

AUS DEM LEHRSTUHL  
FÜR KIEFERORTHOPÄDIE  
PROF. DR. DR. PETER PROFF  
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN  
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

UNTERSUCHUNGEN ZUR ENTSTEHUNG VON REAKTIVEN  
SAUERSTOFFSPEZIES IN PARODONTALLIGAMENT-  
FIBROBLASTEN

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Zahnmedizin

der  
Fakultät für Medizin  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
Andreas Kinateder

2020



AUS DEM LEHRSTUHL  
FÜR KIEFERORTHOPÄDIE  
PROF. DR. DR. PETER PROFF  
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN  
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

UNTERSUCHUNGEN ZUR ENTSTEHUNG VON REAKTIVEN  
SAUERSTOFFSPEZIES IN PARODONTALLIGAMENT-  
FIBROBLASTEN

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Zahnmedizin

der  
Fakultät für Medizin  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
Andreas Kinateder

2020

Dekan:

Prof. Dr. Dirk Hellwig

1. Berichterstatter:

Priv.-Doz. Dr. Agnes Schröder

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. Dr. Helmut Schweikl

Tag der mündlichen Prüfung:

15.05.2020

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>5</b>
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b> .....	<b>14</b>
2.1	Zellkultorexperimente .....	14
2.1.1	Isolierung von Parodontalligament-Fibroblasten .....	14
2.1.2	Versuchsaufbau zur Druckapplikation .....	18
2.1.3	Versuchsaufbau zur Hypoxie .....	19
2.1.4	Versuchsaufbau zur Austestung der Bakterienlysate .....	19
2.1.5	Versuchsaufbau zu Untersuchungen mit H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	20
2.2	RNA-Analytik .....	21
2.2.1	RNA-Isolierung.....	21
2.2.2	cDNA-Synthese.....	21
2.2.3	Quantitative Real-Time Polymerase-Kettenreaktion (RT-qPCR).....	22
2.2.4	Auswertung der RT-qPCR mittels 2 <sup>-ΔΔCT</sup> -Methode .....	23
2.3	Durchflusszytometrie-Messungen mittels FlowCytometer (FACS).....	23
2.3.1	Funktionsweise.....	23
2.3.2	Vorbereitung der Zellen und Fluoreszenzfärbung .....	24
2.3.3	Bestimmung des prozentualen Anteils vitaler Zellen .....	26
2.3.4	Quantifizierung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS).....	27
2.4	Statistische Auswertung .....	29
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>30</b>
3.1	Einfluss von Druckapplikation auf die Entstehung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) und den Anteil vitaler Zellen .....	30
3.2	Einfluss von Hypoxie auf die Entstehung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) und den Anteil vitaler PDL-Fibroblasten .....	30
3.3	Einfluss von <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> auf die Entstehung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) und den Anteil vitaler Zellen .....	31
3.4	Einfluss von <i>Porphyromonas gingivalis</i> auf die Entstehung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) und den Anteil vitaler PDL-Fibroblasten. Rolle von N-Acetylcystein.....	32
3.5	Einfluss von H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> auf die Entstehung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), den Anteil vitaler Zellen und die Expression von proinflammatorischen Genen .....	35

<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>39</b>
4.1	Zielsetzung und Kurzüberblick über die Ergebnisse.....	39
4.2	Einfluss der untersuchten Stimuli auf die ROS-Bildung und Zellvitalität.....	40
4.3	Einfluss des Antioxidantiums N-Acetylcystein auf die ROS-Bildung und Zellvitalität .....	44
4.4	ROS-Produktion und Zellvitalität nach Stimulation durch H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> und Einfluss auf die Expression proinflammatorischer Gene .....	45
4.5	Methodik und Limitationen.....	47
4.6	Schlussfolgerungen .....	48
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>51</b>
<b>6</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>53</b>
6.1	Tabellenverzeichnis.....	53
6.2	Abbildungsverzeichnis .....	53
6.3	Abkürzungsverzeichnis .....	54
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>56</b>
<b>8</b>	<b>Danksagung</b>	

**Erklärung zum Promotionsverfahren**

## 1 Einleitung

Das Institut der Deutschen Zahnärzte (IDZ) bescheinigt der deutschen Bevölkerung in seiner aktuellen fünften Mundgesundheitsstudie grundsätzlich eine Verbesserung des Gebisszustandes über alle Altersgruppen hinweg, bezogen auf die vorherigen Untersuchungen (Jordan et al., 2016). So ist die Anzahl der noch vorhandenen eigenen Zähne in allen Bevölkerungsgruppen in den letzten Jahrzehnten stetig gestiegen. Gleichzeitig wird aber auch darauf hingewiesen, dass auf Grund des demographischen Wandels die Behandlung und Prophylaxe von parodontalen Erkrankungen in Zukunft einen immer höheren Stellenwert einnehmen werden. Zahlreiche Studien und Veröffentlichungen zeigen einen gesteigerten Behandlungsbedarf in diesem Bereich, der mit dem zunehmenden Durchschnittsalter der Patienten korreliert (Schwendicke et al., 2018; Tonetti et al., 2017).

