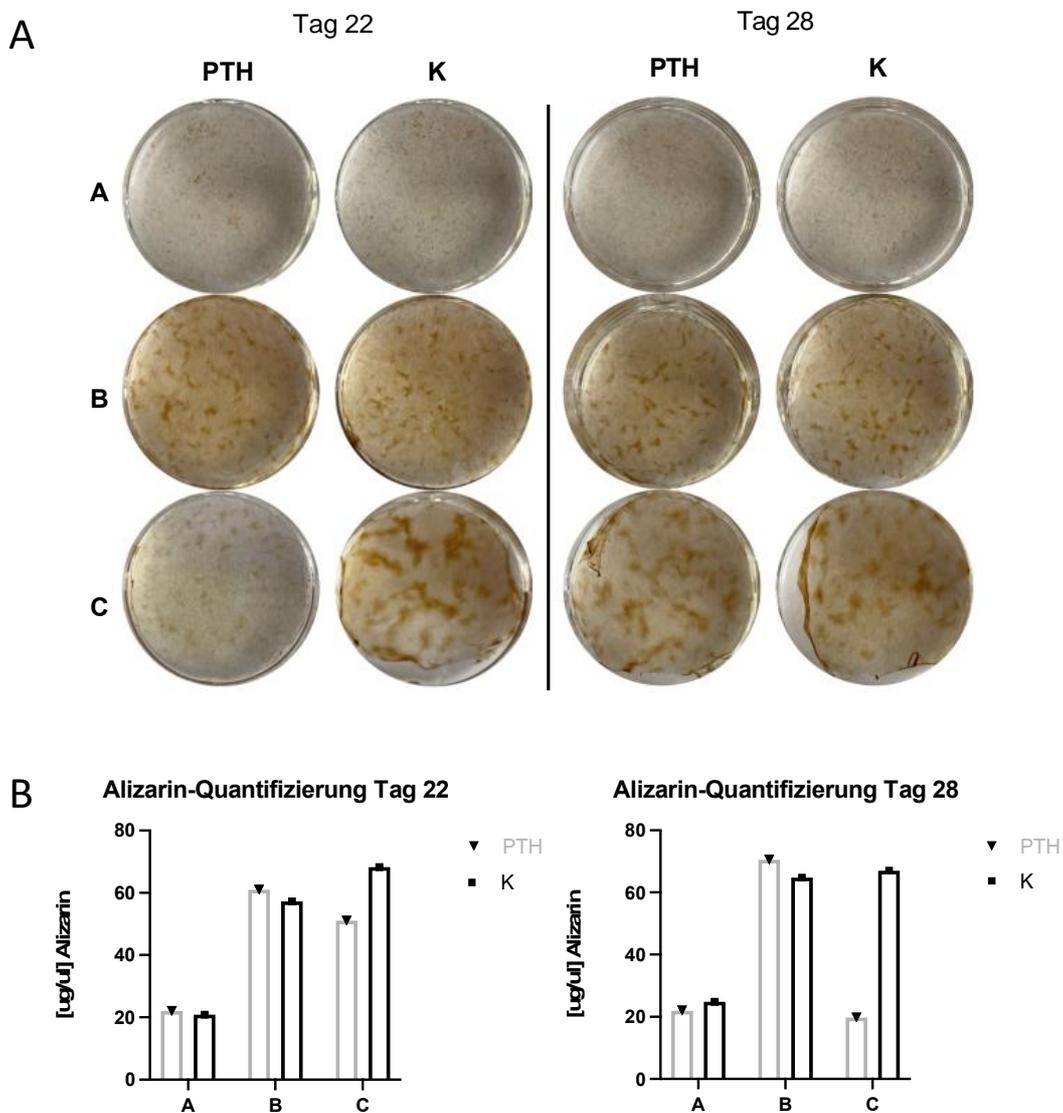


Abbildung 18: **Alizarin Färbung zum Nachweis der osteogenen Differenzierung bei Anwesenheit von PTH.** A: Makroskopische Darstellung der Differenzierung mit und ohne den Zusatz von PTH an Tag 22 und 28. (A: Basismedium, B: Osteogenes Medium, C: Osteogenes Medium ohne Zusatz von Dexamethason). B: Die Quantifizierung von Alizarin zeigt keine deutlichen Unterschiede zwischen PTH- und Kontroll-Gruppe. Bei den abgebildeten Werten handelt es sich um errechnete Mittelwerte aus drei parallelen Replikaten. n = 1.

Durch die Zugabe von PTH wurde die Ablagerung von Calciumphosphatkristallen nicht beeinflusst. Dies wird zum einem aus der makroskopischen Übersicht aber auch in der Quantifizierung (vgl. Abbildung 18B) der Färbung ersichtlich. Die einzige Ausnahme stellt Tag 22 in Gruppe C dar. Dieser Trend zwischen PTH- und Kontrollgruppe ergab sich jedoch durch das vorzeitige Ablösen der Zellen.

3.3 Auswirkung der PTH-Stimulation auf die *ALPL*-defizienten Zelllinien

Als zentrale Fragestellung dieser Arbeit wurde untersucht, wie PTH die *ALPL*-Genexpression bzw. die TNAP-Aktivität der transgenen Zelllinien mit Mutationen im *ALPL*-Gen beeinflusst. Hierfür wurden die Klone 1.1, 1.2, 1.3, 2.3 mit einem nicht-mutierten WT und der hTERT PDL Zelllinie hinsichtlich der Genexpression, der TNAP-Aktivität einschließlich der osteogenen Differenzierungskapazität verglichen. Aufgrund der verlangsamten Populationsverdopplung der Zelllinie 1.5 konnten die qPCR-Analysen sowie das CSPD-Assay für diesen Klon nicht durchgeführt werden.

3.3.1 Kurzzeiteffekte in den *ALPL*-defizienten Zelllinien

Basierend auf den Ergebnissen der Kurzzeitexperimente mit PDLSCs wurden die PTH-Protokolle auf die Zelllinien mit Mutationen im *ALPL*-Gen übertragen. Abbildung 6A visualisiert die PTH-Stimulation zur Untersuchung der kurzfristigen Auswirkungen des Hormons nach 0 h, 1 h, 3 h und 6 h.

3.3.1.1 Genexpressionsanalysen

Für die Genexpressionsanalysen wurden die Ergebnisse der qPCRs für *ALPL*, *PHOSPHO1*, *SMPD3* und *PTH1R* mit der Livak-Methode ($2^{-\Delta\Delta CT}$) im Vergleich zur Kontrolle zu jedem Zeitpunkt ausgewertet. Die Ergebnisse der qPCR sind graphisch in den Abbildungen 19-22 dargestellt.

Für *ALPL* wurde das Expressionsniveau im Verlauf der Stimulation mit PTH weder in der hTERT PDL Zelllinie noch in den *ALPL*-defizienten Zelllinien signifikant gesteigert. 3 h nach der Exposition gab es einen ansteigenden, jedoch nicht signifikanten Trend in der hTERT PDL Zelllinie, Klon 1.1 und 1.2 vergleichen zur Kontrolle. Klon 1.3 zeigte verglichen zur Kontrolle nach 1 h und einer PTH-Exposition von 10 nM eine signifikante Reduzierung der *ALPL*-Genexpression. Für den Klon 2.3 war ein ansteigender Trend bei 1 h und 10 nM bzw. bei 3 h und 50 nM PTH-Zugabe erkennbar.

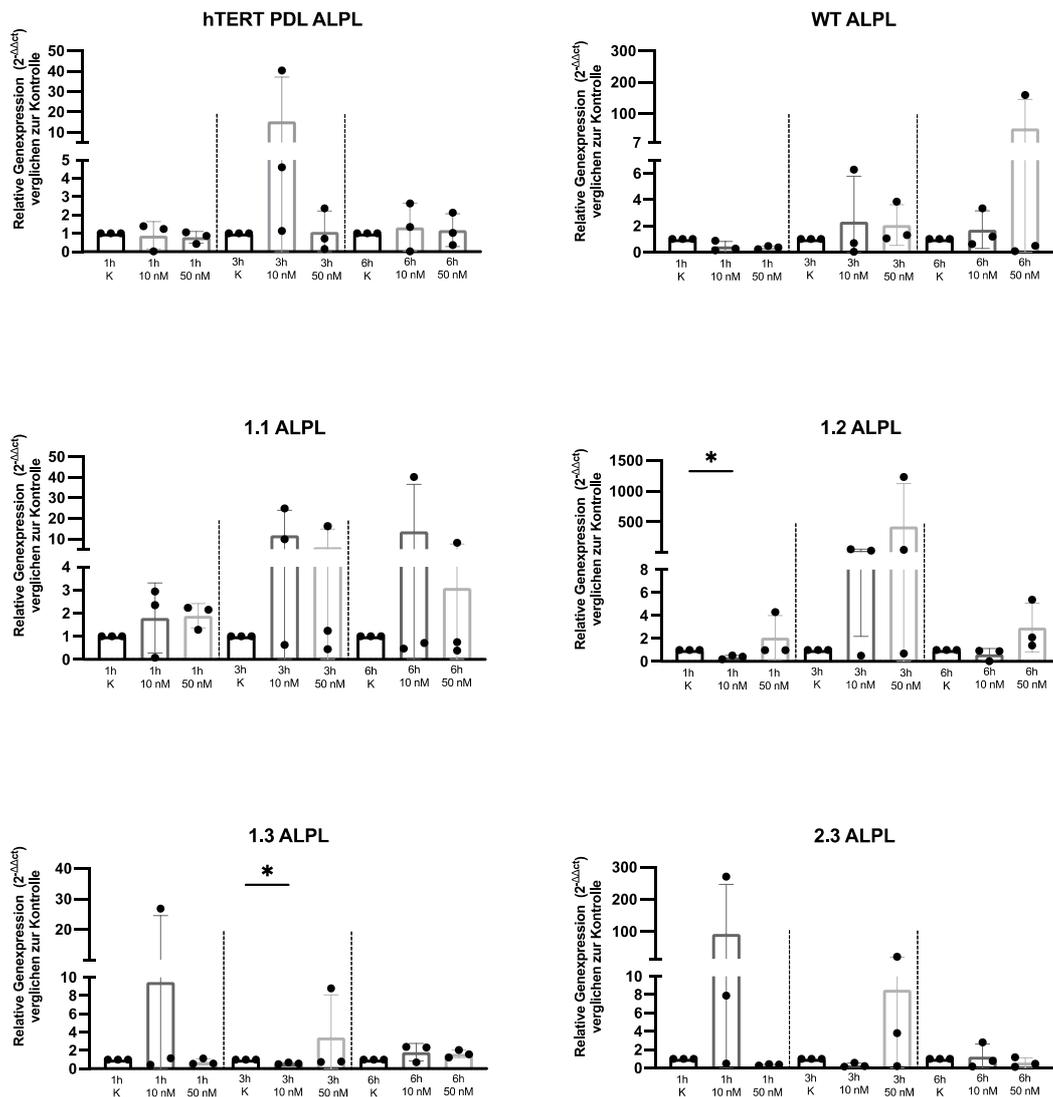


Abbildung 19: Relative Genexpression von **ALPL** nach PTH-Stimulation in **ALPL**-defizienten Zelllinien nach 1 h, 3 h und 6 h. Die Proben wurden zur Kontrolle des jeweiligen Zeitpunkts normiert. Aufgrund der verlangsamten Populationsverdopplung der Zelllinie 1.5 konnte die qPCR-Analyse für diesen Klon nicht durchgeführt werden. Die Statistik wurde aufgrund fehlender Normalverteilung der Proben mit dem Kruskal-Wallis mit dem Dunn's Posthoc-Test berechnet. (*) $p < 0,05$. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung. $n = 3$.

Das Expressionsmuster von *PHOSPHO1* wurde zu keinem der untersuchten Zeitpunkte signifikant durch PTH beeinflusst. Es konnte kein einheitliches Expressionsmuster unter den Klonen festgestellt werden.

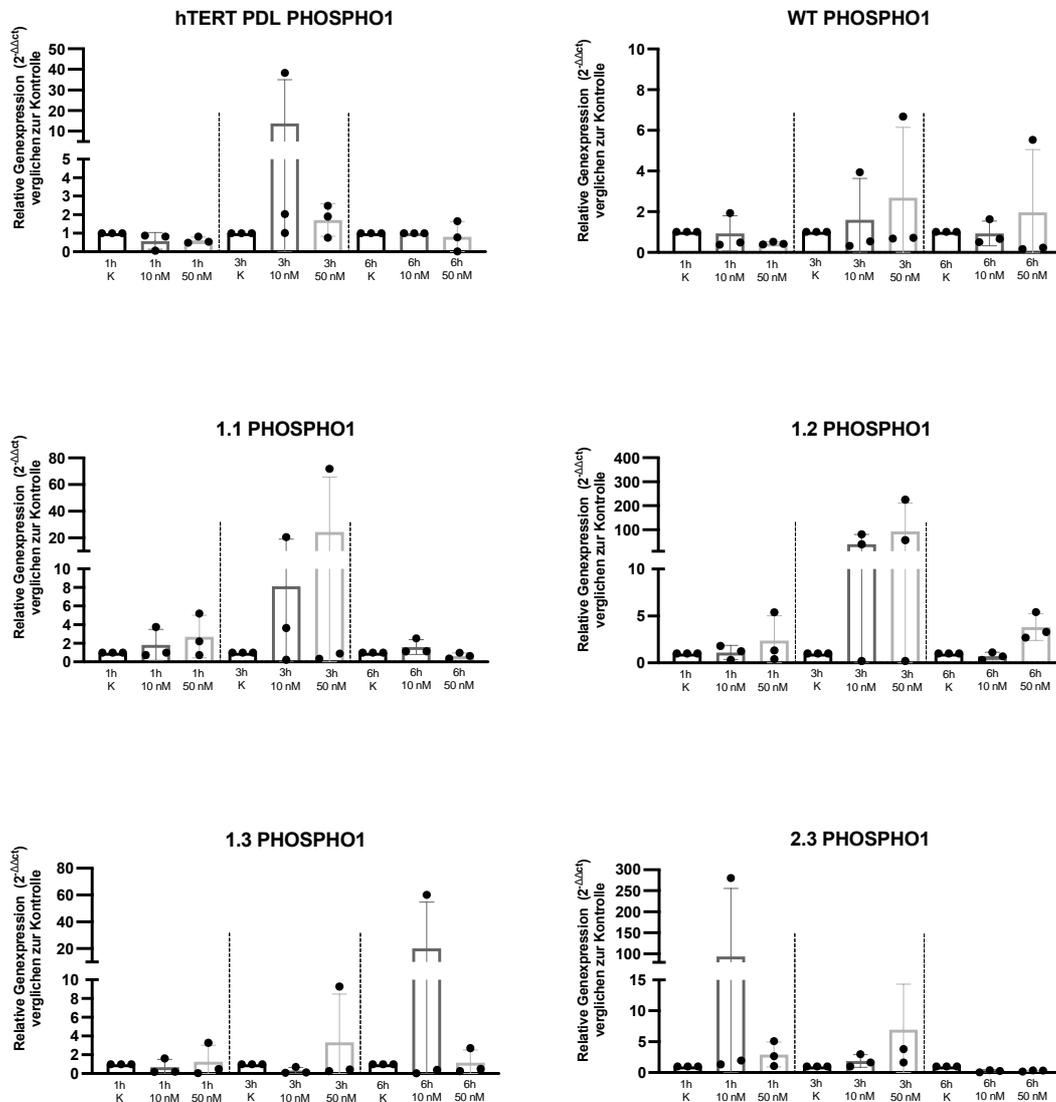


Abbildung 20: Relative Genexpression von *PHOSPHO1* nach PTH-Stimulation in *ALPL*-defizienten Zelllinien nach 1 h, 3 h und 6 h. Die Proben wurden zur Kontrolle des jeweiligen Zeitpunkts normiert. Aufgrund der verlangsamten Populationsverdopplung der Zelllinie 1.5 konnte die qPCR-Analyse für diesen Klon nicht durchgeführt werden. Die Statistik wurde aufgrund fehlender Normalverteilung der Proben mit dem Kruskal-Wallis mit dem Dunn's Posthoc-Test berechnet. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung. n = 3.

Auch die Genexpression von *SMPD3* zeigte zu keinem der untersuchten Zeitpunkte eine signifikante Beeinflussung bei Stimulation mit PTH. Bezüglich des Expressionsmuster konnte auch hier kein einheitlicher Trend festgestellt werden.

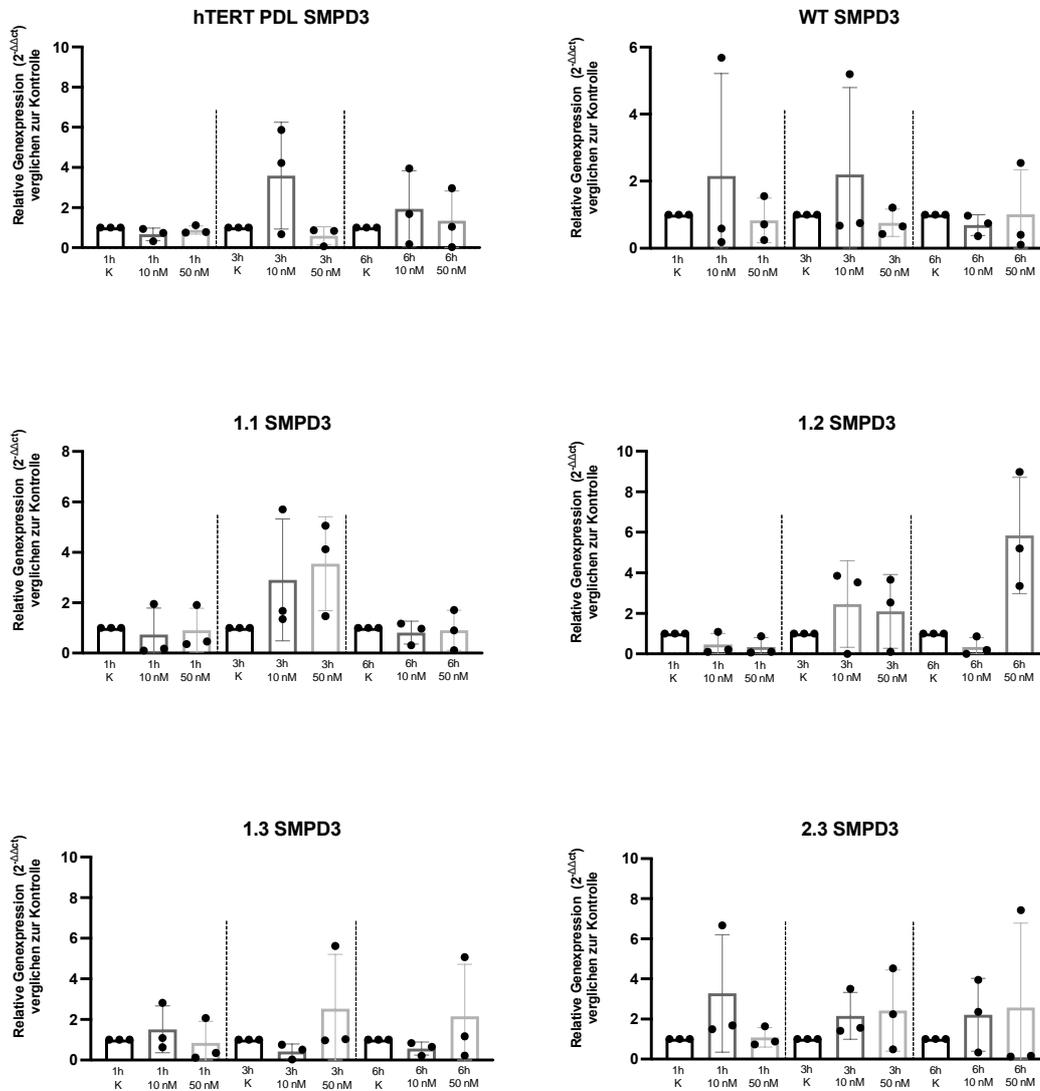


Abbildung 21: Relative Genexpression von *SMPD3* nach PTH-Stimulation in *ALPL*-defizienten Zelllinien nach 1 h, 3 h und 6 h. Die Proben wurden zur Kontrolle des jeweiligen Zeitpunkts normiert. Aufgrund der verlangsamten Populationsverdopplung der Zelllinie 1.5 konnte die qPCR-Analyse für diesen Klon nicht durchgeführt werden. Die Statistik wurde aufgrund fehlender Normalverteilung der Proben mit dem Kruskal-Wallis mit dem Dunn's Posthoc-Test berechnet. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung. n = 3.

Die Expression des *PTH1R* blieb unmittelbar nach PTH-Exposition konstant. Nach 6 h und Behandlung mit 10 nM PTH in der hTERT Zelllinie bzw. nach 6 h und bei einer Stimulation mit 50 nM PTH in Klon 1.2 war eine leichte signifikante Steigerung in der Genexpression erkennbar.

