

Aus der Poliklinik für Kieferorthopädie  
der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

**Der Einfluss von statisch-mechanischem Druck und Methotrexat auf  
Wachstum, Morphologie und Genexpression von humanen periodontalen  
Ligament-Fibroblasten**

Inauguraldissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades der  
Zahnmedizin  
der Universitätsmedizin  
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Vorgelegt von

**Vera Mareike Plümer**  
aus Nürnberg

Mainz, 2026



Wissenschaftlicher Vorstand: Univ.-Prof. Dr. Philipp Drees

1. Gutachter:

2. Gutachter:

Tag der Promotion: 03. März 2026

# Inhaltsverzeichnis

<b>I.</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>IV</b>
<b>II.</b>	<b>Tabellenverzeichnis</b> .....	<b>VI</b>
<b>III.</b>	<b>Abbildungsverzeichnis</b> .....	<b>VII</b>
<b>1</b>	<b>Einleitung und Zielsetzung der Arbeit</b> .....	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Literaturdiskussion</b> .....	<b>3</b>
<b>2.1</b>	<b>Der Aufbau und die Funktionen des Zahnhalteapparates</b> .....	<b>3</b>
2.1.1	Der Alveolarknochen .....	3
2.1.2	Das Periodontalligament (PDL) .....	4
<b>2.2</b>	<b>Die orthodontische Zahnbewegung (OTM)</b> .....	<b>7</b>
2.2.1	Die Grundlagen der OTM .....	7
2.2.2	Ausgewählte zelluläre und molekularbiologische Prozesse der OTM.....	8
<b>2.3</b>	<b>In vitro Modelle zur statisch-mechanischen Druckbelastung von humanen PdLF (HPdLF)</b> .....	<b>10</b>
<b>2.4</b>	<b>Die juvenile idiopathische Arthritis (JIA)</b> .....	<b>11</b>
2.4.1	Die Inzidenz und das Krankheitsbild der JIA.....	11
2.4.2	Der Einfluss der JIA auf die kraniofaziale Morphologie .....	12
2.4.3	Die medikamentöse Therapie der JIA .....	12
<b>3</b>	<b>Material</b> .....	<b>15</b>
<b>3.1</b>	<b>Laborgeräte</b> .....	<b>15</b>
<b>3.2</b>	<b>Verbrauchs- und wiederverwendbare Materialien</b> .....	<b>16</b>
<b>3.3</b>	<b>Reagenzien, Puffer und Lösungen</b> .....	<b>17</b>
3.3.1	Reagenzien .....	17
3.3.2	Puffer und Lösungen.....	17
<b>3.4</b>	<b>Stimulantien und Wirkstoffe</b> .....	<b>18</b>
<b>3.5</b>	<b>Kits</b> .....	<b>18</b>
<b>3.6</b>	<b>Oligonukleotide</b> .....	<b>18</b>
<b>3.7</b>	<b>Antikörper für Fluoreszenzmikroskopie</b> .....	<b>18</b>
3.7.1	Primärantikörper .....	18
3.7.2	Sekundärantikörper .....	19
<b>3.8</b>	<b>Fluoreszenzfarbstoff</b> .....	<b>19</b>
<b>3.9</b>	<b>Zellsystem</b> .....	<b>19</b>
<b>4</b>	<b>Methoden</b> .....	<b>20</b>
<b>4.1</b>	<b>Zellbiologische Arbeitsmethoden</b> .....	<b>20</b>
4.1.1	Kultivierung von HPdLF .....	20
4.1.2	Kryokonservierung und Rekultivierung von HPdLF .....	21
4.1.3	Bestimmung der Lebendzellzahl .....	21

4.1.4	Herstellung des 2D in vitro Modells und statisch-mechanische Druckbehandlung durch Glasplatten .....	22
4.1.5	Herstellung des 3D in vitro Modells und statisch-mechanische Druckbehandlung durch das Flexcell FX-5000TM Compression System.....	23
4.1.6	Behandlung mit Methotrexat im 2D und im 3D in vitro Modell.....	26
4.1.7	MTT-Assay .....	26
4.1.8	Lebendzellanalyse .....	26
4.1.9	Raster-Elektronenmikroskopie .....	27
4.1.10	Fluoreszenzmikroskopie.....	27
<b>4.2</b>	<b>Molekularbiologische Arbeitsmethoden.....</b>	<b>28</b>
4.2.1	Isolation von RNA aus HPdLF.....	28
4.2.2	Quantifizierung von Nukleinsäuren.....	30
4.2.3	cDNA-Synthese mittels Reverser Transkriptase.....	30
4.2.4	Quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR).....	31
<b>4.3</b>	<b>Statistik.....</b>	<b>32</b>
<b>5</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>33</b>
<b>5.1</b>	<b>Analysen an HPdLF im 2D in vitro Modell.....</b>	<b>33</b>
5.1.1	Untersuchungen zur Proliferation von HPdLF unter Druck- und Mtx-Behandlung im 2D in vitro Modell .....	33
5.1.2	Untersuchungen zur Zellmorphologie von HPdLF unter Druck- und Mtx-Behandlung im 2D in vitro Modell.....	34
5.1.3	Untersuchungen zur Änderung der Genexpressionen von HPdLF unter Druck- und Mtx-Behandlung im 2D in vitro Modell.....	36
<b>5.2</b>	<b>Analysen an HPdLF im 3D in vitro Modell.....</b>	<b>40</b>
5.2.1	Etablierung des 3D in vitro Modells.....	40
5.2.2	Untersuchungen zur Änderung der Genexpression von HPdLF unter Druck- und Mtx-Behandlung im 3D in vitro Modell.....	43
<b>5.3</b>	<b>Vergleichende Analysen der Genexpressionen in HPdLF im 2D und im 3D in vitro Modell.....</b>	<b>45</b>
5.3.1	Im 3D in vitro Modell war die HIF-1 $\alpha$ mRNA-Expression nach der 24-stündigen Druckbehandlung stärker reduziert als im 2D in vitro Modell.....	45
5.3.2	Im 3D in vitro Modell zeigt sich nach der 24-stündigen Druckbehandlung eine signifikant höhere IL-6 mRNA-Expression in HPdLF als im 2D in vitro Modell .....	46
<b>6</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>48</b>
<b>6.1</b>	<b>Einordnung und Diskussion der eigenen Ergebnisse im Vergleich zur Literatur.....</b>	<b>48</b>
6.1.1	Die statisch-mechanische Druckbehandlung und die Mtx-Behandlung beeinflussen die in vitro Proliferation von HPdLF zeitlich versetzt.....	48
6.1.2	Die Druck- und Mtx-Behandlung von HPdLF in vitro führen zu morphologischen Veränderungen der HPdLF .....	50
6.1.3	Statisch-mechanischer Druck reduziert in vitro die mRNA-Expression von HIF-1 $\alpha$ in HPdLF, während Mtx scheinbar keinen Einfluss hat.....	52

6.1.4	Statisch-mechanischer Druck steigert die mRNA-Expression des Zytokins IL-6 in HPdLF, Mtx beeinflusst die IL-6 mRNA-Expression unter Druckbehandlung bezogen auf die Expression in Kontrollzellen .....	55
<b>6.2</b>	<b>Erfolgreiche Etablierung des 3D in vitro Compression Modells.....</b>	<b>57</b>
<b>6.3</b>	<b>Beurteilung des Studiendesigns .....</b>	<b>60</b>
6.3.1	Beurteilung des 2D in vitro Modells.....	60
6.3.2	Einschränkungen des 3D in vitro Modells.....	61
6.3.3	Eingeschränkte Vergleichbarkeit zwischen in vitro und in vivo Bedingungen.....	61
6.3.4	Schwierigkeiten bei der Wahl einer adäquaten Druckkraft zur Behandlung der HPdLF in vitro. ....	62
6.3.5	Herausforderungen bei der Festlegung eines geeigneten Haushaltsgens für qRT-PCR Analysen.....	63
<b>7</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>65</b>
<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>67</b>
<b>9</b>	<b>Danksagung.....</b>	<b>76</b>
<b>10</b>	<b>Tabellarischer Lebenslauf .....</b>	<b>77</b>

## I. Abkürzungsverzeichnis

2D	zweidimensional
3D	dreidimensional
ANOVA	Analysis of variance
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
cDNA	komplementäre DNA
COX-2	Cyclooxygenase 2
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMARD	Disease modifying antirheumatic drug
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Dexoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
et al.	und andere
EZM	Extrazelluläre Matrix
FBS	Fetal Bovine Serum
FGF	Fibroblast Growth Factor
h	Stunden
HIF	Hypoxie-induzierter Faktor
HPdLF	Humane Periodontale Ligament-Fibroblasten
IL	Interleukin
JIA	Juvenile Idiopathische Arthritis
kPa	kilo Pascal
MMP	Matrixmetalloproteinase
mRNA	messenger RNA
MTT	Methylthiazolyldiphenyl-tetrazoliumbromid
Mtx	Methotrexat
NFkB	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
ns	Nicht signifikant
NSAR	Nichtsteroidale Antirheumatika
OPG	Osteoprotegerin
OTM	Orthodontic tooth movement
P	Passage

PBS	Phosphate Buffered Saline
PDL	Periodontalligament
PdLF	Periodontale Ligament-Fibroblasten
PDLSC	Periodontal ligament stem cell
PPIB	Peptidylprolylisomerase A
qRT-PCR	quantitativen Real-Time PCR
RA	Rheumatoide Arthritis
RANK	Receptor Activator of NF- $\kappa$ B
RANKL	Receptor Activator of NF- $\kappa$ B Ligand
RNA	Ribonukleinsäure
RPL22	Ribosomales Proteins L22
rpm	revolutions per minute
TBP	TATA-Box-bindendes Protein
TGF	Transforming Growth Factor
TIMP	Tissue inhibitor of metalloproteinase
TNF	Tumornekrosefaktor
TTP	Tristetraprolin
UTR	untranslatierte Region
VEGF	Vascular endothelial growth factor

## II. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Auflistung der verwendeten Laborgeräte.....	15
Tabelle 2: Auflistung der verwendeten Verbrauchs- und Mehrwegmaterialien .....	16
Tabelle 3: Auflistung der verwendeten Chemikalien und Medien .....	17
Tabelle 4: Auflistung der verwendeten Puffer und Lösungen .....	17
Tabelle 5: Auflistung des verwendeten Wirkstoffs.....	18
Tabelle 6: Auflistung der verwendeten Kits .....	18
Tabelle 7: Auflistung der verwendeten qRT-PCR-Primer .....	18
Tabelle 8: Auflistung des verwendeten Primärantikörpers für Fluoreszenzmikroskopie .....	18
Tabelle 9: Auflistung des verwendeten Sekundärantikörpers für Fluoreszenzmikroskopie.....	19
Tabelle 10: Auflistung des verwendeten Zellsystems.....	19
Tabelle 11: Auflistung der Bestandteile des Zellkulturmediums.....	20
Tabelle 12: Zusammensetzung des Kollagengels .....	23
Tabelle 13: Ansatz für die Reverse Transkription mit dem iScript cDNA Synthesis Kit.....	30
Tabelle 14: Temperaturprogramm für die Reverse Transkription .....	30
Tabelle 15: Ansatz für die qRT-PCR mit iQ SYBR Green Supermix .....	31
Tabelle 16: Temperaturprogramm für die qRT-PCR.....	31

### III. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Der Aufbau des Zahnhalteapparates .....	3
Abbildung 2: Die Bestandteile des Periodontalligaments (PDL).....	4
Abbildung 3: Das klassische „Druck-Zug-Modell“ .....	7
Abbildung 4: Glasplatten wurden zur statisch-mechanischen Druckbehandlung (2 g/cm <sup>2</sup> ) von HPdLF im 2D in vitro Modell eingesetzt.....	22
Abbildung 5: Zylinder-Negativformen wurden zum Gießen der Gele in Zellkulturplatten für das 3D in vitro Modell verwendet.....	23
Abbildung 6: Aufbau des „Flexcell FX-5000™ Compression“ Systems .....	24
Abbildung 7: „Stationary platens“ werden den Wells der „Biopress™ Compression“ Zellkulturplatten aufgesetzt.....	25
Abbildung 8: Einsatz der „Biopress™ Compression“ Zellkulturplatten in die Grundplatte (Baseplate) und die Funktionsweise der Druckübertragung auf das Gel innerhalb der Zellkulturplatten.....	25
Abbildung 9: Das verwendete Protokoll zur Zellyse und RNA-Isolation aus HPdLF .....	29
Abbildung 10: Statisch-mechanischer Druck beeinflusst die Proliferation von HPdLF im 2D in vitro Modell zeitabhängig .....	33
Abbildung 11: Die Druckbehandlung bzw. die Behandlung mit Mtx (1 µg/ml) im 2D in vitro Modell scheint die Proliferation der HPdLF erst nach ca. 24 h wesentlich zu beeinflussen.....	34
Abbildung 12: Darstellung der HPdLF nach der Behandlung mit Druck und/oder Mtx über 24 h im Elektronenmikroskop.....	35
Abbildung 13: Analysen der HIF-1α mRNA-Expressionen in HPdLF nach der Behandlung mit Druck bzw. Mtx über 24 h im 2D in vitro Modell.....	36
Abbildung 14: Zeitabhängige Veränderungen der HIF-1α mRNA-Expression unter Druck und Mtx Behandlung im 2D in vitro Modell .....	37
Abbildung 15: Analysen der IL-6 mRNA-Expressionen in HPdLF nach der Behandlung mit Druck bzw. Mtx über 24 h im 2D in vitro Modell.....	38
Abbildung 16: Analysen eines zeitabhängigen Effekts von Druck bzw. Mtx sowie eines konzentrationsabhängigen Effekts von Mtx auf die IL-6 mRNA-Expressionen in HPdLF.....	39
Abbildung 17: Darstellung des HPdLF-Kollagengels im Lichtmikroskop.....	40
Abbildung 18: Lebendzellanalyse der HPdLF nach der Druckbehandlung im 3D in vitro Compression Modell durch Fluoreszenzmikroskopie.....	41
Abbildung 19: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der HPdLF nach der Kontroll- bzw. Druck-Behandlung im 3D in vitro Compression Modell.....	42
Abbildung 20: Analysen der HIF-1α mRNA-Expression in HPdLF im 3D in vitro Modell unter Behandlung mit Druck bzw. Mtx.....	43
Abbildung 21: Analysen der IL-6 mRNA-Expressionen in HPdLF im 3D in vitro Modell unter Behandlung mit Druck bzw. Mtx.....	44

Abbildung 22: Veränderungen der HIF-1 $\alpha$ mRNA-Expressionen nach der Druckbehandlung im 2D und im 3D in vitro Modell.....	45
Abbildung 23: Veränderungen der IL-6 mRNA-Expressionen nach der Druckbehandlung im 2D und im 3D in vitro Modell .....	46

## 1 Einleitung und Zielsetzung der Arbeit

Die juvenile idiopathische Arthritis ist die häufigste entzündlich-rheumatische Erkrankung des Kindesalters und zeigt sich klinisch in arthritischen Gelenkschmerzen, -schwellung und -destruktion. Auch das Kiefergelenk ist oftmals arthritisch befallen, womit ein vermindertes sagittales und vertikales Unterkieferwachstum einhergehen. Daraus können wiederum eine Distalbilsslage (Angle-Klasse II) und ein offener Biss resultieren. Die juvenile idiopathische Arthritis erfordert als komplexe Systemerkrankung eine frühe multimodale Therapie, zu der u. a. die medikamentös antirheumatische und die kieferorthopädische Behandlung gehören.

Aus zahlreichen Studien ist bekannt, dass es in der initialen Phase der orthodontischen Zahnbewegung (orthodontic tooth movement, OTM) zu einer akuten sterilen Entzündung im Periodontalligament (PDL) kommt, die wiederum nachfolgende Umbauprozesse des Zahnhalteapparates induziert und reguliert. Die Entzündung wird maßgeblich von humanen periodontalen Ligamentfibroblasten (HPdLF) über ihre Freisetzung verschiedener entzündlicher Mediatoren getragen. In vitro konnte gezeigt werden, dass Zytokine, wie TNF- $\alpha$ , IL-1 und IL-6, nach mechanischer Druckbehandlung verstärkt von HPdLF exprimiert werden. Zur in vitro Simulation der Druckkraft, die während einer orthodontischen Zahnbewegung auf die HPdLF übertragen wird, existieren verschiedene in vitro Modelle. Ein zweidimensionales (2D) in vitro Modell, bei dem eine spezielle Glasplatte mit definiertem Gewicht auf einen HPdLF Monolayer platziert wird, hat sich zur Druckbehandlung von HPdLF in vitro bewährt.

Methotrexat (Mtx) gehört zu den „Disease-modifying antirheumatic drugs (DMARD)“ und wird Kindern mit juveniler idiopathischer Arthritis zur Stabilisierung der Krankheitsaktivität und zur Remissionsinduktion wöchentlich in niedriger Dosis verabreicht. In der niedrigen Dosis hat Mtx einen anti-inflammatorischen Effekt, indem es u. a. als Folsäureantagonist die De-novo-Synthese von DNA und RNA hemmt. Damit kommt es auch zu einer verminderten Produktion entzündlicher Mediatoren. Aus in vitro Untersuchungen an Fibroblasten-ähnlichen Synovialzellen geht hervor, dass die Behandlung mit Mtx eine veränderte pro-inflammatorische Genexpression der Zellen bewirkt. Zum Effekt von Mtx auf die Genexpression in HPdLF ist bisher wenig bekannt. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit soll in vitro untersucht werden, ob Mtx einen Einfluss auf die sterile Entzündung in der Initialphase der OTM hat und darüber die orthodontische Zahnbewegung beeinträchtigen könnte. Dafür soll die HPdLF Zellkulturlinie verwendet werden. Mit Hilfe des o. g. 2D in vitro Modells sollen eine statisch-mechanische Druckbehandlung und gleichzeitig durch die Zugabe von Mtx in das Zellkulturmedium eine anti-inflammatorische Medikation der Zellen erfolgen.

Um Veränderungen in der Genexpression von HPdLF als Effekte der Druck- und Mtx-Behandlung zu analysieren, sollen die mRNA-Expressionen des Zytokins IL-6 in HPdLF mittels qRT-PCR untersucht werden. Mithilfe von Rasterelektronenmikroskopie und Lebendzellanalyse sollen Änderungen der Proliferation und Morphologie von HPdLF analysiert werden.

Aus Proteinanalysen an HPdLF anderer Arbeitsgruppen geht hervor, dass die statisch-mechanische Druckbehandlung zu einer vermehrten Expression des Hypoxie-induzierten Faktors 1 (HIF-1) führt. Es wird angenommen, dass die HIF-1 Expression überwiegend auf translationaler und post-translationaler Ebene gesteuert wird. An Endothelzellen konnte gezeigt werden, dass die Genexpression von HIF-1 $\alpha$  – einer Untereinheit von HIF-1 – auch bereits auf der Ebene der Transkription reguliert wird. Deshalb soll mittels qRT-PCR untersucht werden, ob die HIF-1 $\alpha$  mRNA-Expression in HPdLF unter der Behandlung mit Druck und Mtx beeinflusst wird.

Ein weiterer Schwerpunkt dieser Arbeit soll in der Etablierung eines dreidimensionalen (3D) in vitro Modells zur Druckbehandlung von HPdLF liegen, um die physiologischen Bedingungen der HPdLF noch besser in vitro simulieren zu können. Es soll ein geeignetes Material für das dreidimensionale Konstrukt gefunden und eine Apparatur zur kontrollierten mechanischen Behandlung im 3D in vitro Modell ausgetestet werden. Es ist bekannt, dass die in vitro Genexpressionen von Zellen in zwei- und dreidimensionalen Zellkulturmodellen divergieren können. Nach der erfolgreichen Etablierung eines 3D in vitro Modells sollen deshalb die Genexpressionen von HIF-1 $\alpha$  und IL-6 abhängig von der Druck- und Mtx-Behandlung auch in dem 3D in vitro Modell analysiert werden.

Angesichts der steigenden Prävalenz der juvenilen idiopathischen Arthritis und der damit einhergehenden Schädigungen des Kiefergelenks, wird eine abgestimmte Therapie aus kieferorthopädischer und anti-inflammatorischer Behandlung zunehmend relevanter. Ein genaues Verständnis molekularbiologischer Prozesse unter diesen Therapien ist deshalb von großem klinischem Interesse und kann langfristig dazu beitragen, die Symptome im Kieferbereich kontrollieren und lindern zu können.

## **2 Literaturdiskussion**

### **2.1 Der Aufbau und die Funktionen des Zahnhalteapparates**

Der Zahnhalteapparat wird auch als „Parodontium“ bezeichnet und umfasst vier Strukturen, die die Verankerung des Zahnes im Alveolarfortsatz bilden (Abb. 1). Zu den Strukturen gehören der Alveolarknochen, die Gingiva, das Wurzelzement und das Periodontalligament (PDL) (1,2). Die Verankerung ist nicht als eine starre Verbindung zwischen Zahn und Knochen, sondern als eine flexible Aufhängung des Zahnes in der Alveole zu verstehen. Sie unterliegt stetigen, dynamischen Umbauprozessen (2,3). Durch den kontrollierten Umbau des Zahnhalteapparates werden physiologische und kieferorthopädische Zahnbewegungen möglich (4,5).

#### **Abbildung 1: Der Aufbau des Zahnhalteapparates**

Der Aufbau des Zahnhalteapparates ist schematisch dargestellt. Er wird aus dem Alveolarknochen, der Gingiva, dem Wurzelzement und dem Periodontalligament (PDL) gebildet.

Abbildung aus Cope, 2011 (6). Die Abbildung und ihre Beschriftung wurden modifiziert.

Auf ausgewählte Strukturen des Zahnhalteapparates, die im Rahmen dieser Arbeit relevant sind, soll im Folgenden ausführlicher eingegangen werden.

#### **2.1.1 Der Alveolarknochen**

Der Alveolarknochen setzt sich aus organischer und anorganischer Matrix sowie Knochenzellen (Osteoblasten, Osteozyten, Osteoklasten) zusammen. Er bildet die Wand der Alveole und hat unter physiologischen Bedingungen keinen direkten Kontakt zum Zahn (7–9). Im Inneren des Knochens, dem spongösen Knochenkern, befinden sich sogenannte Haverssche Kanäle, durch die Gefäße und Nerven verlaufen. In die äußere kortikale Knochenschicht inserieren Bindegewebsfasern als Bestandteile des PDL (Abschnitt 2.1.2.2), die der Aufhängung des Zahnes in der Alveole dienen (9–14). Über eine gesteuerte Aktivität von Osteoblasten und Osteoklasten werden Knochenaufbau- und Knochenabbauprozesse reguliert (10,15–17).

## **2.1.2 Das Periodontalligament (PDL)**

### **2.1.2.1 Die Einordnung und Funktionen des PDL**

Das Periodontalligament (PDL) bezeichnet das zellhaltige, faserreiche Bindegewebe zwischen dem Wurzelzement und dem Alveolarknochen. Es beginnt ca. 1-2 mm apikal der Schmelz-Zement-Grenze und geht nach koronal kontinuierlich in das Bindegewebe der Gingiva über. Das PDL weist eine Breite von ca. 100-400 µm auf (12,18–20). Die Breite des PDL kann sich an funktionelle Veränderungen anpassen. Mit einer gesteigerten Beanspruchung kann die Breite des PDL zunehmen und sich umgekehrt bei reduzierter Funktion verschmälern (12).

Das PDL hat mehrere wichtige Funktionen: Es dient durch seine Lage zwischen Wurzelzement und Alveolarknochen der Stabilisierung und Verankerung des Zahnes in der Alveole. Es fungiert zudem als Dämpfer für mechanische Kräfte, die bei der Mastikation auf den Zahn übertragen werden. Die mechanischen Kräfte werden durch das PDL gleichmäßig auf das umliegende Gewebe verteilt, womit Schäden am Zahn und am Zahnhalteapparates vermieden werden (21). Durch die starke Vaskularisation des PDL ist es darüber hinaus wichtig für die Nährstoffversorgung von Wurzelzement und Alveolarknochen. Weiterhin hat es eine Barrierefunktion gegen pathogene Keime aus der Mundhöhle (12,22).

### **2.1.2.2 Die Bestandteile des PDL**

Das PDL ist ein heterogenes Gewebe und seine Bestandteile sind in Abbildung 2 schematisch dargestellt (10,12,23).

#### **Abbildung 2: Die Bestandteile des Periodontalligaments (PDL)**

Das Periodontalligament (PDL) besteht überwiegend aus einer faserreichen, extrazellulären Matrix. Innerhalb der extrazellulären Matrix (EZM) befinden sich zahlreiche PDL-Zellen, darunter Fibroblasten, Knochenzellen und Immunzellen.

Abbildung aus Eickholz, 2012 (24). Die Beschriftung der Abbildung wurde modifiziert.

Die extrazelluläre Matrix (EZM) macht den größten Teil des PDL aus und besteht hauptsächlich aus einem Netzwerk von Typ I Kollagenfasern (18,23). Das Typ I Kollagen macht ca. 80 % des Kollagens im PDL aus und ist gleichmäßig über das gesamte PDL verteilt (13). Beim Typ I Kollagenmolekül handelt es sich um ein fibrilläres Kollagen (10–12,25). Seine Struktur und Anordnung machen das Typ I Kollagen besonders gegen einwirkende Zugkräfte sehr stabil,

aber ermöglichen gleichzeitig auch eine gewisse Elastizität des Gewebes. Damit ist es eine wichtige Struktur für die Integrität des PDL (11,13,26). Anzumerken ist, dass die Kollagenfibrillen im PDL eine Halbwertszeit von nur wenigen Tagen haben. Die Breite und Intaktheit des PDL können also nur durch eine hohe Syntheserate und -geschwindigkeit des Typ I Kollagens sowie durch einen raschen Abbau von zu ersetzendem Kollagen sichergestellt werden (11,27). Der hohe Kollagenumsatz macht das PDL zu einem der metabolisch aktivsten Strukturen des Körpers (13).

Neben den Typ I Kollagenmolekülen kommen in geringeren Mengen auch andere Kollagentypen, darunter Typ III Kollagen, vor (27). Außerdem sind elastische Fasern Teil der EZM und stellen eine Flexibilität und Elastizität des PDL bei mechanischer Beanspruchung sicher (12).

Zwischen den Faserstrukturen der EZM befindet sich eine gelartige Grundsubstanz aus Wasser, Proteoglykanen und Glykoproteinen. Wasser macht mit ca. 70 % den Hauptanteil der Grundsubstanz aus. Flüssigkeitsströme innerhalb der gelartigen Grundsubstanz ermöglichen die Diffusion von Nährstoffen und Hormonen durch die EZM (12,13,28). Proteoglykane halten durch ihre Bindung von Wasser den Gewebedruck aufrecht. Wird mechanischer Druck auf die Proteoglykane ausgeübt, werden sie reversibel komprimiert und sind damit wichtig für die Gewebeelastizität und -stabilität. Zudem sind Proteoglykane an der Regulation von Zellinteraktionen untereinander und mit EZM-Bestandteilen beteiligt (29,30). Über Glykoproteine, wie Fibronectin und Laminin, werden die Bestandteile des PDL verbunden und das PDL stabilisiert (13).

Das PDL verfügt zudem über eine Vielzahl von Zellpopulationen (11,12,31). Die vorherrschenden Zellen des PDL sind mechanosensitive, spindelförmige Bindegewebszellen, sogenannte periodontale Ligament-Fibroblasten (PdLF). PdLF sollen einen Anteil von 50-60 % aller PDL-Zellen und einen Volumenanteil von ca. 25 % des PDL ausmachen (2,9,18,27). Über ihre Zellfortsätze bilden die PdLF Verbindungen zu benachbarten Zellen des PDL aus, wodurch Kommunikationsnetzwerke innerhalb des PDL entstehen (18,32,33). Histologische Untersuchungen konnten zeigen, dass sich die Zellkörper der PdLF parallel zum Verlauf der Kollagenfaserbündel ausrichten und ihre Zytoplasmafortsätze um die Kollagenfaserbündel gewunden sind (2,12).

PdLF sind hochaktive Zellen und auf verschiedenen Ebenen für den Erhalt und die Gesundheit des PDL zuständig (34). Durch die kontrollierte Freisetzung von Matrixmetalloproteinasen (MMPs) und deren Inhibitoren (Tissue inhibitor of metalloproteinase, TIMP) können PdLF den Kollagenabbau kontrollieren (2,27,32,35). Abzubauenende Kollagenfibrillen können durch PdLF aufgenommen und phagozytiert werden. Gleichzeitig sind PdLF aber auch essenziell für die

Neusynthese von Kollagen. Die PdLF synthetisieren den größten Anteil an Kollagen aller PDL-Zellen und passen die Orientierung und Ausrichtung von neu synthetisiertem Kollagen den Belastungszonen des PDL an (11,18,34,36).

Auch am Umbau des Alveolarknochens – abhängig von der mechanischen Belastung des PDL – sind PdLF beteiligt, indem sie das Gleichgewicht zwischen der Osteoklasten- und der Osteoblastenaktivität beeinflussen (32). Über die Freisetzung pro-inflammatorischer Mediatoren, wie Interleukin (IL)-1 $\beta$  und Tumornekrosefaktor (TNF)- $\alpha$ , sowie über die Receptor Activator of NF- $\kappa$ B /Receptor Activator of NF- $\kappa$ B Ligand/ Osteoprotegerin (RANK/RANKL/OPG)- Achse sind PdLF an der Differenzierung und Proliferation von Knochenvorläuferzellen und am Knochenmetabolismus beteiligt (37,38).

Eine wichtige Bedeutung haben die PdLF auch in Bezug auf die Immunregulation. Sie tragen wesentlich zu einem Gleichgewicht zwischen pro- und anti-inflammatorischen Reaktionen im PDL bei (32). Über die Expression von Zytokinen und anderen Entzündungsmediatoren, wie IL-6, IL-8 und Prostaglandin E2, können PdLF die lokale Immunreaktion im PDL steuern. (39). Darüber hinaus können sie die Migration und Reifung von Immunzellen und antigenpräsentierenden Zellen induzieren und sind so auch entscheidend an der Abwehr gegen bakterielle Erreger beteiligt (40).

Die PdLF unterliegen, wie viele Bestandteile des PDL, einem Gleichgewicht zwischen einem Zellüberleben und einem Zellsterben, um die Gewebemöostase des PDL zu erhalten. Ein Ungleichgewicht darin kann zum Verlust von Hart- und Weichgewebe des PDL führen (34). In vitro Studien an humanen PdLF konnten zeigen, dass diese unter bestimmten Stressbedingungen ihre Apoptose einleiten können (41,42). Neue PdLF differenzieren sich wiederum aus mesenchymalen Stammzellen innerhalb des PDL (Periodontal ligament stem cells, PDLSCs) (34).

Neben den oben genannten PdLF, Knochenzellen und PDLSCs kommen zahlreiche weitere Zellpopulationen im PDL vor. Besonders Immunzellen, darunter antigenpräsentierende Zellen (Lymphozyten, Makrophagen, dendritische Zellen) und Granulozyten, sind in hoher Zahl im PDL vertreten (43). Weiterhin finden sich Nervenzellen, Endothelzellen und Epithelzellen im PDL (12,18). Die genannten Zellen bilden vielschichtige funktionelle Netzwerke untereinander aus, wodurch komplexe biologische Prozesse und eine adäquate Anpassung des PDL auf interne und externe Stimuli möglich werden (31).

