

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

**CRISPR/Cas9-basierte Etablierung Alkalischer Phosphatase-defizienter odontogener
Zelllinien zur Analyse der dentalen Aspekte der Hypophosphatasie**

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

vorgelegt von
Sofia Paulus
aus Würzburg

Würzburg, Januar 2021

Referent: Prof. Dr. med. Franz Jakob

Korreferent: Prof. Dr. med. dent. Ulrich Schlagenhaut

Dekan: Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 03.08.2021

Die Promovendin ist Zahnärztin

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Die Hypophosphatasie	1
1.1.1. Klinische Symptome und Klassifikation	1
1.1.2. Die gewebeunspezifische Alkalische Phosphatase (TNAP)	4
1.1.3. Physiologie der TNAP bei Mineralisationsprozessen	5
1.1.4. Die Rolle der TNAP in dentalen Geweben	7
1.1.5. Diagnostik der Hypophosphatasie	11
1.1.6. Genetik der HPP und Genotyp/Phänotyp Korrelation	12
1.1.7. Therapieansätze der HPP	14
1.1.8. HPP-Forschung an Tier- und Zellkulturmodellen	15
1.2. Die hTERT PDL Zelllinie	16
1.3. Der Einfluss von Parathormon auf den Zahnhalteapparat	17
1.4. Induktion eines TNAP Knockouts mittels CRISPR/Cas9	18
1.5. Zielsetzung der Arbeit	22
2. Material und Methoden	23
2.1. Zellbiologische Arbeiten	23
2.1.1. Kultivierung der Zellen	23
2.1.2. Bestimmung der Zellzahl	24
2.1.3. Berechnung der Populationsverdopplung pro Tag	24
2.1.4. Osteogene Differenzierung	25
2.1.5. Stimulation mit Parathormon (PTH)	26
2.2. Induktion von Mutationen des <i>ALPL</i> Gens mittels CRISPR/Cas9	26
2.2.1. Synthese der guideRNA	27
2.2.2. Transfektion der hTERT PDL Zellen	28
2.2.3. Cleavage Assay	29
2.2.4. Monoklonale Selektion	31
2.2.5. DNA-Isolation	32
2.2.6. Semiquantitative Polymerase-Kettenreaktion	32
2.2.7. Agarose-Gelelektrophorese	33
2.2.8. Aufreinigung der PCR Produkte	34

2.2.9.	Sequenzierung.....	34
2.3.	Molekularbiologische Analysemethoden	35
2.3.1.	RNA-Isolation und Konzentrationsbestimmung für die Genexpressionsanalyse.....	35
2.3.2.	cDNA Synthese	36
2.3.3.	Quantitative real-time PCR (qPCR)	37
2.3.4.	Proteinisolation und Konzentrationsbestimmung	39
2.3.5.	CSPD Assay	39
2.3.6.	Messung der ENPP1 Aktivität.....	40
2.3.7.	SDS-Gel und Western-Blot	41
2.4.	Färbungen zum Nachweis der osteogenen Differenzierung	44
2.4.1.	TNAP Färbung.....	44
2.4.2.	Alizarin Färbung.....	45
3.	Ergebnisse	47
3.1.	Induktion von Mutationen des <i>ALPL</i> Gens in parodontalen Ligamentzellen mittels CRISPR/Cas9	47
3.1.1.	Ergebnis des Cleavage Assays.....	48
3.1.2.	Ergebnis der Sequenzierung nach monoklonaler Selektion	49
3.1.3.	Auswirkung der Mutationen auf die Aminosäuresequenz	53
3.2.	Basale Charakterisierung der mutierten hTERT PDL Klone.....	55
3.2.1.	Wachstumsverhalten und Morphologie	55
3.2.2.	Basale <i>ALPL</i> - Genexpressionsanalyse	57
3.2.3.	Bestimmung der basalen TNAP Aktivität durch den CSPD Assay	58
3.2.4.	Nachweis der TNAP auf Proteinebene durch Western Blot	59
3.2.5.	Messung der basalen ENPP1 Aktivität	60
3.3.	Vorversuche zur osteogenen Differenzierung der hTERT PDL Zellen	61
3.3.1.	Genexpressionsanalysen	61
3.3.2.	Messung der TNAP Aktivität im CSPD Assay	64
3.3.3.	TNAP Färbung.....	64
3.3.4.	Alizarinfärbung	65
3.4.	Osteogene Differenzierung ausgewählter Klone mit <i>ALPL</i> Mutationen	66
3.4.1.	Genexpressionsanalysen	66
3.4.2.	TNAP Aktivitätsmessung im CSPD Assay	77

3.4.3.	TNAP Färbung.....	79
3.4.4.	Alizarin Färbung.....	82
3.5.	Auswirkung der PTH Stimulation auf hTERT PDL Zellen	83
4.	Diskussion	85
4.1.	CRISPR/Cas9 induzierte <i>ALPL</i> Mutationen.....	85
4.1.1.	Vorhersage der Mutationen.....	86
4.1.2.	Vergleich der <i>in vitro</i> Mutationen mit dem Genotyp der HPP	87
4.1.3.	Effekt von Off-Target Mutationen nach CRISPR/Cas9.....	92
4.1.4.	Die Rolle von p53 bei der CRISPR/Cas9 vermittelten Genveränderung und der osteogenen Differenzierung	96
4.2.	Osteogenes Differenzierungspotential der hTERT PDL Zelllinie	97
4.3.	Einordnung der Klone als <i>in vitro</i> Modelle dentaler Aspekte der HPP	100
5.	Ausblick	103
	Zusammenfassung	106
	Literaturverzeichnis.....	107
	Abkürzungsverzeichnis	
	Abbildungsverzeichnis	
	Tabellenverzeichnis	
	Anhang	
	Danksagung	
	Lebenslauf	

1. Einleitung

1.1. Die Hypophosphatasie

Die Hypophosphatasie (HPP) ist eine seltene Stoffwechselerkrankung, die auf eine Mutation des *ALPL*-Gens zurückzuführen ist, welches für die gewebeunspezifische Alkalische Phosphatase (TNAP, tissue non specific alkaline phosphatase) kodiert. Durch die verminderte Enzymaktivität treten neben Symptomen des zentralen Nervensystems (ZNS) hauptsächlich Mineralisationsstörungen auf, die in unterschiedlichem Ausmaß sowohl Knochen als auch Zähne betreffen können, und charakteristisch für das Krankheitsbild sind (Mornet, 2018). Rathbun beschrieb die Krankheit 1948 erstmals in einem Fallbericht und brachte die klinischen Symptome eines Säuglings mit der ungewöhnlich niedrigen Serumkonzentration und Aktivität der Alkalischen Phosphatase in Zusammenhang (Rathbun, 1948). Ursächlich für die große klinische Variabilität sind die unterschiedlichen Mutationen des *ALPL*-Gens. Bis heute wurden über 400 verschiedene Mutationen identifiziert und in der Datenbank von Etienne Mornet gelistet (http://www.se-sep.uvsq.fr/03_hypo_mutations.php, aufgerufen am 20.06.2020). Untersuchungen zur Genotyp-Phänotyp Korrelation zeigten zwar gewisse Tendenzen, verdeutlichten jedoch auch den Einfluss weiterer Confounder wie z.B. epigenetischer Faktoren auf das Krankheitsbild (Mornet, 2018).

1.1.1. Klinische Symptome und Klassifikation

Die klinischen Symptome der HPP sind stark variabel und reichen von Totgeburt ohne mineralisierten Knochen *in utero* bis zu vergleichsweise milden Formen, welche teilweise erst im Erwachsenenalter diagnostiziert werden oder sich im vorzeitigen Verlust der Zähne ohne skelettale Auffälligkeiten manifestieren (Whyte, 2016). Anhand des Manifestationsalters und der Ausprägung werden fünf klinische Subtypen unterschieden, welche einen Rückschluss auf die Prognose und den Krankheitsverlauf geben können: Die schwere perinatale Form kann aufgrund der ausgeprägten Symptome mit häufig letalem Verlauf präzise diagnostiziert werden, während weniger symptomatische Formen mit Erstdiagnose im Erwachsenenalter oft lange unentdeckt bleiben (Mornet, 2018). Die Übergänge zwischen den Subtypen sind fließend und eine klare Zuordnung ist häufig nicht möglich (S. Abb 1). Die Prävalenz für die schwere perinatale Form wird in Europa

auf etwa 1:300 000 geschätzt, wobei milde bis moderate Formen deutlich häufiger (etwa 1:6370) auftreten sollen (Mornet et al., 2011). Definitionsgemäß handelt es sich bei HPP um eine seltene Erkrankung mit einer Prävalenz von weniger als 5:100 000.

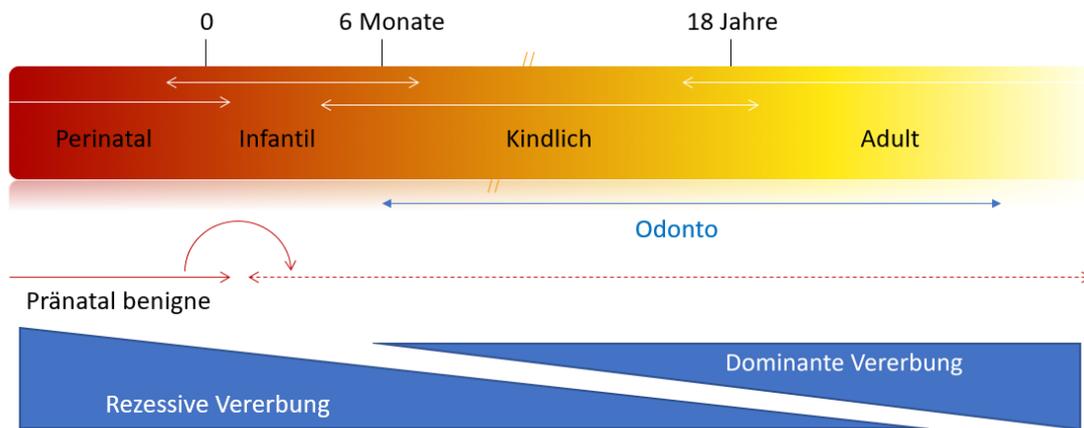


Abb. 1: Einteilung der HPP-Subtypen anhand des Manifestationsalters. Mod. nach Mornet et al. 2018. Eine schriftliche Genehmigung zur Verwendung liegt vor.

Perinatale Form

Bei der perinatalen Form handelt es sich um die schwerwiegendste Form der HPP, welche bereits *in utero* diagnostiziert werden kann. Sonographisch zeigen sich ausgeprägte Hypomineralisationen des Skeletts mit Knochendeformitäten und Frakturen (Shohat et al., 1991). Vor Einführung der Enzyersatztherapie war die Prognose infaust und resultierte in Totgeburten oder letalen Verläufen innerhalb der ersten Lebensstage. Durch die Unterentwicklung des Brustkorbs und eine Lungenhypoplasie kommt es zu einer respiratorischen Insuffizienz, darüber hinaus werden Vitamin B6-abhängige Krampfanfälle und später im Verlauf Kraniosynostosen beobachtet (Mornet, 2018, Silver et al., 1988).

In der Literatur ist zudem eine pränatal „benigne“ Form beschrieben, bei der *in utero* ebenfalls Mineralisationsstörungen und Deformationen des Skeletts mit Verwindungen der langen Röhrenknochen auffallen. Die Symptomatik verbessert sich zum dritten Trimenon und postnatal allerdings deutlich und der Krankheitsverlauf ähnelt dem späterer HPP Formen. Aufgrund dessen wird diese Form eher als Zufallsbefund einer milden HPP Form angesehen (Wenkert et al., 2011). Dies relativiert den prädiktiven Wert einer Pränataldiagnostik und erschwert die genetische Beratung erheblich.

Infantile Form

Patienten mit der etwas milderen infantilen Form kommen gesund auf die Welt und zeigen erste Symptome innerhalb der ersten sechs Monate. Dazu zählen ausgeprägte Rachitiszeichen, generalisierte Hypomineralisation, Knochenbrüche, Knochenschmerzen, Kraniosynostosen mit erhöhtem intrakraniellm Druck, Gedeihstörungen, muskuläre Schwäche und verstärkte Irritierbarkeit durch Hyperkalzämie (Mornet, 2018). Vitamin-B6 abhängige Krampfanfälle können noch vor den skelettalen Symptomen beobachtet werden und sprechen für eine schlechtere Prognose (Baumgartner-Sigl et al., 2007). Etwa 50 % der Patienten sterben im Säuglingsalter (Whyte, 2016). Durch die Einführung der Enzyersatztherapie kann die Letalität deutlich gesenkt werden.

Kindliche Form

Die kindliche oder juvenile Form der HPP manifestiert sich definitionsgemäß zwischen dem 6. Lebensmonat und dem 18. Lebensjahr, allerdings sind die Übergänge zur infantilen und adulten Form fließend. Der vorzeitige Verlust von Milchzähnen ist häufig das erste klinische Anzeichen, weshalb der richtigen Verdachtsdiagnose des Kinderzahnarztes eine hohe Bedeutung zukommt. Je nach Ausprägungsform und Diagnosealter können auch alle Symptome der infantilen und adulten Form beobachtet werden (Whyte, 2016).

Adulte Form

Die adulte Form wird im mittleren Alter diagnostiziert respektive klinisch manifest und verläuft deutlich milder als die frühen Formen der HPP. Rheumatoide Knochen- und Muskelschmerzen, Ermüdungsfrakturen, verzögerte Knochenheilung, Osteomalazie und Gelenkerkrankungen sind charakteristische Symptome. Anamnestisch berichten Patienten teilweise von ungeklärtem Milchzahnverlust oder Rachitis in der Kindheit, was retrospektiv die Einordnung in eine frühere Manifestationsform nahelegt (Briot et al., 2017).

Odonto-HPP

Kennzeichnend für die Odontohypophosphatasie ist der vorzeitige Verlust von Milch- und/oder bleibenden Zähnen ohne skelettale Symptomatik. Insgesamt ist auch hier das klinische Bild sehr variabel und kann abnorme Zahnformen (vergrößerte Pulpenkammern, schmale, bauchige Kronen, zervikale Konstriktionen), gestörte Zahnhartgewebsbildungen, ein erhöhtes Kariesrisiko durch Schmelzhypomineralisierung, Eruptionstörungen, den vorzeitigen Verlust bleibender Zähne und Zahnfarbabweichungen umfassen (Reibel et al., 2009). Insgesamt wird die Odonto-HPP als häufigste HPP Form gehandelt.

1.1.2. Die gewebeunspezifische Alkalische Phosphatase (TNAP)

Die gewebeunspezifische Alkalische Phosphatase (Tissue non specific alkaline phosphatase, TNAP) ist eine von vier humanen Alkalischen Phosphatasen (AP) und wird vom *ALPL* Gen auf Chromosom 1 codiert. Wie aus dem Namen hervor geht, kommt die TNAP im Gegensatz zu den gewebespezifischen Isoformen ubiquitär vor und tritt gehäuft in Knochen, Zahnstrukturen, Leber, Niere und Gehirn auf. Das *ALPL* Gen umfasst eine Länge von 50 kb und ist damit fünfmal länger als die Gene der gewebespezifischen Isoformen *ALPI* und *ALPP*, welche auf Chromosom 2 zu finden sind. *ALPL* besteht aus zwölf Exons, von denen Exon 1 auf der 5' untranslatierten Region der mRNA liegt und eine Promotorsequenz enthält. Gewebeabhängig wird zwischen Exon 1A und Exon 1B unterschieden, wobei Exon 1A in Osteoblasten und Exon 1B in der Niere und Leber überwiegt. Die TNAP Isoformen unterscheiden sich je nach Gewebe also in ihrer mRNA, allerdings nicht in ihrer Aminosäuresequenz, da Exon 1 nicht translatiert wird (Matsuura et al., 1990). Bei den drei gewebespezifischen humanen AP wird zwischen einer intestinalen, einer placentalen und einer Keimzell-AP unterschieden, welche alle zu 90 - 98 % homologe Proteinsequenzen aufweisen. Die TNAP ist dazu lediglich zu 50 % homolog und ist die einzige Alkalische Phosphatase, die bei der Hypophosphatasie betroffen ist (Mornet, 2018).

Die TNAP hat eine homodimere Struktur mit fünf funktionellen Domänen. Dazu gehören ein aktives Zentrum, eine sogenannte Crown Domain, eine Calcium-Bindestelle, ein homodimeres Interface und eine N-terminale alpha-Helix. Die Crown Domain ist für Hitze-stabilität, Allosterie, die unkompetitive Hemmung und gemeinsam mit der N-terminalen

alpha-Helix für die Stabilität des Enzyms zuständig. Am homodimeren Interface sind die Monomere durch van der Waals Kräfte und hydrophobe Effekte miteinander verbunden (Mornet, 2018). Jede dieser Domänen kann von einer Hypophosphatasie verursachenden Mutation betroffen sein. Das aktive Zentrum, die Crown Domain und das homodimere Interface stellen dabei besonders sensible Bereiche dar (Silvent et al., 2014). Nur als Homodimer hat die TNAP eine katalytische Funktion, da allosterische Effekte zwischen den Homodimeren entscheidend für deren Stabilität sind (Hoylaerts et al., 1997). Die beiden Monomere der TNAP sind über je einen Glykosylphosphatidylinositol (GPI) Anker in die Membranen lebender Zellen und in den von Osteoblasten und Chondroblasten während der Mineralisation freigesetzten Matrixvesikeln (MV) integriert und können durch Phospholipasen in die Blutzirkulation abgegeben werden. Grundsätzlich kann die TNAP auch in ihrer freien Form katalytisch aktiv sein, die Membranverankerung sorgt jedoch dafür, dass das Enzym direkt am Ort der Mineralisation wirksam wird (Buchet et al., 2013). Die Expression der TNAP korreliert zeitlich mit dem Beginn der Mineralisierung von Knochen- und Zahnhartgeweben und fällt im Verlauf der Mineralisierung wieder ab (Buchet et al., 2013).

1.1.3. Physiologie der TNAP bei Mineralisationsprozessen

Die Biomineralisierung des Knochens ist ein komplexer Prozess, welcher wesentlich von der Konzentration frei verfügbaren Calciums und Phosphats abhängt. Störungen des Mineralisationsstoffwechsels treten bei Mangel an Substraten oder Cofaktoren wie Vitamin D3 oder bei Überschuss an Mineralisationsinhibitoren wie anorganischem Pyrophosphat (PPi) auf. Das zentrale Molekül der Biomineralisation ist Hydroxyapatit (HA), welches aus freiem Calcium und Phosphat gebildet wird und der Hauptbestandteil von Knochen- und Zahnhartsubstanz ist. HA wird in der frühen Phase der Mineralisation in Matrixvesikeln gebildet, die von Osteoblasten und Chondroblasten abgeschnürt werden. Bei fortschreitendem Wachstum der Kristalle rupturieren die Vesikel, HA wird in den Extrazellulärraum freigesetzt und lagert sich an Kollagenfibrillen an.

Alkalische Phosphatasen hydrolysieren Phosphomonoester in alkalischem Milieu unter der Freisetzung von anorganischem Phosphat (Pi). Die Funktion der TNAP in Mineralisationsprozessen liegt in der extrazellulären Hydrolyse von PPi zu Pi, wodurch zum einen

die inhibitorische Wirkung von P_{Pi} aufgehoben und zum anderen P_i für die Hydroxylapatitsynthese bereitgestellt wird (Millan, 2013). Dabei ist die TNAP nicht für die initiale Kristallformation innerhalb der MV, sondern für das Fortschreiten des Kristallwachstums nach Ruptur der Vesikel verantwortlich, wie Studien an MV von *Alpl*^{-/-} Mäusen und HPP Patienten zeigen konnten (Anderson et al., 1997, Yadav et al., 2011). Die Initiierung der Mineralisation innerhalb der MV wird durch die Phosphatase Orphan 1 (Phospho1) kontrolliert, die intravesikulär Phospholipide hydrolysiert und P_i freisetzt. Fehlen sowohl die TNAP als auch Phospho1, bleibt die Mineralisation komplett aus (Roberts et al., 2007, Yadav et al., 2011). Extrazelluläres P_{Pi} wird über die Ektonukleotid Pyrophosphat Phosphodiesterase (ENPP1) durch die extrazelluläre Hydrolyse von Nukleosidtriphosphaten (NTPs) und über das Transmembranprotein ANK (progressive ankylosis protein homolog) aus dem Intrazellulärraum bereitgestellt. Osteopontin (OPN) verhindert die Hydroxylapatitablagerung und wirkt gemeinsam mit ANK und ENPP1 als Antagonist zur TNAP (S. Abb. 2) (Harmey et al., 2004).

Neben P_{Pi} ist auch Pyridoxalphosphat (PLP), die phosphorylierte Form von Vitamin B6 oder Pyridoxin, ein natürliches Substrat der TNAP. Das dephosphorylierte Pyridoxin kann die Blut-Hirn-Schranke überqueren, wird dort wieder phosphoryliert und wirkt als Coenzym für die γ -Aminobuttersäure-Synthese (GABA). Bei Mangel an TNAP im Gehirn kommt es zu Symptomen wie Krampfanfällen bei Kindern (Baxter, 2003). Dass einige Patienten deutlich stärkere neurologische Symptome zeigen als andere, kann dadurch erklärt werden, dass manche mutierte TNAP Enzyme zwar nicht mehr in der Lage sind P_{Pi} zu hydrolysieren, PLP hingegen schon (Waymire et al., 1995). Im Skelettmuskel finden sich etwa 80 % des systemischen PLP, welches hier als Cofaktor der Glykogenphosphorylase wirkt. Über dieses Enzym wird die Spaltung von Glykogen in Glucose gefördert, was eine Erklärung für die Muskelschwäche von HPP Patienten liefern kann (Salles, 2020).

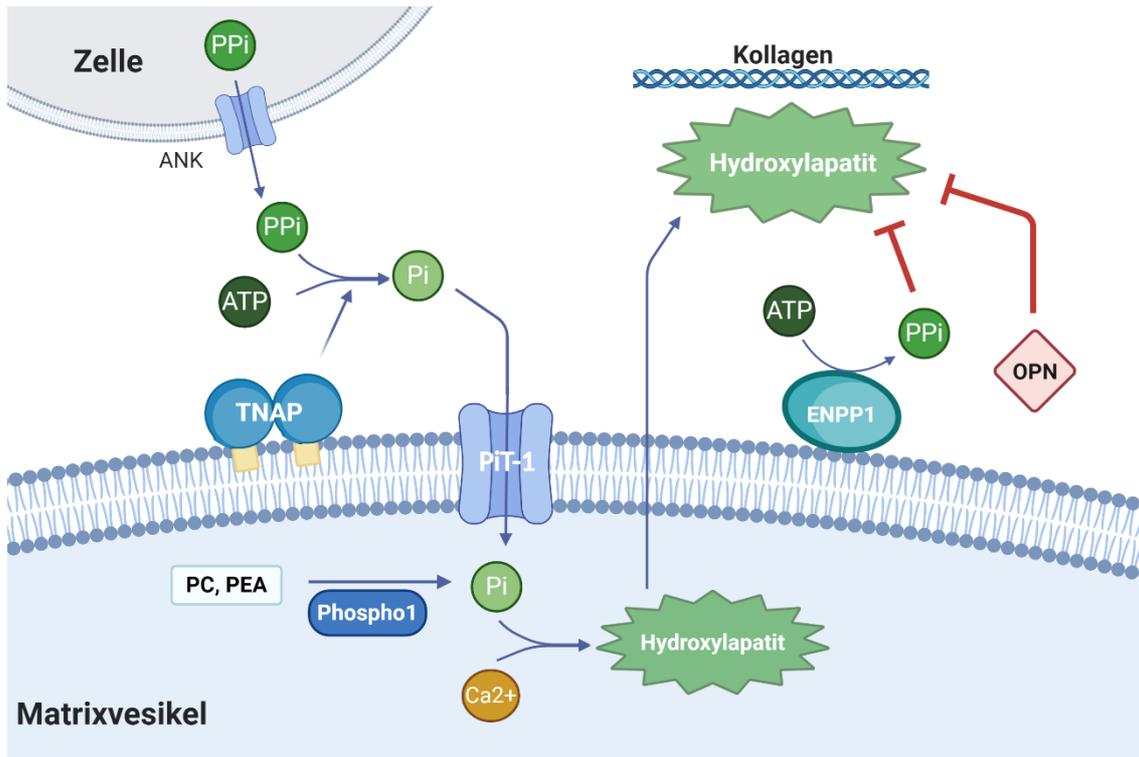


Abb. 2: Die TNAP und ihre Antagonisten bei Mineralisationsprozessen. Dargestellt ist der intra- und extrazelluläre Anteil eines Matrixvesikels während der Mineralisierung. Das für die Hydroxylapatitsynthese benötigte Pi wird intravesikulär von Phospho1 aus Phosphocholin (PC) und Phosphoethanolamin (PEA) und extravesikulär von TNAP aus PPI und ATP hydrolysiert. Das TNAP Dimer ist über zwei GPI Anker extravesikulär an der Membran verankert. Intravesikuläres Pi wird über Phosphat-Transporter 1 (PiT-1) nach extravesikulär transportiert. Extrazelluläres PPI wirkt als Inhibitor der Hydroxylapatitsynthese und wird durch ANK und ENPP1 zu Verfügung gestellt. OPN wirkt ebenfalls inhibitorisch auf die Hydroxylapatitbildung. Die Grafik wurde mit dem Programm BioRender (<https://biorender.com>) erstellt. Mod. nach Salles et al. 2020. Eine schriftliche Genehmigung zur Verwendung liegt vor.

1.1.4. Die Rolle der TNAP in dentalen Geweben

In dentalen Geweben konnte die TNAP in Ameloblasten, Odontoblasten, der Pulpa, dem parodontalen Ligament und dem Zahnsäckchen nachgewiesen und anhand ihrer mRNA der Knochen-Isoform zugeordnet werden (Goseki-Sone et al., 1999, Hoshi et al., 1997). Ihre Rolle liegt dabei primär in der Hydrolyse von PPI für die Hydroxylapatitsynthese zur Biomineralisierung von Schmelz, Dentin und Zement (Tomlinson et al., 2015). Klinisch ist der vorzeitige Verlust der Milchzähne ohne erkennbare Wurzelresorption das wichtigste Symptom für die Verdachtsdiagnose einer milden HPP Form und der Odontohypophosphatasie, bei der lediglich die Zahngewebe betroffen sind (Reibel et al., 2009). Zahngewebe scheinen also noch sensitiver auf einen Verlust der TNAP zu reagieren als beispielsweise der Knochen.

Zähne sind im Knochen über den parodontalen Halteapparat befestigt, welcher im Wesentlichen aus drei Teilen besteht: Dem Zement auf der Wurzeloberfläche, dem Alveolarknochen und dem dazwischenliegenden parodontalen Ligament oder Desmodont. Das parodontale Ligament (PDL) ist eine zellhaltiges, nicht mineralisiertes und überwiegend aus Kollagenfasern bestehendes Gewebe, welches den Zahn im Alveolarknochen stabilisiert. Die Kollagenfasern, bei denen es sich vorwiegend um Kollagen-Typ I handelt, inserieren als sogenannte Sharpey'sche Fasern in den azellulären Fremdfaserzement im zervikalen und mittleren Wurzel Drittel des Zahnes und in den umliegenden Alveolarknochen. Die apikalen zellulären Anteile des Zements haben vermehrt reparative und weniger verankernde Funktionen. Vorzeitig exfoliierte Milchzähne von HPP Patienten und Zähne TNAP-defizienter Mäuse weisen keinen azellulären Zement auf, der zelluläre Zement scheint weniger beeinträchtigt zu sein (van den Bos et al., 2005, Zweifler et al., 2015). Die Kollagenfibrillen inserieren bei HPP also nicht als Sharpey'sche Fasern in den Zahn, stattdessen trennt ein schmaler Spalt das parodontale Ligament vom Dentin. Neben Kollagen spielt Elastin eine wichtige Rolle bezüglich der mechanischen Eigenschaften der Sharpey'sche Fasern und im Rahmen der parodontalen Regeneration (Ivanovski et al., 2007). Im HPP-Zellkulturmodell parodontaler Ligamentzellen nach Stimulation mit dem TNAP Inhibitor Levamisol wurde eine signifikant verringerte Elastin Expression beobachtet (Melms et al., 2020). Übertragen auf die Situation in HPP Patienten könnte ein Mangel an Elastin zu verschlechterten elastischen Eigenschaften und einer Ruptur des parodontalen Ligaments führen, was abermal zu einem vorzeitigem Zahnverlust oder zumindest der nicht primär bakteriell bedingten Erweiterung des Parodontalspalts führen kann. Über diesen Spalt können Bakterien in das Parodont eindringen und bakteriellen Biofilm bilden (van den Bos et al., 2005). Die bakterielle Dysbiose im Bereich des Sulkus wirkt proinflammatorisch und resultiert in einer entzündungsbedingten Knochenresorption, die der Startpunkt der parodontalen Entzündung ist. Aus parodontologischer Sicht gilt die Hypophosphatasie als genetische Disposition einer Parodontitis. Ob der vorzeitige Milchzahnverlust bei HPP Patienten durch eine bakterielle Besiedlung und Gingivitis bzw. Parodontitis zu erklären ist, wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Einerseits konnte eine verstärkte bakterielle Besiedlung auf den Wurzeln vorzeitig exfoliiertes

Zähne nachgewiesen werden (Baab et al., 1986, el-Labban et al., 1991), andererseits wiesen HPP Patienten in klinischen Studien weder vermehrt gingivale oder parodontale Entzündungen auf, noch unterschied sich die Entzündungsaktivität in den parodontalen Taschen von dem gesunder Kontrollpatienten (Reibel et al., 2009, Valenza et al., 2006). Jedoch müssen in den letztgenannten Studien die kleinen Kohorten mit fünf bzw. sieben HPP-Patienten und die Tatsache, dass die HPP-Patienten mit nicht steroidalen Antirheumatika behandelt worden waren und dadurch das Mikrobiom positiv beeinflusst worden sein konnte, berücksichtigt werden. Ein weiteres dentales Symptom der HPP ist die reduzierte Alveolarknochenhöhe, welche auch durch den mangelhaft ausgebildeten Zahnhalteapparat erklärt werden kann: Am gesunden Zahn inserieren die parodontalen Fasern im zervikalen Bereich in den Bündelknochen, welcher nach der natürlichen Exfoliation rasch zurückgebildet wird. Über den dentoalveolären Faserapparat werden mechanische Reize im Sinne einer Mechanotransduktion an die Zellen des PDL übertragen und fördern so ossäre Umbauprozesse, welche je nach Belastung zu Proliferation oder Resorption des Alveolarknochens führen. Das Phänomen der Mechanotransduktion in Tensions- und Kompressionsarealen liefert dabei auch die Grundlage jeder kieferorthopädischen Zahnbewegung. Ohne physiologische Insertion der Kollagenfasern und ausbleibende kompressive Reize auf die PDL-Zellen kommt es zu einer Knochenresorption, was den Attachmentverlust der Milchzähne in HPP Patienten ebenfalls erklären kann.

Ein Schlüsselmolekül für den Knochenabbau bei Parodontitis ist extrazelluläres Adenosintriophosphat (eATP). Über die Bindung an den Purinrezeptor P2X7 wird RANKL (Rezeptor activator of nuclear factor kB ligand) aktiviert und die Osteoklastenaktivität gesteigert (Binderman 2017). Darüber hinaus hat eATP eine entzündungsfördernde Rolle und ist an der Inflammation und der Freisetzung von Zytokinen, insbesondere Interleukin 1 β (IL-1 β) beteiligt. IL-1 β kann wiederum Einfluss auf Kalziumphosphatkristalle in Entzündungsreaktionen nehmen, welche auch bei HPP Patienten durch die Akkumulation von anorganischem PPI beobachtet werden (Ferrari et al. 2006, Giuliani et al. 2017). Erhöhte eATP Spiegel können mehrere Ursachen haben: Eine defekte TNAP resultiert in der extrazellulären Akkumulation von eATP. Im Rahmen einer bakteriellen Entzündung

wird eATP zum einen durch Parodontalbakterien, zum anderen durch vermehrten Zelltod und Hypoxie ausgeschüttet (Giuliani 2017). Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen P2X7 und HPP liefern Studien aus einem Mausmodell der infantilen HPP mit Fokus auf die neuronale Entwicklung sowie die dieser Arbeit vorhergehende Dissertation von Dr. Hannah Melms, in der die Stimulation parodontaler Ligamentzellen mit dem TNAP Inhibitor Levamisol zu einem signifikanten Anstieg der *P2X7* Expression führte (Sebastian-Serrano 2016, Melms 2020). Zudem kann auch ein Mangel an anti-inflammatorischem Adenosin als Produkt der TNAP eine Rolle in der Entzündungsantwort spielen und neben der Substratakkumulation von eATP die Infektion fördern. Eine Hemmung der TNAP in HPP Patienten könnte also über die eATP Akkumulation und die Bindung an P2X7 bzw. den Mangel an Adenosin ein proentzündliches Milieu ohne Infektionsherd begünstigen und somit die Knochenresorption ohne primäre bakterielle Besiedlung des Parodontalspalts fördern.

Auch in dentalen Geweben beeinflusst neben der TNAP die ENPP1 das Verhältnis von P_{Pi} und P_i maßgeblich und wirkt antagonistisch zur TNAP. Während die TNAP bereits früh in Zementoblasten aktiv ist und durch die Hydrolyse von P_{Pi} die Mineralisation und die Bildung von azellulärem Zement fördert, wird ENPP1 erst später aktiv und wird vornehmlich in Zementoblasten, die direkt an azellulären Zement grenzen, gebildet. ENPP1 hydrolysiert eATP und hemmt durch die erhöhte P_{Pi} Konzentration die Mineralisation, sodass einer Ankylose entgegengewirkt wird (Zweifler et al., 2015). Seltener als der vorzeitige Milchzahnverlust treten bei HPP Patienten weitere dentale Symptome auf, zu denen dünnes Dentin, Schmelzhypoplasien und dadurch bedingt eine erhöhte Kariesanfälligkeit und eine vergrößerte Pulpa mit verbreiterten Wurzelkanälen gezählt werden (Reibel et al., 2009). Vergleicht man die Expression von Genen, welche Einfluss auf den Phosphathaushalt nehmen, zwischen Zellen aus dem PDL und der Pulpa, so zeigen sich deutlich höhere Expressionsmuster von *ALPL*, *ANK* und *ENPP1* in PDL-Zellen (Rodrigues et al., 2012, van den Bos et al., 2005). Dies könnte erklären, warum Defekte in der Zementogenese und der damit einhergehende vorzeitige Zahnverlust deutlich häufiger beobachtet werden als Defekte in der Dentinogenese, welche sich in Strukturanomalien äußern.

1.1.5. Diagnostik der Hypophosphatasie

Die Diagnostik der Hypophosphatasie basiert neben klinischen und radiologischen Untersuchungen maßgeblich auf der Messung der Serumaktivität der TNAP und der Konzentration ihrer Substrate. Zur Bestätigung der Verdachtsdiagnose HPP sind genetische Analysen unverzichtbar. Während bei schwerwiegenden Formen das klinische Bild die Verdachtsdiagnose bereits nahelegt, gestaltet sich die Diagnostik bei milderer Formen oft schwieriger.

Die Serumaktivität der TNAP ist bei HPP Patienten erniedrigt, wobei die Aktivität umgekehrt proportional zum Schweregrad der Erkrankung ist (Whyte, 1994). Dabei schwankt die TNAP Aktivität physiologisch alters- und geschlechtsabhängig (S. Tab. 1) und ist beispielsweise in der frühen Schwangerschaft, bei Medikamenteneinnahme, Schilddrüsenunterfunktion oder Anämie erniedrigt (Beck et al., 2009). Dementsprechend kann die Serumaktivität als erster Hinweis zur Diagnostik der HPP und nicht als alleiniges Diagnosekriterium herangezogen werden (Mornet, 2018). Die Akkumulation der TNAP Substrate bei HPP Patienten kann sich durch einen erhöhten PLP-Spiegel im Serum und einem erhöhten PEA-Spiegel im Urin äußern (Lundgren et al., 1991, Whyte et al., 1988). Da PEA allerdings bei einer Vielzahl weiterer Erkrankungen erhöht sein kann und auch unveränderte PEA-Spiegel bei HPP Patienten beobachtet worden sind, wird diesem Wert eine untergeordnete Rolle in der Diagnostik zugeschrieben (Whyte, 2016).

Tab. 1: Normwerte der TNAP im Serum (37 °C, IFCC Methode), nach (Beck et al., 2009).

Patient	IU/L (International Units / Liter)
Säuglinge	110 - 590
Kleinkinder	110 - 550
Schulkinder	130 - 700
Frauen	55 - 147
Männer	62 - 176

Um die Verdachtsdiagnose Hypophosphatasie zu bestätigen, sind genetische Untersuchungen des *ALPL* Gens auf Mutationen essenziell. Dabei wird die kodierende Sequenz der genomischen DNA sequenziert und auf Mutationen getestet. Mutationen in Introns

oder regulatorischen Sequenzen, die bei dieser Methode nicht detektiert werden können, sind im Allgemeinen sehr selten, können aber die molekulargenetische Diagnose der HPP deutlich erschweren (Mentrup et al., 2017). Auch in der Pränataldiagnostik kann bei Schwangerschaften mit einem Risiko für Hypophosphatasie eine Mutationsanalyse durchgeführt werden. Diese gilt heutzutage als aussagekräftiger als die Bestimmung der TNAP Konzentration (Henthorn et al., 1995, Mornet et al., 1999).

Bei mildereren Formen wie der kindlichen HPP und der Odonto-HPP ist das erste klinische Anzeichen häufig der vorzeitige Verlust der Milchzähne mit nicht resorbierten Wurzeln (Reibel et al., 2009). Der Zahnwechsel vollzieht sich sehr individuell mit zeitlichen Schwankungen von +/- 2 Jahren ohne pathologischen Wert, weshalb die nichtresorbierte Milchzahnwurzel klinisch entscheidender ist als der Zeitpunkt des Zahnverlustes. Dementsprechend liegt es nicht selten in der Hand der (Kinder-) Zahnärzte, die Verdachtsdiagnose HPP zu stellen und weitere Diagnostik in die Wege zu leiten.

Aufgrund der variablen klinischen Formen und der Vielzahl an Symptomen ist eine ausführliche Differentialdiagnostik unumgänglich, damit keine falsche Therapie eingeleitet wird. Die erhöhte Frakturanfälligkeit ähnelt der Symptomatik bei Osteoporose, Osteogenesis Imperfecta, oder in seltenen Fällen Knochenmetastasen oder Knochentumoren (Mornet, 2007). Der therapeutische Goldstandard dieser Erkrankungen sind orale oder intravenöse Bisphosphonate, welche allerdings die Symptomatik bei Hypophosphatasie durch das Überangebot an PPI nur verschlimmern würden. Differentialdiagnostisch ist bei der juvenilen Form aufgrund der klinischen und radiologischen Symptome vor allem die Rachitis labordiagnostisch abzugrenzen: Bei Rachitis finden sich erhöhte TNAP Konzentrationen bei erniedrigten Serumkonzentrationen von Calcium, Phosphat und Vitamin D3; diese sind bei HPP unverändert (Mornet, 2007).

1.1.6. Genetik der HPP und Genotyp/Phänotyp Korrelation

Die Genetik der HPP ist komplex und zuverlässige Vorhersagen des Phänotyps auf Basis genetischer Untersuchungen sind bis heute nur bedingt möglich. Insgesamt wurden über 400 verschiedene Mutationen, die zum Krankheitsbild HPP führen, beschrieben

und in der Datenbank von Etienne Mornet gelistet (http://www.sep.uvsq.fr/03_hypo_mutations.php, aufgerufen am 20.06.2020). Den mit 72 % größten Anteil stellen Missense Mutationen dar, bei denen durch Punktmutationen einzelne Aminosäuren verändert sind. Wie hoch die Restaktivität der TNAP durch eine Missense Mutation ist, hängt maßgeblich davon ab, an welcher Position die Aminosäure ersetzt wurde und wie sehr sie sich chemisch von der ursprünglichen Aminosäure unterscheidet. Deutlich seltener treten kleine Deletionen (11,1 %), Splicesite-Mutationen (6 %), Nonsense Mutationen (4,8 %), kleine Insertionen (3 %) und größere Deletionen (2,7 %) auf. Fast alle *ALPL*- Mutationen sind vererbt, *de novo* Mutationen stellen mit zwei beschriebenen Fällen eine Ausnahme dar (Taillandier et al., 2005, Zhang et al., 2012). Dabei werden die schwerwiegenden perinatalen und infantilen Formen ausschließlich autosomal rezessiv, die mildereren Formen autosomal rezessiv oder dominant vererbt (Mornet, 2017).

Bei den rezessiv vererbten Formen mit schweren oder moderaten Ausprägungen werden häufig compound-heterozygote Allele beobachtet, bei denen sich unterschiedliche Mutationen im *ALPL*-Gen auf beiden Allelen finden lassen. Mildere Ausprägungsformen weisen hingegen vermehrt heterozygote Mutationen mit dominant negativen Effekten auf (Fauvert et al., 2009). Solche Effekte treten bei dimeren oder multimeren Proteinen auf und entstehen durch die Heterodimerisierung von mutierten und Wildtyp Monomeren. Zum einen wird dadurch die Enzymaktivität der TNAP herabgesetzt, zum anderen der Einbau des Enzyms in die Zellmembran verhindert und die TNAP reichert sich im Golgi-Apparat an (Lia-Baldini et al., 2008, Lia-Baldini et al., 2001).

Bei dominanten Erbgängen kann oft eine unvollständige Penetranz festgestellt werden, sodass ein Elternteil zwar den gleichen Genotyp aufweist, jedoch im Gegensatz zu seinen Nachfahren keine klinischen Symptome zeigt (Mornet, 2017). Außerdem wurden in einem Fallbericht zwei Geschwister beschrieben, bei denen trotz identischer compound-heterozygoter Mutation ein Kind eine milde und ein Kind eine schwerwiegende Form aufwies (Hofmann et al., 2014). Studien an *Alpl/Enpp1* und *Alpl/Ank* Doppel-Knockout

Mäusen konnten zeigen, dass Mutationen antagonistischer Gene den Phänotyp zumindest teilweise korrigieren und somit Einfluss auf die Manifestation einer HPP nehmen können (Chu et al., 2020, Hesse et al., 2002)

In einem Modell von Silvent et al. wurden anhand aller bis dahin beschriebenen Mutationen besonders sensitive Positionen innerhalb des *ALPL* Gens ermittelt, womit der Schweregrad der Erkrankung vorhergesagt werden soll (Silvent et al., 2014). Eine präzise und lineare Vorhersage des Krankheitsverlaufs auf Basis einer Genotyp-Phänotyp Korrelation ist nach aktuellem Kenntnisstand jedoch nicht möglich.

1.1.7. Therapieansätze der HPP

Die Therapie der HPP erfordert aufgrund der variablen Symptomatik und der individuellen Krankheitsverläufe eine enge interdisziplinäre Zusammenarbeit, welche die Pädiatrie, Osteologie, Orthopädie, Humangenetik, Radiologie, Neurologie und nicht zuletzt Zahnmedizin und Kieferorthopädie einschließt.

Bei Säuglingen mit der perinatalen Form steht zunächst die Sicherstellung einer mechanischen Beatmung im Vordergrund. Kraniosynostosen bedürfen aufgrund der Gefahr eines erhöhten Hirndrucks einer chirurgischen Therapie (Whyte, 2016). Vitamin B6 abhängige Krampfanfälle können zumindest teilweise durch die systemische Gabe von Pyridoxin kontrolliert werden (Baumgartner-Sigl et al., 2007). Bei moderaten Formen kommt neben allgemein orthopädischen Eingriffen bei Frakturen, Knochenheilungsstörungen oder Knochenödemen der physiotherapeutischen Betreuung zum Erhalt und zur Verbesserung des Bewegungsapparats eine wichtige Rolle zu (Whyte, 2016). Im Rahmen der Labordiagnostik sollte sichergestellt werden, dass alle für den Knochenhaushalt wichtigen nutritiven Faktoren wie Vitamin D3, Vitamin B12, Folsäure, Magnesium oder Zink ausreichend vorhanden sind oder gegebenenfalls ergänzt werden. Eine hochdosierte Vitamin D3 Therapie, wie sie in der Rachitistherapie Anwendung findet, ist jedoch dringend zu vermeiden, da sonst vermehrt Phosphat rückresorbiert wird. Auch die Therapie mit Bisphosphonaten wie bei Osteogenesis Imperfecta, Osteoporose, malignem Myelom oder Morbus Paget, ist bei Hypophosphatasie kontraindiziert, da sie als PPI Ana-

loga direkt die Restaktivität der TNAP supprimieren und die Mineralisierung weiter hemmen können (Aeby et al., 2016, Sutton et al., 2012). Bei allen HPP Formen können nicht-steroidale Antirheumatika wie Naproxen zur Analgesie und Entzündungshemmung verschrieben werden (Whyte, 2016).

Zahnärztlich präventive Maßnahmen können dem vorzeitigen Zahnverlust zumindest teilweise vorbeugen. Um den Zahnverlust und daraus resultierende Zahnfehlstellungen zu kompensieren und das Kieferwachstum bei Zahnverlust nicht zu unterdrücken sind kieferorthopädische Behandlungen indiziert.

Seit 2015 steht mit Asfotase alpha (AA, Strensiq®) eine gezielte Enzymersatztherapie zur medikamentösen Behandlung schwerer HPP Erkrankungen zu Verfügung. AA ist ein humanes rekombinantes Alkalisches-Phosphatase Fc-Deca-Aspartat Fusionsprotein, welches über einen Deca-Aspartat-Anker an Hydroxylapatit bindet und die enzymatische Funktion der TNAP während der Knochenmineralisierung übernimmt. In mehreren Studien konnte eine deutliche Verbesserung von Knochenmineralisation, Muskelkraft, Atemfunktion, Wachstum und motorischer Entwicklung bei insgesamt guter Verträglichkeit festgestellt werden (Whyte et al., 2012, Whyte et al., 2019). Andere, häufig mitbetroffene Organe wie die Niere oder das Gehirn werden durch AA nicht angesprochen (Hofmann et al., 2015). Strensiq® ist heute bei infantiler oder kindlicher Hypophosphatasie mit nachgewiesener Knochenmanifestation als Langzeit-Enzymersatztherapie indiziert, wobei die Europäische Arzneimittel-Agentur als rechtfertigende Indikation den Nachweis einer frühen Manifestationsform verlangt.