Mit der Verbesserung der zahnärztlichen Versorgung und dem gesteigerten Bewusstsein des Patienten für seine Zähne steigt aber auch dessen Anspruch an eben diese. Der Wunsch nach einem gesunden und gleichzeitig auch ästhetisch ansprechenden Gebiss bis ins hohe Alter wird damit immer bedeutender. Parallel dazu ist es gerade in der Kieferorthopädie zuletzt zu technischen Fortschritten gekommen, welche die Akzeptanz von korrigierenden Behandlungen auch im Erwachsenenalter stark steigen ließen. Vor allem die Möglichkeit, solchen Patienten mit Hilfe von Aligner- und Lingualtechniken weniger auffällige und für sie somit im Alltag kaum störende Versorgungen anbieten zu können, fördert das. Wegen dieser beiden Entwicklungen ergeben sich heute allerdings auch immer häufiger Kombinationen aus parodontalen Läsionen und kieferorthopädischer Behandlungsabsicht, was die beteiligten Behandler teilweise vor komplexe Aufgaben stellt.

Grundlage sowohl für die Pathogenese der Parodontitis als auch für die Zahnbewegung bei kieferorthopädischer Behandlung sind multifaktorielle Umbauprozesse im Zahnhalteapparat (Parodontium, Parodont). Anatomisch betrachtet handelt es sich beim Parodont um eine funktionelle Einheit aus Alveolarknochen, Wurzelzement, Zahnfleisch (Gingiva propria) und Desmodont (Parodontales Ligament, PDL) (Linß and Fanghänel, 1999). Beim PDL handelt es sich um zell- und faserreiches Gewebe, welches Wurzelzement und knöcherne Alveole verbindet und somit einer Stabilisierung und Dämpfung des Zahnes dient (Eickholz, 2013). Durchzogen wird es dafür unter anderem von kollagenen Faserbündeln, den sogenannten Sharpey-Fasern.

Sie erfahren bei physiologischer Kaubelastung eine Anspannung und wandeln somit eine potenzielle Druckbelastung auf den Alveolarknochen in eine funktionelle und diesen stimulierende Zugbelastung um (Beertsen et al., 1997). Weiterhin stellt das PDL aber auch ein Zellreservoir dar, welches von großer Bedeutung für die Stoffwechsel- und Umbauprozesse des gesamten Zahnhalteapparats ist. Es enthält neben den hauptsächlich vorkommenden Fibroblasten auch Osteoblasten, Osteoklasten, Zementoblasten, Zementoklasten, immunologische Zellen und Progenitorzellen. Zusätzlich ist es reich vaskularisiert und nerval versorgt (Eickholz, 2013; Lekic and McCulloch, 1996). Bereits eine solche Zellzusammensetzung verdeutlicht die vielfältigen Möglichkeiten und Funktionen dieser Zellen des parodontalen Ligaments. Es überrascht daher nicht, dass die PDL-Fibroblasten in der kieferorthopädischen Zahnbewegung und den dabei auftretenden Knochenumbau- und Entzündungsprozessen von hoher Relevanz sind (Meikle, 2006).

Bei der kieferorthopädischen Behandlung werden Zahnfehlstellungen behoben, indem mit Hilfe von festsitzenden oder herausnehmbaren Apparaturen Kräfte ausgeübt werden. Die daraus resultierende Bewegung der Zähne gliedert sich nach Reitan (1960) grundlegend in drei Phasen: Initiale Dämpfung, Hyalinisation und Resorption.

Diese Phasen lassen sich nach Wichelhaus and Eichenberg (2017) und Graber et al. (2017) wie folgt beschreiben:

In der ersten Phase der initialen Dämpfung kommt es bereits bei physiologischen Kräften im Rahmen der Kaubewegung zu Belastungen im Zahnhalteapparat, die durch die genannten Parodontalfasern und Blutgefäße abgefedert werden. Bei andauernder Krafteinwirkung im Rahmen der kieferorthopädischen Zahnbewegung erfährt der Zahn allerdings eine bleibende Bewegung. Eine solche geht mit einer veränderten Blutzirkulation im parodontalen Gewebe einher. Weiter entstehen durch die Lageveränderung des Zahnes Zonen, in denen durch die Zahnwurzel ein Druck auf PDL-Zellen und Knochen ausgeübt wird. Dies führt zu einer Steigerung der Osteoklastenaktivität und damit letztlich zum Knochenabbau. Umgekehrt finden sich auch Zonen, in denen eine Zugbelastung vorherrscht. Es folgt eine erhöhte Aktivität von Osteoblasten und ein Knochenaufbau. Dieser Prozess führt zu einer raschen initialen Zahnbewegung, die in den ersten ein bis drei Tagen stattfindet. Danach reduziert sich die Bewegung in der zweiten Phase der Hyalinisierung und kommt schließlich zum Stillstand. In diesem Abschnitt, welcher zwei bis zehn Wochen andauern kann, kommt es durch die Komprimierung der Areale des PDL auf der Druckseite zu Zirkulationsstörungen und partiellen Nekrosen. Das Ausmaß dieser Hyalinisierung hängt dabei einerseits von den anatomischen Voraussetzungen und dem Alter des