## 2.2 Die orthodontische Zahnbewegung (OTM)

### 2.2.1 Die Grundlagen der OTM

Eine orthodontische Zahnbewegung (orthodontic tooth movement, OTM) bezeichnet die gezielte Positionsänderung von Zähnen im Kiefer durch kieferorthopädische Kraftapplikation. Die Positionsänderung erfordert die Bewegung des Zahnes durch den dentoalveolären Komplex, was durch koordinierte Gewebeumbauprozesse im Zahnhalteapparat (siehe Abschnitt 2.1) möglich wird (10,22,44).

Die OTM unterscheidet sich grundlegend von der physiologischen Zahnbewegung, indem sie plötzlich auftritt und abhängig von der Kraftkomponente schnell oder langsam erfolgen kann (28). In der Literatur finden sich unterschiedliche Theorien zum Mechanismus der OTM (45). Eine klassische, aber stark vereinfachte Theorie ist die „Druck-Zug-Theorie“. Danach wird das paradentale Gewebe bei der OTM räumlich in eine Druck- und eine Zugzone unterteilt (Abbildung 2.2.1). In der Druckzone kommt es zur Kompression des PDL und des Alveolarknochens. Dadurch verändert sich das Mikromilieu, sodass Osteoklasten aktiviert und rekrutiert werden. Die osteoklastische Aktivität führt zur Knochenresorption in der Druckzone. In der gegenüberliegenden Zugzone führen Spannkraften hingegen zur Aktivierung von Osteoblasten und damit zur Knochenneubildung. Durch die Umbauprozesse in der Druck- und Zugzone wird der Zahn im Alveolarknochen bewegt (28,46).

#### **Abbildung 3: Das klassische „Druck-Zug-Modell“**

(A) Die kieferorthopädische Kraft wird auf den Zahn übertragen. (B) Der Zahn wird zunächst in der Alveole bewegt. Auf der Druckseite wird das PDL komprimiert und Osteoklasten sammeln sich. Auf der Zugseite wird das PDL gedehnt und Osteoblasten werden rekrutiert. (C) Auf der Druckseite wird Knochen resorbiert und auf der Zugseite wird Knochen gebildet. Abbildung aus Kitaura et al., 2014 (47). Die Beschriftung der Abbildung wurde geändert.

Molekularbiologisch betrachtet bilden PDL und der alveoläre Knochen eine funktionelle Einheit mit komplexen biochemischen Signalwegen zwischen den zahlreichen Zellen und Geweben (44).

Aus Studien an Beageln geht hervor, dass sich die OTM zeitlich in vier Phasen einteilen lässt: Die erste Phase umfasst den Zeitraum von 24 bzw. 48 h ab Beginn der OTM. Der Zahn wird in dieser Phase innerhalb der Alveole bewegt, ohne dass Veränderungen am knöchernen Hartgewebe stattfinden. Die anschließende zweite Phase ist durch eine Latenz der Zahnbewegung gekennzeichnet und dauert ca. 20-30 Tage an. Die Latenz kommt durch lokale, aseptische Nekrosen am Alveolarknochen zustande. Erst nach der Phagozytose der nekrotischen Knochenareale beginnt die dritte Phase, in der die eigentliche Bewegung des Zahnes durch den Alveolarknochen stattfindet. Sie geht in eine vierte Phase über, die mit der Entfernung der Kraftkomponente endet (48,49).

## **2.2.2 Ausgewählte zelluläre und molekularbiologische Prozesse der OTM**

### **2.2.2.1 Der Einfluss von OTM auf Strukturen, Zellen und molekulare Prozesse des PDL**

Wie in Abschnitt 2.2.1 beschrieben wurde, beginnt die OTM mit der Auslenkung des Zahnes innerhalb der Alveole. Das vergleichsweise weiche PDL wird durch seine anatomische Lage zwischen Zahn und Alveolarknochen (Abschnitt 2.1.2.1) bereits initial der mechanischen Kraft ausgesetzt. Während das PDL auf der Druckseite komprimiert wird, wird es auf der Zugseite gedehnt und nimmt an Volumen zu. Dementsprechend werden die Kollagenfasern als Hauptbestandteil der EZM (Abschnitt 2.1.2.2) komprimiert oder gedehnt. Zudem kommt es zur Umverteilung der freien Flüssigkeit der EZM. Auf der Druckseite wird die Flüssigkeit in den Alveolarknochen hineingepresst und tritt auf der Zugseite aus dem Alveolarknochen aus. Die Flüssigkeitsströme zwischen EZM und alveolärem Knochen verbessern die gleichmäßige Verteilung der Kraft auf den Zahnhalteapparat (44,50–52).

Die PDL-Zellen sind anatomisch und funktionell eng mit der EZM verknüpft. Sie fungieren als Mechanosensoren, indem sie mechanische Reize der EZM in biologische Signale umwandeln. Über fokale Adhäsionskomplexe und Ionenkanäle werden die mechanischen Reize auf die Zellen übertragen. Es folgt die Aktivierung intrazellulärer Signalkaskaden, die letztendlich die Genexpression der Zellen verändern. Mit der modifizierten Genexpression verändern sich das Zytoskelett und die Form der Zellen. Zudem kommt es zu einer veränderten Expression von biochemischen Signalmolekülen (22,33,44,53–55). Besonders Wachstumsfaktoren und Entzündungsmediatoren, wie Zytokine und Prostaglandine, werden als Antwort auf mechanische

Reize verstärkt exprimiert. Aus der Literatur gehen u. a. erhöhte Spiegel der pro-inflammatorischen Zytokine TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-6 und IL-8 hervor. Durch den Anstieg an pro-inflammatorischen Mediatoren führt die OTM in der initialen Phase zu einer sterilen Entzündung im PDL (19,56–60). Die freigesetzten Entzündungsmediatoren und Signalmoleküle steuern zahlreiche Prozesse im PDL als Reaktion auf die OTM. Dazu gehören u. a. die Osteoklastogenese und die Knochenresorption, die Synthese und der Umbau der EZM, die Rekrutierung von Immunzellen und die Angiogenese (19).

Die Formveränderung der EZM hat außerdem Einfluss auf den Blutfluss im PDL. Nach Schwarz (1932) soll bei der Wahl der orthodontischen Kraftgröße der kapilläre Blutdruck beachtet werden. Danach betrage die optimale Kraftgröße 0,2-0,26 N/cm<sup>2</sup> Wurzeloberflächenbelastung. Bei dieser Kraftgröße würde die Zirkulation im PDL ausreichend erhalten bleiben. Höhere Kraftgrößen würden hingegen zum Verschluss von Gefäßen im PDL und damit zu Gewebeschäden führen (61). Aus neueren Veröffentlichungen geht allerdings hervor, dass bereits die Applikation geringer orthodontischer Kräfte zu einer relevanten Minderperfusion des PDL führt. Die Minderperfusion hat lokale, aseptische Knochennekrosen, eine sogenannte Hyalinisierung, zur Folge. Wie in Abschnitt 2.2.1 beschrieben wurde, verhindert die Nekrose zwischenzeitlich die Zahnbewegung in der zweiten Phase der OTM (44,46,62). In PDL-Zellen und Endothelzellen wird durch die Minderperfusion der Vascular endothelial growth factor (VEGF) gebildet, der die Angiogenese fördert (63). Werden hypoxische Bedingungen von 0-2 % Sauerstoffgehalt im PDL erreicht, wird der Hypoxie-induzierte Faktor 1 (HIF-1) verstärkt synthetisiert (22). HIF-1 ist ein heterodimerer Transkriptionsfaktor, dessen Bildung von seiner  $\alpha$ -Untereinheit begrenzt wird. Auch unter normoxischen Bedingungen wird HIF-1 $\alpha$  exprimiert. Die Untereinheit ist unter Normoxie allerdings durch post-translationale Modifikationen instabil und wird proteolytisch abgebaut (64,65). Durch Hypoxie oder andere Stressoren kann die Expression von HIF-1 $\alpha$  hochreguliert und HIF-1 $\alpha$  stabilisiert werden, wodurch es zur Bildung von HIF-1 kommt. HIF-1 hat u. a. Einfluss auf die Angiogenese, die Zellproliferation und das Zellüberleben (22,65–68). Im PDL kann er die Expression von RANKL fördern und darüber indirekt die Differenzierung von Osteoklasten und die Knochenresorption begünstigen (22).

#### **2.2.2.2 Die Rolle von PdLF im Rahmen der OTM**

PdLF sind sowohl bei der Mastikation als auch bei der OTM mechanischen Kräften ausgesetzt. (11,69). Es wird angenommen, dass PdLF die ersten Zellen im PDL sind, die auf mechanische Belastung reagieren. Schon nach wenigen Stunden zeigen sie strukturelle und metabolische

Anpassungen (44,70,71). Das Zytoskelett wird reorganisiert, was sich an einer veränderten Form und Beweglichkeit der Zellen nach mechanischer Belastung zeigt (19,69).

PdLF spielen eine Schlüsselrolle für die Homöostase des PDL, des Alveolarknochens und des lokalen Immunmikromilieus (23,32). Proteinkinasen werden aktiviert, Phosphorylierungsstellen freigelegt und Signaltransduktionskaskaden gestartet. Über die Produktion pro- und anti-inflammatorischer Zytokine abhängig von der mechanischen Belastung sind PdLF entscheidend an der Regulation der sterilen Entzündung in der Initialphase der OTM beteiligt (19,32,50,69,72–74).

Insgesamt ist festzuhalten, dass PdLF vielfältige Funktionen in der Immunregulation sowie beim Gewebeumbau von periodontalem Weich- und Hartgewebe haben. Die adäquate Funktion der PdLF ist damit unerlässlich für den Erfolg einer OTM.

### **2.2.2.3 Das pro-inflammatorische Zytokin IL-6 und seine Bedeutung für die OTM**

IL-6 ist ein pro-inflammatorisches Zytokin, das von Fibroblasten, Makrophagen, Lymphozyten und Endothelzellen exprimiert wird (19,22,75). Auch in PdLF wurde die Produktion von IL-6 nachgewiesen (76–78). IL-6 hat wichtige Funktionen in der Immunantwort und der Regulation von entzündlichen Prozessen (75,79). In den ersten 24 h der OTM konnten erhöhte Expressionslevel von IL-6 festgestellt werden. Dies lässt vermuten, dass IL-6 an der sterilen Entzündung in der Initialphase der OTM beteiligt ist (19,77,78,80).

Darüber hinaus gilt IL-6 als ein wichtiger Regulator des Knochenbaus (81). In Osteoblasten und Osteozyten soll IL-6 die RANKL-Expression induzieren. Auch soll es die Apoptose von Osteoklasten unterdrücken und ihr Ansprechen auf RANKL erhöhen. Über diese Mechanismen scheint IL-6 die Knochenresorption während der OTM zu begünstigen (46,82,83).

IL-6 wird auch eine hohe klinische Relevanz zugeschrieben. Es soll die Neuroinflammation fördern und darüber zu Schmerzen während der OTM führen (83). Zudem wird IL-6 als klinischer Biomarker diskutiert, der Rückschlüsse auf die Wirksamkeit der kieferorthopädischen Therapie ermöglicht (84).

## **2.3 In vitro Modelle zur statisch-mechanischen Druckbelastung von humanen PdLF (HPdLF)**

Um zelluläre und molekulare Reaktionen von PDL-Zellen auf mechanische Druckbelastung untersuchen zu können, wurden inzwischen mehrere in vitro Modelle entwickelt (85).

Das 2D in vitro Modell ist ein einfaches Modell, das von Kanzaki et al. (74) etabliert worden ist. Es erfordert keine speziellen Geräte und wurde bereits von vielen Arbeitsgruppen genutzt. Ein Glaszylinder wird dabei auf einen kultivierten Zellmonolayer platziert und übt eine statische, unidirektionale Kraft auf die Zellen aus (74,85,86). Aus zahlreichen Veröffentlichungen geht hervor, dass die mechanische Druckbelastung von humanen PdLF (HPdLF) mit Glaszylindern zu einer verstärkten Expression verschiedener Entzündungsmediatoren, wie Interleukinen und Prostaglandinen, führt (43,71,76,87).

Um die physiologischen Bedingungen der HPdL-Zellen nachahmen zu können, wurden 3D in vitro Modelle entwickelt (88–90). Die HPdL-Zellen wurden dafür in eine gelartige Matrix eingebracht, die die extrazelluläre Matrix des PDL möglichst imitieren sollte. Als Materialien für die nachempfundene dreidimensionale Matrix wurden u. a. Gele auf Basis synthetischer Polymere, Kollagengele und Hydrogele verwendet (91–93). Das 3D in vitro Modell erlaubt es im Vergleich zum 2D in vitro Modell, mechanischen Druck indirekt über die nachempfundene extrazelluläre Matrix auf HPdLF zu übertragen, was der in vivo Druckübertragung während der OTM ähnelt (69). Der mechanische Druck wurde u. a. über das Gel flankierende bewegliche Platten oder über aufgelegte Gewichte auf das Gel ausgeübt (89,90,93). In einer vergleichenden Studie an HPdLF in einem 2D und in einem 3D in vitro Kompressionsmodell konnten bei gleicher mechanischer Druckbelastung unterschiedliche Genexpressionen festgestellt werden (92). Im Rahmen dieser Arbeit sollen ein zweidimensionales (2D) und ein dreidimensionales (3D) in vitro Modell zur statisch-mechanischen Druckbelastung von HPdLF verglichen werden.

## **2.4 Die juvenile idiopathische Arthritis (JIA)**

### **2.4.1 Die Inzidenz und das Krankheitsbild der JIA**

Die juvenile idiopathische Arthritis (JIA) ist die häufigste entzündlich-rheumatische Erkrankung des Kindesalters und umfasst sieben Unterformen (94). In Europa hat die JIA eine Prävalenz von 1 zu 1000 Kindern im Alter zwischen 0 und 15 Jahren (95). Zu den Hauptsymptomen der JIA gehören arthritische Gelenkveränderungen, die sich klinisch in Schmerzen, Schwellung und Steifigkeit des betroffenen Gelenks zeigen können. Jedes Gelenk des Körpers kann befallen sein, einschließlich des Kiefergelenks. Für die Diagnosestellung einer JIA müssen die Symptome vor dem 16. Lebensjahr auftreten und über einen Zeitraum von mindestens 6 Wochen anhalten. Die genauen Ursachen der JIA sind bislang nur unvollständig geklärt. Es wird vermutet, dass ein Zusammenspiel genetischer Faktoren, immunologischer Faktoren und Umweltfaktoren zur Krankheitsentstehung beiträgt (94,96–98). Wie auch andere rheumatische

Erkrankungen ist die JIA durch eine abnorme Aktivierung von Immunzellen und eine Dysregulation im Gleichgewicht zwischen pro- und anti-inflammatorischen Mediatoren gekennzeichnet. Erhöhte Level von pro-inflammatorischen Mediatoren, wie TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6 und IL-17 lassen sich im Plasma und in der Synovialflüssigkeit von Patienten mit JIA feststellen. Die Zytokine sind wichtige Zielstrukturen in der Behandlung der JIA (97,99).

#### **2.4.2 Der Einfluss der JIA auf die kraniofaziale Morphologie**

Ein erheblicher Anteil der Kinder mit JIA weist eine Kiefergelenksbeteiligung auf. Bildmorphologische Untersuchungen haben gezeigt, dass bei ca. 90 % der Kinder mit JIA durch Magnetresonanz- oder Computertomographie arthritische Veränderungen des Kiefergelenks nachgewiesen werden können (95,98,100,101). Oftmals bleiben diese Veränderungen lange asymptomatisch, sodass die Kiefergelenksbeteiligung erst spät erkannt wird (95). Die verzögerte Behandlung kann mit fazialen Asymmetrien und einem verminderten sagittalen und vertikalen Wachstum des Unterkiefers einhergehen. Daraus können wiederum eine skelettale Klasse II Malokklusion und ein offener Biss resultieren. Insgesamt reduzieren diese Veränderungen nachweislich die gesundheitsbezogene Lebensqualität, indem sie zu funktionellen und ästhetischen Einschränkungen sowie zu orofazialen Schmerzen führen können (100,102–104). Zur Behandlung von oro- und dentofazialen Veränderungen im Rahmen der JIA wird ein interdisziplinäres Therapiekonzept empfohlen. Sowohl die kieferorthopädische als auch die medikamentöse Behandlung sind wichtige Säulen der JIA-Therapie bei Kiefergelenksbeteiligung (105,106).

#### **2.4.3 Die medikamentöse Therapie der JIA**

##### **2.4.3.1 Empfehlungen zur medikamentösen Therapie der JIA gemäß der S2-Leitlinie der AWMF (2019)**

Aus der Leitlinie der AWMF zur Therapie der JIA von November 2019 gehen die Richtlinien zur medikamentösen Therapie der JIA hervor. Durch die Therapie sollen eine rasche Remissionsinduktion und Schmerzfreiheit sowie eine Kontrolle der Krankheitsaktivität erreicht werden. Zu beachten ist, dass sich die Richtlinien abhängig vom Subtyp der JIA unterscheiden können (107).

Gemäß der Leitlinie sind vier Medikamentengruppen zur Behandlung der JIA geeignet: Nichtsteroidale Antirheumatika (NSAR), wie Ibuprofen und Diclofenac, werden bei allen Unterformen der JIA zur Symptomverbesserung als begleitende Therapie empfohlen. Darüber hinaus

können Glukokortikoide intraartikulär injiziert oder bei hoher Krankheitsaktivität systemisch verabreicht werden. Konventionelle systemische Disease-modifying anti-rheumatic drugs (DMARDs), wie Methotrexat (Mtx), werden zur Stabilisierung der Krankheitsaktivität und zur Remissionsinduktion eingesetzt. Sofern die Therapie mit konventionellen systemischen DMARDs keine Remission bewirkt, soll eine Therapieeskalation mit biologischen DMARDs erfolgen. Dabei handelt es sich um Antikörpertherapien, die gegen pro-inflammatorische Zytokine (TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1) gerichtet sind. Abhängig von der Schwere, der Aktivität und dem Risikoprofil soll eine geeignete medikamentöse Kombinationstherapie gewählt werden (107).

#### **2.4.3.2 Methotrexat als wichtiger Wirkstoff zur medikamentösen Behandlung der JIA**

Methotrexat (Mtx, 4-Desoxy-4-Amino-10-Methylfolsäure) ist ein wichtiger Bestandteil in der medikamentösen Therapie der JIA. Bei der polyartikulären Unterform der JIA gilt Mtx als Erstlinientherapie und bei den anderen Unterformen wird Mtx nach fehlendem Ansprechen der Therapie mit NSAR oder Glukokortikoiden empfohlen. Zur Therapie der JIA wird Mtx in niedriger Dosis eingesetzt. Es werden wöchentliche Dosen von 10-15 mg/m<sup>2</sup> Körperoberfläche verabreicht (107).

In der niedrigen Dosis hat Mtx über verschiedene Mechanismen einen anti-inflammatorischen Effekt: Als Folsäureanalogon hemmt es die Dihydrofolat-Reduktase, wodurch die Synthese von Purinen und Pyrimidinen reduziert wird. Diese sind wichtige Bausteine der De-novo-Synthese von DNA und RNA, die für die Zellproliferation und die Zellteilung essenziell sind. Durch den Mangel an Purinen und Pyrimidinen wird besonders die Proliferation von sich schnell teilenden Zellen, wie Immunzellen, gehemmt. Dies führt zu einer verringerten Zytokinproduktion und beeinflusst die Entzündungsreaktion (108–110). Darüber hinaus wurde gezeigt, dass Mtx über die Steuerung von intrazellulären Signalwegen an der Regulation der pro-inflammatorischen Genexpression beteiligt ist. Es hemmt den Transkriptionsfaktor „Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NF- $\kappa$ B)“, wodurch die Expression von pro-inflammatorischen Zytokinen, wie IL-6 und TNF- $\alpha$ , reduziert wird (108,111). Ein weiterer anti-inflammatorischer Effekt von Mtx wird über erhöhte Adenosinspiegel bewirkt. Durch die Anreicherung von Adenosin werden G-Protein-gekoppelt Adenosinrezeptoren stimuliert, was über intrazelluläre Signalkaskaden ebenfalls zu einer reduzierten Produktion von pro-inflammatorischen Zytokinen führt (IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ , MMPs) (108).

In zahlreichen Studien wurde der Effekt von konventionellen systemischen DMARDs auf das Parodontium bei Patienten mit Rheumatoider Arthritis (RA) untersucht (112). Zum Effekt von

Mtx auf die Genexpression von PDL-Zellen während der OTM scheinen bisher wenige Daten vorzuliegen.

### 3 Material

#### 3.1 Laborgeräte

Tabelle 1: Auflistung der verwendeten Laborgeräte

Funktion	Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Kühlung	+4 °C Kühl-schrank	CNP 4813-23	Liebherr (Deutschland)
	-20 °C Gefrier-schrank	LGUex 1500 MediLine	Liebherr (Deutschland)
		CNP 4813-23	
	-80 °C Gefrier-schrank	ULT Freezer 264 Eco Premium	VWR (USA)
Messung	PCR-Gerät	PeqStar 96X universal	Peqlab (Deutschland)
		CFX Connect	Bio-Rad (USA)
	Präzisionswaage	Entris	Sartorius (Deutschland)
	Spektralphotometer	NanoDrop One	Thermo Scientific (USA)
		VersaMax Microplate Reader	Molecular Devices (USA)
	SpectraMax iD5	Molecular Devices (USA)	
Pipetten	Einkanalpipetten	Pipetman	Gibson (USA)
		Research	Eppendorff (Deutschland)
	Pipettierhilfe	Pipetboy	Integra (Schweiz)
Zellkultur	Brutschrank	MCO-170AICUVH-PE	PHCbi (Japan)
	Bioreaktor	FX-5000™ Compression System	Flexcell (USA)
	Kompressor	DK50-10S/M	Ekomp (Tschechien)
	Mikroskope	DMi1 Inverted Microscope	Leica Microsystems (Deutschland)
		Rebel	Echo (Japan)
		Incucyte Lebenszellanalyse	Sartorius (Deutschland)
		Elektronenmikroskop Philips XL30 ESEM	Philips (Niederlande)
		Fluoreszenzmikroskop Eclipse TE2000-U	Nikon (Japan)
	Pumpe	Leybonol LVO 100	Leybold (Deutschland)
	Sterile Werkbank	S2020 1.2	Thermo Scientific (USA)
Zellzählgerät	Luna II Automatic Cell Counter	Logos Biosystems (Südkorea)	
Zentrifugen	Kühlzentrifuge	Heraeus Megafuse 16	Thermo Scientific (USA)
		Heraeus Fresco 21	
	Tischzentrifuge	Galaxy mini star	VWR (USA)

<b>Funktion</b>	<b>Gerät</b>	<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
<b>Sonstige Geräte</b>	Dampfsterilisator	Varioklav Classic 300 EP-Z-RL	HP Medizintechnik GmbH (Deutschland)
	Eismaschine	ZBE 70-35 CoolNat	Ziegler (Deutschland)
	PCR Werkbank	PCR Workstation Pro	PeqLab (Deutschland)
	Thermoschüttler	Thermomixer compact	Eppendorf (Deutschland)
	Vibrations- mischer	Vortex Genie 2	Scientific Industries (USA)
Vortex Mixer SA8		Stuart (UK)	

### 3.2 Verbrauchs- und wiederverwendbare Materialien

Tabelle 2: Auflistung der verwendeten Verbrauchs- und Mehrwegmaterialien

<b>Artikel</b>	<b>Beschreibung</b>	<b>Hersteller</b>
Einweg-Auslaufpipetten	5 ml	Greiner (Österreich)
	10 ml	
	25 ml	
Kunststoff-Pipettenspitzen	0,5 – 10 µl	Eppendorf (Deutschland) Thermo Scientific (USA)
	10 – 100 µl	
	100 – 1000 µl	
Reaktionsgefäße	1,5 ml	Eppendorf (Deutschland)
	2 ml	
Kryokonservierungsgefäß	1,5 ml	Fisher Scientific (USA)
Einfrierbehälter	CoolCell LX, -1 °C/min	Corning (USA)
Zellkulturflaschen Filter Top	25 cm <sup>2</sup> (50 ml)	Greiner (Österreich)
	75 cm <sup>2</sup> (250 ml)	
	175 cm <sup>2</sup> (550 ml)	
6-Well Zellkulturplatten	Kulturfläche je Vertiefung: 9,6 cm <sup>2</sup>	Greiner (Österreich)
24-Well Zellkulturplatten	Kulturfläche je Vertiefung: 1,75 cm <sup>2</sup>	Greiner (Österreich)
Mikroskopiekammer „Chamber Slide“	4-Kammersystem auf einem Objektträger	Falcon (USA)
6-Well „Biopress™ Com- pression“ Zellkulturplatte	Kulturfläche je Vertiefung: 9,62 cm <sup>2</sup> , enthält ringförmige Schaumstoff-Probenhalter	Flexcell (USA)
Edelstahlringe	Durchmesser 13 mm, Höhe 5 mm	Technische Werkstatt der Universitätsmedizin Mainz
„Compression Stationary Platens“	Werden als Aufsätze zur Druckapplikation in „Bio- press™ Compression“ Zell- kulturplatten verwendet	Flexcell (USA)
Zellzählkammern	Zur Zellzählung am Luna II	Logos Biosystems (Südkorea)
		Neubauer LO Laboroptik (UK)

Artikel	Beschreibung	Hersteller
PCR-Gefäße	96-Well Platte für qRT-PCR	Bio-Rad (USA)
	8-Well Streifen für cDNA-Synthese	Brand GmbH (Deutschland)
Zentrifugenröhrchen	15 ml	Greiner (Deutschland)
	50 ml	
Deckgläschen	Rund, 13 mm	Sarstedt (Deutschland)

### 3.3 Reagenzien, Puffer und Lösungen

#### 3.3.1 Reagenzien

Tabelle 3: Auflistung der verwendeten Chemikalien und Medien

Substanz	Hersteller
Accutase	Sigma-Aldrich (USA)
$\beta$ -Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich (USA)
DEPC (Diethylpyrocarbonat)	Gibco (USA)
DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium)	Thermo Fisher Scientific (USA)
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Sigma-Aldrich (USA)
Ethanol	AppliChem GmbH (Deutschland)
FBS (fetal bovine serum)	Bio & Sell (Frankreich)
Fluorescent Mounting Medium	Vector Laboratories (USA)
Isopropanol	Hedinger (Deutschland)
Kollagenase	Advanced BioMatrix (USA)
L-Ascorbinsäure	Sigma-Aldrich (USA)
L-Glutamin	Sigma-Aldrich (USA)
MTT (Methylthiazolyldiphenyl-tetrazoliumbromid)	Sigma-Aldrich (USA)
Natriumhydroxid	Advanced BioMatrix (USA)
Osmiumtetraacetat	Roth (Deutschland)
Paraformaldehyd (4%), Glutaraldehyd (0,5 %) in PBS	Morphisto (Deutschland)
PBS (phosphate buffered saline)	Sigma-Aldrich (USA)
Penicillin-Streptomycin	Sigma-Aldrich (USA)
PureCol (Type I, Bovine Collagen Solution)	Advanced BioMatrix (USA)
RPMI-1640 Medium	Sigma-Aldrich (USA)
Triton X-100	Sigma-Aldrich (USA)
Trypanblaulösung 0,4 %	Roth (Deutschland)

#### 3.3.2 Puffer und Lösungen

Tabelle 4: Auflistung der verwendeten Puffer und Lösungen

Name	Zusammensetzung
DEPC-Wasser	DNA-H <sub>2</sub> O mit 0,1 Vol% DEPC, autoklaviert
Ethanol, 70 %	70 % Ethanol in DNA-H <sub>2</sub> O
Kollagenase-Lösung	5 mg/ml Kollagenase gelöst in PBS
RLT-Puffer	Zellysepuffer (Qiagen) mit Guanidinthiocyanat

### 3.4 Stimulantien und Wirkstoffe

Tabelle 5: Auflistung des verwendeten Wirkstoffs

Name	Konzentration der Stammlösung	Hersteller
Fibroblast Growth Factor (FGF)	100 µg/ml gelöst in PBS	Gibco (USA)
Methotrexat (Mtx)	5 mg/ml gelöst in NaCl	Apotheke der Universitätsmedizin Mainz

### 3.5 Kits

Tabelle 6: Auflistung der verwendeten Kits

Name	Verwendung	Hersteller
RNeasy Mini Kit Nr. 74106	RNA-Extraktion	Qiagen (Niederlande)
RNase free DNase Set Nr. 79254	DNA-Verdau	Qiagen (Niederlande)
Human IL-6 DuoSet ELISA DY206-05	ELISA	R&D Systems (USA)
iScript cDNA Synthesis Kit	Reverse Transkription	Bio-Rad (USA)
iQ SYBR Green Supermix	qRT-PCR	Bio-Rad (USA)

### 3.6 Oligonukleotide

Tabelle 7: Auflistung der verwendeten qRT-PCR-Primer

Name	5'-Primer	3'-Primer	Hersteller
IL-6	TGG CAG AAA ACA ACC TGA ACC	CCT CAA ACT CCA AAA GAC CAG TG	Eurofins Genomics (Deutschland)
RPL22	TGA TTG CAC CCA CCC TGT AG	GGT TCC CAG CTT TTC CGT TC	
HIF-1 $\alpha$	GCA GCT ACT ACA TCA TCT TCT T	CAG CAG TCT ACA TGC TAA ATC A	

### 3.7 Antikörper für Fluoreszenzmikroskopie

#### 3.7.1 Primärantikörper

Tabelle 8: Auflistung des verwendeten Primärantikörpers für Fluoreszenzmikroskopie

Name	Verdünnungs-faktor	Verdünnungs-lösung	Sekundäranti-körper	Hersteller
anti-Vimentin	1:250	1 % BSA in PBS	anti-rabbit	Abcam (UK)

### 3.7.2 Sekundärantikörper

Tabelle 9: Auflistung des verwendeten Sekundärantikörpers für Fluoreszenzmikroskopie

Name	Konjugiert an	Verdünnung	Verdünnungs- lösung	Hersteller
Anti-rabbit	Alexa Fluor 594	1:50	1 % BSA in PBS	Life Technologies (USA)

### 3.8 Fluoreszenzfarbstoff

Name	Verdünnung	Verdünnungslösung	Hersteller
Cell Tracker Red CMTPX	5 µM	DMEM (ohne FCS- Zusatz)	Invitrogen (USA)

### 3.9 Zellsystem

Tabelle 10: Auflistung des verwendeten Zellsystems

Zellsystem	Hersteller und Informationen zum Zellsystem
“Clonetics™ Human Periodontal Ligament Fibroblast Cell System (HPdLF)”	Unveränderte, humane Fibroblasten aus dem Periodontalligament Hersteller: Lonza (USA) Kennziffer der HPdLF: CC-7049 Initiale Kultivierung der kryokonservierten HPdLF mittels SCGM™ BulletKit, CC-3205, Lonza (USA)

## 4 Methoden

### 4.1 Zellbiologische Arbeitsmethoden

Die nachfolgenden zellbiologischen Arbeiten an HPdLF wurden zur Vermeidung von Kontaminationen unter einer sterilen Reinluftwerkbank durchgeführt. Zudem wurden sämtliche Arbeitsmaterialien nur steril verpackt oder autoklaviert verwendet. Instrumente, Geräte und Arbeitsoberflächen wurden vor dem Gebrauch mit 70%igem Ethanol wischdesinfiziert.