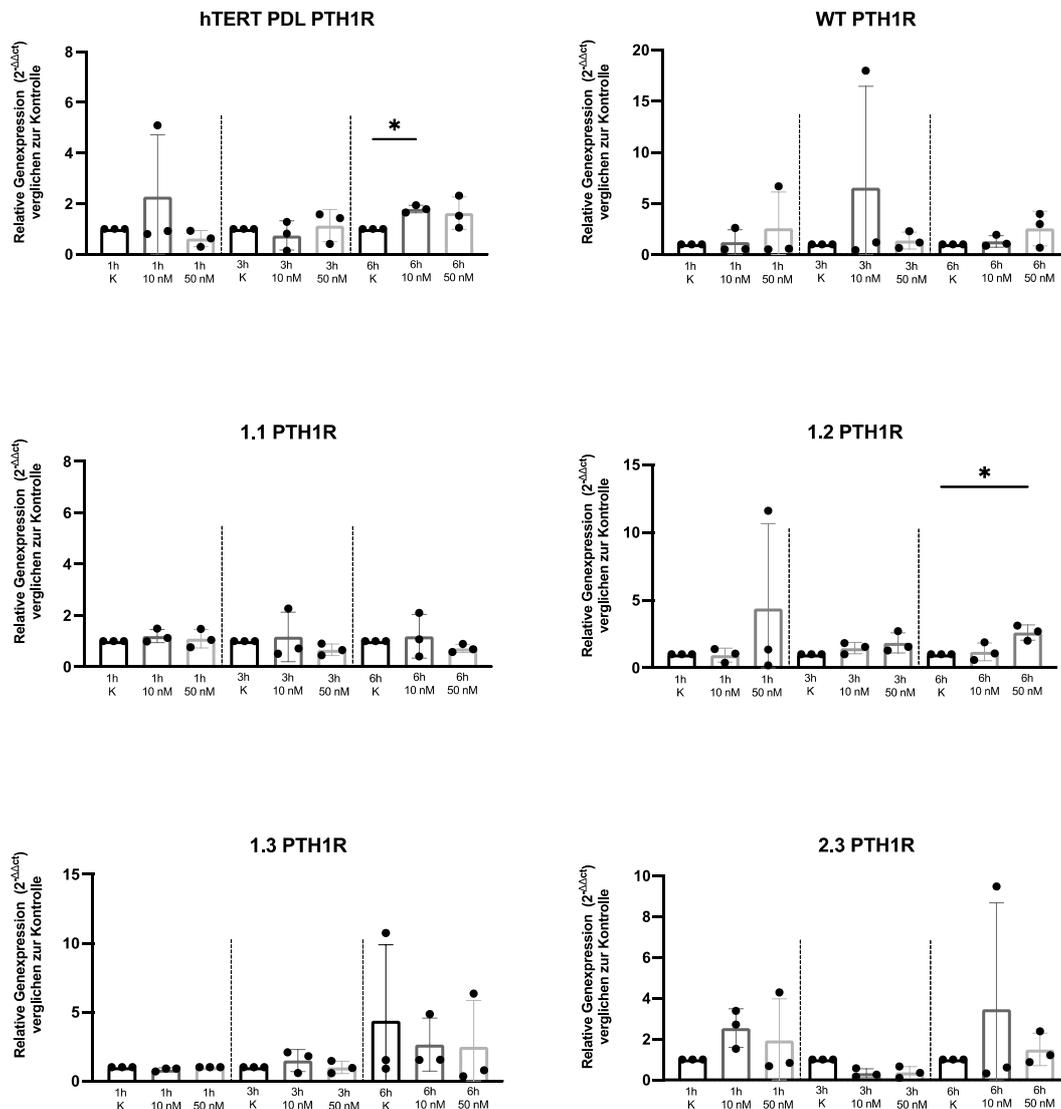


Abbildung 22: **Relative Genexpression von *PTH1R* nach PTH-Stimulation in *ALPL*-defizienten Zelllinien nach 1 h, 3 h und 6 h.** Die Proben wurden zur Kontrolle des jeweiligen Zeitpunkts normiert. Aufgrund der verlangsamten Populationsverdopplung der Zelllinie 1.5 konnte die qPCR-Analyse für diesen Klon nicht durchgeführt werden. Die Statistik wurde aufgrund fehlender Normalverteilung der Proben mit dem Kruskal-Wallis mit dem Dunn's Posthoc-Test berechnet. (*) $p < 0,05$. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung. $n = 3$.

Verglichen zu den Vorversuchen mit den PDLSCs (s. Kapitel 3.2.1) waren die Ergebnisse der Genexpression der hTERT PDL Zelllinie und der *ALPL*-defizienten Zelllinien mit Ausnahme punktueller Ausreißer sehr ähnlich.

3.3.1.2 Bestimmung der TNAP-Aktivität mittels CSPD-Assay

Im Rahmen der Untersuchungen zu den Kurzzeiteffekten von PTH war auch die Analyse der Aktivität von TNAP in den Klonen wenige Stunden nach Stimulation von Interesse. Die Auswertung der Daten wurde wie in Kapitel 3.2.1.2 beschrieben durchgeführt.

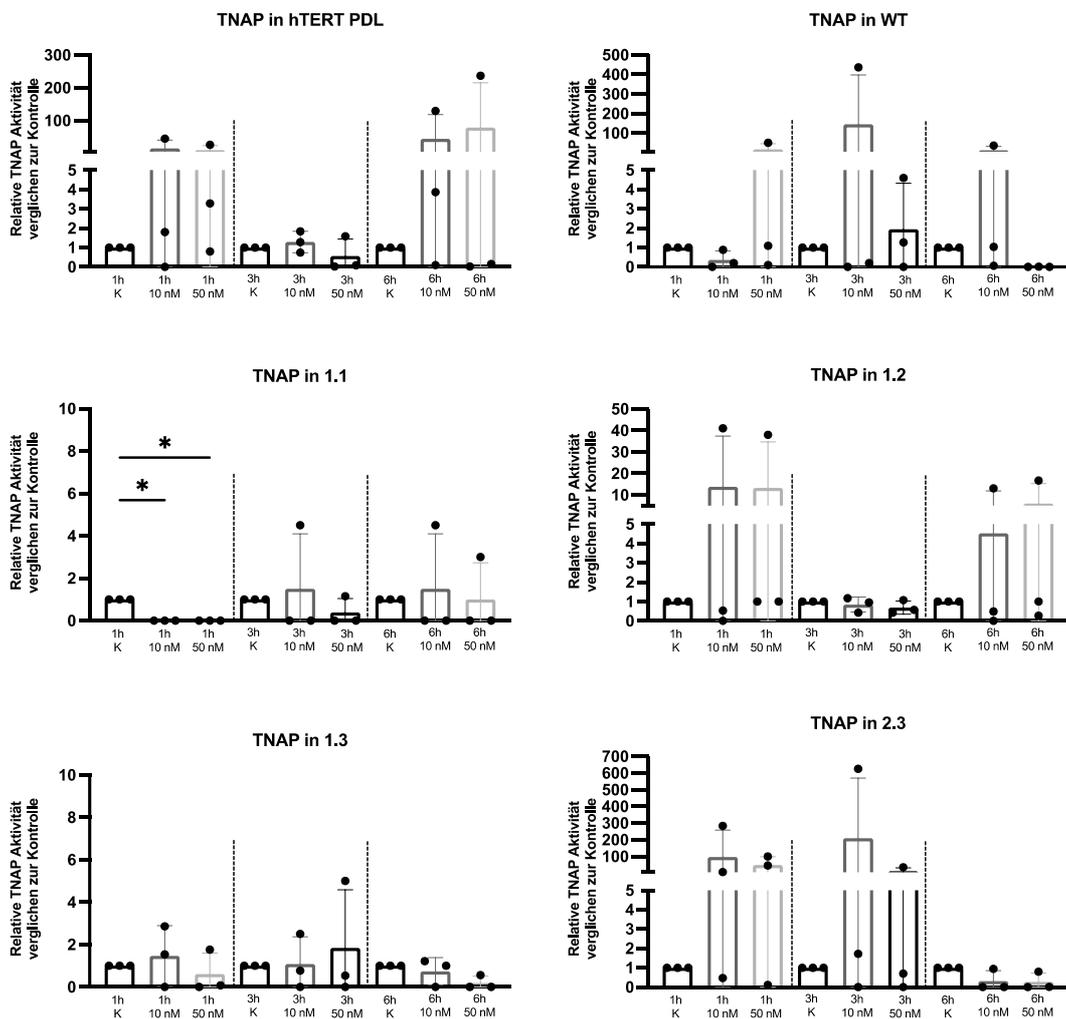


Abbildung 23: TNAP-Aktivität nach PTH-Stimulation in *ALPL*-defizienten Zelllinien nach 1 h, 3 h und 6 h. Veranschaulicht ist in den Graphen die Differenz des Lumineszenzsignal der Proben mit und ohne den Zusatz von Levamisol. Die Proben wurden zur Kontrolle an den jeweiligen Zeitpunkten normalisiert und in Prozent dargestellt. Aufgrund der verlangsamten Populationsverdopplung der Zelllinie 1.5 konnte das CSPD-Assay für diesen Klon nicht durchgeführt werden. Die Statistik wurde aufgrund keiner Normalverteilung der Proben mit dem Kruskal-Wallis mit dem Dunn's Posthoc-Test berechnet. (*) $p < 0,05$. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung. $n = 3$.

Im direkten Vergleich hatte PTH weder in den hTERT PDL Proben noch in den Zelllinien mit Mutationen im *ALPL*-Gen einen signifikanten positiven Einfluss auf die Enzymaktivität. In der hTERT PDL Zelllinie wurde die TNAP durch die beiden getesteten PTH-Konzentrationen nach 1 h und 6 h punktuell gesteigert. Ein gleiches Muster war auch in Klon 1.2 mit heterozygoter Deletion erkennbar. Auch der nicht mutierte Wildtyp zeigte punktuelle Steigerungen nach 1 h und Zusatz von 50 nM bzw. nach 3 h und 6 h und den Zusatz von 10 nM PTH. Hingegen wurde in Klon 1.1 mit homozygoter Deletion die Aktivität nach 1 h signifikant herunterreguliert und konnte auch zu sonst keinem der Zeitpunkte gesteigert werden. Verglichen zur Kontrolle wurde in 2.3 eine erhöhte TNAP-Aktivität sowohl nach 1 h als auch 3 h nachgewiesen.

3.3.2 Funktionelle Veränderungen durch intermittierende PTH-Stimulation

In weiterführenden Experimenten wurde untersucht, inwiefern sich die intermittierende PTH-Applikation langfristig auf die Genexpression von *ALPL* und die osteogene Differenzierung der *ALPL*-defizienten Zelllinien auswirkt. Abbildung 6B (vgl. Kapitel 2.2.5) veranschaulicht das Applikationsprotokoll von PTH im 48-Stunden-Zyklus. Die Experimente wurden exemplarisch durchgeführt ($n = 1$), weswegen die Ergebnisse lediglich als grobe Beurteilung gewertet werden können.

3.3.2.1 Genexpressionsanalyse von *ALPL*

Um besser verstehen zu können, ob die Kultivierung mit PTH die Expression von *ALPL* funktionell beeinflussen kann, wurde die relative Genexpression bestimmt und die entstandenen Daten mit der $2^{-\Delta\Delta CT}$ Methode ausgewertet.

Die Zellen wurden für 8, 14 und 22 Tage intermittierend mit PTH versorgt. In Abbildung 24 sind die Ergebnisse der qPCR für *ALPL* dargestellt.

In der hTERT PDL Zelllinie konnte das Expressionsniveau von *ALPL* an Tag 8 und 14 durch PTH-Zugabe gesteigert werden. Der Trend zu Tag 8 konnte auch im Vorversuch mit PDLSCs (3.2.2.1) beobachtet werden. Im WT und den *ALPL*-defizienten Zellen konnte dieser vielversprechende Trend nicht beobachtet werden. Lediglich in Klon 1.3 und 2.3 konnte das Expressionslevel durch die intermittierende PTH-Zugabe verglichen zu Tag 0 gesteigert werden.

Da sich bereits in den Analysen der kurzen Zeitpunkte abzeichnete, dass die Aktivität des Enzyms punktuell gesteigert werden konnte, war von Interesse, ob die TNAP-Aktivität durch Langzeitexposition stärker beeinflusst werden kann. Hierfür wurden Proben an den Tagen 0, 8, 14 und 22 gesammelt. Jedoch wurde das Lumineszenzsignal weder in primären und immortalisierten PDL-Zellen noch in den *ALPL*-defizienten Zelllinien zu keinem der untersuchten Zeitpunkte erhöht. Klon 1.1 und 1.3 wiesen eine kaum nachweisbare Aktivität auf (Daten hier nicht gezeigt).

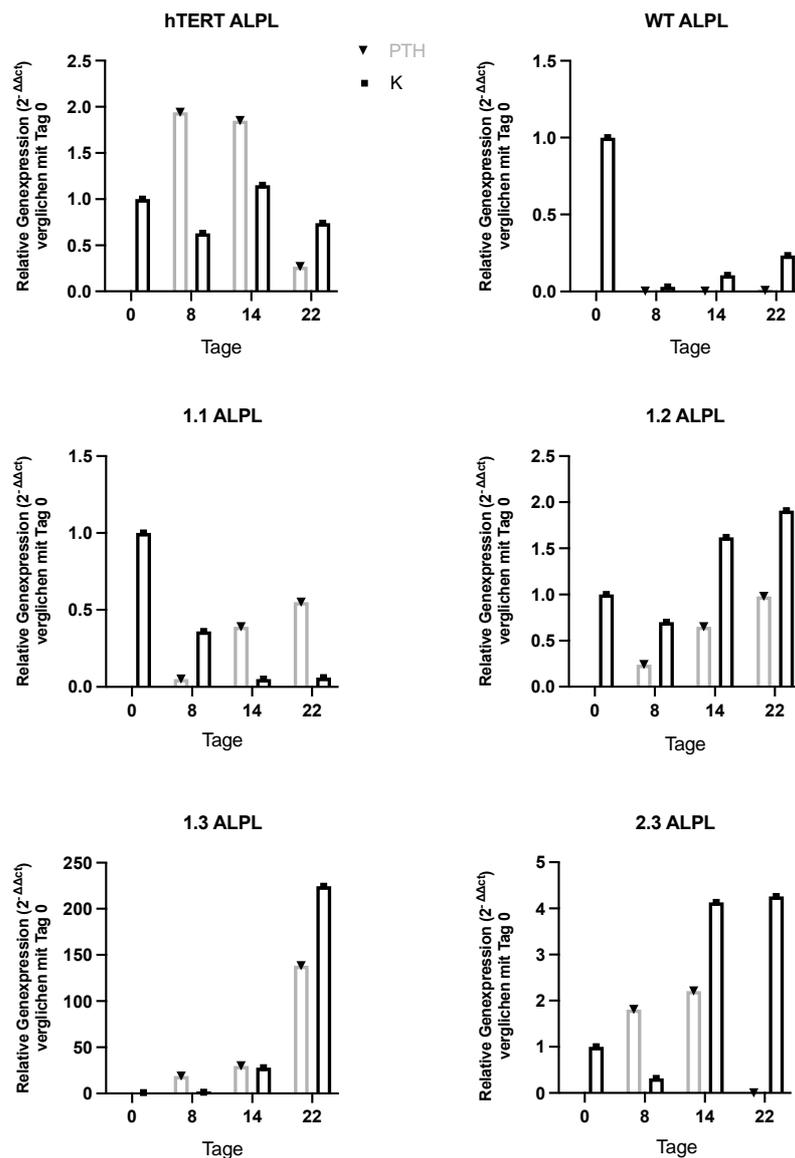


Abbildung 24: **Relative Genexpression von *ALPL* nach Langzeitexposition mit PTH innerhalb eines 48-stündigen Inkubationszyklus.** Hierfür wurden die Zellen für 6 Stunden mit PTH in Basismedium kultiviert. Die restlichen 42 Stunden jedes 48 h-Zyklus erhielten die Zelllinien PTH-freies osteogenes Medium. Aufgrund der verlangsamten Populationsverdopplung der Zelllinie 1.5 konnte die qPCR-Analyse für diesen Klon nicht durchgeführt werden. Die Proben wurden zu Tag 0 standardisiert. n = 1.

3.3.2.2 Osteogene Differenzierung der Zelllinien mit *ALPL*-Mutationen

Um besser zu verstehen, inwieweit PTH die osteogene Differenzierung von Zellen mit Mutationen im *ALPL*-Gen beeinflussen kann, wurden diese für 22 und 28 Tage mit und ohne intermittierende Zugabe von PTH osteogen differenziert.

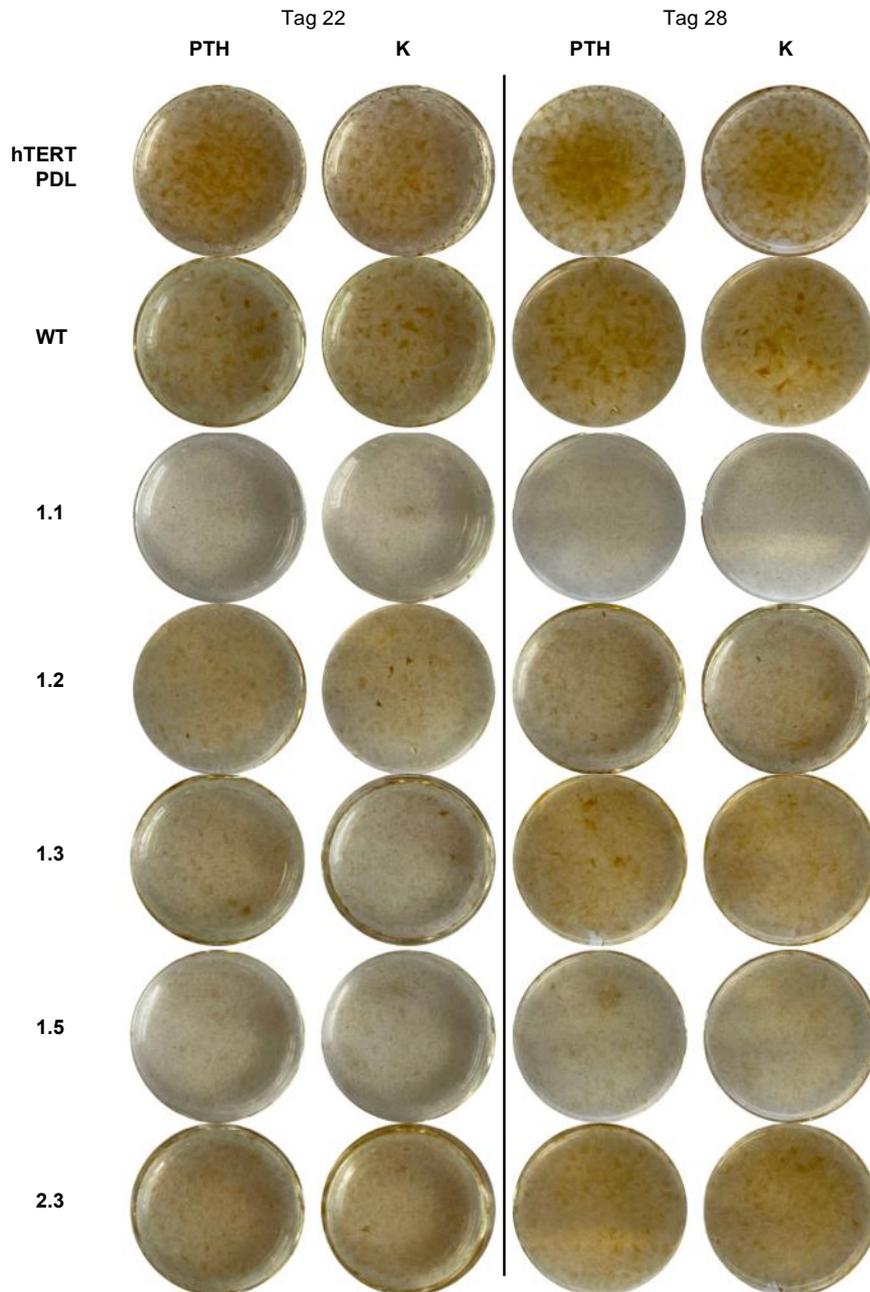


Abbildung 25: **Alizarinrot-Färbung nach 22- und 28-tägiger PTH-Exposition in *ALPL*-defizienten Zelllinien.** Makroskopische Darstellung der gefärbten Zelllinien mit und ohne intermittierende Zugabe von PTH nach 22 und 28 Tagen. Insgesamt konnten in allen Zelllinien mit Ausnahme von Klon 1.1 und 1.5 Calciumphosphatkristalle anhand der Einlagerung des Alizarinfarbstoffes beobachtet werden. n = 1.

Die Calciumphosphatablagerungen in der PTH-Gruppe unterschieden sich verglichen mit der Kontroll-Gruppe nicht. Eine erfolgreiche Differenzierung konnte in der hTERT PDL Zelllinie, im WT und Klon 2.3 festgestellt werden. Klone 1.2 und 1.3 mit einer heterozygoten Mutation im *ALPL*-Gen zeigten ein vermindertes Differenzierungspotential. Im Gegensatz dazu war bei Klon 1.1 mit homozygoter Mutation eines Guanins und 1.5 mit Deletion von 48 bp keine osteogene Differenzierung nachweisbar.