Patienten ab, andererseits auch von der gewählten Kraftdosierung und Bewegungsart (Reitan, 1967). In den hyalinisierten Druckzonen kommt es, bedingt durch Entzündungsmediatoren und Enzyme, zu einer gesteigerten Fibroblasten- und Makrophagenaktivität und nekrotisches Gewebe wird abgebaut. Eine Zahnbewegung findet in diesem Zeitraum nicht statt, da in den hyalinisierten Zonen keine Osteoklastendifferenzierung ablaufen kann. Eine solche und damit weiterer Knochenabbau tritt erst wieder auf, wenn die zerstörten Areale beseitigt worden sind und das parodontale Attachment wiederhergestellt ist. Es schließt sich im Idealfall bei richtiger Kraftapplikation in der dritten, so genannten Resorptionsphase eine progressive Zahnbewegung an. Die Osteoklastenaktivität und damit die Bewegungsgeschwindigkeit sind in dieser Phase am höchsten. Es findet hierbei ein stetiger Wiederaufbau und Umbau von PDL in den resorptiven Arealen statt, ebenso erfolgt parallel in den Zugzonen während aller Phasen Knochenneubildung. Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass im Verlauf der Zahnbewegung durch kieferorthopädische Kräfte die PDL-Fibroblasten die zentrale Rolle einnehmen. So konnte sowohl ihre Wichtigkeit in der Reaktion auf Entzündungs- und immunologische Vorgänge als auch ihre generelle Bedeutung im Knochenumbau, welcher ebenfalls auf entzündungsartigen Grundprinzipien beruht, gezeigt werden (Meikle, 2006; Jönsson et al., 2011).

Gerade wegen ihrer Beteiligung bei inflammatorischen und immunologischen Prozessen finden diese Zellen nicht nur in der kieferorthopädischen Behandlung große Beachtung, sondern auch im Feld der Parodontologie und Parodontitis-Therapie.

Generell bezeichnet der Begriff Parodontitis eine multifaktorielle, entzündliche Erkrankung des Zahnhalteapparats, in deren Verlauf es zu einer Zerstörung von parodontalem Gewebe kommt. Armitage (1999) etablierte ein Klassifikationsschema, das die letzten Jahre international akzeptiert war. Er unterschied hierbei zwischen chronischer Parodontitis, aggressiver Parodontitis, Parodontitis als Manifestation von Systemerkrankungen, nekrotisierenden Parodontalerkrankungen und parodontalen Abszessen. Im gemeinsamen Weltworkshop der American Academy of Periodontology und der European Federation of Periodontology, welcher 2017 in Chicago stattfand, wurde diese Einteilung allerdings an die aktuellen wissenschaftlichen Erkenntnisse und das derzeitige Verständnis der Vorgänge bei parodontalen Erkrankungen angepasst und ein neues Klassifikationsschema erarbeitet. Unterschieden werden nun nur noch drei Formen der Parodontitis, die in ihrer Pathophysiologie deutlich voneinander abweichen (Papapanou et al., 2018): Nekrotisierende Parodontitis (Herrera et al., 2018), Parodontitis als direkte Manifestation einer systemischen Erkrankung (Albandar et al., 2018; Jepsen et al., 2018) und Parodontitis (Fine et al., 2018; Needleman et al., 2018; Billings et al., 2018). Der Überbegriff Parodontitis

hat in dieser Klassifikation die veraltete Unterscheidung in aggressive und chronische Parodontitis abgelöst. Zur weiteren Unterteilung des breiten Feldes wurde dafür ein Staging- und Grading-System eingeführt. Das Staging basiert dabei auf Schweregrad und Komplexität des Managements. Das Grading gibt Auskunft über die Progressionsrate und das zu erwartende Behandlungsergebnis (Tonetti et al., 2018).

Allen diesen Gruppen ist, wie bereits erwähnt, der Rückgang von parodontalem Stützgewebe gemein, es kommt in Folge von Entzündungsreaktionen zu einem klinischen Attachmentverlust. Hervorzuheben ist in diesem Zusammenhang die dentale Plaque. Hierbei handelt es sich um eine komplexe mikrobielle Gemeinschaft auf der Zahnoberfläche, die in Polymere, von Bakterien oder aus dem Speichel stammend, eingebettet ist (Marsh et al., 2003). Hauptsächlich bedingt durch mangelnde Mundhygiene kann es zu einer Ausdehnung der Plaque kommen. Als erste Reaktion des Immunsystems finden sich Entzündungsprozesse im gingivalen Anteil des Zahnhalteapparats, es entsteht eine reversible Gingivitis. Systemische und lokale Faktoren können deren Entstehung zusätzlich beschleunigen und fördern. Hier ist vor allem das Rauchen zu nennen (Tomar and Asma, 2000). Kommt es weiterhin zu keiner suffizienten Reinigung durch den Patienten, kann es als Folge der Entzündungsreaktionen zu ersten Gewebeverlusten kommen. Es entstehen Zahnfleischtaschen und Nischen, in denen sich unter Umständen subgingivale Konkremente bilden. Das vorherrschende Milieu verändert sich, ebenso wie die Zusammensetzung der dentalen Plaque. Diese verschiebt sich in Richtung gramnegativer, anaerober und beweglicher Bakterien, die eine bedeutende Rolle für das Fortschreiten der Zerstörung des Parodontalgewebes spielen (Marsh and Bradshaw, 1995). Es hat sich daraus ein Schema etabliert, das die Bakterien der subgingivalen Plaque unterteilt. So untersuchten Socransky et al. (1998) eine Vielzahl von Proben, welche von an Parodontitis erkrankten Patienten stammten und verglichen diese mit denen gesunder Probanden. Die gefundenen parodontalpathogenen Bakterien teilten sie anschließend in fünf Hauptkomplexe ein. Es zeigte sich zusätzlich, dass bei den untersuchten Patienten generell eine sehr hohe Zahl an verschiedenen Bakterienstämmen in der Mundhöhle vorlag, welche in die Hunderte ging (Teles et al., 2013). Der Großteil dieser Keime scheint hierbei keine pathologischen Auswirkungen zu haben, ein vollständiges Verständnis über deren komplexes Zusammenspiel liegt aber bis heute noch nicht vor.