1.1.8. HPP-Forschung an Tier- und Zellkulturmodellen

Ein Großteil des heutigen Verständnisses über die Pathophysiologie der HPP und mögliche Therapieansätze basieren auf Studien an TNAP defizienten Mausmodellen. Die Schneidezähne von Mäusen und anderen Nagetieren wachsen lebenslang nach und werden durch den Nagetrieb physiologisch abradert. Deswegen eignen sich Mausmodelle besonders zur Erforschung zahnmedizinischer Fragestellungen, da die Auswirkung einer Therapie innerhalb kurzer Zeit deutlich werden kann. Der Phänotyp der TNAP-Knockout Mäuse (*Alpl*^{-/-} oder in älteren Publikationen häufig *Akp2*^{-/-}) erinnert an die infantile Form:

die Mäuse werden mit einem normal mineralisierten Skelett geboren, nach etwa sechs Tagen entwickeln sie rachitisähnliche Symptome und versterben nach 12 bis 16 Tagen aufgrund der skelettalen Hypomineralisation oder epileptischer Anfälle (Narisawa et al., 1997, Waymire et al., 1995). Die Enzyersatztherapie mit humaner rekombinanter TNAP wurde erstmals 2008 erfolgreich in einem Mausmodell angewendet und verbesserte nachweislich die skelettalen und dentalen Symptome (McKee et al., 2011, Millán et al., 2008, Yadav et al., 2012). Auch gentherapeutische Ansätze, bei denen *Alpl*^{-/-} Mäuse mit lentiviral-transduzierten Knochenmarksstammzellen behandelt wurden, konnten die skelettalen und dentalen Symptome lindern (Okawa et al., 2017).

Zellkultur-Modelle der HPP ergänzen die Forschung an Tier-Modellen und umfassen kommerziell erhältliche Zelllinien, Zellen aus Tiermodellen und humane primäre Zellen. Durch Levamisol, einen nicht-kompetitiven Inhibitor der TNAP, kann ein HPP-ähnlicher Phänotyp in Zellkulturmodellen induziert werden (Melms et al., 2020). Levamisol ist ein Anthelminthikum und wird zur Behandlung von Fadenwürmern eingesetzt.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollen durch eine genetische Modifikation mittels CRISPR/Cas9 *in vitro* TNAP-defiziente odontogene Zelllinien etabliert und charakterisiert werden, welche die Erforschung der dentalen Pathophysiologie der HPP sowie neue Therapieansätze ermöglicht.

1.2. Die hTERT PDL Zelllinie

Zusammen mit dem Zement und dem Alveolarknochen bildet das parodontale Ligament den Zahnhalteapparat und verankert die Zähne über Sharpey'sche Fasern im umgebenden Knochen. Das PDL enthält eine Vielzahl von Stamm- und Progenitorzellen, welche aufgrund ihrer Eigenschaften an Stammzellen aus dem Knochenmark (bone-marrow derived mesenchymal stem cells, BMSC) erinnern. Beispielsweise exprimieren sie ähnliche Oberflächenantigene und können in Osteoblasten, Chondroblasten und Adipozyten differenzieren (Seo et al., 2004, Shi et al., 2005). Nach Transplantation *in vivo* können PDL-Zellen zementartige oder PDL-ähnliche Strukturen bilden (Seo et al., 2004), weshalb sie heute eine wichtige Rolle in der Erforschung der parodontalen Wundheilung und Regeneration spielen.

Dem großen regenerativen Potential der PDL-Zellen steht ihre kurze Lebensspanne *in vitro* gegenüber, weshalb verschiedene Methoden zur Immortalisierung der Zellen angewendet wurden (Docheva et al., 2010, Fujii et al., 2008, Tomokiyo et al., 2008). Bei der in dieser Arbeit untersuchten und charakterisierten Zelllinie handelt es sich um eine immortalisierte Zelllinie, die aus parodontalen Ligamentzellen gesunder, aus kieferorthopädischen Gründen extrahierter Prämolaren eines jugendlichen Patienten isoliert wurden. Die Zellen wurden durch eine lentivirale Transduktion mit hTERT (humane Telomerase reverse Transkriptase) immortalisiert und von Docheva et al. charakterisiert (Docheva et al., 2010).

Bei der hTERT handelt es sich um eine RNA-abhängige Polymerase, welche in Keimbahnzellen aktiv ist und den Verlust terminaler DNA-Sequenzen in der Replikation verhindert, indem sie mit ihrer eigenen RNA-Matrize eine kurze Nukleotidsequenz an das 3'-Ende der DNA synthetisiert. Die DNA wird dadurch, im Gegenteil zu somatischen Zellen, nicht bei jeder Replikation verkürzt und die Zellen gehen nicht in Apoptose. Auch bei Tumorzellen lässt sich die unbegrenzte Teilungsfähigkeit auf eine erhöhte Telomeraseaktivität zurückführen. Die virale Transduktion des hTERT Gens ermöglicht es, eine beliebige Zellart zu immortalisieren.

1.3. Der Einfluss von Parathormon auf den Zahnhalteapparat

Als Hormon der Nebenschilddrüse kommt dem Parathormon (PTH) eine entscheidende Rolle in der Regulation des Kalziumstoffwechsels und des physiologischen Knochenumbaus zu. Eine überschießende Produktion von Parathormon (Hyperparathyreoidismus, HPT) kann primär durch einen Tumor der Nebenschilddrüse oder sekundär in Folge einer Nierenerkrankung mit erhöhter Kalziumausscheidung und Phosphatretention auftreten. Infolgedessen wird mehr Kalzium aus dem Knochen resorbiert, was zum Krankheitsbild der Osteoporose führt. Auch im Kieferbereich sind in ausgeprägten Fällen Radiotransluzenzen im Sinne von Demineralisationen erkennbar. Bei gleichzeitigem Auftreten einer Parodontitis wird der betroffene Knochen noch schneller abgebaut. Während die kontinuierliche Exposition also katabol auf den Knochen wirkt, konnte im Tierversuch gezeigt werden, dass eine intermittierende PTH Stimulation anabole Effekte auf den Knochen hat und den Knochenverlust durch Parodontitis verhindern kann (Barros

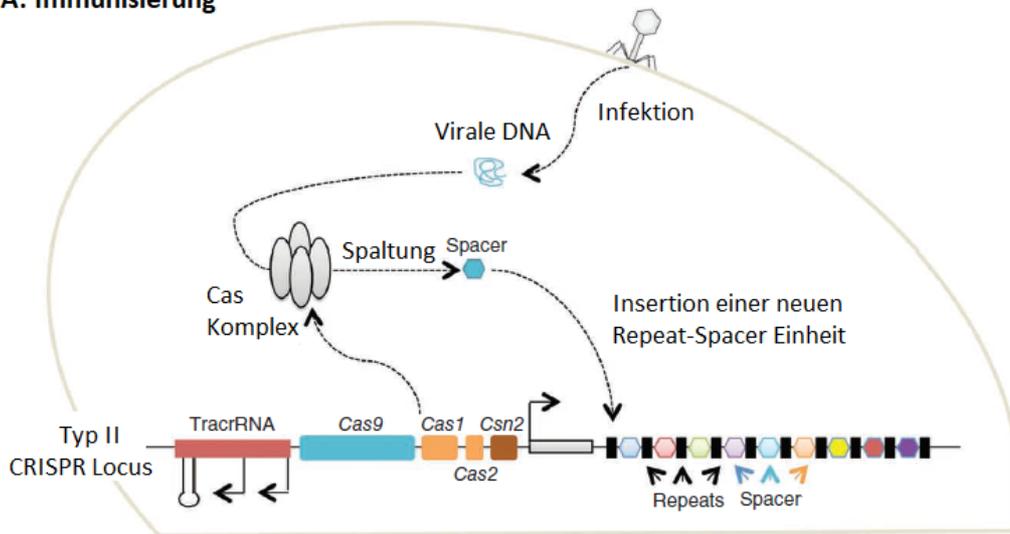
et al., 2003, Kim et al., 2018). Mutationen im *PTHR1* Gen (PTH-Rezeptor 1) wurden in Zusammenhang mit der Diagnose der Primären Durchbruchsstörung gebracht, bei der ein primär nicht ankylosierter Zahn aufgrund einer Störung im Durchbruchmechanismus von allein nicht oder nur teilweise durchbricht. Klassische kieferorthopädische Behandlungsmethoden führen dabei nicht zur gewünschten Mobilisierung, sondern können sogar einen negativen Effekt auf den Zahn und die betroffenen Kieferareale haben (Stellzig-Eisenhauer et al., 2010). Die Auswirkungen der kontinuierlichen PTH Stimulation während der osteogenen Differenzierung wurde in einer murinen Osteoblasten Zelllinie (MC3T3) untersucht. Dabei bewirkte die Stimulation mit PTH eine Hochregulation der *ALPL* Expression und eine Suppression der *Phospho1* Expression (Houston et al., 2016). Bislang scheint die Auswirkung der PTH Stimulation auf die *ALPL* Expression in Zellen des parodontalen Ligaments nicht untersucht worden zu sein. Der Vergleich nicht-mutierter und TNAP-defizienter PDL Zellen kann hierbei einen interessanten Ansatz für die weitere Forschung liefern.

1.4. Induktion eines TNAP Knockouts mittels CRISPR/Cas9

Das CRISPR/Cas9- System ist eine neuartige molekularbiologische Methode, die es erlaubt, gezielt genomische Modifikationen in lebenden Zellen vorzunehmen und damit die Funktion von Genen in ihrem physiologischen Kontext zu erforschen. CRISPR steht dabei für clustered regularly interspaced short palindromic repeats und wurde zuerst als repetitive Sequenz im Genom von *E. Coli* entdeckt (Ishino et al., 1987). Zwischen den repetitiven Sequenzen (Repeats) finden sich im Bakteriengenom nichtrepetitive Sequenzen, die sogenannten Spacer. Diese Sequenzen stellen gemeinsam mit den sogenannten Cas-Genen (CRISPR assoziierte Gene), welche für eine heterogene Proteinfamilie aus Nukleasen, Helikasen, Polymerasen und nukleotidbindenden Proteinen kodieren, ein erworbenes Immunsystem vieler Archeen und Bakterien dar (Jansen et al., 2002, Makarova et al., 2006). Die Spacer Sequenzen entsprechen der genomischen DNA-Sequenz von Viren und Phagen und bilden eine Art Gedächtnis vorhergegangener Infektionen, da sie nach einer durchgestandenen Infektion in das Bakteriengenom integriert werden (Barrangou et al., 2007). Bei einer erneuten Infektion mit demselben Virus kann das Bakterium auf diese Information zurückgreifen und mithilfe des CRISPR/Cas Systems

die virale DNA eliminieren. Dabei werden die Spacer als CRISPR-RNA (crRNA) exprimiert, welche gemeinsam mit einer trans aktivierenden crRNA (tracrRNA) eine Haarnadelstruktur bildet und an die Cas-Proteine bindet. Dieser Ribonukleoproteinkomplex wird durch die RNase III prozessiert und kann daraufhin spezifisch an die Ziel-DNA binden (Deltcheva et al., 2011). Die sogenannte PAM Sequenz (protospacer adjacent motif) auf der viralen DNA spielt dabei eine entscheidende Rolle bei der Bindung der crRNA und der Unterscheidung zwischen viralen und bakterieneigenen Spacer Sequenzen zum Schutz vor Autoimmunität (Deveau et al., 2008, Horvath et al., 2008). Die Cas Proteine induzieren einen Doppelstrangbruch und die virale Infektion wird abgewehrt (S. Abb. 3).

A: Immunisierung



B: Immunabwehr

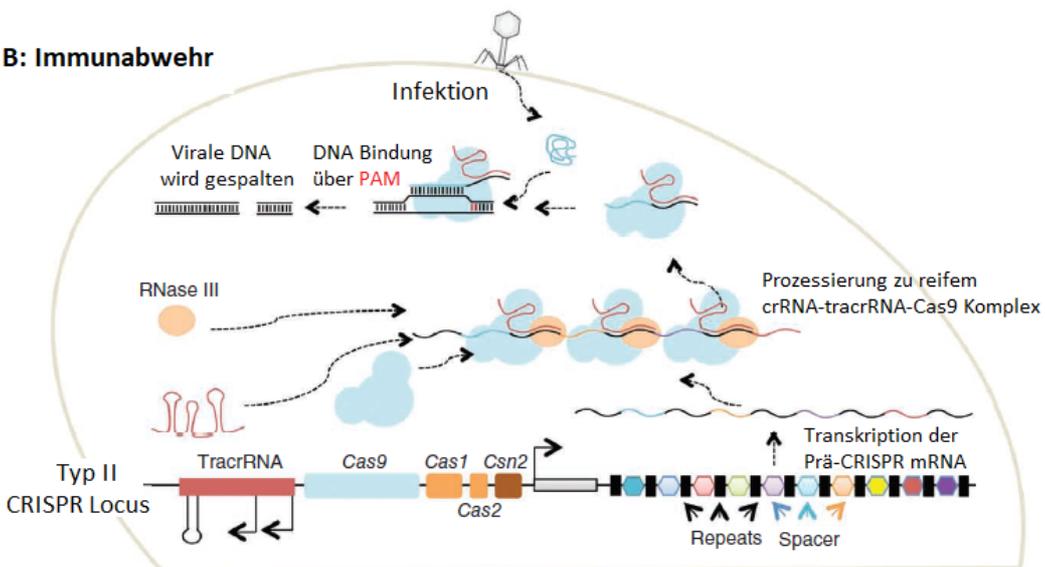


Abb. 3: CRISPR/Cas9 als mikrobielles Abwehrsystem: (A) Immunisierung: Nach Injektion der viralen DNA wird diese vom endogenen Cas-Komplex gespalten und als Spacer in das mikrobielle Genom eingebaut. Innerhalb der CRISPR-Sequenz finden sich repetitive Sequenzen und die Spacer-Sequenzen als Gedächtnis durchgestandener Infektionen. (B): Immunabwehr: Die RNase III prozessiert den Komplex aus Cas9, TracrRNA und Pre-CRISPR RNA zu einem reifen Ribonukleotidkomplex, welcher über die PAM Sequenz an die virale DNA bindet und einen Doppelstrangbruch in der Ziel-DNA einfügt. Mod. nach (Mali et al., 2013). Eine schriftliche Genehmigung zur Verwendung liegt vor.

Anhand des Mechanismus, wie die Ziel-DNA durch den Ribonukleoproteinkomplex erkannt und geschnitten wird, werden die CRISPR/Cas Systeme in mehrere Klassen und Typen eingeteilt. Der am intensivsten untersuchte und molekularbiologisch verwendete Mechanismus ist Typ II. Er hebt sich dadurch hervor, dass ein einziges Cas-Protein, die Cas9, sowohl für die Erkennung der PAM Sequenz als auch für die Entwindung und Spaltung der Ziel-DNA zuständig ist (Sapranauskas et al., 2011). Jedes Cas Protein hat eine spezifische PAM Sequenz, die von ihr erkannt wird. Bei der Cas9 aus *Streptococcus pyogenes* handelt es sich um die Sequenz NGG, welche im menschlichen Genom statistisch alle acht und biologisch alle neun Nukleotide vorkommt. Über ihre zwei katalytischen Einheiten RuvC und HNH schneidet die Cas9 die gegenüberliegenden DNA-Doppelstränge und induziert einen Doppelstrangbruch.

Der erste Nachweis, dass das CRISPR/Cas9 System aus *Streptococcus pyogenes* erfolgreich in eukaryotischen Zellen zur genetischen Modifizierung Anwendung finden kann, wurde 2013 von Cong et al. erbracht. Dabei konnte gezielt ein Doppelstrangbruch in der eukaryotischen DNA erzeugt werden, welcher in der Zelle durch Nichthomologe Endverknüpfung (non-homologous end-joining, NHEJ) korrigiert wurden (Cong et al., 2013). Dabei handelt es sich um den häufigsten Reparaturmechanismus bei Cas9 induzierten Doppelstrangbrüchen, welcher die freien DNA-Enden unabhängig von ihrer Sequenz miteinander ligiert. Im Gegenteil zur homologen Rekombination, bei der in der S- und G2-Phase der Mitose das Schwesterchromatid als Matrize verwendet wird, ist der NHEJ-Mechanismus stark fehleranfällig. Typischerweise entstehen durch NHEJ Deletionen und Insertionen von 1 bis 4 Nukleotiden. Einen weiteren möglichen Reparaturmechanismus stellt die Mikrohomologie vermittelte Endverknüpfung (microhomology-mediated end joining, MMEJ) dar, bei der kurze homologe Sequenzen von 5 - 25 Basenpaaren als Ausgangspunkt zur Strangreparatur verwendet werden. Diese Mikrohomologien liegen dabei auf den komplementären Strängen und beidseits des Doppelstrangbruchs. Die DNA wird bis auf die homologen Bereiche zurückgeschnitten und ligiert, wodurch größere

Deletionen und Insertionen entstehen können (McVey et al., 2008). Wird zusätzlich ein DNA-Molekül mit homologer Sequenz als Reparatur-Matrize verwendet, kann dieses über Homologe Rekombination (homology direct repair, HDR) an der Stelle des Doppelstrangbruchs eingefügt werden (S. Abb. 4). Welcher Reparaturmechanismus tatsächlich verwendet wird, hängt von verschiedenen Faktoren ab. Dazu zählen die Zellzyklusphase, die verwendete Zelllinie, das Vorhandensein von Reparaturenzymen und insbesondere die Sequenz der Ziel-DNA (Allen et al., 2019). Eine rein sequenzabhängige Vorhersage von Mutationen ist beispielsweise über das Tool FORECasT (favored outcomes of repair events at Cas9 targets, <https://partslab.sanger.ac.uk/FORECasT>, aufgerufen am 06.01.2021) möglich.

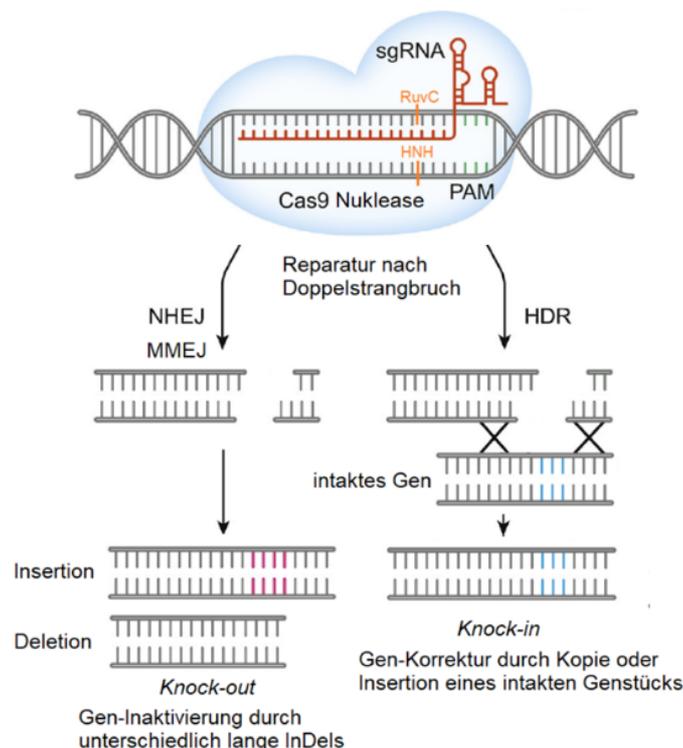


Abb. 4: DNA-Reparaturmechanismen nach CRISPR/Cas9 induzierten Doppelstrangbrüchen. Die DNA wird vorwiegend durch Nichthomologe Endverknüpfung (NHEJ) oder Mikrohomologie-vermittelte Endverknüpfung (MMEJ) unter Entstehung unterschiedlich langer Insertionen und Deletionen repariert. Über homologe Rekombination (HDR) kann ein intaktes Gen an der Stelle des Doppelstrangbruchs eingefügt werden. Modifiziert nach (Zhan et al., 2019), CC-Lizenz.

Um das CRISPR/Cas System des Typ II *in vitro* anzuwenden werden also lediglich zwei Komponenten benötigt: das Cas9 Protein und ein crRNA:tracrRNA Duplex. Der crRNA:tracrRNA Duplex, welcher auch als single guide RNA (sgRNA) bezeichnet wird,

bindet zum einen über eine etwa 20 Nukleotide lange Sequenz am 5' Ende spezifisch die Ziel-DNA, zum anderen über eine Haarnadelstruktur am 3' Ende die Cas9. Um eine bestimmte DNA-Sequenz zu verändern, muss lediglich die sgRNA angepasst werden. Diese Einfachheit des CRISPR/Cas9 Systems bietet einen enormen Vorteil gegenüber Methoden wie ZFN (Zinkfinger-Nukleasen) oder TALEN (Transcription Activator-Like Effector Nucleases), bei denen Proteine modifiziert werden müssen, um eine andere DNA-Sequenz zu adressieren.

Die CRISPR/Cas9 Methode konnte für Forschungszwecke bis heute erfolgreich in zahlreichen verschiedenen Spezies, darunter Mikroorganismen, Pflanzen und Tieren angewendet werden und gilt als vielversprechender Ansatz in der Gentherapie. Die größte Limitation eines klinischen Einsatzes stellen neben ethischen Bedenken off-target Effekte wie unerwünschte Mutationen oder Onkogenaktivierung dar, welche vor einer CRISPR/Cas basierten Gentherapie noch weiterer Forschung bedürfen (Chen et al., 2020).

1.5. Zielsetzung der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit sollen Alkalische Phosphatase-defiziente Zelllinien generiert werden, um ein *in vitro* Modell zur Erforschung dentaler Aspekte der Hypophosphatasie zu etablieren. Dafür wird die hTERT PDL Zelllinie verwendet, welche als immortalisierte Zelllinie aus dem parodontalen Ligament eine Grundlage für die odontogene Fragestellung liefert. Im ersten Teil der Arbeit sollen mithilfe der CRISPR/Cas9 Methode Mutationen im *ALPL*-Gen der hTERT PDL Zellen induziert werden. Unter Verwendung zweier unterschiedlicher crRNA, deren Zielsequenzen auf unterschiedlichen Exons liegen, sollen analog zum variablen Genotyp der HPP möglichst unterschiedliche Mutationen des *ALPL*-Gens generiert werden. Nach monoklonaler Selektion und Sequenzierung der Klone sollen diese im zweiten Teil der Arbeit bezüglich ihrer *ALPL*-Expression und TNAP Aktivität verglichen werden. Neben der basalen Charakterisierung liegt der Fokus auf der osteogenen Differenzierung der Klone im Vergleich mit der nicht mutierten hTERT PDL Zelllinie. Die Erkenntnisse sollen zum einen die generierten Zelllinien als *in vitro* Modell der dentalen Aspekte der Hypophosphatasie validieren und zum anderen Ansätze zur weiteren Erforschung odontogener Symptome der Erkrankung liefern.

2. Material und Methoden

2.1. Zellbiologische Arbeiten

Die Zellkulturarbeiten, die im Folgenden beschrieben werden, wurden unter einer Sterilwerkbank mit steriler Plastik- und Glas-Ausstattung und autoklavierten oder sterilfiltrierten Lösungen durchgeführt.

Bei der verwendeten Zelllinie handelt es sich um Zellen aus dem parodontalen Ligament eines gesunden jugendlichen Patienten, welche über einen lentiviralen Gentransfer mit der humanen Telomerase Reversen Transkriptase (hTERT) immortalisiert wurden. Das PDL enthält Progenitorzellen, welche *in vitro* ein vielseitiges Proliferations- und Differenzierungspotential zeigen. Zellen aus dem PDL eignen sich deswegen gut als Modell in der regenerativen Parodontalforschung. Die Zelllinie wurde in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. med. Schieker der Klinik für Allgemeine Unfall- und Wiederherstellungschirurgie der Universität München entwickelt und charakterisiert (Docheva et al., 2010).

2.1.1. Kultivierung der Zellen

Die Zellen wurden in Zellkulturflaschen aus Polystyrol mit Filterdeckel und optisch-mechanisch aktivierter Wachstumsfläche zur besseren Zelladhäsion (Techno Plastic Products Filter 25 ml, 75 ml, 150 ml) in einem HeraCell 240i Inkubator (ThermoFisher Scientific) bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Vor Gebrauch wurden alle Zellkulturmedien und Zusätze auf 37 °C vorgewärmt. Als Basalmedium wurde DMEM High Glucose Medium (DMEM 1x +4,5g/L D-Glucose, L-Glutamin, - Pyruvat, Gibco, 41965-039) mit einem Zusatz von 10 % Fötalem Kälberserum (FCS, Bio-Sell, BS.FCS 0.500 EUA) und 1 % Penicillin/Streptomycin (Pen/Strep, Sigma Aldrich, P4333) verwendet. Zur Wachstumsförderung wurde den Zellen 5 ng/ml Fibroblasten-Wachstumsfaktor (Fibroblast Growthfactor, FGF, PeproTech, 100-18C-500 µg) zugegeben.

Alle zwei bis drei Tage wurden die Zellen mit frischem Medium versorgt. Hierfür wurde das alte Medium abgenommen und ein entsprechendes Volumen frischen Mediums auf die Zellen gegeben. Bei einer Konfluenz von 80-90 % wurden die Zellen passagiert. Dafür wurde das Medium abgenommen und die Zellen mit sterilem PBS (Dulbecco's Phosphat

Buffered Saline modified without calcium chloride and magnesium chloride, Sigma-Aldrich, D8537-500ml) gewaschen, um Serumreste zu entfernen. Anschließend wurden die Zellen mit 0,005 % Trypsin-EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure) in PBS (Gibco, 15400-54) für 3 Minuten im Brutschrank inkubiert. Durch Klopfen an die Seiten der Zellkulturflaschen wurde das Lösen der adhärenen hTERT PDL Zellen mechanisch unterstützt. Die Zellsuspension wurde in frisches Medium aufgenommen und für 5 Minuten bei 1200 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, um den negativen Effekt des Trypsins auf das Wachstum und die Adhärenz in der neuen Kulturflasche zu minimieren. Nach Resuspension des Pellets wurden die Zellen gezählt und in einer je nach Versuch variierenden Dichte ausgesät.

2.1.2. Bestimmung der Zellzahl

Um in den weiterführenden Versuchen vergleichbare Konditionen zu schaffen, wurden die Zellen vor dem Aussäen mit einer Neubauer-Zählkammer gezählt. Zunächst wurden die Zellen wie in 2.1.1. beschrieben behandelt und in frischem Medium resuspendiert. 10 µl der Zellsuspension wurden mit 90 µl Trypanblau 0,4 % (Gibco, 15250-061) vermischt. Trypanblau färbt tote Zellen blau, die bei der Zählung nicht berücksichtigt wurden. Nach guter Durchmischung wurden je 10 µl in eine Hälfte der Zählkammer appliziert. Die Anzahl der Zellen pro Milliliter wurde ermittelt, indem die Zellen aus vier großen Quadraten addiert, der Mittelwert bestimmt und mit dem Verdünnungsfaktor 10 und dem Kammerfaktor 10 000 multipliziert wurde.

2.1.3. Berechnung der Populationsverdopplung pro Tag

Zur Bestimmung der Populationsverdopplung wurden jeweils $1 \cdot 10^6$ Zellen ausgesät und bis zur Konfluenz nach fünf Tagen kultiviert. Die Zellen wurden geerntet und die Zellzahl bestimmt, anschließend wurden erneut $1 \cdot 10^6$ Zellen ausgesät. Die Populationsverdopplung pro Tag wurde mit folgender Formel berechnet:

$$\text{Populationsverdopplung / Tag} = \frac{\ln\left(\frac{\text{Zellzahl}}{1 \cdot 10^6}\right) \cdot 3,33}{\text{Tage seit der letzten Passage}}$$

2.1.4. Osteogene Differenzierung

Die hTERT PDL Zelllinie und die mutierten Zelllinien wurden unter gleichen Bedingungen osteogen differenziert. Um einem Ablösen der Zellen mit fortschreitender Differenzierung entgegenzuwirken, wurden die Wells initial mit 10 µg/ml Fibronectin (Promocell C43060) in PBS beschichtet und für 10 Minuten bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde das Fibronectin abgenommen und die Zellen in einer Dichte von 20 000 Zellen/ cm² in 6- und 24-Well Platten ohne FGF ausgesät und bis zur Konfluenz kultiviert. Das Differenzierungsmedium bestand aus dem Basalmedium 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). Als Kontrollmedium wurde das Basalmedium ohne weitere Zusätze verwendet. Die Proben zur Ernte von RNA und Protein wurden jeweils in zwei bzw. drei Wells einer 6-Well Platte (Techno Plastic Products) ausgesät. Zur spezifischen Färbung der Differenzierung (TNAP-/Alizarin-Färbung) wurden jeweils Triplikate in 24-Well Platten (Techno Plastic Products) ausgesät.

In Vorversuchen wurde zunächst die Differenzierung der hTERT PDL Zelllinie unabhängig von Mutationen untersucht. Für die RNA Isolation wurden die Zellen nach 0, 1, 3, 7 und 14 Tagen und für die Proteinproben nach 0, 3, 7, 14 und 21 Tagen geerntet. Dabei wurde jeweils zusätzlich eine Kontrollprobe ohne Differenzierungsmedium untersucht. Für die Differenzierung der mutierten Zelllinien wurden die Tage 0, 1, 3, 7 und 14 für die RNA Isolation beibehalten, bei den Proteinproben beschränkte sich die Analyse auf die frühen Zeitpunkte nach 0, 3 und 7 Tagen osteogener Differenzierung. Nach dem erfolgreichen Nachweis der Differenzierung in den Vorversuchen wurde auf die Kontrollgruppen ohne Differenzierungsmedium verzichtet. Als Kontrolle wurde in dieser Versuchsreihe ebenfalls Zellen der hTERT PDL Zelllinie ohne Transfektion mit crRNA differenziert. Bei allen Proben erfolgte die Färbung der TNAP nach 7 und 14 Tagen und die Alizarin Färbung nach 28 Tagen. Bei den Färbungen wurden jeweils Triplikate der Differenzierungs- und Kontrollgruppen miteinander verglichen. Tabelle 2 fasst die Zeitpunkte in den verschiedenen Experimenten zusammen.

Tab. 2: Zeitpunkte der Osteogenen Differenzierung in Tagen. (Diff.: Differenzierungsmedium, Ktrl.: Kontrollmedium)

	Vorversuche		Zelllinien mit Mutationen	
RNA	Diff.	1, 3, 7, 14	Diff.	1, 3, 7, 14
(je 2 Wells in 6-Well Platte)	Ktrl.	0, 1, 3, 7, 14	Ktrl.	0
Protein	Diff.	3, 7, 14, 21	Diff.	3, 7
(je 3 Wells in 6-Well Platte)	Ktrl.	0, 3, 7, 14, 21	Ktrl.	0
TNAP Färbung	Diff.	7, 14	Diff.	7, 14
(je 3 Wells in 24-Well Platte)	Ktrl.	7, 14	Ktrl.	7, 14
Alizarin Färbung	Diff.	28	Diff.	28
(je 3 Wells in 24-Well Platte)	Ktrl.	28	Ktrl.	28

2.1.5. Stimulation mit Parathormon (PTH)

Um die Auswirkung der Stimulation mit PTH auf die Zellen des parodontalen Ligaments mit und ohne *ALPL*-Mutationen während der osteogenen Differenzierung zu untersuchen, wurden die Zellen analog zu 2.1.3. für RNA und Proteinisolierung in 6-Well Platten ausgesät. Nach Erreichen der Konfluenz wurden die Zellen zunächst für drei Tage mit Differenzierungsmedium kultiviert. Am Tag drei wurden die Zellen erneut mit frischem Medium versorgt, wobei dem Medium zur PTH Stimulation 50 nM PTH (Fragment 1-34, Sigma Aldrich, P3796 1MG) in PBS zugegeben wurde. Das Kontrollmedium enthielt das entsprechende Volumen PBS. In einem Vorversuch wurde die Genexpression in nicht gecrispten PDL Zellen nach 0, 1, 6, 24 und 48 Stunden untersucht. In weiterführenden Experimenten zum Vergleich zwischen den Klonen und den nicht mutierten Zellen wurde die Genexpression und die TNAP Aktivität auf Proteinebene nach 0, 1 und 6 Stunden analysiert.

2.2. Induktion von Mutationen des *ALPL* Gens mittels CRISPR/Cas9

Mittels der CRISPR/Cas9 Methode lassen sich gezielt DNA-Sequenzen in einem Zielorganismus modifizieren. Dabei werden die Zellen mit einem Ribonukleotidkomplex aus guideRNA und Cas9 Protein transfiziert. Die guideRNA bezeichnet dabei einen Duplex aus einer crRNA, welche über eine 20 Nukleotide lange komplementäre Sequenz an die Ziel-DNA bindet, und der tracrRNA, über welche das Cas9 Protein gebunden wird. Der

Ribonukleotidkomplex bindet sequenzspezifisch an die zelleigene DNA und induziert dort einen Doppelstrangbruch. Die fehleranfälligen zelleigenen Reparaturmechanismen fügen Mutationen in Form von Insertionen und Deletionen ein, was zu einer gezielten Geninaktivierung genutzt werden kann. Um die Auswirkungen von Mutationen der TNAP an verschiedenen Loci zu beurteilen, wurden zwei verschiedene crRNA für das *ALPL* Gen eingesetzt. Diese werden im Folgenden als ALPL1 und ALPL2 (TrueGuide™ Synthetic crRNA, ThermoFisher Scientific, A35533) bezeichnet (S. Anhang). Als Positivkontrolle wurde eine crRNA für die Cyclin abhängige Kinase 4 (CDK4, ThermoFisher Scientific, A35516) und als Negativkontrolle eine nicht kodierende crRNA (ThermoFisher Scientific, A35526) verwendet (S. Tab. 3).

Tab. 3: crRNA der ALPL1, ALPL2 und CDK4 Konstrukte. Alle crRNAs wurden über ThermoFisher Scientific bezogen. Der Strang bezieht sich auf denjenigen Strang, an den die crRNA mit der Zielsequenz bindet, die PAM Sequenz findet sich im jeweils anderen Strang. Die ALPL mRNA mit den ALPL1 und ALPL2 Zielsequenzen ist im Anhang abgebildet. Chr: Chromosom. PAM: Protospacer adjacent motif.

	ALPL1	ALPL2	CDK4
Zielsequenz (5'-3')	CGTTGCTGAGTACCAGTCC	CTTGGTCTCGCCAGTACTTG	TACCTCTCGATATGAGCCAG
PAM	CGG	GGG	TGG
Locus	Chr.1:21564117-21564139 auf GRCh38, Exon 6	Chr.1: 21560639-21560661 auf GRCh38, Exon 3	Chr.12: 57751690-57751712 auf GRCh38
Strang	forward	forward	reverse
Spezies	human	human	human
Referenznr.	CRISPR1088188_SGM	CRISPR1072819_SGM	CRISPR1007915_SGM

2.2.1. Synthese der guideRNA

Zunächst wurde die spezifische crRNA mit der tracrRNA (TrueGuide™ Synthetic tracrRNA, ThermoFisher Scientific, A35506) zu einem crRNA:tracrRNA Duplex (guideRNA) hybridisiert. Die crRNA und tracrRNA wurden dafür in einer 100 µM Lösung in TE Puffer pH 8,0 (Tris-EDTA Puffer, ThermoFisher Scientific, AM9849) angesetzt und davon jeweils 10 µl mit 10 µl des 5x Annealing Puffers und 20 µl Nuklease-freien Wassers (Promega, P199E) zu einer finalen Konzentration von 20 µM des crRNA:tracrRNA Duplex

gemischt. Folgendes Programm wurde in einem Thermocycler (Labcyler Gradient, Sensoquest 011-101) durchgeführt:

95 °C	5 min
95 °C – 78 °C	- 2 °C / sec
78 °C	10 min
78 °C – 25 °C	- 0,1 °C / min
25 °C	5 min

Die Lagerung des crRNA:tracrRNA Duplex erfolgte bei -20 °C.

2.2.2. Transfektion der hTERT PDL Zellen

Zur Transfektion wurden die hTERT PDL Zellen mit einer Dichte von 6250 Zellen / cm² in Basalmedium + 5 ng/ml FGF in 6-Well Platten ausgesät. Einen Tag nach dem Aussäen waren die Zellen etwa 50 % konfluent und wurden mit dem Cas9 Protein (TrueCut™ Cas9 Protein V2, ThermoFisher Scientific, A36499) und dem crRNA:tracrRNA Duplex über ein Lipofectamin™ CRISPRMAX™ Transfektionsreagenz (ThermoFisher Scientific, CMAX00003) transfiziert. Der Transfektionsansatz wurde für jede crRNA wie folgt in zwei Nuklease-freien sterilen Reaktionsgefäßen vorbereitet:

Gefäß 1:	DMEM High Glucose + 1 % Pen/Strep ohne FCS	125 µl
	Cas9 Protein (5 mg/ml)	7500 ng (= 1,5 µl)
	crRNA:tracrRNA Duplex (20 µM)	50 pmol (= 2,5 µl)
	Lipofectamin Cas9 Plus Reagent	15 µl
Gefäß 2:	DMEM High Glucose + 1 % Pen/Strep ohne FCS	125 µl
	Lipofectamin CRISPRMAX Reagent	7,5 µl

In Reaktionsgefäß 1 wurde das Lipofectamin Cas9 Plus Reagent (ThermoFisher Scientific, CMAX00003) zuletzt zugegeben. Reaktionsgefäß 2 wurde anschließend für eine Minute bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Um längere Inkubationszeiten zu vermeiden, wurde

Gefäß 2 nach Gefäß 1 pipettiert. Der Inhalt beider Reaktionsgefäße wurde gemischt und für 10 – 15 Minuten bei RT inkubiert. In der Zwischenzeit wurde das Medium der hTERT PDL Zellen abgenommen und die Zellen mit Transfektionsmedium (DMEM High Glucose Medium mit 1 % Pen/Strep und 2,5 % FCS) versorgt. 275 µl des Transfektionsansatzes wurde pro Well auf die Zellen pipettiert und die Zellen für zwei Tage im Brutschrank inkubiert. An Tag 1 erfolgte ein Mediumwechsel, ebenfalls mit Transfektionsmedium. Abbildung 5 veranschaulicht die Transfektion der hTERT PDL Zellen mit den verschiedenen crRNA Konstrukten. Mit der Negativkontrolle sollen unspezifische Mutationen im Bereich der ALPL1 und ALPL2 crRNA ausgeschlossen werden. Deswegen wurden zwei Wells mit einer nicht codierenden crRNA angesetzt, um im Anschluss unter Verwendung der ALPL1 und ALPL2 spezifischen Primer beide Genabschnitte auf unerwünschte Spontanmutationen zu untersuchen und diese gegebenenfalls von der induzierten Mutation abzugrenzen. Ein Well wurde zusätzlich ohne den Transfektionsansatz kultiviert, um die Auswirkung der Transfektion auf die Zellmorphologie und Proliferation zu bewerten (S. Abb. 5).

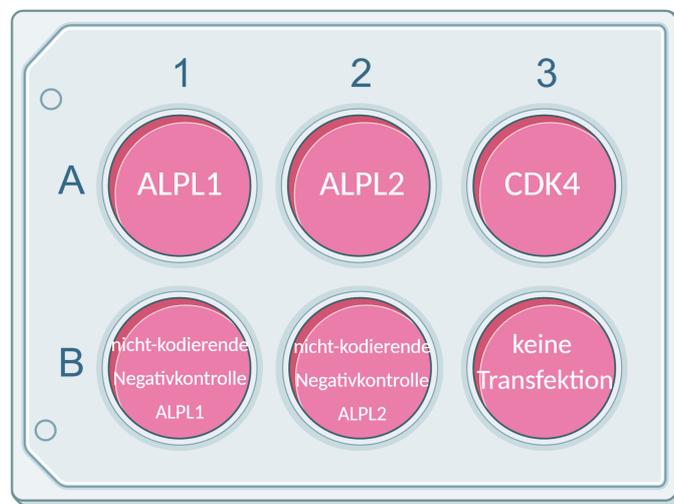


Abb. 5: Schema der Transfektion in einer 6-Well Platte. Die Grafik wurde mit dem Programm BioRender (<https://biorender.com>) erstellt.

2.2.3. Cleavage Assay

Um zu ermitteln, ob und mit welcher Effizienz eine Locus-spezifische Mutation durch CRISPR/Cas9 entstanden ist, wurde ein sogenannter Cleavage Assay unter Verwendung

des GeneArt® Genomic Cleavage Detection Kit (ThermoFisher Scientific, A24372) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Dieser Assay basiert auf der T7 Endonuklease, welche Basenfehlpaarungen in der doppelsträngigen DNA erkennt und diese schneidet. Zwei Tage nach der Transfektion wurden die Zellen geerntet und gezählt. Es wurden je 60 000 Zellen der einzelnen Transfektionen für den Cleavage Assay verwendet. Nach der Zelllyse wurde die DNA in einer Polymerasekettenreaktion (PCR, polymerase chain reaction) unter Verwendung sequenzspezifischer Oligonukleotide, sogenannter Primer, amplifiziert und anschließend denaturiert, sodass sie einzelsträngig vorlag. Über einen Re-Annealingschritt fügten sich die Einzelstränge mit einer Mutation mit solchen ohne Mutation zusammen, was zu Basenfehlpaarungen führte. Diese können durch die T7 Endonuklease erkannt und geschnitten werden. Somit entstanden doppelsträngige DNA-Fragmente in drei unterschiedlichen Längen: Der ursprünglichen Länge und den beiden kleinen Fragmenten nach Schnitt durch die Endonuklease (S. Abb. 6).

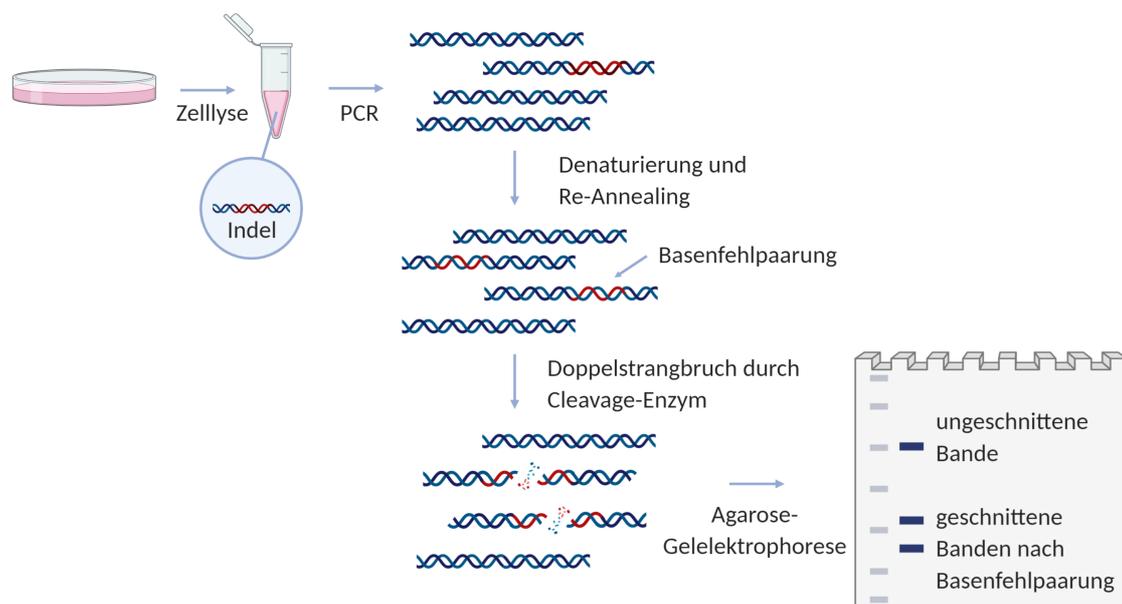


Abb. 6: Schritte des Cleavage Assays. Die Grafik wurde mit dem Programm BioRender (<https://biorender.com>) erstellt.

Die Primer zur Amplifizierung der DNA wurden dabei so gewählt, dass die PAM Sequenz, die durch die Cas9 erkannt und an der der Doppelstrangbruch induziert wird, nicht genau mittig innerhalb der Sequenz liegt. Dadurch entstehen zwei gut voneinander abgrenzbare DNA-Fragmente. Eine dem Kit beigelegte PCR Kontrolle mit gegebenem DNA-

Template und Primern wurde als Positivkontrolle untersucht. Die für den Cleavage Assay verwendeten Primer sind in Tabelle 4 gelistet.

Die Proben wurden auf 1,5 %igen Agarosegelen aufgetragen und 90 V Spannung angelegt (S. 2.2.7. Agarosegelelektrophorese). Um die Effizienz des Cleavage Assays und damit den prozentualen Anteil der mutierten Zellen zu ermitteln, wurden die Agarosegele unter Verwendung der Software ImageJ (U. S. National Institutes of Health, <http://imagej.net>) ausgewertet. Die Software kann die Intensität verschiedener Banden einer Probe graphisch darstellen und quantifizieren, indem sie die Integrale spezifisch gewählter Bereiche errechnet. Dabei wird die Intensität der ungeschnittenen Bande mit der Intensität der Summe der geschnittenen Banden in ein Verhältnis gesetzt. Über folgende Formel kann die Effizienz der genetischen Modifikation ermittelt werden:

$$\text{Effizienz} = 1 - \left(1 - \sqrt{\frac{\text{Summe der geschnittenen Banden}}{\text{Summe der geschnittenen Banden} + \text{ungeschnittene Bande}}} \right)$$

Tab. 4: Primer für den Cleavage Assay. Die Primer wurden über biomers.net bezogen. Bp: Basenpaare. Ktrl: Kontrolle.