#### 4.1.1 Kultivierung von HPdLF

Die adhärennten HPdLF wurden in Brutschränken mit einer Temperatur von 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>-Begasung und gesättigter Wasserdampfatosphäre kultiviert. Zellkulturflaschen mit einer Wachstumsfläche von 175 cm<sup>2</sup> und Filterschraubverschluss stellten einen Gasaustausch während der Zellkultivierung sicher. Es wurde ein zellspezifisches Kulturmedium eingesetzt, dessen genaue Zusammensetzung aus Tabelle 9 zu entnehmen ist. Durch den Zusatz von Antibiotika (Penicillin, Streptomycin) sollten bakterielle Kontaminationen des Kulturmediums vermieden werden. Das Kulturmedium wurde bei +4 °C gelagert. Vor dem Kontakt mit HPdLF wurden das Kulturmedium und andere Lösungen auf Raumtemperatur erwärmt, um den Zellstress möglichst gering zu halten.

**Tabelle 11: Auflistung der Bestandteile des Zellkulturmediums**

<b>Zusammensetzung des Zellkulturmediums</b>
DMEM
10 % FBS
100 U/ml Penicillin
100 U/ml Streptomycin
50 mg/L L-Ascorbinsäure

Um ideale Wachstumsbedingungen zu gewährleisten, wurden die HPdLF regelmäßig lichtmikroskopisch auf ihre Zelldichte bzw. -konfluenz hin beurteilt. Bei einer Zelldichte von ca. 80 % wurden die Zellen subkultiviert. Hierzu wurden das Kulturmedium vollständig abgenommen und die Zellen mit Phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) gewaschen und je nach Fläche der Zellkulturflaschen wurden 3-5 ml Accutase aufgetragen und für 5 min im Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Durch proteolytische und kollagenolytische Reaktionen der Accutase wurden die HPdLF vom Boden der Zellkulturflaschen gelöst. Um die Zellkultur zu erhalten, wurden ein Teil der gelösten HPdLF in frischem Kulturmedium aufgenommen und in Zellkulturflaschen weiter kultiviert. Der nicht für den Erhalt der Zellkultur benötigte Anteil der Zellsuspension stand für Zellkulturexperimente oder zur Kryokonservierung (Kapitel 4.1.2) zur Verfügung.

#### **4.1.2 Kryokonservierung und Rekultivierung von HPdLF**

Zur Sicherstellung eines dauerhaften Erhalts der Zelllinie wurden die HPdLF in einer Konzentration von  $10^6$  Zellen/ml kryokonserviert und langzeitgelagert. Dazu wurde die gelösten Zellen zunächst für fünf Minuten in einem 15 ml-Zentrifugenröhrchen bei 1200 Umdrehungen pro Minute (revolutions per minute, rpm) und 22 °C zentrifugiert. Das entstandene Zellpellet wurde in fetalem Kälberserum (fetal bovine serum, FBS) mit 10 % Dimethylsulfoxid (DMSO) resuspendiert und in ein 1,5 ml-Kryokonservierungsröhrchen transferiert. Das Einfrieren erfolgte schrittweise: Zunächst wurden die Kryokonservierungsröhrchen in einer mit Isopropanol befüllten Einfrierbox bei -80 °C für 24 Stunden gelagert. Dies stellt ein langsames Einfrieren mit einem Temperaturabsinken von 1 °C pro Minute sicher, wodurch Gefrierschäden verhindert werden sollen. Im Anschluss erfolgte eine Langzeitlagerung in einem Stickstofftank bei -196 °C. Bei dieser Lagerung kommt der Stoffwechsel der Zellen vollständig zum Erliegen, ohne dass die Ausgangseigenschaften der Zellen verloren gehen.

Zum Rekultivieren wurden die Zellen unmittelbar nach Entnahme aus dem Stickstofftank in einem 37 °C temperierten Wasserbad aufgetaut und in 5 ml Kulturmedium aufgenommen. Um das bei Raumtemperatur zelltoxisch wirkende DMSO aus der Suspension zu entfernen, wurde die Suspension für fünf Minuten bei 1200 rpm und 22 °C zentrifugiert und das entstandene Zellpellet wurde in 10 ml Kulturmedium resuspendiert. Zum Anwachsen der Zellen folgte eine 24-stündige Kultivierung in einer 25 cm<sup>2</sup>-Zellkulturflasche mit Filterschraubverschluss. Anschließend wurden die Zellen in eine 75 cm<sup>2</sup>-Zellkulturflasche, später in eine 175 cm<sup>2</sup>-Zellkulturflasche mit 20 ml Kulturmedium überführt.

#### **4.1.3 Bestimmung der Lebendzellzahl**

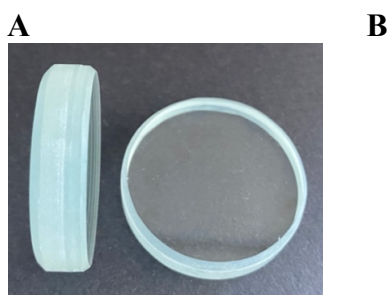
Für die Zellkulturexperimente sollte eine festgelegte Anzahl an vitalen Zellen in Multiwellplatten ausplattiert bzw. zur Herstellung von HPdLF-Kollagengelen eingesetzt werden. Dafür wurde nach dem Ablösen der HPdLF von den Zellkulturflaschen die Lebendzellzahl mithilfe eines Zellzählgeräts bestimmt. Die Zellsuspension wurde zunächst im Verhältnis 1:1 mit einer 0,4%igen Trypanblau-Lösung versetzt. Trypanblau ist ein anionischer Farbstoff, der nicht membrangängig ist. Nur von abgestorbenen und perforierten Zellen wird Trypanblau aufgrund der Permeabilität ihrer Zellmembran aufgenommen. Die geschädigten Zellen werden dadurch blau gefärbt und sie werden bei der anschließenden Zählung der vitalen Zellen nicht berücksichtigt. Das Gemisch wurde auf einen gerätespezifischen Kammerobjektträger aufgetragen und es erfolgte eine automatisierte Hellfeldzellzählung mit Bestimmung der Lebendzellzahl.

Zur Kontrolle wurde die Messung wiederholt und die Ergebnisse der Lebendzellzahl wurden gemittelt.

Alternativ wurde die Lebendzellzahl lichtmikroskopisch unter Verwendung einer Neubauer Zählkammer bestimmt. Der Kammerboden der Neubauer Zählkammer wird von höher liegenden Trägerstegen flankiert, auf die ein Deckglas unter Bildung Newtonscher Ringe positioniert wird. Oberhalb des Kammerbodens entsteht so ein Raum mit einer Kammertiefe von 0,1 mm. Auf dem Kammerboden befindet sich ein Zählfeld aus  $3 \times 3$  Großquadraten von je  $1 \text{ mm}^2$ . Jedes Großquadrat ist wiederum in 16 Einzelquadrate unterteilt. Die auszuzählende Zellsuspension wurde im Verhältnis 1:2 mit der 0,4 %igen Trypanblau-Lösung versetzt. Die Suspension wurde auf die Neubauer Zählkammer aufgetragen und gelangte durch Kapillarkräfte in die Zählkammer. Unter einem Lichtmikroskop wurden die vitalen, farblosen Zellen von drei Großquadraten gezählt. Durch Multiplizieren der ermittelten Zellzahl in drei Großquadraten mit dem Kammerfaktor  $10^4$  sowie dem Verdünnungsfaktor wurde die Lebendzellzahl bestimmt.

#### 4.1.4 Herstellung des 2D in vitro Modells und statisch-mechanische Druckbehandlung durch Glasplatten

Zur Herstellung des 2D in vitro Modells wurden die HPdLF in 6-Wellplatten ausgesät. Pro Well wurden  $7 \times 10^4$  HPdLF in 2 ml Kulturmedium ausplattiert. Nach einer Inkubation über 24 h im Brutschrank präsentierte sich lichtmikroskopisch ein HPdLF-Zellmonolayer am Boden der Zellkulturplatte. Auf den Zellmonolayer wurde vorsichtig eine sterile Glasplatte (17,1 g; 33 mm Durchmesser) platziert (Abb. 4A). Durch die Glasplatte wurde der Zellmonolayer mit einem statisch-mechanischen Druck von  $2 \text{ g/cm}^2$  belastet. Die statisch-mechanische Belastung erfolgte



**Abbildung 4:** Glasplatten wurden zur statisch-mechanischen Druckbehandlung ( $2 \text{ g/cm}^2$ ) von HPdLF im 2D in vitro Modell eingesetzt

In Abb. A sind die zur statisch-mechanischen Druckbehandlung verwendeten Glasplatten in der seitlichen und der frontalen Ansicht dargestellt. Aus Abb. B geht der Versuchsaufbau im 2D in vitro Modell hervor. Es wurden initial 70.000 HPdLF/Well ausgesät. Zur statisch-mechanischen Druckbehandlung wurde eine Glasplatte auf den HPdLF Monolayer gelegt. Durch die Glasplatte wirkt eine Kraft von  $2 \text{ g/cm}^2$ . Zur Kontrolle blieb ein Teil der Wells mechanisch unbehandelt. Abb. B aus Kirschnock et al., 2017 (86). Die Abbildungsbeschriftung wurde modifiziert.

te über 24 h und unter Inkubation im Brutschrank. Gleichzeitig wurden Zellen zur Kontrolle über denselben Zeitraum und unter denselben Bedingungen ohne mechanische Druckapplikation inkubiert (Abb. 4B).

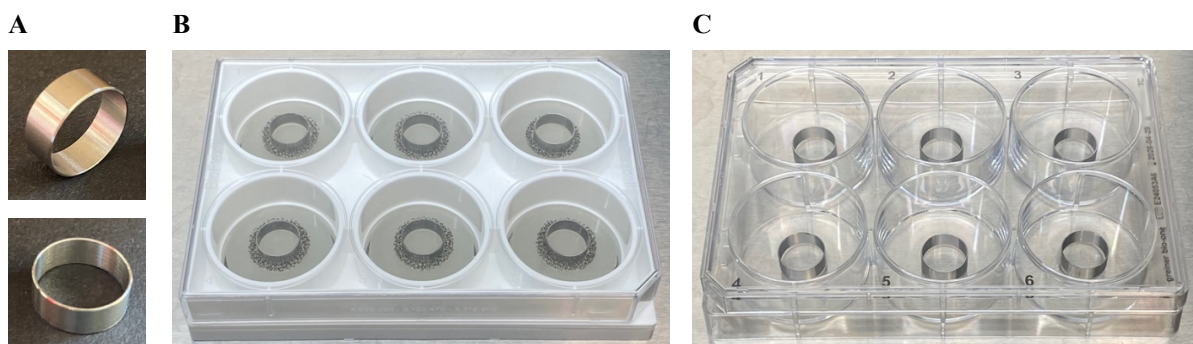
#### 4.1.5 Herstellung des 3D in vitro Modells und statisch-mechanische Druckbehandlung durch das Flexcell FX-5000™ Compression System

Für das 3D in vitro Modell wurden HPdLF in ein dreidimensionales Kollagengel eingebettet. Das Kollagengel wurde entsprechend den Angaben in Tabelle 12 angesetzt.

**Tabelle 12: Zusammensetzung des Kollagengels**

Komponente	Volumen pro Gelansatz
PureCol (Type I, Bovine Collagen Solution, 3 mg/ml)	400 µl
10 x RPMI-1640 Medium	50 µl
Natriumhydroxid	abhängig vom Farbumschlag

Um ein vorzeitiges Aushärten des Gels zu verhindern, wurden alle Materialien durchgängig auf Eis gelagert und auch das Ansetzen des Gels selbst erfolgte auf Eis. Natriumhydroxid wurde dem Gel als letzte Komponente zugefügt. Durch Natriumhydroxid erhöht sich der pH-Wert der Lösung, was die intermolekularen Wechselwirkungen im Kollagen fördert und zur Gelbildung führt. Der Anstieg des pH-Wertes ist durch einen konstanten Farbumschlag des Gels in den orangenen Farbbereich zu erkennen. Das flüssige Gel wurde nun mit HPdLF ( $1 \times 10^6$  Zellen/ml



**Abbildung 5: Zylinder-Negativformen wurden zum Gießen der Gele in Zellkulturplatten für das 3D in vitro Modell verwendet**

In Abb. A sind die Zylinder-Negativformen aus Edelstahl aus zwei verschiedenen Perspektiven dargestellt. Sie haben einen Durchmesser von 13 mm. In Abb. B ist eine „Biopress™ Compression“ Zellkulturplatte gezeigt. Die Zylinder-Negativformen wurden in den Schaumstoffring der Zellkulturplatte platziert. In Abb. C wurden die Zylinder-Negativformen in Kontrollplatten gelegt. Das noch flüssige Gel-Zell-Gemisch wird in die Zylinder-Negativformen in beiden Zellkulturplatten eingefüllt. Nach der Aushärtung haben die Gele eine Zylinderform.

Gel) versetzt. Zudem wurde ein Fibroblasten-spezifischer Wachstumsfaktor (Fibroblast Growth Factor, Einsatz von 1 ng/ml Gel) in das HPdLF-Kollagengel hinzugefügt.

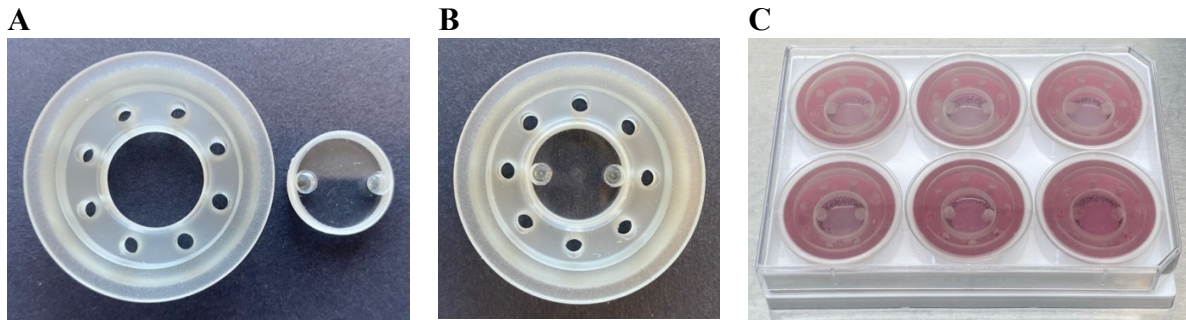
Speziell angefertigte Zylinder-Negativformen aus Edelstahl (13 mm Durchmesser, Abb. 6A) wurden in „Biopress™ Compression“ Zellkulturplatten (Abb. 6B) und in reguläre Kontrollplatten (Abb. 6C) platziert. Je 500 µl des flüssigen HPdLF-Kollagengels wurden in die Edelstahlringe eingefüllt und die Gele wurden nach Aushärtung bei 37 °C im Inkubator mit 3 ml Zellkulturmedium überschichtet.

Nach einer Inkubationszeit von 3-4 Tagen wurden die Edelstahlringe vorsichtig entfernt und die HPdLF-Kollagengele wurden mithilfe eines regulierbaren Luftdrucks einer statisch-mechanischen Druckkraft über 24 h ausgesetzt. Hierfür kam das computergesteuerte „Flexcell FX-5000™ Compression“ System (Abb. 6) zum Einsatz.

**Abbildung 6: Aufbau des „Flexcell FX-5000™ Compression“ Systems**

Der Controller (FX5000) ist die zentrale Steuereinheit des Systems. Er verbindet eine Grundplatte (Baseplate) im Inkubator mit einem Computer. In die Grundplatte werden die „Biopress™ Compression“ Zellkulturplatten eingesetzt. Über den Computer legt der Benutzer eine individuelle Druckbehandlung fest, indem er u. a. die Dauer, die Art (statisch/dynamisch) und die Stärke der Druckapplikation wählt. Mithilfe eines Kompressors (Compressed Air Source) wird entsprechend der gewählten Druckbehandlung ein Überdruck erzeugt. Durch ein Schlauchsystem (Tubing) wird der Überdruck auf die Grundplatte bzw. auf die darin eingesetzten Zellkulturplatten übertragen. Abb. aus „Flexcell FX-5000™ Compression“ Benutzerhandbuch (113).

Zunächst wurden „Stationary platens“ (Abb. 7A und 7B) auf jedes Well der „Biopress™ Compression“ Zellkulturplatten aufgesetzt (Abb. 7C). Der bewegliche Inneneinsatz der „Stationary platens“ wurde so eingestellt, dass er die Oberfläche des HPdLF-Kollagengels berührte. Das Gel wurde damit räumlich zu allen Seiten begrenzt, ohne komprimiert zu werden.



**Abbildung 7: „Stationary platens“ werden den Wells der „Biopress™ Compression“ Zellkulturplatten aufgesetzt**

In Abb. A sind die Bestandteile einer „Stationary platen“ dargestellt. Sie besteht aus einem äußeren Ring (links) und einem zylinderförmigen Inneneinsatz (rechts). In Abb. B ist die „Stationary platen“ zusammengesetzt gezeigt. Der Inneneinsatz wurde über sein Gewinde in den äußeren Ring eingedreht. In Abb. C sind die „Stationary platens“ aufgesetzt auf die Wells der „Biopress™ Compression“ Zellkulturplatten dargestellt. Der Inneneinsatz wird gedreht, bis er die Oberfläche der Gele im Well berührt.

Die „Biopress™ Compression“ Zellkulturplatten wurden in eine Grundplatte (Baseplate) eingesetzt und darin durch Schraubzwingen fixiert (Abb. 8A). Ein Gummieinsatz sorgt für eine vollständige Abdichtung zwischen den Zellkulturplatten und der Grundplatte. Anschließend wurde die statisch-mechanische Druckbelastung durch das „Flexcell FX-5000™ Compres-

**A**

**B**

**Abbildung 8: Einsatz der „Biopress™ Compression“ Zellkulturplatten in die Grundplatte (Baseplate) und die Funktionsweise der Druckübertragung auf das Gel innerhalb der Zellkulturplatten**

In Abb. A ist die Grundplatte (Baseplate) dargestellt. In die Grundplatte können bis zu vier „Biopress™ Compression“ Zellkulturplatten eingesetzt und fixiert werden. Aus Abb. B geht die Druckübertragung auf das Gel hervor. Der Überdruck, der mittels eines Kompressors im „Flexcell FX-5000™ Compression“ System erzeugt wird, hebt die flexible Membran der Zellkulturplatte. Das Gel wird dabei gegen die „Stationary platen“ gedrückt und komprimiert. Abb. aus „Flexcell FX-5000™ Compression“ Benutzerhandbuch (113).

sion“ System gestartet. Mithilfe des Kompressors wurde Druckluft erzeugt, die den flexiblen Boden der „Biopress™ Compression“ Zellkulturplatten anhub. Dadurch wurden die HPdLF-Kollagengele gegen die „Stationary platens“ gedrückt und somit komprimiert (Abb. 8B). Für

die Versuchsreihen wurde eine statisch-mechanische Druckbelastung von 40 kPa über 24 h gewählt.

Nach der abgeschlossenen Druckbehandlung über 24 h wurden die Gele in 1,5 ml-Reaktionsgefäße überführt und mittels einer Kollagenase-Lösung (1 mg/ml) unter Schütteln bei 300 rpm und 37 °C aufgelöst. Die HPdLF wurden dabei aus dem Kollagengel freigesetzt und konnten zur mRNA- und Proteinanalyse verwendet werden.

#### **4.1.6 Behandlung mit Methotrexat im 2D und im 3D in vitro Modell**

Methotrexat (Mtx) ist ein Zytostatikum, das in niedriger Dosierung zur Therapie der juvenilen idiopathischen Arthritis (JIA) eingesetzt wird. Um einen in vitro Effekt von Mtx auf HPdLF sowie den kombinierten Effekt von Mtx und statisch-mechanischer Druckbelastung auf HPdLF zu untersuchen, wurde ein Teil der Zellen sowohl im 2D als auch im 3D in vitro Modell mit Mtx (1 µg/ml) behandelt. In beiden in vitro Modellen wurde das Mtx dem Zellkulturmedium hinzugefügt. Im 3D-Modell wurde Mtx zusätzlich auch dem flüssigen HPdLF-Kollagengel beigemischt.

#### **4.1.7 MTT-Assay**

Mithilfe des MTT-Assays wurde die Zellviabilität – der Anteil funktionsfähiger, lebender Zellen – nach der statisch-mechanischen Druckbelastung im Vergleich zu Kontrollzellen bestimmt. Der MTT-Assay basiert auf kalorimetrischer Messung: Die HPdLF wurden mit dem gelben Farbstoff Tetrazoliumsalz (3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazoliumbromid, MTT) behandelt, welches durch lebende, metabolisch aktive HPdLF zu Formazan reduziert wird. Die Reduktion geht mit einem Farbumschlag in den blau-violetten Bereich einher. Mittels spektralphotometrischer Messung (SpectraMax iD5) bei einer Wellenlänge von 550 nm konnte von der gemessenen Absorption auf die Zellviabilität der HPdLF rückgeschlossen werden.

#### **4.1.8 Lebendzellanalyse**

Das „Incucyte Live-Cell Analysis System“ ermöglichte es, die Zellkonfluenz und somit die Zellproliferation von HPdLF über ein bestimmtes Zeitintervall kontinuierlich zu beobachten. HPdLF wurden während der Inkubation über 72 h alle 2-3 Stunden mikroskopisch erfasst, um den Einfluss von Mtx und/oder statisch-mechanischer Druckbelastung auf die Proliferation der HPdLF im Vergleich zu den Kontrollzellen zu untersuchen.

#### **4.1.9 Raster-Elektronenmikroskopie**

Um morphologische Veränderungen der HPdLF durch statisch-mechanische Druckbelastung sowie durch die Behandlung mit Mtx vergrößert und hochaufgelöst beurteilen zu können, wurden die HPdLF elektronenmikroskopisch untersucht.

Dafür wurden die HPdLF in 6-Wellplatten auf speziellen Objektdeckgläschen (tissue culture coverslips, Durchmesser 13 mm) ausgesät und für 24 h inkubiert, sodass sich ein HPdLF-Monolayer auf den Deckgläschen bilden konnte. Anschließend erfolgte eine statisch-mechanische Druckbelastung des Monolayers durch Glasplatten (2 g/cm<sup>2</sup>, Abschnitt 4.1.4) und/oder eine Behandlung mit Mtx (1 µg/ml, siehe Abschnitt 4.1.6) für weitere 24 h. Die Zellen wurden dann mit PBS gewaschen und mit Paraformaldehyd (PFA, 4 %) und Glutaraldehyd (0,5 %) in PBS (pH 7,4) fixiert. Nach einem weiteren Waschschrift wurde Osmiumtetroxid (1 %) für 60 min aufgetragen. Daraufhin wurden die Zellen mittels eines ansteigenden Ethanolgradienten (70 %, 80 %, 90 %, 100 %) entwässert. Durch eine anschließende Kritisch-Punkt-Trocknung wurden Artefakte vermieden. Beim Sputterprozess wurden die Zellen dann unter Verwendung von Argongas mit Gold beschichtet (Leica EM ACE 200) und konnten anschließend im Raster-Elektronenmikroskop dargestellt werden.

#### **4.1.10 Fluoreszenzmikroskopie**

Zur zellulären Visualisierung und zur Vitalitätskontrolle der HPdLF nach der statisch-mechanischen Druckbehandlung im 3D in vitro Modell wurden die Zellen mittels Fluoreszenzmikroskopie untersucht.

Um die Zellvitalität der HPdLF nach der Druckbehandlung im 3D in vitro Modell zu kontrollieren, wurden die HPdLF mithilfe von Kollagenase aus dem Gel herausgelöst, mit PBS gewaschen und in 1 ml frischem Zellkulturmedium aufgenommen. Je 200 µl der Zellsuspension jeder Probe wurden in ein Well einer 6-Well Zellkulturplatte überführt. Die 6-Well Zellkulturplatten wurde für 24 h im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde der Fluoreszenzfarbstoff „Cell-Tracker“ in FCS-freiem Zellkulturmedium auf die Zellen gegeben und die 6-Well Zellkulturplatten für 30 min im Brutschrank inkubiert. Der Farbstoff diffundiert nur durch die Membranen lebender Zellen, sodass nur vitale Zellen fluoreszieren (Eclipse, TE2000-U).

Auch wurde die Fluoreszenzmikroskopie verwendet, um die Zellkerne und das Zytoskelett der HPdLF nach der mechanischen Druckbehandlung zu visualisieren. Die Zellen wurden dafür

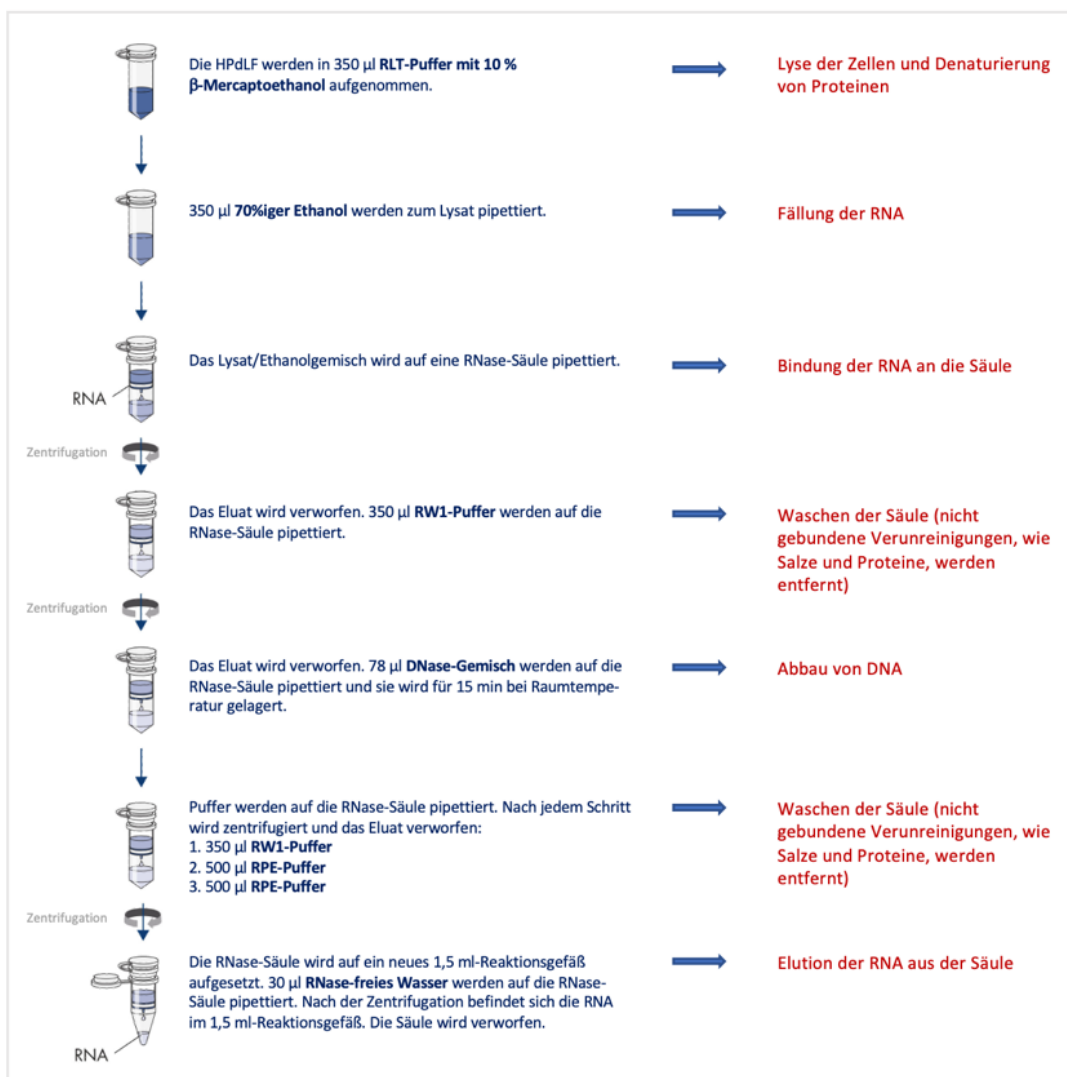
nach der Druckbehandlung aus den Gelen gelöst, mit PBS gewaschen und in Mikroskopiekammern, sogenannte Chamber Slides, überführt. Die Chamber Slides wurden für 24 h im Brutschrank inkubiert, wodurch die HPdLF adhärten. Anschließend wurde das Zellkulturmedium abgenommen und die Zellen mittels PBS gewaschen. Die Fixierung der HPdLF erfolgte mit PFA (4 %) für 24 h. Die fixierten HPdLF wurden dann mehrfach mit PBS gewaschen und anschließend für 5 min mit Triton X-100 (0,1 % in PBS) behandelt. Triton X-100 ist ein nicht-ionisches Detergens, das die Durchlässigkeit der Zellmembranen für Fluoreszenzfarbstoffe und Antikörper erhöht. Nach mehrfachem Waschen mit PBS wurden die Zellen für 5 min mit Rinderserumalbumin (bovine serum albumin, BSA, 5 % in PBS) behandelt, um unspezifische Bindungen von Fluoreszenzfarbstoffen und Antikörpern zu minimieren und Hintergrundsignale zu reduzieren. Im Anschluss wurde ein Anti-Vimentin Antikörper (1:250, verdünnt in 1 %iger BSA/PBS Lösung) aufgetragen und die Chamber Slides wurden über Nacht bei 4 °C gelagert. Der Antikörper bindet an das Filamentprotein „Vimentin“, das als Bestandteil des Zytoskeletts wichtige Bedeutung für die Zellform und die Zellstabilität hat. Nach erneutem Waschschrift mit PBS wurde ein Sekundarantikörper (1:50, verdünnt in 1 %iger BSA/PBS Lösung) für 45 min appliziert, der mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt war. Das Kammergerüst wurde dann vom Objektträger der Chamber Slides entfernt und die Zellen mit „Fluorescent Mounting Medium“ eingedeckt. Das Eindeckmedium enthält den Fluoreszenzfarbstoff DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol), der sich an doppelsträngige DNA anlagert und somit den Kern anfärbt. Dann wurden Deckgläser auf die Objektträger aufgelegt und die Objektträger wurden mittels Fluoreszenzmikroskopie untersucht. Durch die entsprechenden Filtereinstellungen am Fluoreszenzmikroskop konnten die Zellkerne und das Zytoskelett visualisiert werden.

## **4.2 Molekularbiologische Arbeitsmethoden**

### **4.2.1 Isolation von RNA aus HPdLF**

Zur RNA-Isolation wurde das „RNeasy Mini Kit“ entsprechend den Herstellerangaben verwendet. Nach Abschluss der Behandlung mit Mtx und/oder Druckkraft wurden die HPdLF mittels RLT-Lysepuffer mit  $\beta$ -Mercaptoethanol aufgenommen und lysiert.  $\beta$ -Mercaptoethanol reduziert Disulfidbrücken und denaturiert darüber Proteine, was die RNA vor einem Abbau durch die Proteine schützt. Das Lysat wurde 1:1 mit 70%igem Ethanol gemischt. Ethanol bewirkt, dass die RNA aus der Lösung ausfällt. Das Lysat/Ethanolgemisch wurde auf eine RNase-Säule pipettiert und zentrifugiert. Die RNA verblieb nach der Zentrifugation im Filter der Säule. Im

Anschluss wurde die Säule mit RW1-Puffer gewaschen, was die RNA-Reinheit weiter verbessern soll. Dann wurde ein DNase-Gemisch auf die Säule pipettiert und die Säule wurde für 15 min bei Raumtemperatur gelagert, wodurch die in der Probe vorhandene DNA abgebaut wurde. Anschließend wurde die Säule drei weitere Male nacheinander mit Puffern (RW1-Puffer, RPE-Puffer) gewaschen und jeweils zentrifugiert, wodurch die RNA weiter aufgereinigt und Salze herausgewaschen wurden. Mit RNase-freiem Wasser wurde die RNA aus dem Filter der Säule gelöst und ihre Konzentration wurde photometrisch bestimmt (siehe Abschnitt 4.2.2). Das RNA-Isolationsprotokoll ist in Abb. 9 graphisch dargestellt.