Es kristallisierten sich somit über die letzten Jahrzehnte Bakterienspezies heraus, die eine vordergründige Stellung in der Ätiologie der Parodontitis einnehmen. Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich speziell mit den beiden Stämmen *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*) und *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (*A. actinomycetemcomitans*).

*A. actinomycetemcomitans* wurde bereits früh als ein Leitkeim der Parodontitis identifiziert. Es handelt sich um ein unbewegliches, gramnegatives, mikroaerophiles Stäbchen, das unter anaeroben Bedingungen wachsen kann (Fives-Taylor et al., 1999). Heute wird es vor allem mit den Sonderformen der aggressiven oder juvenilen Parodontitis in Verbindung gebracht (Lang et al., 1999). Bei diesen Krankheitsbildern kommt es zu einer ungewöhnlich raschen und fulminanten Zerstörung des Gewebes des Zahnhalteapparats, die vor allem bei ansonsten klinisch gesunden jüngeren Patienten auftritt. *A. actinomycetemcomitans* ist in der Lage, eine Vielzahl von Virulenzfaktoren zu sezernieren. Das bedeutendste ist Leukotoxin, welches neutrophile Granulozyten und Monozyten angreift und damit die Immunabwehr stört (Henderson et al., 2003). Des Weiteren sind solche Bakterien in der Lage, das umgebende Gewebe unter anderem über Kollagenasen direkt zu schädigen. Außerdem können sie den Stoffwechsel von Fibroblasten und Osteoklasten beeinflussen und den Gewebeumbau in Knochen und Bindegewebe stören (Fives-Taylor et al., 1999).

*P. gingivalis* kann in Kombination mit *A. actinomycetemcomitans* bei der aggressiven Form der Parodontitis ebenfalls auftreten (Lang et al., 1999), gilt jedoch vordergründig als Leitkeim für die chronische Parodontitis. Es handelt sich um unbewegliche, gramnegative und anaerobe Stäbchen. Gemeinsam mit den Bakterien *Tannerella forsythia* und *Treponema denticola* bildet *P. gingivalis* den sogenannten Roten Komplex der parodontalpathogenen Keime. Dieser enthält, gemeinsam mit dem eigenständigen *A. actinomycetemcomitans* Komplex, hinsichtlich Pathogenität die aggressivsten Bakterienspezies (Holt and Ebersole, 2005). Das Bakterium beeinträchtigt unter anderem den Knochenstoffwechsel, indem es die Produktion von RANKL (Receptor Activator of Nuclear Factor  $\kappa$ B Ligand) anregt und dadurch die Osteoklastenaktivität steigert. Weiterhin ließen sich in Anwesenheit von *P. gingivalis* gesteigerte Zytokin-Konzentrationen feststellen. Dabei sind vor allem Interleukin 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) und Interleukin-6 (IL-6) zu nennen, die für die gesteigerte RANKL-Aktivität verantwortlich zu sein scheinen (Mysak et al., 2014; Yamaguchi, 2009).

Gemeinsam ist beiden genannten Bakterienspezies, dass sie wegen ihres anaeroben Stoffwechsels gerade in den hypoxischen Bereichen des Zahnfleischsulkus ideale Wachstumsbedingungen vorfinden. Die Sauerstoffarmut wird durch aktive Entzündungsprozesse während einer Parodontitis noch zusätzlich gesteigert (Frede et al., 2007).

Auf molekularer Ebene führen sowohl die bakteriellen Endotoxine als auch mechanische Belastungen der PDL-Fibroblasten im Laufe der kieferorthopädischen Zahnbewegung zu vielfäl-

tigen und komplexen Zellantworten. Generell laufen dabei verschiedene Signal- und Reaktionsmechanismen ab, die bis zum heutigen Tag noch nicht vollständig aufgeklärt werden konnten. Die Zahnbewegung im Parodontium wird über komplexe Kaskaden gesteuert (Meikle, 2006). Ausgelöst durch mechanischen Stress, der auf die PDL-Zellen wirkt, kommt es letztlich zu einer gesteigerten Freisetzung von Prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>). Bedingt wird dies vordergründig durch eine Erhöhung der Cyclooxygenase-2-Aktivität (COX-2) in den Zellen (Yamamoto et al., 2011; Kanzaki et al., 2002). Auch sezernieren immunologische Zellen als Antwort auf Entzündungsprozesse verschiedene Zytokine und Mediatoren, zum Beispiel IL-1 $\beta$  und IL-6. Wie bereits erwähnt wirken sich diese über die Beeinflussung der RANK-Kaskade (Receptor Activator of NF- $\kappa$ B) auf die Osteoklastenaktivität aus. Sie führen zu einer erhöhten Produktion von RANKL, das anschließend an den RANK-Rezeptor bindet. Er ist auf Osteoklasten und deren Vorläuferzellen vorhanden. Dieser Vorgang bewirkt zum einen eine gesteigerte Aktivität der Zellen, zum anderen auch die Umwandlung der Progenitorzellen in die reifen Osteoklasten. Die erhöhte Aktivität der für den Knochenabbau zuständigen Zellen hält so lange an, wie das Gleichgewicht von RANKL und OPG (Osteoprotegerin) zu Gunsten von RANKL verschoben ist. Soll der Knochenabbau wieder gestoppt werden, wird von den Osteoblasten OPG ausgeschüttet. Dabei handelt es sich ebenfalls um einen Rezeptor, der mit dem RANK-Rezeptor konkurriert und die Osteoklastenaktivität und Differenzierung hemmt (Boyle et al., 2003; Yamaguchi, 2009). Die Affinität der RANKL-Moleküle zu OPG ist hierbei höher als diejenige zu RANK, weshalb durch einen Anstieg der OPG-Produktion eine Hemmung des Knochenabbaus erfolgt (Yamaguchi, 2009).