Primer	Sequenz 5'-3'	Produkt [bp]	Cleavage 1 [bp]	Cleavage 2 [bp]
ALPL1	s: GATAAAGCCAAACCCGCC as: AGAGAAATCCCACAGTGCCT	388	133	255
ALPL2	s: CTGGAGGATCTGGATGGCAC as: TTACAGAGCCATGCCAGTG	541	200	341
CDK4	s: GCACAGACGTCCATCAGCC as: GCCGGCCCAAGGAAGACTGGGAG	577	256	301
PCR Ktrl.	n/a	516	291	225

2.2.4. Monoklonale Selektion

Um eine Zelllinie zu erhalten, in der alle Zellen nach Induktion des TNAP Knockouts mittels CRISPR/Cas9 den gleichen Genotyp haben, wurden die Zellen nach der Ernte an Tag zwei in eine Einzelzellkultivierung überführt und monoklonal selektiert. Die Zellen wur-

den dafür in je drei 96-Well Zellkulturplatten pro Transfektion mit einem Verdünnungsfaktor von 0,5 Zellen pro Well ausgesät. Dies entsprach einer Gesamtzellzahl von 144 Zellen auf 28,8 ml Medium, je 100 µl dieser Zellsuspension wurden in jedes Well pipetiert.

Einen Tag nach dem Aussäen in die 96-Well Platten wurden die Zellen mikroskopisch inspiziert und jene Wells markiert, die bereits initial mehr als eine Zelle enthielten. Die Zellen in diesen Wells wurden nicht weiter kultiviert, um Mischkolonien auszuschließen. Sobald die Zellen in den 96-Well Platten konfluent waren, wurden sie analog zu 2.1.2. geerntet und zunächst in 24-Well Platten, dann in 6-Well Platten und schließlich in T75 Zellkulturflaschen ausgesät. Bei Erreichen von Konfluenz in den T75 Zellkulturflaschen wurden die Zellen gezählt und je 1×10^6 zur DNA-Isolation für die Sequenzierung verwendet. Von den restlichen Zellen wurden je 2×10^6 Zellen abzentrifugiert, in 2 ml FCS + 10 % DMSO (Dimethylsulfoxid, Sigma Aldrich, D8418-100ml) resuspendiert und bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

2.2.5. DNA-Isolation

Zur DNA-Isolation aus den Zellpellets für die Sequenzierung wurde das NucleoSpin® Tissue Kit (Macherey-Nagel, 740952.50) unter Angaben des Herstellers eingesetzt. Die DNA wurde im letzten Schritt in 50 µl Elutionspuffer eluiert und vor der Zentrifugation 4 Minuten bei RT inkubiert. Die Lagerung der DNA erfolgte bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

2.2.6. Semiquantitative Polymerase-Kettenreaktion

Vor der Sequenzierung wurde die DNA sequenzspezifisch amplifiziert. Der PCR Ansatz mit einem Gesamtvolumen von 50 µl umfasste je folgende Komponenten:

0,5 µl	20 mM dNTPs (Promega, U1511)
0,5 µl	10 µM sense Primer
0,5 µl	10 mM antisense Primer
4 µl	25 mM MgCl ₂ (Promega, A351H)
10 µl	5x Colorless GoTaq® Flexi Buffer (Promega, M890A)
0,2 µl	GoTaq® DNA Polymerase (5 U / µl) (Promega, M780B)

3 µl	Template DNA
31,3 µl	Nuklease-freies H ₂ O (Promega, P199E)

Für die PCR wurden dieselben Primer wie im Cleavage Assay (Tabelle 3) verwendet. Die Komponenten wurden mit Ausnahme der DNA als Master-Mix pipettiert und in PCR-Gefäßen vorgelegt. Erst dann wurde das Template beziehungsweise H₂O als Negativkontrolle zugegeben. Das Standard-PCR Programm erfolgte in einem Thermocycler und besteht aus den folgenden Schritten:

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

2.2.7. Agarose-Gelelektrophorese

Im Anschluss an die PCR wurden die amplifizierten Proben in einer Agarose-Gelelektrophorese überprüft. Für die Gele wurde 1,5 Gewichts-% LE-Agarosepulver (Genaxxon Bioscience, M3044.0500) in einem Volumen von 70 - 200 ml 0,5 x Tris-Acetat-Puffer (Stocklösung 50x: 242 g Tris Base (Sigma-Aldrich, T6066-5kG), 57,1 ml Essigsäure (Roth 6755.2), 100 ml 0,5 M Na₂EDTA pH 8,0 (Roth Cn51.1) ad 1000 ml H₂O) aufgekocht und nach kurzem Abkühlen mit 5 µl/ 100 ml GelRed® (Genaxxon Bioscience, M3199.0500) versehen. GelRed® interkaliert mit der DNA und sorgt dafür, dass die Banden unter UV-Licht sichtbar werden. Das Gel wurde anschließend in die vorgesehenen Schlitten gefüllt und mit Kämmen versehen, durch die im ausgehärteten Gel Taschen entstehen. In die Taschen wurden 10 µl der PCR-Proben und der Negativkontrolle, welche zuvor mit 10 µl H₂O und 3,3 µl 6x Ladepuffer (ThermoFisher Scientific, R0611) versetzt wurden, aufgetragen. Um später die Größe der Proben nachvollziehen zu können, wurden stets 4,5 µl des 100 bp Markers (Promega, G210A) in die erste Tasche aufgetragen. Durch Anlegen einer Spannung von 90 - 100 V wandern die durch den Phosphatteil negativ geladenen DNA-Fragmente zum Pluspol und werden dabei ihrer Größe nach aufgetrennt. Das im

Ladepuffer enthaltene Xylencyanol und Bromphenolblau gibt eine Orientierung, wie weit die Proben in etwa gelaufen sind. Das Gel wurde daraufhin unter UV-Licht fotografiert (Infinity 1000, Vilber Lourmat). Die DNA-Fragmente konnten mit der Software Mega Capt (Vilber Lourmat) visualisiert werden.

2.2.8. Aufreinigung der PCR Produkte

Um Nukleinsäuren zu sequenzieren, müssen sie nach einer PCR aufgereinigt werden. Je nachdem, ob in der Agarosegelelektrophorese eine klare Bande der gewünschten Größe oder zusätzlich unspezifische Banden anderer Größen erkennbar waren, wurden die PCR Proben unterschiedlich aufgereinigt. Die Proben mit präzisen Banden wurden über NucleoSEQ® Säulen (Macherey-Nagel, 740523.50) nach Herstellerangabe aufgereinigt. Es wurden je 20 µl des PCR Produkts eingesetzt. Bei den Proben mit unspezifischen Banden wurde der gesamte 50 µl PCR-Ansatz auf einem Agarosegel aufgetragen und aufgetrennt, das Gel unter UV-Licht betrachtet und die gewünschten Banden mit einem sterilen Einmalskalpell ausgeschnitten. Die Aufreinigung der Proben erfolgte unter Verwendung des NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up Kits (Macherey-Nagel 740609.50), nach Angaben des Herstellers. Die Proben wurden in einem finalen Volumen von 20 µl Elutionspuffer eluiert. Bei allen Proben erfolgte nach Aufreinigung eine DNA-Konzentrationsbestimmung am Tecan Infinite Plattenlesegerät unter Verwendung einer NanoQuant Platte™ (Tecan). Über das Verhältnis der Absorption bei 260 nm zu 280 nm kann auf die Reinheit der Nukleinsäurelösung geschlossen werden. Bei DNA sollte dieser Wert bei etwa 2,0 liegen.

2.2.9. Sequenzierung

Zum Sequenzieren der aufgereinigten DNA-Fragmente wurden in einem PCR-Gefäß 8 µl Nuklease-freies H₂O, 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 3 µl des aufgereinigten PCR-Produkts vermengt. Der BigDye Terminator-Mix enthält unter anderem fluoreszenzmarkierte ddNTPs, die bei ihrem Einbau zu einem Kettenabbruch führen. Diese können in einer Kapillarelektrophorese detektiert werden, wodurch die DNA-Sequenz rekonstruiert werden kann. Für den ALPL1 Locus wurde der antisense Primer und für den ALPL2 der entsprechende sense Primer eingesetzt, da bei

diesen nach 200 bzw. 225 Nukleinsäuren die PAM Sequenz zu finden ist und dies aufgrund der potenziellen Mutationen der relevante Abschnitt ist (s. Tabelle 3, Anhang). Das Sequenzierprogramm erfolgt in einem Thermocycler und setzt sich aus den folgenden Schritten zusammen:

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

Der Sequenzieransatz wurde anschließend auf einer NucleSEQ[®]-Säule (Macherey-Nagel, 740523.50) nach Herstellerangaben aufgereinigt. Der Durchfluss wurde mit 2 µl 2 M Natriumacetat (Roth, 6773.2) und 80 µl 96 %-Ethanol (Roth, 5054.4) versetzt und für 15 Minuten bei 14 000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet mit 200 µl 70 %igem Ethanol gewaschen. Es erfolgte erneut eine Zentrifugation für 5 Minuten bei 14 000 rpm, der Überstand wurde verworfen und das Pellet getrocknet, welches bei -20 °C gelagert werden kann. Zum Sequenzieren wurden die Proben in 30 µl HiDi[™] Formamid (Applied Biosystems, 4401457) gelöst und in eine 96-Well PCR Platte aufgetragen. Die Sequenzierung erfolgte an einem ABI 3730 Sequencer am Institut für Humangenetik im Biozentrum der Universität Würzburg. Die Darstellung erfolgte mit dem Programm SnapGene (Version 5.2.1, GSL Biotech LLC).

2.3. Molekularbiologische Analysemethoden

2.3.1. RNA-Isolation und Konzentrationsbestimmung für die Genexpressionsanalyse

Pro Probe und Zeitpunkt wurden je zwei Wells einer 6-Well Platte mit 200 000 Zellen/Well ausgesät und identisch behandelt, welche in diesem Schritt zu einer Probe zusammengeführt wurden. Die Zeitpunkte der Ernte für die RNA Isolation sind Tabelle 2 zu entnehmen. Zur Ernte der Proben wurde das Medium abgenommen und die Zellen mit sterilem PBS gewaschen. Anschließend wurde pro Well 175 µl des Lysepuffers RA1 aus

dem NucleoSpin® RNA II Kit (Macherey-Nagel, NZ740955250) mit 1,75 µl β-Mercaptoethanol aufgetragen, die Zellen mit einem Zellschaber gelöst und in ein Reaktionsgefäß überführt. Das Zelllysate aus beiden Wells wurde nun in einem finalen Volumen von 350 µl zusammengeführt. Die Lagerung der Proben vor der Isolation erfolgte bei -80 °C. Die Zeitpunkte, an denen die Proben für die RNA-Isolation geerntet wurden, sind Tabelle 2 zu entnehmen. Die Isolierung und Aufreinigung der RNA erfolgte unter Verwendung des NucleoSpin® RNA II Kits (Macherey-Nagel, NZ740955250, rDNAse 740963) nach Herstellerprotokoll. Die RNA wurde im letzten Schritt in 20 µl Nuklease-freiem Wasser eluiert, um die Konzentration der finalen Lösung zu erhöhen. Die RNA Proben wurden bei -80 °C gelagert.

Die RNA-Konzentration wurde an einem Tecan Infinite Plattenlesegerät unter Verwendung einer NanoQuant Plate™ gemessen. Als Nullabgleich diente Nuklease-freies Wasser, in dem die RNA gelöst worden war. Der Quotient der Absorption bei 260 nm zu 280 nm, welcher Auskunft über die Reinheit der Nukleinsäurelösung gibt, sollte bei RNA zwischen 1,8 und 2 liegen.

2.3.2. cDNA Synthese

Um Rückschlüsse auf die Genexpression zu ziehen, wurde die isolierte RNA mittels reverser Transkription in cDNA umgeschrieben. Die cDNA diente im Folgenden als Template zur Amplifizierung spezifischer Gene in der qPCR. Die RNA wurde dafür nach der Konzentrationsbestimmung auf 1 µg RNA in 17 µl Nuklease-freiem Wasser verdünnt. Dieser Lösung wurden je 1 µl Oligo-dT Primer (Stammlösung 50 pmol/µl, Promega, C110A) zugegeben und die Proben nach einem ersten Denaturierungsschritt von 5 Minuten bei 70 °C auf Eis gelagert. Zu den Proben wurden je 7 µl eines Reaktionsansatzes mit folgenden Bestandteilen zu einem finalen Volumen von 25 µl hinzu pipettiert:

5 µl	M-MLV Reverse Transkriptase 5x Reaction Buffer (Promega, M531A)
0,625 µl	dNTP Mix (20 mM, Promega, U1511)
0,375 µl	Nuklease-freies H ₂ O
1 µl	M-MLV Reverse Transkriptase (200 u/µl, Promega, M170B)

Die Proben wurden für den Elongationsschritt für 1 Stunde bei 42 °C und anschließend zur Hitzeinaktivierung der Reversen Transkriptase für 10 Minuten bei 92 °C in einem Thermocycler inkubiert.

2.3.3. Quantitative real-time PCR (qPCR)

Mit Hilfe der qPCR können Nukleinsäuren vervielfältigt und gleichzeitig in Echtzeit quantifiziert werden. Das Prinzip beruht dabei auf der herkömmlichen PCR, zusätzlich kann durch die Zugabe von Fluoreszenzfarbstoffen, die in die amplifizierte DNA interkalieren, quantitativ auf die Genexpression rückgeschlossen werden. Über eine Schmelzkurvenanalyse, bei der die DNA nach abgelaufener PCR durch einen kontinuierlichen Temperaturanstieg von 65 °C bis 95 °C denaturiert wird, kann auf die Spezifität und Reinheit des Produkts rückgeschlossen werden. Folgende Reagenzien wurden pro Probe in einem Mastermix angesetzt:

10 µl	GoTaq® qPCR Mastermix 2x (Promega, A6002)
0,5 µl	sense Primer (10µM)
0,5 µl	antisense Primer (10 µM)
7 µl	Nuklease-freies H ₂ O

Dem Mastermix wurden jeweils 2 µl der 1:10 verdünnten cDNA hinzugegeben, wobei jede Probe als Duplikat gemessen wurde. Das Gesamtreaktionsvolumen belief sich auf 20 µl. Als Negativkontrolle wurde jeweils eine weitere Probe mit Nuklease-freiem Wasser anstelle der cDNA pipettiert. Die qPCR erfolgte nach dem folgenden Programm in einem qPCR-Thermocycler (CFX96, C1000™ Thermal Cycler, BioRad) unter Verwendung der Software Bio-Rad CFX Manager (Bio-Rad):

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

Die in der qPCR verwendeten Primersequenzen sind Tabelle 5 zu entnehmen. Die Primer wurden mit der Funktion Primerblast (NIH U.S. National Library of Medicine, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi>) entworfen und über bio-mers.net bezogen.

Die Daten wurden mit der $2^{-\Delta\Delta Ct}$ Methode im Microsoft Office Programm Excel ausgewertet und in GraphPad Prism 8 graphisch dargestellt. Die Werte der verschiedenen untersuchten Gene wurden in Bezug zum Haushaltsgen *$\beta 2$ -Mikroglobulin (B2M)* analysiert.

Tab. 5: Primer für die qPCR. s: Sense Primer. as: Antisense Primer. RefSeq = Reference Sequence.

Primer	Sequenz 5'-3'	Produkt [bp]	RefSeq
Haushaltsgen			
<i>B2M</i>	s: GATGAGTATGCCGCGTGT as: TCGGCATCTTCAAACCTCC	105	NM_004048.2
Phosphathaushalt			
<i>ALPL (TNAP)</i>	s: AGAACCCCAAAGGCTTCTTC as: CTTGGCTTTTCCTTCATGGT	74	BC021289.2
<i>ENPP1</i>	s: TTGGCTATGGACCTGGATTC as: TAGGAGCCGGTGTCAAATTC	105	NM_006208.3
<i>ANK</i>	s: TTCACAGTCACCTGGAATGC as: CAGGGATGATGTCGTGAATG	126	NM_054027.6
Osteogene Differenzierung			
<i>Runx2</i>	s: GAGTGGACGAGGCAAGAGTT as: CTGTCTGTGCCTTCTGGGTT	127	NM_001024637.3
<i>Sox9</i>	s: GCAGGCCGACTCGCCACAC as: GGATTGCCCCGAGTGCTCGCC	73	MN_000346.3
<i>Col1A1</i>	s: CGCAGTGGCCTCCTAATTC as: GAATGGAAGGCAAGCCCATC	86	NM_000088.3
<i>B2Galt3</i>	s: GCCTGACCAAGGAAGAATGACTA as: TTGCAAAGCAGCAGTGTCTTC	172	NM_003783.3
<i>C5AR1</i>	s: GAGACCAGAACATGGACTCCT as: AGGATGTCTGGAACACGCAG	127	NM_001736.4
Sonstige			
<i>P2X7</i>	s: GGCACCGGAGGAAAATTTGA as: TGAGGAAGTCGATGAACACA	96	NM_002562.6

2.3.4. Proteinisolation und Konzentrationsbestimmung

Die Zeitpunkte, zu denen die Zellen für die Proteinanalyse geerntet wurden, sind Tabelle 2 zu entnehmen. Pro Probe und Zeitpunkt sind je drei Wells einer 6-Well Platte mit 200 000 Zellen / Well ausgesät worden, welche in diesem Schritt zu einer Probe zusammengeführt wurden. Zur Ernte wurden die Zellen zwei Mal mit PBS gewaschen und pro Well 300 µl PBS + 25:1 Proteinaseinhibitor (PI) (Protease Inhibitor Cocktail Tablets, Roche 04693116001) auf die Zellen pipettiert. Die Zellen wurden mit einem Zellschaber vom Well gelöst und homogenisiert. Anschließend wurde das Zelllysate in ein Reaktionsgefäß überführt und für 5 Minuten bei 3000 rpm und 4 °C abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet in 350 µl PBS + 25:1 PI resuspendiert. Zur Lyse wurde die Zellsuspension unter permanenter Eiskühlung mit zehn Impulsen und 80 % Intensität sonifiziert und für 10 Minuten bei 14 000 x g und 4 °C zentrifugiert, um die ungelösten Zellbestandteile vom Überstand zu trennen. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, welches bei -20 °C gelagert wurde.

Zur Proteinkonzentrationsbestimmung wurde das Pierce BCA Protein-Assay-Kit (ThermoFisher Scientific, 23225) verwendet. Jede Probe und auch der Standard wurden als Triplikat gemessen. Je 95 µl einer Arbeitslösung aus 50 Anteilen BCA Reagent A und 1 Teil BCA Reagent B wurden in eine 96-Well Platte vorgelegt und 5 µl des Albuminstandards (Stockkonzentration 2 mg/ml, ThermoFisher Scientific, 23209) beziehungsweise der Probe zugegeben. Nach einer 30-minütigen Inkubation bei 37 °C wurde die Platte auf Raumtemperatur abgekühlt und die Absorption bei 562 nm in einem Tecan Infinite Plattenlesegerät ausgelesen. Mit den Absorptionswerten des Albumins wurde eine Standardkurve ermittelt und über diese die Proteinkonzentration der gemessenen Proben errechnet.

2.3.5. CSPD Assay

Über den CSPD Assay lässt sich die Alkalische Phosphatase Aktivität in Zelllysaten auf Proteinebene ermitteln. CSPD ist ein chemilumineszentes Substrat der Alkalischen Phosphatase und wird von dieser in ein metastabiles Phenolat-Anion umgewandelt, welches

während des Zerfalls Licht emittiert. Diese Lumineszenzsignale können in einem Lumimeter erfasst werden. Die maximale Emission ist dabei nach 10 Minuten erreicht und soll über mehrere Stunden anhalten.

Die Proteinlysate wurden in einer finalen Konzentration von 10 µg in PBS+PI verwendet. Um die TNAP in Abgrenzung zu den weiteren AP Isoformen zu untersuchen, wurde jede Probe mit und ohne den TNAP Inhibitor Levamisol untersucht. Levamisol (Merck 31742-250MG) wurde in einer finalen Konzentration von 1 mM eingesetzt. Jeweils 100 µl des Proteinlysats mit und ohne Levamisol wurden in einer 96-Well Platte (weiß mit transparentem Boden) appliziert und anschließend 100 µl / Well CSPD Ready to use Reagent (Merck, 11755633001) mit einer Multipipette hinzugefügt. Die Platte wurde für eine ausreichende Durchmischung der Reagenzien leicht geschwenkt und 5 Minuten bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde das Lumineszenzsignal an einem Tecan Infinite Plattenlesegerät detektiert. Die Proben wurden jeweils als Duplikat gemessen.

2.3.6. Messung der ENPP1 Aktivität

Die Bestimmung der Aktivität des TNAP Antagonisten ENPP1 basiert auf der Messung der Absorption bei 405 nm nach Zugabe des ENPP1 spezifischen Substrats p-Nitrophenyl-Thymidin 5'-Monophosphat (pnp-TMP, Sigma Aldrich T4510) mit und ohne Zugabe des ENPP1 Inhibitors β-γ-Methylenadenosin 5'-Triphosphat (β-γ mATP, Sigma Aldrich M7510). Dafür wurden je 2×10^4 Zellen pro Well als Duplikate in einer 96-Well Platte in Basalmedium ausgesät. Als Negativkontrolle wurden zusätzlich Wells ohne Zellen nur mit Basalmedium behandelt. Nach einem Tag wurde das Medium abgenommen und die Wells zweimal mit PBS gewaschen. Die Wells wurden anschließend in vier Gruppen jeweils mit und ohne Substrat pnpTMP und mit und ohne Inhibitor β-γ mATP behandelt. PnpTMP wurde in einer finalen Konzentration von 0,25 µM, β-γ mATP in einer finalen Konzentration von 300 µM in 100 µl PBS pro Well eingesetzt. Nach einer einstündigen Inkubation bei 37 °C wurde pro Well 20 µl 1 M NaOH zum Abstoppen der Reaktion hinzugefügt und die Absorption bei 405 nm am Tecan Infinite Plattenlesegerät gemessen.

2.3.7. SDS-Gel und Western-Blot

Für einen quantitativen Nachweis der TNAP auf Proteinebene wurde ein Westernblot-Experiment durchgeführt. Dafür wurde zunächst das Proteinlysate der Größe nach auf einem SDS-Gel (Natriumdodecylsulfat, engl. Sodium Dodecyl Sulfat) aufgetrennt.

2.3.7.1. SDS Gelelektrophorese

Nach gründlicher Reinigung mit 70 %igem Ethanol wurden die Glasplatten in die Halterung des Gießstands gestellt und auf ihre Dichtheit geprüft. Für ein 0,7 mm dickes 8 %iges Trenngel und Sammelgel wurden die folgenden Komponenten angesetzt:

Tab. 6: Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgel

	Volumen	Komponente	Zusammensetzung
Trenngel 8 %	2,5 ml	Lower Tris Buffer	1,5 M Tris base (Sigma T6066-5KG) 0,4 % SDS (Sigma, 74255-250G)
	2,7 ml	Acrylamid Rothiphorese Gel30 (Roth 3029.1)	
	3,1 ml	H ₂ O	
	1 ml	Glycerol (Sigma, G5516-500ml)	
	14 µl	APS 40 %	4 g APS (Roth, 9592.1) in 10 ml H ₂ O
	14 µl	TEMED (Sigma, T9281)	
Sammelgel	1,25 ml	Upper Tris Buffer	0,5 M Tris Base 0,4 % SDS
	0,5 ml	Acrylamid Rothiphorese Gel30	
	3,2 ml	H ₂ O	
	12 µl	APS 40 %	4 g APS in 10 ml H ₂ O
	12 µl	TEMED	

Zum Start der Polymerisation wurden der Trenngel-Lösung APS (Ammoniumperoxidsulfat) und TEMED (Tetramethylethylendiamin) zugegeben und diese mit Hilfe einer Pasteurpipette bis 2 cm unter den Rand zwischen die Glasplatten gefüllt. Damit das Gel an der Grenze zum Sammelgel eine gerade Kante bekommt, wurde das Trenngel mit etwa 1 cm H₂O beschichtet, welches nach dem Auspolymerisieren des Trenngels abgenommen wurde. Nun wurde die Sammelgel-Lösung angesetzt und auf das Trenngel gegeben.

Vorsichtig wurde ein Kamm eingefügt, in dessen Taschen später die Proben aufgetragen werden konnten.

Die Proteinlysate wurden auf die gewünschte Konzentration mit PBS+PI verdünnt und 1:4 mit 5x Ladepuffer (340 mM Tris Base pH 6,8, 10 % SDS, 30 % Glycerin, 6 mg Bromphenolblau Natriumsalz (Sigma-Aldrich, SAFSB5525-10G), 5 % β -Mercaptoethanol (Sigma-Aldrich 444203) ad 50 ml H₂O) versetzt. Zum Denaturieren der Proben wurden diese für 10 Minuten bei 95 °C aufgeköcht.

Das Gel wurde in die Elektrophoresekammer eingesetzt, die Kammer mit 1x Laufpuffer (10x: 250 mM Tris Base pH 6,8, 1,5 % SDS, 1,9 M Glycerin ad 1 l H₂O) gefüllt und die Kämmen vorsichtig aus den Gelen gezogen. Vor dem Beladen wurden die Taschen mit Laufpuffer gespült, um unpolymerisierte Reste des Polyacrylamids aus den Taschen zu entfernen. Die Proben und ein Proteinmarker (ProtLadder ProSieve QuadColor 00193837) wurden in die Taschen aufgetragen und eine Stromstärke von 25 mA bei maximaler Spannung für 1,5 Stunden angelegt.

2.3.7.2. Western Blot

Die Proteine, die in der SDS-Page ihrer Größe nach aufgetrennt wurden, wurden anschließend durch einen Western Blot auf eine Nitrocellulosemembran (Amersham Protran 0,2 μ m NitroCellulose – 106 00001) übertragen und konnten auf dieser durch spezifische Antikörper nachgewiesen werden. Für den Western Blot wurde eine Fastblot Semi-Dry Blotting Apparatur (Fastblot B43/ B44, Core Life Science) verwendet. Dafür wurde Whatman Filterpapier, die Membran und das Gel in 1x Transferpuffer (5x: 960 mM Glycin (Roth, 3790.1), 125 mM Tris Base, ad 1l H₂O) mit 20 % Methanol getränkt und wie folgt in der Blottingapparatur aufgebaut: Anode (Unterseite) - 3 x Whatman-Filterpapier – Nitrocellulosemembran – SDS Gel – 3 x Whatman-Filterpapier – Kathode (Oberseite). Als Einstellung für den Elektroblot wurde 1 mA/cm² Membran Stromstärke bei 11 - 14 V für 1,5 Stunden angelegt.

Um zu überprüfen, ob die Proteine erfolgreich auf die Membran übertragen wurden, wurde die Membran nach dreimaligem Waschen mit dH₂O für 10 Minuten in 50 ml

1 x Ponceau S Färbelösung (0,1 % Ponceau S (Roth, 5938.1) in 5 % Acetat) geschwenkt und bis zur Entfärbung des Hintergrunds erneut mit dH₂O gewaschen.

2.3.7.3. Detektion der Proteine

Die Membran wurde anschließend für 2 h bei RT in 50 ml Blockierungslösung [2,5 % Milchpulver (Roth, T145.2), 2,5 % BSA (Bovines Serum Albumin, PanReay ITW Reagents, A1391,0100), 2 % Eselserum (Sigma-Aldrich, S30-M) in 1x TBST (1x TBS (10 x: 250 mM Tris Base, 1,5 M NaCl (Roth P029.5) ad 1l H₂O) + 0,1 % Tween-20 (Sigma-Aldrich, P9416-200ML)] inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren. Die Inkubation mit den Primärantikörpern, welche in einer Antikörperlösung (TBST + 1 % Milchpulver, 1 % BSA und 1% Eselserum) gelöst worden waren, erfolgte über Nacht bei 4 °C. Um sowohl die etwa 80 kDa große TNAP als auch das Haushaltsprotein GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase) mit 37 kDa auf einer Membran nachzuweisen, wurde diese in Höhe von 50 kDa geschnitten und die Hälften separat mit dem Erstantikörper inkubiert. Der TNAP Antikörper B4-78 (Santa Cruz, sc-81754) wurde 1:400, der GAPDH Antikörper G-9 (Santa Cruz, sc-365062) 1:1000 eingesetzt. Anschließend wurden die Membranen 3x 10 Minuten in Waschpuffer 1 (1 mM Tris HCl pH 7,2, 150 mM NaCl, 2mM EDTA, 0,1 % Triton-X (Roth 3051.3), 1 % BSA, 1 % Milchpulver, 1 % Eselserum) gewaschen. Der Peroxidase gekoppelte Sekundärantikörper (goat anti-mouse HRP, invitrogen G21040) wurde 1:2000 in Antikörperlösung angesetzt, die Membran für 2 h bei RT inkubiert und im Anschluss 3 x 10 Minuten in Waschpuffer 2 (10 mM Tris HCl, 1 M NaCl, 2 mM EDTA, 0,1 % Triton-X, 1 % BSA, 1 % Milchpulver, 1 % Eselserum) gewaschen. Zur Detektion der Proteine wurden die zwei Lösungen des ECL-Reagenz (Enhanced Chemilumineszenz Reagenz, BioZym Scientific WesternBright Quantum K-12042-D20) nach Herstellerangaben im Verhältnis 1:1 gemischt und für 1 Minute auf die Membran gegeben. Die an den Sekundärantikörper gekoppelte Peroxidase reagierte mit dem im ECL-Reagenz enthaltenen Luminol, wobei chemilumineszent Licht entstand. Dadurch wurde genau an den Stellen der Membran, an denen spezifisch der Primärantikörper an das Protein und der Sekundärantikörper an den Primärantikörper gebunden hat, Licht emittiert. Dieses Signal konnte mittels FluorChemQ (ProteinSimple) unter Verwendung der Software Alpha-View HD2 (ProteinSimple) visualisiert werden.

2.4. Färbungen zum Nachweis der osteogenen Differenzierung

Zum Nachweis der Differenzierungsfähigkeit der hTERT PDL Zellen durch spezifische Färbungen wurden je 40 000 Zellen in zuvor mit Fibronectin beschichteten 24-Well Platten als Triplikate ausgesät. Die Kontrollgruppen erhielten lediglich das Basalmedium.

2.4.1. TNAP Färbung

Über die Reaktion von Naphthol und Fast Blue Alkalisalz kann ein semiquantitativer Nachweis der TNAP Aktivität durchgeführt werden. Naphthol ist ein Substrat der TNAP und wird in alkalischem pH hydrolysiert. Durch das Fast Blue Alkalisalz kommt es zur Formation eines unlöslichen bläulichen Präzipitats, welches die Enzymaktivität einzelner Zellen nachweisen kann. Für diesen Nachweis wurde zunächst das Leucozyte Alkaline Phosphatase Kit (Sigma Aldrich, 86C-1KT), später aufgrund von Lieferproblemen ein alternatives Protokoll verwendet. Die Herstellerangaben des Kits beziehen sich auf die Färbung weißer Blutzellen, welche auf Objektträgern fixiert worden sind, weshalb das Protokoll für die Anwendung in 24-Well Platten leicht abgeändert wurde. Die Zellen wurden nach 7 und 14-tägiger Differenzierung zweimal mit sterilem PBS gewaschen und mit 0,2 ml der Zitratlösung fixiert. Pro Well wurden 1 ml der Färbelösung eingesetzt. Bei 6 Wells wurden dementsprechend 150 µl Natriumnitritlösung mit 150 µl Fast Blue-Alkali Lösung vermischt und nach zweiminütiger Inkubation 6,75 ml deionisiertes Wasser und 150 µl Naphthol AS-BI Phosphat Lösung hinzugegeben. Die fixierten Zellen wurden mit deionisiertem Wasser gespült und je 1 ml der Färbelösung aufgetragen. Die Platten wurden für 15 Minuten auf einem Rüttler leicht geschwenkt, die Färbelösung abgenommen und die Wells mit deionisiertem Wasser gewaschen. Nun erfolgte eine mikroskopische Inspektion mit einem Leica DMI8 Mikroskop, bei der sich jene Zellen, in denen die Alkalische Phosphatase aktiv war, durch die Reaktion mit Naphthol AS-BI bläulich darstellten.

Für das alternative Protokoll wurden die Zellen ebenfalls zunächst zweimal mit sterilem PBS gewaschen, anschließend mit 4 % Paraformaldehyd (Morphisto, 11762.01000) für 30 Minuten bei RT fixiert und mit ddH₂O gewaschen. Für die Färbelösung wurden 0,6 mg/ml Fast Blue RR Salz (Sigma Aldrich, F0500-25g) und 0,2 mg/ml Naphthol AS-MX Phosphat Disodium Salz (Sigma Aldrich, N5000-100mg) in 0,1 mol/l Tris Puffer pH 9.0

gelöst und je 0,5 ml pro Well aufgetragen. Die Inkubation und mikroskopische Inspektion erfolgten wie beschrieben.

2.4.2. Alizarin Färbung

Durch die Alizarinrot-Färbung können Calciumablagerungen in der Extrazellulärmatrix (ECM) differenzierter Zellen detektiert und quantifiziert werden. Die hTERT PDL Zellen wurden dafür für 28 Tage mit Differenzierungs- bzw. Kontrollmedium inkubiert und nach Abnahme des Kulturmediums zweimal mit sterilem PBS gewaschen. Daraufhin wurden die Zellen mit kaltem 70 %igem Ethanol fixiert, für eine Stunde bei -20 °C gelagert, anschließend luftgetrocknet und zweimal mit deionisiertem Wasser gewaschen. Für die 2 % Alizarin Stock Lösung wurden 0,3 g Alizarin Red S (Sigma Aldrich, A-3757) in 15 ml deionisiertem Wasser gelöst und mit 10 % Ammoniumhydroxid (Sigma Aldrich, 22.122-8) auf pH 4,2 eingestellt. Von dieser Lösung wurden je 150 µl pro Well aufgetragen und die Platten für 15 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Schüttler inkubiert. Anschließend wurden die Wells zweimal mit deionisiertem Wasser gewaschen und unter dem Mikroskop bewertet. Calciumablagerungen zeigten sich durch ihre intensiv rote Farbe. Zur Quantifizierung wurde der Farbstoff aus den Wells eluiert. Dafür wurde eine 10 %ige Cetylpyridinium Chlorid (CPC) Lösung aus 10 g CPC (Sigma Aldrich, C07332) in 100 ml Natriumphosphat (pH 7.0) gelöst, davon je 400 µl auf jedes Well pipettiert und die Platten für 20 Minuten auf einem Schüttler inkubiert. Als Referenz wurde eine Alizarin-Standardkurve mit 1000-0 µg/ml Alizarin in 10 % CPC Lösung pipettiert und jeweils 100 µl der Standardreihe und der Eluate als Triplikate in eine 96-Well Platte aufgetragen. Die Absorption bei 570 nm wurde in einem Tecan Infinite Plattenlesegerät gemessen.

2.4.3. Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Programm Graphpad Prism Version 8. Zur Einschätzung, ob eine Stichprobe vor Anwendung eines parametrischen Tests der Normalverteilungsannahme entsprechen, wurde der Shapiro-Wilk Test angewendet. Der Mittelwertsvergleich mehrerer unabhängiger Stichproben wurde im Fall von normalverteilten Proben mit einer einfaktoriellem Varianzanalyse (analysis of variance, ANOVA) mit Dunnett Korrektur berechnet. Als nichtparametrische Alternative wurde der Kruskal-

Wallis Test mit Dunn's Posthoc Test durchgeführt. Mittelwertsvergleiche zweier unabhängiger Stichproben wurden mit einem ungepaarten t -Test errechnet und mittels der Holm-Sidak Korrektur für multiple Vergleiche korrigiert. Das Signifikanzniveau α wurde in allen Tests auf 0,05 festgelegt.

3. Ergebnisse

3.1. Induktion von Mutationen des *ALPL* Gens in parodontalen Ligamentzellen mittels CRISPR/Cas9

Ziel dieser Arbeit war es, Zelllinien aus dem parodontalen Ligament mit unterschiedlichen Mutationen des *ALPL* Gens zu generieren und damit die komplexe klinische Korrelation zwischen Genotyp und Phänotyp in den PDL Zellen abzubilden. Dafür wurden zwei verschiedene crRNA mit Zielsequenzen in Exon drei (*ALPL1*) und sechs (*ALPL2*) eingesetzt. Aufgrund der vermeintlich niedrigen Effizienz und des beschwerlichen Wachstums der Einzelzellkulturen wurden vier Replikate des CRISPR/Cas9 Experiments durchgeführt. Dabei wurde nur im ersten Durchlauf die Positivkontrolle *CDK4* und die Negativkontrolle mit nicht kodierender crRNA untersucht. Unabhängig von der verwendeten crRNA hatte die Transfektion insgesamt einen negativen Effekt auf die Proliferation der hTERT PDL Zellen, was im Vergleich der Konfluenz an Tag zwei nach der Transfektion deutlich wird. Während die Zellen ohne Transfektionsreagenz wie erwartet weitergewachsen sind, stagnierte bei den Transfektionsproben die Proliferation (S. Abb. 7).

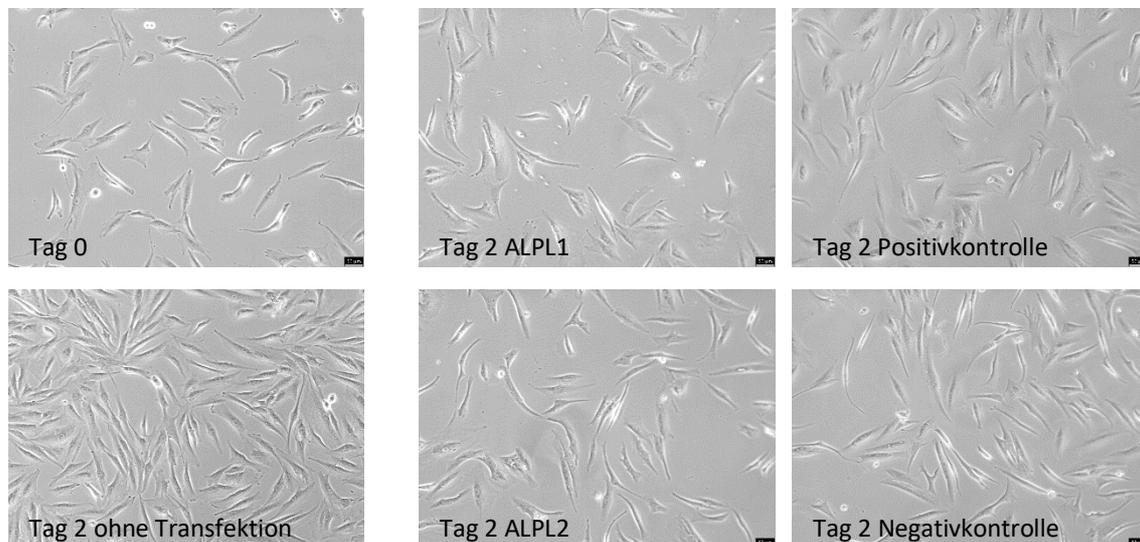


Abb. 7: Einfluss der Transfektion auf das Wachstumsverhalten der hTERT PDL Zellen. Dargestellt sind Phasenkontrastaufnahmen der verschiedenen Zellkulturen. Während die Zellen ohne das Transfektionsreagenz ein zu erwartendes Wachstumsmuster zeigten, hat die Transfektion mit allen verschiedenen crRNAs die Proliferation bis Tag zwei verlangsamt. Der Maßstabalken der Probe ohne Transfektion entspricht 100 μm , der der restlichen Proben entspricht 50 μm .

3.1.1. Ergebnis des Cleavage Assays

Mithilfe des Cleavage Assays konnte anschließend eingeschätzt werden, wie effizient durch CRISPR/Cas9 Mutationen an den verschiedenen Loci induziert wurden. Das Agarsegel in Abbildung 8 zeigt das erste biologische Replikat, die weiteren Durchgänge waren bezüglich ihrer Effizienz vergleichbar. In allen Fällen entsprachen die DNA-Banden der erwarteten Größe, welche Tabelle 3 zu entnehmen sind. Für jedes crRNA Konstrukt wurde jeweils eine Probe mit (+) und ohne (-) enzymatischen Verdau aufgetragen. Für die Negativkontrollen ALPL1 - und ALPL2 - wurde die Probe der Transfektion mit nicht kodierender crRNA jeweils unabhängig voneinander mit dem Primer für ALPL1 und ALPL2 amplifiziert. Da weder in den nicht verdauten Proben noch in den Negativkontrollen für ALPL1 und ALPL2 zusätzliche Banden aufgetreten sind, können unerwünschte Spontanmutationen sowie CRISPR-unabhängige Basenfehlpaarungen im amplifizierten Bereich ausgeschlossen werden. Die Cleavage Banden, die in den verdauten Proben sichtbar sind, zeigen also sicher durch CRISPR/Cas9 induzierte Mutationen. Bei ALPL1 und ALPL2 ist jeweils nur die größere der beiden geschnittenen Banden bei 255 bzw. 341 bp sichtbar, das Signal der zweiten kürzeren Bande konnte nicht detektiert werden. Mit abnehmender Größe der DNA-Fragmente kann auch weniger GelRed zur Visualisierung unter UV-Licht in die DNA interkalieren, was eine Erklärung für die nicht sichtbaren Banden sein kann. Die Positivkontrolle CDK4 und auch die PCR Kontrolle zur internen Validierung des Experiments weisen zwei deutlich sichtbare Cleavage Banden in der passenden Größe auf.

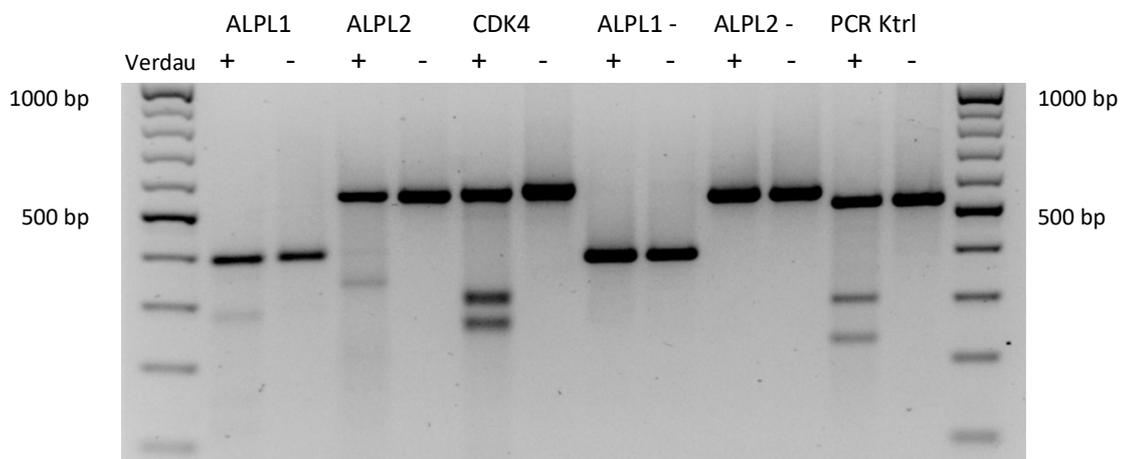


Abb. 8: Ergebnis des Cleavage Assays. Auf das Agarosegel wurden pro crRNA Proben mit (+) und ohne (-) enzymatischen Verdau aufgetragen. Produktgröße der ungeschnittenen und geschnittenen Banden: ALPL1 388 bp, 255 bp, 133 bp; ALPL2 541 bp, 341 bp, 200 bp; CDK4: 577 bp, 301 bp, 256 bp; PCR Ktrl: 516 bp, 291 bp, 225 bp. Bp: Basenpaare. Ktrl: Kontrolle.

Mithilfe der Software ImageJ konnten die Intensitäten der einzelnen Banden des Agarosegels miteinander verglichen und somit die Effizienz, mit welcher Mutationen entstanden sind, eingeschätzt werden. Nach vier durchgeführten Wiederholungen ergab sich eine mittlere Effizienz von **12,73 %** (SD = 5,00 %) für ALPL1 und von **15,97 %** (SD = 6,95 %) für ALPL2. Bei der PCR Kontrolle lag die mittlere Effizienz bei 23,31 % (SD = 8,51 %), die Positivkontrolle CDK4 erreichte bei nur einem Durchgang eine Effizienz von 35,88 % (S. Abb. 9).

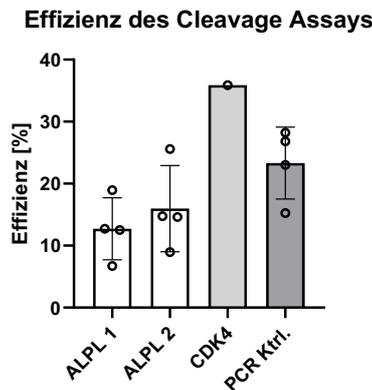


Abb. 9: Effizienz der CRISPR/Cas9 induzierten Mutationen im Cleavage Assay in Prozent. ALPL1, ALPL2 und die PCR Kontrolle wurden vier Mal ausgewertet, die Positivkontrolle CDK 4 einmalig. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung.

3.1.2. Ergebnis der Sequenzierung nach monoklonaler Selektion

Nach der monoklonalen Selektion der beiden Konstrukte ALPL1 und ALPL2 wurden jeweils 22 Einzelzellkolonien erfolgreich angezüchtet und sequenziert. Vor der Sequenzierung wurden die DNA-Proben mit den entsprechenden Primern amplifiziert und auf einem Agarosegel aufgetragen, um über das weitere Protokoll zu entscheiden. In einem exemplarischen Agarosegel mit 13 Proben für ALPL1 und 6 Proben für ALPL2 zeigt sich bei der Probe 1M eine Doppelbande, bei der eine kürzere Bande deutlich abgrenzbar ist (S. Abb. 10). Dies lieferte bereits den Hinweis auf eine mögliche heterozygote, große Deletion in dem betreffenden Klon, weshalb die Banden getrennt voneinander aus dem Agarosegel ausgeschnitten und sequenziert wurden.