**Abbildung 9: Das verwendete Protokoll zur Zellyse und RNA-Isolation aus HPdLF**

Dargestellt sind die Arbeitsschritte der Zellyse und RNA-Isolation aus HPdLF. Es wurde das „RNeasy Mini Kit“ von Qiagen verwendet. Teile der Abbildung stammen aus dem Herstellerprotokoll zur Anwendung des Kits.

#### 4.2.2 Quantifizierung von Nukleinsäuren

Zur Konzentrations- und Reinheitsbestimmung der RNA wurde das Spektralphotometer Nano-Drop2000 verwendet. Nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz kann aus der Höhe der Absorption die Konzentration der absorbierenden Substanz bestimmt werden. Zur Untersuchung der RNA-Konzentration wurde die Extinktion von 260 nm bestimmt. Dies entspricht dem Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren. Das Absorptionsmaximum von Proteinen liegt hingegen bei 280 nm. Aus dem Absorptionsverhältnis von Nukleinsäuren zu Proteinen können Verunreinigungen der RNA durch Proteine festgestellt werden. Die RNA gilt als rein, sofern der Quotient  $A_{260}/A_{280}$  zwischen 1,8 und 2,0 liegt. Neben einer Proteinverunreinigung können auch Lösungsmittel, wie z. B. Ethanol, den Reinheitsgrad der RNA beeinträchtigen. Eine solche Lösungsmittelverunreinigung lässt sich aus dem Quotienten der Absorptionen  $A_{260}/A_{230}$  bestimmen. Bei reiner RNA beträgt dieser Quotient 2.

#### 4.2.3 cDNA-Synthese mittels Reverser Transkriptase

Um die mRNA-Expressionslevel in Zellen durch quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR) untersuchen zu können, wurde die RNA zunächst mittels Reverser Transkription in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben.

**Tabelle 13: Ansatz für die Reverse Transkription mit dem iScript cDNA Synthesis Kit**

Komponente	Volumen pro Ansatz
5x iScript Reaktionsmix	4 $\mu$ l
iScript Reverse Transkriptase	1 $\mu$ l
Nuklease-freies H <sub>2</sub> O	variabel
RNA	variabel
Gesamt	20 $\mu$ l

**Tabelle 14: Temperaturprogramm für die Reverse Transkription**

Schritt	Dauer	Temperatur
Bindung der Oligonukleotide an die RNA	5 min	25 °C
Reverse Transkription	20 min	46 °C
Denaturierung der Reversen Transkriptase	1 min	95 °C
Kühlung	$\infty$	4 °C

Für die Reverse Transkription wurde das „iScript™ cDNA Synthese Kit“ verwendet. Die isolierte RNA wurde mit Nuklease-freiem H<sub>2</sub>O auf 50 ng/ $\mu$ l verdünnt und mit den Kit-Bestandteilen (Tabelle 13) versetzt. Die Reverse Transkription erfolgte im PeqStar 96X universal mit dem in Tabelle 14 aufgeführten Temperaturprogramm. Die im Kit enthaltenen Oligonukleotide mit

Zufallssequenz binden während der Inkubationsphase an die mRNA. Durch die RNA-abhängige DNA-Polymerase wird komplementäre, einsträngige cDNA synthetisiert.

#### 4.2.4 Quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR)

Mit Hilfe der quantitativen Real-Time PCR (qRT-PCR) war es möglich, die mRNA spezifischer Gene aus der Gesamtzell-RNA der HPdLF zu vervielfältigen und ihre Expression zu quantifizieren. Dazu wurden nach der Auswahl eines Zielgens mittels Primer-Blast spezifische Primer (Oligonukleotide) erstellt, die den zu amplifizierenden DNA-Abschnitt flankieren. Zusätzlich wurden Primer für ein Haushaltsgen erstellt, um die Expression des zu untersuchenden Gens relativ zu einem Haushaltsgen bestimmen zu können.

Es wurde ein Reaktionsansatz aus einem spezifischen Primerpaar, cDNA und dem iQ SYBR Green Supermix entsprechend den Angaben in Tabelle 15 in eine 96-Wellplatte pipettiert. Im Cycler CFX Connect von Bio-Rad wurde das in Tabelle 16 angegebene Temperaturprogramm gewählt.

**Tabelle 15: Ansatz für die qRT-PCR mit iQ SYBR Green Supermix**

Komponente	Volumen pro Ansatz
iQ SYBR Green Supermix (Bio-Rad)	10 µl
forward-Primer	0,6 µl
reverse-Primer	0,6 µl
H <sub>2</sub> O	6,8 µl
cDNA	2 µl
Gesamt	20 µl

**Tabelle 16: Temperaturprogramm für die qRT-PCR**

Schritte	Dauer	Temperatur	Zyklusanzahl
Initiale Denaturierung	5 min	95 °C	1
Denaturierung	12 sec	95 °C	44
Annealing/Elongation	1 min	60 °C	
Kühlung	10 min	20 °C	1

Die qRT-PCR beginnt mit der Denaturierung der doppelsträngigen DNA durch Erhitzen auf 95 °C. Dabei kommt es zum Aufbrechen der Wasserstoffbrückenbindung, sodass DNA-Einzelstränge entstehen. Mit dem anschließenden Absenken der Temperatur auf 60 °C hybridisieren die komplementären Primer an die Einzelstränge. Daraufhin erfolgt in der Elongationsphase die Neusynthese des komplementären Stranges durch eine thermostabile DNA-Polymerase. Durch Repetition der genannten PCR-Schritte wird das DNA-Fragment exponentiell amplifiziert.

Der eingesetzte iQ SYBR Green Supermix enthält neben der thermostabilen DNA-Polymerase und Desoxynukleotidtriphosphaten (dNTPs) auch den DNA-bindenden Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green I. SYBR Green I interkaliert während der Elongationsphase in die amplifizierte, doppelsträngige DNA. Durch den hierbei entstehenden Komplex aus cDNA und SYBR Green I wird ein Fluoreszenzsignal freigesetzt, das in Echtzeit zu jedem Amplifikationszeitpunkt detektiert und erfasst wird. Das Fluoreszenzsignal steigt dabei proportional zur Menge der cDNA, sodass die Zunahme an PCR-Produkt in Echtzeit verfolgt werden kann.

Nachteilig an dieser Methode ist die unspezifische Bindung von SYBR Green I an mögliche andere PCR-Produkte oder Primer-Dimere. Zur Überprüfung der Primerspezifität für die Zielsequenz wurden die Schmelzkurve und der Schmelzpunkt analysiert. Beide sind durch die Länge und den GC-Gehalt des DNA-Fragments charakteristisch für eine Zielsequenz.

Zur Datenanalyse wurde die „CFX Maestro™ Software“ von Bio-Rad verwendet. Die Genexpression wurde zwischen den mit Mtx und/oder Druck behandelten Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen analysiert. Das Expressionsniveau eines Zielgens in einer Probe wurden zur Vergleichbarkeit auf das Expressionsniveau eines Haushaltsgens derselben Probe normiert. Das Haushaltsgen wurde unabhängig von den Versuchsbedingungen konstant exprimiert. Die statistische Auswertung und graphische Darstellung der Daten erfolgten mithilfe von Microsoft Excel und GraphPad Prism.

### **4.3 Statistik**

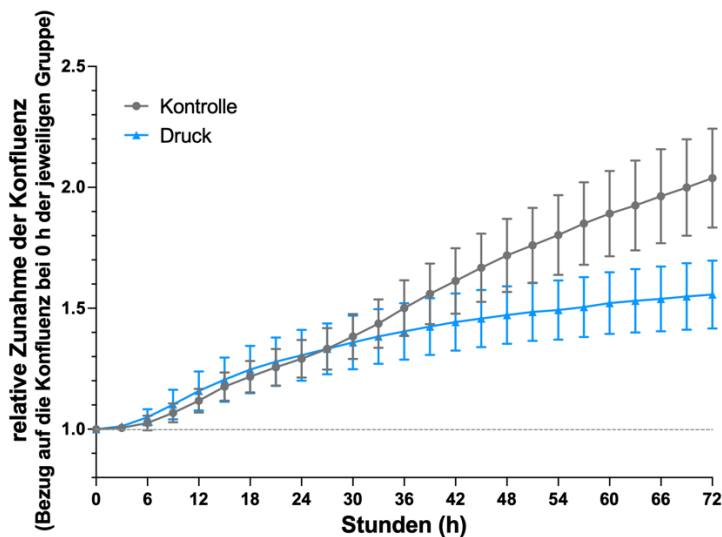
Zur statistischen Auswertung wurden die Programme Microsoft Excel 2019 und GraphPad Prism (Version 10) verwendet. Die Daten repräsentieren den Mittelwert  $\pm$  SEM (Standardfehler der Mittelwerte). Die Signifikanz wird mit einem Stern (\*) dargestellt. Dabei entspricht ein Stern einem p-Wert unter 0,05, zwei Sterne einem p-Wert von unter 0,01, drei Sterne einem p-Wert unter 0,001 und vier Sterne einem p-Wert unter 0,0001. Zur vergleichenden Analyse zweier Gruppen wurden ungepaarte t-Tests durchgeführt. Für den Vergleich zweier Gruppen mit einer Variablen wurde eine one-way ANOVA (analysis of variance) mit Turkey post hoc Test vorgenommen.

## 5 Ergebnisse

### 5.1 Analysen an HPdLF im 2D in vitro Modell

#### 5.1.1 Untersuchungen zur Proliferation von HPdLF unter Druck- und Mtx-Behandlung im 2D in vitro Modell

Durch die Lebendzellanalyse wurden die Veränderungen in der Zellkonfluenz der HPdLF unter Kontrollbedingungen und unter statisch-mechanischer Druckbehandlung im 2D in vitro Modell untersucht. Von der Konfluenz wurde auf die Proliferation der HPdLF rückgeschlossen. Die Proliferation wurde über einen Zeitraum von 72 h nach Beginn der Druckbehandlung beobachtet (Abb. 10). In den ersten 24 h konnte eine stetige Zunahme der Zellproliferation in beiden Gruppen festgestellt werden. Es ließ sich in diesem Zeitraum kein wesentlicher Unterschied in der Proliferationsrate zwischen den Gruppen erkennen. Im Zeitraum zwischen 24 und 72 h war die Proliferation hingegen in den druckbehandelten HPdLF im Vergleich zu den Kontrollzellen deutlich reduziert. Nach ca. 60 h schien die Proliferation in den druckbehandelten Zellen ein Plateau zu erreichen. Bei den Kontrollzellen ließ sich nach 24 h ein stärkerer Anstieg der Proliferation feststellen und innerhalb der Beobachtungszeit war kein Plateau der Proliferation sichtbar.

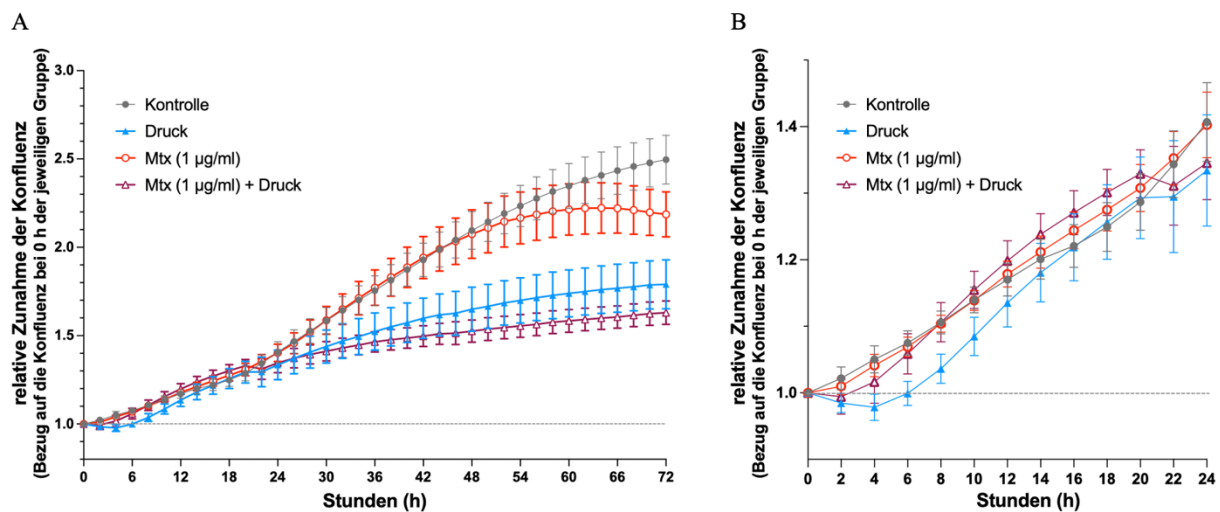


**Abbildung 10: Statisch-mechanischer Druck beeinflusst die Proliferation von HPdLF im 2D in vitro Modell zeitabhängig**

Die Konfluenz der HPdLF wurde unter Kontrollbedingungen und unter Druckbehandlung ( $2 \text{ g/cm}^2$ ) über 72 h durch Lebendzellanalyse gemessen ( $n = 6$ ). Die Daten sind auf die jeweilige Konfluenz zum Ausgangszeitpunkt (0 h) bezogen.

Im nächsten Schritt wurden die HPdLF zusätzlich mit Mtx ( $1 \mu\text{g/ml}$ ) bzw. mit Mtx ( $1 \mu\text{g/ml}$ ) kombiniert mit statisch-mechanischem Druck behandelt und ihre Proliferation wurde untersucht. Alle Behandlungen zeigten über 24 h keine wesentlichen Unterschiede der Proliferation im Vergleich zu den Kontrollzellen (Abb. 11A und B). Nach 24 h zeigten die druckbehandelten HPdLF und die kombiniert mit Druck und Mtx behandelten HPdLF eine verminderte Proliferation im Vergleich zu den Kontrollzellen und den mit Mtx behandelten HPdLF. Während die

Kontrolle und die Behandlung mit Mtx über die ersten 48 h eine ähnliche Proliferationsrate zeigten, ging die Proliferation in den mit Mtx behandelten HPdLF nach 48 h zurück (Abb. 11B).



**Abbildung 11: Die Druckbehandlung bzw. die Behandlung mit Mtx (1 µg/ml) im 2D in vitro Modell scheint die Proliferation der HPdLF erst nach ca. 24 h wesentlich zu beeinflussen**

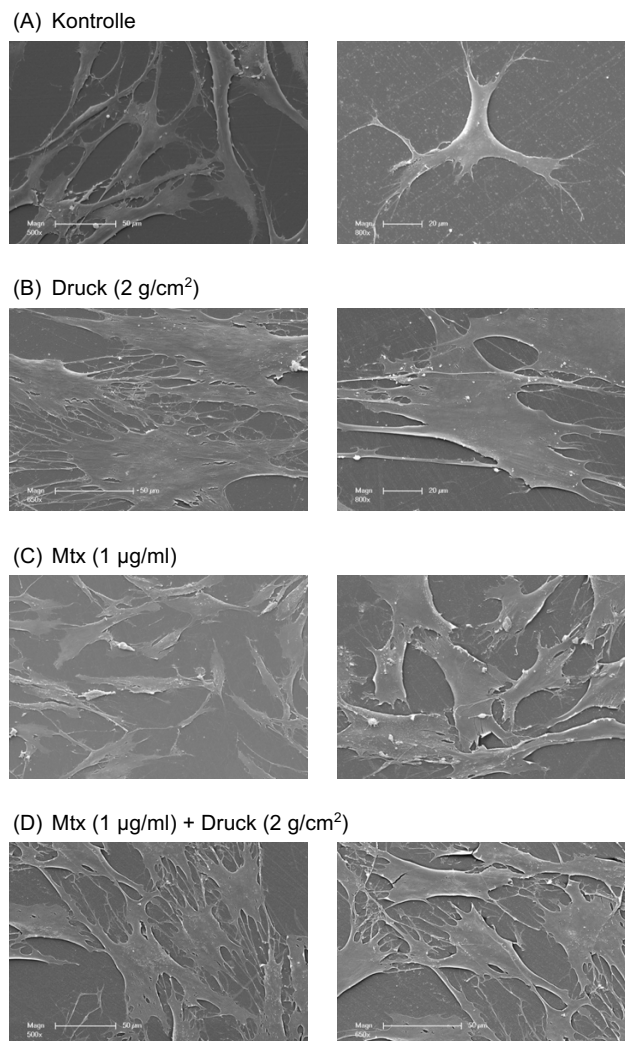
Die HPdLF wurden mit Druck (2 g/cm<sup>2</sup>), Mtx (1 µg/ml) oder kombiniert mit Druck und Mtx behandelt. Ein Teil der HPdLF blieb zur Kontrolle unbehandelt. (A) Über 72 h nach Behandlungsbeginn wurde die Konfluenz der HPdLF mittels Lebendzellanalyse detektiert. Die Veränderung der Konfluenz wurde relativ zur Konfluenz zum Zeitpunkt 0 h der jeweiligen Behandlungsgruppe dargestellt (n = 4). (B) Gezeigt ist ein vergrößerter Ausschnitt zur Konfluenzänderung der HPdLF über die ersten 24 h nach der Behandlung der Zellen.

### 5.1.2 Untersuchungen zur Zellmorphologie von HPdLF unter Druck- und Mtx-Behandlung im 2D in vitro Modell

Um die Zellstruktur, die Zelladhäsion und die Oberflächenmorphologie der HPdLF im 2D in vitro Modell nach der Behandlung mit Druck und/oder Mtx im Vergleich zu den Kontrollzellen beurteilen zu können, wurden sie mittels Rasterelektronenmikroskopie hochauflösend dargestellt.

Die HPdLF-Kontrollzellen weisen einen länglichen, flachen Zellkörper auf und sind über einige breite Zytoplasmafortsätze mit den Nachbarzellen verbunden (Abb. 12A). Nach der Druckbehandlung über 24 h sind die Zellkörper der HPdLF deutlich breiter, flächiger und größer (Abb. 12B). Von den Zellen gehen viele schmalere und kürzere Zellfortsätze aus. An den Enden der Zellfortsätze zeigen sich wiederum zahlreiche kleinere Ausläufer, sogenannte Filopodien, die mit den Nachbarzellen eng verflochten sind. Die Filopodien füllen den Raum zwischen den HPdLF.

Im Vergleich zu den Kontrollzellen haben die HPdLF nach der Behandlung mit Mtx eine wesentlich rudimentärere Zellform (Abb. 12C). Besonders die Zellfortsätze erscheinen weniger stark ausgeprägt zu sein als bei den Kontrollzellen. Zudem scheinen die Zellkontakte insgesamt reduzierter zu sein. Die Morphologie der HPdLF nach kombinierter Behandlung mit Druck und Mtx ähnelt der der HPdLF nach der alleinigen Behandlung mit Druck (Abb. 12D). Die Zellkörper wirken verbreitert und flächiger und die Zellfortsätze sind zahlreich und stehen in Kontakt mit anderen HPdLF.



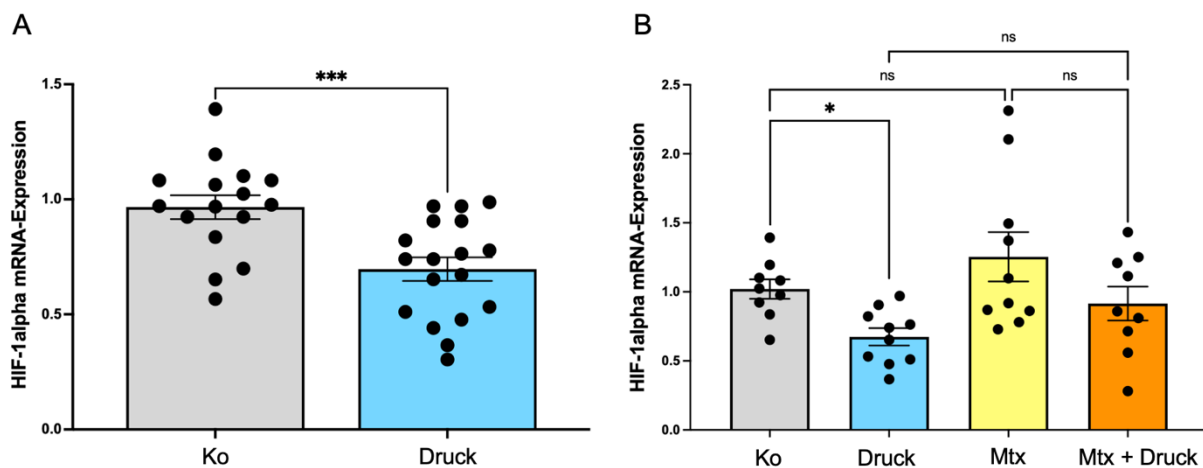
**Abbildung 12: Darstellung der HPdLF nach der Behandlung mit Druck und/oder Mtx über 24 h im Elektronenmikroskop**

Die HPdLF wurden über 24 h mit Druck und/oder Mtx im 2D in vitro Modell behandelt oder blieben zur Kontrolle unbehandelt. Die Behandlung der HPdLF erfolgte entsprechend den Beschriftungen A – D. Nach der Vorbereitung der HPdLF wurden die gezeigten Aufnahmen im Elektronenmikroskop angefertigt.

### 5.1.3 Untersuchungen zur Änderung der Genexpressionen von HPdLF unter Druck- und Mtx-Behandlung im 2D in vitro Modell

#### 5.1.3.1 Statisch-mechanische Druckbehandlung über 24 h geht mit einer reduzierten mRNA-Expression von HIF-1 $\alpha$ in HPdLF einher, während Mtx keinen Effekt auf die Expression zeigt

In dieser Versuchseinheit sollte die Expression des Hypoxie-induzierten Faktors (HIF)-1 $\alpha$  in HPdLF im 2D in vitro Modell beurteilt werden. HIF-1 $\alpha$  ist eine Untereinheit des Transkriptionsfaktors HIF-1 und wird abhängig von Stressoren, wie Hypoxie oder mechanischer Belastung, gebildet (65,67). Nach der Behandlung mit Druck und/oder Mtx (1  $\mu$ g/ml) über 24 h wurde die mRNA-Expression von HIF-1 $\alpha$  mittels quantitativer Real-time PCR (qRT-PCR) bestimmt und mit den Kontrollzellen verglichen. Die gemessenen Expressionen von HIF-1 $\alpha$  wurden auf die mRNA-Expressionen des Ribosomalen Proteins L22 (RPL22) normiert. RPL22 gilt als geeignetes Haushaltsgen für mechanische Versuche an HPdLF (86).

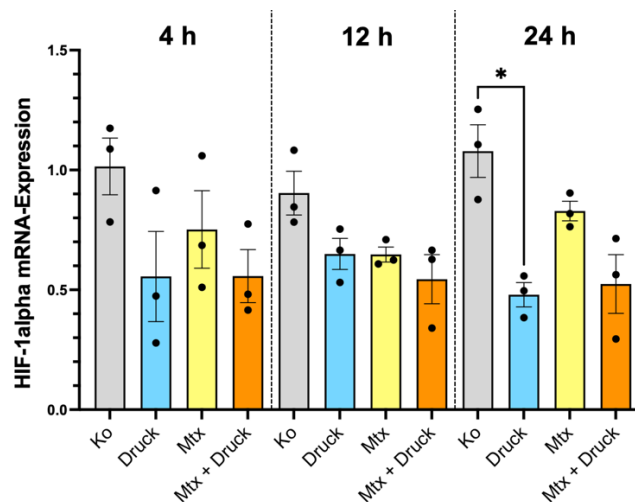


**Abbildung 13: Analysen der HIF-1 $\alpha$  mRNA-Expressionen in HPdLF nach der Behandlung mit Druck bzw. Mtx über 24 h im 2D in vitro Modell**

**A** Die HIF-1 $\alpha$  mRNA-Expression wurde nach der Behandlung der HPdLF mit Druck (2 g/cm<sup>2</sup>) über 24 h im 2D in vitro Modell im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollzellen (Ko) gemessen. Die statistische Auswertung erfolgte durch einen ungepaarten t-Test ( $n \geq 15$ , \*\*\*  $p < 0,001$ ). **B** Ein Teil der HPdLF wurde über 24 h zusätzlich mit Mtx (1  $\mu$ g/ml) bzw. Mtx (1  $\mu$ g/ml) kombiniert mit Druck (2 g/cm<sup>2</sup>) behandelt und die HIF-1 $\alpha$  mRNA-Expressionen wurden auf die Expression in den Kontrollzellen (Ko) bezogen. Zur statistischen Auswertung wurde eine one-way ANOVA durchgeführt ( $n \geq 9$ , \*  $p < 0,05$ ; ns = nicht signifikant). Dargestellt sind die HIF-1 $\alpha$  mRNA-Expressionen normiert auf die mRNA-Expressionen des Haushaltsgens RPL22. Die Säulen repräsentieren die Mittelwerte  $\pm$  SEM.

Bereits unter Kontrollbedingungen kann HIF-1 $\alpha$  nach 24 h in HPdLF nachgewiesen werden (Abb. 13). Eine Druckbehandlung über den gleichen Zeitraum geht mit einer signifikant niedrigeren Expression von HIF-1 $\alpha$  um ca. 25 % im Vergleich zu den Kontrollzellen einher (Abb. 13A). Die Behandlung mit Mtx verändert die HIF-1 $\alpha$  mRNA-Expression nicht signifikant im Vergleich zu den Kontrollzellen. Auch die kombinierte Behandlung mit Mtx und Druck über 24 h zeigt keinen Einfluss auf die Expression von HIF-1 $\alpha$  (Abb. 13B).

Im Folgenden sollte überprüft werden, ob sich die HIF-1 $\alpha$  mRNA-Expressionsverhältnisse zeitabhängig unter den Behandlungsgruppen ändern. Die HPdLF wurden dafür über 4, 12 und 24 h mit Druck und/oder Mtx (1 $\mu$ g/ml) im 2D in vitro Modell behandelt. Die Expressionen wurden auf die HIF-1 $\alpha$  mRNA-Expression der Kontrollzellen nach 4 h bezogen. Aus Abbildung 14 geht hervor, dass nur nach der Druckbehandlung über 24 h eine signifikant reduzierte HIF-1 $\alpha$  mRNA-Expression im Vergleich zur Kontrollbehandlung über 24 h gemessen wurde. Nach der 4- und 12-stündigen Druckbehandlung waren hingegen keine signifikanten Expressionsunterschiede zu den Kontrollbehandlungen festzustellen.

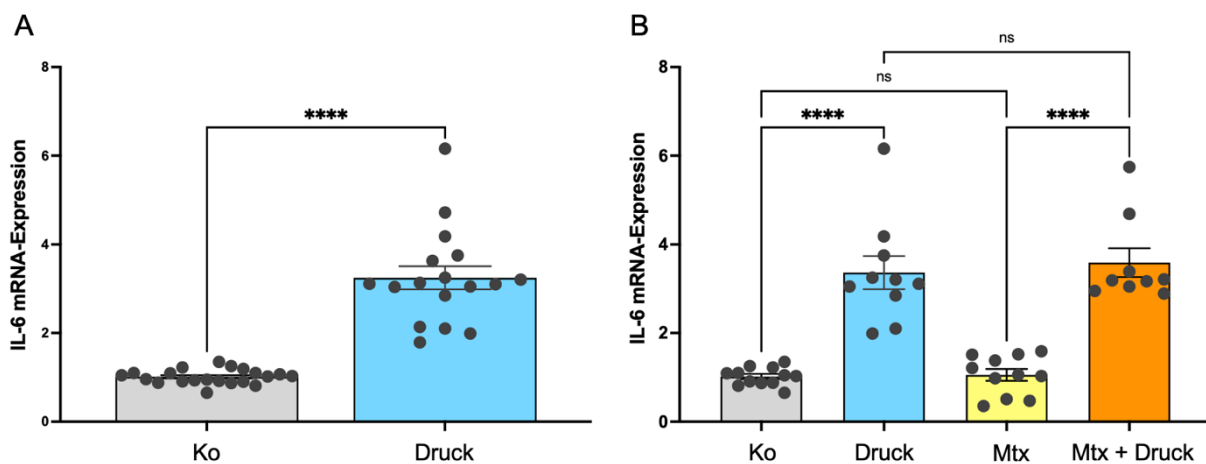


**Abbildung 14: Zeitabhängige Veränderungen der HIF-1 $\alpha$  mRNA-Expression unter Druck und Mtx Behandlung im 2D in vitro Modell**

Die HPdLF wurden für 4, 12 und 24 h mit Druck (2 g/cm<sup>2</sup>) bzw. Mtx (1  $\mu$ g/ml) behandelt und die HIF-1 $\alpha$  mRNA-Expressionen wurde im Anschluss bestimmt. Die Messwerte wurden auf die HIF-1 $\alpha$  mRNA-Expressionen der Kontrollzellen nach 4 h bezogen. Die statistische Auswertung erfolgte mittels einer one-way ANOVA (n = 3, \* p < 0,05). Normiert wurde auf die mRNA-Expressionen des Haushaltsgens RPL22. Die Säulen repräsentieren die Mittelwerte  $\pm$  SEM.

### 5.1.3.2 Statisch-mechanischer Druck führt zu einer erhöhten mRNA-Expression von IL-6 in HPdLF, die Behandlung mit Mtx verändert die IL-6 mRNA-Expression nicht signifikant

Anschließend sollten die behandlungsabhängigen Expressionsänderungen des Zytokins IL-6 mittels qRT-PCR in HPdLF untersucht werden. IL-6 ist an der Regulation von Entzündungsreaktionen und der Immunantwort beteiligt (114). Die Druckbehandlung über 24 h im 2D in vitro Modell führte zu einer signifikant erhöhten mRNA-Expression von IL-6 (Abb. 15A). Die mRNA-Menge war durchschnittlich um das Dreifache gesteigert im Vergleich zu den Kontrollzellen. Die Behandlung der HPdLF über 24 h mit Mtx (1 µg/ml) führte zu keiner signifikanten Veränderung der IL-6 mRNA-Expression bezogen auf die Kontrollzellen. Bei der kombinierten Behandlung mit Mtx und Druck wurde eine signifikant gesteigerte IL-6 mRNA-Expression im Vergleich zu den Kontrollzellen und den mit Mtx behandelten Zellen festgestellt. Die Expression unterscheidet sich aber nicht signifikant zu den nur mit Druck behandelten HPdLF (Abb. 15B).