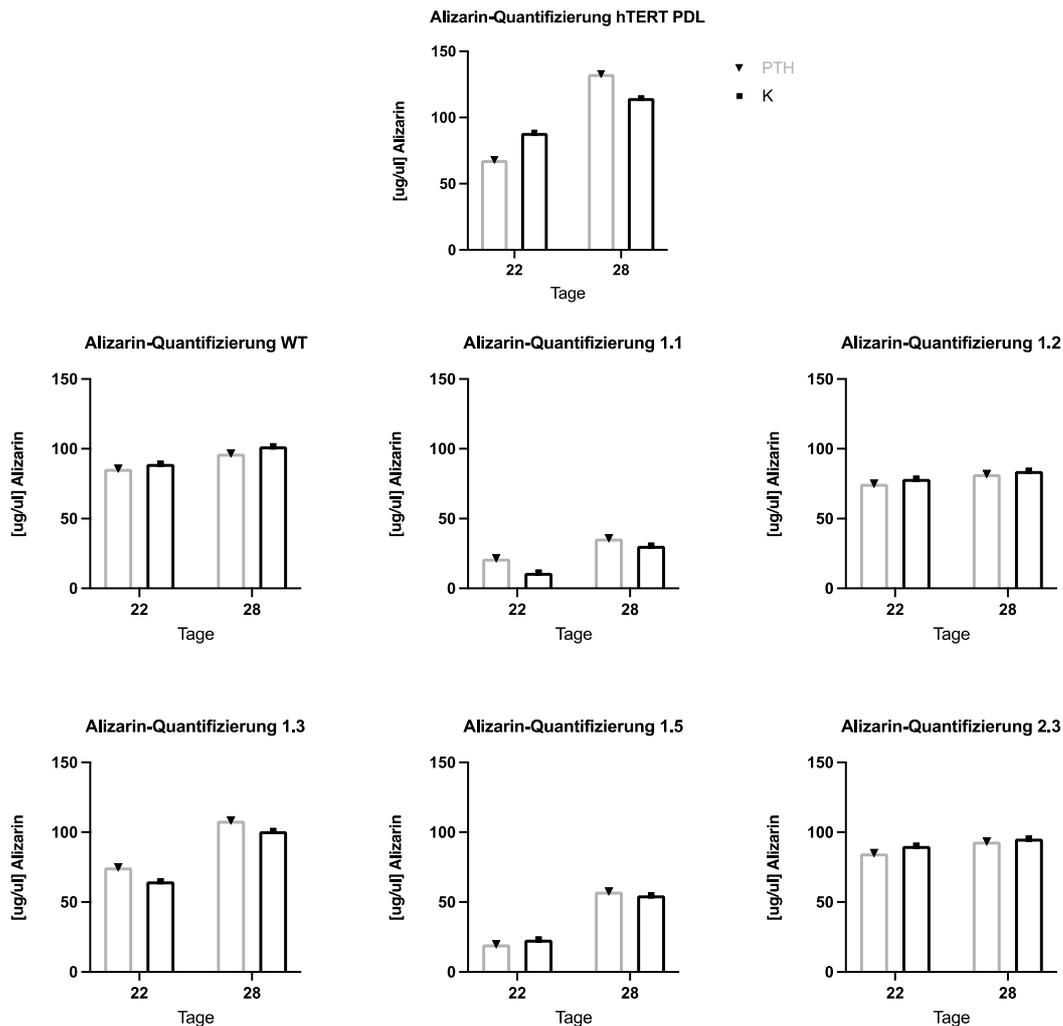


Abbildung 26: **Quantifizierung der Alizarinfärbung.** Dargestellt sind in den Graphen Mittelwerte von drei technischen Replikaten. Die Quantifizierung der Alizarin-Färbung (vgl. Abbildung 25) zeigt keine klaren Differenzen zwischen PTH-Gruppe und Kontrolle. $n = 1$.

Die Quantifizierung zeigte auch, dass die Ablagerung von Calciumphosphatkristallen sowohl nach 22 Tagen als auch nach 28 Tagen osteogener Differenzierung ungefähr gleich stark ausgeprägt war. Die Ergebnisse der Quantifizierung sind in Abbildung 26 graphisch dargestellt. Aufgrund der geringen Probenzahl von $n = 1$ konnte keine

statistische Analyse durchgeführt werden. Allerdings zeigten alle Klone und auch die nicht-mutierte Zelllinie bezüglich des Effekts von PTH denselben Trend.

Die qPCR-Analyse von *ALPL* (vgl. Kapitel 3.3.2.1) sowie das Experiment zur osteogenen Differenzierung wurden lediglich einmal wiederholt. Der direkte Vergleich zwischen den Klonen zeigte, dass PTH die Genexpression oder die Differenzierungskapazität nur selten erhöhte, weshalb diese Experimente nicht weiterverfolgt wurden.

4 Diskussion

Der Schwerpunkt dieser Arbeit lag neben der weiteren Charakterisierung vor allem auf der Evaluierung der molekularen Auswirkungen von PTH in den fünf *ALPL*-defizienten Zelllinien, die als *in-vitro*-Modell zur Untersuchung der dentalen Aspekte der HPP dienen. Die basale Charakterisierung der *ALPL*-defizienten Zelllinien sah zunächst den Ausschluss potentieller Off-Target Mutationen vor, die während einer genetischen Modifizierung mittels CRISPR/Cas9 auftreten können. Desweiteren lag der Fokus auch auf der Analyse des Phänotyps des *ALPL*-Genotyps.

Zur Untersuchung des Einflusses von PTH wurden zunächst Applikationsprotokolle in primär isolierten PDLSCs etabliert, um eine kontinuierliche, kurzzeitige oder intermittierende Exposition mit dem Hormon zu simulieren. Diese wurden anschließend auf die transgenen Zelllinien (1.1, 1.2, 1.3, 1.5 und 2.3) angewandt, was einen Vergleich der Genexpression und TNAP-Aktivität zwischen nicht-mutierten und TNAP-defizienten Zellen des parodontalen Ligaments nach PTH- Behandlung ermöglichen sollte.

Es wurde bereits gezeigt, dass die kontinuierliche Stimulation mit PTH nach 1 bis 48 Stunden die *ALPL*-Expression in murinen Osteoblastenzellen sowie primären PDLSCs nachweislich erhöht (Houston et al., 2016, Wolf et al., 2013). Zusätzlich wurde in der Literatur bereits mehrfach über positive Effekte der intermittierenden Verabreichung von PTH bei adulter HPP berichtet. Durch das PTH wurde die Heilung von Knochenbrüchen durch eine Stimulation der Serum-AP und gesteigerter Synthese von TNAP in Osteoblasten verbessert (Schalin-Jantti et al., 2010, Whyte et al., 2007).

Bislang gibt es jedoch kein Forschungsprojekt, das die Auswirkungen des Hormons auf Zellen des Zahnhalteapparates im Rahmen einer HPP-Erkrankung untersucht. Da PTH nachweislich die *ALPL*-Expression und TNAP-Aktivität erhöht, könnte eine kontinuierliche, kurzfristige oder intermittierende Verabreichung von PTH einen interessanten therapeutischen Ansatz zur Linderung der dentalen Symptomatik darstellen.

4.1 Basale Charakterisierung des dentogenen *in-vitro*-Modells der HPP

Ein detaillierter Vergleich zwischen Genotyp und Phänotyp der *ALPL*-defizienten Zelllinien wurde während der basalen Kultivierung durchgeführt. Hierfür wurden die Zelllinien auf ihre TNAP-Expression, Zellwachstum und metabolische Aktivität untersucht und mit der nicht-mutierten hTERT PDL Zelllinie verglichen. Die Auswertung

der Kontrollgruppen der Alizarinrot-Färbung, die im Zuge der intermittierenden PTH-Stimulation durchgeführt wurde, erlaubt zusätzlich eine Beurteilung der osteogenen Mineralisierungskapazität der transgenen Zelllinien.

4.1.1 Die Bedeutung des *ALPL*-Genotyps für den HPP-Phänotyp

Die in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien weisen Mutationen im *ALPL*-Gen auf. Bei diesen Mutationen handelt es sich mit Ausnahme des Klon 2.3 um Deletionen von einer oder mehreren Basen. In vorangegangener Dissertation wurde bereits analysiert, dass die Einzelbasendeletionen in den Klonen 1.1, 1.2 und 1.3 allesamt zu einem vorzeitigen Stoppcodon auf einem oder beiden Allelen führen und somit einen vorzeitigen Abbruch der Translation bewirken. Die Deletion von 48 bp in Klon 1.5 resultierte nicht in einer Verschiebung des Leserasters und somit nicht in einem vorzeitigen Stoppcodon. Davon unterscheidet sich maßgeblich Klon 2.3, da die Punktmutation zu einem Einbau einer anderen Aminosäure in das Protein führt. In der Datenbank für *ALPL*-Genvarianten (<https://alplmutationdatabase.jku.at>; aufgerufen am 05.03.2023) sind aktuell über 400 Mutationen gelistet, von denen die meisten Punktmutationen sind. Im Kontrast dazu wurden mit dem *ALPL1* Konstrukt nur Einzelbasen-Deletionen an den Positionen 554 (1.1, 1.2) und 555 (1.3) des Exon 6 erzeugt. In der Datenbank lassen sich insgesamt drei Deletionen finden, die alle zu einem perinatalen Phänotyp der HPP führen. Eine große Deletion von 16 Aminosäuren liegt in Klon 1.5 vor. Diese treten jedoch sehr selten auf. Das *ALPL2* Konstrukt führt zu einem Austausch eines Thymins an Position 83 (Klon 2.3) in Exon 3. Die Datenbank führt an Position 83 eine compound-heterozygote Punktmutation auf, die zu einem infantilen Phänotyp führt. Liu et. al untersuchten in ihrer Studie genetische Merkmale der HPP bei chinesischen Kindern. Einer der charakterisierten Patienten wies diese Punktmutation auf, welche in einer Restaktivität der TNAP von 7 IU/l resultiert und somit mit einer infausten Prognose verbunden ist (Liu et al., 2021b). Um einzuschätzen, welche Auswirkungen die einzelnen *in-vitro*-Mutationen auf den HPP-Phänotyp haben können, wurde die TNAP-Expression auf Proteinniveau sowie die osteogene Differenzierungskapazität analysiert.

Die homozygote Deletion in Klon 1.1 bewirkt phänotypisch einen funktionellen TNAP-Knockout.

Die Analyse der Immunfluoreszenzfärbung zeigte für den Klon 1.1 mit homozygoter Deletion des Guanins keine TNAP-positive Zelle. In der Literatur wird ein chinesischer Patient mit homozygotem Genotyp beschrieben, der klinisch zu einer infantilen Form

der HPP führt und mit einer massiv reduzierten Serum-AP Aktivität von <7 IU/L einhergeht (Liu et al., 2021b). Physiologische Werte der Serum-AP liegen bei Säuglingen und Kleinkindern zwischen 100-590 IU/L. Die infantile oder kindliche Form der HPP sollte in Betracht gezogen werden, wenn die AP-Werte um die untere Grenze herum oder leicht darunter liegen (<100 IU/L) (Beck et al., 2009b). Die Prognose wird für den Patienten mit infantiler HPP als infaust angegeben (Liu et al., 2021b). Homozygotie für die Deletion eines Thymins an Position 1559 des *ALPL*-Gens ruft einen schweren letalen Phänotyp hervor (Sawai et al., 2003). Darüber hinaus beschrieben Mentrup et al. sogar eine homozygote Deletion im Intron 7, die zu einem verkürzten, nicht funktionsfähigen TNAP-Enzym führt (Mentrup et al., 2017). Auch die osteogene Differenzierung war im Vergleich zu den anderen Zelllinien mit Mutationen im *ALPL*-Gen lediglich im Klon 1.1 nicht erfolgreich, was wiederum die elementare Bedeutung der TNAP bei der osteogenen Differenzierung unterstreicht. Da die Einzelbasen-Deletion in der Zelllinie 1.1 homozygot auftritt, führt die Leserasterverschiebung zu einem vorzeitigen Stopcodon auf beiden Allelen und somit zu einem vorzeitigen Abbruch der Proteintranslation. Zusammengefasst wird deutlich, dass Homozygotie ein erschwerender Faktor für die Erkrankung ist und phänotypisch in vorliegender Zelllinie zu einem TNAP-Knockout führt.

Die heterozygoten Deletionen in den Klonen 1.2, 1.3 und 1.5 resultieren in einem ähnlichen Phänotyp.

Die Klone 1.2, 1.3 und 1.5 weisen in der Immunfluoreszenzanalyse keine TNAP-positiven Zellen auf, doch konnte im Western Blot für die Klone ein annähernd gleiches Expressionsniveau festgestellt werden. Die osteogene Differenzierung wirkte sich bei den drei heterozygot-mutierten Zelllinien etwas unterschiedlich aus: Während die beiden Klone mit Deletion eines Guanins (1.2) bzw. Adenins (1.3) noch ein vermindertes Differenzierungspotential aufweisen, ist dieses bei Klon 1.5 mit Deletion von 48 bp nicht mehr vorhanden, was wiederum die Bedeutung des Fehlens von 16 AS für den Phänotyp unterstreicht. Silvent et al. ermittelten anhand aller bis dahin beschriebenen Mutationen empfindliche Positionen, die zu einem Hervorrufen der genetischen Erkrankung führen. 89,5 % der AS befinden sich davon in funktionell wichtigen Regionen der TNAP und werden als sensibel eingestuft, lediglich 10,5 % als variabel. Dies lässt folgern, dass das Enzym in seiner gesamten Länge stark strukturiert sein muss, damit die TNAP richtig funktioniert. Außerdem befasst sich die Studie damit, welche AS an welcher enzymatischen Domäne der TNAP beteiligt sind. Die AS des Exon 6 sind Bestandteil

der über mehrere Codons verteilten AS-Sequenz des aktiven Zentrums des Enzyms sowie posttranslationalen Phosphorylierungsstellen (Silvent et al., 2014). Das aktive Zentrum ist eine der funktionell wichtigen Domänen und umfasst die katalytische Stelle und drei Bindestellen für Metallionen (Hoylaerts et al., 2006). Die Bedeutung der Phosphorylierungsstellen im Rahmen der posttranslationalen Modifikation der TNAP ist bisher unbekannt. Jedoch lässt die Tatsache, dass 5 der insgesamt 18 Stellen während der Evolution unverändert blieben, mutmaßen, dass diesen doch eine funktionelle Bedeutung zugeschrieben werden könnte.

Das Validierungsmodell von Silvent et. al erklärt somit die maßgeblich verringerte TNAP-Aktivität für die Klone 1.2, 1.3 und 1.5 aufgrund der bestehenden Mutation in der funktionell entscheidenden Region des aktiven Zentrums des Enzyms. Eine Beurteilung des resultierenden Schweregrades des Genotyps ist mit diesem Modell jedoch nicht möglich (Silvent et al., 2014). Zusätzlich ist der DNE bei heterozygoten Mutationen ein erschwerender Faktor für die Beurteilung des Phänotyps, da die Dimerisierung des gesunden mit dem mutierten Monomer die Aktivität des nicht-mutierten Monomers der TNAP negativ beeinflussen kann (Mornet et al., 2021).

Die Punktmutation in Klon 2.3 bewirkt eine gesteigerte Expression von TNAP und hat vermutlich keine Auswirkungen auf den HPP-Phänotyp.

Besonders beeindruckend war der Klon 2.3 in der Immunfluoreszenzfärbung: Dieser zeigte einen 7-fachen erhöhten Anteil an TNAP-positiven Zellen im Vergleich zur hTERT PDL Zelllinie und dem Wildtyp. Dieser verstärkte Trend war auch im Western Blot erkennbar. Die Analyse der osteogenen Differenzierung in der Alizarinrot-Färbung zeigte eine erfolgreiche Differenzierung des Klons 2.3, die mit der hTERT PDL Zelllinie vergleichbar war. Die Publikation von Silvent et al. beschreibt das in Klon 2.3 betroffene Tyrosin als sensitive Position, die Teil des homodimeren Interface der TNAP ist. Dieses spielt eine wesentliche Rolle für die korrekte Funktion des Enzyms (Silvent et al., 2014). Missense-Mutationen im Bereich der homodimeren Schnittschnelle werden häufig mit dem DNE in Verbindung gebracht (Mornet, 2015). Yang et al. zeigten, dass eine Punktmutation an Position 83 klinisch nur als heterozygote Compound-Mutation manifestiert, während der Vater mit heterozygoter Punktmutation keine Symptome entwickelt (Yang et al., 2013). Somit führen homozygote und compound-heterozygote Mutationen in der AS-Sequenz des homodimeren Interface mit großer Wahrscheinlichkeit zu Funktionseinschränkungen des Enzyms und lässt somit mutmaßen, dass die heterozygote

Mutation im Klon 2.3 wahrscheinlich keine direkte Auswirkung auf den HPP-Phänotyp hat.

Eine Überexpression von Proteinen aufgrund von Mutationen in ihren kodierenden Genen wurde in der Literatur nicht beschrieben, doch gibt es Beispiele, in denen Mutationen die Expression von anderen Proteinen steigern und somit eine mögliche Erklärung für die erhöhte Expression von TNAP in Klon 2.3 sein könnten: Eine Mutation im epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptor verstärkt die Expression von Cadherin-5 in Lungenkrebszellen (Hung et al., 2016). Die Deletion des Jun-Dimerisierungsproteins 2 steigert die Expression von Cystin/Glutamat-Transportern (Ku et al., 2021). Eine Promotoraktivierung durch eine mit CRISPR/Cas9-erzeugte Mutation in einem Enhancer wäre ebenfalls denkbar. Enhancer sind nicht kodierende Sequenzen im Genom, die die Expression von Zielgenen aktivieren (Panigrahi and O'Malley, 2021). Daher wäre beispielsweise eine Sequenzierung des gesamten Genoms von Interesse, um die Überexpression von TNAP in der Zelllinie 2.3 besser zu verstehen.

Im Gegensatz zu klinischen Beobachtungen deuten die Ergebnisse der transgenen Zelllinien auf eine hohe Korrelation zwischen Genotyp und Phänotyp *in-vitro* hin, die *in-vivo* noch bestätigt werden müssen. Allerdings lassen sich HPP-Phänotypen aufgrund des DNE und compound-heterozygoten Allelen nur schwer vorhersagen. Klon 2.3 ist ein Beispiel, bei dem die Punktmutation zu einem Phänotyp mit erhöhter TNAP-Expression führt, während klinische Daten gezeigt haben, dass diese Allelmutation bei Vorliegen von Compound-Heterozygotie mit einer ungünstigen Prognose verbunden ist (Liu et al., 2021a). Daher wäre es von besonderem Interesse zu erforschen, warum welcher Genotyp welchen Phänotyp auslöst. Das hier verwendete *in-vitro*-Zellkulturmodell könnte dazu beitragen, die molekularbiologischen Zusammenhänge klinisch manifester HPP-Genotypen besser zu verstehen.

4.1.2 Der Einfluss der TNAP-Defizienz auf den Zellmetabolismus

Während die Auswirkungen des TNAP-Mangels auf die Gewebemineralisierung umfassend erforscht sind, ist der Zusammenhang zwischen einem TNAP-Mangel und metabolischer Aktivität weitgehend unklar. Es ist bereits bekannt, dass die TNAP die mitochondriale Funktion und den ATP-Spiegel beeinflusst (Zhang et al., 2021, Abbracchio et al., 2009). Bei der Charakterisierung des Phänotyps war insbesondere das Wachstum von Klon 1.5 mit einer heterozygoten Deletion von 48 bp signifikant

eingeschränkt. Auch die anderen Klone mit Ausnahme von 1.2 zeigten bei der Bestimmung der Populationsverdopplung während der Expansionskultur einen ähnlich reduzierten Trend. Zhang et al. zeigten in ihrer Studie, dass ein TNAP-Knockout in murinen Osteoblasten-Vorläuferzellen (MC3T3) zu einer signifikant reduzierten Zellproliferation führt und erklärt somit das eingeschränkte Wachstumsverhalten der vorliegenden Zelllinien (Zhang et al., 2021).

Bei der Analyse der Auswirkungen des TNAP-Mangels auf den ATP-Spiegel zeichnete sich bei Klon 1.1 und 2.3 ein annähernd vergleichbares ATP-Level verglichen zu der hTERT PDL Zelllinie ab. Interessanterweise zeigten die Klone 1.2, 1.3 und 1.5 einen abnehmenden Trend bezüglich intrazellulären ATP-Gehaltes verglichen zu der nicht-mutierten Zelllinie. Um Pi für die Synthese von HA bereitzustellen, spaltet die TNAP auch ATP. Bei diesem Prozess wird ATP schrittweise zu Adenosin abgebaut, wobei ADP und AMP als Zwischenprodukte entstehen (Abbraccio et al., 2009). Eine Untersuchung in MSCs zeigte, dass ein TNAP-Mangel die ATP-Freisetzung erhöht und die ATP-Hydrolyse verringert. Das überschüssige extrazelluläre ATP wird dann wiederum von der Zelle aufgenommen und bewirkt einen Anstieg des intrazellulären ATP-Spiegels (Liu et al., 2020). Im Gegensatz zu dieser Studie ergab die Analyse des intrazellulären ATP-Gehaltes in den *ALPL*-defizienten Zelllinien eine abnehmende Tendenz.

Eine mögliche Erklärung für entsprechende Daten könnte in der Anpassung der Energieversorgung liegen, wenn aufgrund der *ALPL*-Mutation weniger ATP abgebaut wird. In diesem Zusammenhang wäre es daher besonders interessant, den extrazellulären ATP-Gehalt zu bestimmen.

Bei HPP-Patienten führt der TNAP-Mangel häufig zu entzündlichen Zuständen wie Parodontitis. Das extrazelluläre ATP ist dabei ein Schlüsselmolekül für die Knochenresorption bei einer Parodontitis. Die Bindung von ATP an den Purinrezeptor P2X7 führt zur Aktivierung von RANKL und damit zu einer erhöhten Osteoklastenaktivität (Binderman et al., 2017). Darüber hinaus spielt TNAP eine Rolle in Bezug auf das Gleichgewicht zwischen proinflammatorischem extrazellulärem ATP und dem entzündungshemmenden Abbauprodukt Adenosin (Graser et al., 2021). Kürzlich wurde gezeigt, dass die Behandlung mit Levamisol Gene beeinflusst, die direkt oder indirekt an der Regulierung von entzündlichen Prozessen beteiligt sind. DMP1 (Dentin Matrix Acidic Phosphoprotein 1), welches eine schützende Wirkung gegen Entzündungen hat, wurde dabei nachweislich herunterreguliert und könnte somit zu einer verstärkten Entzündungsreaktion unter TNAP-Hemmung beitragen (Melms et al., 2020).

Ein weiterer Aspekt, der die Regulierung des ATP-Gehaltes erklären könnte, wurde von Andrilli et al. untersucht. Es wurde festgestellt, dass TNAP und ENPP1 während der MV-vermittelten Biom mineralisierung ATP synergetisch hydrolysieren (Andrilli et al., 2022). Daher könnte die Analyse der ENPP1-Genexpression zum besseren Verständnis der Daten beitragen.