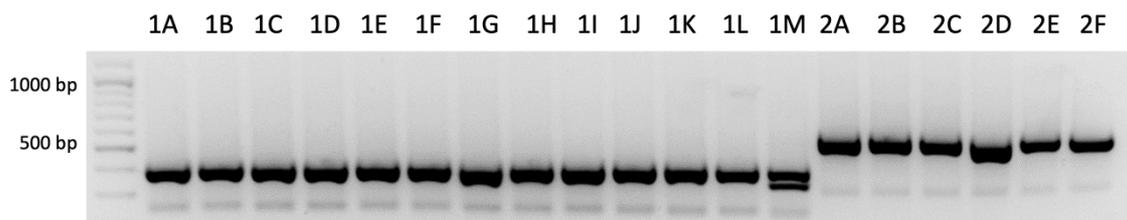


Abb. 10: Agarosegel vor der Sequenzierung. Es sind exemplarisch 13 Proben des ALPL1 Konstrukts (1A – 1M) und sechs Proben des ALPL2 Konstrukts (2A – 2F) dargestellt. ALPL1 = 388 bp; ALPL2 = 541 bp. Auffällig ist die klar trennbare Doppelbande bei Klon 1M mit Verdacht auf eine größere heterozygote Deletion. Bp = Basenpaare.

Von den 22 sequenzierten Klonen des jeweiligen Konstrukts wiesen acht der ALPL1 Klone und vier der ALPL2 Klone eine Mutation auf, was einer Rate von **36,36 %** für ALPL1 und **18,18 %** für ALPL2 entspricht. In beiden Fällen ist die tatsächliche Effizienz also höher als im Cleavage Assay vorhergesagt. Die Sequenzen der mutierten Klone sind in den Abbildungen 11 und 12 dargestellt.

Bei den acht mutierten Sequenzen in der ALPL1 Gruppe wurde deutlich, dass eine bestimmte Position, nämlich ein Cytosin vier Positionen in 3' Richtung der PAM Sequenz, besonders anfällig für Mutationen zu sein scheint: in drei Klonen war diese Base heterozygot deletiert, in einer sogar homozygot. Der homozygot mutierte Klon wurde im Folgenden als Klon 1.1 und einer der Klone mit heterozygoter Deletion als Klon 1.2 weiter charakterisiert. In unmittelbarer Nähe traten zwei weitere heterozygote Deletionen von einzelnen Nukleotiden auf. Dabei war in einem Klon das Thymin fünf und in einem weiteren Klon das Thymin sieben bp in 3' Richtung der PAM Sequenz betroffen (Klon 1.3 und 1.4). Zwei weitere Klone wiesen große heterozygote Deletionen auf, wobei sich der Verdacht der im Agarosegel dargestellten Doppelbanden bestätigte. Bei den getrennt voneinander sequenzierten Doppelbanden zeigte die größere eine Mischsequenz aus dem Wildtyp und einer Sequenz mit Deletion von 48 Nukleotiden, die kürzere Bande zeigte die eindeutige um 48 Nukleotide deletierte Sequenz, wobei die Deletion 26 bp in 3' Richtung der PAM Sequenz beginnt. Dieser Klon wurde im Folgenden als Klon 1.5 kultiviert und untersucht. Eine weitere größere Deletion war bei Klon 1.6 zu finden, hierbei fehlten zehn Basenpaare auf einem Allel ab der vierten Position in 3' Richtung der PAM Sequenz. Bei diesem Klon war im Agarosegel kein Anzeichen für eine Doppelbande zu sehen. Bei Klon 1.5 zeigte sich im Bereich der Schnittstelle eine kurze repetitive Sequenz

mit hohem GC Gehalt. Diese kann als sogenannte Mikrohomologie gedeutet werden, welche nach einem Doppelstrangbruch als Ausgangspunkt einer Reparatur verwendet wird und im Rahmen von CRISPR/Cas9 induzierten Mutationen häufig als Mechanismus für große Deletionen beschrieben sind.

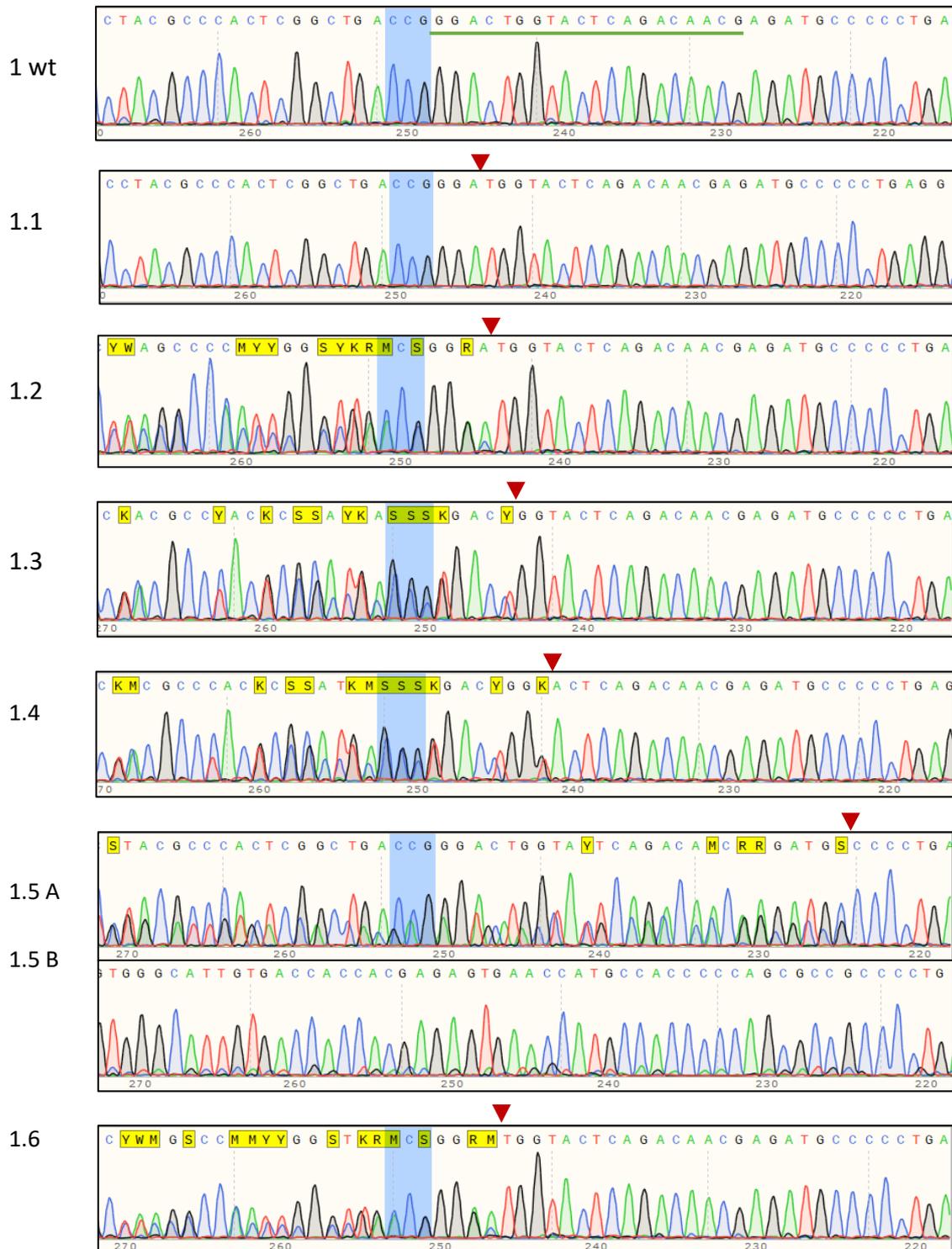


Abb. 11: Ergebnis der Sequenzierung der Klone nach CRISPR/Cas9 mit dem ALPL1 Konstrukt. Dargestellt ist der forward Strang in 5'-3' Richtung mit der blau hinterlegten PAM (CCG). Die roten Pfeile entsprechen dem Ort der Mutation, die grüne Markierung in der WT Sequenz der Zielsequenz. Von 22 sequenzierten Klonen wiesen acht eine Mutation auf, 14 entsprachen der Wildtyp Sequenz (wt). 1.1: homozygote Deletion eines Cytosins vier Nukleotide in 3' Richtung der PAM Sequenz. 1.2: heterozygote Deletion eines Cytosins vier Nukleotide in 3' Richtung der PAM Sequenz. Diese Mutation trat bei drei unterschiedlichen Klonen auf. 1.3: heterozygote Deletion eines Thymins fünf Nukleotide in 3' Richtung der PAM Sequenz. 1.4: heterozygote Deletion eines Thymins sieben Nukleotide in 3' Richtung der PAM Sequenz. 1.5 A, 1.5 B: heterozygote Deletion von 48 Basenpaaren. Die Sequenz 1.5 A entspricht der größeren Bande im Agarosegel und stellt eine Mischsequenz aus dem Wildtyp und der um 48 Basenpaare verkürzten Sequenz dar. Die Sequenz 1.5 B entstammt der kürzeren Bande. Dieser Sequenz fehlen 48 Nukleotide 26 Basenpaare in 3' Richtung der PAM Sequenz. 1.6: heterozygote Deletion von zehn Basenpaaren vier Nukleotide in 3' Richtung der PAM Sequenz.

Bei den Klonen des ALPL2 Konstrukts wurden insgesamt drei verschiedene Mutationen beobachtet. Auch bei ALPL2 trat eine homozygote Deletion auf, dabei war ein Adenin zwei Nukleotide in 3' Richtung der PAM Sequenz betroffen (2.1). Die heterozygote Deletion von sechs Basenpaaren ab der zweiten Position der PAM Sequenz konnte in Klon 2.2 gefunden werden. In zwei Klonen trat die heterozygote Punktmutation eines Thymins fünf Nukleotide in 3' Richtung der PAM Sequenz auf. Dabei konnte in der Sequenzierung nicht eindeutig dargestellt werden, ob stattdessen ein Adenin oder ein Cytosin eingebaut wurde. Einer dieser Klone wurde als Klon 2.3 weiter kultiviert.

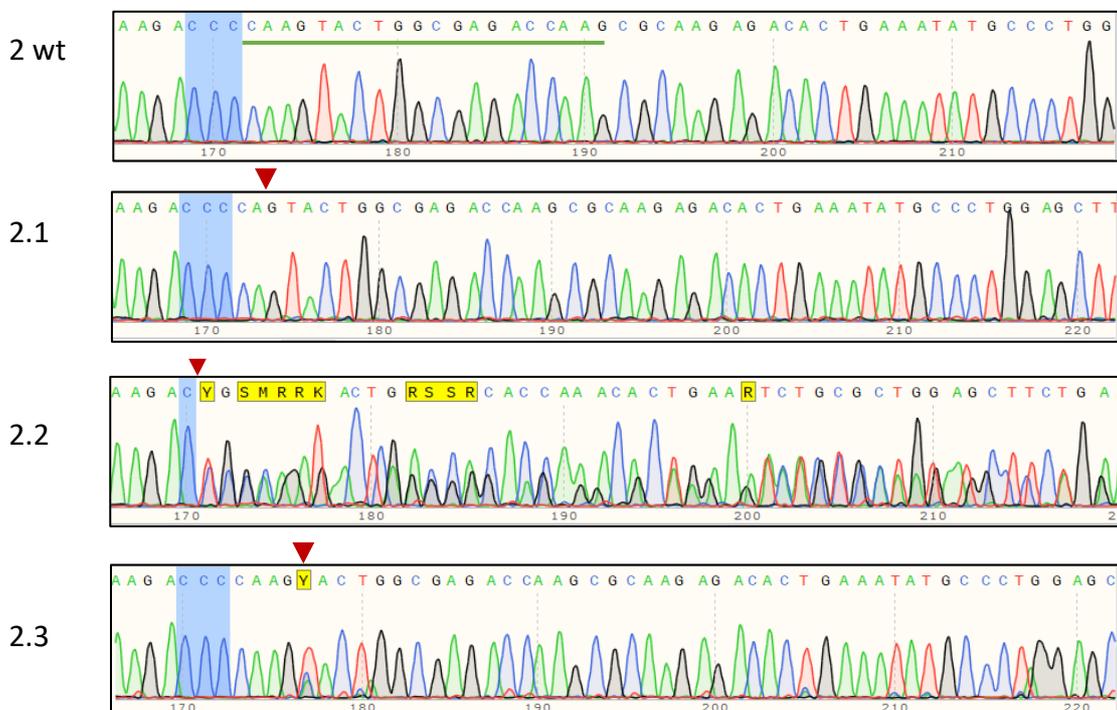


Abb. 12: Ergebnis der Sequenzierung der Klone nach CRISPR/Cas9 mit dem ALPL2 Konstrukt. Dargestellt ist der forward Strang in 5'-3' Richtung mit der blau hinterlegten PAM Sequenz (CCC). Die roten Pfeile entsprechen dem Ort der Mutation. Die Zielsequenz ist in der Wildtyp Sequenz grün hervorgehoben. Von 22 sequenzierten Klonen wiesen vier eine Mutation auf, 18 entsprachen der Wildtyp Sequenz (wt). **2.1:** homozygote Deletion eines Adenins zwei Nukleotide in 3' Richtung der PAM Sequenz. **2.2:** heterozygote Deletion von neun Basenpaaren ab der zweiten Position der PAM Sequenz ohne Verschiebung des Leserasters. **2.3:** heterozygote Punktmutation eines Thymins fünf Nukleotide in 3'-Richtung der PAM Sequenz. Statt Thymin tritt an dieser Position Adenin oder Cytosin auf. Zwei unabhängige Klone wiesen die gleiche Mutation auf.

3.1.3. Auswirkung der Mutationen auf die Aminosäuresequenz

Um die Auswirkungen der einzelnen Mutationen auf das Leseraster und die Aminosäuresequenz beurteilen zu können, wurden die mutationstragenden Sequenzen mit Hilfe des Onlineprogramms Benchling (<https://www.benchling.com>) in die Aminosäuresequenz umgeschrieben. Von besonderem Interesse war hierbei, ob die Deletionen, die zu einer Leserasterverschiebung führen, in einem vorzeitigen Stopcodon resultieren, was einen Abbruch der Translation zufolge hätte. In Abbildung 13 sind die jeweiligen Nukleotidsequenzen des forward Strangs in 5'-3' Richtung und die dazugehörige Aminosäuresequenz für die Klone im Bereich der Mutationen und der PAM Sequenz dargestellt.

Bei allen Einzelbasendeletionen (Klone 1.1 und 1.2, 1.3, 1.4, 2.1) resultiert die Mutation in einem vorzeitigen Stopcodon TGA, welches in der Aminosäuresequenz als Stern gekennzeichnet ist. Auch bei 1.6 ist durch die Mutation ein vorzeitiges Stopcodon entstanden, was neben dem Verlust von drei Aminosäuren einen schwerwiegenderen Proteinfunktionsdefekt zu Folge haben kann. Bei den Klonen 1.5 und 2.2 ist durch die Deletion von 48 bzw. neun Nukleotiden keine Leserasterverschiebung und dementsprechend kein vorzeitiges Stopcodon aufgetreten. Nichtsdestotrotz ist bei der Deletion von 16 Aminosäuren bei Klon 1.5 und drei Aminosäure bei Klon 2.2 dennoch mit einer Auswirkung auf Proteinebene zu rechnen.

Die Punktmutation von Thymin zu Cytosin oder Adenin bei Klon 2.3 führt dazu, dass an dieser Position statt eines Tyrosins (TAC) ein Asparagin (AAC) oder ein Histidin (CAC) eingebaut wird.

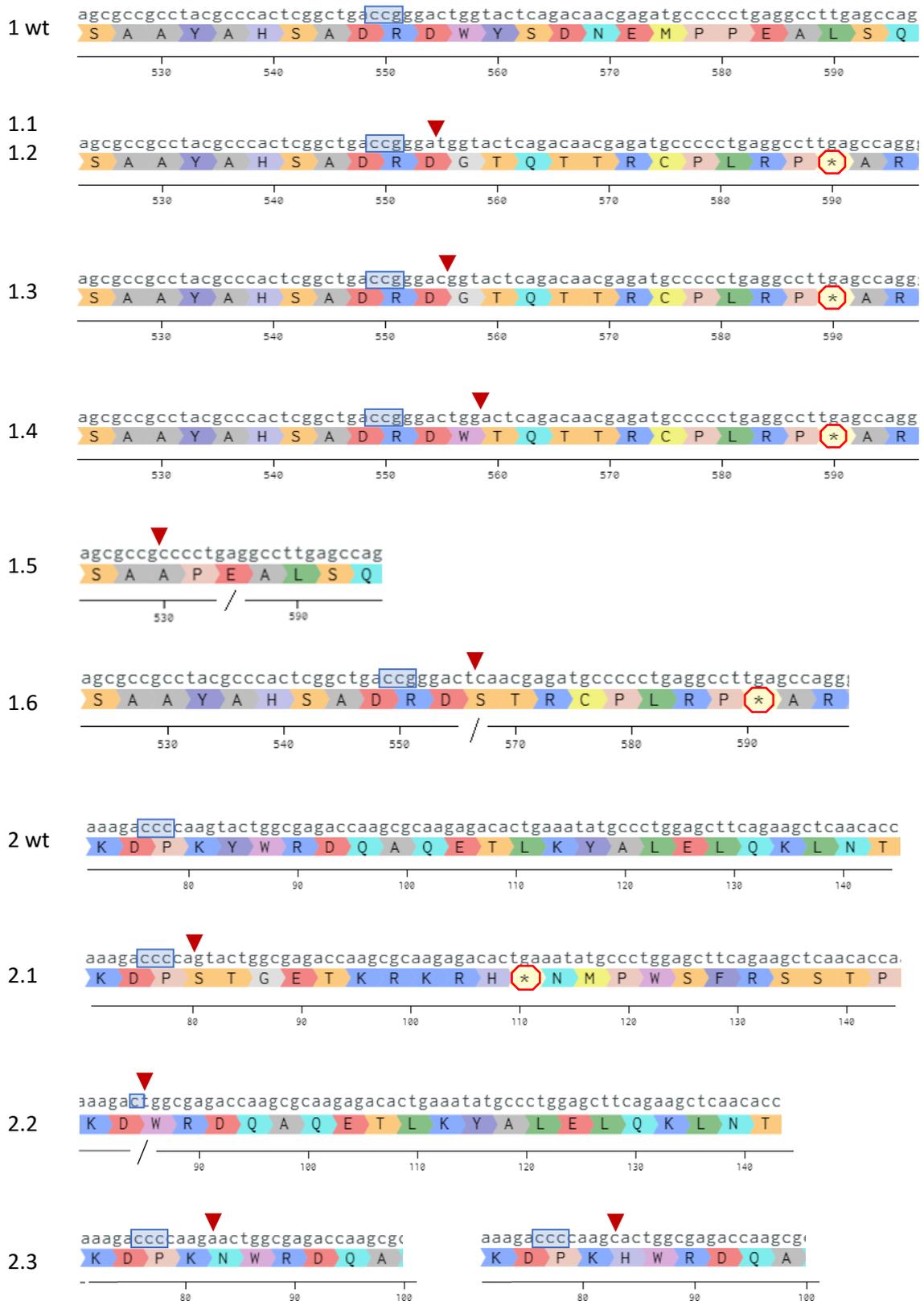


Abb. 13: Auswirkung der Mutationen auf die Aminosäuresequenz. Dargestellt ist der forward Strang des *ALPL* Gens in 5'-3' Richtung mit der dazugehörigen Aminosäuresequenz für die Loci im Bereich der Zielsequenz für ALPL1 und ALPL2. Die PAM Sequenz ist jeweils blau hervorgehoben, rote Pfeilspitzen markieren die von Mutationen betroffenen Stellen. Vorzeitige Stopcodons bei 1.1/1.2, 1.3, 1.4, 1.6 und 2.1 sind in der Sequenz durch Sternchen bzw. rote Acht-ecke hervorgehoben.

3.2. Basale Charakterisierung der mutierten hTERT PDL Klone

Nach der Sequenzierung wurden die Klone mit den verschiedenen Mutationen wieder in Kultur genommen und vergleichend mit den hTERT PDL Zellen, welche nicht gecrispert worden waren, analysiert. Zusätzlich wurden auch zwei Wildtyp Klone, jeweils einer nach Transfektion mit der ALPL1 und ALPL2 crRNA ohne aufgetretene Mutation, untersucht. In Tabelle 7 sind die Klone mit den zugrundeliegenden Mutationen gelistet und vermerkt, mit welchen nach der basalen Charakterisierung weitergearbeitet wurde.

Tab. 7: Überblick über die analysierten Klone. Wt = Wildtyp, A = Adenin, C = Cytosin, T = Thymin, bp = Basenpaare.

Klone	Mutation	In weiterführenden Experimenten analysiert
PDL	Keine, nicht gecrispert	Ja
1 wt	Keine, Transfektion mit ALPL1	Nein
2 wt	Keine, Transfektion mit ALPL2	Ja
1.1	Homozygote Deletion C	Ja
1.2	Heterozygote Deletion C (wie 1.1)	Ja
1.3	Heterozygote Deletion T	Ja
1.4	Heterozygote Deletion T	Nein
1.5	Heterozygote Deletion von 48 bp	Ja
1.6	Heterozygote Deletion von zehn bp	Nein
2.1	Homozygote Deletion A	Nein
2.2	Heterozygote Deletion von neun bp	Nein
2.3	Heterozygote Punktmutation	ja

3.2.1. Wachstumsverhalten und Morphologie

Einen Tag nach dem Aussäen wurden die Zellen mikroskopisch inspiziert und untersucht, ob sie sich bezüglich ihrer Zellmorphologie unterscheiden (S. Abb. 14). Alle Klone zeigen eine fibroblastenartige, spindelförmige bis sternartige Morphologie sowie Plastikadhärenz und kolonieartiges Wachstum, welche charakteristisch für mesenchymale Stammzellen und parodontale Ligamentzellen sind.

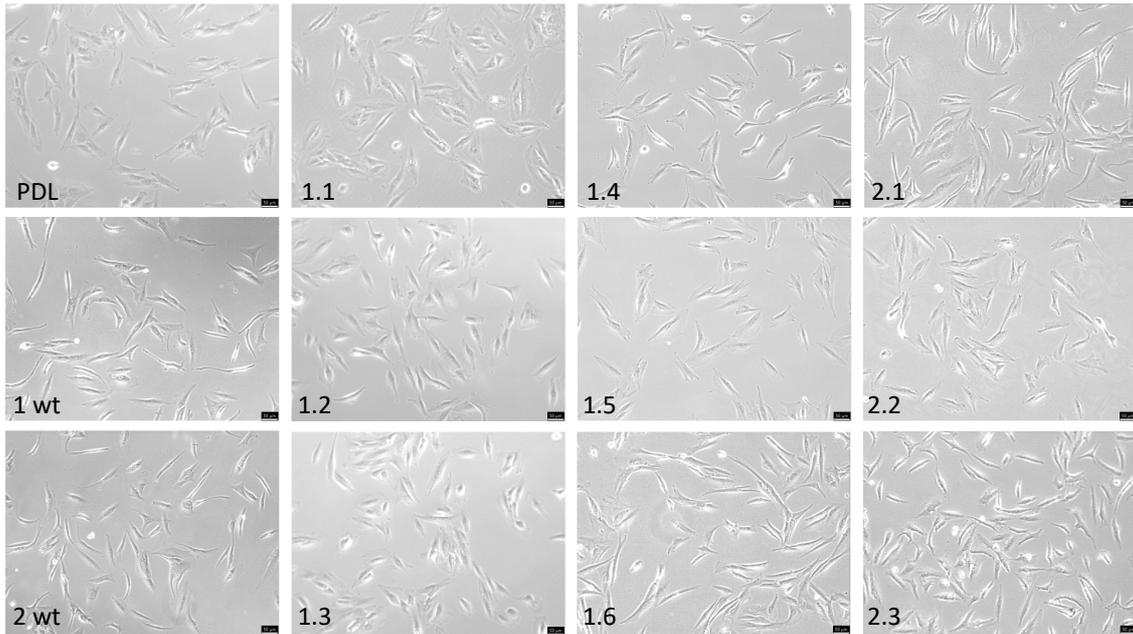


Abb. 14: Repräsentative Mikroskop-Aufnahmen der Klone. Alle Proben zeigen eine fibroblastenartige Morphologie. Der Maßstab beträgt 50 nm.

Insgesamt zeigten sich sehr konstante Populationsverdopplungszeiten / Tag ohne erkennbare Unterschiede zwischen den Klonen (S. Abb. 15). Nach dem erneuten Aussäen scheinen also weder das Wachstumsverhalten noch die Morphologie der Zellen durch die Mutationen beeinträchtigt zu sein.

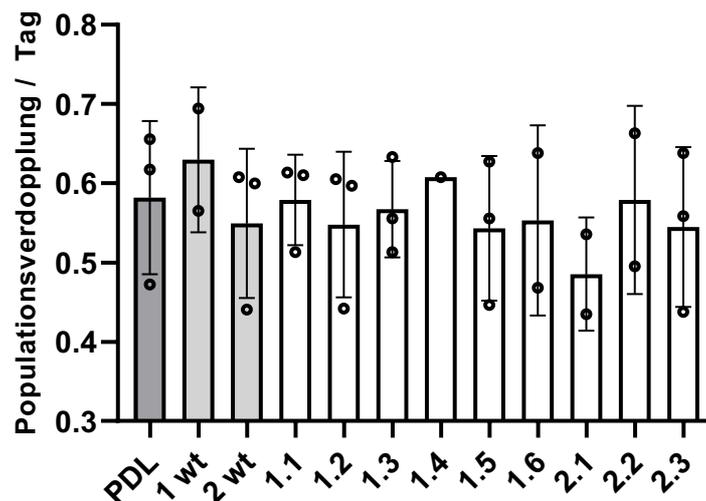


Abb. 15: Populationsverdopplung / Tag der Klone. Das Wachstumsverhalten wird durch die Mutationen nicht beeinflusst. n = 3 für PDL, 2 wt, 1.1, 1.2, 1.3, 1.5, 2.3. n = 2 für 1 wt, 1.6, 2.1, 2.2. n = 1 für 1.4. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung.

3.2.2. Basale *ALPL*- Genexpressionsanalyse

Um einzuschätzen, ob und in welchem Ausmaß die Mutationen Einfluss auf die Expression des *ALPL* Gens nehmen, wurde mittels qPCR die relative Genexpression bestimmt und über die $2^{-\Delta\Delta ct}$ -Methode der Vergleich zur Expression in den nicht gecrisperten hTERT PDL Proben gezogen (S. Abb. 16). Im Rahmen der basalen Charakterisierung mit allen Klonen wurde die qPCR lediglich einmal wiederholt, ausführlichere Genexpressionsanalysen fanden anschließend im Rahmen der osteogenen Differenzierung ausgewählter Klone statt.

Interessanterweise konnte in beiden Wildtypen 1 und 2 eine verringerte Expression des *ALPL* Gens festgestellt werden, bei Wildtyp 1 war diese noch ausgeprägter. Die beiden homozygoten Mutationen 1.1 und 2.1, die heterozygoten Einzelbasendeletionen 1.2, 1.3 und 1.4 und auch die großen Mutationen 1.5 und 1.6 wiesen ebenfalls eine Herabregulation der *ALPL* Expression auf. Dabei waren 1.1, 1.3 und 1.4 am stärksten betroffen. Im direkten Vergleich hatte die homozygote Deletion bei 1.1 eine stärkere Auswirkung als die heterozygote Deletion 1.2. Aus dem Raster fallen die Deletion von neun Basenpaaren bei Klon 2.2 und die Punktmutation 2.3, in beiden konnte eine Überexpression von *ALPL* auf das 3,1 und 2,5-fache festgestellt werden. Die Analyse fand in einer sehr frühen Passage nach dem Aussäen der Proben statt. Zusammen mit der geringen Stichprobenzahl von $n = 1$ kann dieses Experiment lediglich als grobe Einschätzung gewertet werden.

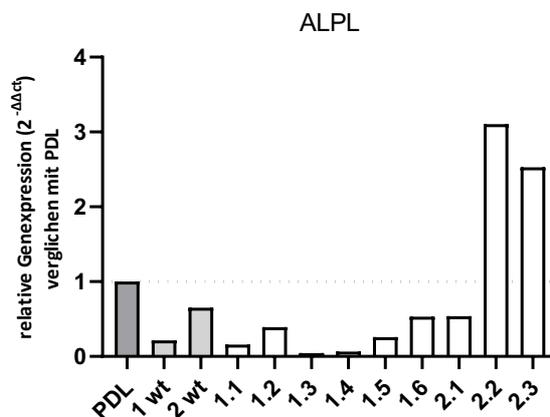


Abb. 16: Relative basale Genexpression des *ALPL* Gens. Als Referenz für die Klone gilt die Genexpression in den nicht gecrisperten hTERT PDL Zellen. $n = 1$.

3.2.3. Bestimmung der basalen TNAP Aktivität durch den CSPD Assay

Parallel zur Ermittlung der relativen *ALPL* Expression der Klone wurde basal auch die TNAP Aktivität auf Proteinebene durch den CSPD Assay ermittelt. Dabei wurden die Proteinproben zu zwei Zeitpunkten jeweils ohne und mit dem TNAP spezifischen Inhibitor Levamisol behandelt, bei Klon 1.4 fand die Messung nur zu einem Zeitpunkt statt. In Abbildung 17 ist das Ergebnis der TNAP Aktivitätsmessung dargestellt. Dabei wird ersichtlich, dass die Zugabe des TNAP Inhibitors Levamisol in allen Proben deutlich reduzierte Lumineszenzsignale hervorruft. Im Umkehrschluss ermöglicht dies, aus der Differenz der Lumineszenzwerte ohne und mit Levamisol die TNAP Aktivität zu bestimmen. Insgesamt liefert die basale TNAP Aktivitätsmessung ein sehr ähnliches Bild wie die Genexpressionsanalyse: Während die Klone 1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5, 1.6 und 2.1 eine deutlich verringerte TNAP Aktivität aufwiesen, war die Aktivität in den Klonen 2.2 und 2.3 im Vergleich zu den nicht gecrisperten hTERT PDL Proben stark erhöht. Dabei ist anzumerken, dass die höchsten Werte der TNAP Aktivität bei 2.2 und 2.3 zum selben Zeitpunkt gemessen wurden, zu dem auch die Genexpressionsanalyse stattgefunden hat. Bei der Messung eine Passage später war die Aktivität, gemessen am Lumineszenzsignal, bereits ansatzweise halbiert (von 2181,5 auf 1265,5 und von 3792,5 auf 1754,5).

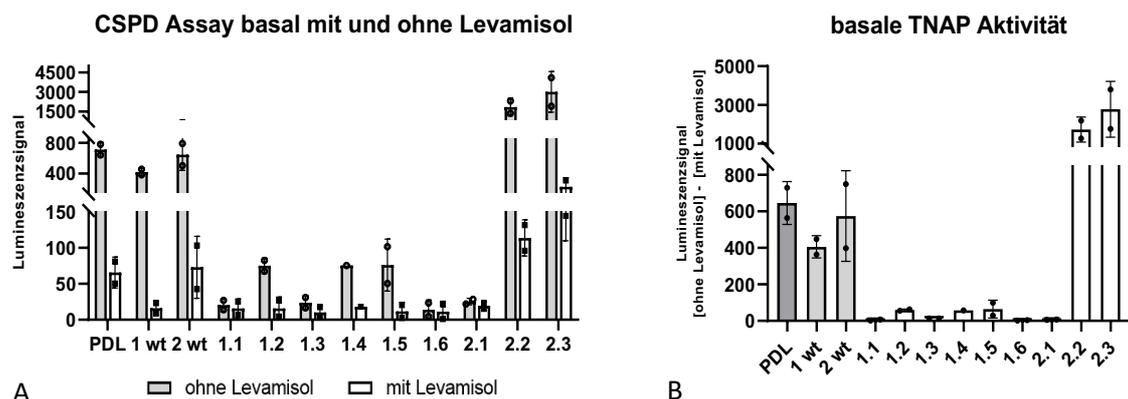


Abb. 17: Basale TNAP Aktivitätsmessung im CSPD Assay aller Klone. (A): Dargestellt ist der Vergleich der Proben mit und ohne Levamisol, wobei das Lumineszenzsignal erwartungsgemäß in allen Proben durch die Levamisolzugabe verringert wird. (B) Gezeigt ist die TNAP Aktivität als Differenz der Signale ohne und mit Levamisol. Das Ergebnis geht mit dem der Genexpressionsanalyse einher. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung. n = 2 mit Ausnahme von 1.4 (n = 1). Auf eine statistische Auswertung wurde aufgrund der geringen Stichprobenzahl verzichtet.

Auch in dieser Auswertung ist der limitierende Faktor der Analyse die geringe Stichprobenmenge von $n = 2$ bzw. $n = 1$ bei Klon 1.4. Im Rahmen der osteogenen Differenzierung wurde die basale TNAP Aktivität ausgewählter Klone zu vier weiteren Zeitpunkten bestimmt und analysiert, was eine statistische Berechnung zulässt (S. 3.4.1.)

Ausgehend von den Ergebnissen der basalen *ALPL* Expression und der TNAP Aktivität wurde der Entschluss gefasst, die Anzahl der Klone für die weiterführenden Experimente auf die folgenden Proben zu beschränken: die nicht gecrisperten hTERT PDL Zellen, die Wildtyp Zelllinie, welche mit dem *ALPL2* Konstrukt transfiziert worden war (2 wt, im Folgenden als wt bezeichnet) und die mutierten Zelllinien 1.1, 1.2, 1.3, 1.5 und 2.3.

3.2.4. Nachweis der TNAP auf Proteinebene durch Western Blot

Ein weiteres Bestreben war es, die TNAP durch einen Western Blot auf Proteinebene darzustellen und zu quantifizieren. Um initial zu testen, ob die TNAP in den Zelllysaten der hTERT PDL Zellen überhaupt nachweisbar ist, wurden folgende Proben verwendet: PDL Zelllysate basal, PDL Zelllysate nach drei Tagen der osteogenen Differenzierung, Zelllysate des Klons 2.3 zum Zeitpunkt der höchsten gemessenen TNAP Aktivität im CSPD Assay und als Positivkontrolle Zelllysate der Neuroblastom Zelllinie SH-SY5Y, welche die TNAP stabil überexprimieren (Graser et al., 2015). Bei allen Proben wurde die maximale Proteinmenge von 15 oder 20 μg gemessen am Taschenvolumen des zur Proteinauftrennung verwendeten SDS-Gels aufgetragen. Mit einer Ponceau S Färbung konnte zunächst der erfolgreiche Transfer der Proteinproben auf die Nitrocellulosemembran festgestellt werden (S. Abb. 18 A). Die Membran wurde daraufhin zerschnitten und separat mit dem Antikörper für die TNAP und dem Haushaltsprotein GAPDH inkubiert. Während GAPDH in allen Proben gleichmäßig nachgewiesen werden konnte, war die TNAP nur in der Positivkontrolle detektierbar (S. Abb. 18 B). Gemessen an den Werten des CSPD Assays wurden die PDL Proben mit der höchsten TNAP Aktivität verwendet. Insgesamt scheint in den hTERT PDL Zellen nicht ausreichend TNAP vorhanden zu sein, um im Western Blot nachgewiesen zu werden. Aus diesem Grund wurde diese Nachweismethode nicht weiterverfolgt.

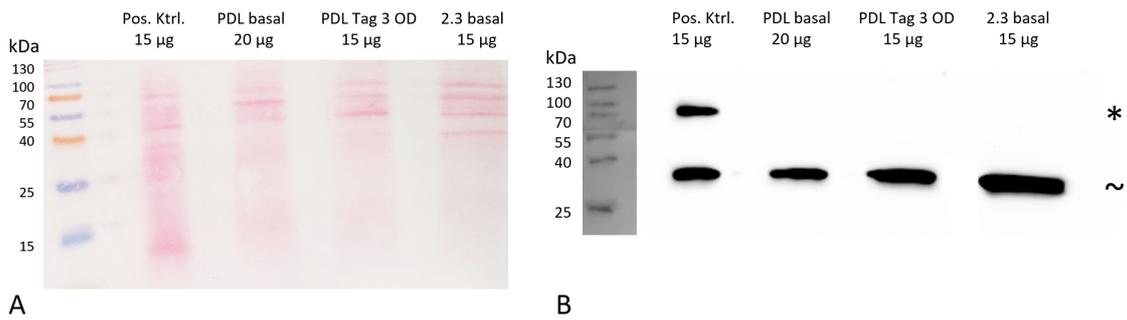


Abb. 18: Nachweis der TNAP auf Proteinebene im Western Blot. Es wurde jeweils die maximale Proteinmenge (15 oder 20 µg) aufgetragen. A: Die Ponceau S Färbung bestätigt den erfolgreichen Proteintransfer. B: GAPDH (37 kDa, ~) war in allen Proben nachweisbar, TNAP (80 kDa, *) ausschließlich in der Positivkontrolle. Pos.Ktrl (Positivkontrolle) = Lysat TNAP überexprimierender SH-SY5Y Zellen. OD = Osteogene Differenzierung. kDa = Kilodalton

3.2.5. Messung der basalen ENPP1 Aktivität

Neben der basalen TNAP Aktivität war auch von Interesse, wie sich die Mutationen auf die Aktivität des TNAP Antagonisten ENPP1 auswirken (S. Abb. 19). In diesem Nachweis wurden lediglich die ausgewählten Klone untersucht und jede Probe mit und ohne Substrat pnpTMP und mit und ohne Inhibitor β me ATP gemessen. Die Zugabe des Inhibitors führte dabei zu einer signifikanten Reduktion des gemessenen Absorptionswerts. Zwischen den einzelnen Proben war jedoch kein Unterschied bezüglich der ENPP1 Aktivität nachweisbar.

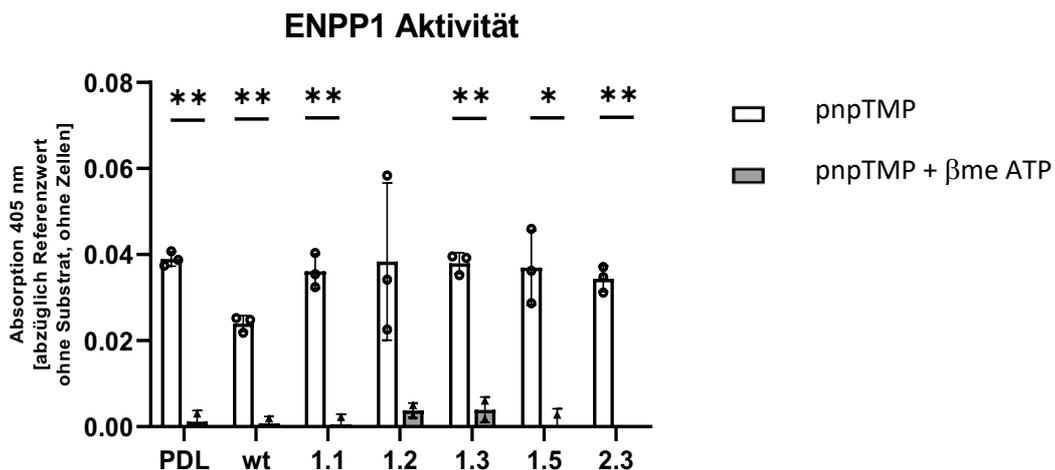


Abb. 19: Basale ENPP1 Aktivität. Die Zugabe des Inhibitors β me ATP reduzierte die Aktivität in allen Proben außer 1.2 signifikant. Innerhalb der Gruppen war bezüglich der ENPP1 Aktivität nach Substratzugabe kein Unterschied feststellbar. Die Statistik wurde für jede Gruppe einzeln mit ungepaarten *t*-Tests errechnet und mit der Holm-Sidak Methode korrigiert. (*) $p < 0,05$, (**) $p < 0,01$. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung. $n = 3$ für pnpTMP, $n = 2$ für pnpTMP + β me ATP.

3.3. Vorversuche zur osteogenen Differenzierung der hTERT PDL Zellen

Dass Zellen aus dem parodontalen Ligament Stammzelleigenschaften besitzen und osteogen differenziert werden können, ist in der Literatur ausreichend beschrieben (Docheva et al., 2010, Seo et al., 2004). Die Arbeitsgruppe um Docheva et al., welche die hTERT PDL Zelllinie etabliert hat, konnte ebenfalls zeigen, dass die Zelllinie nach osteogener Differenzierung Calciumphosphatkristalle ausbilden kann, welche durch eine Alizarinfärbung sichtbar gemacht wurden. Vor der osteogenen Differenzierung der mutierten Zelllinien wurde im Rahmen von Vorversuchen die Differenzierungskapazität der hTERT PDL Zelllinie untersucht. Dafür wurden Genexpressionsanalysen, Messungen der TNAP Aktivität und spezifische Färbungen zum Nachweis der Differenzierung eingesetzt und jeweils Differenzierungs- und Kontrollproben miteinander verglichen.

3.3.1. Genexpressionsanalysen

Für die Genexpressionsanalysen wurden die qPCR Ergebnisse für *ALPL*, *C5AR1*, *B3Galt2*, *Runx2*, *Sox9* und *Col1A1* mit der $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Methode im Vergleich zu Tag 0 analysiert. Dabei wurde der erste Durchgang als Referenz verwendet und alle Daten auf Tag 0 dieses Replikats normiert, wodurch die Schwankung innerhalb der Tag 0-Werte zu erklären ist. Abbildung 20 fasst die Ergebnisse der qPCR zusammen.

Die *ALPL* Genexpression wird durch die osteogene Differenzierung signifikant erhöht

Die osteogene Differenzierung bewirkt in den hTERT PDL Zellen eine signifikante Hochregulation der *ALPL* Expression innerhalb der ersten drei Tage der Differenzierung. Zu Tag 7 und Tag 14 nimmt die *ALPL* Expression wieder ab und nähert sich dem Ausgangs- und Kontrollwert. In den Kontrollproben ohne Differenzierungsmedium ist keine Änderung des Expressionslevels erkennbar.

Die frühen osteogenen Markergene *C5AR1* und *B3Galt2* werden in den Differenzierungsproben verstärkt exprimiert

C5AR1 und *B3Galt2* gelten als Marker der frühen osteogenen Differenzierung (van de Peppel et al., 2017). Dabei kodiert *C5AR1* (C5a Anaphylatoxin Chemotaktischer Rezeptor 1) für einen G-Protein gekoppelten Rezeptor für C5a, welches als Bestandteil des Komplementsystems eine entscheidende Rolle im angeborenen Immunsystem spielt.

B2Galt3 (Beta-1,3-Galactosyltransferase 2) kodiert für ein membrangebundenes Glykoprotein, welches den Galactosetransfer von UDP-Galaktose in der Di- und Polysaccharidsynthese katalysiert. In den Differenzierungsproben wurde verglichen mit den Kontrollgruppen signifikant mehr *C5AR1* an Tag 7 und *B3Galt2* an Tag 1, 3 und 7 exprimiert. Zudem schienen beide Gene im zeitlichen Verlauf verglichen mit Tag 0 verstärkt exprimiert zu werden, wobei aufgrund der geringen Stichprobenzahl und der erheblichen Varianz der Ergebnisse keine statistische Signifikanz erreicht wird. Die Kontrollgruppen blieben unverändert.

Der *Runx2/Sox9* Quotient steigt tendenziell durch die osteogene Differenzierung

Während sich die Expression von *Runx2* und *Sox9* während der Differenzierung nicht merklich veränderte und auch kaum ein Unterschied zwischen der Differenzierung und der Kontrolle ersichtlich war, gibt es einen ansteigenden, jedoch nicht statistisch signifikanten Trend im *Runx2/Sox9* Quotienten. Dieser ist ebenfalls als Marker der frühen Differenzierung in MSC in der Literatur beschrieben (Loebel et al., 2015).

Die Expression von *Col1A1* wird in den hTERT PDL Zellen nicht gesteigert

Die Expression von Kollagen, die zu späten Zeitpunkten der osteogenen Differenzierung erhöht sein sollte, wurde in den hTERT PDL Zellen nicht gesteigert. Nichtsdestotrotz war *Col1A1* an Tag 3 in den Differenzierungsproben verglichen mit der Kontrolle signifikant erhöht.

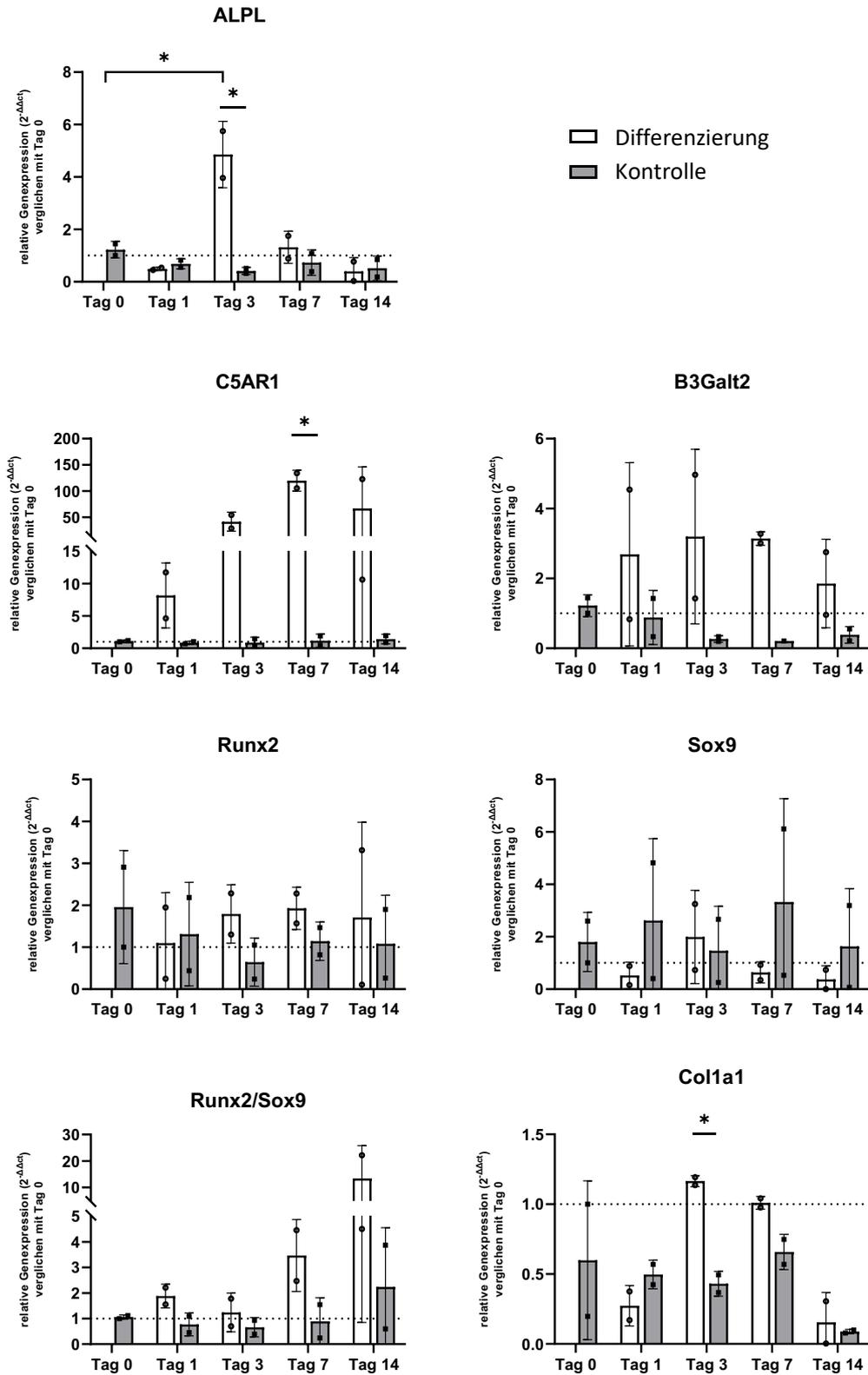


Abb. 20: relative Genexpression im Verlauf der osteogenen Differenzierung der hTERT PDL Zellen. Die Proben wurden zu Tag 0 normiert. Die Statistik wurde mit ungepaarten *t*-Tests mit Holm-Sidak Korrektur errechnet (Vergleich zwischen Differenzierungs- und Kontrollproben) und mit einem ANOVA Test mit Dunnett Korrektur (Vergleich Tag 0 mit Differenzierungsproben) berechnet. (*) $p < 0,05$. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung. $n = 2$.