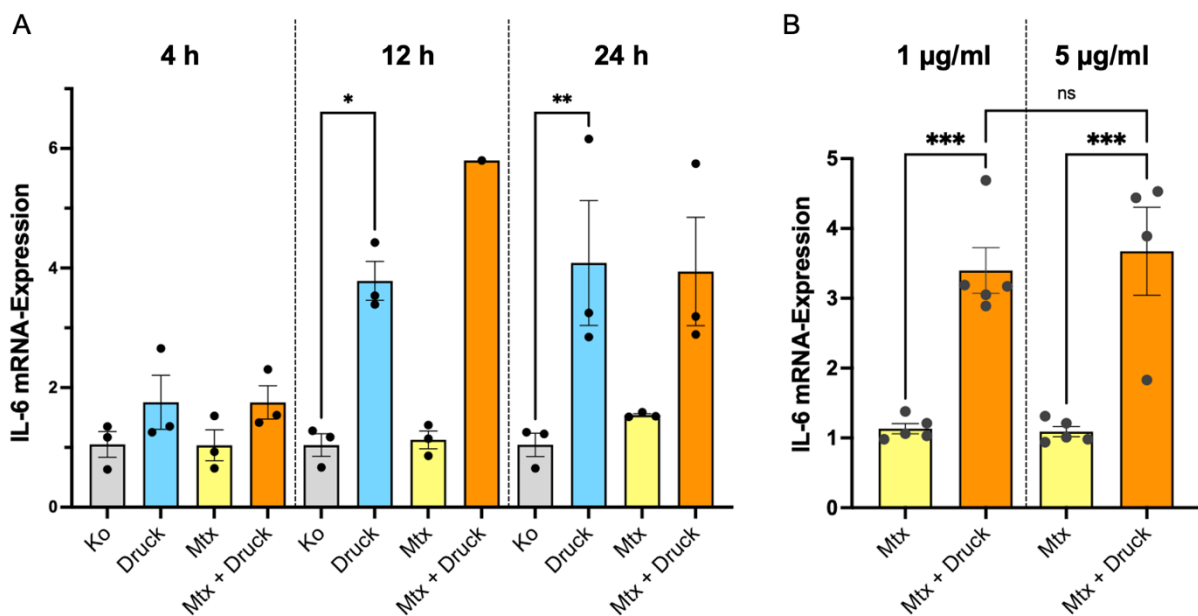
**Abbildung 15: Analysen der IL-6 mRNA-Expressionen in HPdLF nach der Behandlung mit Druck bzw. Mtx über 24 h im 2D in vitro Modell**

**A** Nach der Behandlung der HPdLF mit Druck (2 g/cm<sup>2</sup>) über 24 h im 2D in vitro Modell wurde die IL-6 mRNA-Expression im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollzellen (Ko) gemessen. Zur Auswertung wurde ein ungepaarter t-Test durchgeführt (n ≥ 17, \*\*\*\* p < 0,0001). **B** Ein Teil der HPdLF wurde über 24 h zusätzlich mit Mtx (1 µg/ml) bzw. Mtx (1 µg/ml) kombiniert mit Druck (2 g/cm<sup>2</sup>) behandelt und die IL-6 mRNA-Expressionen wurden auf die Expression in den Kontrollzellen (Ko) bezogen. Die statistische Auswertung erfolgte mittels einer one-way ANOVA (n ≥ 9, \*\*\*\* p < 0,0001; ns = nicht signifikant). Dargestellt sind die IL-6 mRNA-Expressionen normiert auf die mRNA-Expressionen des Haushaltsgens RPL22. Die Säulen repräsentieren die Mittelwerte ± SEM.

Es folgte die Messung der IL-6 mRNA-Expression über eine Zeitkinetik: Zunächst konnten bei der Druck- und Mtx-Behandlung der HPdLF über 4 h keine signifikanten Veränderungen der

IL-6 mRNA-Expressionslevel gemessen werden (Abb. 16A). Hingegen führte die Druckbehandlung über 12 h zu einer gesteigerten IL-6 mRNA-Menge in den HPdLF. Dieser Effekt war nach der Druckbehandlung über 24 h noch deutlicher.

Zudem sollte zusätzlich der Effekt einer höheren Mtx-Konzentration auf die IL-6 mRNA-Expression getestet werden. Die HPdLF wurden über 24 h mit 1 µg/ml oder 5 µg/ml Mtx behandelt. In Kombination mit der Druckbehandlung wurden sowohl bei einer Mtx-Konzentration von 1 µg/ml als auch bei 5 µg/ml im Vergleich zur reinen Behandlung mit Mtx erhöhte IL-6 mRNA-Expressionen detektiert. Die mRNA-Menge war jeweils um das Drei- bis Vierfache gesteigert. Es war kein signifikanter Expressionsunterschied der IL-6 mRNA abhängig von der Mtx-Konzentration festzustellen (Abb. 16B).



**Abbildung 16: Analysen eines zeitabhängigen Effekts von Druck bzw. Mtx sowie eines konzentrationsabhängigen Effekts von Mtx auf die IL-6 mRNA-Expressionen in HPdLF**

**A** Die HPdLF wurden für 4, 12 und 24 h mit Druck (2 g/cm<sup>2</sup>), Mtx (1 µg/ml) oder kombiniert mit Druck und Mtx im 2D in vitro Modell behandelt. Ein Teil der HPdLF blieb zur Kontrolle über die gleichen Zeiträume unbehandelt (Ko). Die Daten wurden auf die IL-6 mRNA-Expression der jeweiligen Kontrollzellen bezogen. Die statistische Auswertung erfolgte mittels einer one-way ANOVA (n = 3, \* p < 0,05; \*\* p < 0,01). **B** Die HPdLF wurden mit 1 µg/ml Mtx oder mit 5 µg/ml Mtx behandelt. Ein Teil der HPdLF wurde kombiniert mit Druck behandelt. Zur statistischen Auswertung wurde eine one-way ANOVA durchgeführt (n ≥ 4, \*\*\* p < 0,001; ns = nicht signifikant). Die IL-6 mRNA-Expressionen wurden auf die mRNA-Expressionen des Haushaltsgens RPL22 normiert. Die Säulen repräsentieren die Mittelwerte ± SEM.

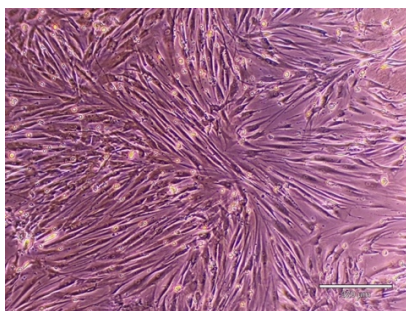
## 5.2 Analysen an HPdLF im 3D in vitro Modell

### 5.2.1 Etablierung des 3D in vitro Modells

Um die physiologischen Bedingungen der HPdLF als Bestandteil des dreidimensionalen PDL besser simulieren zu können, sollte ein 3D in vitro Modell etabliert werden.

Verschiedene Materialien wurden auf ihre Eignung als Gerüst für das 3D Modell und die Fähigkeit, geeignete Wachstumsbedingungen für die HPdLF zu bieten, überprüft.

Zuerst wurde das Hydrogel „Mebiol®“ getestet, das bei 4 °C in flüssiger Form vorliegt und bei 37 °C in einen Gelzustand übergeht. Nach der Inkubation über 4 Tage zeigte sich im Lichtmikroskop jedoch eine geringe Proliferation der HPdLF. Laut Herstellerangaben könnte Mebiol® das Wachstum von Fibroblasten hemmen, was sich in diesem Versuch bestätigte. Daher wurde Mebiol® als Matrix für das 3D Modell verworfen. Als weitere potenzielle Matrix für das 3D in vitro Modell wurde das „TrueGel3D™“ Hydrogel getestet. Nach dem Druckversuch wurden die HPdLF entsprechend den Herstellerangaben mittels einer „Recovery Solution“ enzymatisch aus dem Gel gelöst. Die anschließende Viabilitätsbestimmung ergab eine stark reduzierte Lebendzellrate der HPdLF sowohl im Kontrollgel als auch im druckbehandelten Gel, weshalb auch dieser Ansatz nicht weiterverfolgt wurde. Schließlich wurde das PureCol Kollagen getestet. Aufgrund seiner Stabilität und Eigenschaften erschien es für Druckversuche mit dem „FX-5000™ Compression“ System geeignet. In Vorversuchen wurde eine optimale Zelldichte von  $1 \times 10^6$  Zellen/ml für die Druckexperimente ermittelt. Nach einer 4-tägigen Inkubation im Brutschrank zeigten Lichtmikroskopische Aufnahmen eine adäquate Proliferation und eine Ausrichtung der HPdLF innerhalb des Gels (Abb. 17).

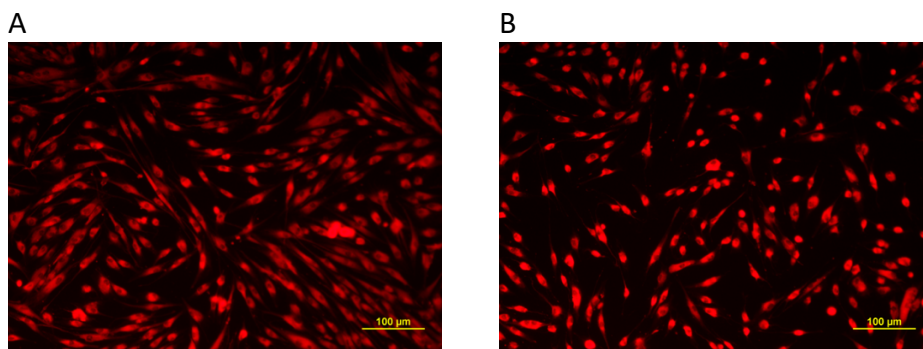


**Abbildung 17: Darstellung des HPdLF-Kollagengels im Lichtmikroskop**

Dargestellt ist ein HPdLF-Kollagen gel nach der Inkubation über 4 Tage im Brutschrank. Die HPdLF proliferieren innerhalb des Gels und stellen sich als längliche, schmale Zellen dar (Maßstab: 370 µm).

Im Rahmen der mechanischen Druckbehandlung wurde eine statisch-mechanische Kraft von 40 kPa über 24 h im Flexcell FX-5000™ Compression System auf die HPdLF-Kollagengele ausgeübt (Abschnitt 4.1.5). Zur Kontrolle wurde ein Teil der HPdLF-Kollagengele keinem me-

chanischen Druck ausgesetzt. Um die Vitalität der HPdLF nach der Druckbehandlung zu überprüfen, wurden die HPdLF mithilfe von Kollagenase aus dem Gel herausgelöst und in 1 ml frischem Zellkulturmedium resuspendiert. 200 µl der Zellsuspension wurden in 6-Well-Zellkulturplatten ausplattiert und für 24 h im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden mittels des Fluoreszenzfarbstoffs „CellTracker“ lebende Zellen in der Fluoreszenzmikroskopie sichtbar gemacht (Abschnitt 4.1.10). Aus den Aufnahmen in Abb. 18 geht hervor, dass die aus den Kontrollgelen und aus den druckbehandelten Gelen herausgelösten HPdLF den Fluoreszenzfarbstoff aufgenommen haben. Allerdings erscheint die Zelldichte der druckbehandelten HPdLF im Vergleich zu den Kontroll-HPdLF geringer.

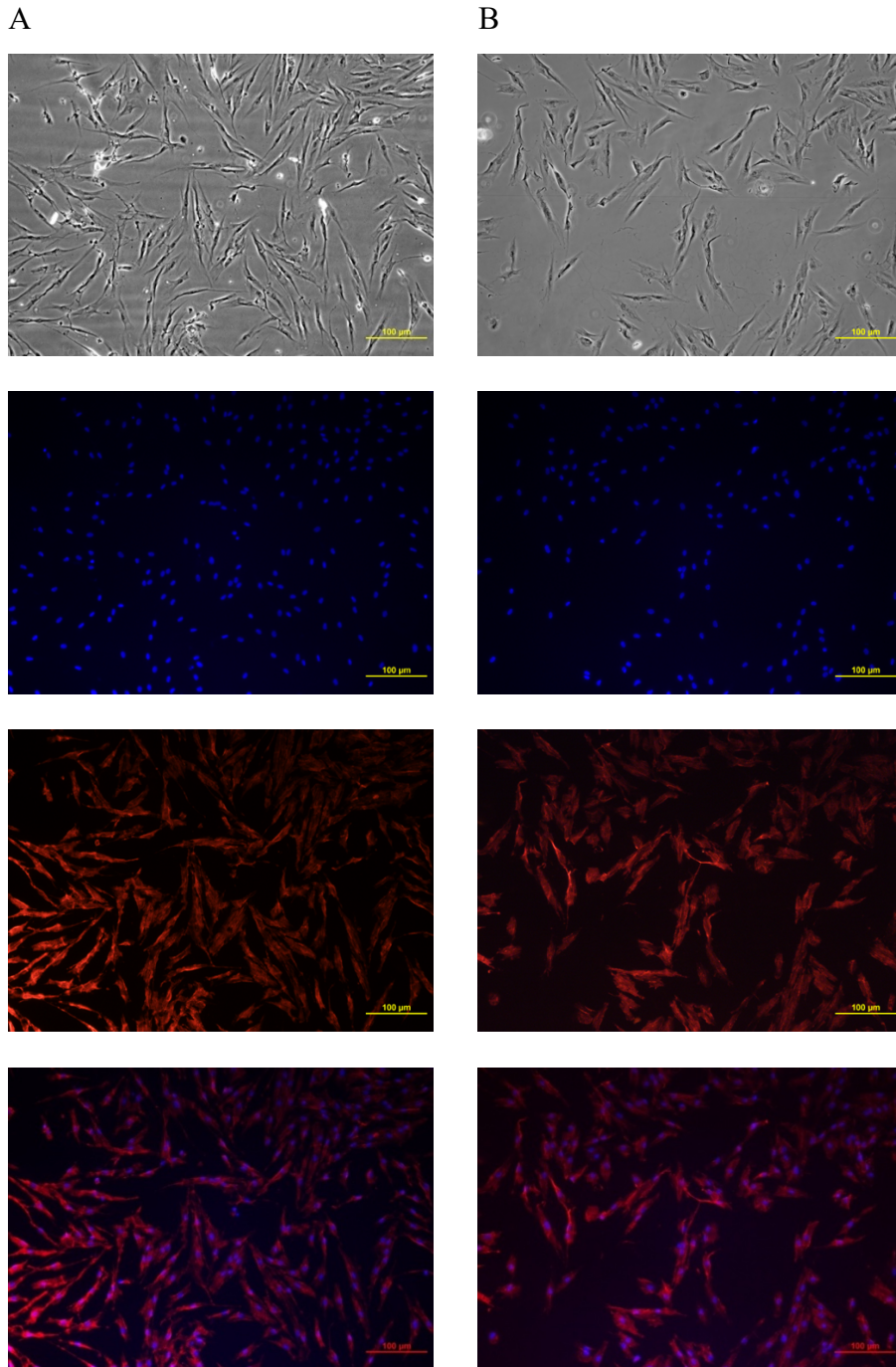


**Abbildung 18: Lebendzellanalyse der HPdLF nach der Druckbehandlung im 3D in vitro Compression Modell durch Fluoreszenzmikroskopie**

**A** HPdLF aus Kontrollgelen. **B** HPdLF aus Gelen nach der Druckbehandlung im 3D in vitro Compression Modell. Im Anschluss an die Druck- bzw. Kontrollbehandlung wurden die HPdLF mittels Kollagenase aus den Gelen gelöst und in eine 6-Well-Zellkulturplatte überführt. Nach der Inkubation der HPdLF über 24 h im Brutschrank wurden die Zellen mittels „CellTracker“ fluoreszenzmarkiert. Der Farbstoff wird nur von vitalen Zellen aufgenommen, sodass nur die vitalen HPdLF in der Fluoreszenzmikroskopie aufleuchten (Maßstab: 100 µm).

Nach Abschluss der Druckbehandlung sollte das Zytoskelett der HPdLF visualisiert werden. Dazu wurden die HPdLF nach der Druckbehandlung fluoreszenzmarkiert (Abschnitt 4.1.10). Die Zellkerne der HPdLF erscheinen blau und das Zytoskelett rot (Abb 19).

Aus den fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen in Abbildung 19 wird eine deutlich verminderte Zelldichte bzw. Anzahl Fluoreszenz-markierter Zellkerne in HPdLF nach der Druckbehandlung erkenntlich. Aus den Aufnahmen gehen keine Unterschiede in der Struktur und Form des Zytoskeletts zwischen den Kontroll-HPdLF und den Druck-behandelten HPdLF hervor.



**Abbildung 19: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der HPdLF nach der Kontroll- bzw. Druck-Behandlung im 3D in vitro Compression Modell**

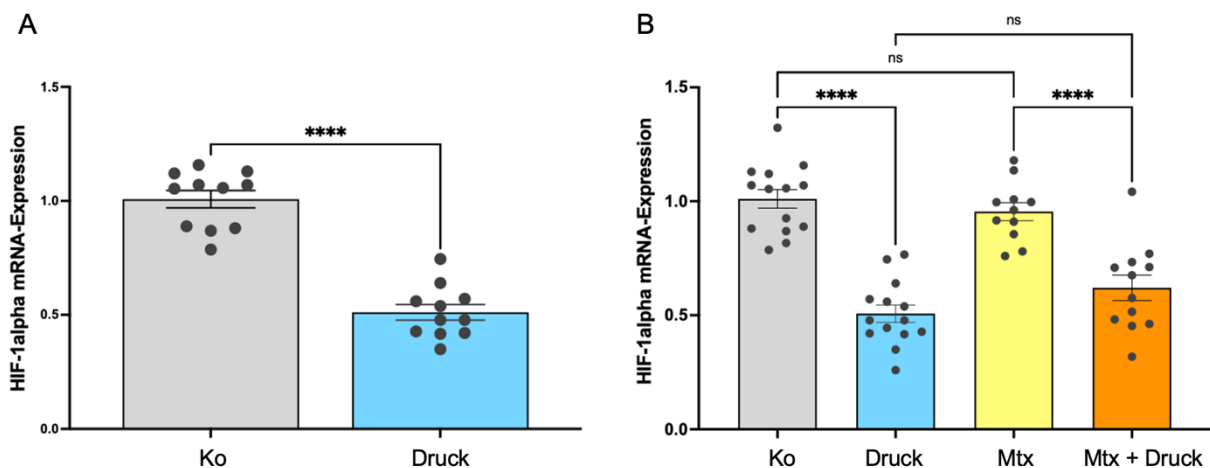
**A** HPdLF aus Kontrollgelen. **B** HPdLF aus Druck-behandelten Gelen. Dargestellt sind: Nativbilder, DAPI-Färbung (blau), Vimentin-Färbung (rot), kombinierte DAPI- und Vimentin-Färbung.

Die HPdLF wurden nach der Kontrollbehandlung bzw. der Druckbehandlung über 24 h aus den Kollagengelen herausgelöst, in Chamber Slides überführt und darin für 24 h im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden die HPdLF auf den Chamber Slides mit PFA fixiert und die Zellkerne (DAPI) und das Zytoskelett (Vimentin) der HPdLF wurden Fluoreszenz-markiert.

## 5.2.2 Untersuchungen zur Änderung der Genexpression von HPdLF unter Druck- und Mtx-Behandlung im 3D in vitro Modell

### 5.2.2.1 Die Druckbehandlung von HPdLF im 3D in vitro Modell führt zu einer signifikant verminderten HIF-1 $\alpha$ mRNA-Expression, während die Mtx-Behandlung keinen signifikanten Effekt auf die Expression zeigt

Für mRNA-Expressionsanalysen in HPdLF im 3D in vitro Modell wurde ein Teil der HPdLF-Kollagengele über 24 h druckbehandelt. Der andere Teil der Gele blieb zur Kontrolle unbehandelt. Nach der Druckbehandlung wurden die Kollagengele mittels einer Kollagenase aufgelöst, um die HPdLF herauszulösen. Mittels qRT-PCR wurden zunächst die HIF-1 $\alpha$  mRNA-Mengen der HPdLF beider Gruppen gemessen. Im Vergleich zu den Kontrollzellen zeigten die druckbehandelten HPdLF eine signifikant verminderte HIF-1 $\alpha$  mRNA-Expression. Im Mittel war die Expression um ca. 50 % reduziert (Abb. 20A).



**Abbildung 20: Analysen der HIF-1 $\alpha$  mRNA-Expression in HPdLF im 3D in vitro Modell unter Behandlung mit Druck bzw. Mtx**

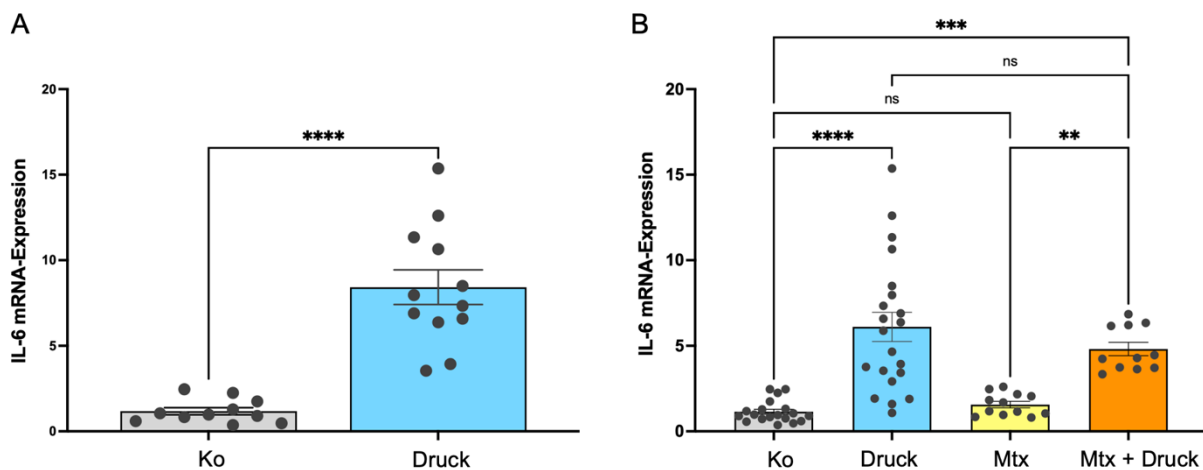
**A** Das HPdLF-Kollagengel wurde über 24 h mittels des „Flexcell FX-5000<sup>TM</sup> Compression“ Systems einem statisch-mechanischen Druck von 40 kPa ausgesetzt. Nach der Druckbehandlung wurden die HIF-1 $\alpha$  mRNA-Expressionen der HPdLF mittels qRT-PCR bestimmt. Die HIF-1 $\alpha$  mRNA-Expressionen wurden auf die Expressionen von HPdLF aus den unbehandelten Kontrollgelen (Ko) bezogen. Zur Auswertung wurde ein ungepaarter t-Test durchgeführt ( $n \geq 11$ , \*\*\*\*  $p < 0,0001$ ). **B** Ein Teil der HPdLF-Kollagengele wurde zusätzlich mit Mtx bzw. kombiniert mit Mtx und Druck behandelt. Die statistische Auswertung erfolgte mittels einer one-way ANOVA ( $n \geq 11$ , \*\*\*\*  $p < 0,0001$ ; ns = nicht signifikant). Dargestellt sind die HIF-1 $\alpha$  mRNA-Expressionen normiert auf die mRNA-Expressionen des Haushaltgens RPL22. Die Säulen repräsentieren die Mittelwerte  $\pm$  SEM.

In einer weiteren Versuchsreihe wurde zusätzlich eine 24-stündige Behandlung der HPdLF-Kollagengele mit Mtx (1  $\mu$ g/ml) sowie eine 24-stündige kombinierten Behandlung mit Mtx (1

µg/ml) und Druck vorgenommen (Abb. 20B). Die Behandlung mit Mtx zeigte keine signifikanten Veränderungen in der HIF-1α mRNA-Expression bezogen auf die unbehandelten Kontrollzellen. Die kombinierte Behandlung mit Mtx und Druck führte zu einer vergleichbaren HIF-1α mRNA-Expression, die in rein druckbehandelten HPdLF gemessen wurde.

### 5.2.2.2 Die statisch-mechanische Druckbehandlung von HPdLF im 3D in vitro Modell geht mit einer erhöhten IL-6 mRNA-Expression einher, Mtx verändert die Expression nicht signifikant

Anschließend sollte die IL-6 mRNA-Expression der HPdLF nach der Druckbehandlung im 3D in vitro Modell untersucht werden. Die Analysen zeigten eine signifikant gesteigerte IL-6 mRNA-Expression im Vergleich zu den HPdLF aus den Kontrollgelen (Abb. 21A). Die Expression war im Mittel um das Achtfache gesteigert.



**Abbildung 21: Analysen der IL-6 mRNA-Expressionen in HPdLF im 3D in vitro Modell unter Behandlung mit Druck bzw. Mtx**

**A** Die HPdLF-Kollagengele wurde über 24 h statisch-mechanischem Druck von 40 kPa ausgesetzt. Die IL-6 mRNA-Expressionen wurde auf die Expressionen von HPdLF aus den unbehandelten Kontrollgelen (Ko) bezogen. Zur Auswertung wurde ein ungepaarter t-Test durchgeführt ( $n \geq 11$ , \*\*\*\*  $p < 0,0001$ ). **B** Die HPdLF-Kollagengele wurden zusätzlich mit Mtx (1 µg/ml) über 24 h behandelt. Ein Teil der HPdLF-Kollagengele wurde kombiniert mit Mtx und Druck behandelt. Die statistische Auswertung erfolgte mittels einer one-way ANOVA ( $n \geq 11$ , \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$ ; ns = nicht signifikant). Dargestellt sind die IL-6 mRNA-Expressionen normiert auf die mRNA-Expressionen des Haushaltgens RPL22. Die Säulen repräsentieren die Mittelwerte  $\pm$  SEM.

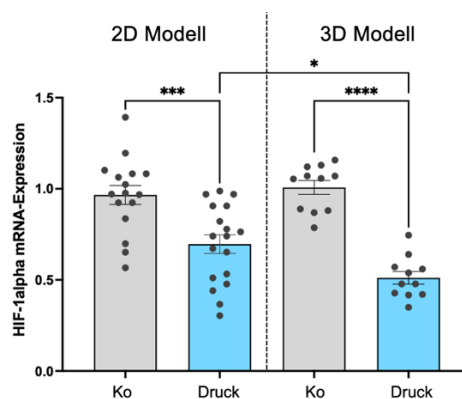
Im nächsten Schritt wurden der Einfluss von Mtx und Mtx kombiniert mit einer Druckbehandlung auf die IL-6 mRNA-Expression untersucht (Abb. 21B). Die Behandlung mit Mtx (1 µg/ml) ging nicht mit einer signifikant veränderten IL-6 mRNA-Menge im Vergleich zu den HPdLF

aus den Kontrollgelen hervor. Die kombinierte Behandlung mit Mtx und Druck führte im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollzellen zu einer im Mittel vierfach erhöhten IL-6 mRNA-Menge. Im Vergleich zu den HPdLF aus den rein druckbehandelten Gelen zeigten die HPdLF nach der kombinierten Behandlung somit eine geringere IL-6 mRNA-Expression. Der Unterschied war aber statistisch nicht signifikant. Im Vergleich zu den kontrollbehandelten HPdLF wiesen die rein druckbehandelten HPdLF eine statistisch signifikantere Steigerung der IL-6 mRNA-Mengen (\*\*\*\*  $p < 0,0001$ ) auf als die kombiniert mit Druck und Mtx behandelten HPdLF (\*\*\*)  $p < 0,001$ ).

### 5.3 Vergleichende Analysen der Genexpressionen in HPdLF im 2D und im 3D in vitro Modell

#### 5.3.1 Im 3D in vitro Modell war die HIF-1 $\alpha$ mRNA-Expression nach der 24-stündigen Druckbehandlung stärker reduziert als im 2D in vitro Modell

Nach der Druckbehandlung der HPdLF über 24 h im 2D und 3D in vitro Modell wurden die HIF-1 $\alpha$  mRNA-Expressionen vergleichend analysiert (Abb. 22).



**Abbildung 22: Veränderungen der HIF-1 $\alpha$  mRNA-Expressionen nach der Druckbehandlung im 2D und im 3D in vitro Modell**

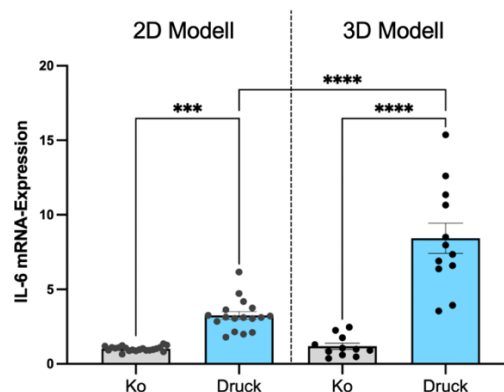
Im 2D Modell wurde über 24 h durch ein Gewicht eine statische Druckkraft von 2 g/cm<sup>2</sup> auf den HPdLF Monolayer ausgeübt. Im 3D Modell wurden die HPdLF in ein Kollagengel aufgenommen. Eine statische Druckkraft von 40 kPa wurde über ein Compression System über 24 h auf das HPdLF Kollagengel ausgeübt. Nach der Druckbehandlung wurden die HIF-1 $\alpha$  mRNA-Expressionen der HPdLF aus beiden in vitro Modellen mittels qRT-PCR bestimmt. Die HIF-1 $\alpha$  mRNA-Expressionen wurde auf die Expressionen der jeweiligen Kontrollzellen (Ko) bezogen. Die statistische Auswertung erfolgte mittels einer one-way ANOVA ( $n \geq 11$ , \*  $p < 0,05$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$ ). Dargestellt sind die HIF-1 $\alpha$  mRNA-Expressionen normiert auf die mRNA-Expressionen des Haushaltgens RPL22. Die Säulen repräsentieren die Mittelwerte  $\pm$  SEM.

Aus den Untersuchungen geht hervor, dass die HIF-1 $\alpha$  mRNA-Expression nach der Druckbehandlung im 2D in vitro Modell im Vergleich zu den Kontrollzellen eine um ca. ein Drittel

signifikant verminderte HIF-1 $\alpha$ -Menge zeigte (\*\* $p < 0,001$ ). Nach der Druckbehandlung im 3D in vitro Modell war eine noch stärkere Reduktion der HIF-1 $\alpha$ -mRNA Menge zu messen. Die HIF-1 $\alpha$  mRNA-Menge war hier im Vergleich zu den Kontrollzellen halbiert (\*\*\*\* $p < 0,0001$ ). Aus dem direkten Vergleich der HIF-1 $\alpha$  mRNA-Expressionen nach der Druckbehandlung in beiden in vitro Modellen ergibt sich so eine signifikant verminderte HIF-1 $\alpha$  mRNA-Expression nach der Druckbehandlung im 3D in vitro Modell im Vergleich zur Expression nach der Druckbehandlung im 2D in vitro Modell (\* $p < 0,05$ ).

### 5.3.2 Im 3D in vitro Modell zeigt sich nach der 24-stündigen Druckbehandlung eine signifikant höhere IL-6 mRNA-Expression in HPdLF als im 2D in vitro Modell

In Abbildung 23 sind die IL-6 mRNA-Expressionen im 2D und im 3D in vitro Modell nach der entsprechenden Druckbehandlung über 24 h im Vergleich zu den Kontrollzellen dargestellt. Es fällt auf, dass die Druckbehandlung sowohl im 2D als auch im 3D in vitro Modell mit einer signifikant gesteigerten IL6 mRNA-Menge einhergeht. Im 2D in vitro Modell war die Expres-



**Abbildung 23: Veränderungen der IL-6 mRNA-Expressionen nach der Druckbehandlung im 2D und im 3D in vitro Modell**

Im 2D Modell wurde über 24 h durch ein Gewicht eine statische Druckkraft von 2 g/cm<sup>2</sup> auf einen HPdLF Monolayer ausgeübt. Im 3D Modell wurden die HPdLF in ein Kollagengel aufgenommen. Eine statische Druckkraft von 40 kPa wurde über ein Compression System über 24 h auf das HPdLF Kollagengel ausgeübt. Nach der Druckbehandlung wurden die IL-6 mRNA-Expressionen der HPdLF aus beiden in vitro Modellen mittels qRT-PCR bestimmt. Die IL-6 mRNA-Expressionen wurde auf die Expressionen der jeweiligen Kontrollzellen (Ko) bezogen. Die statistische Auswertung erfolgte mittels einer one-way ANOVA ( $n \geq 12$ , \*\* $p < 0,001$ ; \*\*\*\* $p < 0,0001$ ). Dargestellt sind die IL-6 mRNA-Expressionen normiert auf die mRNA-Expressionen des Haushaltsgens RPL22. Die Säulen repräsentieren die Mittelwerte  $\pm$  SEM.

sion im Mittel nach der Druckbehandlung verdreifacht im Vergleich zu den Kontrollzellen. Im 3D in vitro Modell wurde im Vergleich zu den HPdLF aus den unbehandelten Kontrollzellen

eine im Mittel ca. 8-fach gesteigerte IL-6 mRNA-Menge gemessen. Die IL-6 mRNA-Expression ist nach der Druckbehandlung über 24 h bei HPdLF aus dem 3D in vitro Modell signifikant höher als bei den druckbehandelten Zellen aus dem 2D in vitro Modell. Anzumerken ist allerdings, dass die Streuung der Einzelwerte bei der Messung der IL-6 mRNA-Menge im 3D in vitro Modell deutlich größer ist als im 2D in vitro Modell.