4.2 Der Einfluss von PTH auf das dentogene *in-vitro*-Modell der HPP

PTH ist ein zentrales Hormon des Calciumhaushalts und hat eine Schlüsselfunktion beim physiologischen Knochenumbau. Es wurde bereits mehrfach nachgewiesen, dass PTH eine Vielzahl von Genen regulieren kann, die je nach Dauer der Exposition, katabole oder anabole Wirkungen auf das Skelett haben (Silva and Bilezikian, 2015). In einer Studie von Houston et al. wurde gezeigt, dass die *ALPL*-Expression nach ein- bis sechsständiger kontinuierlicher PTH-Stimulation in murinen Osteoblasten signifikant gesteigert werden kann. Gleichzeitig bewirkte die Stimulation eine Suppression der Gene *PHOSPHO1* und *SMPD3* (Houston et al., 2016). Eine Verstärkung der Genexpression von *ALPL* und der TNAP-Aktivität als Reaktion auf eine kontinuierliche PTH-Exposition wurde auch in PDLSCs nachgewiesen (Wolf et al., 2013). Diese beiden Studien gaben den Anstoß, den Einfluss des Hormons im Zusammenhang mit der HPP-Erkrankung genauer zu untersuchen und somit eine mögliche Therapiestrategie abzuleiten. Die Bedeutung der TNAP als wesentlicher Bestandteil einer erfolgreichen Mineralisierung ist angesichts des auffälligen Skelett- und Zahnphänotyp von HPP-Patienten offensichtlich. Dennoch ist die TNAP für die Initiierung der MV-vermittelten Mineralisierung der ECM nicht wesentlich (Anderson et al., 2004). Der aktuelle Wissensstand legt nahe, dass die beiden Enzyme *PHOSPHO1* und *SMPD3* die Initiierung der HA-Synthese in den MVs steuern, weshalb diese im Rahmen der vorliegenden Arbeit ebenfalls näher untersucht wurden (Yadav et al., 2011, Houston et al., 2016).

Zunächst wurden zwei PTH-Applikationsprotokolle in PDLSCs etabliert, um die Auswirkungen einer kontinuierlichen, kurzzeitigen und einer intermittierenden Präsenz von PTH zu modellieren. Das *in-vitro*-Modell, bei dem PTH dem Kulturmedium zugesetzt wird, bevor die Experimente zur Sammlung von RNA bzw. Protein nach 1 h, 3 h und 6 h gestoppt werden, kommt einer kontinuierlichen PTH-Exposition am nächsten (Ishizuya et al., 1997). Eine intermittierende PTH-Gabe, bei der das Hormon den Zellkulturen für

6 Stunden pro 48-stündigem Inkubationszyklus zugeführt wird, soll genaueren Aufschluss über die funktionellen Auswirkungen geben.

Die Bewertung der Reaktion der PDLSCs auf die Stimulation mit PTH zeigte, dass die *ALPL*- und *SMPD3*-Genexpression bei beiden getesteten PTH-Konzentrationen verglichen zur Kontrolle konstant bleibt. Durch die PTH-Stimulation wurde die *PHOSPHO1*-Genexpression in den PDLSCs nach 3 Stunden signifikant herunterreguliert, was sich mit den Ergebnissen von Houston et al. deckt (Houston et al., 2016). Die TNAP-Aktivität wurde in einigen PDLSC-Donoren nach Zugabe von 10 nM PTH nach 1 Stunde erhöht. Bei Anwendung der *in-vitro*-Modelle auf die hTERT PDL Zelllinie sowie transgenen Varianten mit Mutationen im *ALPL*-Gen zeigte sich nach 3 Stunden und einer Konzentration von 10 nM PTH in der hTERT PDL Zelllinie sowie in den Klonen 1.1 und 1.2 ein Anstieg der Genexpression von *ALPL*. Die Expression von *SMPD3* und *PHOSPHO1* wurde durch die Stimulation mit dem Hormon in den transgenen Zelllinien nicht beeinflusst. Die Analyse der TNAP-Aktivität mittels CSPD-Assay zeigte punktuelle Steigerungen der Enzymaktivität in der hTERT PDL Zelllinie und einigen Klonen.

Ein entscheidender Einflussfaktor, der zu den abweichenden Ergebnissen führt, könnte die verwendete PTH-Konzentration sein, die in vorliegender Arbeit mit 10 nM und 50 nM getestet wurde. Die Daten von Houston et al. zeigen deutlich, dass bei einer Konzentration von 50 nM die *ALPL*-Expression signifikant erhöht ist (Houston et al., 2016). Im Gegensatz zu dieser Studie fand die Arbeitsgruppe um Lossdörfer et al. keine signifikante Dosisabhängigkeit der PTH-Wirkung in PDLSCs (Lossdorfer et al., 2005). Eine weiterer Grund für die fehlende Signifikanz könnte die Verwendung anderer Zellen bzw. Zelllinien sein. Es wurde zwar beschrieben, dass PDLSCs ähnlich wie Osteoblasten auf die Stimulation mit PTH reagieren, dies war jedoch abhängig von der Konfluenz der Zellen. Lossdörfer et al. zeigten, dass die intermittierende Gabe von PTH in einer konfluenten oder präkonfluenten Zellkultur die Expression von Osteoprotegerin unterschiedlich reguliert (Lossdorfer et al., 2005). Die PTH-Administration fand im Rahmen dieser Arbeit in konfluenten Zellkulturen statt. Somit könnte eine erneute Analyse der *ALPL*-Expression und TNAP-Aktivität nach einer kurzzeitigen, kontinuierlichen PTH-Stimulation in präkonfluentem Zustand bzw. die erneute Testung unterschiedlicher Konzentrationen des PTH weitere Schritte darstellen.

Relevante Aspekte, die das Fehlen von Auswirkungen auf die *ALPL*-Expression und die nur punktuell gesteigerte TNAP-Aktivität erklären könnten, könnten im Expositionsprotokoll und in der Signalübertragung liegen: Angesichts der reichlichen Expression des

PTH1R in PDLSCs ist eine modulierende Wirkung von PTH auf die Zellen zu erwarten (Wolf et al., 2013). Die stimulierende Funktion von PTH auf die TNAP-Aktivität ist gut dokumentiert. Im Gegensatz dazu wurde jedoch auch von einer Hemmung der Osteoblastendifferenzierung durch PTH berichtet (van der Horst et al., 2005, Bellows et al., 1990). Diese negative Wirkung von PTH auf die osteogene Differenzierung kann durch Unterschiede im Differenzierungsstadium, der Zellkonfluenz sowie der PTH Expositionszeit und -dosis erklärt werden (Isogai et al., 1996, Houston et al., 2016, Ishizuya et al., 1997).

Isogai et al. postulierten in ihrer Studie, dass PTH die TNAP-Aktivität hemmt, wenn die Zellkultur einen konfluenten Zustand erreicht. Im Gegensatz dazu hatte die PTH-Exposition in einem subkonfluenten Zustand eine stimulierende Wirkung auf die Aktivität des Enzyms (Isogai et al., 1996). Da die Zelllinien in vorliegender Arbeit vor der Stimulation einen konfluenten Zustand erreichten, bietet dieser Aspekt eine plausible Erklärung dafür, dass die PTH-Stimulation nur geringe Auswirkungen zeigt.

Eine Besonderheit des PTH ist, dass es abhängig von der Dauer der Exposition völlig gegensätzliche Wirkungen auf den Knochen haben kann, was den Einfluss der Dauer der PTH-Supplementierung unterstreicht. Eine anhaltende Exposition führt zu einem Anstieg des RANKL/OPG-Verhältnisses und damit zu einer verstärkten Osteoklastogenese, während eine intermittierende Verabreichung einen knochenanabolen Effekt hat (Barros et al., 2003). Ishizuya et al. konnten zudem aufzeigen, dass auch die Expositionszeit während der intermittierenden Verabreichung des Hormons die Osteoblastendifferenzierung beeinflusst. Wenn osteoblastische Zellen nur während der ersten Stunde jedes 48-stündigen Inkubationszyklus intermittierend mit PTH behandelt wurden, wurde die Differenzierung durch Unterdrückung der TNAP-Aktivität und mRNA-Expression von *ALPL* gehemmt. Im Gegensatz dazu stimulierte die intermittierende Exposition mit PTH während der ersten 6 Stunden jedes 48-Stunden-Zyklus die Osteoblastendifferenzierung (Ishizuya et al., 1997). Die Expositionszeit wurde im Applikationsprotokoll zur Testung der funktionellen Auswirkungen von PTH auf 6 Stunden innerhalb eines 48-stündigen Zyklus festgesetzt. Es ist daher nicht ausgeschlossen, dass die Genexpression von *ALPL* und die Enzymaktivität in den mutierten Zelllinien durch verlängerte oder verkürzte Expositionszeiten beeinflusst werden könnte, was in weiteren Versuchen näher untersucht werden sollte.

Neben dem Expositionsprotokoll könnten weitere relevante Aspekte auch in der Signalübertragung liegen. Um seine Wirkung zu entfalten, bindet PTH an den *PTH1R*

und vermittelt dann über intrazelluläre Signalwege die Bereitstellung von Calcium (Wein and Kronenberg, 2018, Juppner et al., 1991) Folglich könnte die Herabregulierung der Anzahl oder der Empfindlichkeit des PTH-Rezeptors als Teil eines negativen Rückkopplungsmechanismus das Ausbleiben einer späten Wirkung nach Langzeitexposition mit dem Hormon erklären. Der Wnt/ β -Catenin Signalweg spielt im Zusammenhang mit der intermittierenden PTH-Exposition ebenfalls eine Schlüsselrolle. PTH fördert die Knochenbildung durch Unterdrückung der Expression von Sklerostin, einem Inhibitor des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs (Tamura and Kaji, 2013). Dieser Signalweg hat auch eine wesentliche Funktion bei der Bildung des Zements auf der Wurzeloberfläche (Kuchler et al., 2014). Vorzeitig exfoliierten Milchzähnen von HPP-Patienten fehlt azelluläres Zement. Der Wurzelzement stellt einen wichtigen Bestandteil des Zahnhalteapparates und wird daher auch als Ursache für die verfrühte Exfoliation diskutiert (Zweifler et al., 2015, van den Bos et al., 2005). Melms et al. zeigten, dass eine TNAP-Inhibition durch Levamisol den Wnt-Signalweg herunterreguliert (Melms et al., 2020). Die Tatsache, dass PTH kaum Effekte auf die untersuchten osteogenen Marker zeigt, lässt mutmaßen, dass das Hormon auch die Expression von Sklerostin nicht beeinflusst. In Kombination mit der Herunterregulierung des Wnt/ β -Catenin Signalwegs durch eine TNAP-Inhibition, die hier durch eine TNAP-Defizienz gegeben ist, könnte die Untersuchung der Genexpression von Sklerostin einen interessanten Ansatzpunkt bieten, um die Entstehung dentaler Symptome der HPP genauer zu verstehen.

Nicht zuletzt stellt auch das limitierte Differenzierungspotential der hTERT PDL Zelllinie eine potentielle Erklärung für den fehlenden Effekt bei der Langzeitstimulation dar. Im Gegensatz zu den Publikationen von Docheva et al. zeigte die hTERT PDL Zelllinie eine eingeschränkte osteogene Differenzierungskapazität auf (Docheva et al., 2010). Die Expression von *ALPL* während der intermittierenden Verabreichung von PTH zeigte in der Kontrollgruppe, die nur mit osteogenem Differenzierungsmedium behandelt wurde, keine signifikante Beeinflussung (vgl. Kapitel 3.3.2.1). Eine Studie zu den Auswirkungen der hTERT-Immortalisierung auf die osteogene und adipogene Differenzierung von DPSCs zeigte, dass die osteogene Differenzierung von primären DPSCs etwa 60 % effektiver ist als die von immortalisierten DPSCs. Dabei wurde *RUNX2* und *BSP* während der osteogenen Differenzierung sogar herunterreguliert. *RUNX2* ist für die Expression osteogener Markergene einschließlich *ALPL* notwendig. Daher ist denkbar, dass die *ALPL*-Genexpression und *TNAP*-Expression in der hTERT PDL Zelllinie aufgrund einer basal reduzierten Expression von osteogenen Markern, beeinträchtigt ist

(Ikbale et al., 2016). Eine Analyse des Expressionsniveaus von *RUNX2* in den untersuchten Zelllinien wäre daher von Interesse, um eine Einschränkung der Differenzierung aufgrund der Immortalisierung mit hTERT auszuschließen. Selbige Arbeitsgruppe kam während der Differenzierung von DPSCs in Neurone zu der Schlussfolgerung, dass eine Immortalisierung mit hTERT nicht der beste Ansatz für die langfristige Verwendung von Zellen zur Untersuchung von Krankheiten ist. Hierbei wurde festgestellt, dass einige der Transkripte, die während des Differenzierungsprozesses erhöht sind, durch die Immortalisierung in den differenzierten Neuronen unterdrückt werden (Urraca et al., 2015). Somit könnte eine Analyse des gesamten Transkriptom der hTERT PDL Zelllinie Aufschluss darüber geben, ob die Differenzierungseigenschaften durch die Immortalisierung beeinträchtigt sind.

Darüber hinaus ergab die Off-Target-Genanalyse eine Mutation in *CRELD2*, das in Verbindung mit der osteogenen Differenzierung steht. Eine Untersuchung in MSCs, in der die *CRELD2* Expression mittels siRNA stillgelegt wurde, zeigte eine signifikante Verringerung der Matrixmineralisierung, TNAP-Aktivität und *ALPL*-Genexpression und könnte somit auch das eingeschränkte Differenzierungspotential in den Zelllinien erklären (Dennis et al., 2020). Die möglichen funktionellen Auswirkungen der *CRELD2*-Mutation werden im Kapitel 4.3 genauer diskutiert.

In vorliegender Arbeit wurden die Auswirkungen von PTH auf die *ALPL*-defizienten Zelllinien ausführlich untersucht. Obwohl die Genexpression von *ALPL* durch die Stimulation nicht positiv beeinflusst wurde, konnte die TNAP-Aktivität in den *ALPL*-defizienten Zelllinien unter den in Kapitel 2.2.5 beschriebene Bedingungen punktuell gesteigert werden. Dies zeichnete sich insbesondere bei dem punktmultierten Klon 2.3 ab, der phänotypisch bereits deutlich mehr TNAP-positive Zellen aufweist. Jedoch besteht in den untersuchten Zelllinien eine TNAP-Defizienz, welche für eine erfolgreiche Mineralisierung entscheidend ist. Nichtsdestotrotz scheint es, dass durch Anpassungen im Zellkulturmodell hinsichtlich der PTH-Konzentration, sowie des Konfluenzzustandes der Zellkultur und Verlängerung oder Verkürzungen der Expositionszeit, insbesondere im Langzeitversuch, vielversprechende Ergebnisse erzielt werden könnten, die einen potentiellen Therapieansatz der HPP darstellen könnten.

4.3 Off-Target Mutationen durch CRISPR/Cas9-basiertes Genediting

CRISPR/Cas9 ist ein Verfahren, mit der das Erbgut von Organismen präzise verändert werden kann. Ethische Bedenken und ungewollte Mutationen außerhalb der Zielsequenz, sogenannte Off-Target Mutationen, stellen jedoch Limitationen für den Einsatz dieser Methode dar.

Um eine Aktivität des CRISPR/Cas9-Systems außerhalb der Zielsequenz zu untersuchen, stehen unterschiedliche Ressourcen zur Verfügung, die solche unspezifischen Mutationen identifizieren können. Zum vollständigen Ausschluss von Off-Target Mutationen bietet sich eine genomweite Sequenzierung an. Alternativ steht eine Vielzahl von Online-Tools zur Auswahl, die eine kostengünstige und zeitsparende, jedoch auch nur rein spekulative Variante darstellen. Solche Online-Tools stellen zwar keinen Ersatz für eine genomweite Sequenzierung dar, jedoch können diese Voraussagen treffen, welche Sequenzen potenziell für Off-Target Mutationen anfällig sind und ermöglichen folglich eine gezielte Untersuchung dieser Gene. Das Programm ermittelt anhand der Zielsequenz der sgRNA mögliche Off-Target Gene und listet diese nach dem CFD (Cutting Frequency Determination)-Spezifitätsscore von der höchsten bis zur geringsten Wahrscheinlichkeit des Auftretens (Doench et al., 2016, Concordet and Haeussler, 2018, Tycko et al., 2019).

Die Sequenzierung der Off-Target Gene ergab Varianten in *CRELD2*, *TRIM42* und *PTPRE* (vgl. Abbildung 7-8). Ob aufgrund der Mutation funktionelle Auswirkungen zu erwarten sind, soll im Folgenden genauer erörtert werden:

CRELD2 (Cysteine-rich with epidermal growth factor-like domains 2) ist ein Protein, das erstmals im ER lokalisiert wurde (Oh-hashii et al., 2009). Bisher wurden fünf menschliche Isoformen des *CRELD2* identifiziert (Maslen et al., 2006). Die genaue Rolle des Chaperons ist bisher nicht bekannt, jedoch wurde gezeigt, dass *CRELD2* bei ER-Stress sezerniert wird und erhöhte *CRELD2*-Spiegel im Urin mit ER-Stress-vermittelten Nierenerkrankungen in Verbindung stehen (Kim et al., 2017). Mehrere Autoren wiesen jedoch nach, dass *CRELD2* ein wichtiger Mediator bei der Knochenentwicklung ist: Eine Aktivierung des Gens in BMP9-stimulierten MSCs führt zu einer gesteigerten TNAP-Aktivität, während ein Silencing von *CRELD2* diese hemmt. Die molekularen Mechanismen der BMP9-ausgelösten osteogenen Differenzierung sind bisher jedoch unklar (Zhang et al., 2013). Darüber hinaus zeigte ein *CRELD2*-Knockout im Mausmodell eine Osteopenie mit geringer Knochendichte und veränderter trabekulärer

Architektur in den Tieren. Zudem fanden die Autoren heraus, dass *CRELD2* ein neuartiges Chaperon ist, welches den Wnt-Signalweg in der Skelettentwicklung moduliert, da sowohl *CRELD2*-Knockdown MSCs als auch Osteoblasten der Knockout-Mäuse eine signifikant reduzierte Expression von Wnt4 aufwiesen (Dennis et al., 2020). *TRIM42* (Tripartite Motif 42) gehört zu einer Familie von Proteinen, die aufgrund ihrer E3-Ubiquitin-Ligase-Aktivität in der Lage sind, Proteine posttranslational zu modifizieren und spielen somit eine Rolle in vielen biologischen Prozessen (Offermann et al., 2021). TRIM-Proteine fungieren als wichtige Regulatoren für diverse Krankheiten, jedoch wurde bisher keine direkt mit *TRIM42* in Verbindung gebracht (Watanabe and Hatakeyama, 2017). *PTPRE* (Protein Tyrosin Phosphatase Receptor Typ E) kodiert für ein Mitglied der Gruppe der Rezeptor-Protein-Tyrosin-Phosphatasen, die die posttranslationale Entfernung von Phosphatgruppen von Tyrosinresten katalysieren (Liang et al., 2019). Die Tyrosinphosphorylierung reguliert eine Vielzahl zellulärer Prozesse durch koordinierte Aktivierung und Inaktivierung von Signalproteinen. Abweichungen bei der Tyrosinphosphorylierung von Proteinen und der Signalübertragung werden häufig mit onkogenen Tumoren assoziiert (Lui et al., 2014).

Da *TRIM42* und *PTPRE* in keinerlei Verbindung mit der osteogenen Differenzierung stehen, ist insbesondere die Mutation im *CRELD2* Genlokus von besonderem Interesse. Die Region befindet sich am langen Ende von Chromosom 22 und weist einige Polymorphismen auf. Für die fragliche Stelle sind insgesamt drei Single Nucleotide Polymorphism im menschlichen Genom beschrieben, welche in der ENSEMBL Datenbank gefunden werden können: rs373989043, rs28562884 und rs774436187 (http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Variation/Explore?db=core;g=ENSG00000184164;r=22:4991916249919273;source=dbSNP;t=ENST00000328268;tl=ljy6iTnMsprGrgQr-7951187-846456636;v=rs28562884;vdb=variation;vf=185674949, aufgerufen am 11.03.2023). Die Variante rs28562884 liegt in den verwendeten Zelllinien vor. Alle drei Varianten sind im Intron lokalisiert und somit nicht kodierend. Für die Variante rs774436187 wird ein Einfluss auf das Spleißen vorausgesagt, was bei der in den Zelllinien vorliegenden Variante jedoch nicht der Fall ist. Die bestehende Mutation kommt in 5-15 % der humanen Sequenzdaten vor und ist somit nicht selten. Ausgehend von dieser Tatsache ist es daher unwahrscheinlich, dass die Mutation durch die Transfektion entstanden ist. Ein weiterer Punkt, der zudem dagegenspricht, dass die heterozygote Variante in *CRELD2* durch das CRISPR/Cas9-Verfahren induziert wurde,

besteht darin, dass die DNA-Spaltstelle von Cas9 in der Nähe der PAM-Stelle am anderen Ende der sgRNA-Zielregion liegt.