3.3.2. Messung der TNAP Aktivität im CSPD Assay

Durch die osteogene Differenzierung wurde die TNAP Aktivität in den hTERT PDL Zellen an Tag 3 und 7 signifikant gesteigert. An Tag 3 war zudem ein signifikanter Unterschied zwischen der Differenzierungs- und Kontrollprobe festzustellen, wobei die Kontrollproben insgesamt unverändert blieben (S. Abb. 21). Dieses Ergebnis deckt sich mit dem Ergebnis der qPCR für *ALPL*, dessen Hochregulation zu Tag 3 in einer über einen längeren Zeitpunkt anhaltenden Aktivitätssteigerung zu resultieren scheint.

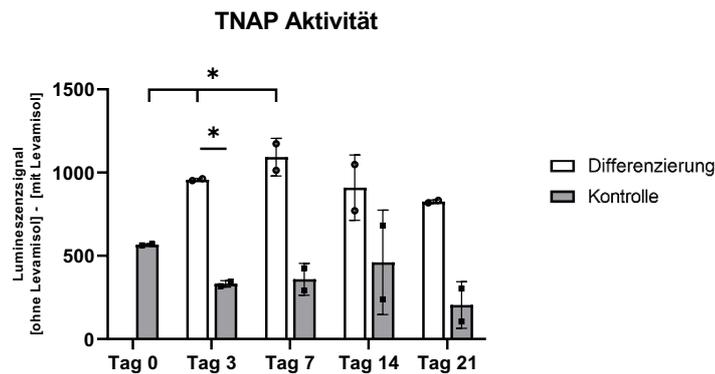


Abb. 21: TNAP Aktivität der hTERT PDL Zellen im Verlauf der osteogenen Differenzierung. Die TNAP Aktivität wurde durch die osteogene Differenzierung bezogen auf Tag 0 an Tag 3 und 7 signifikant gesteigert. Die Statistik wurde mit ungepaarten *t*-Tests mit Holm-Sidak Korrektur (Vergleich zwischen Differenzierungs- und Kontrollproben) und mit einem ANOVA Test mit Dunnett Korrektur (Vergleich Tag 0 mit Differenzierungsproben) berechnet. (*) $p < 0,05$. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung. $n = 2$.

3.3.3. TNAP Färbung

Zum visuellen Nachweis der TNAP Aktivität wurde nach 7 und 14 Tagen eine TNAP Färbung angefertigt. In Abbildung 22 sind exemplarische Mikroskop-Bilder dargestellt. Dabei stellen sich Zellen, in denen die TNAP aktiv ist, blau dar. Je intensiver die Blaufärbung, desto aktiver ist die TNAP in den Zellen. Es ist ein deutlicher Unterschied der TNAP Aktivität zwischen den Kontroll- und Differenzierungsproben festzustellen, wobei zwischen Tag 7 und Tag 14 keine weitere Zunahme zu erkennen ist. Diese Ergebnisse decken sich dementsprechend mit denen der qPCR und des CSPD Assays.

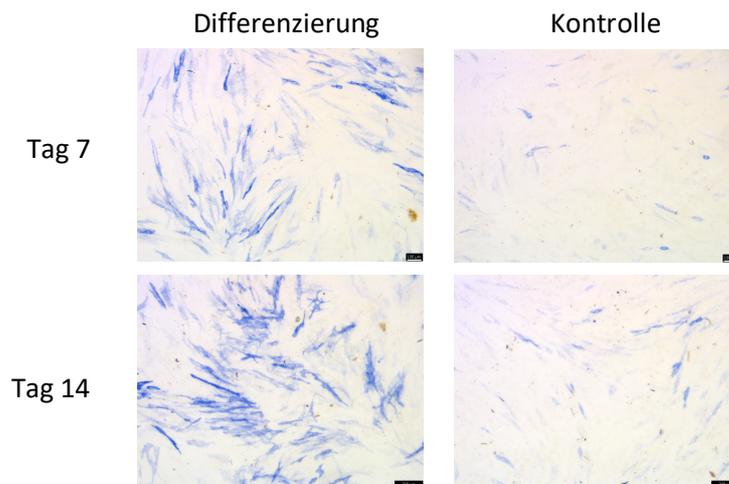


Abb. 22: TNAP Färbung der hTERT PDL Zellen nach 7 und 14 Tagen der osteogenen Differenzierung. Die Differenzierungsproben wiesen mehr TNAP positive Zellen auf als die Kontrollproben, wobei kein Unterschied zwischen den Tag 7 und Tag 14 Färbungen festgestellt werden konnte. Der Maßstababalken entspricht 100 µm an Tag 7 und 200 µm an Tag 14.

3.3.4. Alizarinfärbung

Mit der Alizarinfärbung können Calciumphosphate, die zu späteren Zeitpunkten der osteogenen Differenzierung in die Matrix abgelagert werden und Maßstab der Differenzierung sind, nachgewiesen werden. Dafür wurden die hTERT PDL Zellen 28 Tage osteogen differenziert und anschließend gefärbt. Es konnten keine Calciumphosphatablagerungen in den differenzierten Zellen festgestellt werden. Im Unterschied zu den Kontrollzellen zeigten diese jedoch eine deutlich stärkere Ablösung, was trotz der Beschichtung mit Fibronectin und vorsichtigen Mediumwechsels nicht zu verhindern war und auch als Zeichen der Differenzierung gedeutet werden kann (S. Abb. 23 A, B). Das Phänomen des Ablösens stellt sich auch in der Quantifizierung dar, da das Alizarin durch die umgeschlagenen Zellschichten trotz mehrfachen Waschens nicht komplett ausgewaschen werden konnte. Die erhöhten Werte der Quantifizierung in den Differenzierungsproben lassen sich also vermutlich nicht auf Calciumphosphatablagerungen, sondern gegebenenfalls auf in den Umschlagfalten zurückgehaltenen Farbstoff zurückführen (S. Abb. 23 C). Die Stichprobenzahl $n = 2$ ist dabei zu gering für eine statistische Auswertung.

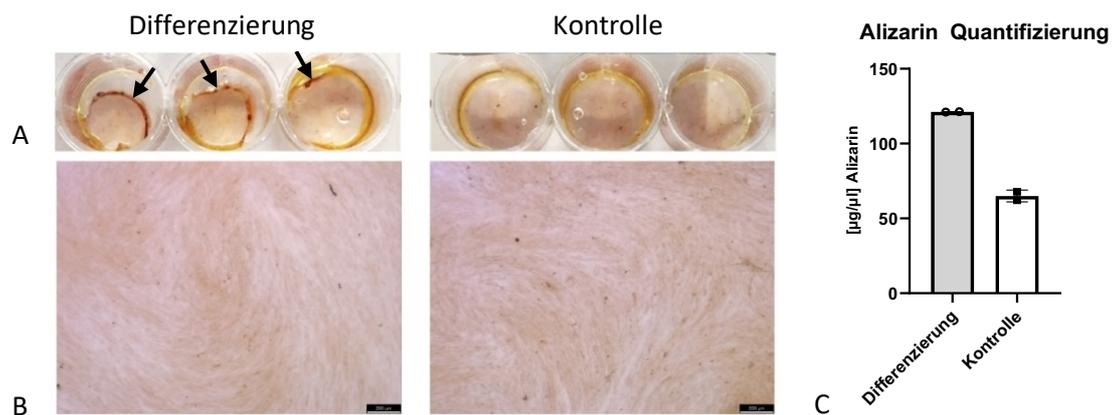


Abb. 23: Alizarinfärbung der hTERT PDL Zellen nach 28 Tagen der osteogenen Differenzierung. A: Die makroskopischen Bilder zeigen das fortgeschrittene Ablösen der Differenzierungsproben (Pfeile). B: Mikroskopisch sind keine Calciumphosphatablagerungen feststellbar. Der Maßstabalken entspricht 200 µm. C: Die Quantifizierung ergibt höhere Werte für die differenzierten Proben, die gegebenenfalls auf den in den Umschlagfalten zurückgehaltenen Farbstoff zurückzuführen sind. n = 2.

3.4. Osteogene Differenzierung ausgewählter Klone mit *ALPL* Mutationen

Als zentrale Fragestellung der Arbeit wurde untersucht, inwiefern sich *ALPL* Mutationen auf die osteogene Differenzierung der hTERT PDL Zellen auswirken. Dafür wurden die ausgewählten Klone 1.1, 1.2, 1.3, 1.5, 2.3 mit einem nicht mutierten Wildtyp (wt) und den nicht gecrispten hTERT PDL in drei biologischen Replikaten bezüglich ihre Genexpression und TNAP Aktivität untersucht sowie TNAP- und Alizarinfärbungen zum Nachweis der Differenzierung durchgeführt.

3.4.1. Genexpressionsanalysen

Die Daten der Genexpressionsanalyse wurden auf zwei verschiedene Arten ausgewertet: Zum einen wurde der zeitliche Verlauf von Tag 0 bis Tag 14 für jede Zelllinie dargestellt, zum anderen wurden die Klone an den einzelnen Tagen miteinander verglichen. Je nach untersuchtem Gen war die eine oder andere Auswertungsmethode aussagekräftiger. Aus Gründen der Vollständigkeit werden im Folgenden beide Darstellungen für die jeweiligen Gene gegenübergestellt. Da für die Auswertung ein Replikat als Referenz verwendet wurde und die Werte aller Durchgänge zu diesem Ausgangswert normiert wurden, liegen auch Schwankungen in den Bezugsproben von Tag 0 bzw. den PDL vor.

Die *ALPL* Expression ist in den mutierten Zelllinien und dem Wildtyp signifikant reduziert

Im Verlauf der Differenzierung ist weder bei den nicht gecrisperten hTERT PDL noch bei den Klonen eine Steigerung der *ALPL* Expression erkennbar. 1.2 und 1.5 wiesen sogar eine signifikant geringere *ALPL* Expression im Verlauf auf (S. Abb. 24). Bei den PDL zeigt sich ein leichter Trend zu Tag 3, wie er auch in den Vorversuchen beobachtet wurde. Diese Zunahme ist hier allerdings nicht statistisch signifikant.

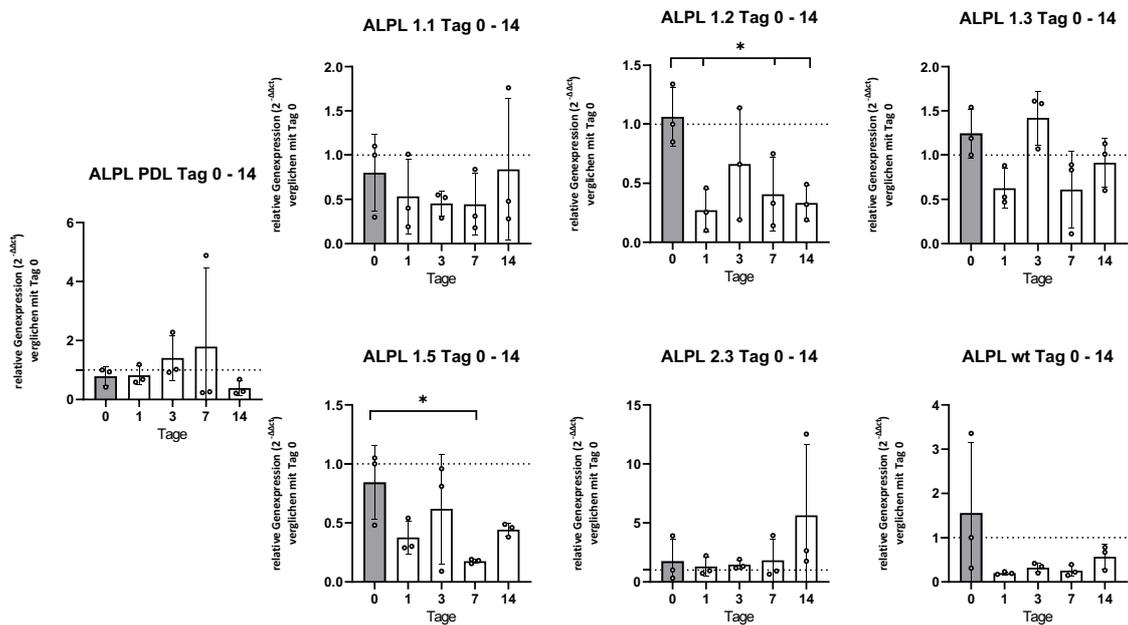


Abb. 24: *ALPL* Genexpression der einzelnen Klone im zeitlichen Verlauf der osteogenen Differenzierung. In keiner der Proben wird eine gesteigerte *ALPL* Expression durch die Differenzierung beobachtet, bei Klon 1.2 und 1.5 ist sie sogar verringert. Die Statistik wurde bei Normalverteilung mit dem ANOVA Test mit Dunnett Korrektur (1.1, 1.2, 1.3, 1.5, 2.3, wt) und bei nicht normalverteilten Proben mit dem Kruskal-Wallis mit dem Dunn's Posthoc-Test berechnet (PDL): (*) $p < 0,05$. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung. $n = 3$.

Abbildung 25 zeigt die Gegenüberstellung der *ALPL* Expression zwischen den Proben an den einzelnen Tagen. Es wurde basal und während der Differenzierung signifikant weniger *ALPL* in den mutierten Klonen exprimiert, ab Tag 1 war allerdings auch eine signifikant geringere Expression in den nicht mutierten Wildtyp Zellen verglichen mit PDL zu erkennen. Eine statistische Signifikanz liegt an allen Zeitpunkten außer an Tag 14 vor, was durch die geringere Expression in den PDL an Tag 14 (S. Abb. 24) erklärt werden kann.

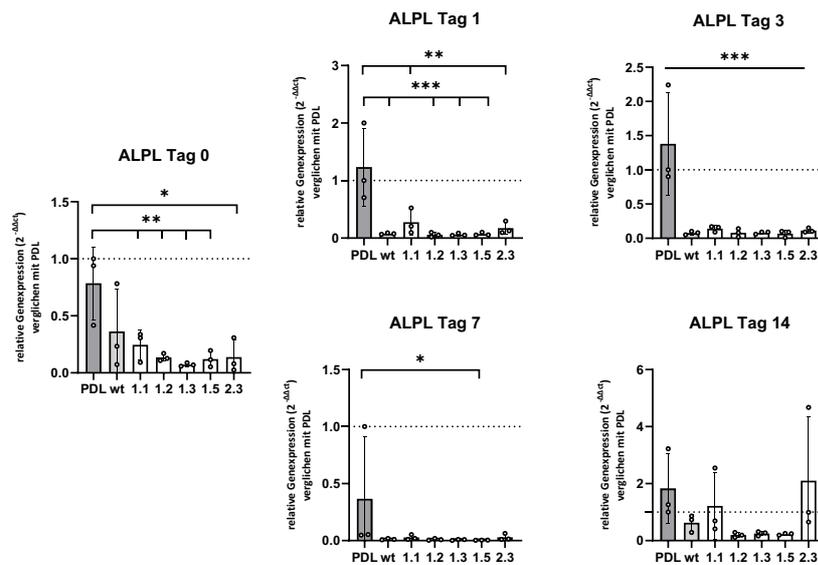


Abb. 25: ALPL Genexpression an den Tagen 0 - 14 der osteogenen Differenzierung im Vergleich zwischen den Klonen. Basal wird signifikant weniger ALPL in den mutierten Zelllinien exprimiert, ab Tag 1 auch im Wildtyp. Die Statistik wurde bei Normalverteilung mit dem ANOVA Test mit Dunnett Korrektur (Tag 0, 1, 3, 7) und bei nicht normalverteilten Proben mit dem Kruskal-Wallis mit dem Dunn's Posthoc-Test berechnet (Tag 14). (*) $p < 0,05$; (**) $p < 0,01$; (***) $p < 0,001$. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung. $n = 3$.

Bei allen Genexpressionsanalysen wurde grundsätzlich die Schmelzkurve überprüft, um die Spezifität der amplifizierten Produkte zu überprüfen. Bei den qPCR zur Analyse der ALPL Expression fiel auf, dass Klon 1.5 durchgängig eine deutlich abweichende Schmelzkurve zeigte, welche ihren Höhepunkt bei heterogenen niedrigeren Temperaturen hatte als alle andere Proben und die Wasserkontrolle (S. Abb. 26).

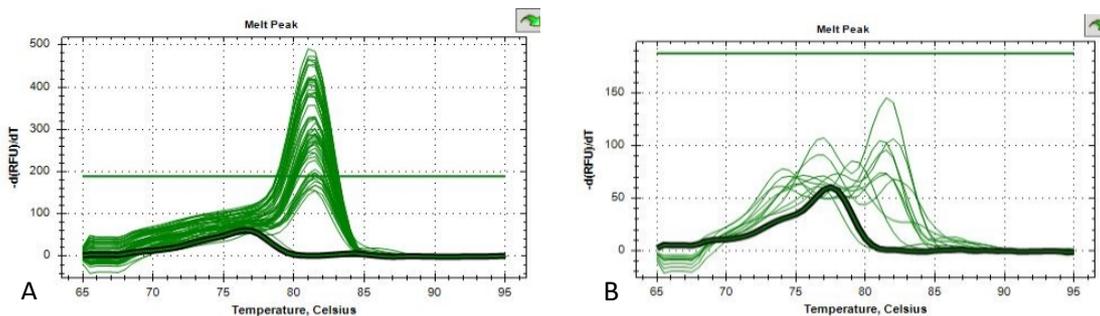


Abb. 26: Schmelzkurvenanalyse ALPL. (A): Schmelzkurve aller Proben außer 1.5. Die Schmelzkurve der Wasserkontrolle ist dick markiert. Die Schmelztemperatur der Proben liegt bei 81,5 °C. (B): Schmelzkurve der Proben 1.5 Tag 0-Tag 14. Die Wasserkontrolle ist dick dargestellt. Bei keiner der Proben zeigt sich eine eindeutige Schmelztemperatur.

Die Deletion von Klon 1.5 liegt auf Exon 6; die verwendeten *ALPL* Primer amplifizieren eine 76 bp lange Sequenz beginnend in Exon 9. Letztendlich ist es bei einer heterozygoten Deletion von 48 bp vor der amplifizierten Sequenz nicht weiter verwunderlich, dass keine eindeutige Schmelzkurve erzielt werden kann, weshalb die Daten für Klon 1.5 ungeachtet dessen dennoch berücksichtigt wurden. Für alle anderen Gene waren die Proben 1.5 bezüglich der Schmelzkurve unauffällig.

Die Expression der TNAP Antagonisten *ANK* und *ENPP1* wird weder durch die Differenzierung noch durch die Mutation beeinflusst.

Weder bei den hTERT PDL noch bei den untersuchten Klonen veränderte sich das Expressionsmuster der TNAP Antagonisten *ANK* und *ENPP1* im Lauf der Differenzierung (S. Abb. 27 und 29). Primär stand bei den beiden Genen der Vergleich zwischen den mutierten und den nicht-mutierten Proben im Vordergrund. Bei beiden Genen ist weder basal noch im Verlauf der Differenzierung ein Unterschied zu den hTERT PDL erkennbar (S. Abb. 28 und 30). Bei den Basalwerten muss jedoch der starke Ausreißer bei Tag 0 der hTERT PDL Proben bemerkt werden, ohne den eine Hochregulation in den Klonen erkennbar wäre. Insgesamt deckt sich das Ergebnis mit der *ENPP1* Aktivitätsmessung, welche basal ebenfalls keine Unterschiede zwischen den Klonen zeigte.

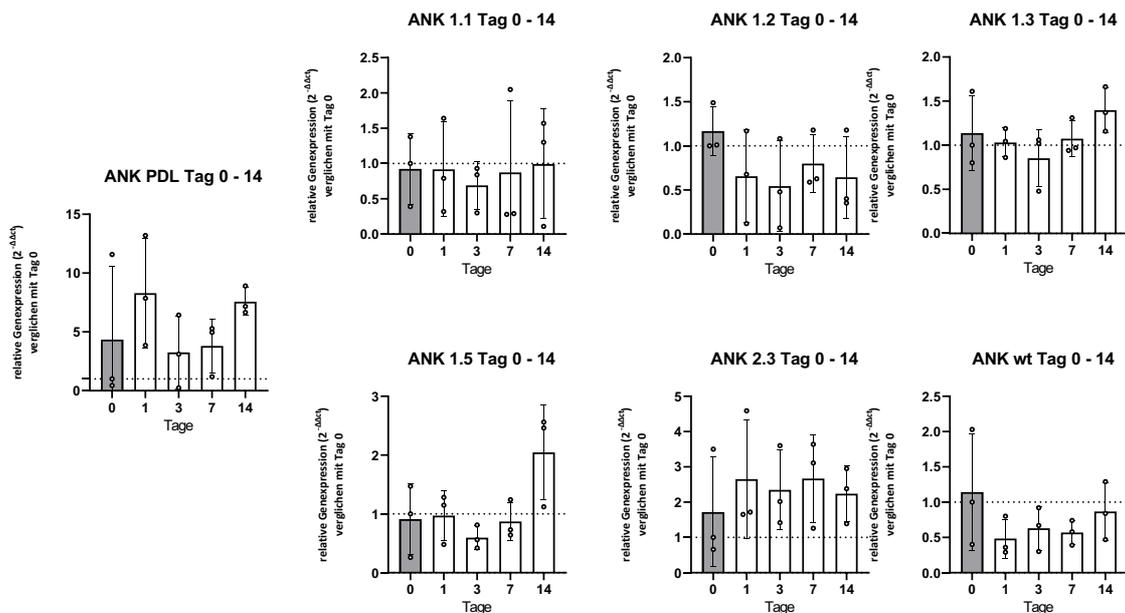


Abb. 27: ANK Genexpression der einzelnen Klone im zeitlichen Verlauf der osteogenen Differenzierung. Die Expression blieb im zeitlichen Verlauf in allen Proben unverändert. Die Statistik wurde bei Normalverteilung mit dem ANOVA Test mit Dunnett Korrektur (PDL, 1.3, 1.5, wt) und bei nicht normalverteilten Proben mit dem Kruskal-Wallis mit dem Dunn's Posthoc-Test berechnet (1.1, 1.2, 2.3). Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung. n = 3.

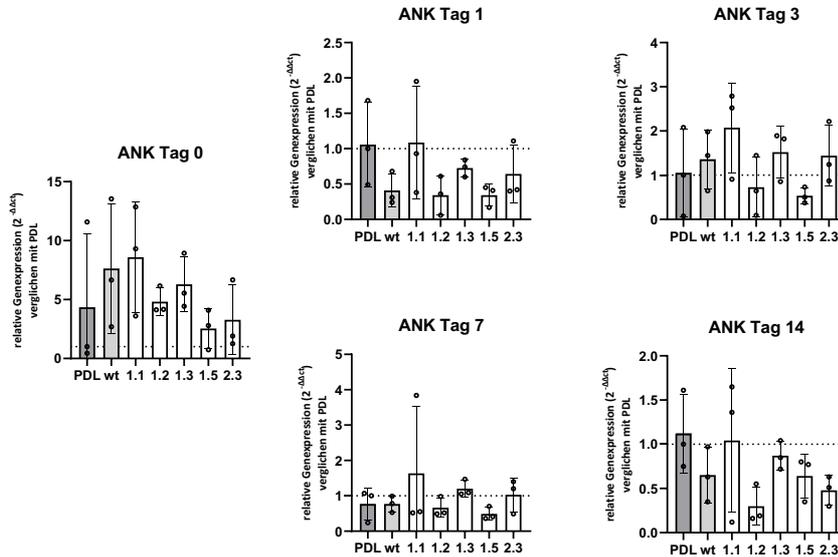


Abb. 28: ANK Genexpression an den Tagen 0 - 14 der osteogenen Differenzierung im Vergleich zwischen den Klonen. Es zeigten sich keine Expressionsunterschiede zwischen den Proben. Die Statistik wurde bei Normalverteilung mit dem ANOVA Test mit Dunnett Korrektur (Tag 3, 14) und bei nicht normalverteilten Proben mit dem Kruskal-Wallis mit dem Dunn's Posthoc-Test berechnet (Tag 0, 1, 7). Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung. n = 3.

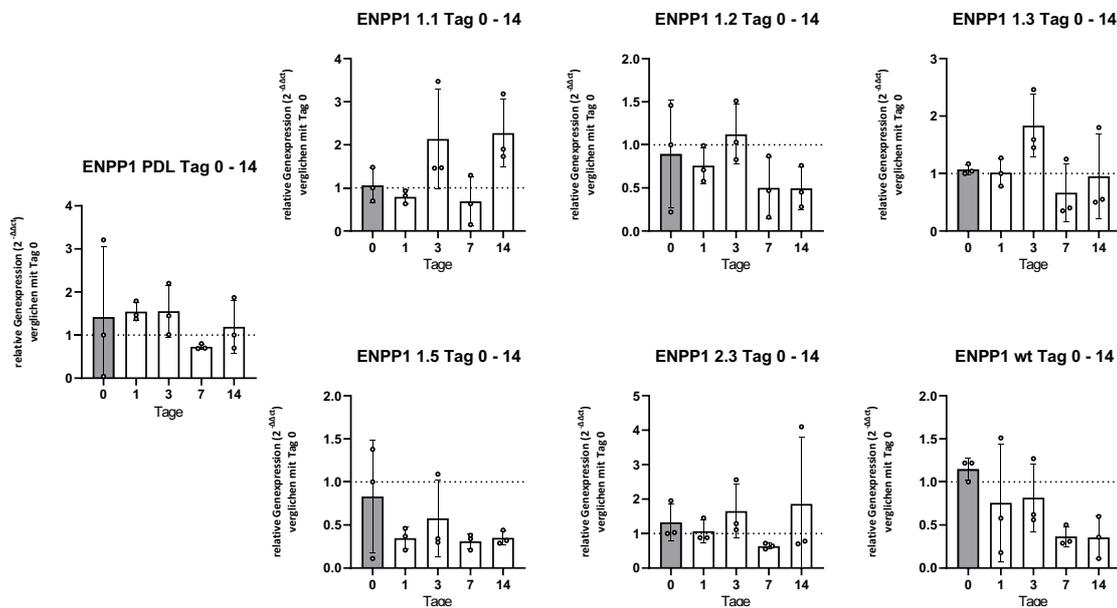


Abb. 29: ENPP1 Genexpression der einzelnen Klone im zeitlichen Verlauf der osteogenen Differenzierung. In keiner der Proben zeigte sich eine signifikante Änderung durch die Differenzierung. Die Statistik wurde bei Normalverteilung mit dem ANOVA Test mit Dunnett Korrektur (PDL, 1.2, 1.3, 1.5, 2.3, wt) und bei nicht normalverteilten Proben mit dem Kruskal-Wallis mit dem Dunn's Posthoc-Test berechnet (1.1). Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung. n = 3.

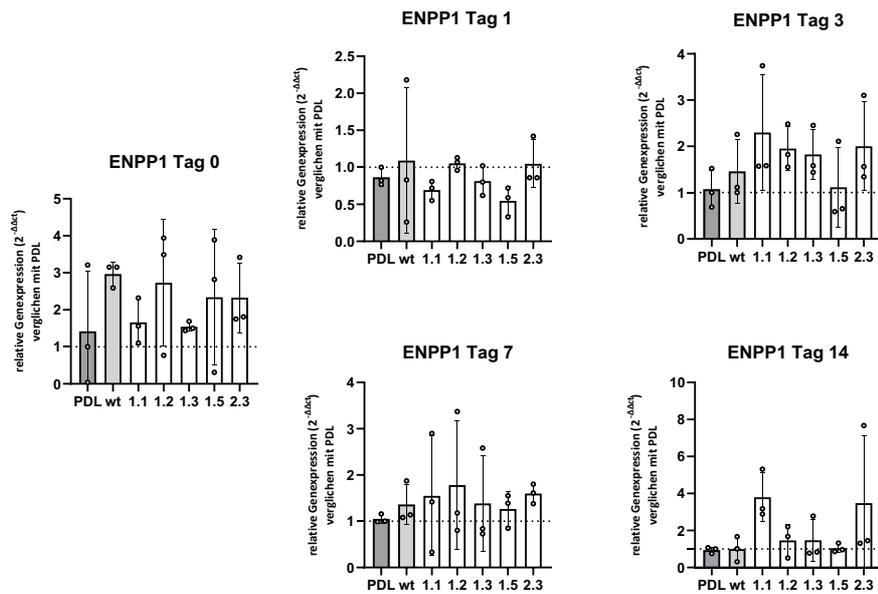


Abb. 30: ENPP1 Genexpression an den Tagen 0 - 14 der osteogenen Differenzierung im Vergleich zwischen den Klonen. Es sind keine Unterschiede zwischen den Proben an den einzelnen Tagen ersichtlich. Die Statistik wurde bei Normalverteilung mit dem ANOVA Test mit Dunnett Korrektur (Tag 1, 7) und bei nicht normalverteilten Proben mit dem Kruskal-Wallis mit dem Dunn's Posthoc-Test berechnet (Tag 0, 3, 14). Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung. n = 3.

Die *C5AR1* Expression steigt in den hTERT PDL und den Mutanten durch die Differenzierung

Ungeachtet der Mutationen war in allen untersuchten Zelllinien eine signifikante Erhöhung der *C5AR1* Expression im zeitlichen Verlauf auf das bis zu 178-fache in Klon 1.5 vorhanden (S. Abb. 31). Die Hochregulation von *C5RA1* durch die Differenzierung wird also von den Mutationen nicht beeinträchtigt.

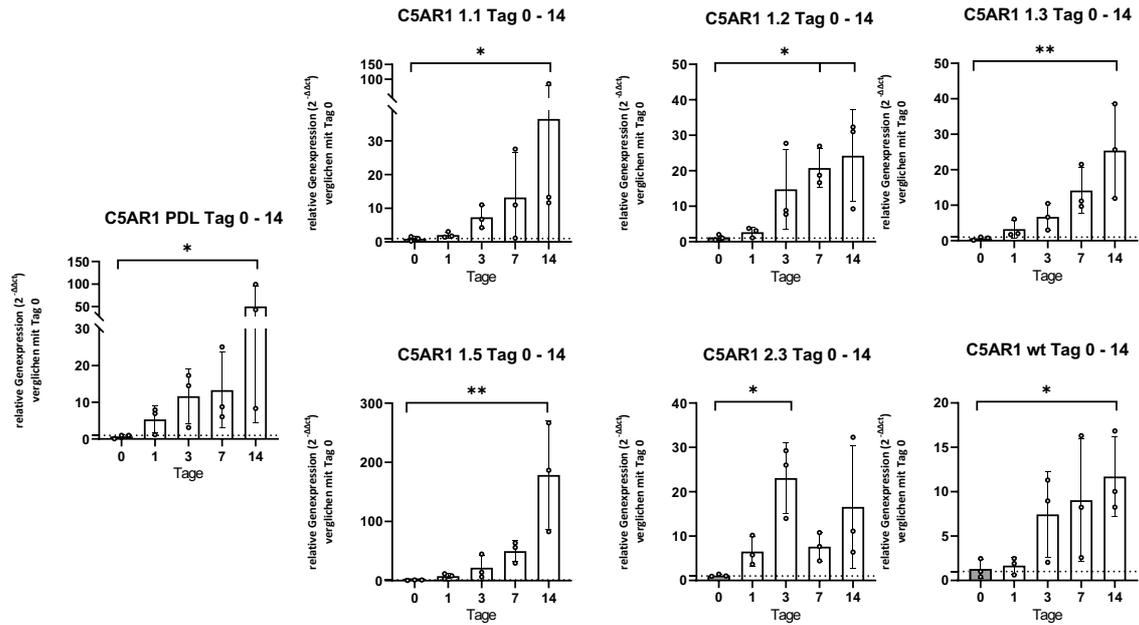


Abb. 31: C5AR1 Genexpression der einzelnen Klone im zeitlichen Verlauf der osteogenen Differenzierung. Alle Proben eine signifikant erhöhte C5AR1 Expression an Tag 3, 7 oder 14 zu Tag 0. Die Statistik wurde bei Normalverteilung mit dem ANOVA Test mit Dunnett Korrektur (1.2, 1.3, 1.5, 2.3, wt) und bei nicht normalverteilten Proben mit dem Kruskal-Wallis mit dem Dunn's Posthoc-Test berechnet (PDL, 1.1). (*) p < 0,05; (**) p < 0,01. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung. n = 3.

Gleichzeitig ist kein Unterschied im Expressionsmuster zwischen den Proben zu den einzelnen Zeitpunkten erkennbar (S. Abb. 32).

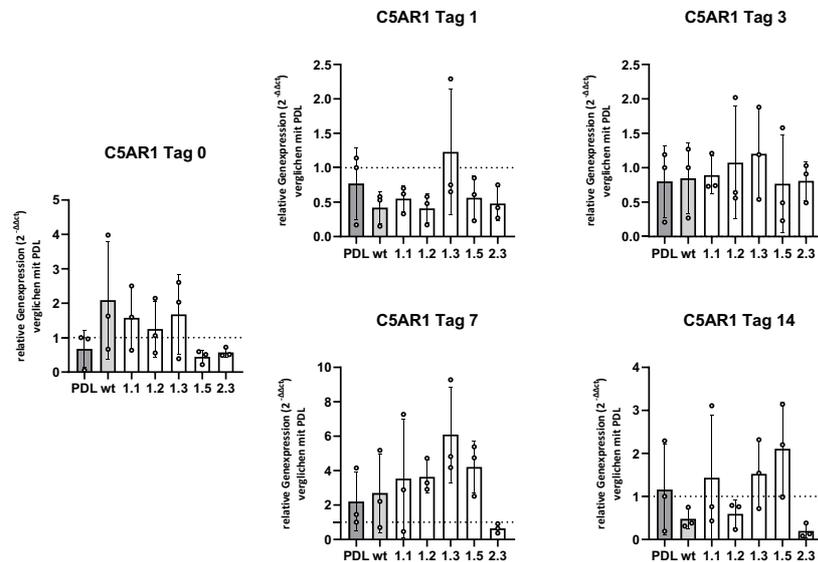


Abb. 32: C5AR1 Genexpression an den Tagen 0 - 14 der osteogenen Differenzierung im Vergleich zwischen den Klonen. Es sind keine Unterschiede zwischen den Proben an den einzelnen Tagen ersichtlich. Die Statistik wurde bei Normalverteilung mit dem ANOVA Test mit Dunnett Korrektur (Tag 0, 1, 7, 14) und bei nicht normalverteilten Proben mit dem Kruskal-Wallis mit dem Dunn's Posthoc-Test berechnet (Tag 3). Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung. n = 3.

Die *B3Galt2* Hochregulation wird durch die Mutationen teilweise aufgehoben

Wie auch in den Vorversuchen wurde in den hTERT PDL *B3Galt2* durch die Differenzierung hochreguliert, wobei der Unterschied erst an Tag 14 statistisch signifikant wurde. Dies traf analog für die Klone 1.3 und 1.5 zu. In 1.1, 1.2, 2.3 und auch dem nicht mutierten Wildtyp konnte keine signifikante Expressionszunahme beobachtet werden (S. Abb. 33). Insgesamt hat die große Deletion ohne Leserasterverschiebung bei 1.5 die geringste Auswirkung auf die *B3Galt2* Expression. Im Vergleich der Zelllinien untereinander zeichnet sich der Trend einer erhöhten *B3Galt2* Expression in den Klonen ab, dieser ist jedoch nur im Vergleich zwischen hTERT PDL und 1.2 an Tag 7 statistisch signifikant (S. Abb. 34).

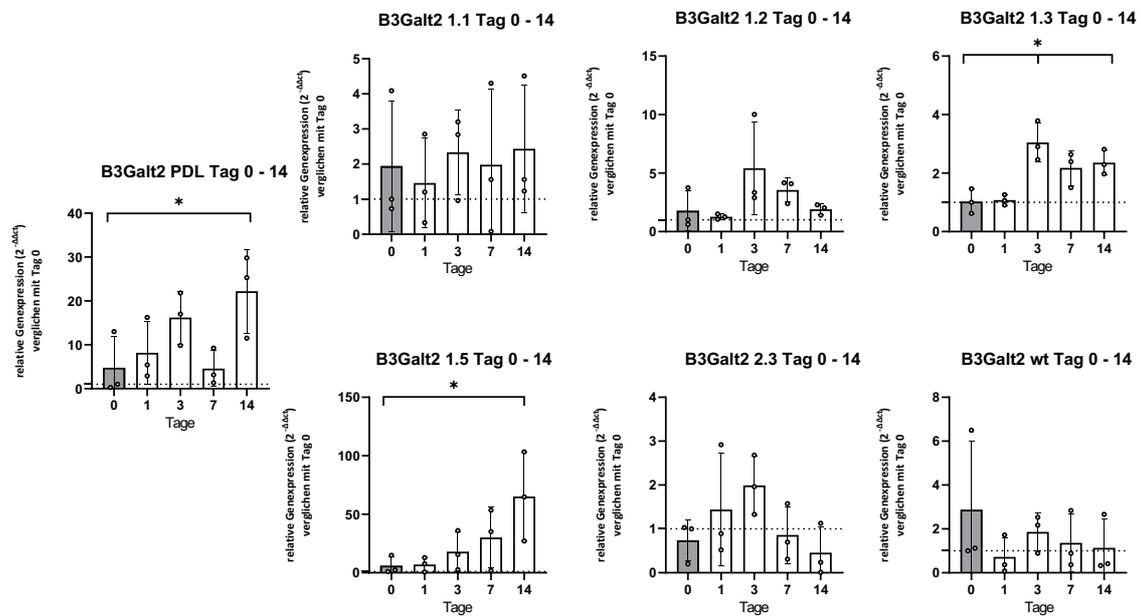


Abb. 33: *B3Galt2* Genexpression der einzelnen Klone im zeitlichen Verlauf der osteogenen Differenzierung. Bei 1.1, 1.2, 2.3 und dem wt ging die *B3Galt2* Expressionszunahme verloren. Die Statistik wurde bei Normalverteilung mit dem ANOVA Test mit Dunnett Korrektur (1.1, 1.2, 1.3, 1.5, 2.3) und bei nicht normalverteilten Proben mit dem Kruskal-Wallis mit dem Dunn's Posthoc-Test berechnet (PDL, wt). (*) $p < 0,05$. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung. $n = 3$.

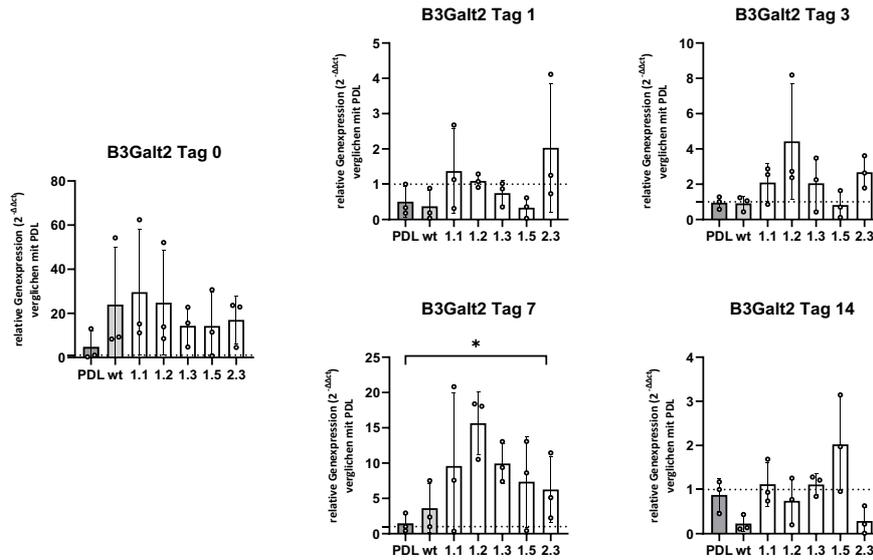


Abb. 34: B3Galt2 Genexpression an den Tagen 0 - 14 der osteogenen Differenzierung im Vergleich zwischen den Klonen. Es zeigte sich ein nicht signifikanter Trend, nach dem in den Klonen mehr *B3Galt2* als in den PDL exprimiert wird. Die Statistik wurde bei Normalverteilung mit dem ANOVA Test mit Dunnett Korrektur (Tag 1, 3, 7, 14) und bei nicht normalverteilten Proben mit dem Kruskal-Wallis mit dem Dunn's Posthoc-Test berechnet (Tag 0). (*) $p < 0,05$. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung. $n = 3$.

Der *Runx2/Sox9* Quotient wird durch die Differenzierung nicht beeinflusst

Der Quotient aus der *Runx2* und *Sox9* Genexpression, welcher bereits in den Vorversuchen keine Aussagekraft bezüglich der Differenzierung hatte, war auch in diesem Experiment in keiner der untersuchten Proben statistisch signifikant verändert (S. Abb. 35). Zwar zeigte sich teilweise (1.1, 1.3, 1.5, wt) ein leichter Trend der Zunahme des Quotienten, dieser war jedoch nicht statistisch signifikant. Auch die Einzeldaten für *Runx2* und *Sox9* zeigten, wie in den Vorversuchen, keine Veränderung im zeitlichen Verlauf oder zwischen den Proben, weshalb sie an dieser Stelle nicht gezeigt werden.

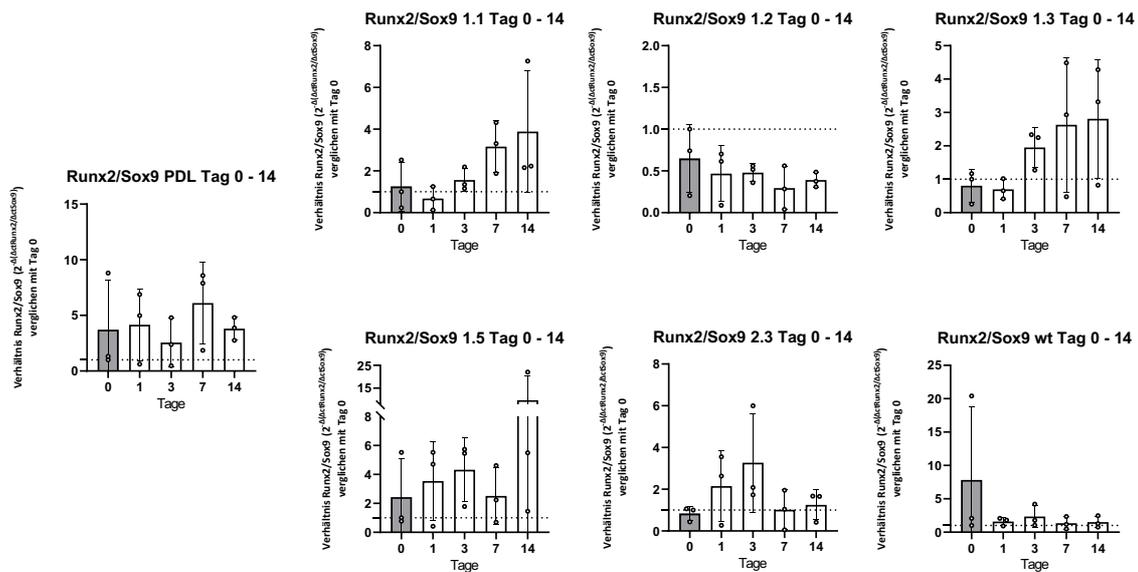


Abb. 35: Runx2/Sox9 Quotient der einzelnen Klone im zeitlichen Verlauf der osteogenen Differenzierung. Bei keiner der Proben zeigte sich eine signifikante Änderung des Quotienten. Die Statistik wurde bei Normalverteilung mit dem ANOVA Test mit Dunnett Korrektur (PDL, 1.2, 1.3, 1.5, wt) und bei nicht normalverteilten Proben mit dem Kruskal-Wallis mit dem Dunn's Posthoc-Test berechnet (1.1, 2.3). Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung. n = 3.

P2X7 zeigt ein inhomogenes Expressionsmuster

Die Expression des Purinrezeptorgens *P2X7* wurde weder durch die osteogene Differenzierung noch die *ALPL*-Mutationen signifikant beeinflusst (S. Abb. 36 und 37). Insgesamt fällt ein sehr inhomogenes Expressionsmuster mit deutlichen Ausreißern, insbesondere innerhalb der Klone 1.1 und 1.3 auf. Unter Nichtberücksichtigung dieser Ausreißer kann eine gesteigerte *P2X7* Expression in Klon 1.1 und 1.3 verglichen mit den hTERT PDL vermutet werden. Mit den vorliegenden Ergebnissen ist dies jedoch rein spekulativ und keinesfalls als erwiesen anzusehen.