## **6 Diskussion**

### **6.1 Einordnung und Diskussion der eigenen Ergebnisse im Vergleich zur Literatur**

#### **6.1.1 Die statisch-mechanische Druckbehandlung und die Mtx-Behandlung beeinflussen die in vitro Proliferation von HPdLF zeitlich versetzt**

Die Proliferationsanalysen zeigen, dass die Druckbehandlung zunächst keinen wesentlichen Einfluss auf die Proliferationsrate von HPdLF hat, eine Druckbehandlung über 24 h hinaus hingegen mit einer verminderten Proliferation der HPdLF einhergeht. Dies deutet auf eine zeitverzögerte Reaktion der mechanosensitiven Zellen hin, möglicherweise durch Aktivierung von Signalkaskaden, die die Genexpression verändern (115). Beispielsweise könnten infolge der Druckbehandlung Wachstumsfaktoren, die unter Kontrollbedingungen von HPdLF freigesetzt werden und die Proliferation der HPdLF autokrin und parakrin fördern, nun vermindert exprimiert werden. Durch die Halbwertszeit der Wachstumsfaktoren könnte in den ersten 24 h noch ausreichend Wachstumsfaktor vorliegen, sodass die Proliferationsrate der HPdLF erst zeitlich verzögert zurückgeht.

Anzumerken ist, dass der gemessene Rückgang in der Proliferation auch durch Zellsterben bzw. Apoptose bedingt sein könnte. Es ist bekannt, dass HPdLF unter Stressbedingungen ihre Apoptose einleiten können (34,42,116). Weil auch die Druckbehandlung Zellstress auslösen kann (116), wurden die Zellen nach der Druckbehandlung regelmäßig auf ihre Viabilität mittels MTT untersucht. Es konnte dabei ein geringer Rückgang der Viabilität der HPdLF festgestellt werden. In diesem Zusammenhang ist jedoch nicht auszuschließen, dass beim Entfernen der Glasplatte nach der Druckbehandlung Zellen an dieser verbleiben und somit für die Messung nicht mehr zur Verfügung standen. Auch andere Arbeitsgruppen untersuchten die Zellviabilität nach der Behandlung mit Druck. Während in manchen Studien kein signifikanter Effekt der Druckbehandlung auf die Zellviabilität festgestellt werden konnte (78,117), wurde in anderen Studien ein Rückgang der Zellviabilität beschrieben (67,73,118,119). In diesem Zusammenhang wurde gezeigt, dass sich die prozentuale Zellviabilität auch abhängig von der Anzahl der eingesetzten HPdLF pro Well unterscheiden kann (118). Zudem wurde gezeigt, dass mit der Steigerung der Druckkraft auf die HPdLF die Zellviabilität sinkt (117).

Insgesamt ist es also wahrscheinlich, dass die gemessene Proliferationsminderung sowohl durch die veränderte Stoffwechselaktivität als auch durch Verluste der Zellviabilität zustande kommt. Dies geht auch aus der Studie von Brockhaus et al. (120) hervor: Sie bestimmten die Anzahl vitaler Zellen zu drei Zeitpunkten (24 h, 48 h, 72 h) nach Beginn der Druckbehandlung

mittels Trypanblaufärbung und Zellzählung. Zu allen drei Zeitpunkten konnten sie eine signifikant höhere Zahl toter Zellen nach der Druckbehandlung im Vergleich zu den Kontrollen feststellen (120). Gleichzeitig wurde in dieser Studie aber auch gezeigt, dass Zellzyklus-assoziierte Marker nach der Druckbehandlung vermindert exprimiert werden (120). Somit scheint die verminderte Proliferationsrate auch durch den Einfluss von Druck auf den Zellzyklus bzw. die Zellreplikation vermittelt zu werden.

Die Behandlung der HPdLF mit Mtx in einer Konzentration von 1 µg/ml zeigte in den ersten 48 h keinen Einfluss auf die Proliferationsrate. Nach 48 h wurde in Mtx-behandelten HPdLF ein Rückgang der Proliferation gemessen. Dies zeigt, dass Mtx einen hemmenden Einfluss auf die Proliferation von HPdLF hat, der sich im Vergleich zur Druckbehandlung erst später zeigt. Dieser Effekt stimmt mit der Rolle von Mtx als Folsäureanalogon überein. Durch die Hemmung der Dihydrofolat-Reduktase wird die De-novo-Synthese von DNA und RNA beeinträchtigt, was mit einer verminderten Zellproliferation einhergeht (108,109). Die zeitverzögerte Abnahme der Proliferation könnte dadurch zustande kommen, dass in den ersten 48 h noch ausreichende Mengen an Biomolekülen für die De-novo-Synthese vorhanden sind.

Bisher wurde der Einfluss von Mtx auf HPdLF kaum von anderen Arbeitsgruppen untersucht. Allerdings wurde für Synovial-Fibroblasten eine dosisabhängige Hemmung des Wachstums durch Mtx beschrieben. Dabei wurden Mtx-Konzentrationen von 0,07-2,2 µM getestet (121). An den HPdLF wurde die Proliferation bei einer Mtx-Konzentration von 1 µg/ml (2,2 µM) untersucht. In Folgeexperimenten an HPdLF könnten vergleichende Proliferationsanalysen mit weiteren Mtx-Konzentrationen vorgenommen werden. Lories et al. haben den Effekt von Mtx an Fibroblasten-ähnlichen Synovialzellen von Patienten mit Rheumatoider Arthritis (RA) untersucht. Sie konnten feststellen, dass Synovialzellen von RA-Patienten, die mit Mtx behandelt wurden, in vitro signifikant längere Populationsverdopplungszeiten aufwiesen (122). In derselben Studie wurde außerdem gezeigt, dass die Proliferationsrate unabhängig von der Zellpassage war. Hierbei wurden aber nur die Zellpassagen 2-5 untersucht (122). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden HPdLF in den Passagen 5-10 für Zellkulturexperimente verwendet. In zukünftigen Analysen an HPdLF könnte ein Effekt der Mtx- und Druckbehandlung abhängig von der Zellpassage überprüft werden.

Auch ist bekannt, dass Mtx die Apoptose von Zellen einleiten kann (123). Allerdings ist die eingesetzte Mtx-Konzentration von 1 µg/ml vergleichsweise gering. Bei einer Untersuchung an primären Gingiva-Fibroblasten wurden die Zellen für 24 h mit 5, 25 und 50 µg/ml Mtx behan-

delt. Während die Behandlungen mit 25 und 50  $\mu\text{g/ml}$  zu einer signifikant verminderten Viabilität führten, ging die Behandlung mit 5  $\mu\text{g/ml}$  nicht mit einer Viabilitätsminderung der Fibroblasten einher (124).

Eine kombinierte Behandlung der HPdLF mit Druck und Mtx zeigte eine geringfügige weitere Reduktion in der Proliferation im Vergleich zur alleinigen Druckbehandlung. Da Druck vermutlich den Zellstoffwechsel reduziert, könnte auch die De-novo-Synthese von DNA und RNA eingeschränkt sein. Durch die Reserven an Biomolekülen für die De-novo-Synthese könnte der Effekt von Mtx auf die Proliferation zeitlich weiter verzögert werden. Hierzu könnten Proliferationsanalysen der HPdLF mit Druck und Mtx über längere Zeiträume durchgeführt werden.

Insgesamt geht aus den Untersuchungen hervor, dass scheinbar sowohl die Druck- als auch die Mtx-Behandlung einen hemmenden Einfluss auf die Proliferation von HPdLF *in vitro* haben.

### **6.1.2 Die Druck- und Mtx-Behandlung von HPdLF *in vitro* führen zu morphologischen Veränderungen der HPdLF**

Die Form der HPdLF wurde in zweidimensionalen, lichtmikroskopischen Untersuchungen unter physiologischen Bedingungen als „spindelförmig“ beschrieben (33). Es ist bekannt, dass unter mechanischer Beanspruchung Umbauprozesse des Zytoskeletts stattfinden, die zu einer veränderten Zellform führen können (120,125,126). Der Einfluss von Mtx auf die Morphologie von HPdLF scheint bisher nicht bekannt zu sein. Im Rahmen dieser Arbeit wurden hochauflösende Aufnahmen mittels Rasterelektronenmikroskopie angefertigt, um Veränderungen der Oberflächenstrukturen der HPdLF durch die Behandlung mit Druck bzw. Mtx beurteilen zu können.

Unter Kontrollbedingungen wiesen die HPdLF eine flache, längliche Zellform auf. Die Beschreibung der Zellform als „spindelförmig“ erscheint somit nicht passend zu sein, weil sie einen runden Querschnitt der HPdLF suggeriert. Auch Harashima et al. stellten bei ihren Untersuchungen zur Ultrastruktur des PDL eine flache Struktur der HPdLF unter Kontrollbedingungen fest. Sie beschrieben die dreidimensionale Form der HPdLF als „flügelartig“ und zeigten außerdem die Variabilität ihrer Zellmorphologie auf (127,128). Die Zellen zeigten unter Kontrollbedingungen über Zytoplasmafortsätze direkte Verbindungen untereinander, was mit den beschriebenen Zellinteraktionen zwischen den HPdLF einhergeht (31,127,129). Weil HPdLF die häufigsten Zellen im PDL sind, bekräftigt dieser Befund die ausgeprägten Kommunikationsnetzwerke innerhalb des PDL (23,130).

Nach der Druckbelastung der HPdLF über 24 h, wurde die Form der HPdLF runder und flächiger. Dies bestätigt, dass HPdLF ihre Morphologie *in vitro* an mechanische Bedingungen anpassen können. Interessanterweise scheinen die morphologischen Veränderungen unter Druck die Zell-Zell-Interaktionen der HPdLF zu verstärken. Unter diesen Bedingungen bilden die Zellen vermehrt Filopodien aus, die sich als geflechtartige Ausstülpungen der Zellmembran zeigten. Es ist bekannt, dass Filopodien wichtig für die Erkennung biochemischer Signalmoleküle aus der Umgebung sind und der Zell-Zell-Interaktion dienen (131,132). Durch die Druckbehandlung scheint die Zelle also verstärkt Umgebungssignale zu detektieren und mit anderen Zellen zu interagieren.

Unter Behandlung der HPdLF mit Mtx zeigten die Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen weniger Zytoplasmafortsätze bzw. Verbindungen zu benachbarten HPdLF. Dies könnte bedeuten, dass die Mtx-Behandlung zu einer verminderten Zellinteraktion der HPdLF untereinander sowie zu einer geringeren sensorischen Aktivität der HPdLF für Umgebungssignale führt. Dadurch könnte die Reaktionsfähigkeit von HPdLF auf mechanische Reize beeinträchtigt werden. In einer *in vitro* Studie an HeLa-Zellen wurde mittels Elektronenmikroskopie und Immunfluoreszenz ebenfalls ein erheblicher Einfluss von Mtx auf die Zellmorphologie festgestellt: Unter der Behandlung mit Mtx kam es zu einer deutlichen Reorganisation des Zytoskeletts und zu Zellformveränderungen. Es wurden eine Kontraktion der Zellen bzw. eine kompaktere Zellform beobachtet, indem Zytoskelettelemente verstärkt in Richtung des Nukleus bewegt und verdichtet wurden. Die morphologischen Veränderungen der Zellen ähnelten denen nach einer Hitzeschockbehandlung. Daraus wurde gefolgert, dass auch die strukturellen Anpassungen der Zelle durch die Mtx-Behandlung eine Stressreaktion darstellen (133).

Die kombinierte Behandlung der HPdLF mit Druck und Mtx führte zu einer morphologischen Veränderung, die den HPdLF nach der reinen Druckbehandlung glich. Möglicherweise ist der Effekt der Druckbehandlung auf Zellstrukturänderungen der HPdLF nach 24 h stärker als der der Mtx-Behandlung. Für Folgeexperimenten wäre es interessant, den kombinierten Effekt von Druck und Mtx auf die Morphologie der HPdLF über längere Behandlungszeiträume zu untersuchen.

Die o. g. Veränderungen der Zellmorphologie von HPdLF auf mechanische Reize gehen mit der bekannte Rolle von HPdLF als Mechanosensoren des PDL einher (115,134). Die HPdLF zeigten bereits innerhalb der ersten 24 h morphologische Anpassungen ihrer Struktur auf mechanische Reize, was vermuten lässt, dass HPdLF eine Schlüsselfunktion in der Initialphase der orthodontischen Zahnbewegung (OTM) haben. Durch die gesteigerten Zell-Zell-Interaktionen

nach der Behandlung mit Druck ist es wahrscheinlich, dass HPdLF unter mechanischer Belastung verstärkt biochemische Signale empfangen und abgeben. Dies könnte auch zur Steuerung von PDL-Umbauprozessen während der OTM beitragen. Mtx scheint einen Einfluss auf die Organisation des Zytoskeletts von HPdLF zu haben und die Zellvernetzung der HPdLF zu beeinträchtigen. Unter Druckbehandlung über 24 h war dieser Effekt allerdings nicht sichtbar. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass Mtx in der Initialphase der OTM keinen Einfluss auf die Morphologie von HPdLF in der Kompressionszone des PDL hat. In den späteren Phasen der OTM kann ein Einfluss von Mtx auf die HPdLF Morphologie aber nicht ausgeschlossen werden.

### **6.1.3 Statisch-mechanischer Druck reduziert in vitro die mRNA-Expression von HIF-1 $\alpha$ in HPdLF, während Mtx scheinbar keinen Einfluss hat**

Es ist bekannt, dass der Hypoxie-induzierte Faktor 1 $\alpha$  in HPdLF nicht nur durch Hypoxie, sondern auch durch Stressoren, wie mechanische Belastung, reguliert wird (67). Wir untersuchten die Expression von HIF-1 $\alpha$  auf mRNA-Ebene unter statisch-mechanischer Druckbehandlung im 2D und im 3D in vitro Modell. Nach der Druckbehandlung über 24 h wurde in beiden in vitro Modellen eine reduzierte HIF-1 $\alpha$  mRNA-Menge in HPdLF nachgewiesen. Dieses Ergebnis zeigt, dass die HIF-1 $\alpha$  Expression bereits auf transkriptioneller oder post-transkriptioneller Ebene in HPdLF gesteuert wird. Aus anderen Veröffentlichungen geht hervor, dass HIF-1 $\alpha$  hauptsächlich post-translational über die Proteinstabilität reguliert wird (68,135,136). Für zahlreiche post-translationale Modifikationen, wie Ubiquitynylierung, Acetylierung, Hydroxylierung und Phosphorylierung wurde ein Einfluss auf die Stabilität und Funktion von HIF-1 $\alpha$  nachgewiesen (137). Zum Einfluss von mechanischem Druck auf die HIF-1 $\alpha$  mRNA-Expression scheint bisher wenig bekannt zu sein.

Ullrich et al. führten in diesem Zusammenhang vergleichende in vitro Studien durch, in denen HPdLF entweder unter normoxischen oder unter hypoxischen Umgebungsbedingungen einer mechanischen Druckkraft von 2 g/cm<sup>2</sup> über 48 h ausgesetzt wurden. Nach der Behandlung wurde u.a. die Proteinexpression von HIF-1 $\alpha$  bestimmt. Sowohl unter normoxischen als auch unter hypoxischen Bedingungen wurde eine Hochregulation von HIF-1 $\alpha$  bei der Druckbehandlung festgestellt (67). Dieses Ergebnis steht scheinbar in Widerspruch zu unseren o. g. Ergebnissen auf mRNA-Ebene. Es ist aber zu beachten, dass die Genexpression einer vielfältigen Steuerung auf unterschiedlichen Ebenen unterliegt und von der mRNA-Expression nicht direkt auf die Proteinexpression eines Zielgens rückgeschlossen werden kann. Dies wurde auch in

einer ähnlichen Studie an Endothelzellen deutlich. Darin wurde gezeigt, dass sich die HIF-1 $\alpha$  mRNA-Menge unter hypoxischen Bedingungen stetig verringerte, während ein zeitweiliger Anstieg der HIF-1 $\alpha$  Proteinspiegel gemessen wurde (135). Zudem wurde in der Studie gezeigt, dass das mRNA-bindende Protein Tristetrapolin (TTP) an die 3' untranslatierte Region (3' UTR) von HIF-1 $\alpha$  binden kann und darüber unter hypoxischen Bedingungen den HIF-1 $\alpha$  mRNA-Abbau begünstigt (135). Möglicherweise spielt TTP oder ein anderes mRNA-destabilisierendes Protein eine Rolle bei der reduzierten HIF-1 $\alpha$  mRNA-Menge in HPdLF nach der Druckbehandlung. Ein weiterer Erklärungsansatz für die scheinbar widersprüchlichen Expressionsdaten auf mRNA- und Proteinebene geht aus Untersuchungen an einer Lungenepithel-Zelllinie hervor. Darin konnte dargelegt werden, dass das HIF-1 $\alpha$  Protein unter hypoxischen Bedingungen die HIF-1 $\alpha$  mRNA-Menge hemmt, indem es den Anstieg von Antisense HIF-1 $\alpha$  begünstigt und eine Destabilisierung der HIF-1 $\alpha$  mRNA bewirkt. Möglicherweise unterliegt auch die HIF-1 $\alpha$  mRNA in HPdLF einer solchen negativen Rückkopplungsschleife über das HIF-1 $\alpha$  Protein, was die verminderten mRNA-Menge erklären würde (136).

Anzumerken ist außerdem, dass die o. g. Proteindaten aus der Studie von Ullrich et al. nach einer 48-stündigen Druckbehandlung der HPdLF bestimmt wurden. Wir untersuchten die mRNA-Expression hingegen nach einer Druckbehandlung der HPdLF über 24 h. In nachfolgenden Experimenten wäre es interessant, die mRNA- und die Proteinexpression zu gleichen Zeitpunkten zu bestimmen. Wir untersuchten die HIF-1 $\alpha$  mRNA-Expression im 2D in vitro Modell zusätzlich auch nach 4 und 12 h der Druckbehandlung. Zu diesen Zeitpunkten waren keine Unterschiede in der HIF-1 $\alpha$  mRNA-Expression zwischen den Kontrollzellen und den druckbehandelten Zellen feststellbar. Dies zeigt, dass sich die HIF-1 $\alpha$  mRNA-Mengen mit der Dauer der Druckbehandlung verändern.

Aus unseren Ergebnissen geht nicht hervor, ob die Regulation der HIF-1 $\alpha$  mRNA allein durch die Druckbehandlung zustande kommt, oder ob es im 2D und 3D in vitro Modell zu einer reduzierten Sauerstoffversorgung während der Druckbehandlung kommt, die die HIF-1 $\alpha$  mRNA-Expression ebenfalls beeinflusst. In einer Studie, die rein den Einfluss hypoxischer Umgebungsbedingungen auf HPdLF untersuchte, konnte nach 24 h keinen Unterschied in der HIF-1 $\alpha$  mRNA-Expression zwischen HPdLF unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen festgestellt werden (68). Dies könnte darauf hindeuten, dass die von uns gemessenen Unterschiede in der HIF-1 $\alpha$  mRNA-Expression eher auf die Druckbehandlung zurückzuführen sind.

Bei einer weiteren *in vitro* Untersuchung an HPdLF wurde zudem gezeigt, dass die mechanische Druckbehandlung der HPdLF eine weitaus größere Bedeutung für die molekulare Regulation von PDL-Umbauprozessen während der OTM hat als eine reduzierte Sauerstoffversorgung (67).

Im 2D sowie im 3D *in vitro* Modell wurden auch der Einfluss von Mtx sowie der kombinierte Einfluss von Mtx und Druck auf die HPdLF untersucht. Im 2D *in vitro* Modell ließen sich keine Veränderungen der HIF-1 $\alpha$  mRNA-Menge im Vergleich zu den Kontrollzellen bzw. zu den druckbehandelten Zellen nach 4, 12 und 24 h feststellen. Auch im 3D *in vitro* Modell war nach der 24-stündigen Mtx-Behandlung sowie nach der kombinierten Druck- und Mtx-Behandlung kein Mtx-abhängiger Effekt auf die mRNA-Mengen von HIF-1 $\alpha$  bestimmt worden. Insgesamt scheint Mtx in den gemessenen Zeiträumen in beiden *in vitro* Modellen also keinen Einfluss auf die HIF-1 $\alpha$  mRNA-Expression zu haben und keinen Stressor für die HPdLF darzustellen. Es ist aber möglich, dass Mtx über längere Behandlungszeiträume einen Einfluss auf die HIF-1 $\alpha$  mRNA-Expression hat, was in Folgeexperimenten untersucht werden könnte. Weil es durch die Inflammationsgeschehen bei rheumatischen Erkrankungen zu hypoxischen Umgebungsbedingungen für Zellen kommt, scheint die Hypoxie eine wichtige Bedeutung in der Pathogenese von rheumatoiden Erkrankungen zu spielen (138). Deshalb wäre es interessant, zukünftig den Einfluss von Mtx bzw. den kombinierten Einfluss einer Behandlung mit Mtx und Druck unter hypoxischen Bedingungen *in vitro* zu untersuchen. In diesem Zusammenhang sind aber Ergebnisse aus einer Studie an Melanomzelllinien zu beachten. Darin konnte nachgewiesen werden, dass hypoxischer Stress zu einer erhöhten Resistenz der Melanomzellen gegenüber Mtx führte. Diese Resistenz war zeitlich begrenzt (139). Es ist möglich, dass es auch in HPdLF unter hypoxischen Bedingungen zu einer Resistenz gegenüber Mtx kommt, weshalb in Versuchen der Einfluss von Mtx unter hypoxischen Bedingungen zu verschiedenen Zeitpunkten und über einen längeren Zeitraum untersucht werden sollte.

Darüber hinaus könnten vergleichende Analysen der HIF-1 $\alpha$  Expression in anderen PDL-Zellen vorgenommen werden. Es wurde nachgewiesen, dass die HIF-1 $\alpha$  Expression in Makrophagen im Vergleich zu HPdLF unterschiedlich auf hypoxische Bedingungen und eine mechanische Druckbehandlung reagiert (140). Auch könnten die PDL-Zellen in Kokulturen untersucht werden, um zu überprüfen, ob die Expressionen sich wechselseitig vom Einfluss anderer PDL-Zellen verändern. Weil bekannt ist, dass HIF-1 $\alpha$  die Expression einer Reihe von Mediatoren reguliert, die am Umbau des PDL und des Alveolarknochens während der OTM beteiligt sind, sollten weitere Untersuchungen zur Rolle von HIF-1 $\alpha$  im Rahmen der OTM folgen (64,67,141).

#### **6.1.4 Statisch-mechanischer Druck steigert die mRNA-Expression des Zytokins IL-6 in HPdLF, Mtx beeinflusst die IL-6 mRNA-Expression unter Druckbehandlung bezogen auf die Expression in Kontrollzellen**

Aus zahlreichen Veröffentlichungen geht hervor, dass IL-6 zur sterilen Entzündung in der Initialphase der OTM beiträgt (19). Gleichzeitig ist IL-6 auch ein wichtiger Entzündungsmediator in der Pathogenese der Juvenilen Idiopathischen Arthritis (JIA) (142,143). Weil die JIA bei Kindern mit orofazialen Veränderungen einhergehen kann, die eine kieferorthopädische Therapie erfordern (105), sollte die Expression von IL-6 unter mechanischer Belastung bzw. kombiniert unter antirheumatischer Therapie mit Mtx untersucht werden. Die Expressionsveränderungen von IL-6 in HPdLF unter mechanischer Belastung sind bereits vielfältig untersucht worden. Hingegen scheint zum Einfluss von Mtx auf die Genexpression in HPdLF oder anderen Zellen des PDL bisher wenig bekannt zu sein. Wir untersuchten die IL-6 mRNA-Expression sowohl im 2D als auch im 3D in vitro Compression Modell.

In beiden in vitro Modellen wurde nach der Druckbehandlung der HPdLF über 24 h eine gesteigerte IL-6 mRNA-Menge festgestellt. Das Ergebnis geht mit den Studien anderer Arbeitsgruppen einher, die nach der Behandlung mit statisch-mechanischem Druck im 2D in vitro Modell ebenfalls eine Hochregulation von IL-6 auf mRNA- bzw. Proteinebene nachweisen konnten (76,78,144,145). Der Effekt von statisch-mechanischem Druck scheint dabei abhängig von der Behandlungsdauer zu sein. Unsere Untersuchungen zeigten nach der 4-stündigen Druckbehandlung keinen signifikanten Effekt auf die IL-6 mRNA-Expression, während sie nach 12 und 24 h hochreguliert war. Auch Grimm et al. konnten in ihrer Studie nach einer Druckbehandlung der HPdLF über 3 h keine Veränderung in der IL-6 mRNA-Expression detektieren (146). Weider et al. stellten bei ihren Untersuchungen eine erhöhte IL-6 mRNA-Menge nach 6, 24 und 48 h fest, während nach 72 h kein Effekt mehr messbar war (144). Unsere Daten gehen mit den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen einher und bekräftigen die Annahme, dass IL-6 ein Mediator der akuten, aseptischen Entzündung in der Initialphase der OTM ist (19).

Im nächsten Schritt sollte untersucht werden, ob Mtx einen Einfluss auf die IL-6 mRNA-Expression in der Initialphase der OTM haben könnte. Es ist bekannt, dass Mtx die Expression von IL-6 sowohl über die Regulation des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B als auch über gesteigerte Adenosinspiegel hemmen kann (108,111). Im 2D in vitro Modell zeigte sich weder durch die Behandlung mit Mtx (1  $\mu$ g/ml) noch durch die kombinierte Behandlung mit Druck und Mtx ein signifikanter Einfluss auf die IL-6 mRNA-Expression. Auch die Behandlung der HPdLF mit Mtx in einer höheren Konzentration (5  $\mu$ g/ml) bewirkte keine Veränderungen der IL-6 mRNA-

Expression. Im 3D in vitro Modell bewirkte die Mtx-Behandlung keine Veränderung der IL-6 mRNA-Expression im Vergleich zu den Kontrollzellen. Allerdings ergab die kombinierte Druck- und Mtx-Behandlung bezogen auf die IL-6 mRNA-Expression in den Kontrollzellen einen geringeren Anstieg der IL-6 mRNA-Expression als nach der reinen Druckbehandlung. Der Unterschied in der IL-6 mRNA-Expression im Vergleich zwischen der reinen Druckbehandlung und der kombinierten Druck- und Mtx-Behandlung war jedoch nicht signifikant, was ein Hinweis darauf sein könnte, dass Mtx die entzündlichen Prozesse im PDL während einer OTM im Vergleich zur OTM ohne medikamentöse Mtx-Therapie nicht verändert. Es ist aber zu beachten, dass die initiale sterile Entzündung auch durch die Expression anderer Zytokine zustande kommt (71,120), die hier nicht untersucht worden sind und deren Expression durch die Behandlung mit Mtx beeinflusst werden könnte. Darüber hinaus sind neben HPdLF auch viele weitere Zellen des PDL an der Entzündungsreaktion beteiligt, deren Genexpression durch Mtx reguliert werden könnte. In Folgeexperimenten könnten HPdLF in Kokulturen mit anderen PDL-Zellen untersucht und die Expressionen weiterer Entzündungsmediatoren nach der Behandlung mit Mtx analysiert werden. Für Untersuchungen der PDL-Zellen in Kokulturen würden es sich anbieten, die Zellen als Sphäroide aggregieren zu lassen (147).

Es ist anzumerken, dass unsere Versuche an der HPdLF Zellkulturlinie vorgenommen worden sind. Die HPdLF Zellkulturlinie kann sich aber in ihren zellulären Eigenschaften und ihrem Zytokin-Expressionsmuster von primären HPdLF unterscheiden. Einige Arbeitsgruppen haben den Einfluss von mechanischem Druck an primären HPdLF untersucht (71,77,80,118). Aus dem Vergleich der Veröffentlichungen geht hervor, dass die Ergebnisse aus molekularbiologischen Analysen nach der statisch-mechanischen Druckbehandlung in primären HPdLF deutlich stärker variieren als in der HPdLF Zellkulturlinie. Während in einer Studie nach der 24-stündigen Druckbehandlung keine IL-6 mRNA-Expressionsveränderungen in primären HPdLF gemessen wurden (80), konnte eine andere Arbeitsgruppe nach 24 h eine signifikant gesteigerte IL-6 mRNA-Expressionen nachweisen (118). Auch zur Dauer der IL-6 Hochregulation gehen aus der Literatur unterschiedliche Daten hervor. In machen Veröffentlichungen war die erhöhte IL-6 mRNA-Menge über 5 Tage nachweisbar (118), während sie in anderen Veröffentlichungen nur über 2 Tage festgestellt werden konnte (71). Alle o. g. Arbeitsgruppen verwendeten das 2D in vitro Modell nach Kanzaki et al. (74) mit einer Kraftapplikation von  $2 \text{ g/cm}^2$ . Möglicherweise sind die abweichenden Ergebnisse durch die Verwendung der HPdLF in unterschiedlichen Zellpassagen zu begründen oder durch eine unterschiedliche Zellkonfluenz zu Beginn des Versuchs. Auch ist zu erwägen, dass genetische Polymorphismen nachweislich einen Einfluss auf die Genexpression von HPdLF in der initialen Phase der OTM haben können (148).

## 6.2 Erfolgreiche Etablierung des 3D in vitro Compression Modells

In vergleichenden Analysen anderer Arbeitsgruppen konnte gezeigt werden, dass die Zelleigenschaften und die Genexpressionsmuster zwischen 2D und 3D in vitro Zellkultursystemen stark variieren können (88). Die 3D in vitro Zellkultursysteme scheinen die in vivo Umgebungsbedingungen der Zellen wesentlich besser widerzuspiegeln (149). Deshalb sollte im Rahmen dieser Arbeit ein 3D in vitro Compression Modell etabliert werden, das sich für die mechanische Behandlung von HPdLF eignet. Verschiedene Materialien und Zusammensetzungen wurden als Matrix für dreidimensionale Gel-Zell-Systeme getestet. Bei der Wahl der Matrix wurde auf die Biokompatibilität, die mechanischen Eigenschaften und das adäquate Wachstumsverhalten der HPdLF im Gel geachtet. Das Kollagengel PureCol hat diese Anforderungen im Vergleich zu den anderen getesteten Materialien am besten erfüllt. Mittels Lichtmikroskopie konnte gezeigt werden, dass die HPdLF in der Gelmatrix wachsen (Abschnitt 5.2.1).