Für *HBEGF* und *EML4* konnten keine verwertbaren Ergebnisse in der Sequenzierung erzielt werden. *HBEGF* (Heparin Binding EGF like growth factor) ist ein Wachstumsfaktor, der mit hoher Affinität an den EGF-Rezeptor bindet und die EGF-Rezeptor-Signalübertragung aktiviert. Diese ist an zahlreichen physiologischen Prozessen beteiligt, einschließlich der Geweberegeneration, Tumorstadium und Angiogenese (Krampera et al., 2005). Deletionen in diesem Gen werden mit Herzhypertrophie, Leberfibrose sowie einer erhöhten Anfälligkeit für nekrotisierende Enterokolitis in Verbindung gebracht (Radulescu et al., 2010, Kim et al., 2020). *EML4* (Echinoderm microtubule-associated protein-like 4) hat eine wesentliche Funktion für die Bildung und Stabilität von Mikrotubuli. Darüber hinaus ist das Protein für die Organisation der mitotischen Spindel und die ordnungsgemäße Befestigung von Kinetochoren an den Mikrotubuli erforderlich. Mutationen in diesem Genabschnitt werden mit nicht-kleinzelligem Lungenkrebs assoziiert (Pollmann et al., 2006, Chen et al., 2015). Funktionelle Einbußen sind aufgrund der fehlenden Korrelation der beiden Gene mit der osteogenen Differenzierung nicht zu erwarten.

Vor der Durchführung einer Sequenzierung sind viele Arbeitsschritte erforderlich, die allesamt fehleranfällig sein können. Für die erfolgreiche Sequenzierung eines Genabschnittes muss zunächst DNA gewonnen und amplifiziert werden. Erfolgt die PCR nicht unter optimalen Bedingungen, können undefinierte, unerwünschte oder keine PCR Produkte entstehen. Zu den Variablen, die zur Optimierung beitragen, gehören neben $MgCl_2$ auch die Zyklusbedingungen der PCR. Bei letzterem ist die Annealing-Temperatur entscheidend für eine spezifische Bindung des Primers an die Zielsequenz (Roux, 1995). Ist die Annealing-Temperatur zu niedrig, kann der Primer unspezifisch binden; eine zu hohe Annealing-Temperatur kann dagegen dazu führen, dass kein PCR-Produkt entsteht (Wu et al., 1991). Für *HBEGF* führte die Erhöhung des $MgCl_2$ auf 5 μ l pro PCR-Ansatz und Anpassung der Annealing-Temperatur auf 60°C zum Nachweis des gewünschten PCR-Produkts im Agarosegel. Für *EML4* genügte eine Anpassung der Annealing-Temperatur auf 57°C. Unwirksame Primer werden häufig für Sequenzierungsfehler verantwortlich gemacht (Zhao et al., 2001). Die Agaroseelektrophorese zeigte jedoch für *HBEGF* und *EML4* eine klare Bande der gewünschten Größe und schließen somit einen fehlerhaften Primer als Ursache für die fehlgeschlagene Sequenzierung aus. Darüber hinaus wird in der Literatur die Bedeutung der Reinheit der

DNA für eine korrekte Sequenzierung beschrieben. Unreine DNA kann zu Rauschen in der Nukleotidkurve führen und die Qualität der Sequenzierung negativ beeinflussen (Xiao et al., 1998). Die Bestimmung des $OD_{260/280}$ -Quotienten ergab für beide Gene Werte $\geq 1,8$ und zeigt somit an, dass es sich um reine DNA-Proben handelt. Darüber hinaus wurde in der Literatur beschrieben, dass der Verlust des Reaktionsproduktes der Sequenzier-PCR durch Verwendung einer Ethanol-fällung während der Aufreinigung ursächlich für das Scheitern der Sequenzierung sein kann (Fujikura, 2015). Die genaue Ursache für die erfolglose Sequenzierung von *HBEGF* und *EML4* konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht final geklärt werden. Der Verlust des Sequenzierproduktes nach Optimierung der anderen Parameter ist jedoch sehr wahrscheinlich. Denkbare weitere Schritte, um den Verlust des Produktes als Ursache für das Scheitern der Sequenzierung auszuschließen, wären neben der Verwendung eines Aufreinigungskits ohne Ethanol-fällungsprotokoll auch der Zusatz von Glykogen, das die Bildung eines sichtbaren Pellets fördert (Maisarah et al., 2020).

Zusammenfassend deuten die Ergebnisse der Sequenzierung daraufhin, dass durch CRISPR/Cas9-basierte Genediting keine unerwünschten Veränderungen im Genom der Zelllinien aufgetreten sind. Somit lässt sich schlussfolgern, dass das eingeschränkte Differenzierungspotential nicht auf Off-Target Mutationen zurückzuführen ist und die etablierten Zelllinien ein valides *in-vitro*-Modell der HPP darstellen.

4.4 Ausblick

Die weiterführende Charakterisierung der Zelllinien in vorliegender Arbeit machte deutlich, dass die *ALPL*-defizienten Zelllinien in Abwesenheit relevanter bzw. CRISPR/Cas9-induzierter Off-Target Effekte eine große Genotyp-Phänotyp Korrelation aufweisen. Das spenderunabhängige *in-vitro*-Modell stellt somit eine solide Grundlage für weitere Experimente hinsichtlich molekularbiologischer Mechanismen im Krankheitsbild der HPP, insbesondere im dentalen Kontext, dar.

Eine Möglichkeit die Pathogenese der Odonto-HPP besser zu verstehen, ist die Untersuchung der Zementogenese. Vorzeitig exfoliierte Milchzähne von HPP-Patienten weisen keinen azellulären Zement auf, der für die Befestigung des Zahnes über Kollagenfasern in der Alveole entscheidend ist (Zweifler et al., 2015, van den Bos et al., 2005, Foster et al., 2012). Der Wnt/ β -Catenin Signalweg hat dabei eine wesentliche

Funktion bei der Bildung des Zements auf der Wurzeloberfläche (Kuchler et al., 2014). In diesem Zusammenhang könnte eine Analyse der Regulierung des Signalwegs Aufschluss über das Scheitern der Zementogenese im zervikalen Bereich der Wurzeloberfläche geben. Hierfür würden sich zunächst quantitative Analysen von Zielgenen des Wnt/ β -Catenin Signalwegs in der hTERT PDL Zelllinie sowie den *ALPL*-defizienten Zelllinien eignen.

Insbesondere sollte auch der Rolle von TNAP im Hinblick auf das Gleichgewicht zwischen den entzündungsfördernden ATP-Effekten und den entzündungshemmenden Wirkungen seines Abbauprodukts Adenosin Beachtung finden. Hier könnte die Untersuchung des extrazellulären ATP-Gehaltes in den transgenen Zelllinien sowie die Analyse von Genen, die an entzündlichen Prozessen beteiligt sind, von Interesse sein und zur Erklärung des erhöhten Risikos einer Parodontitiserkrankung bei HPP beitragen.

Besonders sollte die Weiterentwicklung der PTH-Applikationsmodelle im Fokus der Forschung stehen, um somit mögliche Therapiestrategien bei HPP zu etablieren. Die Analyse des Einflusses von PTH zeigte zum ersten Mal, dass die TNAP-Aktivität durch die PTH-Stimulation punktuell in *ALPL*-defizienten Zelllinien gesteigert werden kann. Dennoch weist die Methodik einige Limitationen auf. In der Literatur wird vermehrt von einem differenzierungshemmenden Effekt von PTH berichtet, welche durch Unterschiede im Differenzierungsstadium, der Zellkonfluenz sowie der PTH-Expositionszeit und -dosis erklärt werden (van der Horst et al., 2005, Bellows et al., 1990). Hierfür wäre beispielsweise die Testung der PTH-Protokolle in präkonfluenter Zellkultur sowie die Identifizierung eines PTH-Protokolls, das einen osteoanabolen Effekt in Wildtyp-Zellen hat, sinnvoll. Anschließend könnte dann untersucht werden, ob auch positive Effekte in den Zelllinien mit eingeschränkter TNAP-Aktivität erzielbar sind.

Darüber hinaus wäre eine Behandlung der Zellen mit dem Enzymerersatz Asfotase alfa denkbar, welches bei schweren Fällen von HPP mehrfach erfolgreich eingesetzt wurde. In diesem Kontext sollte auch die Anwendung der Protokolle auf primäres Zellmaterial von HPP-Patienten weiterverfolgt werden. Dies war im Rahmen dieser Arbeit aufgrund der Seltenheit der Erkrankung jedoch nicht möglich.

Nicht zuletzt wäre eine *in-vivo*-Analyse der *in-vitro*-Ergebnisse interessant. Entgegen der klinischen Beobachtungen deuten die Ergebnisse hier auf eine hohe Genotyp-Phänotyp Korrelation hin. Eine Übertragung der Mutationen auf den Zebrafisch wäre hilfreich, um die beobachteten Auswirkungen in den Zelllinien besser in den Kontext der HPP

einordnen zu können. Ein *in-vivo*-Modell, basierend auf einer TNAP-Inhibition durch Levamisol, wurde kürzlich etabliert und konnte bereits erste Einblicke auf molekularer Ebene bei HPP liefern (Ohlebusch et al., 2020). Eine Weiterführung des Forschungsprojektes ist in Planung. Somit könnten zukünftige Versuche in Kooperation mit der Humangenetik der Universität Würzburg geplant werden. Der Modellorganismus Zebrafisch würde nicht nur die Analyse der *ALPL*-Genexpression im Zahnhalteapparat, sondern auch der Zahnentwicklung und -struktur ermöglichen, wodurch die Zusammenhänge zwischen Genotyp und Phänotyp bei HPP weiter charakterisiert werden könnten.

5 Zusammenfassung

Hypophosphatasie (HPP) beschreibt eine seltene Erbkrankheit, die hauptsächlich durch heterozygote Mutationen im *ALPL*-Gen verursacht wird. Diese führen zu einer verminderten Aktivität der gewebeunspezifischen alkalischen Phosphatase (TNAP). Neben skelettalen Symptomen sind Zahnanomalien wie der vorzeitige Verlust von Milchzähnen ohne resorbierte Wurzel sowie eine gestörte Mineralisierung der Zahnhartsubstanzen ein typisches Merkmal der HPP. Die zugrunde liegenden molekularen Mechanismen sind bisher noch nicht vollständig verstanden.

In der vorliegenden Arbeit wurden Zelllinien des parodontalen Ligaments mit Mutationen im *ALPL*-Gen charakterisiert, um anschließend mögliche Therapiestrategien für die HPP auf molekularer Ebene zu untersuchen.

Im Rahmen der basalen Charakterisierung wurden die Zelllinien hinsichtlich der TNAP-Expression (Immunhistochemie, Western Blot), des Stoffwechselprofils (ATP-Assay) und des osteogenen Differenzierungspotenzials (Alizarin-Färbung) analysiert. Von Interesse war auch, ob durch CRISPR/Cas9-basiertes Genediting Off-Target Mutationen entstanden sind. Zur Untersuchung der molekularen Auswirkungen von PTH, welches die *ALPL*-Expression steigern kann, wurden zwei Protokolle etabliert, die eine kontinuierliche, kurzzeitige bzw. intermittierende Präsenz von PTH *in-vitro* imitieren. Anschließend wurde die *ALPL*-Expression (qPCR) sowie TNAP-Aktivität (CSPD-Assay) ermittelt.

Die basale TNAP-Expression war variabel und reichte vom völligen Fehlen in den Zelllinien mit Deletionen bis hin zu einer starken TNAP-Expression in der Zelllinie mit einer heterogenen Punktmutation. Eine niedrige Expression ging mit einer verringerten Zellproliferation sowie extrazellulären ATP einher. Es zeigte sich ein unterschiedliches Mineralisierungspotenzial, das hauptsächlich das TNAP-Expressionsniveau in den verschiedenen Zelllinien widerspiegelt, während die PTH-Stimulation keine Wirkung auf die Differenzierung hatte. Im Gegensatz zu klinischen Beobachtungen deuten die Ergebnisse auf eine hohe Korrelation zwischen Genotyp und Phänotyp *in-vitro* hin, die *in-vivo* noch bestätigt werden müssen. Die Sequenzierung bestätigte, dass durch die Geneditierung keine Off-Target Mutationen aufgetreten sind, welche somit keinen limitierenden Faktor hinsichtlich der Differenzierungskapazität darstellen können.

Die Stimulation mit PTH führte zwar nicht zu einer gesteigerten *ALPL*-Expression, doch konnte die TNAP-Aktivität in den *ALPL*-defizienten Zelllinien punktuell gesteigert werden und bildet somit eine solide Basis für weitere Experimente, die zur Therapieentwicklung für die Odonto-HPP beitragen können.

Summary

Hypophosphatasia (HPP) describes a rare inherited disorder caused mainly by heterozygous mutations in the *ALPL* gene. These lead to impaired activity of tissue non-specific alkaline phosphatase (TNAP). In addition to skeletal symptoms, dental abnormalities such as premature loss of deciduous teeth without resorption of the roots and impaired mineralization of tooth hard tissues are typical features of HPP. The underlying molecular mechanisms are not yet fully understood.

In the present study, cell lines of the periodontal ligament with mutations in the *ALPL* gene were characterized to subsequently investigate potential therapeutic strategies for HPP at the molecular level.

As part of the basal characterization, the cell lines were analyzed with respect to TNAP expression (immunohistochemistry, Western blot), metabolic profile (ATP assay) and osteogenic differentiation potential (alizarin staining). Also of interest was whether off-target mutations resulted from CRISPR/Cas9-based gene editing. To investigate the molecular effects of Parathyroid Hormone (PTH), which can increase *ALPL* expression, two protocols were established that mimic continuous, short-term, and intermittent presence of PTH *in-vitro*. *ALPL* gene expression (qPCR), as well as TNAP activity (CSPD assay) were then determined.

Basal TNAP expression was variable, ranging from complete absence in the cell lines with deletions to strong TNAP expression in the cell line with a heterogeneous point mutation. Low expression was associated with decreased cell proliferation as well as extracellular ATP. There was a differential mineralization potential mainly reflecting the TNAP expression level in the different cell lines, whereas PTH stimulation had no effect on differentiation. In contrast to clinical observations, the results indicate a high correlation between genotype and phenotype *in-vitro*, which remains to be confirmed *in-vivo*. Sequencing confirmed that no off-target mutations occurred as a result of gene editing, which thus cannot be a limiting factor with respect to differentiation capacity.

Although stimulation with PTH did not result in increased *ALPL* expression, TNAP activity was selectively increased in the *ALPL*-deficient cell lines, providing a solid basis for further experiments that may contribute to therapy development for Odonto-HPP.

6 Literaturverzeichnis

- ABBACCHIO, M. P., BURNSTOCK, G., VERKHRATSKY, A. & ZIMMERMANN, H. 2009. Purinergic signalling in the nervous system: an overview. *Trends Neurosci*, 32, 19-29.
- ABOU-SAMRA, A. B., JUPPNER, H., FORCE, T., FREEMAN, M. W., KONG, X. F., SCHIPANI, E., URENA, P., RICHARDS, J., BONVENTRE, J. V., POTTS, J. T., JR. & ET AL. 1992. Expression cloning of a common receptor for parathyroid hormone and parathyroid hormone-related peptide from rat osteoblast-like cells: a single receptor stimulates intracellular accumulation of both cAMP and inositol trisphosphates and increases intracellular free calcium. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89, 2732-6.
- ABUDUWALI, N., LOSSDORFER, S., WINTER, J., KRAUS, D., GUHLKE, S., WOLF, M. & JAGER, A. 2014. Functional characterization of the parathyroid hormone 1 receptor in human periodontal ligament cells. *Clin Oral Investig*, 18, 461-70.
- ADDISON, W. N., AZARI, F., SORENSEN, E. S., KAARTINEN, M. T. & MCKEE, M. D. 2007. Pyrophosphate inhibits mineralization of osteoblast cultures by binding to mineral, up-regulating osteopontin, and inhibiting alkaline phosphatase activity. *J Biol Chem*, 282, 15872-83.
- AGGARWAL, P. & ZAVRAS, A. 2012. Parathyroid hormone and its effects on dental tissues. *Oral Dis*, 18, 48-54.
- ANDERSON, H. C. 1995. Molecular biology of matrix vesicles. *Clin Orthop Relat Res*, 266-80.
- ANDERSON, H. C., SIPE, J. B., HESSLE, L., DHANYAMRAJU, R., ATTI, E., CAMACHO, N. P., MILLAN, J. L. & DHAMYAMRAJU, R. 2004. Impaired calcification around matrix vesicles of growth plate and bone in alkaline phosphatase-deficient mice. *Am J Pathol*, 164, 841-7.
- ANDRILLI, L. H. S., SEBINELLI, H. G., FAVARIN, B. Z., CRUZ, M. A. E., RAMOS, A. P., BOLEAN, M., MILLAN, J. L., BOTTINI, M. & CIANCAGLINI, P. 2022. NPP1 and TNAP hydrolyze ATP synergistically during biomineralization. *Purinergic Signal*.
- BAAB, D. A., PAGE, R. C. & MORTON, T. 1985. Studies of a family manifesting premature exfoliation of deciduous teeth. *J Periodontol*, 56, 403-9.
- BARRANGOU, R. & HORVATH, P. 2012. CRISPR: new horizons in phage resistance and strain identification. *Annu Rev Food Sci Technol*, 3, 143-62.
- BARROS, S. P., SILVA, M. A., SOMERMAN, M. J. & NOCITI, F. H., JR. 2003. Parathyroid hormone protects against periodontitis-associated bone loss. *J Dent Res*, 82, 791-5.
- BASHUTSKI, J. D., EBER, R. M., KINNEY, J. S., BENAVIDES, E., MAITRA, S., BRAUN, T. M., GIANNOBILE, W. V. & MCCAULEY, L. K. 2010. Teriparatide and osseous regeneration in the oral cavity. *N Engl J Med*, 363, 2396-405.
- BAUMGARTNER-SIGL, S., HABERLANDT, E., MUMM, S., SCHOLL-BURGI, S., SERGI, C., RYAN, L., ERICSON, K. L., WHYTE, M. P. & HOGLER, W. 2007. Pyridoxine-responsive seizures as the first symptom of infantile hypophosphatasia caused by two novel missense mutations (c.677T>C, p.M226T; c.1112C>T, p.T371I) of the tissue-nonspecific alkaline phosphatase gene. *Bone*, 40, 1655-61.
- BECK, C., MORBACH, H., RICHL, P., STENZEL, M. & GIRSCHICK, H. J. 2009a. How can calcium pyrophosphate crystals induce inflammation in hypophosphatasia or chronic inflammatory joint diseases? *Rheumatol Int*, 29, 229-38.
- BECK, C., MORBACH, H., STENZEL, M., SCHNEIDER, P., COLLMANN, H., GIRSCHICK, G. & GIRSCHICK, H. J. 2009b. [Hypophosphatasia]. *Klin Padiatr*, 221, 219-26.

- BELLOWS, C. G., ISHIDA, H., AUBIN, J. E. & HEERSCHKE, J. N. 1990. Parathyroid hormone reversibly suppresses the differentiation of osteoprogenitor cells into functional osteoblasts. *Endocrinology*, 127, 3111-6.
- BERKSETH, K. E., TEBBEN, P. J., DRAKE, M. T., HEFFERAN, T. E., JEWISON, D. E. & WERMERS, R. A. 2013. Clinical spectrum of hypophosphatasia diagnosed in adults. *Bone*, 54, 21-7.
- BESSUEILLE, L., BRIOLAY, A., COMO, J., MEBAREK, S., MANSOURI, C., GLEIZES, M., EL JAMAL, A., BUCHET, R., DUMONTET, C., MATERA, E. L., MORNET, E., MILLAN, J. L., FONTA, C. & MAGNE, D. 2020. Tissue-nonspecific alkaline phosphatase is an anti-inflammatory nucleotidase. *Bone*, 133, 115262.
- BIANCHI, M. L. 2015. Hypophosphatasia: an overview of the disease and its treatment. *Osteoporos Int*, 26, 2743-57.
- BIANCHI, M. L., BISHOP, N. J., GUANABENS, N., HOFMANN, C., JAKOB, F., ROUX, C., ZILLIKENS, M. C. & RARE BONE DISEASE ACTION GROUP OF THE EUROPEAN CALCIFIED TISSUE, S. 2020. Hypophosphatasia in adolescents and adults: overview of diagnosis and treatment. *Osteoporos Int*, 31, 1445-1460.
- BINDERMAN, I., GADBAN, N. & YAFFE, A. 2017. Extracellular ATP is a key modulator of alveolar bone loss in periodontitis. *Arch Oral Biol*, 81, 131-135.
- BLOCH-ZUPAN, A. 2016. Hypophosphatasia: diagnosis and clinical signs - a dental surgeon perspective. *Int J Paediatr Dent*, 26, 426-438.
- BOSKEY, A. L. 1998. Biomineralization: conflicts, challenges, and opportunities. *J Cell Biochem Suppl*, 30-31, 83-91.
- BOYCE, B. F. & XING, L. 2007. Biology of RANK, RANKL, and osteoprotegerin. *Arthritis Res Ther*, 9 Suppl 1, S1.
- BRIOT, K. & ROUX, C. 2017. Adult hypophosphatasia. *Arch Pediatr*, 24, 5S71-5S73.
- BRUCKNER, R. J., RICKLES, N. H. & PORTER, D. R. 1962. Hypophosphatasia with premature shedding of teeth and aplasia of cementum. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*, 15, 1351-69.
- BRUN-HEATH, I., TAILLANDIER, A., SERRE, J. L. & MORNET, E. 2005. Characterization of 11 novel mutations in the tissue non-specific alkaline phosphatase gene responsible for hypophosphatasia and genotype-phenotype correlations. *Mol Genet Metab*, 84, 273-7.
- BUCHET, R., MILLAN, J. L. & MAGNE, D. 2013. Multisystemic functions of alkaline phosphatases. *Methods Mol Biol*, 1053, 27-51.
- BURTIS, W. J. 1992. Parathyroid hormone-related protein: structure, function, and measurement. *Clin Chem*, 38, 2171-83.
- CAMACHO, P. M., PAINTER, S. & KADANOFF, R. 2008. Treatment of adult hypophosphatasia with teriparatide. *Endocr Pract*, 14, 204-8.
- CASTELLS, L., CASSANELLO, P., MUNIZ, F., DE CASTRO, M. J. & COUCE, M. L. 2018. Neonatal lethal hypophosphatasia: A case report and review of literature. *Medicine (Baltimore)*, 97, e13269.
- CHASE, L. R. & AURBACH, G. D. 1970. The effect of parathyroid hormone on the concentration of adenosine 3',5'-monophosphate in skeletal tissue in vitro. *J Biol Chem*, 245, 1520-6.
- CHEN, B., LIN, T., YANG, X., LI, Y., XIE, D. & CUI, H. 2016. Intermittent parathyroid hormone (1-34) application regulates cAMP-response element binding protein activity to promote the proliferation and osteogenic differentiation of bone mesenchymal stromal cells, via the cAMP/PKA signaling pathway. *Exp Ther Med*, 11, 2399-2406.
- CHEN, D., ITO, S., YUAN, H., HYODO, T., KADOMATSU, K., HAMAGUCHI, M. & SENGA, T. 2015. EML4 promotes the loading of NUDC to the spindle for mitotic progression. *Cell Cycle*, 14, 1529-39.