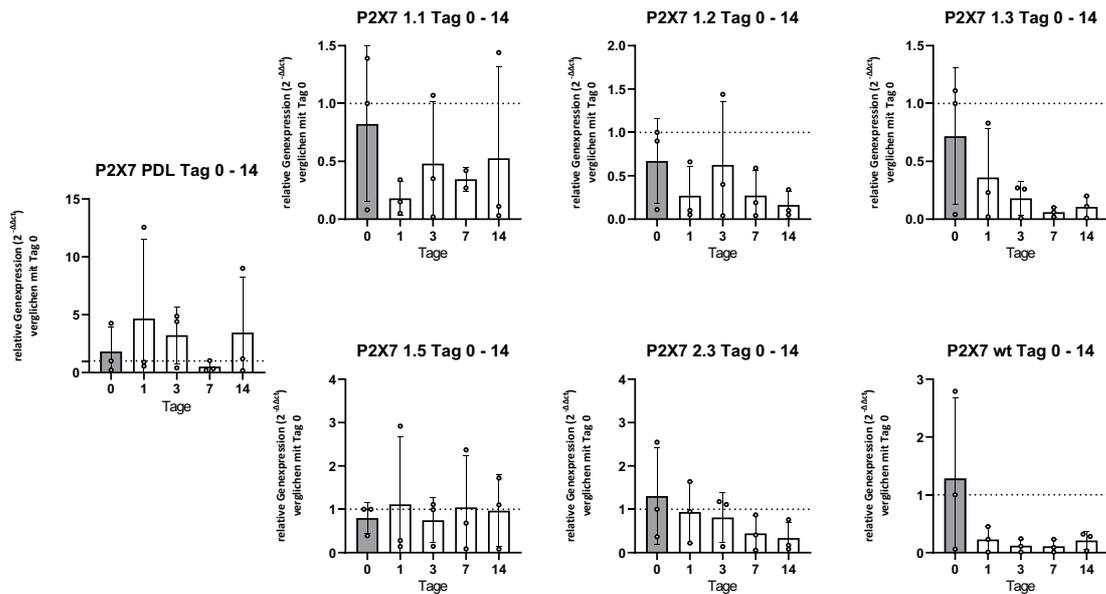


Abb. 36: P2X7 Genexpression der einzelnen Klone im zeitlichen Verlauf der osteogenen Differenzierung. Im zeitlichen Verlauf zeigte sich keine Änderung des Expressionslevels. Die Statistik wurde bei Normalverteilung mit dem ANOVA Test mit Dunnett Korrektur (1.2, 1.3, 1.5, 2.3, wt) und bei nicht normalverteilten Proben mit dem Kruskal-Wallis mit dem Dunn's Posthoc-Test berechnet (PDL, 1.1). Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung. n = 3.

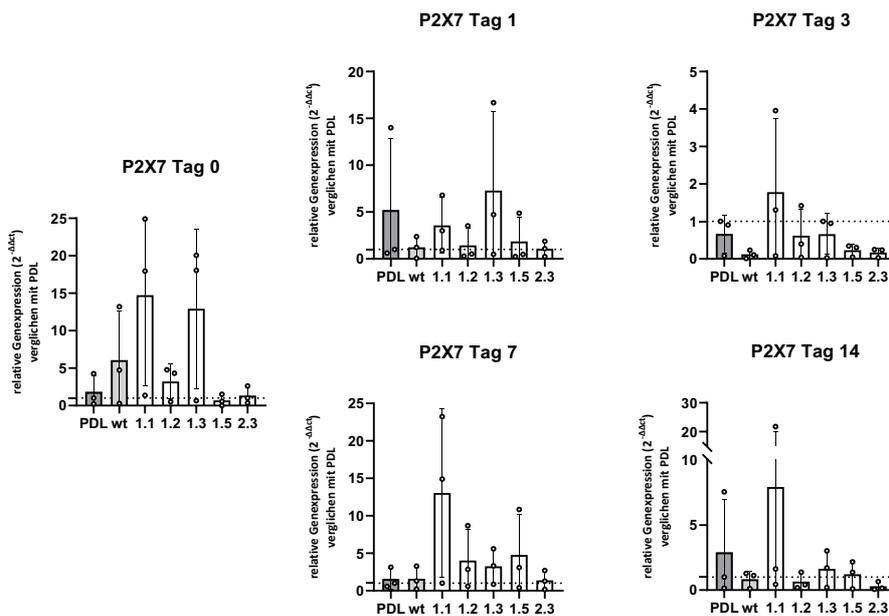


Abb. 37: P2X7 Genexpression an den Tagen 0 - 14 der osteogenen Differenzierung im Vergleich zwischen den Klonen. Es zeigte sich ein nicht signifikanter Trend, nach dem in den Klonen 1.1 und 1.3 mehr P2X7 als in den PDL exprimiert wird. Insgesamt lag eine sehr hohe Streuung der Werte vor. Die Statistik wurde bei Normalverteilung mit dem ANOVA Test mit Dunnett Korrektur (Tag 3, 7) und bei nicht normalverteilten Proben mit dem Kruskal-Wallis mit dem Dunn's Posthoc-Test berechnet (Tag 0, 1, 14). Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung. n = 3.

3.4.2. TNAP Aktivitätsmessung im CSPD Assay

Da sich in den Vorversuchen abzeichnete, dass an frühen Zeitpunkten bezüglich der *ALPL* Expression und der TNAP Aktivität die größten Unterschiede zu beobachten sind, wurden bei der Differenzierung der ausgewählten Klone lediglich die Tage 0, 3 und 7 bezüglich der TNAP Aktivität im CSPD Assay analysiert. In den folgenden Analysen wurden nur die Basalwerte der Passagen berücksichtigt, die auch differenziert wurden. Die Werte, die in den hTERT PDL Vorversuchen (3.3.2.) und der basalen Charakterisierung der Klone (3.2.3.) beschrieben wurden, sind in diesem Kapitel nicht enthalten. Ausschlaggebend dafür war neben der direkten Darstellung des Zeitverlaufs die Erkenntnis, dass die gesteigerte TNAP Aktivität in Klon 2.3 in der basalen Charakterisierung nach einigen Passagen nicht mehr vorhanden war und diese Werte die Entwicklung während der osteogenen Differenzierung verfälscht hätten.

In der Gegenüberstellung der Basalwerte ohne und mit Levamisol wurde erneut ein statistisch signifikanter Unterschied bei allen Proben außer 1.1 und 1.2 festgestellt (S. Abb. 38).

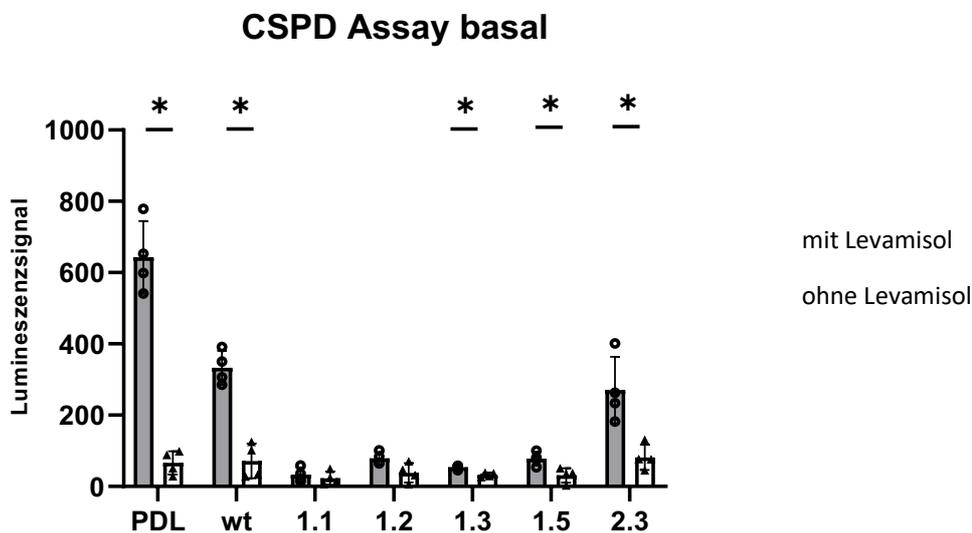


Abb. 38: Basalwerte des CSPD Assay mit und ohne Levamisol der Klone. Mit Ausnahme der Proben 1.1 und 1.2 unterscheiden sich die Werte innerhalb einer Gruppe statistisch signifikant. Die Statistik wurden mit ungepaarten *t*-Tests mit Holm-Sidak Korrektur berechnet. (*): $p < 0,05$. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung. $n = 3$.

Die basale TNAP Aktivität an den Tagen 0, 3 und 7 ist in allen Proben verglichen mit den hTERT PDL statistisch signifikant reduziert, wobei in Klon 1.1 und 1.3 so gut wie keine Aktivität nachweisbar war (S. Abb. 39). Im direkten Vergleich hat Klon 1.2 mit der heterozygoten Deletion eine tendenziell aber statistisch nicht signifikant höhere Aktivität als der homozygot mutierte Klon 1.1. Auch der nicht mutierte Wildtyp weist eine verringerte TNAP Aktivität auf, die sich etwa im Bereich der Punktmutation 2.3 befindet. Im Verlauf der Differenzierung bleibt der Unterschied zwischen Proben zu den hTERT PDL bestehen.

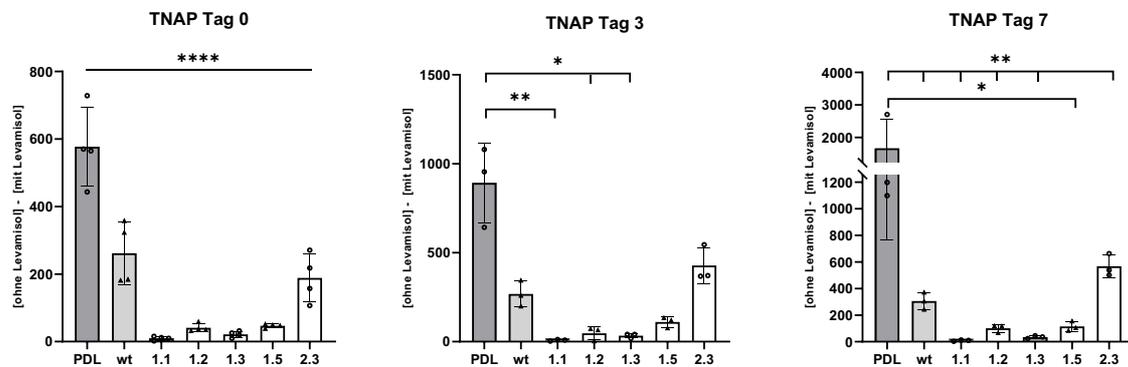


Abb. 39: TNAP Aktivität an den Tagen 0 - 7 der osteogenen Differenzierung im Vergleich zwischen den Klonen. Basal und auch im zeitlichen Verlauf war die TNAP Aktivität in den hTERT PDL signifikant höher als in den untersuchten Klonen, wobei insbesondere Klon 1.1 eine kaum nachweisbare Aktivität aufwies. Die Statistik wurde bei Normalverteilung mit dem ANOVA Test mit Dunnett Korrektur (Tag 0, Tag 7) und bei nicht normalverteilten Proben mit dem Kruskal-Wallis mit dem Dunn's Posthoc-Test berechnet (Tag 3). (*) $p > 0,05$; (**) $p < 0,01$; (****) $p < 0,0001$. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung. $n = 3$.

Betrachtet man die einzelnen Proben bezüglich der Entwicklung von Tag 0 bis Tag 7, so fällt auf, dass trotz der Mutationen in Klon 1.2, 1.5 und 2.3 die Aktivität in einem vergleichbaren Maß wie in den hTERT PDL Proben gesteigert wurde. Dem gegenüber nahm die Aktivität bei Klon 1.3 und dem Wildtyp nicht signifikant zu, bei Klon 1.1 blieben die absoluten Werte minimal (S. Abb. 40).

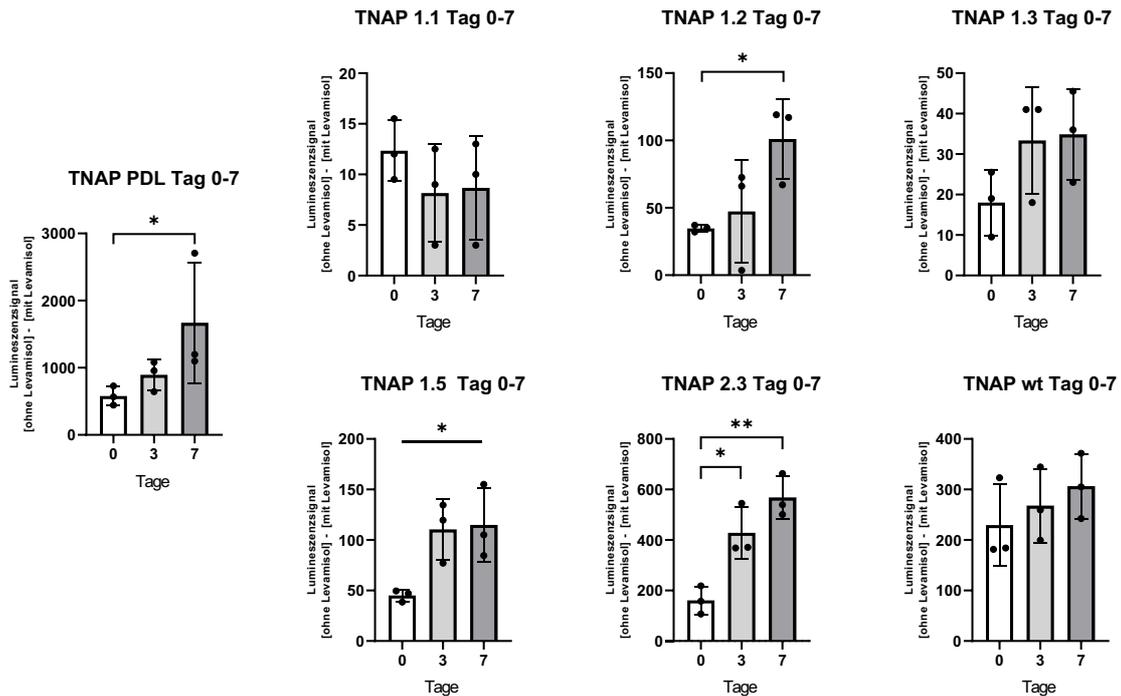


Abb. 40: TNAP Aktivität der einzelnen Klone im zeitlichen Verlauf der osteogenen Differenzierung. Die TNAP Aktivität wurde durch die osteogene Differenzierung in den hTERT PDL, in 1.2, 1.5 und 2.3 in einem vergleichbaren Maß gesteigert. Die Statistik wurde bei Normalverteilung mit dem ANOVA Test mit Dunnett Korrektur (1.1, 1.2, 1.3, 1.5, 2.3, wt) und bei nicht normalverteilten Proben mit dem Kruskal-Wallis mit dem Dunn's Posthoc-Test berechnet (PDL). (*) $p > 0,05$. (**) $p < 0,01$. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung. $n = 3$.

3.4.3. TNAP Färbung

Analog zu den Vorversuchen zur hTERT PDL Differenzierung wurde auch bei den ausgewählten Klonen eine TNAP Färbung nach 7 und 14 Tagen der osteogenen Differenzierung durchgeführt. Dabei war neben der Entwicklung im Verlauf der Differenzierung ein mikroskopischer Nachweis der basalen TNAP Aktivität in den nicht differenzierten Kontrollproben von Interesse, um das Ausmaß der Mutationen zu visualisieren. Wie im Methodenteil beschrieben, musste aufgrund von Lieferschwierigkeiten das Protokoll der TNAP Färbung umgestellt werden. Aus diesem Grund stellt sich der Hintergrund der vorliegenden Mikroskop-Bilder in Abb. 41 gelblicher dar als in den Vorversuchen.

In den nicht gecrisperten hTERT PDL Zellen konnte wie in den Vorversuchen eine Zunahme der TNAP positiven Zellen durch die osteogene Differenzierung gezeigt werden, wobei zwischen Tag 7 und Tag 14 kein Unterschied auszumachen ist. Die Wildtyp Zellen

weisen insgesamt deutlich weniger TNAP positive Zellen als die hTERT PDL Proben auf. Auch hier wurde die Zahl der positiven Zellen durch die Differenzierung gesteigert.

Die TNAP Färbung visualisiert eindrücklich die Auswirkung der verschiedenen Mutationen auf den Anteil TNAP positiver Zellen: In der homozygot mutierten Zelllinie 1.1 konnte keine positive Zelle nachgewiesen werden. In den heterozygoten Deletionen 1.2, 1.3 und 1.5 waren in den Kontroll- und Differenzierungsproben vereinzelte Zellen mit aktiver TNAP sichtbar, wobei die osteogene Differenzierung keine Auswirkung auf die Anzahl der blau gefärbten Zellen hatte. Im Vergleich mit den Wildtyp Zellen waren bei 1.2, 1.3 und 1.5 deutlich weniger als die Hälfte der Zellen TNAP positiv. Daraus lässt sich schließen, dass die Zellen tatsächlich heterozygot mutiert sind und keine Mischkultur aus einer homozygot und einer nicht-mutierten Zelllinie vorliegt, was in der Sequenzierung nicht zu unterscheiden gewesen wäre. Der punktmutierte Klon 2.3 weist verglichen mit den anderen Mutanten deutlich mehr TNAP positive Zellen auf, deren Anzahl durch die Differenzierung gesteigert wurde, und ähnelt insgesamt dem Wildtyp. In vielen Aspekten geht das Ergebnis der TNAP Färbung also mit dem des CSPD Assays einher und vervollständigt die Charakterisierung der verschiedenen Klone.

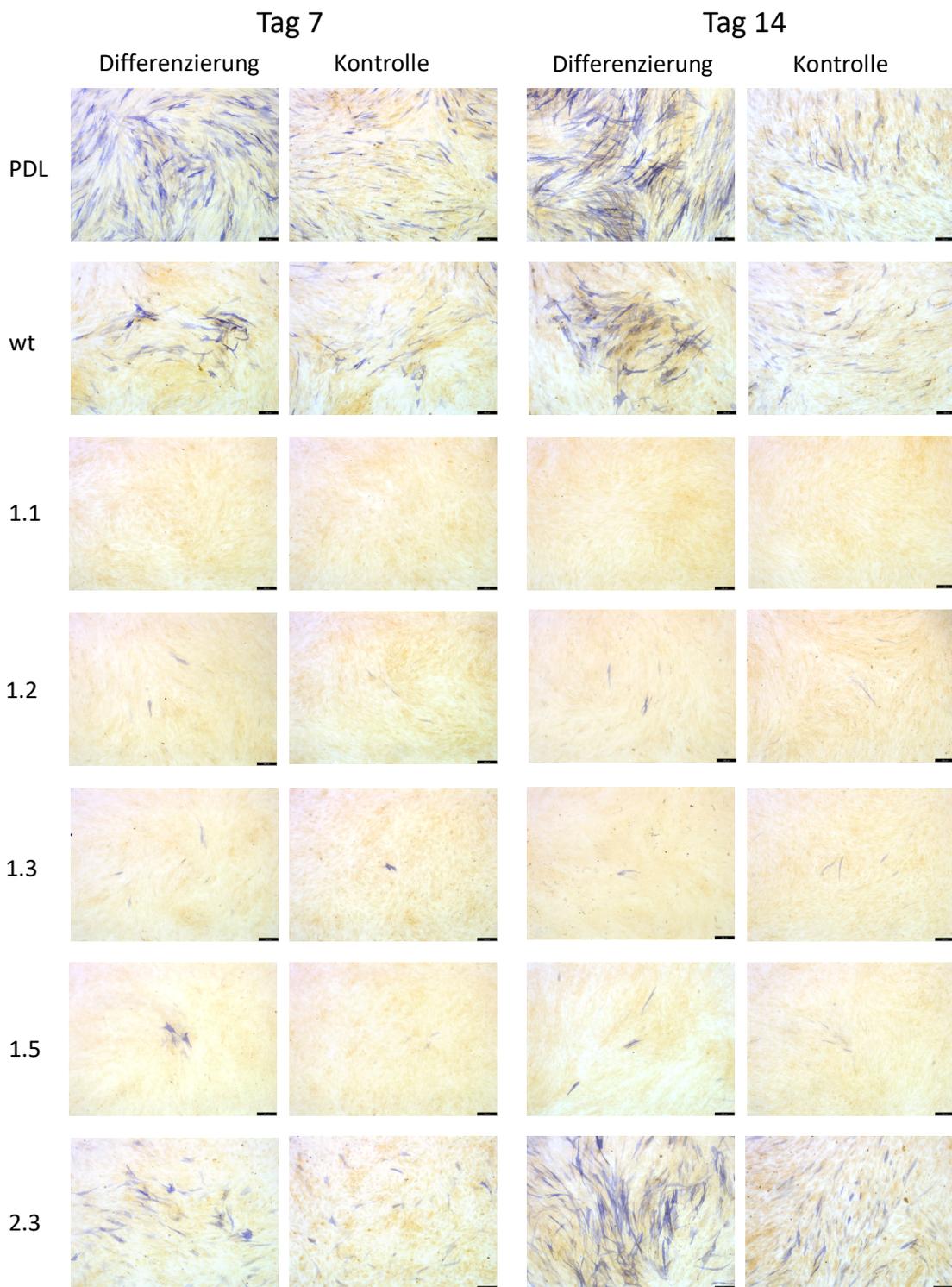


Abb. 41: TNAP Färbung der Klone an Tag 7 und 14 der osteogenen Differenzierung. Zellen, in denen die TNAP aktiv ist, sind blau gefärbt. Die Differenzierungs- und Kontrollproben sind jeweils gegenübergestellt. In den nicht gecrisperen PDL, dem Wildtyp (wt) und Klon 2.3 wurde die Anzahl der TNAP positiven Zellen durch die Differenzierung gesteigert, wobei bei wt und 2.3 die Gesamtzahl positiver Zellen geringer war als in den hTERT PDL Zellen. In Klon 1.1 waren keine Zellen mit TNAP Aktivität nachweisbar. Bei den Klonen 1.2, 1.3 und 1.5 sind vereinzelte TNAP positive Zellen erkennbar, deren Zahl sich zwischen Differenzierung und Kontrolle nicht unterscheidet. Der Maßstabalken entspricht 200 µm.

3.4.4. Alizarin Färbung

Nach 28 Tagen der osteogenen Differenzierung wurde eine Alizarinfärbung zum Nachweis von Calciumphosphatablagerungen durchgeführt. Wie es sich bereits in den Vorversuchen angedeutet hatte, konnte weder bei den nicht gecrisperten hTERT PDL Zellen noch bei den verschiedenen Klonen eine Kalzifizierung nachgewiesen werden. Nichtsdestotrotz war analog zu den Vorversuchen bezüglich des Ablösens ein Unterschied zwischen den Differenzierungs- und Kontrollproben erkennbar: In keiner der Kontrollproben lösten sich die Zellen vom Kulturboden, während in fast allen Differenzierungsproben zumindest eine partielle Ablösung der Zellen auftrat. Die Ausnahme bildete dabei Klon 1.1, bei dem die Differenzierungsproben ebenso adhärent geblieben sind (S. Abb. 42).

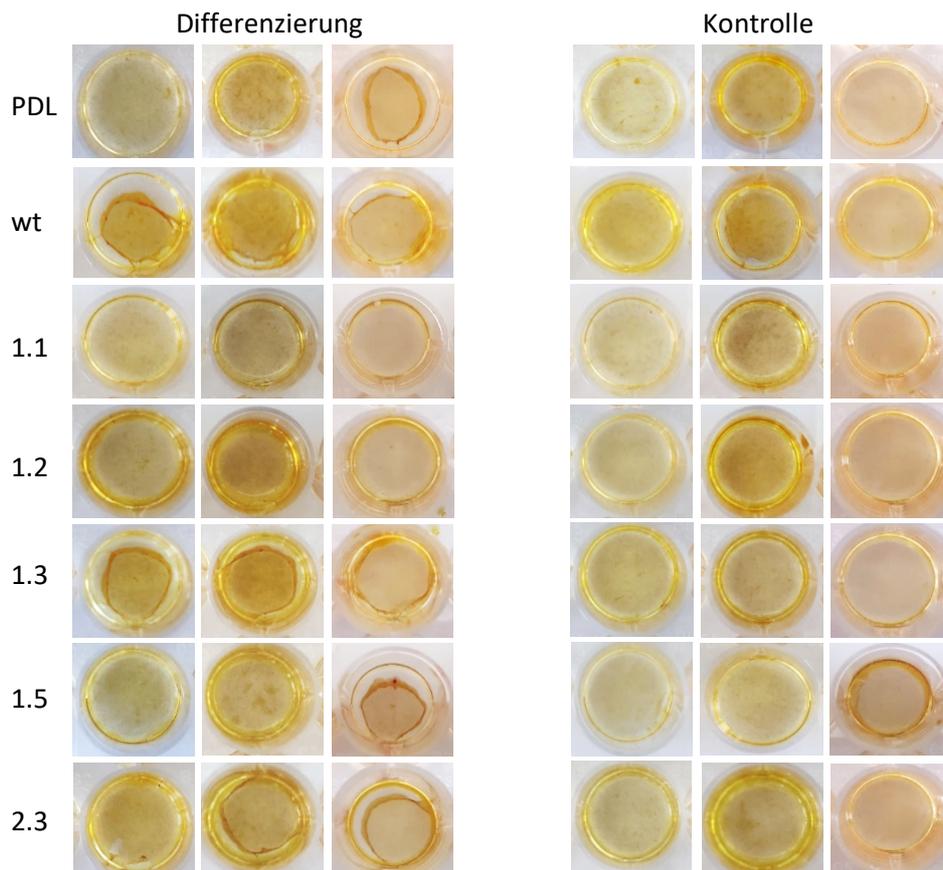


Abb. 42: Alizarinfärbung nach 28 Tagen der osteogenen Differenzierung. Die Bilder sind repräsentative Beispiele eines Wells jeder Passage. In keiner der Proben waren Calciumphosphatablagerungen erkennbar. Die Differenzierungsproben haben sich verglichen mit den Kontrollproben von den Wells abgelöst. In Klon 1.1 ist auch bei der Differenzierung kein Adhäsionsverlust sichtbar.

Der durch das Ablösen in den Umschlagfalten zurückgehaltene Farbstoff führte zu vermeintlich höheren Werten in der Quantifizierung, welche in der Wildtyp Probe sogar zu einem signifikanten Unterschied führte (S. Abb. 43).

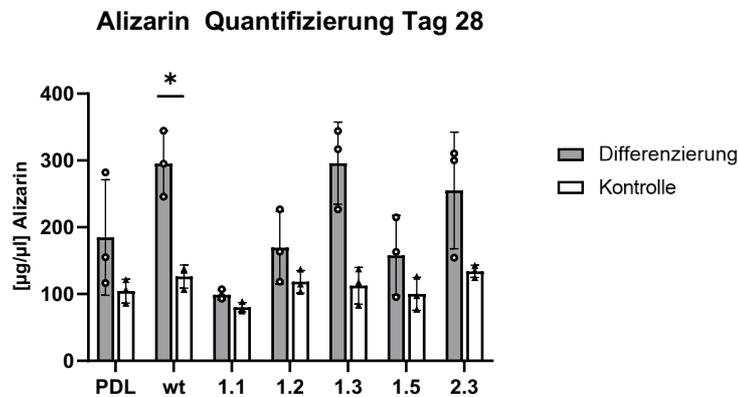


Abb. 43: Quantifizierung der Alizarinfärbung. Der in den Wildtyp (wt) Proben signifikante Unterschied in der Quantifizierung ist durch den in den Umschlagfalten zurückgehaltenen Farbstoff der abgelösten Differenzierungsproben zu erklären. Für die Statistik wurden ungepaarte t-Tests mit Holm-Sidak Korrektur berechnet. (*): $p < 0,05$. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung. $n = 3$.

3.5. Auswirkung der PTH Stimulation auf hTERT PDL Zellen

Der Einfluss der PTH Stimulation auf differenzierende hTERT PDL Zellen wurde in dieser Arbeit nur im Rahmen von Vorexperimenten untersucht. Dabei wurden zunächst die nicht gecrispten hTERT PDL Zellen nach PTH Stimulation bezüglich der *ALPL*- und *Phospho1* Genexpression und anschließend die ausgewählten Klone bezüglich der *ALPL*- Genexpression und der TNAP Aktivität im Vergleich mit den hTERT PDL analysiert (S. Abb 44, 45).

Der erste Versuch zur *ALPL*- und *Phospho1*- Genexpression zeigte einen vielversprechenden Trend, nach welchem die *ALPL* Expression bereits eine Stunde nach der PTH Zugabe deutlich gesteigert wurde. Sechs Stunden nach der Exposition war das Expressionslevel wieder annähernd normalisiert und stieg nach 24 Stunden erneut an. *Phospho1* verhielt sich in diesem Vorversuch gegenläufig zu *ALPL*: Nach einer Stunde wurde das Expressionsniveau zunächst reduziert, um dann nach sechs und 24 Stunden gesteigert zu werden. Diese Ergebnisse entsprechen der Publikation von Houston et al (Houston et al., 2016).

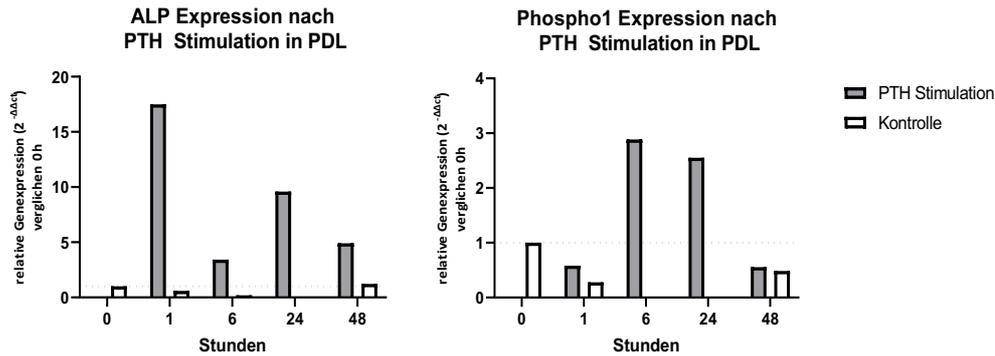


Abb. 44: ALPL und Phospho1 Expression in hTERT PDL nach 0 - 48 Stunden der PTH Stimulation. Die ALPL Expression wurde nach einer Stunde auf das 17,5-fache gesteigert und fiel nach 6 Stunden wieder ab. Die Phospho1 Genexpression nahm nach einer Stunde zunächst ab und erreichte nach 6 Stunden ein Maximum. n = 1.

In den folgenden Experimenten zur PTH Stimulation der ausgewählten Klone wurden die Zeitpunkte nach 0, 1 und 6 Stunden berücksichtigt. Der Trend aus dem Vorversuch konnte nicht bestätigt werden. Weder in den PDL Proben noch in den Klonen war ein Unterschied in der ALPL Expression oder der TNAP Aktivität erkennbar (S. Abb. 45).

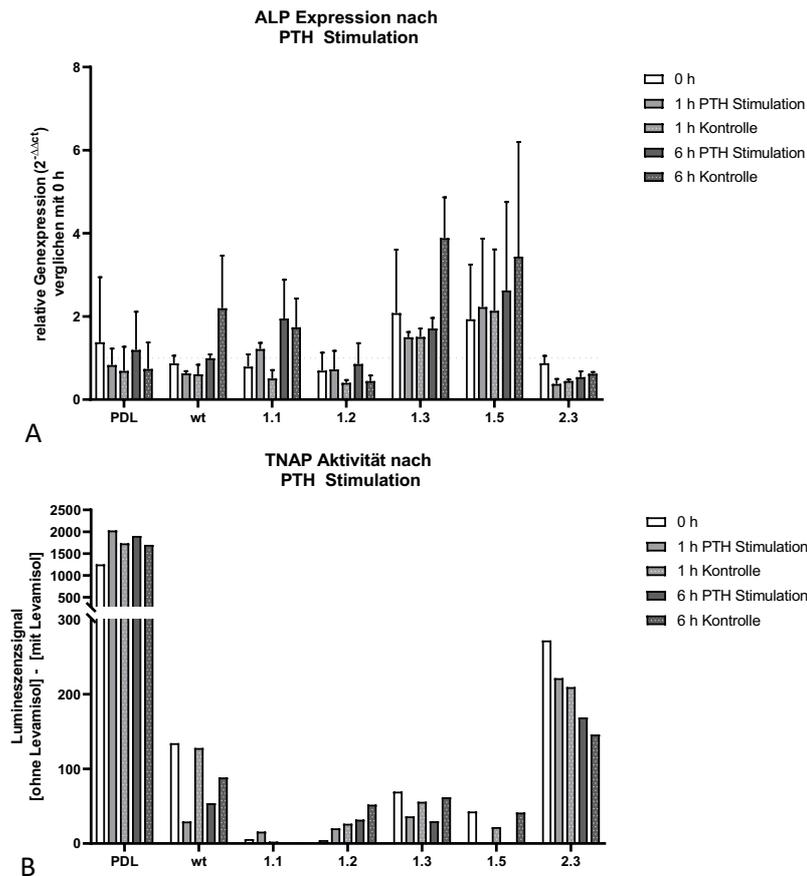


Abb. 45: ALPL Genexpression und TNAP Aktivität der Klone nach PTH Stimulation. Die Werte nach einer und sechs Stunden (h) der PTH- und Kontrollproben sind dem Basalwert (0 h) gegenübergestellt. In keiner der untersuchten Proben zeigten sich Veränderungen, die die Tendenz des Vorversuchs bestätigen konnten. n = 2 bei (A); n = 1 bei (B).

4. Diskussion

Der Fokus dieser Arbeit lag auf der Entwicklung und Charakterisierung Alkalische Phosphatase defizienter odontogener Zelllinien als *in vitro* Modell zur Erforschung dentaler Aspekte der Hypophosphatasie. Dafür wurden immortalisierte Zellen des parodontalen Ligaments mit Hilfe von CRISPR/Cas9 genetisch modifiziert und anschließend bezüglich ihrer Genexpression und TNAP Aktivität basal und während der osteogenen Differenzierung untersucht. Nach momentanem Kenntnisstand ist dies das erste Forschungsprojekt, das die Etablierung einer TNAP defizienten odontogenen Zelllinie verfolgt. Ein Großteil der bisherigen HPP Forschung basierte neben der Arbeit mit TNAP defizienten Mausmodellen auf Zellkulturmodellen, in denen durch eine vorübergehende Inhibition mit Levamisol oder Biarylsulfonamiden wie MLS-0038949 oder die konstante *ALPL* Überexpression wie in der neuronalen SH-SY5Y^{TNAP^{high}} Zelllinie die TNAP Aktivitätslevel beeinflusst werden (Dahl et al., 2009, Graser et al., 2015, Melms et al., 2020, Nowak et al., 2015, Sergienko et al., 2009). Darüber hinaus existiert ein Schafmodell, bei welchem durch CRISPR/Cas9 eine bestimmte *ALPL* Punktmutation induziert wurde, welche zuvor bei Patienten beschrieben worden war. Dabei löste die Mutation in den Patienten in einer homozygoten Ausprägung die infantile Form und in einer compound-heterozygoten Ausprägung die perinatal letale Form der HPP aus und zeigte bei den Schafen eine ähnliche Genotyp-Phänotyp Korrelation (Williams et al., 2018). Im Unterschied zu dieser Studie wurde in der vorliegenden Arbeit keine gezielte Position im *ALPL* Gen modifiziert, sondern vielmehr versucht, mit unterschiedlichen Mutationen ein möglichst breites Spektrum der im Zusammenhang mit der HPP vorkommenden Mutationen abzudecken und miteinander zu vergleichen.

4.1. CRISPR/Cas9 induzierte *ALPL* Mutationen

Insgesamt wurden bei der Sequenzierung der 44 Klone aus der Transfektion mit den verschiedenen crRNAs ALPL1 und ALPL2 zwölf mutierte Klone detektiert. Unabhängig von der crRNA war bei beiden Konstrukten die tatsächliche Mutationsrate höher als vorher im Cleavage Assay bestimmt. Dabei wurde die Effizienz im Cleavage Assay möglicherweise insofern unterschätzt, als dass jeweils nur die größere sichtbare Bande in die

Quantifizierung eingeflossen ist. Außerdem lag, entgegen des Ergebnisses des Cleavage Assays, eine deutlich höhere Mutationsrate bei der ALPL1 crRNA vor, was wiederum der Angabe des Herstellers Thermofisher entspricht. Auch wenn eine Stichprobe von 22 Sequenzierungen pro Konstrukt nicht zwingend ausreichend zur Bestimmung der Effizienz ist, zeigt sich, dass die im Cleavage Assay bestimmte Effizienz nur als grobe Einschätzung gewertet werden kann und auch vermeintlich geringe Mutationsraten zu positiven Sequenzierungsergebnissen führen können.

4.1.1. Vorhersage der Mutationen

Es ist mittlerweile bekannt, dass die Mutationen, die durch CRISPR/Cas9 induziert werden, keinesfalls zufällig entstehen, sondern vielmehr von ganz bestimmten Faktoren abhängen. Dabei ist die Zielsequenz der crRNA bedeutsamer als der Locus der Modifikation im genomischen Kontext oder die verwendete Zelllinie. Über zeitliche Variation der Transfektion und gezielte Inhibition kann Einfluss auf die unterschiedlichen Reparaturmechanismen und damit die Mutagenese genommen werden (van Overbeek et al., 2016). Im Umkehrschluss bedeutet dies, dass nur anhand der Zielsequenz, unabhängig des genetischen Kontexts, bereits Vorhersagen über bevorzugte Mutationen getroffen werden können (Allen et al., 2019, Shen et al., 2018). Die Programme InDelphi (<https://indelphi.giffordlab.mit.edu/single>, aufgerufen am 07.11.2020) und FORECasT (<https://partslab.sanger.ac.uk/FORECasT>, aufgerufen am 07.11.2020) wurden dahingehend programmiert, nur anhand der Zielsequenz und der PAM Sequenz Aussagen über die Verteilungsmuster der auftretenden Mutationen zu liefern, wobei sie sich primär an Mikrohomologien orientieren. Beide Programme wurden für ALPL1 und ALPL2 getestet. Für ALPL1 werten die Programme eine Deletion von fünf Basenpaaren direkt ab der PAM Sequenz mit 7,4 % bei FORECasT und 27,6 % bei InDelphi als wahrscheinlichstes Ergebnis. Die Einzelbasendeletion des Cytosins, welche in Klon 1.1 und 1.2 beobachtet wurde, wurde von beiden Programmen erkannt. InDelphi wertet diese Deletion mit 4,9 % als dritthäufigste, bei FORECasT ergibt sich für diese Mutation eine Wahrscheinlichkeit von 3,8 %. Diese Vorhersage widerspricht den Ergebnissen der Sequenzierung insofern, als bei der in 22 sequenzierten Klonen vier Mal dieselbe Base betroffen war, welche offensichtlich besonders sensitiv gegenüber Mutationen ist. Die anderen beschriebenen

ALPL1 Mutationen, inklusive der großen Deletionen von Klon 1.5 und 1.6, wurden von den Programmen nicht vorhergesagt. Während die Deletionen einzelner Basen voraussichtlich durch nichthomologe Endverknüpfungen entstanden sind, basiert die große Deletion in Klon 1.5 mit hoher Wahrscheinlichkeit auf einer Mikrohomologie vermittelten Endverknüpfung. Durch die Deletion ist an der Schnittstelle ein Bereich mit einer repetitiven GC-reichen Sequenz entstanden, welcher als Mikrohomologie gedeutet werden kann. Die jeweils zehn bzw. neun Nukleotide umfassenden Deletionen in Klon 1.6 und 2.3 weisen keine offensichtlichen Mikrohomologien auf. Für ALPL2 favorisiert InDelphi die Deletion eines Guanins innerhalb der PAM Sequenz. Keine der in Klon 2.1, 2.2 und 2.3 beobachteten Mutationen wurde vom Programm vorhergesagt, allerdings zeichnete sich bei den wenigen mutierten Proben auch kein eindeutiger Trend im Sinne einer besonders sensitiven Position ab, wie er bei ALPL1 zu beobachten war. Die Reliabilität des Programms InDelphi lässt sich also anhand der hier sequenzierten Proben nicht nachvollziehen, selbiges gilt für das mit einem ähnlichen Algorithmus arbeitenden Programms FORECasT. Beide Programme arbeiten primär über die Erkennung von Mikrohomologien. Je mehr solche in der Zielsequenz vorhanden sind, desto eher entspricht die Vorhersage des Programmes dem tatsächlichen Ergebnis der Sequenzierung (Sledzinski et al., 2020).

Neben kommerzieller crRNA, welche in dieser Arbeit verwendet wurde, gibt es auch die Möglichkeit, eine spezifische guideRNA synthetisieren zu lassen. Im Zusammenhang mit den beschriebenen Vorhersageprogrammen finden diese dann Anwendung, wenn ein ganz bestimmter Gendefekt simuliert werden soll. Um die Präzision der Vorhersage zu steigern bietet es sich in einem solchen Fall also an, Mikrohomologien als Kriterium für die guideRNA Synthese zu berücksichtigen.

4.1.2. Vergleich der *in vitro* Mutationen mit dem Genotyp der HPP

Bei den Mutationen, die in der vorliegenden Arbeit durch CRISPR/Cas9 induziert wurden, handelte es sich hauptsächlich um Deletionen von Einzelbasen, die zu einem vorzeitigen Stopcodon auf einem oder beiden Allelen führten, sowie große Deletionen mit und ohne Verschiebung des Leserasters. Punktmutationen, wie in Klon 2.3, werden mit der in dieser Arbeit angewendeten Methode eher selten beobachtet. Bei den über 400

beschriebenen Hypophosphatasie-auslösenden Mutationen handelt es sich hingegen größtenteils um Punktmutationen, welche in den meisten Fällen als compound-heterozygote Mutationen mit verschiedenen betroffenen Nukleotiden auf beiden Allelen beobachtet werden. Kleine Deletionen treten nur in etwa 11 % der Fälle auf, Nonsense Mutationen mit vorzeitigem Stopcodon werden nur in 4,8 % der Fälle beschrieben (S. Datenbank Etienne Mornet, http://www.sesep.uvsq.fr/03_hypo_mutations.php, aufgerufen am 20.06.2020). Ob auch in den sequenzierten Klonen compound-heterozygote Mutationen aufgetreten sind, kann nicht endgültig ausgeschlossen werden. Zum einen ist der Abgleich der Sequenz nach einer heterozygoten Mutation aufgrund der Signalüberlagerung erschwert, zum anderen wurden nur etwa 300 Nukleotide sequenziert.

Um einzuschätzen, welchen Effekt die *in vitro* induzierten Mutationen auf den HPP Phänotyp haben könnten, wurden sie mit der HPP-Datenbank abgeglichen. Das ALPL1 Konstrukt führte bei den Klonen zu Mutationen in Exon 6. Dabei sind gemessen ab der Position des Startcodons die Nukleotide 554 (Klone 1.1, 1.2), 555 (Klon 1.3) und 558 (Klon 1.4) von Einzelbasendeletionen betroffen (Vgl. Abb. 13). Im Bereich von Exon sechs sind in der Datenbank drei heterozygote Einzelbasendeletionen erfasst, welche ebenfalls zu vorzeitigem Stopcodons führen. Dabei lösen die Deletion an Position 480 und an Position 544, beide mit compound-heterozygoten Punktmutationen auf dem anderen Allel, die perinatale Form der HPP aus. Eine Deletion an Position 522 wurde bei einem Patienten mit infantiler HPP beschrieben. Große Deletionen, wie sie in Klon 1.5 und 1.6 aufgetreten sind, treten zumindest bei nicht letalen Formen der HPP sehr selten auf. Die Deletion eines Asparagins ohne Verschiebung des Leserasters (568 - 570) und die gleichzeitige Deletion einer Base in Exon 12 auf dem anderen Allel löste bei einem Patienten eine perinatale HPP aus (Michigami et al., 2005). Dieses Asparagin ist nur eine von 16 bzw. drei Aminosäuren, die bei Klon 1.5 und 1.6 fehlen.

Das ALPL2 Konstrukt führte zu einer homozygoten Einzelbasendeletion an Position 79 gemessen ab dem Startcodon (Klon 2.1), einer Deletion von neun Nukleotiden (Position 77 - 85) ohne Verschiebung des Leserasters (Klon 2.2) und zu einem Austausch des Thymins an Position 83 (Klon 2.3) in Exon 3 (Punktmutation). In der Datenbank wird eine

Deletion von sechs Nukleotiden an Position 69 - 74 genannt, welche mit einer Punktmutation auf dem anderen Allel Auslöser für eine klinisch manifeste perinatale HPP war. Einzelbasendeletionen werden für Exon drei in der Datenbank nicht erwähnt. Von besonderem Interesse ist die Punktmutation in Klon 2.3, da ein Austausch von Thymin durch Guanin an derselben Position bei compound-heterozygoter Punktmutation in Exon zwölf zur klinischen Form der Odontohypophosphatasie geführt hat (Yang et al., 2013). Die 18 Monate alte Patientin präsentierte sich mit dem vorzeitigen Verlust der Milchzähne und einer massiv reduzierten TNAP Aktivität von 7 IU/l. Während in dem vorliegenden Patientenfall anstelle eines Tyrosins (TAC) eine Asparaginsäure (GAC) eingebaut wurde, findet sich bei Klon 2.3 entweder ein Asparagin (AAC) oder ein Histidin (CAC). Beide Eltern der Patientin tragen heterozygot nur eine der beiden Mutationen und zeigen klinisch keine HPP Symptome. Unter der Annahme, dass bei Klon 2.3 keine compound-heterozygote Deletion auf dem anderen Allel zu finden ist und ungeachtet der neu eingebauten Aminosäure, entspricht der Genotyp des Klons 2.3 dem des Vaters, welcher klinisch gesund war.