Besonders geeignet erschien das PureCol Kollagengel auch aufgrund seiner ähnlichen Zusammensetzung im Vergleich zur extrazellulären Matrix des PDL in vivo (Abschnitt 2.1.2.2). Das PureCol Kollagengel besteht hauptsächlich aus Typ I Kollagen, das auch in vivo die Hauptmasse des PDL-Kollagens und die strukturelle Festigkeit des PDL ausmacht (11,27). Allerdings muss angemerkt werden, dass die Anordnung der Kollagenfibrillen im PDL in vivo streng organisiert ist und das Kollagen abhängig von der mechanischen Belastung im PDL angeordnet wird (11). HPdLF sind in vivo maßgeblich an dieser Organisation beteiligt und richten auch ihre eigene Morphologie und Ausrichtung nach der Struktur der extrazellulären Matrix (2,11,12). In einer in vitro Studie wurden dermale Fibroblasten in ein rekonstruiertes Kollagengel aufgenommen. Strukturelle Analysen zeigten, dass die Fibroblasten innerhalb des Kollagengels biosynthetisch aktiv waren und sie einen Umbau der EZM bewirkten. Durch die Umstrukturierung wurde das Kollagengel widerstandsfähiger gegenüber mechanischer Zugbelastung (150). In zukünftigen Analysen könnte untersucht werden, ob HPdLF im Kollagengel ebenfalls einen Umbau der EZM bewirken und unter mechanischer Belastung die Ausrichtung der Kollagenfibrillen in vitro verändern. Zudem könnten Veränderungen der HPdLF in ihrer Ausrichtung im Kollagengel abhängig von der mechanischen Belastung stattfinden. Eine Arbeitsgruppe analysierte in diesem Zusammenhang die Zellausrichtung sowie die Zellwanderungen von primären Prostata-Fibroblasten in einem Kollagengel. Sie konnten mittels Fluoreszenzmikroskopie zeigen, dass die Fibroblasten unter mechanischer Druckbehandlung ihre Ausrichtung von der Krafrichtung abwandten und innerhalb des Gels abwanderten (151).

Für die Untersuchungen der HPdLF im 3D in vitro Modell wurden zunächst Vorversuche durchgeführt, in denen eine geeignete Zellzahl bzw. -dichte der HPdLF innerhalb des Kollagen-gels ermittelt wurden. Wir konnten in den Vorversuchen feststellen, dass zum Anwachsen der HPdLF innerhalb der Gelstruktur eine längere Inkubationszeit vor Beginn der Druckbehand-lung erforderlich ist als im 2D in vitro Modell. Die Inkubation der HPdLF-Kollagengele über 4 Tage vor Beginn der Druckbehandlung stellte sich als geeigneter Zeitraum für die Prolifera-tion der Zellen innerhalb des Gels heraus. Somit war die Versuchsdauer im 3D in vitro Modell insgesamt wesentlich länger als im 2D in vitro Modell.

Für die Druckbehandlung der HPdLF-Kollagengele sollte eine Apparatur gewählt werden, die im Inkubator verwendet werden kann, um ideale Wachstumsbedingungen auch während der Druckbehandlung beibehalten zu können (37 °C, 100 % Wasserdampfsättigung, 5 % CO<sub>2</sub>-Be-gasung). Das „Flexcell FX-5000 Compression“ System ist auf die Anwendung im Inkubator ausgerichtet und computergesteuert können damit die Druckstärke, -dauer und -frequenz indi-viduell eingestellt werden. Durch die individuelle Einstellung können zukünftig auch andere Druckprofile angewandt und ihr Einfluss auf die Genexpression in PDL-Zellen analysiert wer-den. Dies erlaubt eine größere Flexibilität im Vergleich zum 2D in vitro Modell.

Die Zellviabilität nach der Druckbehandlung im 3D Compression Modell wurde mittels des Fluoreszenzfarbstoffs „CellTracker“ bestätigt, jedoch war eine geringere Zelldichte als in den Kontrollgelen zu erkennen. Wie in Abschnitt 6.1.1 ausführlich diskutiert wurde, könnte die verminderte Zelldichte durch eine geringere Proliferation der HPdLF unter der Behandlung mit mechanischem Druck und/oder durch Zellsterben unter der Druckbehandlung zustande kom-men. Es ist aber zu beachten, dass beim Herauslösen der Zellen aus den Gelen mithilfe von Kollagenase möglicherweise nicht alle Zellen aus dem Gel herausgelöst werden konnten. Ins-besondere in den druckbehandelten, komprimierten Gelen könnte das Herauslösen der HPdLF im Vergleich zu den Kontrollgelen erschwert werden, was die beobachtete Zelldichte verfäl-schen könnte.

Aus den Aufnahmen im Fluoreszenzmikroskop nach der Kernfärbung mit DAPI bzw. der Flu-oreszenzmarkierung des Zytoskeletts mittels Antikörper gegen Vimentin wurde die vermin-derte Zelldichte der Druck-behandelten HPdLF ebenfalls deutlich. Jedoch konnten die struktu-rellen Veränderungen des Zytoskeletts, die mittels Elektronenmikroskopie nach der Druckbe-handlung im 2D in vitro Modell beobachtet wurden (Abschnitt 5.1.2), mittels Fluoreszenzmik-roskopie nicht festgestellt werden. Dabei ist zu beachten, dass die HPdLF nach der Druckbe-handlung im 3D in vitro Compression Modell über 24 h auf den Chamber Slides adhären

mussten. Es ist wahrscheinlich, dass die druckbedingten Veränderungen des Zytoskeletts durch die zeitlich verzögerte Fixierung der HPdLF auf den Chamber Slides bzw. die dynamischen Umbauprozesse des Zytoskeletts nicht mehr feststellbar waren. Generell ist anzumerken, dass die Untersuchung der HPdLF nach der Druckbehandlung im 3D in vitro Modell im Vergleich zum 2D Compression Modell zeitlich stärker verzögert wird, weil zunächst die Gelmatrix mittels Kollagenase aufgelöst werden muss. Dadurch könnten druckbedingte Effekte auf das Zytoskelett und auf die Genexpression zum Messzeitpunkt bereits abgeschwächt sein, was bei der Einordnung der Ergebnisse beachtet werden sollte.

Nach der Druckbehandlung im 3D Modell konnte eine gesteigerte IL-6 mRNA-Menge im Vergleich zu unbehandelten HPdLF-Kollagengelen bestimmt werden (Abb. 21). Dies zeigt, dass die Druckbehandlung im 3D in vitro Compression Modell erfolgreich war und die Druckkraft vom Kollagengel auf die HPdLF übertragen worden ist. Im Vergleich zum 2D Modell war der Anstieg der IL-6 mRNA nach Druckexposition im 3D Modell stärker, was mit Daten anderer Arbeitsgruppen übereinstimmt, die nach Druckbehandlung von HPdLF in Sphäroiden ebenfalls eine stärkere Zunahme der IL-6 mRNA-Expression messen konnten als in einem zweidimensionalen Zellkultursystem (93). Dabei wurden jedoch unterschiedliche Druckkräfte angewandt, da die Kraft im 2D Modell direkt und im 3D Modell über die Gelmatrix übertragen wird. Die gewählte Druckkraft in den in vitro Modellen wird in Abschnitt 6.3.4 separat diskutiert.

In beiden in vitro Modellen führte die Druckbehandlung über 24 h zu einer verminderten HIF-1 $\alpha$  mRNA-Expression bezogen auf die jeweiligen Kontrollzellen (Abb. 13, Abb. 20). Aus den vergleichenden Analysen ging die Druckbehandlung im 3D in vitro Modell mit einer geringeren HIF-1 $\alpha$  mRNA-Menge einher als im 2D in vitro Modell (Abb. 22). Zwar könnte dies ein Hinweis sein, dass sich der Zellstress während der Kontroll- bzw. Druckbehandlung in den beiden in vitro Modellen unterscheidet, allerdings sind bei der Interpretation der Ergebnisse die unterschiedliche Druckkraft und Druckübertragung in den beiden in vitro Modellen zu berücksichtigen (siehe Abschnitt 6.3.4). Wie in Abschnitt 6.1.3 beschrieben, wurden außerdem negative Rückkopplungsschleifen zwischen der HIF-1 $\alpha$  mRNA- und Protein-Expression festgestellt, weshalb nicht direkt von der gemessenen HIF-1 $\alpha$  mRNA-Menge auf die Proteinmenge rückgeschlossen werden sollte (136).

Neben dem von uns verwendeten Gel-basierten System, das Bestandteile der EZM enthalten kann, gibt es gerüstbasierte 3D Kulturen, Bioprinting-Modelle und Sphäroid-Modelle. Durch die vergleichsweise physiologische Zellform, Zellproliferation und Zell-Zell-Interaktion in den

3D Zellsystemen werden die Differenzen zwischen dem Zellkultursystem und der in vivo Zellphysiologie geringer. Damit können auch physiologischere Reaktionen der Zellen auf mechanische Stimuli angenommen werden (149). So könnten in zukünftigen Versuchen auch zugrundeliegende Mechanotransduktionswege in HPdLF näher beleuchtet werden. 3D Zellkultursysteme sollen zudem besser geeignet sein, um den Effekt von Medikamenten auf Zellen zu untersuchen, weil auch die Metabolisierung von Medikamenten im 3D Zellkultursystem eher der physiologischen Metabolisierung entspricht (152). Die zukünftige Testung anderer (antirheumatischer) Medikamente an PDL-Zellen sollte deshalb in 3D in vitro Zellkultursystemen erfolgen.

Insgesamt ist festzuhalten, dass das etablierte 3D in vitro Modell zwar deutlich zeitaufwändiger und kostenintensiver in der Versuchsdurchführung ist als das 2D in vitro Modell, aber die physiologischen Bedingungen der HPdLF wesentlich besser repräsentiert werden (149,153). Auch die Möglichkeit, PDL-Zellen als Kokultur im 3D in vitro Modell einzusetzen, erlaubt es in zukünftigen Versuchen, das PDL als komplexes Zellnetzwerk auf molekularbiologischer Ebene untersuchen zu können.

## **6.3 Beurteilung des Studiendesigns**

### **6.3.1 Beurteilung des 2D in vitro Modells**

Der Effekt von mechanischem Druck auf die Genexpression in HPdLF wurde in der Vergangenheit größtenteils im 2D in vitro Compression Modell untersucht (85), das von Kanzaki et al. (74) etabliert worden ist. Auch im Rahmen dieser Arbeit wurde es für die mechanische Stimulation von HPdLF verwendet. Das 2D in vitro Modell hat sich durch die relativ einfache Handhabung, die geringen Kosten und die gute Reproduzierbarkeit der Ergebnisse bewährt (149,153). Ein Vorteil von zweidimensionalen Zellkultursystemen ist außerdem, dass die Nährstoffversorgung aller Zellen im Monolayer sehr gleichmäßig ist (153). Im hier verwendeten 2D in vitro Modell wurde aber eine Glasplatte auf den Zellmonolayer platziert, was die Nährstoffversorgung sowie die Oxygenierung der Zellen einschränken könnte. Dies spiegelt aber die physiologischen Bedingungen im PDL während der OTM wider, weil es auch in vivo während der OTM durch die Kompression von Gefäßen zu hypoxischen Bedingungen der Zellen auf der Druckseite des PDL kommt (64,154). Nachteilig am 2D in vitro Modell ist, dass sich die Zellen nur zweidimensional ausbreiten können, was die physiologische Zellform verändert und die Zell-Zell-Interaktionen stark reduziert (153). Zudem wirkt die Druckkraft auf die HPdLF rein

unidirektional (85). Diese Abweichungen könnten die zelluläre Antwort von HPdLF auf mechanische Stimuli im 2D in vitro Modell von der physiologischen Zellantwort abweichen lassen. Auch konnte festgestellt werden, dass Zellen in zweidimensionalen Kultursystemen weniger resistent gegen Medikamente sind, wodurch der Effekt eines Medikaments überschätzt werden kann (155). Dies muss auch bei dem gemessenen Effekt von Mtx auf die Proliferation und die Morphologie von HPdLF berücksichtigt werden.

### **6.3.2 Einschränkungen des 3D in vitro Modells**

In Abschnitt 6.2 wurde insbesondere auf die Vorteile des 3D in vitro Modells eingegangen. Zwar scheint das 3D in vitro Modell die physiologischen Bedingungen der HPdLF innerhalb des PDL besser widerzuspiegeln, allerdings hat auch dieses Modell Nachteile.

Wie bereits genannt, sind die Versuche im 3D in vitro Modell mit einem größeren zeitlichen Aufwand und deutlich höheren Materialkosten verbunden als Versuche im 2D in vitro Modell (153). Weitere Probleme des Modells sind die erschwerte Reproduzierbarkeit der Ergebnisse sowie die stärkeren Schwankungen der Ergebnisse innerhalb eines Versuches: Bei den Genexpressionsanalysen im 3D in vitro Modell war auffällig, dass die IL-6 mRNA-Expression – insbesondere bei den druckbehandelten HPdLF – im Vergleich zum 2D in vitro Modell eine deutlich größere Streuung aufwies. Eventuell könnten Zellen abhängig von ihrer Position im Gel einer leicht unterschiedlichen Druckkraft ausgesetzt werden. Zudem war es durch geringe Schwankungen in der Höhe der HPdLF-Kollagengele schwierig, die Inneneinsätze der „Stationary platens“ (Abb. 7) so einzustellen, dass sie die Oberfläche der Gele berührten, ohne sie bereits zu komprimieren. Schon minimale Ungenauigkeiten in der Position der Inneneinsätze könnten Auswirkungen auf die Druckbehandlung haben und die Streuung erklären. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass abhängig vom gewählten Material für die Matrix von dreidimensionalen HPdLF-Zellkultursystemen Unterschiede in der IL-6 mRNA-Expression nach der Druckbehandlung bestehen (93). Unsere Versuche wurden ausschließlich unter Verwendung von Kollagengel durchgeführt.

### **6.3.3 Eingeschränkte Vergleichbarkeit zwischen in vitro und in vivo Bedingungen**

Bei der Einordnung unserer Ergebnisse aus in vitro Versuchen muss beachtet werden, dass die Behandlung mit Mtx nur über einen vergleichsweise kurzen Zeitraum erfolgte. Kinder mit JIA, die kieferorthopädisch therapiert werden, sind abhängig vom individuellen Ansprechen und

Krankheitsverlauf ggf. schon über mehrere Monate mit Mtx therapiert worden. In vitro sind Versuche über diese langen Zeiträume nicht möglich. Dafür würden sich Versuche am Tiermodell eignen. Mehrere Arbeitsgruppen haben in Mäusen oder Ratten über Nickel-Titan-Spiralfedern eine orthodontische Zahnbewegung ausgelöst und anschließend Gewebeuntersuchungen des PDL vorgenommen (156–159). Der Einfluss von Mtx auf die OTM wurde in einer Studie an einem Rattenmodell getestet. Den Tieren wurde mehrfach intraperitoneal Mtx in Konzentrationen von 0,75 oder 1,5 mg/kg Körpergewicht über 21 Tage injiziert und durch Drahtfedern zwischen dem Schneidezahn und dem ersten Molaren wurde eine OTM bewirkt. Nach 21 Tagen wurden histologische und immunhistologische Analysen vorgenommen. Im Vergleich zu den Kontrolltieren wurde bei den mit Mtx behandelten Tieren eine erhöhte Anzahl an Osteoklasten und Blutgefäßen im periodontalen Gewebe festgestellt. Zudem gab es Hinweise, dass durch die Mtx-Injektion in der höheren Dosis die OTM beschleunigt wird (157). Die zugrundeliegenden molekularbiologischen Mechanismen wurden in dieser Studie nicht beleuchtet. Die Ergebnisse suggerieren aber, dass Mtx in vivo einen Einfluss auf die OTM haben könnte. Für zukünftige Untersuchungen zur JIA könnte ein Arthritis-Tiermodell verwendet werden, das über längere Zeit eine antirheumatische Therapie mit Mtx erhält, bevor eine orthodontische Zahnbewegungen und Analysen des PDL erfolgen.

Weiterhin ist zu bedenken, dass zur Therapie der JIA abhängig vom JIA-Subtyp andere antirheumatische Medikamente und auch Kombinationstherapien dieser Medikamente eingesetzt werden (107). Zum besseren Verständnis des Einflusses von antirheumatischen Medikamenten auf die kieferorthopädische Therapie sollte der Effekt der anderen für die JIA zugelassenen Medikamente sowie deren Kombinationseffekte überprüft werden.

Aus unseren Untersuchungen ergeben sich erste Hinweise darauf, dass Mtx möglicherweise keinen Einfluss auf die entzündlichen Reaktionen im PDL in der Initialphase der OTM hat. Ein genauer Rückschluss auf die in vivo Auswirkungen der antirheumatischen Behandlung unter kieferorthopädischer Therapie ist aus unseren Daten noch nicht möglich.

#### **6.3.4 Schwierigkeiten bei der Wahl einer adäquaten Druckkraft zur Behandlung der HPdLF in vitro**

Wie in Abschnitt 6.2 diskutiert wurde, konnten wir bei der Druckbehandlung der HPdLF im 3D in vitro Modell eine deutlich stärkere Zunahme der IL-6 mRNA-Expression bezogen auf die Kontrollbehandlung im Vergleich zu den Messungen im 2D in vitro Modell feststellen. Es

ist aber zu beachten, dass dieser Effekt möglicherweise durch die Unterschiede in der angewandten Druckkraft und Druckübertragung zustande kommen könnte.

Im 2D in vitro Modell wurde eine Druckkraft von 2 g/cm<sup>2</sup> appliziert, während die Gele im 3D in vitro Modell mit 40 kPa Druckkraft behandelt worden sind. Da die Druckkraft im 3D Modell indirekt über die Gelmatrix auf die HPdLF wirkt und die genaue Kraftübertragung unklar ist, wurde eine höhere Druckkraft gewählt. Zur Festlegung der Druckkraft im 3D in vitro Modell wurde Rücksprache mit F. Etienne (UFR des Sciences Fondamentales et Biomédicales, Université Paris Cité) gehalten, der seit mehreren Jahren Druckversuche an mechanosensitiven Zellen mithilfe des Flexcell Compression Systems vornimmt (160). Auch Nettelhoff et al. verwendeten zur Simulation der OTM in vitro eine vergleichbare Druckkraft (117). Zur Simulation der OTM im 2D in vitro Modell wurden von anderen Arbeitsgruppen überwiegend Drückkräfte zwischen 0,5 und 8 g/cm<sup>2</sup> gewählt (74,76). Aus vorausgegangenen Studien geht insgesamt hervor, dass sich die Genexpression von IL-6 und anderen biochemischen Molekülen abhängig von der Stärke der Druckkraft verändert (76,77,93,118).

Dies zeigt, dass es generell schwierig ist, die Druckkraft, die in vivo durch eine OTM auf HPdLF ausgeübt wird, auf ein in vitro Modell zu übertragen. Außerdem kann auch die Druckkraft, die in vivo während einer OTM auf einen Zahn ausgeübt wird, variieren. Insgesamt können unsere Druckversuche somit nur als Annäherung an die mechanische Belastung der HPdLF in vivo während einer OTM angesehen werden.

### **6.3.5 Herausforderungen bei der Festlegung eines geeigneten Haushaltgens für qRT-PCR Analysen**

Eine weitere Schwierigkeit, die sowohl im 2D als auch im 3D in vitro Modell auftrat, bestand darin, ein geeignetes Haushaltgen für die Versuche zur statisch-mechanischen Druckbehandlung zu finden. Um die Expression der Zielgene auf die Expression eines Haushaltgens normalisieren zu können, war es wichtig, dass die Expression des Haushaltgens durch die mechanische Druckstimulation nicht beeinflusst wurde. Kirschneck et al. haben in diesem Zusammenhang 15 potenzielle Gene auf ihre Eignung als Haushaltsgene in HPdLF getestet. Sie konnten feststellen, dass PPIB (Peptidylprolylisomerase A), TBP (TATA-Box-bindendes Protein) und RPL22 (Ribosomales Protein L22) am stabilsten exprimiert wurden (86). Die Empfehlungen von Kirschneck et al. basieren aber auf Untersuchungen an primären HPdLF. In der von uns verwendeten HPdLF-Zellkulturlinie wurden die Expressionen von PPIB und TBP allerdings durch die mechanische Druckbehandlung reguliert und waren damit zur Normalisierung

nicht geeignet. RPL22 zeigte hingegen auch unter mechanischer Stimulation der HPdLF eine konstante Expression und wurde deshalb zur Normalisierung der HIF-1 $\alpha$  und IL-6 mRNA-Expressionen verwendet.

## 7 Zusammenfassung

Die juvenile idiopathische Arthritis (JIA) ist die häufigste chronisch-entzündliche Erkrankung im Kindesalter mit einer weltweit steigenden Inzidenz. Im Krankheitsverlauf kommt es bei ca. 90 % der erkrankten Kinder zu arthritischen Veränderungen des Kiefergelenks, was das vertikale und sagittale Wachstum des Unterkiefers beeinflussen und in einer Distalbisslage (Angle-Klasse II) und einem offenen Biss resultieren kann. Zur Behandlung der JIA ist oft eine Kombination aus einer medikamentös-antirheumatischen und einer kieferorthopädischen Therapie erforderlich.

Methotrexat (Mtx) ist ein zentrales Medikament in der Therapie der JIA und wird gemäß der aktuellen S2-Leitlinie je nach Subtyp auch als Erstlinientherapie empfohlen. Diese Arbeit untersucht den Einfluss von Mtx auf die sterile Entzündung in der Initialphase der orthodontischen Zahnbewegung. Dafür wurden *in vitro* Untersuchungen an humanen periodontalen Ligament-Fibroblasten (HPdLF) vorgenommen. HPdLF spielen eine wesentliche Rolle in der sterilen Entzündungsreaktion und initiieren darüber Umbauprozess des Zahnhalteapparates. Die HPdLF wurden hinsichtlich ihrer Proliferation, ihrer Morphologie und ihrer Genexpression in Abhängigkeit von einer Behandlung mit Mtx und/oder statisch-mechanischem Druck untersucht.

Durch die Lebendzellanalyse wurde gezeigt, dass sowohl die mechanische Druckbehandlung als auch die Behandlung mit Mtx einen hemmenden Effekt auf die Proliferation von HPdLF *in vitro* haben. Während die Druckbehandlung nach 24 h einen Rückgang der Proliferation bewirkte, wurde der hemmende Einfluss von Mtx erst nach 48 h in den Wachstumskurven deutlich. Die kombinierte Behandlung mit Druck und Mtx führte zu einem Wachstum, das mit dem der reinen Druckbehandlung vergleichbar war. Dies könnte ein Hinweis sein, dass die Proliferation von HPdLF in der Initialphase der orthodontischen Zahnbewegung überwiegend durch den mechanischen Druck beeinflusst wird und Mtx während der orthodontischen Zahnbewegung keinen oder einen zeitlich verzögerten Effekt auf das Wachstum von HPdLF hat.

Die morphologischen Veränderungen der HPdLF wurden mittels Rasterelektronenmikroskopie untersucht. Es zeigte sich, dass die im Lichtmikroskop als „spindelförmig“ beschriebenen HPdLF sich im Rasterelektronenmikroskop mit flachem Zellkörper darstellten. Die Behandlung mit Mtx führte zu einer kompakteren Zellform und einer reduzierten Anzahl an Zytoplasmafortsätzen. Mechanischer Druck bewirkte eine deutliche Verbreiterung der Zellkörper sowie die Bildung von geflechtartigen, dünnen Membranausstülpungen, sogenannten Filopodien, die

die HPdLF miteinander vernetzen und so die Zellkommunikation der HPdLF förderten. Wiederum führte die kombinierte Behandlung mit Druck und Mtx zu einer Zellmorphologie, die der reinen Druckbehandlung ähnelt, was den stärkeren Einfluss der Druckbehandlung in der Initialphase der orthodontischen Zahnbewegung bestätigt.

Mittels qRT-PCR wurden Veränderungen der Genexpression in HPdLF analysiert. Es wurden die mRNA-Expressionen des Hypoxie-induzierten Faktors  $1\alpha$  (HIF- $1\alpha$ ) sowie des Interleukins-6 (IL-6) untersucht. Aus Studien anderer Arbeitsgruppen geht hervor, dass zellulärer Stress, wie Hypoxie und mechanische Stimuli, zu einer verstärkten Proteinexpression von HIF- $1\alpha$  führen. Bisher wurde angenommen, dass die Expression von HIF- $1\alpha$  überwiegend auf translationaler und post-translationaler Ebene gesteuert wird. Wir konnten zeigen, dass eine statisch-mechanische Druckbehandlung mit einer verminderten HIF- $1\alpha$  mRNA-Menge in HPdLF einhergeht. Unser Ergebnis lässt vermuten, dass HIF- $1\alpha$  bereits auf transkriptionaler oder post-transkriptionaler Ebene reguliert wird und das HIF- $1\alpha$ -Protein die mRNA-Expression über einen negativen Feedbackmechanismus regulieren könnte. Unsere Analysen zur IL-6 mRNA-Expression zeigten eine Hochregulation des Zytokins durch die mechanische Druckbehandlung, was die bekannte Rolle von IL-6 als wichtiger Mediator der sterilen Entzündung während einer orthodontischen Zahnbewegung bestätigt. Die Behandlung mit Mtx führte nicht zu signifikanten Veränderungen in den mRNA-Expressionen von HIF- $1\alpha$  und IL-6. Im Vergleich zu Kontrollzellen ohne Behandlung mit Druck und Mtx zeigten die HPdLF nach der kombinierten Behandlung eine geringere IL-6 mRNA-Expression als aus rein druckbehandelten Gelen.

Zusammenfassend legen unsere Studien nahe, dass Mtx in der Initialphase einer kieferorthopädischen Behandlung keinen direkten Einfluss auf die entzündlichen Reaktionen im Periodontalligament (PDL) hat. Aus unseren *in vitro* Untersuchungen ist aber kein definitiver Rückschluss auf den Effekt von Mtx bei einer kieferorthopädischen Therapie *in vivo* möglich. Hier sollten Analysen anderer entzündlicher Mediatoren und Zellen des PDL vorgenommen werden. Das im Rahmen dieser Arbeit etablierte dreidimensionale *in vitro* Modell zur mechanischen Druckbehandlung erscheint für die zukünftigen Analysen vielversprechend, weil es die physiologischen Bedingungen des PDL noch besser simuliert.

## 8 Literaturverzeichnis

1. Cho MI, Garant PR. Development and general structure of the periodontium. *Periodontol 2000*. 2000 Oct;24:9–27.
2. Hassell TM. Tissues and cells of the periodontium. *Periodontol 2000*. 1993 Oct;3:9–38.
3. Melcher AH. On the repair potential of periodontal tissues. *J Periodontol*. 1976 May;47(5):256–60.
4. Zhang M, Yu Y, He D, Liu D, Zhou Y. Neural regulation of alveolar bone remodeling and periodontal ligament metabolism during orthodontic tooth movement in response to therapeutic loading. *J World Fed Orthod*. 2022 Oct;11(5):139–45.
5. Davidovitch Z. Tooth movement. *Crit Rev oral Biol Med an Off Publ Am Assoc Oral Biol*. 1991;2(4):411–50.
6. Cope G, Cope A. The periodontium: an anatomical guide. *Dent Nurs*. 2011;7:375–8.
7. Hathaway-Schrader JD, Novince CM. Maintaining homeostatic control of periodontal bone tissue. *Periodontol 2000*. 2021 Jun;86(1):157–87.
8. Delaissé JM, Eeckhout Y, Neff L, François-Gillet C, Henriët P, Su Y, et al. (Pro)collagenase (matrix metalloproteinase-1) is present in rodent osteoclasts and in the underlying bone-resorbing compartment. *J Cell Sci*. 1993 Dec;106 ( Pt 4):1071–82.
9. Jiang N, Guo W, Chen M, Zheng Y, Zhou J, Kim SG, et al. Periodontal Ligament and Alveolar Bone in Health and Adaptation: Tooth Movement. *Front Oral Biol*. 2016;18:1–8.
10. Li Y, Jacox LA, Little SH, Ko C-C. Orthodontic tooth movement: The biology and clinical implications. *Kaohsiung J Med Sci*. 2018 Apr;34(4):207–14.
11. de Jong T, Bakker AD, Everts V, Smit TH. The intricate anatomy of the periodontal ligament and its development: Lessons for periodontal regeneration. *J Periodontal Res*. 2017 Dec;52(6):965–74.
12. Nanci A, Bosshardt DD. Structure of periodontal tissues in health and disease. *Periodontol 2000*. 2006;40:11–28.
13. Mariotti A. The extracellular matrix of the periodontium: dynamic and interactive tissues. *Periodontol 2000*. 1993 Oct;3:39–63.
14. Chang B, Liu X. Osteon: Structure, Turnover, and Regeneration. *Tissue Eng Part B Rev*. 2022 Apr;28(2):261–78.
15. Li Y, Ling J, Jiang Q. Inflammasomes in Alveolar Bone Loss. *Front Immunol*. 2021;12:691013.
16. Dutra EH, Nanda R, Yadav S. Bone Response of Loaded Periodontal Ligament. *Curr Osteoporos Rep*. 2016 Dec;14(6):280–3.
17. Lu HH, Thomopoulos S. Functional attachment of soft tissues to bone: development, healing, and tissue engineering. *Annu Rev Biomed Eng*. 2013;15:201–26.
18. Beertsen W, McCulloch CA, Sodek J. The periodontal ligament: a unique, multifunctional connective tissue. *Periodontol 2000*. 1997 Feb;13:20–40.
19. Isola G, Matarese G, Cordasco G, Perillo L, Ramaglia L. Mechanobiology of the tooth movement during the orthodontic treatment: a literature review. *Minerva Stomatol*. 2016 Mar;
20. Hellwig E, Klimek J, Attin T. Einführung in die Zahnerhaltung. 6. Auflage. Deutscher Zahnärzte Verlag; 2013.
21. Jin S-S, He D-Q, Wang Y, Zhang T, Yu H-J, Li Z-X, et al. Mechanical force modulates periodontal ligament stem cell characteristics during bone remodelling via TRPV4. *Cell Prolif*. 2020 Oct;53(10):e12912.
22. Li Y, Zhan Q, Bao M, Yi J, Li Y. Biomechanical and biological responses of periodontium in orthodontic tooth movement: up-date in a new decade. *Int J Oral Sci*. 2021 Jun;13(1):20.