- CHEN, H., FU, T., MA, Y., WU, X., LI, X., LI, X., SHEN, J. & WANG, H. 2017. Intermittent administration of parathyroid hormone ameliorated alveolar bone loss in experimental periodontitis in streptozotocin-induced diabetic rats. *Arch Oral Biol*, 83, 76-84.
- CHEN, T., WANG, Y., HAO, Z., HU, Y. & LI, J. 2021. Parathyroid hormone and its related peptides in bone metabolism. *Biochem Pharmacol*, 192, 114669.
- CHOREV, M. 2002. Parathyroid hormone 1 receptor: insights into structure and function. *Recept Channels*, 8, 219-42.
- CIVITELLI, R., REID, I. R., WESTBROOK, S., AVIOLI, L. V. & HRUSKA, K. A. 1988. PTH elevates inositol polyphosphates and diacylglycerol in a rat osteoblast-like cell line. *Am J Physiol*, 255, E660-7.
- COLARD, T., FALGAYRAC, G., BERTRAND, B., NAJI, S., DEVOS, O., BALSACK, C., DELANNOY, Y. & PENEL, G. 2017. Correction: New Insights on the Composition and the Structure of the Acellular Extrinsic Fiber Cementum by Raman Analysis. *PLoS One*, 12, e0174080.
- COLE, D. E. 2008. Hypophosphatasia update: recent advances in diagnosis and treatment. *Clin Genet*, 73, 232-5.
- COLLMANN, H., MORNET, E., GATTENLOHNER, S., BECK, C. & GIRSCHICK, H. 2009. Neurosurgical aspects of childhood hypophosphatasia. *Childs Nerv Syst*, 25, 217-23.
- CONCORDET, J. P. & HAEUSSLER, M. 2018. CRISPOR: intuitive guide selection for CRISPR/Cas9 genome editing experiments and screens. *Nucleic Acids Res*, 46, W242-W245.
- CONG, L., RAN, F. A., COX, D., LIN, S., BARRETTO, R., HABIB, N., HSU, P. D., WU, X., JIANG, W., MARRAFFINI, L. A. & ZHANG, F. 2013. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science*, 339, 819-23.
- CUI, C., BI, R., LIU, W., GUAN, S., LI, P., SONG, D., XU, R., ZHENG, L., YUAN, Q., ZHOU, X. & FAN, Y. 2020. Role of PTH1R Signaling in Prx1(+) Mesenchymal Progenitors during Eruption. *J Dent Res*, 99, 1296-1305.
- DATTA, N. S. & ABOU-SAMRA, A. B. 2009. PTH and PTHrP signaling in osteoblasts. *Cell Signal*, 21, 1245-54.
- DE PAPP, A. E. & STEWART, A. F. 1993. Parathyroid hormone-related protein a peptide of diverse physiologic functions. *Trends Endocrinol Metab*, 4, 181-7.
- DENNIS, E. P., EDWARDS, S. M., JACKSON, R. M., HARTLEY, C. L., TSOMPANI, D., CAPULLI, M., TETI, A., BOOT-HANDFORD, R. P., YOUNG, D. A., PIROG, K. A. & BRIGGS, M. D. 2020. CRELD2 Is a Novel LRP1 Chaperone That Regulates Noncanonical WNT Signaling in Skeletal Development. *J Bone Miner Res*, 35, 1452-1469.
- DOCHEVA, D., PADULA, D., POPOV, C., WEISHAUPT, P., PRAGERT, M., MIOSGE, N., HICKEL, R., BOCKER, W., CLAUSEN-SCHAUMANN, H. & SCHIEKER, M. 2010. Establishment of immortalized periodontal ligament progenitor cell line and its behavioural analysis on smooth and rough titanium surface. *Eur Cell Mater*, 19, 228-41.
- DOENCH, J. G., FUSI, N., SULLENDER, M., HEGDE, M., VAIMBERG, E. W., DONOVAN, K. F., SMITH, I., TOTHOVA, Z., WILEN, C., ORCHARD, R., VIRGIN, H. W., LISTGARTEN, J. & ROOT, D. E. 2016. Optimized sgRNA design to maximize activity and minimize off-target effects of CRISPR-Cas9. *Nat Biotechnol*, 34, 184-191.
- FAUVERT, D., BRUN-HEATH, I., LIA-BALDINI, A. S., BELLAZI, L., TAILLANDIER, A., SERRE, J. L., DE MAZANCOURT, P. & MORNET, E. 2009. Mild forms of hypophosphatasia mostly result from dominant negative effect of severe alleles or from compound heterozygosity for severe and moderate alleles. *BMC Med Genet*, 10, 51.

- FLANAGAN, A. M. & CHAMBERS, T. J. 1991. Inhibition of bone resorption by bisphosphonates: interactions between bisphosphonates, osteoclasts, and bone. *Calcif Tissue Int*, 49, 407-15.
- FLEISCHMANNOVA, J., MATALOVA, E., SHARPE, P. T., MISEK, I. & RADLANSKI, R. J. 2010. Formation of the tooth-bone interface. *J Dent Res*, 89, 108-15.
- FOSTER, B. L., NAGATOMO, K. J., NOCITI, F. H., JR., FONG, H., DUNN, D., TRAN, A. B., WANG, W., NARISAWA, S., MILLAN, J. L. & SOMERMAN, M. J. 2012. Central role of pyrophosphate in acellular cementum formation. *PLoS One*, 7, e38393.
- FOSTER, B. L., NAGATOMO, K. J., TSO, H. W., TRAN, A. B., NOCITI, F. H., JR., NARISAWA, S., YADAV, M. C., MCKEE, M. D., MILLAN, J. I. & SOMERMAN, M. J. 2013. Tooth root dentin mineralization defects in a mouse model of hypophosphatasia. *J Bone Miner Res*, 28, 271-82.
- FOSTER, B. L., NOCITI, F. H., JR. & SOMERMAN, M. J. 2014. The rachitic tooth. *Endocr Rev*, 35, 1-34.
- FOSTER, B. L., TOMPKINS, K. A., RUTHERFORD, R. B., ZHANG, H., CHU, E. Y., FONG, H. & SOMERMAN, M. J. 2008. Phosphate: known and potential roles during development and regeneration of teeth and supporting structures. *Birth Defects Res C Embryo Today*, 84, 281-314.
- FRANK, R. M. 1979. Tooth enamel: current state of the art. *J Dent Res*, 58, 684-94.
- FRASER, D. 1957. Hypophosphatasia. *Am J Med*, 22, 730-46.
- FUJIKURA, K. 2015. No-wash ethanol precipitation of dye-labeled reaction products improves DNA sequencing reads. *Anal Biochem*, 468, 39-41.
- GABLE, T. O., KUMMER, A. W., LEE, L., CREAGHEAD, N. A. & MOORE, L. J. 1995. Premature loss of the maxillary primary incisors: effect on speech production. *ASDC J Dent Child*, 62, 173-9.
- GARCIA, A. F., SIMAO, A. M., BOLEAN, M., HOYLAERTS, M. F., MILLAN, J. L., CIANCAGLINI, P. & COSTA-FILHO, A. J. 2015. Effects of GPI-anchored TNAP on the dynamic structure of model membranes. *Phys Chem Chem Phys*, 17, 26295-301.
- GESEK, F. A. & FRIEDMAN, P. A. 1992. On the mechanism of parathyroid hormone stimulation of calcium uptake by mouse distal convoluted tubule cells. *J Clin Invest*, 90, 749-58.
- GILMORE, S. K., WHITSON, S. W. & BOWERS, D. E., JR. 1986. A simple method using alizarin red S for the detection of calcium in epoxy resin embedded tissue. *Stain Technol*, 61, 89-92.
- GIRSCHICK, H. J., SEYBERTH, H. W. & HUPPERTZ, H. I. 1999. Treatment of childhood hypophosphatasia with nonsteroidal antiinflammatory drugs. *Bone*, 25, 603-7.
- GOLDBERG, M., KULKARNI, A. B., YOUNG, M. & BOSKEY, A. 2011. Dentin: structure, composition and mineralization. *Front Biosci (Elite Ed)*, 3, 711-35.
- GOSEKI-SONE, M., IIMURA, T., TAKEDA, K., NIFUJI, A., OGATA, Y., YANAGISHITA, M. & OIDA, S. 1999. Expression of mRNA encoding tissue-nonspecific alkaline phosphatase in human dental tissues. *Calcif Tissue Int*, 64, 160-2.
- GRASER, S., LIEDTKE, D. & JAKOB, F. 2021. TNAP as a New Player in Chronic Inflammatory Conditions and Metabolism. *Int J Mol Sci*, 22.
- GREENFIELD, E. M. 2012. Anabolic effects of intermittent PTH on osteoblasts. *Curr Mol Pharmacol*, 5, 127-34.
- HABENER, J. F., ROSENBLATT, M. & POTTS, J. T., JR. 1984. Parathyroid hormone: biochemical aspects of biosynthesis, secretion, action, and metabolism. *Physiol Rev*, 64, 985-1053.
- HAIJISHENGALLIS, G. 2020. New developments in neutrophil biology and periodontitis. *Periodontol 2000*, 82, 78-92.

- HARRIS, H. 1990. The human alkaline phosphatases: what we know and what we don't know. *Clin Chim Acta*, 186, 133-50.
- HASSELGREN, G., FRANZEN, A. & HAMMARSTROM, L. E. 1978. Histochemical characterization of alkaline phosphatase in developing rat teeth and bone. *Scand J Dent Res*, 86, 325-36.
- HASSELL, T. M. 1993. Tissues and cells of the periodontium. *Periodontol 2000*, 3, 9-38.
- HERNANDEZ-MONJARAZ, B., SANTIAGO-OSORIO, E., MONROY-GARCIA, A., LEDESMA-MARTINEZ, E. & MENDOZA-NUNEZ, V. M. 2018. Mesenchymal Stem Cells of Dental Origin for Inducing Tissue Regeneration in Periodontitis: A Mini-Review. *Int J Mol Sci*, 19.
- HOFFDING, J. & KISLING, E. 1978. Premature loss of primary teeth: part I, its overall effect on occlusion and space in the permanent dentition. *ASDC J Dent Child*, 45, 279-83.
- HOFMANN, C., GIRSCHICK, H., MORNET, E., SCHNEIDER, D., JAKOB, F. & MENTRUP, B. 2014. Unexpected high intrafamilial phenotypic variability observed in hypophosphatasia. *Eur J Hum Genet*, 22, 1160-4.
- HOFMANN, C., GIRSCHICK, H. J., MENTRUP, B., GRASER, S., SEEFRIED, L., LIESE, J. & JAKOB, F. 2013. Clinical Aspects of Hypophosphatasia: An Update. *Clinical Reviews in Bone and Mineral Metabolism*, 11, 60-70.
- HOSHI, K., AMIZUKA, N., ODA, K., IKEHARA, Y. & OZAWA, H. 1997. Immunolocalization of tissue non-specific alkaline phosphatase in mice. *Histochem Cell Biol*, 107, 183-91.
- HOUSTON, B., STEWART, A. J. & FARQUHARSON, C. 2004. PHOSPHO1-A novel phosphatase specifically expressed at sites of mineralisation in bone and cartilage. *Bone*, 34, 629-37.
- HOUSTON, D. A., MYERS, K., MACRAE, V. E., STAINES, K. A. & FARQUHARSON, C. 2016. The Expression of PHOSPHO1, nSMase2 and TNAP is Coordinately Regulated by Continuous PTH Exposure in Mineralising Osteoblast Cultures. *Calcif Tissue Int*, 99, 510-524.
- HOYLAERTS, M. F., DING, L., NARISAWA, S., VAN KERCKHOVEN, S. & MILLAN, J. L. 2006. Mammalian alkaline phosphatase catalysis requires active site structure stabilization via the N-terminal amino acid microenvironment. *Biochemistry*, 45, 9756-66.
- HOYLAERTS, M. F., MANES, T. & MILLAN, J. L. 1997. Mammalian alkaline phosphatases are allosteric enzymes. *J Biol Chem*, 272, 22781-7.
- HOYLAERTS, M. F., VAN KERCKHOVEN, S., KIFFER-MOREIRA, T., SHEEN, C., NARISAWA, S. & MILLAN, J. L. 2015. Functional significance of calcium binding to tissue-nonspecific alkaline phosphatase. *PLoS One*, 10, e0119874.
- HUMMER, C. & MILLAN, J. L. 1991. Gly429 is the major determinant of uncompetitive inhibition of human germ cell alkaline phosphatase by L-leucine. *Biochem J*, 274 (Pt 1), 91-5.
- HUNG, M. S., CHEN, I. C., LUNG, J. H., LIN, P. Y., LI, Y. C. & TSAI, Y. H. 2016. Epidermal Growth Factor Receptor Mutation Enhances Expression of Cadherin-5 in Lung Cancer Cells. *PLoS One*, 11, e0158395.
- IKBALE EL, A., GOORHA, S., REITER, L. T. & MIRANDA-CARBONI, G. A. 2016. Effects of hTERT immortalization on osteogenic and adipogenic differentiation of dental pulp stem cells. *Data Brief*, 6, 696-9.
- ISHIZUYA, T., YOKOSE, S., HORI, M., NODA, T., SUDA, T., YOSHIKI, S. & YAMAGUCHI, A. 1997. Parathyroid hormone exerts disparate effects on osteoblast differentiation depending on exposure time in rat osteoblastic cells. *J Clin Invest*, 99, 2961-70.
- ISOGAI, Y., AKATSU, T., ISHIZUYA, T., YAMAGUCHI, A., HORI, M., TAKAHASHI, N. & SUDA, T. 1996. Parathyroid hormone regulates osteoblast differentiation

- positively or negatively depending on the differentiation stages. *J Bone Miner Res*, 11, 1384-93.
- IWASAKI, K., AKAZAWA, K., NAGATA, M., KOMAKI, M., HONDA, I., MORIOKA, C., YOKOYAMA, N., AYAME, H., YAMAKI, K., TANAKA, Y., KIMURA, T., KISHIDA, A., WATABE, T. & MORITA, I. 2019. The Fate of Transplanted Periodontal Ligament Stem Cells in Surgically Created Periodontal Defects in Rats. *Int J Mol Sci*, 20.
- JUPPNER, H., ABOU-SAMRA, A. B., FREEMAN, M., KONG, X. F., SCHIPANI, E., RICHARDS, J., KOLAKOWSKI, L. F., JR., HOCK, J., POTTS, J. T., JR., KRONENBERG, H. M. & ET AL. 1991. A G protein-linked receptor for parathyroid hormone and parathyroid hormone-related peptide. *Science*, 254, 1024-6.
- KARAPLIS, A. C., LUZ, A., GLOWACKI, J., BRONSON, R. T., TYBULEWICZ, V. L., KRONENBERG, H. M. & MULLIGAN, R. C. 1994. Lethal skeletal dysplasia from targeted disruption of the parathyroid hormone-related peptide gene. *Genes Dev*, 8, 277-89.
- KAWASE, T., OKUDA, K. & YOSHIE, H. 2007. Extracellular ATP and ATPgammaS suppress the proliferation of human periodontal ligament cells by different mechanisms. *J Periodontol*, 78, 748-56.
- KHUNDMIRI, S. J., MURRAY, R. D. & LEDERER, E. 2016. PTH and Vitamin D. *Compr Physiol*, 6, 561-601.
- KIM, S., SUBRAMANIAN, V., ABDEL-LATIF, A. & LEE, S. 2020. Role of Heparin-Binding Epidermal Growth Factor-Like Growth Factor in Oxidative Stress-Associated Metabolic Diseases. *Metab Syndr Relat Disord*, 18, 186-196.
- KIM, Y., PARK, S. J., MANSON, S. R., MOLINA, C. A., KIDD, K., THIESSEN-PHILBROOK, H., PERRY, R. J., LIAPIS, H., KMOCH, S., PARIKH, C. R., BLEYER, A. J. & CHEN, Y. M. 2017. Elevated urinary CRELD2 is associated with endoplasmic reticulum stress-mediated kidney disease. *JCI Insight*, 2.
- KONG, X. F., SCHIPANI, E., LANSKE, B., JOUN, H., KARPERIEN, M., DEFIZE, L. H., JUPPNER, H., POTTS, J. T., JR., SEGRE, G. V., KRONENBERG, H. M. & ET AL. 1994. The rat, mouse, and human genes encoding the receptor for parathyroid hormone and parathyroid hormone-related peptide are highly homologous. *Biochem Biophys Res Commun*, 201, 1058.
- KRAMER, K., CHAVEZ, M. B., TRAN, A. T., FARAH, F., TAN, M. H., KOLLI, T. N., DOS SANTOS, E. J. L., WIMER, H. F., MILLAN, J. L., SUVA, L. J., GADDY, D. & FOSTER, B. L. 2021. Dental defects in the primary dentition associated with hypophosphatasia from biallelic ALPL mutations. *Bone*, 143, 115732.
- KRAMPERA, M., PASINI, A., RIGO, A., SCUPOLI, M. T., TECCHIO, C., MALPELI, G., SCARPA, A., DAZZI, F., PIZZOLO, G. & VINANTE, F. 2005. HB-EGF/HER-1 signaling in bone marrow mesenchymal stem cells: inducing cell expansion and reversibly preventing multilineage differentiation. *Blood*, 106, 59-66.
- KRONENBERG, H. M. 2006. PTHrP and skeletal development. *Ann N Y Acad Sci*, 1068, 1-13.
- KU, C. C., WUPUTRA, K., KATO, K., PAN, J. B., LI, C. P., TSAI, M. H., NOGUCHI, M., NAKAMURA, Y., LIU, C. J., CHAN, T. F., HOU, M. F., WAKANA, S., WU, Y. C., LIN, C. S., WU, D. C. & YOKOYAMA, K. K. 2021. Deletion of Jdp2 enhances Slc7a11 expression in Atoh-1 positive cerebellum granule cell progenitors in vivo. *Stem Cell Res Ther*, 12, 369.
- KUCHLER, U., SCHWARZE, U. Y., DOBSAK, T., HEIMEL, P., BOSSHARDT, D. D., KNEISSEL, M. & GRUBER, R. 2014. Dental and periodontal phenotype in sclerostin knockout mice. *Int J Oral Sci*, 6, 70-6.
- LAROCHE, M. 2012. Failure of teriparatide in treatment of bone complications of adult hypophosphatasia. *Calcif Tissue Int*, 90, 250.

- LE DU, M. H. & MILLAN, J. L. 2002. Structural evidence of functional divergence in human alkaline phosphatases. *J Biol Chem*, 277, 49808-14.
- LEHTO, M. T. & SHAROM, F. J. 2002. PI-specific phospholipase C cleavage of a reconstituted GPI-anchored protein: modulation by the lipid bilayer. *Biochemistry*, 41, 1398-408.
- LEKIC, P., ROJAS, J., BIREK, C., TENENBAUM, H. & MCCULLOCH, C. A. 2001. Phenotypic comparison of periodontal ligament cells in vivo and in vitro. *J Periodontal Res*, 36, 71-9.
- LI, X., GONG, P. & LIAO, D. 2010. In vitro neural/glia differentiation potential of periodontal ligament stem cells. *Arch Med Sci*, 6, 678-85.
- LI, Y., HU, Z., ZHOU, C., XU, Y., HUANG, L., WANG, X. & ZOU, S. 2017. Intermittent parathyroid hormone (PTH) promotes cementogenesis and alleviates the catabolic effects of mechanical strain in cementoblasts. *BMC Cell Biol*, 18, 19.
- LIA-BALDINI, A. S., MULLER, F., TAILLANDIER, A., GIBRAT, J. F., MOUCHARD, M., ROBIN, B., SIMON-BOUY, B., SERRE, J. L., AYLSWORTH, A. S., BIETH, E., DELANOTE, S., FREISINGER, P., HU, J. C., KROHN, H. P., NUNES, M. E. & MORNET, E. 2001. A molecular approach to dominance in hypophosphatasia. *Hum Genet*, 109, 99-108.
- LIANG, J., SHI, J., WANG, N., ZHAO, H. & SUN, J. 2019. Tuning the Protein Phosphorylation by Receptor Type Protein Tyrosine Phosphatase Epsilon (PTPRE) in Normal and Cancer Cells. *J Cancer*, 10, 105-111.
- LINDSAY, R., NIEVES, J., FORMICA, C., HENNEMAN, E., WOELFERT, L., SHEN, V., DEMPSTER, D. & COSMAN, F. 1997. Randomised controlled study of effect of parathyroid hormone on vertebral-bone mass and fracture incidence among postmenopausal women on oestrogen with osteoporosis. *Lancet*, 350, 550-5.
- LINGLART, A. & BIOSSE-DUPLAN, M. 2016. Hypophosphatasia. *Curr Osteoporos Rep*, 14, 95-105.
- LIU, J., NAM, H. K., CAMPBELL, C., GASQUE, K. C., MILLAN, J. L. & HATCH, N. E. 2014. Tissue-nonspecific alkaline phosphatase deficiency causes abnormal craniofacial bone development in the *Alpl*(^{-/-}) mouse model of infantile hypophosphatasia. *Bone*, 67, 81-94.
- LIU, M., LIU, M., LIANG, X., WU, D., LI, W., SU, C., CAO, B., CHEN, J. & GONG, C. 2021a. Clinical and genetic characteristics of hypophosphatasia in Chinese children. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 16, 159.
- LIU, M., LIU, M., LIANG, X., WU, D., LI, W., SU, C., CAO, B., CHEN, J. & GONG, C. 2021b. Clinical and genetic characteristics of hypophosphatasia in Chinese children. *Orphanet J Rare Dis*, 16, 159.
- LIU, W., ZHANG, L., XUAN, K., HU, C., LIU, S., LIAO, L., LI, B., JIN, F., SHI, S. & JIN, Y. 2020. Correction: *Alpl* prevents bone ageing sensitivity by specifically regulating senescence and differentiation in mesenchymal stem cells. *Bone Res*, 8, 29.
- LOSSDORFER, S., GOTZ, W. & JAGER, A. 2005. PTH(1-34) affects osteoprotegerin production in human PDL cells in vitro. *J Dent Res*, 84, 634-8.
- LOSSDORFER, S., GOTZ, W. & JAGER, A. 2006. Parathyroid hormone modifies human periodontal ligament cell proliferation and survival in vitro. *J Periodontal Res*, 41, 519-26.
- LOSSDORFER, S., GOTZ, W. & JAGER, A. 2011. PTH(1-34)-induced changes in RANKL and OPG expression by human PDL cells modify osteoclast biology in a co-culture model with RAW 264.7 cells. *Clin Oral Investig*, 15, 941-52.
- LOW, M. G. & HUANG, K. S. 1991. Factors affecting the ability of glycosylphosphatidylinositol-specific phospholipase D to degrade the membrane anchors of cell surface proteins. *Biochem J*, 279 (Pt 2), 483-93.