Die Literatur zeigt also, dass bei den beschriebenen Vorgängen der Zahnbewegung mittels kieferorthopädischer Kräfte und auch in der Immunreaktion auf parodontalpathogene Bakterien der Einfluss der PDL-Fibroblasten groß ist. Sie sind in der Lage, unter mechanischer Belastung den Knochenstoffwechsel zu modulieren. Analog dazu ist ihre Bedeutung auch beim Krankheitsbild der Parodontitis hoch, da sie Immunzellen beeinflussen und damit aktiv für die Immunantwort und auch Gewebeabbau und -zerstörung verantwortlich sind (Koner mann et al., 2012).

Einen weiteren wesentlichen Punkt bei der Betrachtung von Entzündungsgeschehen stellt der Zustand des oxidativen Stresses dar. Dieser Begriff bezeichnet laut Sies (1997) eine Stoffwechsellage, bei der das Gleichgewicht zwischen Oxidantien und Antioxidantien zu Gunsten der Oxidantien gestört ist und die schädlich für den Organismus sein kann. Es kommt zu einem vermehrten Auftreten sogenannter reaktiver Sauerstoffspezies (Reactive oxygen species, ROS).

Der Begriff bezeichnet hochreaktive Oxidationsmittel, wie zum Beispiel Wasserstoffperoxid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) und freie Radikale wie das Hyperoxid-Anion (auch Superoxid,  $\text{O}_2^-$ ) und das Hydroxyl-Radikal ( $\text{HO}\bullet$ ) (Brandt, 2014). Das primäre ROS stellt dabei das Superoxid-Anion dar. Es wird über streng regulierte Enzymkomplexe, die NADPH-Oxidasen, in den Mitochondrien als Nebenprodukt bei Atmungskette und oxidativer Phosphorylierung ständig gebildet, wenn Nährstoffe oxidiert und verarbeitet werden. Weil es sich dabei um ein überaus reaktives Molekül handelt, wird es in den Zellen hauptsächlich über Superoxid-Dismutasen in Wasserstoffperoxid umgewandelt. Dieses wird dann wiederum über verschiedene Katalasen und die Glutathionperoxidase weiter abgebaut (Sena and Chandel, 2012).

Wegen ihrer hohen Reaktionsfreudigkeit sind ROS in der Lage eine Vielzahl von Vorgängen im Körper zu stören und zu beeinflussen. So spielen sie eine Rolle in Entzündungs- und Immunreaktionen (Roth and Dröge, 1987) und sind imstande, Proteine und auch DNA-Moleküle direkt zu schädigen. Zusätzlich scheinen sie Apoptoseprozesse in Zellen zu starten und zu beeinflussen (Redza-Dutordoir and Averill-Bates, 2016). Erste Erwähnung fanden sie in der Literatur als Werkzeug von Phagozyten, welche ROS ausschütten, um damit Pathogene anzugreifen und zu zerstören. Weiterhin wurden sie in den letzten Jahrzehnten mit einer Reihe von entzündlichen und mutagenen Erkrankungen in Verbindung gebracht (Reuter et al., 2010; Duracková, 2010) und auch lange für die Zellalterung mitverantwortlich gemacht (Harman, 1956). Neben ihren schädigenden Wirkungen bei erhöhter ROS-Konzentration, also oxidativem Stress, sind diese Moleküle in physiologischen Dosen zusätzlich in der intra- und interzellulären Signalweitergabe von Bedeutung. Es konnte gezeigt werden, dass Mitochondrien mittels  $\text{O}_2^-$ -Produktion und Freisetzung verschiedene Einflüsse auf die Zellkommunikation haben (Brown and Griendling, 2009). Bereits früh untersuchte Finkel (1998) die Auswirkungen von  $\text{H}_2\text{O}_2$  auf die verschiedenen Signalkaskaden. Er konnte nachweisen, dass eine Reihe von Zytokinen, Wachstums- und Transkriptionsfaktoren ( $\text{NF-}\kappa\text{B}$ , Activator protein 1 (AP-1)) und der Insulinstoffwechsel durch dessen Konzentration beeinflusst werden und umgekehrt auch die ROS-Bildung modulieren.

Von besonderer Relevanz scheint dabei die Sensibilität von  $\text{NF-}\kappa\text{B}$  auf ROS zu sein, welcher eine prominente Rolle bei der Regulierung zahlreicher proinflammatorischer Gene spielt (Jansen-Heininger et al., 2000; Bubici et al., 2006). Reize wie Hypoxie, gesteigerte Zytokinspiegel als Folge von Entzündungsreaktionen, aber auch verschiedene Wachstumsfaktoren lösen über gesteigerte ROS-Produktion vielfältige Zellreaktionen aus, wobei die Gesamtheit dieser Vorgänge noch nicht abschließend erforscht ist (Sena and Chandel, 2012).