Silvent et al. konnten anhand von Vergleichen der TNAP-Aminosäuresequenzen von 58 verschiedenen Säugetieren feststellen, welche Aminosäuren in der Evolution konserviert sind und bei welchen Variationen zwischen den Spezies aufgetreten sind (Silvent et al., 2014). Je konservierter eine Aminosäure ist, desto wahrscheinlicher führt eine Mutation an dieser Stelle zum Phänotyp der HPP. Gleichzeitig nimmt die Mutation einer variablen Aminosäure mit einer hohen Wahrscheinlichkeit keinen Einfluss auf die Krankheitsausprägung. Insgesamt wurden 89,5 % der Aminosäuren als sensitive Positionen eingestuft. Dazu zählen neben den komplett konservierten Aminosäuren auch solche, deren Änderung nur leichte chemische Abweichungen verursacht. Lediglich 10,5 % gelten als variable Position. Der hohe Grad der Übereinstimmung der TNAP Aminosäuresequenz innerhalb der Evolution der Säugetiere verdeutlicht den hohen Selektionsdruck auf das Protein und die enge Verknüpfung der Funktion und Struktur der TNAP. Entsprechend der Beobachtung bei HPP Patienten können bereits kleine strukturelle Veränderungen zu einer maßgeblich verringerten TNAP Funktion führen. Darüber hinaus befasst

sich dieselbe Publikation damit, welche Aminosäuren an welcher enzymatischen Domäne der TNAP beteiligt sind. Die 16 Aminosäuren, welche bei Klon 1.5 heterozygot deletiert sind, sind alle als sensitive Positionen beschrieben und sind Bestandteil des aktiven Zentrums oder potenzielle Phosphorylierungsstellen für posttranslationale Modifikationen. Das aktive Zentrum der TNAP wird von über mehrere Codons verteilten Aminosäuresequenzen gebildet und erst durch die Proteinfaltung zu einer funktionellen Einheit mit drei Bindestellen für Metallionen. Das Arginin an Position 184 ist eine der in Klon 1.5 deletierten Aminosäuren und eine von sechs Positionen, welche die Ionen-Bindetasche des aktiven Zentrums formen. Die drei Aminosäuren, welche in Klon 2.2 heterozygot deletiert sind, sind ebenfalls sensitive Positionen und sind am homodimeren Interface beteiligt. Im homodimeren Interface sind die Monomere durch van der Waals Kräfte und hydrophobe Effekte miteinander verbunden (Mornet, 2018). Die TNAP ist ein funktionelles Homodimer, welches nur durch die allosterischen Effekte zwischen den beiden Monomeren katalytisch aktiv ist (Hoylaerts et al., 1997). Dementsprechend ist auch bei Mutationen des homodimeren Interface mit deutlichen strukturellen und funktionellen Einbußen zu rechnen. Auch das in Klon 2.3 betroffene Tyrosin gilt als sensitive Position und ist sowohl Bestandteil des homodimeren Interface und der N-terminalen alpha-Helix, als auch eine potenzielle Phosphorylierungsstelle. Dabei ist eben dieses Tyrosin an Pos. 28 innerhalb der gesamten Säugetierevolution konserviert. Die N-terminale alpha-Helix trägt zur Stabilisierung des Proteins bei und unterstützt die katalytische Funktion. An den potenziellen Phosphorylierungsstellen können im Rahmen der posttranslationalen Modifizierungen reversibel negativ geladene Phosphatgruppen angehängt werden, wodurch der Ladezustand des Proteins geändert wird und die Proteine im Wechsel der phosphorylierten und dephosphorylierten Form zu funktionellen Schaltern der intrazellulären Signaltransduktion werden. Ob solche Phosphorylierungen auch bei der TNAP eine Rolle spielen, ist bislang nicht genauer beschrieben, wobei die starke evolutionäre Konservierung dieser Aminosäuren dafürspricht, dass sie eine entscheidende Rolle in der Proteinfunktion einnehmen.

Im Vergleich zu den klinisch beobachteten Mutationen, welche in der Datenbank gelistet sind, und unter Berücksichtigung sensitiver Aminosäurepositionen, kann davon ausgegangen werden, dass alle CRISPR/Cas9 induzierten *ALPL*-Mutationen massive Einflüsse auf den klinischen HPP Phänotyp hätten, würden sie im *ALPL*-Gen von Patienten auftreten. Dabei bildet Klon 2.3 unter Berücksichtigung des klinisch gesunden Vaters mit heterozygoter Punktmutation eine Ausnahme. Insgesamt wird die Vorhersage eines HPP Phänotyps auf Basis des Genotyps durch compound-heterozygote Allele und dominant negative Effekte erschwert und macht eine Zuordnung zu einer bestimmten HPP Manifestation ausschließlich anhand der Sequenz nahezu unmöglich.

Punktmutationen stellen die häufigste bei HPP beobachtete Mutation dar, gleichzeitig werden sie bei der hier angewandten CRISPR/Cas9 Methodik sehr selten beobachtet. Es gibt aber durchaus methodische Abwandlungen, mit denen Punktmutationen induziert werden könnten. Zum einen kann über homologe Rekombination ein Reperaturtemplate mit einer bestimmten Sequenz an den Ort des Doppelstrangbruchs eingefügt werden. Zum anderen bietet das sogenannte Base Editing die Möglichkeit, einzelne Basen gezielt zu mutieren. Dabei wird eine katalytisch inaktive Cas9 eingesetzt, die mit einer Deaminase kombiniert ist. Der Ribonukleotidkomplex aus Cas9 und crRNA bindet analog zur beschriebenen Methodik die genomische Zielsequenz, anschließend kommt es jedoch nicht zu einem Doppelstrangbruch, sondern zu einer Deaminierung von Cytosin zu Uracil (Cytosin-Deaminase) oder von Adenin zu Inosin (Adenin-Deaminase). Im Rahmen der DNA-Reparatur wird Uracil durch Thymin und Inosin durch Guanin ersetzt und die komplementäre Base auf dem Gegenstrang zur Korrektur der Basenfehlpaarung ausgetauscht. Dadurch wird das Basenpaar C-G durch A-T ersetzt und umgekehrt (Gaudelli et al., 2017, Komor et al., 2016). Da es zu keinem Doppelstrangbruch kommt ist die Wahrscheinlichkeit ungewünschter Nebenwirkungen beim Base Editing geringer. Das sogenannte Prime Editing ist noch einmal präziser und ermöglicht eine Vielzahl spezifischer DNA-Veränderungen: Statt einer guideRNA wird eine spezielle pegRNA (Prime editing guide RNA) an eine modifizierte Cas9 gebunden, welche lediglich Einzelstrangbrüche induzieren kann. Die pegRNA ist länger als die herkömmliche sgRNA und enthält neben der Zielsequenz noch Informationen über die angestrebte Mutation, welche durch eine

gekoppelte Reverse Transkriptase direkt umgesetzt werden kann. Dabei können sowohl Basenaustausche als auch Insertionen und Deletionen von bis zu 30 Nukleotiden realisiert werden. Die Mutationsrate ist höher, da sie nicht von den zelleigenen Reparaturmechanismen abhängig sind, gleichzeitig werden Off-Target Effekte reduziert, da nur ein Strang geschnitten wird (Anzalone et al., 2019). Mit den drei beschriebenen Methoden könnte also gezielt eine bestimmte Punktmutation auf einem Allel oder gegebenenfalls sogar compound-heterozygote Punktmutationen auf beiden Allelen induziert werden, um einen klinisch manifesten HPP Genotyp *in vitro* nachzuahmen. In diesem Zusammenhang wäre es besonders interessant, Mutationen der verschiedenen klinischen Ausprägungsformen oder verschiedene Zelllinien direkt miteinander zu vergleichen und zu erforschen, warum welcher Genotyp welchen Phänotyp auslöst.

4.1.3. Effekt von Off-Target Mutationen nach CRISPR/Cas9

Neben ethischen Bedenken stellen sogenannte Off-Target Effekte die größte Limitation für den klinischen Einsatz der CRISPR/Cas9 Methode dar, bei denen jenseits der Zielsequenz unkontrolliert Mutationen induziert werden. Auch im Forschungsbereich sind solche Effekte nicht zu vernachlässigen. Der Cleavage Assay basiert auf einer T7 Endonuclease und dient dem Ausschluss von Off-Target Effekten in einem beschränkten Genombereich nahe der Zielsequenz, welcher zuvor mittels PCR vervielfältigt wird. Dabei werden zum einen die nicht verdauten Kontrollen und die Negativkontrollen, die mit einer nicht kodierenden crRNA transfiziert wurden, auf zusätzliche Banden überprüft. Zum anderen müssen die geschnittenen Banden in der verdauten Probe der erwarteten Größe entsprechen. Im vorliegenden Fall traten zumindest im untersuchten Genabschnitt nahe der PAM keine unerwarteten Banden auf, was ein Hinweis auf eine präzise Genveränderung ist. Die Limitation des Cleavage Assay liegt aber einerseits darin, dass wenig frequente Mutationen unter 1 % aufgrund der zu schwachen Banden nicht im Agarosegel visualisiert werden können und andererseits nur die DNA in engem räumlichen Kontext zur Zielsequenz dargestellt wird (Zhang et al., 2015). Zum vollständigen Ausschluss von Off-Target Mutationen müsste eine genomweite Untersuchung auf Doppelstrangbrüche durchgeführt werden. In Chen et al. werden verschiedene genomweite Sequenzierungsmethoden und ihre Vor- und Nachteile gegenübergestellt (Chen et al.,

2020). Die Gemeinsamkeit aller Methoden ist der hohe technische und finanzielle Aufwand. Online Tools zur Vorhersage von Off-Target Effekten wie CRISPOR.org (<http://crispor.org>, aufgerufen am 06.01.2021) bieten zwar eine rein spekulative, allerdings schnelle und kostengünstige Alternative, die basierend auf der Zielsequenz der guideRNA mögliche Off-Target Effekte auflisten (Concordet et al., 2018).

Beide crRNA Konstrukte wurden mit dem Programm CRISPOR auf mögliche Off-Target Effekte untersucht. Neben konkreten Off-Target Genen ermittelt das Programm auch die generelle Spezifität der crRNA, welche auf der Einzigartigkeit einer Sequenz im genomischen Kontext basieren. Der CFD (Cutting Frequency Determination) Spezifitätsscore ist dabei der präziseste Wert und berechnet für beide Konstrukte hohe Spezifitäten von 93 % bei ALPL1 und 96 % bei ALPL2 (Doench et al., 2016, Tycko et al., 2019). Um eine andere genomische Sequenz zu binden, müssen bei ALPL1 mindestens zwei und bei ALPL2 mindestens drei Basenfehlpaarungen der crRNA mit der genomischen Zielsequenz vorliegen. Zur Bindung eines anderen Exons müssen jeweils mindestens drei bis vier Basenfehlpaarungen eingegangen werden.

Das Programm konnte für ALPL1 die folgenden sieben verschiedene Exons identifizieren, bei denen durch drei oder vier Basenfehlpaarungen der crRNA Off-Target Effekte auftreten könnten: WDR59 (WD Repeat Domain 59) ist eine Komponente des GATOR2 Multiproteinkomplexes, welcher den mTOR (mechanistic Target of Rapamycin) Signalweg reguliert (Peng et al., 2017). Der mTOR Signalweg ist ein zentraler Regulator verschiedener zellulärer Prozesse und reguliert neben Proliferation, Differenzierung und Vermehrung auch die Signalkaskade der Immunantwort in Zellen. Eine Inhibition des mTOR Signalwegs in MSC der dentalen Pulpa verhinderte die osteogene Differenzierung der Zellen (Pantovic et al., 2013). CRELD2 (Cysteine-rich with epidermal growth factor-like domains 2) ist ein im Endoplasmatischen Retikulum (ER) lokalisiertes Chaperon, welches zur ER-Stressantwort auf fehlgefaltete Proteine beiträgt. Dabei besteht ein direkter Zusammenhang zwischen CRELD2 und der Knochenentwicklung: Zum einen wird die *CRELD2* Expression während der BMP9 induzierten osteogenen Differenzierung in MSC hochreguliert, zum anderen zeigen *Creld2*-defiziente Mäuse Defekte in der chondroge-

nen und osteogenen Differenzierung mit einer signifikanten Reduktion der *ALPL* Expression und TNAP Aktivität (Dennis et al., 2020, Zhang et al., 2013). *TSSC1* (Tumor Suppression Subtransferable Candidate 1) ist Teil der 11p15.5 Tumor-Suppressor Genregion. Mutationen in dieser Region sind mit verschiedenen Tumorerkrankungen wie dem Wilms Tumor, dem Rhabdomyosarkom, dem Adrenokortikalen Karzinom sowie Lungen-, Ovarial- und Brustkrebs assoziiert (Hu et al., 1997). *WDR1* (WD repeat domain 1) induziert den Abbau von Aktinfilamenten und beeinflusst dadurch das Zytosekelett. Eine Mutation des *WDR1* Gens führte in einem Patientenfall zu einer Autoimmunerkrankung mit starkem Fieber, Immundefizienz und Thrombozytopenie (Standing et al., 2017). Das Gen *NCOR2* (Nuclear Receptor Corepressor 2) reguliert die Genexpression über die Aktivierung einer Histon Deacetylase. *NCOR2*-defiziente Knock-out Mäuse und Patienten mit *NCOR2* Mutationen zeigen neurologische Entwicklungsstörungen (Zhou et al., 2019). Das Gen *RNF168* (Ring Finger Protein 168) kodiert für eine E3 Ubiquitin Ligase, welche eine wichtige Rolle in der Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen spielt: *RNF168* akkumuliert am Doppelstrangbruch und ubiquitiniert gemeinsam mit *RNF8* (Ring Finger Protein 8) die Histonproteine H2A und H2AX (Mattioli et al., 2012). Diese Ubiquitinierung löst Signalwege zur Rekrutierung weiterer Faktoren der Doppelstrangreparatur wie 53BP1 (P53 Binding Protein 1) und BRCA1 (Breast Cancer 1) aus. Eine Off-Target Mutation des *RNF168* Gens könnte also eine plausible Erklärung für defiziente DNA-Reparaturen im Rahmen von CRISPR/Cas9 Experimenten sein, eine Erklärung für die im Wildtyp beobachtete geringere TNAP Aktivität lässt sich dadurch jedoch nicht ableiten. *TRIM42* (Tripartite Motif 42) gehört zu einer Proteinfamilie, deren Mitglieder ebenfalls für Ubiquitin E3 Ligasen kodieren und an zahlreichen zellulären Prozessen und Signalkaskaden beteiligt sind. Dabei ist die genaue Rolle von *Trim42* bislang nicht beschrieben (Hatakeyama, 2017).

Für *ALPL2* identifizierte CRISPR fünf verschiedenen Exons, in denen durch mindestens drei fehlerhafte Basenpaarungen Off-Target Effekte auftreten könnten. Dabei handelt es sich um die folgenden Gene: *ABCC8* (ATP binding cassette subfamily C member 8) kodiert für einen Modulator der ATP-sensitiven Kaliumkanäle und der Insulinfreisetzung.

Mutationen von *ABCC8* können zu kongenitalem Hyperinsulinismus und insulinunabhängigem Diabetes Typ II führen (Demirbilek et al., 2017). Eine Mutation des *C15Orf41* (Chromosom 15 Open Reading Frame 41) Gens löst eine kongenitale Dyserythropoetische Anämie aus, eine seltene Bluterkrankung, die durch makrozytäre Anämie und Hepatomegalie gekennzeichnet ist (Shroff et al., 2020). Das Gen *HBEGF* (Heparin Binding EGF like growth factor) kodiert für einen Faktor, der an der Wundheilung, Angiogenese und Adipogenese beteiligt ist und kann bei Mutationen kanzerogen wirken (Taylor et al., 2014). *C3orf30* (Chromosom 3 Open Reading Frame 30) wird in den männlichen Keimzellen exprimiert und steuert die Spermatogenese (Yu et al., 2009). PTPRE (Protein Tyrosin Phosphatase Receptor Typ E) wirkt als Antagonist zu Tyrosinkinase in der posttranslationalen Modifikation und dephosphoryliert Tyrosin (Liang et al., 2019). Auch wenn PTPRE und TNAP beide Dephosphorylierungen katalysieren, unterscheiden sie sich bezüglich ihrer Expression, ihrer zellulären Funktion der Substrate so deutlich, dass kein direkter Vergleich gezogen werden kann.

In den vergleichenden Experimenten wurde ein Wildtyp Klon verwendet, welcher zuvor mit dem *ALPL2* Konstrukt transferiert worden war. Da keines der möglichen Off-Target Gene von *ALPL2* in direkten Zusammenhang mit der TNAP, einem TNAP Antagonisten oder der osteogenen Differenzierung gebracht werden kann, stellen Off-Target Effekte keine direkte Erklärung für die reduzierte Wildtyp Aktivität dar. Gleichzeitig bleiben Off-Target Effekte bei den mit *ALPL1* transfizierten Klonen natürlich nicht ausgeschlossen. Dabei wäre insbesondere eine genauere Analyse von *WDR59* und *CRELD2* von Interesse, welche beide direkt oder indirekt im Zusammenhang mit der osteogenen Differenzierung stehen. Eine Mutation in einem der beiden Gene könnte neben der *ALPL* Mutation in den Klonen 1.1, 1.2, 1.3 und 1.5 ebenfalls eine Erklärung für die beschränkte osteogene Differenzierung liefern.

Um Off-Target Effekte endgültig auszuschließen müsste dementsprechend eine Sequenzierung aller genannten Gene erfolgen. Als Alternative könnte ein Cleavage Assay nach Amplifizierung der Gene ebenfalls Aufschluss über mögliche Off-Target Mutationen geben, wobei die oben genannten Limitationen des beschränkten Genabschnitts und der geringen Sensitivität bestehen blieben.

4.1.4. Die Rolle von p53 bei der CRISPR/Cas9 vermittelten Genveränderung und der osteogenen Differenzierung

Die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse zeigen einen deutlichen Unterschied zwischen den nicht gecrisperten hTERT PDL Zellen und den hTERT PDL Wildtyp Zellen, die nach der Transfektion keine Mutation aufgewiesen haben. So war die *ALPL* Expression, die TNAP Aktivität und auch die Zahl TNAP positiver gefärbter Zellen basal und während der osteogenen Differenzierung in den Wildtyp Zellen signifikant reduziert.

Ein Gen, das zunehmend mit unerwünschten Nebenwirkungen von CRISPR/Cas9 induzierten Doppelstrangbrüchen in Verbindung gebracht wird, ist das Tumorsuppressorgen *TP53*, welches für das Protein p53 kodiert. P53 wirkt als Transkriptionsfaktor und reguliert DNA-Reparatur, Apoptose und den Zellzyklus. Die große medizinische Relevanz liegt darin, dass *TP53* das häufigste mutierte Gen in menschlichen Tumoren ist (Ko et al., 1996, Vogelstein et al., 2000). P53 spielt zudem eine wichtige Rolle im Rahmen der osteogenen Differenzierung von Osteoblasten und wirkt als negativer Regulator der Osteoblastogenese, indem es die Expression von *Osterix*, einem wichtigen Transkriptionsfaktor für die frühe osteogene Differenzierung, unterdrückt. *TP53* defiziente Mäuse zeigen eine hypertrophe Knochenformation im Sinne eines osteosklerotischen Phänotyps und *TP53* defiziente Osteoblasten weisen eine gesteigerte Proliferation und Differenzierungskapazität in Zellkulturexperimenten auf (Molchadsky et al., 2008, Wang et al., 2006).

In Bezug auf CRISPR/Cas9 rückt p53 zunehmend in das Forschungsinteresse. Haapaniemi et al. und Ihry et al. konnten zeitgleich und unabhängig voneinander zeigen, dass Cas9-induzierte Doppelstrangbrüche zu einem p53 abhängigen Zellzyklusarrest und gesteigertem Zelltod führen. Gleichzeitig führte die Unterdrückung des p53 Signalwegs zu einer höheren Effizienz der genetischen Modifizierung und einer geringeren Zelltoxizität nach CRISPR/Cas9. Dabei war es nicht von Bedeutung, ob die untersuchten Zellen die Cas9 stabil exprimierten oder mit einem Ribonukleotidkomplex aus guideRNA und Cas9 transfiziert worden waren (Haapaniemi et al., 2018, Ihry et al., 2018). Neben Off-Target Effekten ergibt sich aus der mutmaßlichen Onkogenaktivierung also eine weitere enorme Hürde in der klinischen Anwendbarkeit der CRISPR/Cas9 Methode.

In Bezug auf die vorliegende Arbeit kann die Aktivierung des p53 Signalwegs durch Cas9 induzierte Doppelstrangbrüche eine Erklärung für die initial stagnierte Zellproliferation der transfizierten Proben bis zur Ernte an Tag 2 und in den anschließenden Einzelzellkulturen zur monoklonalen Selektion liefern. Die negative Auswirkung der Transfektion auf das Wachstumsverhalten war bei den ALPL1, ALPL2 und CDK4 Proben dabei vermeintlich stärker als in der Negativkontrolle mit einer nicht-kodierenden crRNA (S. Abb. 7). Ein langfristig wachstumshemmender Effekt konnte im Vergleich zu den nicht gecrisperten hTERT PDL Zellen jedoch nicht festgestellt werden (S. 3.2.1.). Eine durch CRISPR/Cas9 provozierte Aktivierung des p53 Signalwegs liefert gleichzeitig eine mögliche Erklärung für die geringere *ALPL* Expression und TNAP Aktivität in der Wildtyp Zelllinie, bei der möglicherweise ursprünglich ein Doppelstrangbruch vorlag, der korrekt repariert wurde. Die erhöhte p53 Aktivität könnte über eine *Osterix* Suppression jegliche mineralisierungsassoziierten Prozesse unterdrücken und eine Erklärung für den Phänotyp des Wildtypen im Vergleich mit den nicht gecrisperten hTERT PDL Zellen liefern (Wang et al., 2006).

Um die Ursache der niedrigeren *ALPL* Expression in der Wildtyp Zelllinie zu klären, könnten also Sequenzierungen der möglichen Off-Target Gene sowie eine Analyse der p53 Aktivität und *Osterix* Expression im Vergleich mit den nicht gecrisperten hTERT PDL Zellen durchgeführt werden. Zusätzlich könnten weitere Klone mit dem Wildtyp Genotyp untersucht werden, bei denen gegebenenfalls keine oder auch andere Faktoren die TNAP Aktivität positiv oder negativ beeinflussen.

4.2. Osteogenes Differenzierungspotential der hTERT PDL Zelllinie

Entgegen der Publikation von Docheva et al. wiesen die hTERT PDL Zellen in den Vorversuchen und den späteren Vergleichen ein grundsätzlich limitiertes Potential der osteogenen Differenzierung auf, obwohl die in diesem Projekt eingesetzten Zellen freundlicherweise direkt von dieser Arbeitsgruppe übernommen werden konnten. Weder die Expression von *ALPL* oder *Runx2* noch die Alizarinfärbung oder das von Loebel et al. beschriebene *Runx2/Sox9* Verhältnis wurden durch die osteogene Differenzierung signifikant beeinflusst (Loebel et al., 2015). Dem gegenüber wurde die TNAP Aktivität im CSPD

Assay und der TNAP Färbung durch die Differenzierung signifikant gesteigert. Möglicherweise befanden sich die hTERT PDL Zellen in dieser Arbeit bereits in einer zu hohen Passage und konnten, trotz ihrer Immortalisierung, ihre Stammzeleigenschaften und das Differenzierungspotenzial nicht mehr vollends nutzen.

B3Galt2 und *C5AR1* gelten als Marker der frühen osteogenen Differenzierung (van de Peppel et al., 2017), dabei ist bei beiden die physiologische Rolle während der Differenzierung unbekannt. *C5AR1* ist ein G-Protein gebundener Rezeptor für C5a und Teil des Komplementsystems. Über die Bindung von C5a werden Zytokine ausgeschüttet und inflammatorische Prozesse im Rahmen der angeborenen Immunantwort reguliert. *In vivo* Experimente an einem Frakturmodell bei Ratten konnten eine gesteigerte *C5AR1* Expression und Funktion während Knochenheilungsprozessen in Osteoblasten, Osteoklasten und Chondroblasten artigen Zellen nachweisen (Ignatius et al., 2011). Darüber hinaus fördert *C5AR1* während der Knochenheilung die Migration von mesenchymalen Stammzellen an den Ort der Verletzung (Schraufstatter et al., 2009). Aber auch *in vitro* wird die *C5AR1* Expression während der osteogenen Differenzierung gesteigert und die Inhibition von *C5AR1* führt zu einer eingeschränkten osteogenen Differenzierung (Ignatius et al., 2011, Kalbasi Anaraki et al., 2014). Während der *in vivo* Zusammenhang zwischen dem Komplementsystem und Knochenheilungsprozessen vielfach belegt und durchaus nachvollziehbar ist, bleibt fraglich, inwieweit *in vitro* Untersuchungen der Komplementaktivierung in einem wie in dieser Arbeit verwendeten einzelnen isolierten Zellsystem ohne proinflammatorische Reize sinnvoll sind. Eine Gemeinsamkeit aller Studien, die *in vitro* eine gesteigerte *C5AR1* Genexpression nach osteogener Differenzierung nachgewiesen haben, ist die Kultivierung der Zellen mit 100 nM Dexamethason. Dabei aktiviert Dexamethason über FHL2 (Four and a half LIM Domain Protein 2) die WNT/ β -Catenin abhängige Expression von *Runx2* und ermöglicht die osteogene Differenzierung (Hamidouche et al., 2008). Dexamethason gehört zu der Arzneimittelgruppe der Glucocorticoide, wirkt entzündungshemmend und immunsuppressiv und wird beispielsweise bei schwerem Asthma bronchiale oder diversen Hauterkrankungen verabreicht. Gegebenenfalls kann die immunmodulierende Wirkung von Dexamethason also eine Erklärung für die Hochregulation von *C5AR1* und dem Komplementsystem unter

sterilen *in vitro* Kulturbedingungen liefern. Damit wäre die gesteigerte *C5AR1* Expression *in vitro* weniger der tatsächlichen osteogenen Differenzierung der hTERT PDL Zellen und der TNAP-defizienten Klone, als vielmehr einem methodisch bedingten Nebeneffekt zuzuschreiben.

B3Galt2 kodiert für eine β -1,3 Galaktosidyltransferase und katalysiert den Transport von UDP-Galaktose, welche im Golgi-Apparat für die Synthese von Glykosaminglykanen (GAGs), linearen Polysacchariden mit repetitiven Dissaccharid-Einheiten, benötigt wird. GAGs bilden wiederum die Seitenketten von Proteoglykanen, welche als stark glykosylierte Glykoproteine einen Hauptbestandteil der Extrazellulärmatrix (ECM) tierischer Zellen bilden. Sie fungieren als Korezeptoren für Wachstumsfaktoren wie FGF, BMP2 (Bone Morphogenetic Protein 2) oder DMP1 (Dentin Matrix Acidic Phosphoprotein 1) und werden in der osteogenen Differenzierung benötigt, um die Bindung der Zytokine an die Oberflächenrezeptoren der Zelle zu ermöglichen. Fukunishi et al. konnten *in vitro* zeigen, dass die osteogene Differenzierung prä-osteoblastischer Zellen unter Zusatz von BMP2 zu einer signifikant gesteigerten GAG Sekretion führte (Fukunishi et al., 2018). Die gesteigerte *B3Galt2* Expression im Rahmen der osteogenen Differenzierung ist vor diesem Hintergrund also durchaus plausibel zu erklären. Um genauer einzuschätzen, in welchem Zusammenhang *B3Galt2* mit der Ausbildung der ECM steht, wäre es von Interesse, die Expression matrixspezifischer Proteine zu analysieren. Dabei liegt ein Fokus auf der Expression und Funktion von Kollagen, welches neben seiner Aufgabe als Hauptbestandteil der ECM als bindegewebige Verankerung zwischen dem Zement und dem Alveolarknochen den Zahn befestigt und bei der Entstehung dentaler Symptome der Hypophosphatasie nicht unberücksichtigt bleiben darf. Während die *B3Galt2* Expression in den hTERT PDL Proben sowie Klon 1.3 und 1.5 im zeitlichen Verlauf der osteogenen Differenzierung signifikant gesteigert wurde, ging diese Expressionszunahme bei 1.1, 1.2, 2.3 und dem Wildtyp verloren. Sollte sich in der Expressionsanalyse von Kollagen ein ähnliches Muster zeigen, könnte zum einen eine plausible Verbindung zwischen der ECM und *B3Galt2* hergestellt werden, zum anderen wäre dies ein Hinweis auf eine unterschiedliche Auswirkung der verschiedenen Mutationen auf die Ausbildung der ECM.

Ohne weitergehende Experimente lassen sich nur anhand der *B3Galt2* Expression daraus jedoch keine eindeutigen Rückschlüsse ziehen.

4.3. Einordnung der Klone als *in vitro* Modelle dentaler Aspekte der HPP

Der ausführlichste Vergleich der verschiedenen mutierten Klone mit dem nicht mutierten Wildtyp und den nicht gecrisperten hTERT PDL Zellen fand im Zuge der osteogenen Differenzierung statt. Dabei wurden die Zellen bezüglich ihrer Genexpression und TNAP-Aktivität untersucht und eine TNAP- und Alizarinfärbung durchgeführt. Die Tag 0 Ergebnisse der qPCR und des CSPD Assay sowie die Kontrollgruppen der Färbung erlauben zusätzlich einen basalen Vergleich der Klone.

Die homozygote Deletion von Klon 1.1 bewirkt einen funktionellen TNAP Knockout

Von allen untersuchten Klonen hat die homozygote Deletion in Klon 1.1 die größte Auswirkung auf die TNAP Funktion. Die *ALPL* Expression ist in 1.1 basal im Vergleich zu den nicht gecrisperten hTERT PDL Zellen signifikant reduziert und auch im CSPD Assay zeigt Klon 1.1 die mit Abstand geringste und kaum messbare Aktivität. Beide Werte werden durch die osteogene Differenzierung nicht beeinflusst. Besonders eindrucksvoll ist der funktionelle TNAP Knockout von Klon 1.1 in der TNAP Färbung, bei der keine einzelne Zelle TNAP positiv gefärbt wird.

Zwar konnten in keiner der Proben bei der Alizarinfärbung Calciumphosphatablagerungen festgestellt werden, jedoch war Klon 1.1 die einzige Zelllinie, bei der die osteogene Differenzierung kein Ablösen des Zellrasens von der Kulturoberfläche bewirkte. Einzig die *C5AR1* Expression wird analog zu den anderen Klonen durch die osteogene Differenzierung hochreguliert. Da alle weiteren verlässlichen Nachweise der Differenzierung, insbesondere die TNAP Färbung und Aktivitätsmessung, bei Klon 1.1 durch die osteogene Differenzierung nicht verändert wurden, muss die Bedeutung der *C5AR1* Hochregulation abermals in Frage gestellt werden (S. 4.2.). Mit einer vergleichenden Genexpressionsanalyse nach alleiniger Stimulation mit Dexamethason ohne Ascorbinsäure und β -Glycerophosphat könnte untersucht werden, ob die *C5AR1* Expression allein durch Dexamethason hochreguliert wird.

Die heterozygoten Deletionen bei 1.2, 1.3 und 1.5 resultieren in einem ähnlichen Phänotyp

Im deutlichen Kontrast zu Klon 1.1 stehen die drei heterozygoten Deletionen 1.2, 1.3 und 1.5. Alle drei weisen eine vergleichbare Restaktivität der TNAP im CSPD Assay und der Färbung auf. Dass es sich bei 1.2, 1.3 und 1.5 um echte heterozygote Mutationen und nicht um Mischkulturen einer homozygoten Mutation mit dem Wildtyp handelt wird in der TNAP Färbung ersichtlich: Im Falle einer Mischkultur lägen in den Kontrollen etwa halb so viele TNAP positive Zellen wie in der Wildtypkontrolle vor. Tatsächlich zeigen sich aber nur einzelne TNAP positive Zellen bei den heterozygoten Klonen. Die osteogene Differenzierung wirkt sich bei den drei Klonen leicht unterschiedlich aus. Während die TNAP Aktivität in Klon 1.2 und 1.5 signifikant gesteigert wird, sinkt die *ALPL* Expression in den genannten Klonen durch die Differenzierung signifikant. Bei Klon 1.3 ist weder im *ALPL* Expressionslevel noch der Aktivität der TNAP ein signifikanter Unterschied erkennbar, dabei zeigt 1.3 verglichen mit 1.2 und 1.5 die höchste Ablösung des Zellrasens in der Alizarinfärbung. Die *B3Galt2* Expression als mögliches Zeichen der Ausbildung der extrazellulären Matrix wird in 1.3 und 1.5 analog zu den nicht gecrisperten hTERT PDL Zellen signifikant gesteigert. Bei keinem der Klone nimmt die Zahl TNAP positiver Zellen durch die osteogene Differenzierung sichtbar zu. Insgesamt haben alle heterozygoten Deletionen eine deutliche Auswirkung auf die absolute TNAP Aktivität und *ALPL* Expression mit einer höheren Restaktivität als Klon 1.1. Der Vergleich der CRISPR-Mutationen mit den Mutationen der Datenbank hatte ergeben, dass bei heterozygoten Deletionen wie in 1.2, 1.3 und 1.5 vermeintlich schwere Ausprägungsformen der HPP auftreten. Auch wenn sich die *in vitro* Restaktivität nicht direkt mit der HPP Klassifikation in Verbindung setzen lässt, unterstreichen die Ergebnisse dennoch die fatalen Auswirkungen kleiner heterozygoter Deletionen im *ALPL* Gen.

Der punktmutierte Klon 2.3 verhält sich ähnlich dem Wildtyp

Zwar zeigte der punktmutierte Klon 2.3 in den Vorversuchen eine deutlich gesteigerte *ALPL* Expression und TNAP Aktivität, diese ging jedoch nach einigen Passagen in Kultur verloren und näherte sich der des nicht mutierten Wildtyp an. Auch bezüglich der TNAP Färbung zeigten beide ein ähnliches Muster: Es waren zwar basal weniger TNAP positive Zellen als in den nicht gecrisperten hTERT PDL Proben nachweisbar, nichtsdestotrotz nahm die Zahl TNAP positiver Zellen durch die osteogene Differenzierung in beiden Proben zu. Für Klon 2.3 trifft dies auch im CSPD Assay zu, wohingegen der Wildtyp keine signifikante Zunahme der TNAP Aktivität durch die osteogene Differenzierung aufwies. Insgesamt verhalten sich beide Proben in Abgrenzung gegenüber den Klonen mit Deletionen und den nicht gecrisperten hTERT PDL Zellen ähnlich. Wie oben beschrieben, wurde die in Klon 2.3 gefundene Punktmutation erst als compound-heterozygote Mutation klinisch manifest, wohingegen der Vater mit heterozygoter Punktmutation keine Symptome zeigt (Yang et al., 2013). Es ist also plausibel, dass die Punktmutation in Klon 2.3 als stille Mutation keine direkte Auswirkung auf den Phänotyp hat und die reduzierte TNAP Aktivität beider Proben eher auf Off-Target Effekte oder gegebenenfalls die p53 Aktivität zurückzuführen ist (S. 4.1.3 und 4.1.4.).

Die mutierten Zelllinien zeigen vielversprechende Ansätze, um als *in vitro Modelle* für dentale Aspekte der Hypophosphatasie genutzt zu werden. Dabei ist insbesondere Klon 1.1 mit dem funktionellen TNAP Knockout hervorzuheben, welcher die elementare Rolle von TNAP in der osteogenen Differenzierung unterstreicht. Die heterozygot deletierten Klone 1.2, 1.3 und 1.5 können bezüglich des Ausmaßes des TNAP Knockouts nicht genau unterschieden werden und zeigen alle einen in gewisser Weise ähnlichen Phänotyp. Dementsprechend bleibt Klon 1.2 aufgrund derselben heterozygoten Mutation wie Klon 1.1 als Vergleichszelllinie für weiterführende Experimente von Interesse.

5. Ausblick

Nach der Etablierung von Zelllinie 1.1 als *in vitro* Modell ergeben sich vielseitige Ansätze, um die Pathogenese der dentalen Aspekte der HPP weitergehend zu erforschen. Eine Richtung ist dabei die Untersuchung der Zementogenese im Vergleich mit den unmutierten hTERT PDL Zellen. Die Kollagenfasern aus dem PDL inserieren in den azellulären Zement auf der Wurzeloberfläche und verankern den Zahn in der Alveole. Vorzeitig exfoliierte Milchzähne von HPP Patienten weisen keinen azellulären Zement auf der Wurzeloberfläche auf (van den Bos et al., 2005, Zweifler et al., 2015). Analog zu anderen mineralisierten Geweben wirkt PPI auch in der Zementogenese inhibierend auf die Hydroxylapatitsynthese und wird durch das Zusammenspiel von TNAP, ANK und ENPP1 reguliert (Foster et al., 2013). Unter physiologischen Bedingungen wird zu Beginn der Zementogenese zunächst die TNAP exprimiert und dadurch eine PPI-arme, mineralisationsfördernde Umgebung geschaffen. Die Expression der *ENPP1* setzt später ein und verhindert eine übermäßige Hydroxylapatitbildung (Zweifler et al., 2015). Durch die Bildung des azellulären Zements wird die Expression von *OPN* und *DMP1* gesteigert, welche beide als Matrixproteine in die ECM sezerniert werden und dort die Mineralisation regulieren (Foster et al., 2013). Salmon et al. konnte in einer *in vivo* Studie zur experimentell induzierten Zementogenese an Mäusen 24 Proteine identifizieren, die in der Zementogenese verstärkt aktiv sind. Dazu gehören BSP (Bone Sialoprotein), OPN, DMP1, Col11A1 (Kollagen Typ 11 alpha 1), SPARC (Osteonectin), ASPN (Asporin) und FMOD (Fibromodulin) (Salmon et al., 2016). Eine Analyse dieser Gene während der Differenzierung der TNAP defizienten Zelllinie 1.1 könnte Aufschluss auf die Pathophysiologie der ausbleibenden Zementogenese bei der Odonto-HPP geben.

Auch wenn sich keine signifikanten Unterschiede in der *P2X7* Expression zwischen den Klonen und den Kontrollproben zeigten, war dennoch ein Trend der verstärkten *P2X7* Expression in dem *in vitro* HPP Modell des Klons 1.1 erkennbar. In der Dissertation von Dr. Hannah Melms konnte *P2X7* als wichtiges Kandidatengen des *in vitro* HPP Modells identifiziert werden, welches nach Levamisol-Stimulation in Stammzellen des parodontalen Ligaments (PDLSC) verstärkt exprimiert wurde (Melms et al., 2020). Der Zusammenhang zwischen der gesteigerten Expression des proinflammatorischen *P2X7* bei

TNAP Inhibition und der erhöhten TNAP Aktivität im Rahmen von pulpalen und parodontalen Entzündungsreaktionen (Aslantas et al., 2016, Binderman et al., 2017, Spoto et al., 2001) könnte zur Erklärung der Parodontitis bei HPP Patienten beitragen und sollte im Kontext der dentalen Aspekte der HPP weiterverfolgt werden.

Parathormon ist ein zentrales Hormon des Kalziumstoffwechsels und des physiologischen Knochenumbaus. Im dentalen Kontext führte ein Parathormonexzess zum einen zum beschleunigten Knochenabbau bei einer manifesten Parodontitis, zum anderen wurden Mutationen am PTH-Rezeptor in Zusammenhang mit der Diagnose der Primären Eruptionsstörung gebracht (Barros et al., 2003, Kim et al., 2018, Stellzig-Eisenhauer et al., 2010). Im Zellkulturmodell einer murinen Osteoblastenzelllinie und isolierter PDLSC wurde die *ALPL* Expression nach einer bis 48 Stunden kontinuierlicher PTH Stimulation signifikant gesteigert (Houston et al., 2016, Wolf et al., 2013). Zwar zeigte sich nach Stimulation der hTERT PDL Zelllinie und der Klone mit PTH kein eindeutiger Trend bezüglich der *ALPL* und *Phospho-1* Genexpression, dennoch sind weiterführende Experimente basierend auf den vielversprechenden Vorversuchen geplant. Unter Berücksichtigung des limitierten Differenzierungspotentials der hTERT PDL Zelllinie in der vorliegenden Arbeit könnte in Betracht gezogen werden, die PTH Stimulation zunächst methodisch in einer Osteoblastenzelllinie oder primär isolierten PDLSC zu etablieren und anschließend auf die hier verwendeten Zelllinien zu übertragen. Neben der gesteigerten *ALPL* Expression wurde auch eine differenzierungshemmende Wirkung von PTH in Osteoblasten beschrieben (Bellows et al., 1990, van der Horst et al., 2005). Isogai et al. postulierten eine vom Differenzierungsstadium und der Konfluenz abhängige positive oder negative Wirkung von PTH auf differenzierende Osteoblasten (Isogai et al., 1996). Um die differenzierungshemmende Wirkung von PTH auf die Zellkultur zu reduzieren, wurden die hTERT PDL Zellen vor der PTH Stimulation für drei Tage osteogen differenziert und vor der PTH Stimulation ein Mediumwechsel durchgeführt. Die Spanne von drei Tagen wurde gewählt, da sich in den Vorversuchen der osteogenen Differenzierung der hTERT PDL Zellen die höchste *ALPL* Expression und TNAP Aktivität an Tag 3 zeigten. Gegebenenfalls wirkt sich eine längere initiale Differenzierungsdauer positiv auf die Ergebnisse der PTH

Versuche aus. Auch ist bei kürzeren Stimulationszeiten nicht zwingend ein Mediumwechsel vor der PTH Stimulation nötig, welcher seinerseits Einfluss auf die Genexpression nehmen kann. Nach bisherigem Kenntnisstand könnte sich PTH als interessantes Zielmolekül der parodontalen Regeneration und gegebenenfalls als Therapeutikum von Parodontalerkrankungen und der dentalen Symptome von HPP entwickeln.

Ein besonders interessanter Ansatz stellt die vergleichende Analyse der *in vitro* generierten Zelllinien mit PDLSC von Patienten, welche von Odonto-HPP betroffen sind, dar. Dabei könnten zum einen exfoliierte Milchzähne, als auch retinierte und noch nicht durchgebrochene Weisheitszähne zu Verwendung kommen. Exfoliierte Milchzähne haben dabei den Vorteil der einfacheren Zugänglichkeit, durch den bestehenden Kontakt zur Mundhöhle und die zusätzliche höhere Kariesanfälligkeit bei einer Mineralisationsstörung des Schmelzes oder Dentins besteht aber die vergleichsweise höhere Gefahr einer Kontaminierung bei der Isolation der dentalen Stammzellen. Im Rahmen dieser Arbeit war ein solcher Vergleich aufgrund der Seltenheit der Erkrankung und der schwierigen zeitlichen Abpassung des meist unvorhergesehenen Zahnausfalls nicht möglich. Li et al. isolierten und kultivierten pulpale Stammzellen aus exfoliierten Milchzähnen von HPP Patienten und konnten eine geringere *ALPL* Expression verglichen mit der gesunden Kontrollgruppe feststellen (Li et al., 2009). Ein ähnlicher Vergleich zwischen Stammzellen des parodontalen Ligaments von HPP Patienten mit gesunden Kontrollgruppen und der hier etablierten Zelllinie könnte die beobachteten Effekte in der Zelllinie besser in den Kontext der HPP einordnen.

Zusammenfassung

Die Hypophosphatasie ist eine seltene Erberkrankung, welche durch compound-heterozygote oder dominant negative heterozygote Mutationen des *ALPL* Gens zu einem Funktionsverlust der gewebeunspezifischen Alkalischen Phosphatase (TNAP) führt. Die daraus resultierenden Mineralisierungsstörungen betreffen sowohl den Knochen als auch in milderer Ausprägungsform die Zähne und den Zahnhalteapparat. Das zahnmedizinische Leitsymptom und in vielen Fällen das erste Anzeichen der HPP ist dabei der vorzeitige Verlust der Milchzähne ohne physiologische Wurzelresorption. Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene TNAP defiziente immortalisierte Zellen des parodontalen Ligaments (PDL) mittels der CRISPR/Cas9 Methode generiert und anschließend fünf Zelllinien charakterisiert. Die dabei entstandenen Mutationen variierten von einer moderaten heterozygoten Punktmutation zu einer schwerwiegenden homozygoten Deletion eines einzelnen Nukleotids, welche in einem vorzeitigen Stopcodon resultierte. Analysen der *ALPL* Expression (qPCR), TNAP Aktivitätsmessungen (CSPD Assay) und TNAP Färbungen zeigten einen signifikanten Rückgang in allen TNAP-defizienten Zelllinien mit einer starken Korrelation zwischen der Restaktivität und dem Ausmaß der Mutation, welche in Einklang mit der komplexen Genotyp-Phänotyp Korrelation bei HPP zu bringen ist. Das Potential der osteogenen Differenzierung der hTERT PDL Zellen wurde in der homozygot mutierten Zelllinie komplett unterdrückt. Mögliche Mechanismen des vorzeitigen Zahnverlustes bei HPP Patienten ist die geminderte Formation und Mineralisation des Wurzelzements und die fehlerhafte Insertion der parodontalen Fasern. Die hier erstmalig etablierten Zellkulturmodelle liefern ein valides spenderunabhängiges *in vitro* Modell der HPP, welches dazu beitragen kann, die molekularbiologischen Zusammenhänge der dentalen Aspekte der Hypophosphatasie zu ergründen und daraus gegebenenfalls neue Therapieansätze abzuleiten.