23. Lekic P, McCulloch CA. Periodontal ligament cell population: the central role of fibroblasts in creating a unique tissue. *Anat Rec.* 1996 Jun;245(2):327–41.
24. Eickholz P. *Parodontologie von A bis Z*. 1. Auflage. Quintessenz Verlag; 2012.
25. Gelse K, Pöschl E, Aigner T. Collagens--structure, function, and biosynthesis. *Adv Drug Deliv Rev.* 2003 Nov;55(12):1531–46.
26. Ganesan VV, Dhanasekaran M, Thangavel N, Dhathathreyan A. Elastic compliance of fibrillar assemblies in type I collagen. *Biophys Chem.* 2018 Sep;240:15–24.
27. Berkovitz BK. The structure of the periodontal ligament: an update. *Eur J Orthod.* 1990 Feb;12(1):51–76.
28. Krishnan V, Davidovitch Z. Cellular, molecular, and tissue-level reactions to orthodontic force. *Am J Orthod Dentofac Orthop Off Publ Am Assoc Orthod its Const Soc Am Board Orthod.* 2006 Apr;129(4):469.e1-32.
29. Rahemtulla F. Proteoglycans of oral tissues. *Crit Rev oral Biol Med an Off Publ Am Assoc Oral Biol.* 1992;3(1–2):135–62.
30. Gallagher JT. The extended family of proteoglycans: social residents of the pericellular zone. *Curr Opin Cell Biol.* 1989 Dec;1(6):1201–18.
31. Hirashima S, Ohta K, Togo A, Nakamura K-I. 3D mesoscopic architecture of a heterogeneous cellular network in the cementum-periodontal ligament-alveolar bone complex. *Reprod Syst Sex Disord.* 2022 Jan;71(1):22–33.
32. Huang Y, Tang Y, Zhang R, Wu X, Yan L, Chen X, et al. Role of periodontal ligament fibroblasts in periodontitis: pathological mechanisms and therapeutic potential. *J Transl Med.* 2024 Dec;22(1):1136.
33. Ei Hsu Hlaing E, Ishihara Y, Wang Z, Odagaki N, Kamioka H. Role of intracellular Ca(2+)-based mechanotransduction of human periodontal ligament fibroblasts. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol.* 2019 Sep;33(9):10409–24.
34. He W, Fu Y, Yao S, Huang L. Programmed cell death of periodontal ligament cells. *J Cell Physiol.* 2023 Aug;238(8):1768–87.
35. Sang S-G, Rong H, Wang J-B, Xie Y-Q. Effects of *Porphyromonas gingivalis* extracellular vesicles on human periodontal ligament fibroblasts. *Int J Clin Exp Med.* 2014;7(2):379–83.
36. Harris AK, Stopak D, Wild P. Fibroblast traction as a mechanism for collagen morphogenesis. *Nature.* 1981 Mar;290(5803):249–51.
37. Sokos D, Everts V, de Vries TJ. Role of periodontal ligament fibroblasts in osteoclastogenesis: a review. *J Periodontal Res.* 2015 Apr;50(2):152–9.
38. Wada N, Maeda H, Yoshimine Y, Akamine A. Lipopolysaccharide stimulates expression of osteoprotegerin and receptor activator of NF-kappa B ligand in periodontal ligament fibroblasts through the induction of interleukin-1 beta and tumor necrosis factor-alpha. *Bone.* 2004 Sep;35(3):629–35.
39. Zarrouh AE, Hasturk H, Stephens DN, Van Dyke TE, Kantarci A. Resolvin D1 modulates periodontal ligament fibroblast function. *J Periodontol.* 2023 May;94(5):683–93.
40. Konermann A, Stabenow D, Knolle PA, Held SAE, Deschner J, Jäger A. Regulatory role of periodontal ligament fibroblasts for innate immune cell function and differentiation. *Innate Immun.* 2012 Oct;18(5):745–52.
41. Liu J, Jiang Y, Mao J, Gu B, Liu H, Fang B. High levels of glucose induces a dose-dependent apoptosis in human periodontal ligament fibroblasts by activating caspase-3 signaling pathway. *Appl Biochem Biotechnol.* 2013 Jul;170(6):1458–71.
42. Monteiro MM, Lima CR, Gomes CC, Cruz MC, Horliana ACRT, Santos MF. Lowered Expression of MicroRNAs 221 and 222 Mediate Apoptosis Induced by High Glucose in Human Periodontal Ligament Cells. *Cell Biochem Biophys.* 2020 Sep;78(3):391–8.
43. Alghamdi B, Jeon HH, Ni J, Qiu D, Liu A, Hong JJ, et al. Osteoimmunology in

- Periodontitis and Orthodontic Tooth Movement. *Curr Osteoporos Rep*. 2023 Apr;21(2):128–46.
44. Maltha JC, Kuijpers-Jagtman AM. Mechanobiology of orthodontic tooth movement: An update. *J World Fed Orthod*. 2023 Aug;12(4):156–60.
  45. Will LA. Orthodontic Tooth Movement: A Historic Prospective. *Front Oral Biol*. 2016;18:46–55.
  46. Meikle MC. The tissue, cellular, and molecular regulation of orthodontic tooth movement: 100 years after Carl Sandstedt. *Eur J Orthod*. 2006 Jun;28(3):221–40.
  47. Kitaura H, Kimura K, Ishida M, Sugisawa H, Kohara H, Yoshimatsu M, et al. Effect of cytokines on osteoclast formation and bone resorption during mechanical force loading of the periodontal membrane. *ScientificWorldJournal*. 2014;2014:617032.
  48. van Leeuwen EJ, Maltha JC, Kuijpers-Jagtman AM. Tooth movement with light continuous and discontinuous forces in beagle dogs. *Eur J Oral Sci*. 1999 Dec;107(6):468–74.
  49. Pilon JJ, Kuijpers-Jagtman AM, Maltha JC. Magnitude of orthodontic forces and rate of bodily tooth movement. An experimental study. *Am J Orthod Dentofac Orthop Off Publ Am Assoc Orthod its Const Soc Am Board Orthod*. 1996 Jul;110(1):16–23.
  50. Henneman S, Von den Hoff JW, Maltha JC. Mechanobiology of tooth movement. *Eur J Orthod*. 2008 Jun;30(3):299–306.
  51. Zhou J, Song Y, Shi X, Lin J, Zhang C. A new perspective: Periodontal ligament is a viscoelastic fluid biomaterial as evidenced by dynamic shear creep experiment. *J Mech Behav Biomed Mater*. 2021 Jan;113:104131.
  52. McCormack SW, Witzel U, Watson PJ, Fagan MJ, Gröning F. The biomechanical function of periodontal ligament fibres in orthodontic tooth movement. *PLoS One*. 2014;9(7):e102387.
  53. Jaalouk DE, Lammerding J. Mechanotransduction gone awry. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2009 Jan;10(1):63–73.
  54. Jin Y, Ding L, Ding Z, Fu Y, Song Y, Jing Y, et al. Tensile force-induced PDGF-BB/PDGFR $\beta$  signals in periodontal ligament fibroblasts activate JAK2/STAT3 for orthodontic tooth movement. *Sci Rep*. 2020 Jul;10(1):11269.
  55. Schwartz MA, DeSimone DW. Cell adhesion receptors in mechanotransduction. *Curr Opin Cell Biol*. 2008 Oct;20(5):551–6.
  56. Yamaguchi M, Kasai K. Inflammation in periodontal tissues in response to mechanical forces. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2005;53(5):388–98.
  57. Alhashimi N, Frithiof L, Brudvik P, Bakhtiet M. Orthodontic tooth movement and de novo synthesis of proinflammatory cytokines. *Am J Orthod Dentofac Orthop Off Publ Am Assoc Orthod its Const Soc Am Board Orthod*. 2001 Mar;119(3):307–12.
  58. Hofbauer LC, Lacey DL, Dunstan CR, Spelsberg TC, Riggs BL, Khosla S. Interleukin-1 $\beta$  and tumor necrosis factor- $\alpha$ , but not interleukin-6, stimulate osteoprotegerin ligand gene expression in human osteoblastic cells. *Bone*. 1999 Sep;25(3):255–9.
  59. Huang H, Williams RC, Kyrkanides S. Accelerated orthodontic tooth movement: molecular mechanisms. *Am J Orthod Dentofac Orthop Off Publ Am Assoc Orthod its Const Soc Am Board Orthod*. 2014 Nov;146(5):620–32.
  60. Yamaguchi M, Fukasawa S. Is Inflammation a Friend or Foe for Orthodontic Treatment?: Inflammation in Orthodontically Induced Inflammatory Root Resorption and Accelerating Tooth Movement. *Int J Mol Sci*. 2021 Feb;22(5).
  61. Schwarz AM. Tissue changes incidental to orthodontic tooth movement. *Int J Orthod Oral Surg Radiogr*. 1932;331–52.
  62. Storey E. The nature of tooth movement. *Am J Orthod*. 1973 Mar;63(3):292–314.
  63. d'Apuzzo F, Cappabianca S, Ciavarella D, Monsurrò A, Silvestrini-Biavati A, Perillo L. Biomarkers of periodontal tissue remodeling during orthodontic tooth movement in

- mice and men: overview and clinical relevance. *ScientificWorldJournal*. 2013;2013:105873.
64. Niklas A, Proff P, Gosau M, Römer P. The role of hypoxia in orthodontic tooth movement. *Int J Dent*. 2013;2013:841840.
  65. Ke Q, Costa M. Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1). *Mol Pharmacol*. 2006 Nov;70(5):1469–80.
  66. Gleadle JM, Ratcliffe PJ. Hypoxia and the regulation of gene expression. *Mol Med Today*. 1998 Mar;4(3):122–9.
  67. Ullrich N, Schröder A, Jantsch J, Spanier G, Proff P, Kirschneck C. The role of mechanotransduction versus hypoxia during simulated orthodontic compressive strain- an in vitro study of human periodontal ligament fibroblasts. *Int J Oral Sci*. 2019 Nov;11(4):33.
  68. Gözl L, Memmert S, Rath-Deschner B, Jäger A, Appel T, Baumgarten G, et al. Hypoxia and *P. gingivalis* synergistically induce HIF-1 and NF- $\kappa$ B activation in PDL cells and periodontal diseases. *Mediators Inflamm*. 2015;2015:438085.
  69. Krishnan V, Davidovitch Z. On a path to unfolding the biological mechanisms of orthodontic tooth movement. *J Dent Res*. 2009 Jul;88(7):597–608.
  70. Kawarizadeh A, Bourauel C, Götz W, Jäger A. Early responses of periodontal ligament cells to mechanical stimulus in vivo. *J Dent Res*. 2005 Oct;84(10):902–6.
  71. Schröder A, Bauer K, Spanier G, Proff P, Wolf M, Kirschneck C. Expression kinetics of human periodontal ligament fibroblasts in the early phases of orthodontic tooth movement. *J Orofac Orthop = Fortschritte der Kieferorthopadie Organ/official J Dtsch Gesellschaft fur Kieferorthopadie*. 2018 Sep;79(5):337–51.
  72. Wang JH-C, Thampatty BP, Lin J-S, Im H-J. Mechanoregulation of gene expression in fibroblasts. *Gene*. 2007 Apr;391(1–2):1–15.
  73. Schröder A, Küchler EC, Omori M, Spanier G, Proff P, Kirschneck C. Effects of ethanol on human periodontal ligament fibroblasts subjected to static compressive force. *Alcohol*. 2019 Jun;77:59–70.
  74. Kanzaki H, Chiba M, Shimizu Y, Mitani H. Periodontal ligament cells under mechanical stress induce osteoclastogenesis by receptor activator of nuclear factor kappaB ligand up-regulation via prostaglandin E2 synthesis. *J bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res*. 2002 Feb;17(2):210–20.
  75. Kaur S, Bansal Y, Kumar R, Bansal G. A panoramic review of IL-6: Structure, pathophysiological roles and inhibitors. *Bioorg Med Chem*. 2020 Mar;28(5):115327.
  76. Mayr A, Marciniak J, Eggers B, Blawat K, Wildenhof J, Bastos Craveiro R, et al. Autophagy Induces Expression of IL-6 in Human Periodontal Ligament Fibroblasts Under Mechanical Load and Overload and Effects Osteoclastogenesis in vitro. *Front Physiol*. 2021;12:716441.
  77. Kunii R, Yamaguchi M, Tanimoto Y, Asano M, Yamada K, Goseki T, et al. Role of interleukin-6 in orthodontically induced inflammatory root resorption in humans. *Korean J Orthod*. 2013 Dec;43(6):294–301.
  78. Grimm S, Mundethu A, Symmank J, Hennig C, Walter C, Reichardt E, et al. Compressive force strengthened the pro-inflammatory effect of zoledronic acid on il-1 $\beta$  stimulated human periodontal fibroblasts. *Clin Oral Investig*. 2021 Jun;25(6):3453–61.
  79. Rose-John S. IL-6 trans-signaling via the soluble IL-6 receptor: importance for the pro-inflammatory activities of IL-6. *Int J Biol Sci*. 2012;8(9):1237–47.
  80. Proff P, Reicheneder C, Faltermeier A, Kubein-Meesenburg D, Römer P. Effects of mechanical and bacterial stressors on cytokine and growth-factor expression in periodontal ligament cells. *J Orofac Orthop = Fortschritte der Kieferorthopadie Organ/official J Dtsch Gesellschaft fur Kieferorthopadie*. 2014 May;75(3):191–202.

81. Rozen N, Ish-Shalom S, Rachmiel A, Stein H, Lewinson D. Interleukin-6 modulates trabecular and endochondral bone turnover in the nude mouse by stimulating osteoclast differentiation. *Bone*. 2000 May;26(5):469–74.
82. Wu Q, Zhou X, Huang D, Ji Y, Kang F. IL-6 Enhances Osteocyte-Mediated Osteoclastogenesis by Promoting JAK2 and RANKL Activity In Vitro. *Cell Physiol Biochem Int J Exp Cell Physiol Biochem Pharmacol*. 2017;41(4):1360–9.
83. Toyama N, Ono T, Ono T, Nakashima T. The interleukin-6 signal regulates orthodontic tooth movement and pain. *Biochem Biophys Res Commun*. 2023 Dec;684:149068.
84. Kumar BD, Singh N, Verma SK, Singh S, Thakur S. A Study to Evaluate Il1 And Il6 Gingival Crevicular Fluid Levels in Adolescents and Young Adults During the Early Phase of Orthodontic Tooth Movement. *J Pharm Bioallied Sci*. 2022 Jul;14(Suppl 1):S494–7.
85. Yang L, Yang Y, Wang S, Li Y, Zhao Z. In vitro mechanical loading models for periodontal ligament cells: from two-dimensional to three-dimensional models. *Arch Oral Biol*. 2015 Mar;60(3):416–24.
86. Kirschneck C, Batschkus S, Proff P, Köstler J, Spanier G, Schröder A. Valid gene expression normalization by RT-qPCR in studies on hPDL fibroblasts with focus on orthodontic tooth movement and periodontitis. *Sci Rep*. 2017 Nov;7(1):14751.
87. KÜchler EC, Schröder A, Teodoro VB, Nazet U, Scariot R, Spanier G, et al. The role of 25-hydroxyvitamin-D3 and vitamin D receptor gene in human periodontal ligament fibroblasts as response to orthodontic compressive strain: an in vitro study. Vol. 21, *BMC oral health*. England; 2021. p. 386.
88. Alves LB, Mariguela VC, Grisi MF de M, Souza SLS de, Novaes Junior AB, Taba Junior M, et al. Expression of osteoblastic phenotype in periodontal ligament fibroblasts cultured in three-dimensional collagen gel. *J Appl Oral Sci*. 2015;23(2):206–14.
89. Heckler AF, Mirzaei Z, Pereira I, Simmons CA, Gong S-G. Development of a three-dimensional in vitro model system to study orthodontic tooth movement. *Arch Oral Biol*. 2013 Oct;58(10):1498–510.
90. Lee Y-H, Nahm D-S, Jung Y-K, Choi J-Y, Kim SG, Cho M, et al. Differential gene expression of periodontal ligament cells after loading of static compressive force. *J Periodontol*. 2007 Mar;78(3):446–52.
91. Liao W, Okada M, Sakamoto F, Okita N, Inami K, Nishiura A, et al. In vitro human periodontal ligament-like tissue formation with porous poly-L-lactide matrix. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2013 Aug;33(6):3273–80.
92. Kang K-L, Lee S-W, Ahn Y-S, Kim S-H, Kang Y-G. Bioinformatic analysis of responsive genes in two-dimension and three-dimension cultured human periodontal ligament cells subjected to compressive stress. *J Periodontal Res*. 2013 Feb;48(1):87–97.
93. Schröder A, Schöniger R, Oeldemann J, Spanier G, Proff P, Jantsch J, et al. An Evaluation of Different 3D Cultivation Models on Expression Profiles of Human Periodontal Ligament Fibroblasts with Compressive Strain. *Int J Mol Sci*. 2022 Feb;23(4).
94. Martini A, Lovell DJ, Albani S, Brunner HI, Hyrich KL, Thompson SD, et al. Juvenile idiopathic arthritis. *Nat Rev Dis Prim*. 2022 Jan;8(1):5.
95. Patel K, Gerber B, Bailey K, Saeed NR. Juvenile idiopathic arthritis of the temporomandibular joint - no longer the forgotten joint. *Br J Oral Maxillofac Surg*. 2022 Apr;60(3):247–56.
96. Prakken B, Albani S, Martini A. Juvenile idiopathic arthritis. *Lancet (London, England)*. 2011 Jun;377(9783):2138–49.
97. Zaripova LN, Midgley A, Christmas SE, Beresford MW, Baildam EM, Oldershaw RA.

- Juvenile idiopathic arthritis: from aetiopathogenesis to therapeutic approaches. *Pediatr Rheumatol Online J*. 2021 Aug;19(1):135.
98. El Assar de la Fuente S, Angenete O, Jellestad S, Tzaribachev N, Koos B, Rosendahl K. Juvenile idiopathic arthritis and the temporomandibular joint: A comprehensive review. *J cranio-maxillo-facial Surg Off Publ Eur Assoc Cranio-Maxillo-Facial Surg*. 2016 May;44(5):597–607.
  99. Cimaz R, Maioli G, Calabrese G. Current and emerging biologics for the treatment of juvenile idiopathic arthritis. *Expert Opin Biol Ther*. 2020 Jul;20(7):725–40.
  100. Costello A, Twilt M, Lerman MA. Provider assessment of the temporomandibular joint in Juvenile idiopathic arthritis: a retrospective analysis from the CARRA database. *Pediatr Rheumatol Online J*. 2024 Apr;22(1):41.
  101. Schmidt C, Ertel T, Arbogast M, Hügler B, Kalle T von, Neff A. The Diagnosis and Treatment of Rheumatoid and Juvenile Idiopathic Arthritis of the Temporomandibular Joint. *Dtsch Arztebl Int*. 2022 Jan;119(4):47–54.
  102. Stoustrup P, Lerman MA, Twilt M. The Temporomandibular Joint in Juvenile Idiopathic Arthritis. *Rheum Dis Clin North Am*. 2021 Nov;47(4):607–17.
  103. von Bremen J, Ruf S. Orthodontic and dentofacial orthopedic management of juvenile idiopathic arthritis: a systematic review of the literature. *Orthod Craniofac Res*. 2011 Aug;14(3):107–15.
  104. Piacino MG, Cannavale R, Dalmasso P, Tonni I, Garagiola U, Perillo L, et al. Cranial structure and condylar asymmetry of patients with juvenile idiopathic arthritis: a risky growth pattern. *Clin Rheumatol*. 2018 Oct;37(10):2667–73.
  105. Stoustrup P, Resnick CM, Abramowicz S, Pedersen TK, Michelotti A, Küsel A, et al. Management of Orofacial Manifestations of Juvenile Idiopathic Arthritis: Interdisciplinary Consensus-Based Recommendations. *Arthritis Rheumatol (Hoboken, NJ)*. 2023 Jan;75(1):4–14.
  106. Rongo R, Michelotti A, Pedersen TK, Resnick CM, Stoustrup P. Management of temporomandibular joint arthritis in children and adolescents: An introduction for orthodontists. *Orthod Craniofac Res*. 2023 Dec;26 Suppl 1:151–63.
  107. Gesellschaft für Kinder- und Jugendrheumatologie (GKJR), Deutsche Gesellschaft für Kinder- und Jugendmedizin (DGKJ), S2k-Leitlinie “Therapie der Juvenilen Idiopathischen Arthritis.” AWMF online. 2019;3. Auflage(027/020).
  108. Bedoui Y, Guillot X, Sélambarom J, Guiraud P, Giry C, Jaffar-Bandjee MC, et al. Methotrexate an Old Drug with New Tricks. *Int J Mol Sci*. 2019 Oct;20(20).
  109. Cronstein BN. The mechanism of action of methotrexate. *Rheum Dis Clin North Am*. 1997 Nov;23(4):739–55.
  110. Zhao Z, Hua Z, Luo X, Li Y, Yu L, Li M, et al. Application and pharmacological mechanism of methotrexate in rheumatoid arthritis. *Biomed Pharmacother*. 2022 Jun;150:113074.
  111. Tak PP, Firestein GS. NF-kappaB: a key role in inflammatory diseases. *J Clin Invest*. 2001 Jan;107(1):7–11.
  112. de Smit MJ, Westra J, Posthumus MD, Springer G, van Winkelhoff AJ, Vissink A, et al. Effect of Anti-Rheumatic Treatment on the Periodontal Condition of Rheumatoid Arthritis Patients. *Int J Environ Res Public Health*. 2021 Mar;18(5).
  113. Flexcell International Corporation. User Manual: Flexcell FX-5000 Compression System. 2024;
  114. Tanaka T, Narazaki M, Kishimoto T. IL-6 in inflammation, immunity, and disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2014 Sep;6(10):a016295.
  115. Steinmetz J, Stemmler A, Hennig C-L, Symmank J, Jacobs C. GDF15 Contributes to the Regulation of the Mechanosensitive Responses of PdL Fibroblasts through the Modulation of IL-37. *Dent J*. 2024 Feb;12(2).

116. Blawat K, Mayr A, Hardt M, Kirschneck C, Nokhbehshaim M, Behl C, et al. Regulation of Autophagic Signaling by Mechanical Loading and Inflammation in Human PDL Fibroblasts. *Int J Mol Sci.* 2020 Dec;21(24).
117. Nettelhoff L, Grimm S, Jacobs C, Walter C, Pabst AM, Goldschmitt J, et al. Influence of mechanical compression on human periodontal ligament fibroblasts and osteoblasts. *Clin Oral Investig.* 2016 Apr;20(3):621–9.
118. Janjic Rankovic M, Docheva D, Wichelhaus A, Baumert U. Effect of static compressive force on in vitro cultured PDL fibroblasts: monitoring of viability and gene expression over 6 days. *Clin Oral Investig.* 2020 Jul;24(7):2497–511.
119. Lisboa RA, Lisboa FA, de Castro Santos G, Andrade MVM, Cunha-Melo JR. Matrix metalloproteinase 2 activity decreases in human periodontal ligament fibroblast cultures submitted to simulated orthodontic force. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 2009 Dec;45(10):614–21.
120. Brockhaus J, Craveiro RB, Azraq I, Niederau C, Schröder SK, Weiskirchen R, et al. In Vitro Compression Model for Orthodontic Tooth Movement Modulates Human Periodontal Ligament Fibroblast Proliferation, Apoptosis and Cell Cycle. *Biomolecules.* 2021 Jun;11(7).
121. Meyer FA, Yaron I, Mashiah V, Yaron M. Methotrexate inhibits proliferation but not interleukin 1 stimulated secretory activities of cultured human synovial fibroblasts. *J Rheumatol.* 1993 Feb;20(2):238–42.
122. Lories RJU, Derese I, De Bari C, Luyten FP. In vitro growth rate of fibroblast-like synovial cells is reduced by methotrexate treatment. *Ann Rheum Dis.* 2003 Jun;62(6):568–71.
123. Nakazawa F, Matsuno H, Yudoh K, Katayama R, Sawai T, Uzuki M, et al. Methotrexate inhibits rheumatoid synovitis by inducing apoptosis. *J Rheumatol.* 2001 Aug;28(8):1800–8.
124. Cardoso LM, Pansani TN, Hebling J, de Souza Costa CA, Basso FG. Chemotherapy drugs and inflammatory cytokines enhance matrix metalloproteinases expression by oral mucosa cells. *Arch Oral Biol.* 2021 Jul;127:105159.
125. Yoshigi M, Hoffman LM, Jensen CC, Yost HJ, Beckerle MC. Mechanical force mobilizes zyxin from focal adhesions to actin filaments and regulates cytoskeletal reinforcement. *J Cell Biol.* 2005 Oct;171(2):209–15.
126. Hoffman LM, Jensen CC, Chaturvedi A, Yoshigi M, Beckerle MC. Stretch-induced actin remodeling requires targeting of zyxin to stress fibers and recruitment of actin regulators. *Mol Biol Cell.* 2012 May;23(10):1846–59.
127. Hirashima S, Kanazawa T, Ohta K, Nakamura K-I. Three-dimensional ultrastructural imaging and quantitative analysis of the periodontal ligament. *Anat Sci Int.* 2020 Jan;95(1):1–11.
128. Hirashima S, Ohta K, Kanazawa T, Okayama S, Togo A, Uchimura N, et al. Three-dimensional ultrastructural analysis of cells in the periodontal ligament using focused ion beam/scanning electron microscope tomography. *Sci Rep.* 2016 Dec;6:39435.
129. Beertsen W, Everts V. Junctions between fibroblasts in mouse periodontal ligament. *J Periodontal Res.* 1980 Nov;15(6):655–68.
130. Hirashima S, Ohta K, Kanazawa T, Togo A, Tsuneyoshi R, Kusukawa J, et al. Cellular network across cementum and periodontal ligament elucidated by FIB/SEM tomography. Vol. 69, *Microscopy* (Oxford, England). England; 2020. p. 53–8.
131. Heckman CA, Plummer HK 3rd. Filopodia as sensors. *Cell Signal.* 2013 Nov;25(11):2298–311.
132. Ruhoff VT, Leijnse N, Doostmohammadi A, Bendix PM. Filopodia: integrating cellular functions with theoretical models. *Trends Cell Biol.* 2025 Feb;35(2):129–40.
133. Jackson DA, Pearson CK, Fraser DC, Prise KM, Wong SY. Methotrexate-induced

- morphological changes mimic those seen after heat shock. *J Cell Sci.* 1989 Jan;92 ( Pt 1):37–49.
134. Horie S, Nakatomi C, Ito-Sago M, Morii A, Orimoto A, Ikeda H, et al. PIEZO1 promotes ATP release from periodontal ligament cells following compression force. *Eur J Orthod.* 2023 Sep;45(5):565–74.
  135. Chamboredon S, Ciais D, Desroches-Castan A, Savi P, Bono F, Feige J-J, et al. Hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  mRNA: a new target for destabilization by tristetraprolin in endothelial cells. *Mol Biol Cell.* 2011 Sep;22(18):3366–78.
  136. Uchida T, Rossignol F, Matthay MA, Mounier R, Couette S, Clottes E, et al. Prolonged hypoxia differentially regulates hypoxia-inducible factor (HIF)-1 $\alpha$  and HIF-2 $\alpha$  expression in lung epithelial cells: implication of natural antisense HIF-1 $\alpha$ . *J Biol Chem.* 2004 Apr;279(15):14871–8.
  137. Brahimi-Horn C, Mazure N, Pouyssegur J. Signalling via the hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  requires multiple posttranslational modifications. *Cell Signal.* 2005 Jan;17(1):1–9.
  138. Fearon U, Hanlon MM, Floudas A, Veale DJ. Cellular metabolic adaptations in rheumatoid arthritis and their therapeutic implications. *Nat Rev Rheumatol.* 2022 Jul;18(7):398–414.
  139. Sanna K, Rofstad EK. Hypoxia-induced resistance to doxorubicin and methotrexate in human melanoma cell lines in vitro. *Int J cancer.* 1994 Jul;58(2):258–62.
  140. Schröder A, Barschkies L, Jantsch J, Proff P, Gölz L, Deschner J, et al. Role of Oxygen Supply in Macrophages in a Model of Simulated Orthodontic Tooth Movement. *Mediators Inflamm.* 2020;2020:5802435.
  141. Park H-J, Baek KH, Lee H-L, Kwon A, Hwang HR, Qadir AS, et al. Hypoxia inducible factor-1 $\alpha$  directly induces the expression of receptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B ligand in periodontal ligament fibroblasts. *Mol Cells.* 2011 Jun;31(6):573–8.
  142. Akioka S. Interleukin-6 in juvenile idiopathic arthritis. *Mod Rheumatol.* 2019 Mar;29(2):275–86.
  143. La Bella S, Rinaldi M, Di Ludovico A, Di Donato G, Di Donato G, Salpietro V, et al. Genetic Background and Molecular Mechanisms of Juvenile Idiopathic Arthritis. *Int J Mol Sci.* 2023 Jan;24(3).
  144. Weider M, Schröder A, Docheva D, Rodrian G, Enderle I, Seidel CL, et al. A Human Periodontal Ligament Fibroblast Cell Line as a New Model to Study Periodontal Stress. *Int J Mol Sci.* 2020 Oct;21(21).
  145. Knaup I, Symmank J, Bastian A, Neuss S, Pufe T, Jacobs C, et al. Impact of FGF1 on human periodontal ligament fibroblast growth, osteogenic differentiation and inflammatory reaction in vitro. *J Orofac Orthop = Fortschritte der Kieferorthopadie Organ/official J Dtsch Gesellschaft für Kieferorthopadie.* 2022 Oct;83(Suppl 1):42–55.
  146. Grimm S, Wolff E, Walter C, Pabst AM, Mundethu A, Jacobs C, et al. Influence of clodronate and compressive force on IL-1 $\beta$ -stimulated human periodontal ligament fibroblasts. *Clin Oral Investig.* 2020 Jan;24(1):343–50.
  147. Cheng N-C, Chen S-Y, Li J-R, Young T-H. Short-term spheroid formation enhances the regenerative capacity of adipose-derived stem cells by promoting stemness, angiogenesis, and chemotaxis. *Stem Cells Transl Med.* 2013 Aug;2(8):584–94.
  148. Küchler EC, Schröder A, Corso P, Scariot R, Spanier G, Proff P, et al. Genetic polymorphisms influence gene expression of human periodontal ligament fibroblasts in the early phases of orthodontic tooth movement. *Odontology.* 2020 Jul;108(3):493–502.
  149. Aveic S, Craveiro RB, Wolf M, Fischer H. Current Trends in In Vitro Modeling to Mimic Cellular Crosstalk in Periodontal Tissue. *Adv Healthc Mater.* 2021 Jan;10(1):e2001269.

150. Huang D, Chang TR, Aggarwal A, Lee RC, Ehrlich HP. Mechanisms and dynamics of mechanical strengthening in ligament-equivalent fibroblast-populated collagen matrices. *Ann Biomed Eng.* 1993;21(3):289–305.
151. Yang L, Carrington LJ, Erdogan B, Ao M, Brewer BM, Webb DJ, et al. Biomechanics of cell reorientation in a three-dimensional matrix under compression. *Exp Cell Res.* 2017 Jan;350(1):253–66.
152. Ravi M, Paramesh V, Kaviya SR, Anuradha E, Solomon FDP. 3D cell culture systems: advantages and applications. *J Cell Physiol.* 2015 Jan;230(1):16–26.
153. Jensen C, Teng Y. Is It Time to Start Transitioning From 2D to 3D Cell Culture? *Front Mol Biosci.* 2020;7:33.
154. Khouw FE, Goldhaber P. Changes in vasculature of the periodontium associated with tooth movement in the rhesus monkey and dog. *Arch Oral Biol.* 1970 Dec;15(12):1125–32.
155. Imamura Y, Mukohara T, Shimono Y, Funakoshi Y, Chayahara N, Toyoda M, et al. Comparison of 2D- and 3D-culture models as drug-testing platforms in breast cancer. *Oncol Rep.* 2015 Apr;33(4):1837–43.
156. Rath-Deschner B, Nogueira AVB, Beisel-Memmert S, Nokhbehshaim M, Eick S, Cirelli JA, et al. Interaction of periodontitis and orthodontic tooth movement-an in vitro and in vivo study. *Clin Oral Investig.* 2022 Jan;26(1):171–81.
157. Golshah A, Omid K, Nikkerdar N, Moradpoor H, Ghorbani F. Effect of Methotrexate Injection on Orthodontic Tooth Movement: An Experimental Study on Rats. *Int J Dent.* 2021;2021:8451522.
158. Li H, Li Y, Zou J, Yang Y, Han R, Zhang J. Sinomenine Inhibits Orthodontic Tooth Movement and Root Resorption in Rats and Enhances Osteogenic Differentiation of PDLSCs. *Drug Des Devel Ther.* 2022;16:2949–65.
159. Lin J, Huang J, Zhang Z, Yu X, Cai X, Liu C. Periodontal ligament cells under mechanical force regulate local immune homeostasis by modulating Th17/Treg cell differentiation. *Clin Oral Investig.* 2022 Apr;26(4):3747–64.
160. Zarka M, Etienne F, Bourmaud M, Szondi D, Schwartz J-M, Kampmann K, et al. Mechanical loading activates the YAP/TAZ pathway and chemokine expression in the MLO-Y4 osteocyte-like cell line. *Lab Invest.* 2021 Dec;101(12):1597–604.

## 9 Danksagung

## **10 Tabellarischer Lebenslauf**