- LUI, V. W., PEYSER, N. D., NG, P. K., HRITZ, J., ZENG, Y., LU, Y., LI, H., WANG, L., GILBERT, B. R., GENERAL, I. J., BAHAR, I., JU, Z., WANG, Z., PENDLETON, K. P., XIAO, X., DU, Y., VRIES, J. K., HAMMERMAN, P. S., GARRAWAY, L. A., MILLS, G. B., JOHNSON, D. E. & GRANDIS, J. R. 2014. Frequent mutation of receptor protein tyrosine phosphatases provides a mechanism for STAT3 hyperactivation in head and neck cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 111, 1114-9.
- LUNDGREN, T., WESTPHAL, O., BOLME, P., MODEER, T. & NOREN, J. G. 1991. Retrospective study of children with hypophosphatasia with reference to dental changes. *Scand J Dent Res*, 99, 357-64.
- LYU, P., LI, B., LI, P., BI, R., CUI, C., ZHAO, Z., ZHOU, X. & FAN, Y. 2021. Parathyroid Hormone 1 Receptor Signaling in Dental Mesenchymal Stem Cells: Basic and Clinical Implications. *Front Cell Dev Biol*, 9, 654715.
- MAGNUSSON, T. E. 1979. The effect of premature loss of deciduous teeth on the spacing of the permanent dentition. *Eur J Orthod*, 1, 243-9.
- MAISARAH, Y., HASHIDA, H. N. & YUSMIN, M. Y. 2020. The challenge of getting a high quality of RNA from oocyte for gene expression study. *Vet Res Forum*, 11, 179-184.
- MARTIN, T. J., MOSELEY, J. M. & WILLIAMS, E. D. 1997. Parathyroid hormone-related protein: hormone and cytokine. *J Endocrinol*, 154 Suppl, S23-37.
- MARTIN, T. J., SIMS, N. A. & SEEMAN, E. 2021. Physiological and Pharmacological Roles of PTH and PTHrP in Bone Using Their Shared Receptor, PTH1R. *Endocr Rev*, 42, 383-406.
- MASLEN, C. L., BABCOCK, D., REDIG, J. K., KAPELI, K., AKKARI, Y. M. & OLSON, S. B. 2006. CRELD2: gene mapping, alternate splicing, and comparative genomic identification of the promoter region. *Gene*, 382, 111-20.
- MCKEE, M. D., NAKANO, Y., MASICA, D. L., GRAY, J. J., LEMIRE, I., HEFT, R., WHYTE, M. P., CRINE, P. & MILLAN, J. L. 2011. Enzyme replacement therapy prevents dental defects in a model of hypophosphatasia. *J Dent Res*, 90, 470-6.
- MELMS, H., HERRMANN, M., FORSTNER, K., BHARTI, R., SCHNEIDER, D., MENTRUP, B., RUDERT, M., SCHLAGENHAUF, U., JAKOB, F. & GRASER, S. 2020. Novel molecular cues for dental defects in hypophosphatasia. *Exp Cell Res*, 392, 112026.
- MENTRUP, B., GIRSCHICK, H., JAKOB, F. & HOFMANN, C. 2017. A homozygous intronic branch-point deletion in the ALPL gene causes infantile hypophosphatasia. *Bone*, 94, 75-83.
- MERRILL, A. H., JR., SCHMELZ, E. M., DILLEHAY, D. L., SPIEGEL, S., SHAYMAN, J. A., SCHROEDER, J. J., RILEY, R. T., VOSS, K. A. & WANG, E. 1997. Sphingolipids--the enigmatic lipid class: biochemistry, physiology, and pathophysiology. *Toxicol Appl Pharmacol*, 142, 208-25.
- MEYER, J. L. 1984. Can biological calcification occur in the presence of pyrophosphate? *Arch Biochem Biophys*, 231, 1-8.
- MIAO, D. & SCUTT, A. 2002. Histochemical localization of alkaline phosphatase activity in decalcified bone and cartilage. *J Histochem Cytochem*, 50, 333-40.
- MILLAN, J. L. 2006. Alkaline Phosphatases : Structure, substrate specificity and functional relatedness to other members of a large superfamily of enzymes. *Purinergic Signal*, 2, 335-41.
- MILLAN, J. L. 2013. The role of phosphatases in the initiation of skeletal mineralization. *Calcif Tissue Int*, 93, 299-306.
- MILLAN, J. L., NARISAWA, S., LEMIRE, I., LOISEL, T. P., BOILEAU, G., LEONARD, P., GRAMATIKOVA, S., TERKELTAUB, R., CAMACHO, N. P., MCKEE, M. D., CRINE, P. & WHYTE, M. P. 2008. Enzyme replacement therapy for murine hypophosphatasia. *J Bone Miner Res*, 23, 777-87.

- MILLAN, J. L. & WHYTE, M. P. 2016. Alkaline Phosphatase and Hypophosphatasia. *Calcif Tissue Int*, 98, 398-416.
- MILLER, P. D., HATTERSLEY, G., RIIS, B. J., WILLIAMS, G. C., LAU, E., RUSSO, L. A., ALEXANDERSEN, P., ZERBINI, C. A., HU, M. Y., HARRIS, A. G., FITZPATRICK, L. A., COSMAN, F., CHRISTIANSEN, C. & INVESTIGATORS, A. S. 2016. Effect of Abaloparatide vs Placebo on New Vertebral Fractures in Postmenopausal Women With Osteoporosis: A Randomized Clinical Trial. *JAMA*, 316, 722-33.
- MORNET, E. 2007. Hypophosphatasia. *Orphanet J Rare Dis*, 2, 40.
- MORNET, E. 2015. Molecular Genetics of Hypophosphatasia and Phenotype-Genotype Correlations. *Subcell Biochem*, 76, 25-43.
- MORNET, E. 2017. Genetics of hypophosphatasia. *Archives de Pédiatrie*, 24, 5S51-5S56.
- MORNET, E. 2018. Hypophosphatasia. *Metabolism*, 82, 142-155.
- MORNET, E., STURA, E., LIA-BALDINI, A. S., STIGBRAND, T., MENEZ, A. & LE DU, M. H. 2001. Structural evidence for a functional role of human tissue nonspecific alkaline phosphatase in bone mineralization. *J Biol Chem*, 276, 31171-8.
- MORNET, E., TAILLANDIER, A., DOMINGUES, C., DUFOUR, A., BENALOUN, E., LAVAUD, N., WALLON, F., ROUSSEAU, N., CHARLE, C., GUBERTO, M., MUTI, C. & SIMON-BOUY, B. 2021. Hypophosphatasia: a genetic-based nosology and new insights in genotype-phenotype correlation. *Eur J Hum Genet*, 29, 289-299.
- MORNET, E., YVARD, A., TAILLANDIER, A., FAUVERT, D. & SIMON-BOUY, B. 2011. A molecular-based estimation of the prevalence of hypophosphatasia in the European population. *Ann Hum Genet*, 75, 439-45.
- MOSELEY, J. M. & GILLESPIE, M. T. 1995. Parathyroid hormone-related protein. *Crit Rev Clin Lab Sci*, 32, 299-343.
- MURSHED, M. 2018. Mechanism of Bone Mineralization. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 8.
- NAGATA, M., ONO, N. & ONO, W. 2020. Mesenchymal Progenitor Regulation of Tooth Eruption: A View from PTHrP. *J Dent Res*, 99, 133-142.
- NANCI, A. & BOSSHARDT, D. D. 2006. Structure of periodontal tissues in health and disease. *Periodontol 2000*, 40, 11-28.
- NARISAWA, S., FROHLANDER, N. & MILLAN, J. L. 1997. Inactivation of two mouse alkaline phosphatase genes and establishment of a model of infantile hypophosphatasia. *Dev Dyn*, 208, 432-46.
- NARISAWA, S., YADAV, M. C. & MILLAN, J. L. 2013. In vivo overexpression of tissue-nonspecific alkaline phosphatase increases skeletal mineralization and affects the phosphorylation status of osteopontin. *J Bone Miner Res*, 28, 1587-98.
- NEER, R. M., ARNAUD, C. D., ZANCHETTA, J. R., PRINCE, R., GAICH, G. A., REGINSTER, J. Y., HODSMAN, A. B., ERIKSEN, E. F., ISH-SHALOM, S., GENANT, H. K., WANG, O. & MITLAK, B. H. 2001. Effect of parathyroid hormone (1-34) on fractures and bone mineral density in postmenopausal women with osteoporosis. *N Engl J Med*, 344, 1434-41.
- NINOMIYA, T., HIRAGA, T., HOSOYA, A., OHNUMA, K., ITO, Y., TAKAHASHI, M., ITO, S., ASASHIMA, M. & NAKAMURA, H. 2014. Enhanced bone-forming activity of side population cells in the periodontal ligament. *Cell Transplant*, 23, 691-701.
- OFFERMANN, A., KANG, D., WATERMANN, C., WEINGART, A., HUPE, M. C., SARAJI, A., STEGMANN-FREHSE, J., KRUPER, R., SCHULE, R., PANTEL, K., TAUBERT, H., DUENSING, S., CULIG, Z., AIGNER, A., KLAPPER, W., JONIGK, D., PHILIPP KUHNEL, M., MERSEBURGER, A. S., KIRFEL, J., SAILER, V. & PERNER, S. 2021. Analysis of tripartite motif (TRIM) family gene expression in prostate cancer bone metastases. *Carcinogenesis*, 42, 1475-1484.

- OFFIAH, A. C., VOCKLEY, J., MUNNS, C. F. & MUROTSUKI, J. 2019. Differential diagnosis of perinatal hypophosphatasia: radiologic perspectives. *Pediatric Radiology*, 49, 3-22.
- OH-HASHI, K., KOGA, H., IKEDA, S., SHIMADA, K., HIRATA, Y. & KIUCHI, K. 2009. CRELD2 is a novel endoplasmic reticulum stress-inducible gene. *Biochem Biophys Res Commun*, 387, 504-10.
- OHLEBUSCH, B., BORST, A., FRANKENBACH, T., KLOPOCKI, E., JAKOB, F., LIEDTKE, D. & GRASER, S. 2020. Investigation of *alpl* expression and Tnap-activity in zebrafish implies conserved functions during skeletal and neuronal development. *Sci Rep*, 10, 13321.
- OLSSON, A., MATSSON, L., BLOMQUIST, H. K., LARSSON, A. & SJODIN, B. 1996. Hypophosphatasia affecting the permanent dentition. *J Oral Pathol Med*, 25, 343-7.
- ONO, W., SAKAGAMI, N., NISHIMORI, S., ONO, N. & KRONENBERG, H. M. 2016. Parathyroid hormone receptor signalling in osterix-expressing mesenchymal progenitors is essential for tooth root formation. *Nat Commun*, 7, 11277.
- OUYANG, H., MCCAULEY, L. K., BERRY, J. E., D'ERRICO, J. A., STRAYHORN, C. L. & SOMERMAN, M. J. 2000. Response of immortalized murine cementoblasts/periodontal ligament cells to parathyroid hormone and parathyroid hormone-related protein in vitro. *Arch Oral Biol*, 45, 293-303.
- PAL, K., MELCHER, K. & XU, H. E. 2012. Structure and mechanism for recognition of peptide hormones by Class B G-protein-coupled receptors. *Acta Pharmacol Sin*, 33, 300-11.
- PANG, X., ZHUANG, Y., LI, Z., JING, S., CAI, Q., ZHANG, F., XUE, C. & YU, J. 2020. Intermittent Administration of Parathyroid Hormone Enhances Odonto/Osteogenic Differentiation of Stem Cells from the Apical Papilla via JNK and P38 MAPK Pathways. *Stem Cells Int*, 2020, 5128128.
- PANIGRAHI, A. & O'MALLEY, B. W. 2021. Mechanisms of enhancer action: the known and the unknown. *Genome Biol*, 22, 108.
- PARTRIDGE, N. C., BLOCH, S. R. & PEARMAN, A. T. 1994. Signal transduction pathways mediating parathyroid hormone regulation of osteoblastic gene expression. *J Cell Biochem*, 55, 321-7.
- PAULI, R. M., MODAFF, P., SIPES, S. L. & WHYTE, M. P. 1999. Mild hypophosphatasia mimicking severe osteogenesis imperfecta in utero: bent but not broken. *Am J Med Genet*, 86, 434-8.
- PETTENGILL, M., MATUTE, J. D., TRESENITER, M., HIBBERT, J., BURGNER, D., RICHMOND, P., MILLAN, J. L., OZONOFF, A., STRUNK, T., CURRIE, A. & LEVY, O. 2017. Human alkaline phosphatase dephosphorylates microbial products and is elevated in preterm neonates with a history of late-onset sepsis. *PLoS One*, 12, e0175936.
- PHILBRICK, W. M., WYSOLMERSKI, J. J., GALBRAITH, S., HOLT, E., ORLOFF, J. J., YANG, K. H., VASAVADA, R. C., WEIR, E. C., BROADUS, A. E. & STEWART, A. F. 1996. Defining the roles of parathyroid hormone-related protein in normal physiology. *Physiol Rev*, 76, 127-73.
- POLLMANN, M., PARWARESCH, R., ADAM-KLAGES, S., KRUSE, M. L., BUCK, F. & HEIDEBRECHT, H. J. 2006. Human EML4, a novel member of the EMAP family, is essential for microtubule formation. *Exp Cell Res*, 312, 3241-51.
- RADULESCU, A., YU, X., ORVETS, N. D., CHEN, Y., ZHANG, H. Y. & BESNER, G. E. 2010. Deletion of the heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor gene increases susceptibility to necrotizing enterocolitis. *J Pediatr Surg*, 45, 729-34.

- RAN, F. A., HSU, P. D., WRIGHT, J., AGARWALA, V., SCOTT, D. A. & ZHANG, F. 2013. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nature Protocols*, 8, 2281-2308.
- RATHBUN, J. C. 1948. Hypophosphatasia; a new developmental anomaly. *Am J Dis Child*, 75, 822-31.
- REIBEL, A., MANIERE, M. C., CLAUSS, F., DROZ, D., ALEMBIK, Y., MORNET, E. & BLOCH-ZUPAN, A. 2009. Orofacial phenotype and genotype findings in all subtypes of hypophosphatasia. *Orphanet J Rare Dis*, 4, 6.
- ROBERTS, S. J., STEWART, A. J., SADLER, P. J. & FARQUHARSON, C. 2004. Human PHOSPHO1 exhibits high specific phosphoethanolamine and phosphocholine phosphatase activities. *Biochem J*, 382, 59-65.
- ROCKMAN-GREENBERG, C. 2013. Hypophosphatasia. *Pediatr Endocrinol Rev*, 10 Suppl 2, 380-8.
- ROUX, K. H. 1995. Optimization and troubleshooting in PCR. *PCR Methods Appl*, 4, S185-94.
- SAKWE, A. M., ENGSTROM, A., LARSSON, M. & RASK, L. 2002. Biosynthesis and secretion of parathyroid hormone are sensitive to proteasome inhibitors in dispersed bovine parathyroid cells. *J Biol Chem*, 277, 17687-95.
- SAMMON, P. J., STACEY, R. E. & BRONNER, F. 1970. Role of parathyroid hormone in calcium homeostasis and metabolism. *Am J Physiol*, 218, 479-85.
- SANGER, F., NICKLEN, S. & COULSON, A. R. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 74, 5463-7.
- SAWAI, H., KANAZAWA, N., TSUKAHARA, Y., KOIKE, K., UDAGAWA, H., KOYAMA, K. & MORNET, E. 2003. Severe perinatal hypophosphatasia due to homozygous deletion of T at nucleotide 1559 in the tissue nonspecific alkaline phosphatase gene. *Prenat Diagn*, 23, 743-6.
- SCHALIN-JANTTI, C., MORNET, E., LAMMINEN, A. & VALIMAKI, M. J. 2010. Parathyroid hormone treatment improves pain and fracture healing in adult hypophosphatasia. *J Clin Endocrinol Metab*, 95, 5174-9.
- SEO, B. M., MIURA, M., GRONTHOS, S., BARTOLD, P. M., BATOULI, S., BRAHIM, J., YOUNG, M., ROBNEY, P. G., WANG, C. Y. & SHI, S. 2004. Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *Lancet*, 364, 149-55.
- SHAPIRO, J. R. & LEWIECKI, E. M. 2017. Hypophosphatasia in Adults: Clinical Assessment and Treatment Considerations. *J Bone Miner Res*, 32, 1977-1980.
- SHAROM, F. J. & LEHTO, M. T. 2002. Glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins: structure, function, and cleavage by phosphatidylinositol-specific phospholipase C. *Biochem Cell Biol*, 80, 535-49.
- SIDDAPPA, R., MARTENS, A., DOORN, J., LEUSINK, A., OLIVO, C., LICHT, R., VAN RIJN, L., GASPAR, C., FODDE, R., JANSSEN, F., VAN BLITTERSWIJK, C. & DE BOER, J. 2008. cAMP/PKA pathway activation in human mesenchymal stem cells in vitro results in robust bone formation in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105, 7281-6.
- SILVA, B. C. & BILEZIKIAN, J. P. 2015. Parathyroid hormone: anabolic and catabolic actions on the skeleton. *Curr Opin Pharmacol*, 22, 41-50.
- SILVA, B. C., COSTA, A. G., CUSANO, N. E., KOUSTENI, S. & BILEZIKIAN, J. P. 2011. Catabolic and anabolic actions of parathyroid hormone on the skeleton. *J Endocrinol Invest*, 34, 801-10.
- SILVENT, J., GASSE, B., MORNET, E. & SIRE, J. Y. 2014. Molecular evolution of the tissue-nonspecific alkaline phosphatase allows prediction and validation of missense mutations responsible for hypophosphatasia. *J Biol Chem*, 289, 24168-79.