Literaturverzeichnis

- Aeby, M., Wyss, T., Mentrup, B., Kunstmann, E., Jakob, F. & Aeberli, D. 2016. Low-energy trauma-induced intercondylar femoral fracture. *Clin Cases Miner Bone Metab*, 13, 151-53.
- Allen, F., Crepaldi, L., Alsinet, C., Strong, A. J., Kleshchevnikov, V., De Angeli, P., Páleníková, P., Khodak, A., Kiselev, V., Kosicki, M., Bassett, A. R., Harding, H., Galanty, Y., Muñoz-Martínez, F., Metzakopian, E., Jackson, S. P. & Parts, L. 2019. Predicting the mutations generated by repair of Cas9-induced double-strand breaks. *Nature Biotechnology*, 37, 64-72.
- Anderson, H. C., Hsu, H. H., Morris, D. C., Fedde, K. N. & Whyte, M. P. 1997. Matrix vesicles in osteomalacic hypophosphatasia bone contain apatite-like mineral crystals. *Am J Pathol*, 151, 1555-61.
- Anzalone, A. V., Randolph, P. B., Davis, J. R., Sousa, A. A., Koblan, L. W., Levy, J. M., Chen, P. J., Wilson, C., Newby, G. A., Raguram, A. & Liu, D. R. 2019. Search-and-replace genome editing without double-strand breaks or donor DNA. *Nature*, 576, 149-57.
- Aslantas, E. E., Buzoglu, H. D., Karapinar, S. P., Cehreli, Z. C., Muftuoglu, S., Atilla, P. & Aksoy, Y. 2016. Age-related Changes in the Alkaline Phosphatase Activity of Healthy and Inflamed Human Dental Pulp. *J Endod*, 42, 131-4.
- Baab, D. A., Page, R. C., Ebersole, J. L., Williams, B. L. & Scott, C. R. 1986. Laboratory studies of a family manifesting premature exfoliation of deciduous teeth. *J Clin Periodontol*, 13, 677-83.
- Barrangou, R., Fremaux, C., Deveau, H., Richards, M., Boyaval, P., Moineau, S., Romero, D. A. & Horvath, P. 2007. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science*, 315, 1709-12.
- 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.
- 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.
- Baxter, P. 2003. Pyridoxine-dependent seizures: a clinical and biochemical conundrum. *Biochim Biophys Acta*, 1647, 36-41.
- Beck, C., Stenzel, M., Schneider, P. & Girschick, H. 2009. Hypophosphatasie - aktuelle Diagnostik und Therapie. *Journal für Mineralstoffwechsel & Muskuloskelettale Erkrankungen*, 16 (3), 116-22.
- Bellows, C. G., Ishida, H., Aubin, J. E. & Heersche, J. N. M. 1990. Parathyroid Hormone Reversibly Suppresses the Differentiation of Osteoprogenitor Cells into Functional Osteoblasts*. *Endocrinology*, 127, 3111-16.
- Binderman, I., Gadban, N. & Yaffe, A. 2017. Extracellular ATP is a key modulator of alveolar bone loss in periodontitis. *Arch Oral Biol*, 81, 131-35.
- Briot, K. & Roux, C. 2017. Adult hypophosphatasia. *Archives de Pédiatrie*, 24, 5S71-5S73.
- Buchet, R., Millan, J. L. & Magne, D. 2013. Multisystemic functions of alkaline phosphatases. *Methods Mol Biol*, 1053, 27-51.
- Chen, S., Yao, Y., Zhang, Y. & Fan, G. 2020. CRISPR system: Discovery, development and off-target detection. *Cell Signal*, 70, 109577.
- Chu, E. Y., Vo, T. D., Chavez, M. B., Nagasaki, A., Mertz, E. L., Nociti, F. H., Aitken, S. F., Kavanagh, D., Zimmerman, K., Li, X., Stabach, P. R., Braddock, D. T., Millán, J. L., Foster, B. L. &

- Somerman, M. J. 2020. Genetic and pharmacologic modulation of cementogenesis via pyrophosphate regulators. *Bone*, 136, 115329.
- Concordet, J.-P. & Haeussler, M. 2018. CRISPOR: intuitive guide selection for CRISPR/Cas9 genome editing experiments and screens. *Nucleic Acids Research*, 46, W242-W45.
- 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.
- Dahl, R., Sergienko, E. A., Su, Y., Mostofi, Y. S., Yang, L., Simao, A. M., Narisawa, S., Brown, B., Mangravita-Novo, A., Vicchiarelli, M., Smith, L. H., O'Neill, W. C., Millán, J. L. & Cosford, N. D. 2009. Discovery and validation of a series of aryl sulfonamides as selective inhibitors of tissue-nonspecific alkaline phosphatase (TNAP). *J Med Chem*, 52, 6919-25.
- Deltcheva, E., Chylinski, K., Sharma, C. M., Gonzales, K., Chao, Y., Pirzada, Z. A., Eckert, M. R., Vogel, J. & Charpentier, E. 2011. CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III. *Nature*, 471, 602-7.
- Demirbilek, H. & Hussain, K. 2017. Congenital Hyperinsulinism: Diagnosis and Treatment Update. *J Clin Res Pediatr Endocrinol*, 9, 69-87.
- 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., Piróg, 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, 1452-69.
- Deveau, H., Barrangou, R., Garneau, J. E., Labonte, J., Fremaux, C., Boyaval, P., Romero, D. A., Horvath, P. & Moineau, S. 2008. Phage response to CRISPR-encoded resistance in *Streptococcus thermophilus*. *J Bacteriol*, 190, 1390-400.
- Docheva, D., Padula, D., Popov, C., Weishaupt, P., Prägert, M., Miosge, N., Hickel, R., Böcker, 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. *Nature Biotechnology*, 34, 184-91.
- el-Labban, N. G., Lee, K. W. & Rule, D. 1991. Permanent teeth in hypophosphatasia: light and electron microscopic study. *J Oral Pathol Med*, 20, 352-60.
- 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.
- 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.
- Fujii, S., Maeda, H., Wada, N., Tomokiyo, A., Saito, M. & Akamine, A. 2008. Investigating a clonal human periodontal ligament progenitor/stem cell line in vitro and in vivo. *J Cell Physiol*, 215, 743-9.
- Fukunishi, Y. & Tabata, Y. 2018. Osteogenic differentiation enhances the MC3T3-E1 secretion of glycosaminoglycans with an affinity for basic fibroblast growth factor and bone morphogenetic protein-2. *Regen Ther*, 8, 58-62.
- Gaudelli, N. M., Komor, A. C., Rees, H. A., Packer, M. S., Badran, A. H., Bryson, D. I. & Liu, D. R. 2017. Programmable base editing of A•T to G•C in genomic DNA without DNA cleavage. *Nature*, 551, 464-71.

- 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., Mentrup, B., Schneider, D., Klein-Hitpass, L., Jakob, F. & Hofmann, C. 2015. Tissue-nonspecific alkaline phosphatase supports the attitude of neurogenic differentiation in the human SH-SY5Y neuroblastoma cell line. *Bone*, 79.
- Haapaniemi, E., Botla, S., Persson, J., Schmierer, B. & Taipale, J. 2018. CRISPR–Cas9 genome editing induces a p53-mediated DNA damage response. *Nature Medicine*, 24, 927-30.
- Hamidouche, Z., Haÿ, E., Vaudin, P., Charbord, P., Schüle, R., Marie, P. J. & Fromigué, O. 2008. FHL2 mediates dexamethasone-induced mesenchymal cell differentiation into osteoblasts by activating Wnt/beta-catenin signaling-dependent Runx2 expression. *Faseb j*, 22, 3813-22.
- Harmey, D., Hesse, L., Narisawa, S., Johnson, K. A., Terkeltaub, R. & Millan, J. L. 2004. Concerted regulation of inorganic pyrophosphate and osteopontin by *akp2*, *enpp1*, and *ank*: an integrated model of the pathogenesis of mineralization disorders. *Am J Pathol*, 164, 1199-209.
- Hatakeyama, S. 2017. TRIM Family Proteins: Roles in Autophagy, Immunity, and Carcinogenesis. *Trends Biochem Sci*, 42, 297-311.
- Henthorn, P. S. & Whyte, M. P. 1995. Infantile hypophosphatasia: successful prenatal assessment by testing for tissue-non-specific alkaline phosphatase isoenzyme gene mutations. *Prenat Diagn*, 15, 1001-6.
- Hesse, L., Johnson, K. A., Anderson, H. C., Narisawa, S., Sali, A., Goding, J. W., Terkeltaub, R. & Millan, J. L. 2002. Tissue-nonspecific alkaline phosphatase and plasma cell membrane glycoprotein-1 are central antagonistic regulators of bone mineralization. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99, 9445-9.
- 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., Jakob, F., Seefried, L., Mentrup, B., Graser, S., Plotkin, H., Girschick, H. J. & Liese, J. 2015. Recombinant Enzyme Replacement Therapy in Hypophosphatasia. *Subcell Biochem*, 76, 323-41.
- Horvath, P., Romero, D. A., Coute-Monvoisin, A. C., Richards, M., Deveau, H., Moineau, S., Boyaval, P., Fremaux, C. & Barrangou, R. 2008. Diversity, activity, and evolution of CRISPR loci in *Streptococcus thermophilus*. *J Bacteriol*, 190, 1401-12.
- 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, 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, 510-24.
- Hoylaerts, M. F., Manes, T. & Millan, J. L. 1997. Mammalian alkaline phosphatases are allosteric enzymes. *J Biol Chem*, 272, 22781-7.
- Hu, R.-J., Lee, M. P., Connors, T. D., Johnson, L. A., Burn, T. C., Su, K., Landes, G. M. & Feinberg, A. P. 1997. A 2.5-Mb Transcript Map of a Tumor-Suppressing Subchromosomal Transferable Fragment from 11p15.5, and Isolation and Sequence Analysis of Three Novel Genes. *Genomics*, 46, 9-17.
- Ignatius, A., Ehrnthaller, C., Brenner, R. E., Kreja, L., Schoengraf, P., Lisson, P., Blakytyn, R., Recknagel, S., Claes, L., Gebhard, F., Lambris, J. D. & Huber-Lang, M. 2011. The anaphylatoxin receptor C5aR is present during fracture healing in rats and mediates osteoblast migration in vitro. *J Trauma*, 71, 952-60.

- Ihry, R. J., Worringer, K. A., Salick, M. R., Frias, E., Ho, D., Theriault, K., Kommineni, S., Chen, J., Sondey, M., Ye, C., Randhawa, R., Kulkarni, T., Yang, Z., McAllister, G., Russ, C., Reece-Hoyes, J., Forrester, W., Hoffman, G. R., Dolmetsch, R. & Kaykas, A. 2018. p53 inhibits CRISPR–Cas9 engineering in human pluripotent stem cells. *Nature Medicine*, 24, 939-46.
- Ishino, Y., Shinagawa, H., Makino, K., Amemura, M. & Nakata, A. 1987. Nucleotide sequence of the iap gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. *J Bacteriol*, 169, 5429-33.
- 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.
- Ivanovski, S., Lichanska, A. M., d'Aniello, E., Xiao, Y. & Waters, M. J. 2007. Gene expression profiling of cells involved in periodontal regeneration. *Tissue Eng*, 13, 393-404.
- Jansen, R., Embden, J. D., Gaastra, W. & Schouls, L. M. 2002. Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. *Mol Microbiol*, 43, 1565-75.
- Kalbasi Anaraki, P., Patecki, M., Larmann, J., Tkachuk, S., Jurk, K., Haller, H., Theilmeier, G. & Dumler, I. 2014. Urokinase receptor mediates osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells and vascular calcification via the complement C5a receptor. *Stem Cells Dev*, 23, 352-62.
- Kim, J. H., Kim, A. R., Choi, Y. H., Kim, A., Sohn, Y., Woo, G. H., Cha, J. H., Bak, E. J. & Yoo, Y. J. 2018. Intermittent PTH administration improves alveolar bone formation in type 1 diabetic rats with periodontitis. *J Transl Med*, 16, 70.
- Ko, L. J. & Prives, C. 1996. p53: puzzle and paradigm. *Genes Dev*, 10, 1054-72.
- Komor, A. C., Kim, Y. B., Packer, M. S., Zuris, J. A. & Liu, D. R. 2016. Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage. *Nature*, 533, 420-4.
- Li, J., Liu, H. & Ge, L. H. 2009. [Study on dental pulp stem cells from patients with hypophosphatasia]. *Beijing Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban*, 41, 66-70.
- Lia-Baldini, A. S., Brun-Heath, I., Carrion, C., Simon-Bouy, B., Serre, J. L., Nunes, M. E. & Mornet, E. 2008. A new mechanism of dominance in hypophosphatasia: the mutated protein can disturb the cell localization of the wild-type protein. *Hum Genet*, 123, 429-32.
- 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, 105-11.
- Loebel, C., Czekanska, E. M., Bruderer, M., Salzmann, G., Alini, M. & Stoddart, M. J. 2015. In vitro osteogenic potential of human mesenchymal stem cells is predicted by Runx2/Sox9 ratio. *Tissue Eng Part A*, 21, 115-23.
- 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.
- Makarova, K. S., Grishin, N. V., Shabalina, S. A., Wolf, Y. I. & Koonin, E. V. 2006. A putative RNA-interference-based immune system in prokaryotes: computational analysis of the predicted enzymatic machinery, functional analogies with eukaryotic RNAi, and hypothetical mechanisms of action. *Biol Direct*, 1, 7.
- Mali, P., Svelt, K. M. & Church, G. M. 2013. Cas9 as a versatile tool for engineering biology. *Nat Methods*, 10, 957-63.

- Matsuura, S., Kishi, F. & Kajii, T. 1990. Characterization of a 5'-flanking region of the human liver/bone/kidney alkaline phosphatase gene: two kinds of mRNA from a single gene. *Biochem Biophys Res Commun*, 168, 993-1000.
- Mattiroli, F., Vissers, Joseph H. A., van Dijk, Willem J., Ikpa, P., Citterio, E., Vermeulen, W., Marteiijn, Jurgen A. & Sixma, Titia K. 2012. RNF168 Ubiquitinates K13-15 on H2A/H2AX to Drive DNA Damage Signaling. *Cell*, 150, 1182-95.
- 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.
- McVey, M. & Lee, S. E. 2008. MMEJ repair of double-strand breaks (director's cut): deleted sequences and alternative endings. *Trends Genet*, 24, 529-38.
- Melms, H., Herrmann, M., Förstner, K., Bharti, R., Schneider, D., Mentrup, B., Rudert, M., Schlagenhaut, 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.
- Michigami, T., Uchihashi, T., Suzuki, A., Tachikawa, K., Nakajima, S. & Ozono, K. 2005. Common mutations F310L and T1559del in the tissue-nonspecific alkaline phosphatase gene are related to distinct phenotypes in Japanese patients with hypophosphatasia. *Eur J Pediatr*, 164, 277-82.
- Millan, J. L. 2013. The role of phosphatases in the initiation of skeletal mineralization. *Calcif Tissue Int*, 93, 299-306.
- Millán, 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.
- Molchadsky, A., Shats, I., Goldfinger, N., Pevsner-Fischer, M., Olson, M., Rinon, A., Tzahor, E., Lozano, G., Zipori, D., Sarig, R. & Rotter, V. 2008. p53 plays a role in mesenchymal differentiation programs, in a cell fate dependent manner. *PLoS One*, 3, e3707.
- Mornet, E. 2007. Hypophosphatasia. *Orphanet J Rare Dis*, 2, 40.
- Mornet, E. 2017. Genetics of hypophosphatasia. *Arch Pediatr*, 24, 5s51-5s56.
- Mornet, E. 2018. Hypophosphatasia. *Metabolism*, 82, 142-55.
- Mornet, E., Muller, F., Ngo, S., Taillandier, A., Simon-Bouy, B., Maire, I. & Oury, J. F. 1999. Correlation of alkaline phosphatase (ALP) determination and analysis of the tissue non-specific ALP gene in prenatal diagnosis of severe hypophosphatasia. *Prenat Diagn*, 19, 755-7.
- 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.
- Narisawa, S., Fröhlander, N. & Millán, J. L. 1997. Inactivation of two mouse alkaline phosphatase genes and establishment of a model of infantile hypophosphatasia. *Dev Dyn*, 208, 432-46.
- Nowak, L. G., Rosay, B., Czégé, D. & Fonta, C. 2015. Tetramisole and Levamisole Suppress Neuronal Activity Independently from Their Inhibitory Action on Tissue Non-specific Alkaline Phosphatase in Mouse Cortex. *Subcell Biochem*, 76, 239-81.
- Okawa, R., Iijima, O., Kishino, M., Okawa, H., Toyosawa, S., Sugano-Tajima, H., Shimada, T., Okada, T., Ozono, K., Ooshima, T. & Nakano, K. 2017. Gene therapy improves dental manifestations in hypophosphatasia model mice. *J Periodontal Res*, 52, 471-78.
- Pantovic, A., Krstic, A., Janjetovic, K., Kocic, J., Harhaji-Trajkovic, L., Bugarski, D. & Trajkovic, V. 2013. Coordinated time-dependent modulation of AMPK/Akt/mTOR signaling and

- autophagy controls osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Bone*, 52, 524-31.
- Peng, M., Yin, N. & Li, M. O. 2017. SZT2 dictates GATOR control of mTORC1 signalling. *Nature*, 543, 433-37.
- 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., Narisawa, S., Harmey, D., Millán, J. L. & Farquharson, C. 2007. Functional involvement of PHOSPHO1 in matrix vesicle-mediated skeletal mineralization. *J Bone Miner Res*, 22, 617-27.
- Rodrigues, T. L., Foster, B. L., Silverio, K. G., Martins, L., Casati, M. Z., Sallum, E. A., Somerman, M. J. & Nociti, F. H., Jr. 2012. Correction of hypophosphatasia-associated mineralization deficiencies in vitro by phosphate/pyrophosphate modulation in periodontal ligament cells. *J Periodontol*, 83, 653-63.
- Salles, J. P. 2020. Hypophosphatasia: Biological and Clinical Aspects, Avenues for Therapy. *Clin Biochem Rev*, 41, 13-27.
- Salmon, C. R., Giorgetti, A. P., Paes Leme, A. F., Domingues, R. R., Sallum, E. A., Alves, M. C., Kolli, T. N., Foster, B. L. & Nociti, F. H., Jr. 2016. Global proteome profiling of dental cementum under experimentally-induced apposition. *J Proteomics*, 141, 12-23.
- Sapranaukas, R., Gasiunas, G., Fremaux, C., Barrangou, R., Horvath, P. & Siksnys, V. 2011. The *Streptococcus thermophilus* CRISPR/Cas system provides immunity in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res*, 39, 9275-82.
- Schraufstatter, I. U., Discipio, R. G., Zhao, M. & Khaldoyanidi, S. K. 2009. C3a and C5a are chemotactic factors for human mesenchymal stem cells, which cause prolonged ERK1/2 phosphorylation. *J Immunol*, 182, 3827-36.
- Seo, B. M., Miura, M., Gronthos, S., Bartold, P. M., Batouli, S., Brahim, J., Young, M., Robey, P. G., Wang, C. Y. & Shi, S. 2004. Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *Lancet*, 364, 149-55.
- Sergienko, E., Su, Y., Chan, X., Brown, B., Hurder, A., Narisawa, S. & Millán, J. L. 2009. Identification and characterization of novel tissue-nonspecific alkaline phosphatase inhibitors with diverse modes of action. *J Biomol Screen*, 14, 824-37.
- Shen, M. W., Arbab, M., Hsu, J. Y., Worstell, D., Culbertson, S. J., Krabbe, O., Cassa, C. A., Liu, D. R., Gifford, D. K. & Sherwood, R. I. 2018. Predictable and precise template-free CRISPR editing of pathogenic variants. *Nature*, 563, 646-51.
- Shi, S., Bartold, P. M., Miura, M., Seo, B. M., Robey, P. G. & Gronthos, S. 2005. The efficacy of mesenchymal stem cells to regenerate and repair dental structures. *Orthod Craniofac Res*, 8, 191-9.
- Shohat, M., Rimoïn, D. L., Gruber, H. E. & Lachman, R. S. 1991. Perinatal lethal hypophosphatasia; clinical, radiologic and morphologic findings. *Pediatr Radiol*, 21, 421-7.
- Shroff, M., Knebel, A., Toth, R. & Rouse, J. 2020. A complex comprising C15ORF41 and Codanin-1: the products of two genes mutated in congenital dyserythropoietic anaemia type I (CDA-I). *Biochem J*, 477, 1893-905.
- 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.
- Silver, M. M., Vilos, G. A. & Milne, K. J. 1988. Pulmonary hypoplasia in neonatal hypophosphatasia. *Pediatr Pathol*, 8, 483-93.

- Sledzinski, P., Nowaczyk, M. & Olejniczak, M. 2020. Computational Tools and Resources Supporting CRISPR-Cas Experiments. *Cells*, 9, 1288.
- Spoto, G., Fioroni, M., Rubini, C., Tripodi, D., Di Stilio, M. & Piattelli, A. 2001. Alkaline phosphatase activity in normal and inflamed dental pulps. *J Endod*, 27, 180-2.
- Standing, A. S. I., Malinova, D., Hong, Y., Record, J., Moulding, D., Blundell, M. P., Nowak, K., Jones, H., Omoyinmi, E., Gilmour, K. C., Medlar, A., Stanescu, H., Kleta, R., Anderson, G., Nanthapaisal, S., Gomes, S. M., Klein, N., Eleftheriou, D., Thrasher, A. J. & Brogan, P. A. 2017. Autoinflammatory periodic fever, immunodeficiency, and thrombocytopenia (PFIT) caused by mutation in actin-regulatory gene WDR1. *J Exp Med*, 214, 59-71.
- Stellzig-Eisenhauer, A., Decker, E., Meyer-Marcotty, P., Rau, C., Fiebig, B. S., Kress, W., Saar, K., Rüschemdorf, 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.
- 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.
- Taillandier, A., Sallinen, S. L., Brun-Heath, I., De Mazancourt, P., Serre, J. L. & Mornet, E. 2005. Childhood hypophosphatasia due to a de novo missense mutation in the tissue-nonspecific alkaline phosphatase gene. *J Clin Endocrinol Metab*, 90, 2436-9.
- Taylor, S. R., Markesbery, M. G. & Harding, P. A. 2014. Heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor (HB-EGF) and proteolytic processing by a disintegrin and metalloproteinases (ADAM): a regulator of several pathways. *Semin Cell Dev Biol*, 28, 22-30.
- Tomlinson, M. J., Dennis, C., Yang, X. B. & Kirkham, J. 2015. Tissue non-specific alkaline phosphatase production by human dental pulp stromal cells is enhanced by high density cell culture. *Cell Tissue Res*, 361, 529-40.
- Tomokiyo, A., Maeda, H., Fujii, S., Wada, N., Shima, K. & Akamine, A. 2008. Development of a multipotent clonal human periodontal ligament cell line. *Differentiation*, 76, 337-47.
- 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, 4063-63.
- Valenza, G., Burgemeister, S., Girschick, H., Schoen, C., Veihelmann, S., Moter, A., Haban, V., Vogel, U. & Schlegelhauf, U. 2006. Analysis of the periodontal microbiota in childhood-type hypophosphatasia. *Int J Med Microbiol*, 296, 493-500.
- van de Peppel, J., Strini, T., Tilburg, J., Westerhoff, H., van Wijnen, A. J. & van Leeuwen, J. P. 2017. Identification of Three Early Phases of Cell-Fate Determination during Osteogenic and Adipogenic Differentiation by Transcription Factor Dynamics. *Stem Cell Reports*, 8, 947-60.
- 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., Löwik, C. W. G. M. & Karperien, M. 2005. Multiple mechanisms are involved in inhibition of osteoblast differentiation by PTHrP and PTH in KS483 Cells. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, 20, 2233-44.
- van Overbeek, M., Capurso, D., Carter, M. M., Thompson, M. S., Frias, E., Russ, C., Reece-Hoyes, J. S., Nye, C., Gradia, S., Vidal, B., Zheng, J., Hoffman, G. R., Fuller, C. K. & May, A. P. 2016. DNA Repair Profiling Reveals Nonrandom Outcomes at Cas9-Mediated Breaks. *Mol Cell*, 63, 633-46.
- Vogelstein, B., Lane, D. & Levine, A. J. 2000. Surfing the p53 network. *Nature*, 408, 307-10.

- Wang, X., Kua, H. Y., Hu, Y., Guo, K., Zeng, Q., Wu, Q., Ng, H. H., Karsenty, G., de Crombrughe, B., Yeh, J. & Li, B. 2006. p53 functions as a negative regulator of osteoblastogenesis, osteoblast-dependent osteoclastogenesis, and bone remodeling. *J Cell Biol*, 172, 115-25.
- Waymire, K. G., Mahuren, J. D., Jaje, J. M., Guilarte, T. R., Coburn, S. P. & MacGregor, G. R. 1995. Mice lacking tissue non-specific alkaline phosphatase die from seizures due to defective metabolism of vitamin B-6. *Nat Genet*, 11, 45-51.
- 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. 1994. Hypophosphatasia and the role of alkaline phosphatase in skeletal mineralization. *Endocr Rev*, 15, 439-61.
- Whyte, M. P. 2016. Hypophosphatasia - aetiology, nosology, pathogenesis, diagnosis and treatment. *Nat Rev Endocrinol*, 12, 233-46.
- Whyte, M. P., Greenberg, C. R., Salman, N. J., Bober, M. B., McAlister, W. H., Wenkert, D., Van Sickle, B. J., Simmons, J. H., Edgar, T. S., Bauer, M. L., Hamdan, M. A., Bishop, N., Lutz, R. E., McGinn, M., Craig, S., Moore, J. N., Taylor, J. W., Cleveland, R. H., Cranley, W. R., Lim, R., Thacher, T. D., Mayhew, J. E., Downs, M., Millán, J. L., Skrinar, A. M., Crine, P. & Landy, H. 2012. Enzyme-replacement therapy in life-threatening hypophosphatasia. *N Engl J Med*, 366, 904-13.
- Whyte, M. P., Mahuren, J. D., Fedde, K. N., Cole, F. S., McCabe, E. R. & Coburn, S. P. 1988. Perinatal hypophosphatasia: tissue levels of vitamin B6 are unremarkable despite markedly increased circulating concentrations of pyridoxal-5'-phosphate. Evidence for an ectoenzyme role for tissue-nonspecific alkaline phosphatase. *J Clin Invest*, 81, 1234-9.
- Whyte, M. P., Simmons, J. H., Moseley, S., Fujita, K. P., Bishop, N., Salman, N. J., Taylor, J., Phillips, D., McGinn, M. & McAlister, W. H. 2019. Asfotase alfa for infants and young children with hypophosphatasia: 7 year outcomes of a single-arm, open-label, phase 2 extension trial. *Lancet Diabetes Endocrinol*, 7, 93-105.
- Williams, D. K., Pinzón, C., Huggins, S., Pryor, J. H., Falck, A., Herman, F., Oldeschulte, J., Chavez, M. B., Foster, B. L., White, S. H., Westhusin, M. E., Suva, L. J., Long, C. R. & Gaddy, D. 2018. Genetic engineering a large animal model of human hypophosphatasia in sheep. *Sci Rep*, 8, 16945.
- Wolf, M., Jäger, A., Abuduwali, N., Götz, W. & Lossdörfer, S. 2013. Continuous PTH modulates alkaline phosphatase activity in human PDL cells via protein kinase C dependent pathways in vitro. *Annals of Anatomy - Anatomischer Anzeiger*, 195, 455-60.
- 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., Simão, A. M., Narisawa, S., Huesa, C., McKee, M. D., Farquharson, C. & Millán, 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.

- Yu, Z., Wu, B., Tang, A., Chen, J., Guo, X., Qin, J., Gui, Y. & Cai, Z. 2009. Expression profile of a novel germ cell-specific gene, TSCPA, in mice and human. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci*, 29, 535-9.
- Zhan, T., Rindtorff, N., Betge, J., Ebert, M. P. & Boutros, M. 2019. CRISPR/Cas9 for cancer research and therapy. *Semin Cancer Biol*, 55, 106-19.
- Zhang, H., Ke, Y. H., Wang, C., Yue, H., Hu, W. W., Gu, J. M. & Zhang, Z. L. 2012. Identification of the mutations in the tissue-nonspecific alkaline phosphatase gene in two Chinese families with hypophosphatasia. *Arch Med Res*, 43, 21-30.
- 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, X.-H., Tee, L. Y., Wang, X.-G., Huang, Q.-S. & Yang, S.-H. 2015. Off-target Effects in CRISPR/Cas9-mediated Genome Engineering. *Mol Ther Nucleic Acids*, 4, e264-e64.
- Zhou, W., He, Y., Rehman, A. U., Kong, Y., Hong, S., Ding, G., Yalamanchili, H. K., Wan, Y.-W., Paul, B., Wang, C., Gong, Y., Zhou, W., Liu, H., Dean, J., Scalais, E., O'Driscoll, M., Morton, J. E. V., study, D. D. D., Hou, X., Wu, Q., Tong, Q., Liu, Z., Liu, P., Xu, Y. & Sun, Z. 2019. Loss of function of NCOR1 and NCOR2 impairs memory through a novel GABAergic hypothalamus-CA3 projection. *Nat Neurosci*, 22, 205-17.
- Zweifler, L. E., Patel, M. K., Nociti, F. H., Jr., Wimer, H. F., Millán, 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

53BP1	P53 Binding Protein 1
A	Adenin
AA	Asfotase alfa
ABCC8	ATP binding cassette subfamily C member 8
ALPI	Intestinale Alkalische Phosphatase
ALPL, auch AP	Alkalische Phosphatase
ALPP	Plazentale Alkalische Phosphatase
ANK	Progressiv Ankylosis Protein homolog
ANOVA	Analysis of Variance
APS	Ammoniumperoxidsulfat
ASPN	Asporin
ATP	Adenosintriphosphat
B2M	Beta-Mikroglobulin
B3Galt2	Beta-1,3-Galactosyltransferase 2
BCRA1	Breast Cancer 1
BMP	Bone Morphogenetic Protein
BMSC	Bone marrow derived mesenchymal stromal cells, Mesenchymale Stammzellen des Knochenmarks
Bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
BSP	Bone Sialoprotein
C	Cytosin
C15Orf41	Chromosom 15 Open Reading Frame 41
C3orf30	Chromosom 3 Open Reading Frame 30
C5AR1	C5a Anaphylatoxin Chemotaktischer Rezeptor 1
Cas	CRIPSR assoziiertes Gen
CDK4	Cyclin abhängige Kinase 4
CFD	Cutting Frequency Determination
Col11A1	Kollagen Typ 11 alpha 1
Col1A1	Kollagen Typ 1 alpha 1
CPC	Cetylpyridinum Chlorid
CRELD2	Cysteine rich with epidermal growth factor like domain 2
CRISPR	clustered regularly interspaced short palindromic repeats
crRNA	CRIPSR RNA
ddH ₂ O	Doppelt destilliertes Wasser
ddNTP	Didesoxyribonukleotidphosphat
DMP1	Dentin Matrix Acidic Phosphoprotein 1

DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotidphosphat
eATP	Extrazelluläres Adenosintriophosphat
ECL	Enhanced Chemilumineszenz
ECM	Extrazellulärmatrix
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ENPP1	Ektonukleotid Pyrophosphatase/ Phosphodiesterase 1
ER	Endoplasmatisches Retikulum
et al.	Et altera, und andere
FCS	Fetal calf serum / Fötales Kälberserum
FGF	Fibroblast Growth Factor/ Fibroblasten Wachstumsfaktor
FHL2	Four and a half LIM Domain Protein
FMOD	Fibromodulin
FORECasT	favored outcomes of repair events at Cas9 targets
Fw	Forward
G	Guanin
GABA	γ -Aminobuttersäure
GAG	Glykosaminyglykan
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
HA	Hydroxylapatit
HBEGF	Heparin Binding EGF like growth factor
HDR	Homologe Rekombination
HPP	Hypophosphatasie
HPR	Horseradish Peroxidase
HPT	Hyperparathyroidismus
hTERT	Humane Telomerase Reverse Transkriptase
IL-1 β	Interleukin 1 β
Indel	Insertion/Deletion
kDa	Kilo Dalton
MMEJ	Microhomology mediated end-joining /Mikrohomologie vermittelte Endverknüpfung
mRNA	Messenger RNA
MSC	Mesenchymale Stammzellen
mTOR	Mechanistic Target of Rapamycin
MV	Matrixvesikel
NCOR2	Nuclear Receptor Corepressor 2
NHEJ	Non homologous end-joining / Nicht homologe Endverknüpfung
NTP	Nukleosidtriphosphat

OPN	Osteopontin
P2X7	P2X Purinorezeptor 7
PAM	protospacer adjacent motif
PBS	Phosphat buffered Saline / Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PC	Phosphocholin
PCR	Polymerase Chain Reaction / Polymerasekettenreaktion
PDL	Parodontales Ligament
PDLSC	Stammzellen des parodontalen Ligaments
PEA	Phosphoethanolamin
pegRNA	Prime editing guide RNA
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
Phospho1	Phosphatase Orphan 1
PI	Proteinaseinhibitor
Pi	Anorganisches Phosphat
PiT-1	Phosphat-Transporter 1
PLP	Pyridoxalphosphat
pnpTMP	p-Nitrophenyl-Thymidin 5'-Monophosphat
PPi	Pyrophosphat
PTH	Parathormon
PTHr1	Parathormon-Rezeptor 1
PTPRE	Protein Tyrosin Phosphatase Receptor Typ E
qPCR	Quantitative Echtzeit Polymerase Kettenreaktion
RANKL	Rezeptor activator of nuclear factor kB ligand
Rev	Reverse
RNA	Ribonukleinsäure
RNF	Ringfinger Protein
Rpm	Rounds per minute / Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
Runx2	Runt-Related Transcription Factor 2
SDS	Natriumdodecylsulfat
sgRNA	Single guide RNA
Sox9	Sex Determining Region Y-Box 9
SPARC	Osteonectin
T	Thymin
TALEN	Transcription Activator-like Effector Nucleases
TBS	Tris
TE Puffer	Tris EDTA Puffer
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TNAP	Gewebeunspezifische Alkalische Phosphatase

TP53 / p53	Tumorsupressor 53
TracrRNA	Trans aktivierende crRNA
TRIM42	Tripartite Motif 42
TSSC1	Tumor Suppression Subtransferable Candidate 1
WDR	WD Repeat Domain
Wt	Wildtyp
ZFN	Zinkfinger-Nukleasen
β me ATP	β - γ -Methylenadenosin 5'-Triphosphat

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Einteilung der HPP-Subtypen anhand des Manifestationsalters	2
Abb. 2: Die TNAP und ihre Antagonisten bei Mineralisationsprozessen	7
Abb. 3: CRISPR/Cas9 als mikrobielles Abwehrsystem	19
Abb. 4: DNA-Reparaturmechanismen nach CRISPR/Cas9 induzierten Doppelstrangbrüchen.....	21
Abb. 5: Schema der Transfektion in einer 6-Well Platte	29
Abb. 6: Schritte des Cleavage Assays.	30
Abb. 7: Einfluss der Transfektion auf das Wachstumsverhalten der hTERT PDL Zellen.	47
Abb. 8: Ergebnis des Cleavage Assays.....	48
Abb. 9: Effizienz der CRISPR/Cas9 induzierten Mutationen im Cleavage Assay in Prozent	49
Abb. 10: Agarosegel vor der Sequenzierung	50
Abb. 11: Ergebnis der Sequenzierung der Klone nach CRISPR/Cas9 mit dem ALPL1 Konstrukt.	51
Abb. 12: Ergebnis der Sequenzierung der Klone nach CRISPR/Cas9 mit dem ALPL2 Konstrukt	52
Abb. 13: Auswirkung der Mutationen auf die Aminosäurecode.....	54
Abb. 14: Repräsentative Mikroskop-Aufnahmen der Klone.	56
Abb. 15: Populationsverdopplung / Tag der Klone	56
Abb. 16: Relative basale Genexpression des <i>ALPL</i> Gens.	57
Abb. 17: Basale TNAP Aktivitätsmessung im CSPD Assay aller Klonen	58
Abb. 18: Nachweis der TNAP auf Proteinebene im Western Blot.....	60
Abb. 19: Basale ENPP1 Aktivität.....	60
Abb. 20: relative Genexpression im Verlauf der osteogenen Differenzierung der hTERT PDL Zellen.....	63
Abb. 21: TNAP Aktivität der hTERT PDL Zellen im Verlauf der osteogenen Differenzierung.....	64
Abb. 22: TNAP Färbung der hTERT PDL Zellen nach 7 und 14 Tagen der osteogenen Differenzierung	65
Abb. 23: Alizarinfärbung der hTERT PDL Zellen nach 28 Tagen der osteogenen Differenzierung	66
Abb. 24: <i>ALPL</i> Genexpression der einzelnen Klone im zeitlichen Verlauf der osteogenen Differenzierung.	67
Abb. 25: <i>ALPL</i> Genexpression an den Tagen 0 - 14 der osteogenen Differenzierung im Vergleich zwischen den Klonen.....	68
Abb. 26: Schmelzkurvenanalyse <i>ALPL</i>	68
Abb. 27: <i>ANK</i> Genexpression der einzelnen Klone im zeitlichen Verlauf der osteogenen Differenzierung	69
Abb. 28: <i>ANK</i> Genexpression an den Tagen 0 - 14 der osteogenen Differenzierung im Vergleich zwischen den Klonen.....	70
Abb. 29: <i>ENPP1</i> Genexpression der einzelnen Klone im zeitlichen Verlauf der osteogenen Differenzierung	70
Abb. 30: <i>ENPP1</i> Genexpression an den Tagen 0 - 14 der osteogenen Differenzierung im Vergleich zwischen den Klonen.....	71
Abb. 31: <i>C5AR1</i> Genexpression der einzelnen Klone im zeitlichen Verlauf der osteogenen Differenzierung	72
Abb. 32: <i>C5AR1</i> Genexpression an den Tagen 0 - 14 der osteogenen Differenzierung im Vergleich zwischen den Klonen.....	72

Abb. 33: <i>B3Galt2</i> Genexpression der einzelnen Klone im zeitlichen Verlauf der osteogenen Differenzierung	73
Abb. 34: <i>B3Galt2</i> Genexpression an den Tagen 0 - 14 der osteogenen Differenzierung im Vergleich zwischen den Klonen.....	74
Abb. 35: <i>Runx2/Sox9</i> Quotient der einzelnen Klone im zeitlichen Verlauf der osteogenen Differenzierung	75
Abb. 36: <i>P2X7</i> Genexpression der einzelnen Klone im zeitlichen Verlauf der osteogenen Differenzierung	76
Abb. 37: <i>P2X7</i> Genexpression an den Tagen 0 - 14 der osteogenen Differenzierung im Vergleich zwischen den Klonen.....	76
Abb. 38: Basalwerte des CSPD Assay mit und ohne Levamisol der Klone.....	77
Abb. 39: TNAP Aktivität an den Tagen 0 - 7 der osteogenen Differenzierung im Vergleich zwischen den Klonen.....	78
Abb. 40: TNAP Aktivität der einzelnen Klone im zeitlichen Verlauf der osteogenen Differenzierung	79
Abb. 41: TNAP Färbung der Klone an Tag 7 und 14 der osteogenen Differenzierung	81
Abb. 42: Alizarinfärbung nach 28 Tagen der osteogenen Differenzierung	82
Abb. 43: Quantifizierung der Alizarinfärbung	83
Abb. 44: <i>ALPL</i> und <i>Phospho1</i> Expression in hTERT PDL nach 0 - 48 Stunden der PTH Stimulation	84
Abb. 45: <i>ALPL</i> Genexpression und TNAP Aktivität der Klone nach PTH Stimulation.....	84

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Normwerte der TNAP im Serum (37 °C, IFCC Methode)	11
Tab. 2: Zeitpunkte der Osteogenen Differenzierung in Tagen	26
Tab. 3: crRNA der ALPL1, ALPL2 und CDK4 Konstrukte	27
Tab. 4: Primer für den Cleavage Assay.....	31
Tab. 5: Primer für die qPCR	38
Tab. 6: Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgel	41
Tab. 7: Überblick über die analysierten Klone.	55

Anhang

Anhang 1: ALPL mRNA mit PAM und Zielsequenzen für ALPL1 und ALPL2. Dargestellt ist der forward Strang in 5'-3' Richtung der ALPL mRNA mit den 12 farblich getrennt dargestellten Exons und dem orange hervorgehobenen Startcodon atg in Exon 2. Die PAM- und Zielsequenz für beide Konstrukte ALPL1 und ALPL2 finden sich auf dem reverse Strang, weshalb die Sequenzen im forward Strang revers und komplementär vorgefunden werden.

ALPL1: PAM Sequenz und Zielsequenz auf reverse Strang (Exon 6)

PAM-Sequenz: cgg (ccg auf forward Strang)

Zielsequenz: cgttgtctcgagtaccagtcc (ggactggtactcagacaacg auf forward Strang)

ALPL2: PAM Sequenz und Zielsequenz auf reverse Strang (Exon 3)

PAM-Sequenz: ggg (ccc auf forward Strang)

Zielsequenz: cttggtctcgccagtacttg (caagtactggcgagaccaag auf forward Strang)

```
1 gccgcgttgc getcccgcca ctccgcgcc getatcctgg ctccgtgctc ccacgcgett
61 gtgcctggag ggaccctcgc cagtgtctctg cgcaggattg gaacatcagt taacatctga
121 ccactgccag cccaccccct cccaccacag tccattgcat ctctgggctc cagggataaa
181 gcaggtcttg ggtgcacc tgatttcacc attcttagta ctggccattg gcacctgcct
241 tactaactcc ttagtgccag agaaagagaa agaccacaag tactggcgag accaagcgca ALPL2
301 agagacactg aaatatgcc tggagcttca gaagctcaac accaacgtgg ctaagaatgt
361 catcatgttc ctgggagatg ggatgggtgt ctccacagtg acgggtgccc gcatcctcaa
421 gggtcagctc caccacaacc ctggggagga gaccaggctg gagatggaca agttcccctt
481 cgtggccctc tccaagacgt acaacaccaa tgcccaggtc cctgacagtg ccggcaccgc
541 caccgcctac ctgtgtgggg tgaaggccaa tgagggcacc gtgggggtaa gcgcagccac
601 tgagcgttcc cgttgcaaca ccaccaggg gaacgaggtc acctccatcc tgcctggggc
661 caaggacgct gggaaatctg tgggcattgt gaccaccag agagtgaacc atgccacccc
721 cagcgccgct tacgccact cggctgacc ggactggtac tcagacaacg ALPL1
781 tgaggccttg agccagggct gtaaggacat cgcctaccag ctcatgcata acatcaggga
841 cattgacgtg atcatggggg gtggccggaa atacatgtac cccaagaata aaactgatgt
901 ggagtatgag agtgacgaga aagccagggg cagaggctg gacggcctgg acctcgttga
961 cacctggaag agttcaaac cgagatacaa gactcccac ttcattctgga accgcacgga
1021 actcctgacc cttgaccccc acaatgtgga ctacctattg ggtctcttcg agccagggga
1081 catgcagtac gagctgaaca ggaacaacgt gacggaccgg tcaactctccg agatggtggt
1141 ggtggccatc cagatcctgc ggaagaacc caaaggcttc ttcttgctgg tggaaaggagg
1201 cagaattgac cacgggcacc atgaaggaaa agccaagcag gccctgcatg aggcggtgga
1261 gatggaccgg gccatcgggc aggcaggcag cttgacctcc tcggaagaca ctctgacctg
1321 ggtcactgcg gaccattccc acgtcttcac atttgggtgga tacaccccc gtggcaactc
1381 tatctttggt ctggccccc a tgctgagtga cacagacaag aagcccttca ctgccatcct
1441 gtatggcaat gggcctggct acaagggtgg tggcggtgaa cgagagaaat tctccatggt
1501 ggactatgct cacaacaact accaggcgca gtctgtctgt ccctgcgcc acgagaccca
1561 cggcggggag gacgtggcgg tcttctccaa gggcccacat gcgcacctgc tgcacggcgt
1621 ccacgagcag aactacgtcc cccacgtgat ggcgtatgca gctgcatcg gggccaacct
1681 cggccactgt gctcctgcca gctcggcagg cagccttctg gcaggcccc tgcctgctgc
1741 gctggccctc taccocctga gcgtcctggt ctgagggcc agggcccggg caccacaag
1801 cccgtgacag atgccaactt cccacacggc agccccccc tcaaggggca gggaggtggg
1861 ggcctcctca gcctctgcaa ctgcaagaaa ggggaccaa gaaaccaaag tctgcccgcc
1921 acctcgctcc cctctggaat cttcccacag ggccaaacce acttctggcc tccagccttt
1981 gctccctccc cgctgccctt tggccaacag ggtagatttc tcttgggcag gcagagagta
2041 cagactgcag acattctcaa agcctcttat tttctagcg aacgtatttc tccagaccca
2101 gaggccctga agcctccgtg gaacattctg gatctgaccc tcccagtctc atctcctgac
2161 cctcccactc ccatctcctt acctctggaa cccccaggc cctacaatgc tcatgtccct
2221 gtccccaggc ccagccctcc ttcaggggag ttgaggctt tctcctcagg acaaggcctt
2281 gctcactcac tcactccaag accaccaggg tcccaggaag ccggtgacct ggtggccatc
2341 ctaccacagc tggcccaggc cgggaagagc cacctggcag ggctcacact cctgggctct
2401 gaacacacac gccagctcct ctctgaagcg actctcctgt ttggaacggc aaaaaaaaaa
2461 ttttttttct ctttttgggt gtggttaaaa ggaacacaa aacatttaaa taaaactttc
2521 caaatatttc cgagga
```

Danksagung

Zuallererst möchte ich mich aus ganzem Herzen bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Franz Jakob für die hervorragende Betreuung meiner Doktorarbeit, die stets konstruktive und vertrauensvolle Kommunikation und die Möglichkeit diese spannende Fragestellung zu bearbeiten, bedanken. Ich bin stolz darauf, Ihre wohl letzte Doktorandin gewesen zu sein und hoffe sehr, dass sich unsere Wege noch weiterhin kreuzen werden.

Ich danke Herrn Prof. Schlagenhaut für das Korreferat, welchem er ungeachtet der bevorstehenden Emeritierung ohne Zögern zugestimmt hat.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. Marietta Herrmann für die sehr gute Betreuung der experimentellen Arbeit, die wertvollen Ratschläge, die konstruktive Kritik und die anregenden Diskussionen der Ergebnisse. Vielen Dank für all deine Hilfe, das Vertrauen, das Du mir entgegengebracht hast und die fachlich und vor allem menschlich bereichernde Zeit!

Ich danke Frau Dr. Stephanie Graser für die Hilfe bei allen thematischen Fragestellungen, die hilfreichen Korrekturen und das stets offene Ohr.

Ein großer Dank gilt der gesamten Nachwuchsforschergruppe des IZKF für die herzliche Aufnahme, jegliche Hilfestellungen im Laboralltag und die vielen schönen Stunden: Ich danke Theresa Kreuzahler, Dr. Drenka Trivanović, Ana Rita Pereira, Jovana Ilić, Noah Volkmann, Bianca Schlierf und Andrea Knorz. An die Zeit im Labor werde ich immer gerne zurückdenken.

Mein Dank gilt ebenfalls Frau Prof. Dr. Dentisa Docheva für die Bereitstellung der hTERT PDL Zelllinie.

Ich danke meinen Eltern und meinen Freunden für die großartige Unterstützung.