ROS sind also sowohl an der Immunabwehr als auch an der Entstehung von Krankheiten beteiligt. Das führte zu Versuchen, solche Prozesse durch die Verwendung von Antioxidantien, die ROS binden oder neutralisieren, zu beeinflussen. Allerdings werden die Ansätze teilweise kontrovers diskutiert (Poljsak et al., 2013).

Zahlreiche Studien haben in der Vergangenheit auch die Auswirkungen von ROS speziell bei der Entstehung und Pathologie der Parodontitis untersucht. Es zeigte sich, dass die Schwere und der Verlauf dieser Erkrankung nicht per se von den pathogenen Stoffwechselprodukten der beteiligten Bakterien abhängen. Vielmehr ist die Wirtsantwort mitverantwortlich für das Ausmaß der parodontalen Schäden, wobei reaktive Sauerstoffspezies als wichtige Botenstoffe auftreten (Liu et al., 2017). So konnte eine Zunahme von oxidativem Stress in PDL-Fibroblasten als Reaktion auf Lysate parodontalpathogener Keime nachgewiesen werden (Gölz et al., 2014; Chapple and Matthews, 2007; Tamaki et al., 2014). Auch und gerade unter hypoxischen Bedingungen steuern ROS eine Reihe von wesentlichen Transkriptionsfaktoren, hierbei sind vor allem der Hypoxie-induzierte Faktor 1 (HIF-1) und dessen Untereinheit HIF-1 $\alpha$  zu nennen (Semenza, 2000). Diese Moleküle stellen ein äußerst bedeutendes Werkzeug des Körpers im Umgang mit sauerstoffreduzierten Umgebungen dar.

Übertragen auf die Zahnbewegung während kieferorthopädischer Behandlung und die zugrundeliegenden Umbau- und Entzündungsprozesse zeigt sich ein ähnliches Bild. Auch hier finden sich Gewebезonen, in denen Druck und Sauerstoffarmut als Folge von Durchblutungsstörungen im PDL-Gewebe auftreten. Solche Umstände haben wiederum Auswirkungen auf die ROS-Bildung (Chandel et al., 1998) und es kommt, analog zu den Vorgängen bei der Parodontitis, zu Knochenmodellierung als Immunantwort des Körpers auf die vorliegenden Entzündungsprozesse (Meikle, 2006). Lee et al. (2005) zeigten, dass ROS die RANK-Signalkette beeinflussen und somit die Differenzierung von Osteoklasten steuern. Auch scheinen sie Einfluss auf deren Funktion und Aktivität und damit indirekt auf das Ausmaß des Knochenabbaus zu haben (Yang et al., 2004). Es konnte weiter nachgewiesen werden, dass sich die Expression bestimmter Mediatoren und Zytokine in PDL-Fibroblasten unter Druck und anaeroben Bedingungen ändert (Chae et al., 2011).

Die Relevanz von reaktiven Sauerstoffspezies als Botenstoffe bei physiologischen Konzentrationen zum einen und als pathologische Agenzien bei oxidativem Stress bei verschiedenen Krankheitsbildern zum anderen, scheint also überaus hoch zu sein. Gerade in den sich überschneidenden Feldern der Kieferorthopädie und Parodontologie kommt solchen Stoffwechselprozessen eine bedeutsame Rolle zu. Es konnten bereits erste Kenntnisse darüber gesammelt

werden, wie sich die Zuführung von körperfremden Antioxidantien auf die Entzündungsreaktionen während der Behandlungen auswirkt (Chae et al., 2011). Dabei bleibt die Frage, ob in Zukunft die Verwendung von solchen Stoffen als unterstützende Maßnahmen sinnvoll ist, um die jeweiligen Therapien noch genauer steuern zu können.

Auf Grund der einleitend dargestellten demographischen Faktoren wird die Zahl der Behandlungsfälle, in denen eine Kombination aus Parodontitis und kieferorthopädischem Behandlungswunsch vorliegt, wie bereits erwähnt, in Zukunft wohl immer weiter steigen. So konnten unter anderem Kirschneck et al. (2017a) zeigen, dass es bei solchen Patienten im Laufe der kieferorthopädischen Behandlung zu erhöhtem und ungewolltem Knochenverlust kommt. Es sollte also einerseits eine funktionierende Abstimmung zwischen Kieferorthopäden und Parodontologen stattfinden, um solch komplexe Fälle erfolgreich behandeln zu können. Andererseits müssen die molekularen Vorgänge bei diesen Prozessen noch weiter erforscht werden, um ein besseres Verständnis darüber zu erhalten, wie solche Nebenwirkungen vermieden werden können.

Die vorliegende *in-vitro*-Untersuchung soll dazu beitragen, die während der Behandlungen auftretenden Signalkaskaden weiter zu ergründen. Dabei liegt der Fokus auf der Untersuchung der Fibroblasten des parodontalen Ligaments und inwieweit oxidativer Stress in deren Stoffwechselprozessen auftritt. Von besonderem Interesse ist hier die Fragestellung, ob es nach Stimulation dieser PDL-Fibroblasten durch parodontalpathogene Bakterien einerseits und mechanische Kraftapplikation und Hypoxie andererseits zur Bildung von ROS kommt und ob dies mittels Durchflusszytometrie nachgewiesen werden kann. Auch die Reaktion der Zellen auf erhöhte ROS-Konzentrationen und die Auswirkungen von Antioxidantien sollte geprüft werden.