- SIM, I. W., BORROMEO, G. L., TSAO, C., HARDIMAN, R., HOFMAN, M. S., PAPATZIAMOS HJELLE, C., SIDDIQUE, M., COOK, G. J. R., SEYMOUR, J. F. & EBELING, P. R. 2020. Teriparatide Promotes Bone Healing in Medication-Related Osteonecrosis of the Jaw: A Placebo-Controlled, Randomized Trial. *J Clin Oncol*, 38, 2971-2980.
- SIMMER, J. P., PAPAGERAKIS, P., SMITH, C. E., FISHER, D. C., ROUNTREY, A. N., ZHENG, L. & HU, J. C. 2010. Regulation of dental enamel shape and hardness. *J Dent Res*, 89, 1024-38.
- STELLZIG-EISENHAUER, A., DECKER, E., MEYER-MARCOTTY, P., RAU, C., FIEBIG, B. S., KRESS, W., SAAR, K., RUSCHENDORF, F., HUBNER, N., GRIMM, T., WITT, E. & WEBER, B. H. 2010. Primary failure of eruption (PFE)--clinical and molecular genetics analysis. *J Orofac Orthop*, 71, 6-16.
- SUBRAMANIAN, H., DORING, F., KOLLERT, S., RUKOYATKINA, N., STURM, J., GAMBARYAN, S., STELLZIG-EISENHAUER, A., MEYER-MARCOTTY, P., EIGENTHALER, M. & WISCHMEYER, E. 2016. PTH1R Mutants Found in Patients with Primary Failure of Tooth Eruption Disrupt G-Protein Signaling. *PLoS One*, 11, e0167033.
- SUTTON, R. A., MUMM, S., COBURN, S. P., ERICSON, K. L. & WHYTE, M. P. 2012. "Atypical femoral fractures" during bisphosphonate exposure in adult hypophosphatasia. *J Bone Miner Res*, 27, 987-94.
- SWARTHOUT, J. T., D'ALONZO, R. C., SELVAMURUGAN, N. & PARTRIDGE, N. C. 2002. Parathyroid hormone-dependent signaling pathways regulating genes in bone cells. *Gene*, 282, 1-17.
- TAMURA, Y. & KAJI, H. 2013. [Parathyroid hormone and Wnt signaling]. *Clin Calcium*, 23, 847-52.
- TASCAU, L., GARDNER, T., ANAN, H., YONGPRAVAT, C., CARDOZO, C. P., BAUMAN, W. A., LEE, F. Y., OH, D. S. & TAWFEEK, H. A. 2016. Activation of Protein Kinase A in Mature Osteoblasts Promotes a Major Bone Anabolic Response. *Endocrinology*, 157, 112-126.
- TYCKO, J., WAINBERG, M., MARINOV, G. K., URSU, O., HESS, G. T., EGO, B. K., ARADHANA, LI, A., TRUONG, A., TREVINO, A. E., SPEES, K., YAO, D., KAPLOW, I. M., GREENSIDE, P. G., MORGENS, D. W., PHANSTIEL, D. H., SNYDER, M. P., BINTU, L., GREENLEAF, W. J., KUNDAJE, A. & BASSIK, M. C. 2019. Mitigation of off-target toxicity in CRISPR-Cas9 screens for essential non-coding elements. *Nat Commun*, 10, 4063.
- URRACA, N., MEMON, R., EL-IYACHI, I., GOORHA, S., VALDEZ, C., TRAN, Q. T., SCROGGS, R., MIRANDA-CARBONI, G. A., DONALDSON, M., BRIDGES, D. & REITER, L. T. 2015. Characterization of neurons from immortalized dental pulp stem cells for the study of neurogenetic disorders. *Stem Cell Res*, 15, 722-730.
- VALENZA, G., BURGEMEISTER, S., GIRSCHICK, H., SCHOEN, C., VEIHELMANN, S., MOTER, A., HABAN, V., VOGEL, U. & SCHLAGENHAUF, U. 2006. Analysis of the periodontal microbiota in childhood-type hypophosphatasia. *Int J Med Microbiol*, 296, 493-500.
- VAN DEN BOS, T., HANDOKO, G., NIEHOF, A., RYAN, L. M., COBURN, S. P., WHYTE, M. P. & BEERTSEN, W. 2005. Cementum and dentin in hypophosphatasia. *J Dent Res*, 84, 1021-5.
- VAN DER HORST, G., FARIH-SIPS, H., LOWIK, C. W. & KARPERIEN, M. 2005. Multiple mechanisms are involved in inhibition of osteoblast differentiation by PTHrP and PTH in KS483 Cells. *J Bone Miner Res*, 20, 2233-44.
- VILLA-SUAREZ, J. M., GARCIA-FONTANA, C., ANDUJAR-VERA, F., GONZALEZ-SALVATIERRA, S., DE HARO-MUNOZ, T., CONTRERAS-BOLIVAR, V., GARCIA-FONTANA, B. & MUNOZ-TORRES, M. 2021. Hypophosphatasia: A Unique Disorder of Bone Mineralization. *Int J Mol Sci*, 22.

- WATANABE, H., UMEDA, M., SEKI, T. & ISHIKAWA, I. 1993. Clinical and laboratory studies of severe periodontal disease in an adolescent associated with hypophosphatasia. A case report. *J Periodontol*, 64, 174-80.
- WATANABE, M. & HATAKEYAMA, S. 2017. TRIM proteins and diseases. *J Biochem*, 161, 135-144.
- WEIN, M. N. & KRONENBERG, H. M. 2018. Regulation of Bone Remodeling by Parathyroid Hormone. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 8.
- WEISS, M. J., COLE, D. E., RAY, K., WHYTE, M. P., LAFFERTY, M. A., MULIVOR, R. A. & HARRIS, H. 1988. A missense mutation in the human liver/bone/kidney alkaline phosphatase gene causing a lethal form of hypophosphatasia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 85, 7666-9.
- WEISS, M. J., HENTHORN, P. S., LAFFERTY, M. A., SLAUGHTER, C., RADUCHA, M. & HARRIS, H. 1986. Isolation and characterization of a cDNA encoding a human liver/bone/kidney-type alkaline phosphatase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 83, 7182-6.
- WENKERT, D., MCALISTER, W. H., COBURN, S. P., ZEREGA, J. A., RYAN, L. M., ERICSON, K. L., HERSH, J. H., MUMM, S. & WHYTE, M. P. 2011. Hypophosphatasia: nonlethal disease despite skeletal presentation in utero (17 new cases and literature review). *J Bone Miner Res*, 26, 2389-98.
- WHYTE, M. P. 2012. Chapter 28 - Hypophosphatasia. In: GLORIEUX, F. H., PETTIFOR, J. M. & JÜPPNER, H. (eds.) *Pediatric Bone (Second Edition)*. San Diego: Academic Press.
- WHYTE, M. P. 2016. Hypophosphatasia - aetiology, nosology, pathogenesis, diagnosis and treatment. *Nat Rev Endocrinol*, 12, 233-46.
- WHYTE, M. P. 2017. Hypophosphatasia: An overview For 2017. *Bone*, 102, 15-25.
- WHYTE, M. P., MAHUREN, J. D., VRABEL, L. A. & COBURN, S. P. 1985. Markedly increased circulating pyridoxal-5'-phosphate levels in hypophosphatasia. Alkaline phosphatase acts in vitamin B6 metabolism. *J Clin Invest*, 76, 752-6.
- WHYTE, M. P., MUMM, S. & DEAL, C. 2007. Adult hypophosphatasia treated with teriparatide. *J Clin Endocrinol Metab*, 92, 1203-8.
- WHYTE, M. P., MURPHY, W. A. & FALLON, M. D. 1982. Adult hypophosphatasia with chondrocalcinosis and arthropathy. Variable penetrance of hypophosphatasemia in a large Oklahoma kindred. *Am J Med*, 72, 631-41.
- WHYTE, M. P., ROCKMAN-GREENBERG, C., OZONO, K., RIESE, R., MOSELEY, S., MELIAN, A., THOMPSON, D. D., BISHOP, N. & HOFMANN, C. 2016. Asfotase Alfa Treatment Improves Survival for Perinatal and Infantile Hypophosphatasia. *J Clin Endocrinol Metab*, 101, 334-42.
- WHYTE, M. P., ZHANG, F., WENKERT, D., MCALISTER, W. H., MACK, K. E., BENIGNO, M. C., COBURN, S. P., WAGY, S., GRIFFIN, D. M., ERICSON, K. L. & MUMM, S. 2015. Hypophosphatasia: validation and expansion of the clinical nosology for children from 25 years experience with 173 pediatric patients. *Bone*, 75, 229-39.
- WOLF, M., JAGER, A., ABUDUWALI, N., GOTZ, W. & LOSSDORFER, S. 2013. Continuous PTH modulates alkaline phosphatase activity in human PDL cells via protein kinase C dependent pathways in vitro. *Ann Anat*, 195, 455-60.
- WU, D. Y., UGOZZOLI, L., PAL, B. K., QIAN, J. & WALLACE, R. B. 1991. The effect of temperature and oligonucleotide primer length on the specificity and efficiency of amplification by the polymerase chain reaction. *DNA Cell Biol*, 10, 233-8.
- XIAO, C., ZHANG, S., WU, H. & XIA, Q. 1998. [The influence of several factors on automated DNA sequencing]. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi*, 15, 238-41.
- YADAV, M. C., DE OLIVEIRA, R. C., FOSTER, B. L., FONG, H., CORY, E., NARISAWA, S., SAH, R. L., SOMERMAN, M., WHYTE, M. P. & MILLAN, J. L. 2012. Enzyme

- replacement prevents enamel defects in hypophosphatasia mice. *J Bone Miner Res*, 27, 1722-34.
- YADAV, M. C., SIMAO, A. M., NARISAWA, S., HUESA, C., MCKEE, M. D., FARQUHARSON, C. & MILLAN, J. L. 2011. Loss of skeletal mineralization by the simultaneous ablation of PHOSPHO1 and alkaline phosphatase function: a unified model of the mechanisms of initiation of skeletal calcification. *J Bone Miner Res*, 26, 286-97.
- YANG, H., WANG, L., GENG, J., YU, T., YAO, R. E., SHEN, Y., YIN, L., YING, D., HUANG, R., ZHOU, Y., CHEN, H., LIU, L., MO, X., SHEN, Y., FU, Q. & YU, Y. 2013. Characterization of six missense mutations in the tissue-nonspecific alkaline phosphatase (TNSALP) gene in Chinese children with hypophosphatasia. *Cell Physiol Biochem*, 32, 635-44.
- YOSHIDA, W., MATSUGAMI, D., MURAKAMI, T., BIZENJIMA, T., IMAMURA, K., SESHIMA, F. & SAITO, A. 2019. Combined effects of systemic parathyroid hormone (1-34) and locally delivered neutral self-assembling peptide hydrogel in the treatment of periodontal defects: An experimental in vivo investigation. *J Clin Periodontol*, 46, 1030-1040.
- ZHANG, D., ZHANG, S., WANG, J., LI, Q., XUE, H., SHENG, R., XIONG, Q., QI, X., WEN, J., FAN, Y., ZHOU, B. O. & YUAN, Q. 2020. LepR-Expressing Stem Cells Are Essential for Alveolar Bone Regeneration. *J Dent Res*, 99, 1279-1286.
- ZHANG, J., WENG, Y., LIU, X., WANG, J., ZHANG, W., KIM, S. H., ZHANG, H., LI, R., KONG, Y., CHEN, X., SHUI, W., WANG, N., ZHAO, C., WU, N., HE, Y., NAN, G., CHEN, X., WEN, S., ZHANG, H., DENG, F., WAN, L., LUU, H. H., HAYDON, R. C., SHI, L. L., HE, T. C. & SHI, Q. 2013. Endoplasmic reticulum (ER) stress inducible factor cysteine-rich with EGF-like domains 2 (Creld2) is an important mediator of BMP9-regulated osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *PLoS One*, 8, e73086.
- ZHANG, Z., NAM, H. K., CROUCH, S. & HATCH, N. E. 2021. Tissue Nonspecific Alkaline Phosphatase Function in Bone and Muscle Progenitor Cells: Control of Mitochondrial Respiration and ATP Production. *Int J Mol Sci*, 22.
- ZHAO, Q., PAN, P., WEN, N. & SHAO, Y. M. 2001. [The influential factors on DNA cycle sequencing and data evaluation of practical example]. *Zhonghua Shi Yan He Lin Chuang Bing Du Xue Za Zhi*, 15, 283-6.
- ZURUTUZA, L., MULLER, F., GIBRAT, J. F., TAILLANDIER, A., SIMON-BOUY, B., SERRE, J. L. & MORNET, E. 1999. Correlations of genotype and phenotype in hypophosphatasia. *Hum Mol Genet*, 8, 1039-46.
- ZWEIFLER, L. E., PATEL, M. K., NOCITI, F. H., JR., WIMER, H. F., MILLAN, J. L., SOMERMAN, M. J. & FOSTER, B. L. 2015. Counter-regulatory phosphatases TNAP and NPP1 temporally regulate tooth root cementogenesis. *Int J Oral Sci*, 7, 27-41.

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
<i>ABCC8</i>	ATP-Binding-Cassette Subfamily C Member 8
AMP, ADP, ATP	Adenosinmonophosphat, -diphosphat, -triphosphat
<i>ALPI</i>	Intestinale Alkalische Phosphatase
AP, auch <i>ALPL</i>	Alkalische Phosphatase
<i>ALPP</i>	Plazentale Alkalische Phosphatase
ANKH	Ankylosis Progressive Homolog
ANOVA	Analysis of Variance
APS	Ammoniumperoxidsulfat
AS	Aminosäure
as	antisense
<i>B2M</i>	Beta-Mikroglobulin
BMSCs	Bone marrow derived mesenchymal stem cells, Stammzellen des Knochens
bp	base pair, Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
<i>BSP</i>	Bone Sialoprotein
C	Cytosin
<i>C15orf41</i>	Chromosom 15 Open Reading Frame 41
<i>C3orf30</i>	Chromosom 3 Open Reading Frame 30
cAMP	cyclic AMP, zyklisches Adenosinmonophosphat
Cas	CRISPR assoziiertes Gen
cDNA	complementary deoxyribonucleic acid, komplementäre Desoxyribonukleinsäure
<i>CHCHD2P8</i>	Coiled-Coil-Helix-Coiled-Coil-Helix Domain Containing 2 Pseudogene 8
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CPC	Cetylpyridiniumchlorid-Lösung
CRE	cAMP reagierendes Element
<i>CRELD2</i>	Cystein rich with epidermal growth factor like domain 2
CRISPR	clustered regularly interspaced short palindromic repeats
crRNA	CRISPR RNA
DAG	Diacylglycerol
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
dH ₂ O	destilliertes Wasser
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser

ddNTP	Didesoxyribonukleotidphosphat
DMP1	Dentin Matrix Acidic Phosphoprotein 1
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotidphosphat
DNE	Dominant-negativer Effekt
DPSCs	Dental pulp stem cells, Stammzellen aus der Pulpa
ECM	Extrazellulärmatrix
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
<i>EML4</i>	Echinoderm microtubule-associated protein-like4
ENPP1	Ektonukleotid Pyrophosphatase Phosphodiesterase 1
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERT	Enzymersatztherapie
et. al	Et altera, und andere
FCS	Fetal calf serum / Fötales Kälberserum
FGF	Fibroblast Growth Factor/ Fibroblasten Wachstumsfaktor
G	Guanin
GABA	γ -Aminobuttersäure
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
HA	Hydroxylapatit
<i>HBEGF</i>	Heparin Binding EGF like growth factor
HPP	Hypophosphatasie
HSP60	Hitzeschockprotein 60
hTERT	Humane Telomerase Reverse Transkriptase
H ₂ O	Wasser
IP3	Inositoltrisphosphat
kDa	Kilo Dalton
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
mRNA	messenger RNA
MSC	Mesenchymale Stammzellen
MV	Matrix Vesikel
<i>NCOR2</i>	Nuclear Receptor Corepressor 2
OPN	Osteopontin
P2X7	P2X-Purinozeptor 7
PAM	protospacer adjacent motif

PBS	Phosphat buffered saline / Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PBST	PBS mit Tween
PCh	Phosphocholin
PCR	Polymerase Chain Reaction/ Polymerasekettenreaktion
PDL	Parodontales Ligament
PDLSCs	Periodontal ligament stem cells, Stammzellen des parodontalen Ligaments
PEA	Phosphoethanolamin
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
PFA	Paraformaldehyd
PHOSPHO1	Phosphatase Orphan 1
Pi	Anorganisches Phosphat
PI	Proteinaseinhibitor
PIP ₂	Phosphatidylinositolbisphosphat
PKA	Proteinkinase-A
PKC	Proteinkinase-C
PLC	Phospholipase C
PLP	Pyridoxalphosphat
<i>PPARG</i>	Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor-Gamma
PPi	Pyrophosphat
PTH	Parathormon
PTH1R	Parathormon-Rezeptor 1
PTHrP	Parathormon-related Protein
<i>PTPRE</i>	Protein-Tyrosin-Phosphatase Receptor Typ E
qPCR	Quantitative Echtzeit-Polymerasekettenreaktion
RANKL	Rezeptor activator of nuclear factor kB ligand
RefSeq	Referenzsequenz
RNA	Ribonukleinsäure
<i>RNF168</i>	Ring Finger Protein 168
rpm	rounds per minute, Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
<i>RUNX2</i>	Runt-Related Transcription Factor 2
s	sense
s.	siehe
SDS	Natriumdodecylsulfat
sgRNA	Single guide RNA

SMPD3	Sphingomyelin Phosphodiesterase 3
SNPs	Single Nucleotide Polymorphism
<i>SVEP1</i>	Sushi, von Willebrand factor type A, EGF and pentraxin domain containing 1
T	Thymin
TBS	Tris
TE Puffer	Tris EDTA Puffer
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TNAP	Tissue-nonspecific alkaline phosphatase, Gewebe-unspezifische AP
tracrRNA	trans-aktivierenden cRNA
<i>TRIM42</i>	Tripartite Motif 42
<i>TSSC1</i>	Tumor Suppression Subtransferable Candidate 1
vgl.	vergleiche
<i>WDR</i>	WD Repeat Domain
WT	Wildtyp

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Substrate der TNAP.	5
Abbildung 2: Modell des Mineralisierungsprozess.	6
Abbildung 3: Signalwege des PTH1R.	14
Abbildung 4: Exemplarisches <i>in-vitro</i>-Applikationsprotokoll von PTH.	16
Abbildung 5: Zellen in Kultur.	18
Abbildung 6: Administration von Parathormon auf die Zellkulturmodelle.	24
Abbildung 7: Exemplarische Ergebnisse der Analyse kodierender Bereiche nach CRISPR/Cas9-basierter Geneditierung mit dem ALPL1 Konstrukt.	40
Abbildung 8: Exemplarische Ergebnisse der Analyse kodierender Bereiche nach CRISPR/Cas9-basierter Geneditierung mit dem ALPL2 Konstrukt.	40
Abbildung 9: Immunzytochemische Färbung der TNAP.	41
Abbildung 10: Semiquantitativer Nachweis der TNAP im Western Blot.	42
Abbildung 11: Populationsverdopplung/Tag.	43
Abbildung 12: Messung des intrazellulären ATP-Gehalts.	44
Abbildung 13: Immunzytochemische Färbung des HSP60.	45
Abbildung 14: HSP60-Quantifizierung.	46
Abbildung 15: Relative Genexpression unmittelbar nach PTH-Stimulation in PDLSCs.	48
Abbildung 16: Messung der TNAP-Aktivität mittels CSPD-Assay wenige Stunden nach PTH-Exposition.	49
Abbildung 17: Relative Genexpression von <i>ALPL</i> im Langzeitversuch mit PTH in den PDLSCs.	50
Abbildung 18: Alizarin Färbung zum Nachweis der osteogenen Differenzierung bei Anwesenheit von PTH.	52
Abbildung 19: Relative Genexpression von <i>ALPL</i> nach PTH-Stimulation in <i>ALPL</i>-defizienten Zelllinien nach 1 h, 3 h und 6 h.	54
Abbildung 20: Relative Genexpression von <i>PHOSPHO1</i> nach PTH-Stimulation in <i>ALPL</i>-defizienten Zelllinien nach 1 h, 3 h und 6 h.	55
Abbildung 21: Relative Genexpression von <i>SMPD3</i> nach PTH-Stimulation in <i>ALPL</i>-defizienten Zelllinien nach 1 h, 3 h und 6 h.	56
Abbildung 22: Relative Genexpression von <i>PTH1R</i> nach PTH-Stimulation in <i>ALPL</i>-defizienten Zelllinien nach 1 h, 3 h und 6 h.	57
Abbildung 23: TNAP-Aktivität nach PTH-Stimulation in <i>ALPL</i>-defizienten Zelllinien nach 1 h, 3 h und 6 h.	58
Abbildung 24: Relative Genexpression von <i>ALPL</i> nach Langzeitexposition mit PTH innerhalb eines 48-stündigen Inkubationszyklus.	60
Abbildung 25: Alizarinrot-Färbung nach 22- und 28-tägiger PTH-Exposition in <i>ALPL</i>-defizienten Zelllinien.	61

Abbildung 26: Quantifizierung der Alizarinfärbung.	62
---	----

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht der verwendeten Zelllinien.	21
Tabelle 2: Primer zur Analyse von Off-Target Mutationen.	26
Tabelle 3: Primer der qPCR.	30
Tabelle 4: Zusammensetzung der Gele für die SDS-Page.	34

Danksagung

Zuallererst möchte ich mich ganz herzlich bei meiner Doktormutter Frau Priv.-Doz. Dr. Marietta Herrmann für die Betreuung meiner Doktorarbeit bedanken. Ich danke Dir für Dein Vertrauen und die Möglichkeit des wissenschaftlichen experimentellen Arbeitens. Auch möchte ich Danke sagen für Deine konstruktiven Ratschläge und den Input, den du mir in unseren wöchentlichen Freitags-Meeting zusammen mit Frau Dr. Stephanie Graser gegeben hast.

Weiterhin gilt mein Dank Frau Prof. Dr. Yvonne Jockel-Schneider für die Übernahme des Korreferats.

Für eine wundervolle Zeit und die produktive tägliche Unterstützung im Laboralltag danke ich der IZKF Nachwuchsgruppe. Vielen Dank Dr. Drenka Trivanović, Dr. Ana Rita Pereira, Jovana Ilić, Sebastian Häusner, Katharina Marnet, Theresa Kreuzahler, Bianca Schlierf, Magdalena Stöckl, Annika Schiminski, Christoph Kölbl und Noah Volkmann.

An dieser Stelle möchte ich mich auch bei Frau Martina Wiesler für die Bereitstellung eines hervorragenden Arbeitsplatzes und den stetigen Beistand bedanken. Ich werde mich immer wieder gerne an dieses Jahr zurückerinnern!

Den Kollegen aus der Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie der Universität Würzburg danke ich für die Bereitstellung von extrahierten Zähnen.

Außerdem möchte ich mich bei meinen Freunden für Eure mentale Unterstützung und sämtliche Besuche am Wochenende im Labor bedanken.

Zuletzt gilt mein Dank meiner Familie, die mich schon immer darin bestärkt hat, meinen eigenen Weg zu gehen und an meinen Zielen festzuhalten. Danke, dass Ihr immer hinter mir steht!

Eigene Veröffentlichungen

Marnet, K., Schiffmaier, J., & Herrmann, M. (2022). Präklinische Zell- und Tiermodelle zur Untersuchung der Auswirkungen des Parathormons auf den Zahnhalteapparat. [Preclinical Cell and Animal Models to Study the Effects of Parathyroid Hormone on the Periodontium]. *Osteologie*, 31(02), 100-105. doi:10.1055/a-1830-9347