

3 Präparation der verwendeten Proteine

Zahnkeime permanenter Molaren aus dem Unterkiefer von Kälbern (5 Monate alt) wurden entfernt, gereinigt und für die Aufbereitung von SMP im Institute of Dental Sciences (Head: Prof. Dr. D. Deutsch, Hebrew University, Jerusalem, Israel) präpariert. Dazu wurden die Zähne sofort nach Extraktion von Blut gereinigt und das Schmelzorgan isoliert, nachdem die umliegenden Weichgewebe sowie die Pulpa entfernt wurden. Der sich formende Schmelz wurde unter dem Stereomikroskop vom darunterliegenden Dentin getrennt, gefriergetrocknet und die gefriergetrocknete extrazelluläre Schmelzmatrix für nachfolgende Proteinextraktionen nach der Methode von Termine verwendet [278].

Die Präparation einer Amelogenin-reichen Fraktion (Ax) erfolgte durch Lösung in 4M-Guanidin-HCl, pH 7.4, mit einem Cocktail von Protease-Inhibitoren (0.01 M PMSF, Benzamidin 0.005 M in Tris-Puffer 0.05 M). Nach Dialyse bei 4°C für 72 h und Zentrifugation bei 3,000 rpm für 20 min. wurde der Überstand entnommen und zur Aufbewahrung lyophilisiert.

Eine Gesamtproteinfraktion (Bx) wurde durch Säureextraktion mit Essigsäure isoliert. Dazu wurden 5 g der Schmelzmatrix in 1000 ml 10% Essigsäure für 72 h bei 4°C unter ständiger Bewegung gelöst und dann bei 3,000 rpm 20 min. zentrifugiert. Der Überstand wurde 72 h gegen 0.05 M Essigsäure dialysiert und anschließend lyophilisiert.

Eine Enamelin-angereicherte Fraktion (Cx) der Schmelzmatrix wurde aus Zahnkeimen permanenter Molaren von Kälbern präpariert [278]. Der unvollständig mineralisierte Schmelz wurde vom darunterliegenden Dentin abgeschabt und gelöst in 4M-Guanidin-HCl, pH 7.4, mit einem Cocktail von Protease-Inhibitoren. Nach Dialyse und Zentrifugation wurde das resultierende Pellet weiter gelöst in 4M-Guanidin-HCl und 0.5 M EDTA, um die mineralgebundenen Proteine zu isolieren. Der Überstand wurde gegen Wasser dialysiert und zur Lagerung lyophilisiert.

Aus der kommerziellen Emdogain[®]-Präparation von Jungschweinen wurde eine Fraktion von Amelogenin-Proteinen (Fx) isoliert, bei der durch anionische Säulenchromatographie höhermolekulare Proteine entfernt wurden. Diese Fraktion wurde zur Weiterverwendung ebenfalls lyophilisiert.

Rekombinantes humanes Amelogenin-Protein (rHAM) wurde in einem eukaryotischen System produziert, das posttranslationale Modifikationen wie Glycosylierungen oder Phosphorylierungen ermöglicht [60, 274, 275]. rHAM wurde exprimiert im Baculovirus-System, indem cDNA von humanem Amelogenin in Baculoviren kloniert und in Sf9-Insektenzellen (*Spodoptera frugiperda*) exprimiert wurde. Zusätzlich enthält das exprimierte Protein am N-terminalen Ende ein Poly-Histidin-Tag, das zur Purifikation über Nickelsäulen (NTA-Ni²⁺) angefügt wird. Das gereinigte humane Amelogenin (Molekulargewicht ca. 23 kDa) wurde im Detail charakterisiert durch SDS-Page, Immunoblotting, Massenspektrometrie (Elektrospray-Ionisation) und Restriction-Mapping [273]. Als Kontrollsubstanz in der Studie wurde das kommerziell erhältliche Präparat Emdogain[®] Gel (EMD, Biora, Malmö, Schweden) entsprechend der Herstellerangaben verwendet. Vor Gebrauch wurden alle Proteine und -fraktionen in steriler Propylen-Glykolalginat-Lösung (PGA, Biora) rekonstituiert.