## **2 Material und Methoden**

### **2.1 Zellkulturexperimente**

#### **2.1.1 Isolierung von Parodontalligament-Fibroblasten**

In den Versuchsreihen wurden humane PDL-Zellen verwendet. Die Arbeiten wurden dabei stets unter einer Sterilbank (Herasafe KS, Thermo Fisher Scientific) durchgeführt. Kam es zu direktem Zellkontakt, wurden soweit möglich steril verpackte Einwegartikel verwendet. Hitzebeständige Materialien wurden unter Standardbedingungen in einem Autoklav sterilisiert, nicht hitzefeste Lösungen bei Bedarf unter der Sterilbank hergestellt oder andernfalls vor Verwendung steril filtriert.

Die verwendeten PDL-Zellen stammten von Patienten der Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie des Universitätsklinikums Regensburg. Sie hatten der Verwendung im Vorfeld zugestimmt. Das Alter der Spender lag zwischen 14 und 22 Jahren und die Zellen wurden aus extrahierten Weisheitszähnen gewonnen, welche keinerlei entzündliche und kariöse Läsionen aufwiesen und deren Entfernung medizinisch indiziert war. Die Genehmigung der zuständigen Ethikkommission lag vor (12-170-0150). Die Zähne wurden nach erfolgter Extraktion von den Mitarbeitern, welche an den Eingriffen beteiligt waren, in serumfreiem Vollmedium (DMEM High Glucose (D5671, Sigma-Aldrich), 1% Antibiotikum/Antimykotikum (A5955, Sigma-Aldrich) und 1% L-Glutamin (G7513, Sigma-Aldrich) aufbewahrt und anschließend bei einer Temperatur von 4°C über einen Zeitraum von maximal 2 Stunden gelagert.

Um die Fibroblasten zu isolieren, wurde der Weisheitszahn zuerst in eine sterile phosphatgepufferte Salzlösung (14190094, Life Technologies) überführt, welche zusätzlich 1% Antibiotikum/Antimykotikum enthielt (A5955, Sigma-Aldrich; PBS+AA). Dieser Waschschrift diente der Entfernung von Geweberesten und Blut und wurde viermal mit jeweils frischer PBS+AA Lösung wiederholt. Im Anschluss wurde der Zahn in eine Petrischale, ebenfalls mit PBS+AA gefüllt, gegeben und das Parodontalligament vorsichtig mit Hilfe geeigneter Küretten oder Skalpelle abgeschabt.

Die Gewebestücke wurden daraufhin in ein Falcon-Röhrchen überführt und erneut viermal mit PBS+AA gewaschen. Zwischendurch erfolgten Sedimentation und Zentrifugation (1.200 rpm, 5 min), um die Materialverluste bei den Waschsritten möglichst gering zu halten. In Folge

wurde der Überstand abgenommen und es erfolgte ein Collagenaseverdau. Dazu wurden die Gewebestückchen für 20 min in 5 ml serumfreiem Medium, welchem 180 µl Collagenase Typ III (17101-015, Thermo Fisher Scientific) zugesetzt waren, bei 37°C über 30 min auf einem Schüttler inkubiert. Nach erfolgter Inkubation wurde der Überstand abgenommen und die Zellen für 5 min bei 1.200 rpm zentrifugiert. Das gewonnene Gewebepellet wurde in 2 ml serumhaltigem Vollmedium (DMEM high glucose, D5796, Sigma-Aldrich; 10% FBS, P30-3306, PAN-Biotech; 1% L-Glutamin, SH30034.01, GE Healthcare; 100 µM Ascorbinsäure, A8960, Sigma-Aldrich und 1% Antibiotika/Antimykotika, A5955, Sigma-Aldrich) aufgenommen und in einer 6-Well-Zellkulturplatte (353046, BD Biosciences) ausgesät. Das Material wurde dann für sieben Tage im Brutschrank (T6060, Heraeus; 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 100% H<sub>2</sub>O) inkubiert. Nach diesem Zeitraum erfolgte ein erster Wechsel des Mediums, welcher anschließend alle zwei Tage wiederholt wurde. Die Kontrolle des Wachstums und der Ausschluss von Verunreinigungen erfolgten mittels Lichtmikroskop.

Um eine Kultivierung von fremdem und unerwünschtem Zellmaterial auszuschließen, mussten die gezüchteten Zellen eindeutig als Fibroblasten des parodontalen Ligaments identifiziert werden. Dies konnte durch lichtmikroskopische Untersuchung und Messung der Genexpression mittels Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase chain reaction, PCR) und anschließender Agarose-Gelelektrophorese erreicht werden. Die lichtmikroskopische Untersuchung zeigte die für PDL-Fibroblasten charakteristische spindelförmige Morphologie (Abb. 1).



**Abb. 1.** Lichtmikroskopische Aufnahme von PDL-Fibroblasten in 100facher Vergrößerung (Aufnahme: Oralbiologisches Labor, Poliklinik für Kieferorthopädie, Universitätsklinikum Regensburg).

Im zweiten Schritt wurde die Expression verschiedener für PDL-Fibroblasten typischer Markergene überprüft. Dazu wurde zuerst, wie in den Verfahrensprotokollen im entsprechenden Kapitel dargestellt, die RNA isoliert. Anschließend erfolgte die Synthese der cDNA (complementary DNA, siehe Kapitel 2.2). Mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion konnten aus der gewonnenen cDNA schließlich spezifisch die für die gesuchten Gene codierenden Abschnitte vervielfältigt werden. Dafür wurde für jedes Markergen 2 µl cDNA (1:10 verdünnt) mit 2 µl 10fach PCR Puffer mit MgCl<sub>2</sub> (12161567001, Roche), 0,4 µl NTPs (L785.2, Carl Roth), 0,2 µl Taq-Polymerase (12032929001, Roche) und je 0,5 µl Primer (Tabelle 1) gemischt und mit H<sub>2</sub>O<sub>ad</sub> auf ein Gesamtvolumen von 20 µl aufgefüllt.

**Tab. 1.** Primersequenzen der zur Charakterisierung von PDL-Fibroblasten verwendeten Ziel- und Referenzgene (PCR).

Abkürzung	Genname	forward Primer	reverse Primer
ALP	Alkalische Phosphatase	AGAACCCCAAAGGCTTCTTC	CTTGGCTTTTCCTTCATGGT
BSP	Bone Sialoprotein	CAATCTGTGCCA-CTCACTGC	CAGTCTTCATTTTGGTGATTGC
FMOD	Fibromodulin	GGGACGTGGTCA-CTCTCTG	CTGGGAGAGGGAGAAGAGC
OPG	Osteoprotegerin	GAAGGGCGCTAC-CTTGAGAT	GCAAACGTATTTTCGCTCTGG
POSTN	Periostin	GAACCAAAAATTAAAGTGAT- GAAGG	TGACTTTTGTAGTGTGGGTCCT
RANKL	Receptor activator of NF-κB ligand	TGATTCATGTAG- GAGAATTAAACAGG	GATGTGCTGTGATCCAACGA
RUNX2	Runt related transcription factor 2	GTGCCTAGGCGCATTCA	GCTCTTCTTACTGAGAGTG- GAAGG

Mit Hilfe der selektiven Primerpaare konnten dann im Rahmen der PCR für jeden Ansatz die entsprechenden DNA-Abschnitte amplifiziert werden. Die PCR wurde mit einem Thermozyklier (VWR) durchgeführt. Dabei wurden die Proben zunächst für 5 min bei 95°C denaturiert und anschließend die DNA in 40 Zyklen (95°C – 20 sec, 60°C - 20 sec, 72°C – 20 sec) amplifiziert. Mit dem Verfahren der PCR konnten die gesuchten Genabschnitte selektiv vervielfältigt werden, sofern diese im zu untersuchenden DNA-Material vorlagen.

Um das zu überprüfen wurde nun in einem letzten Schritt eine Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt. Bei diesem Verfahren werden die negativ geladenen DNA-Moleküle mit Hilfe einer angelegten elektrischen Spannung getrennt, wobei die Wanderungsgeschwindigkeit der einzelnen Moleküle von ihrem Molekulargewicht und somit ihrer Größe abhängt. Dies ist dem Porendurchmesser des benutzten Agarosegels geschuldet, welches durchwandert werden muss. Große Moleküle bewegen sich mit geringerer Geschwindigkeit als kleinere (Lee et al., 2012). Für die Durchführung wurde zuerst das Agarosegel hergestellt. Dafür benötigte man Tris-Acetat-EDTA-Puffer (TAE-Puffer), worin die Agarose gelöst wurde. Es wurde zuerst eine TAE-Puffer Stammlösung (50fach) hergestellt. Sie setzte sich aus 242 g Tris, 57,1 ml Eisessig und 100 ml EDTA (5 M, pH 8) zusammen und wurde anschließend mit destilliertem Wasser auf 1 Liter aufgefüllt. Mit Hilfe von weiterem destilliertem Wasser konnte die Pufferlösung dann auf die gewünschte einfache Endkonzentration verdünnt werden. Für das benötigte 1,5 prozentige Agarosegel wurden 1,5 g Agarose (T145.3, Roth) in 100 ml TAE-Puffer (1fach) gelöst und unter Zugabe des Gel Red Farbstoffes (41003, Biotrend) aufgekocht. Das Gel wurde dann in die Elektrophoresekammer inklusive zwölfmal Kamm gefüllt und kühlte ab. Ein Gemisch aus 7 µl des jeweiligen PCR-Produktes und 3 µl Sucrose-Ladepuffer wurde in die Taschen eingebracht, als Laufpuffer wurde TAE-Puffer (1fach) verwendet. Die Spannung betrug 120 V und wurde über einen Zeitraum von 40 min aufrechterhalten. Danach wurden die fluoreszierenden Banden mit Hilfe von Genoplex 2 und der entsprechenden Software Genosoft (VWR) dargestellt. Es ergab sich das in Abb. 2 gezeigte Resultat.



**Abb. 2.** Agarose-Gelelektrophorese der Gene für die Charakterisierung von PDL-Fibroblasten (Aufnahme: Oralbiologisches Labor, Poliklinik für Kieferorthopädie, Universitätsklinikum Regensburg).

Alle für die Charakterisierung verwendeten Referenzgene konnten dargestellt werden, wodurch der Beleg geliefert wurde, dass es sich bei dem isolierten Zellmaterial um PDL-Fibroblasten handelte.

Nach der Isolierung der PDL-Zellen wurden diese in T75-Zellkulturflaschen in serumhaltigem Vollmedium im Brutschrank inkubiert. Das Wachstum wurde dabei täglich lichtmikroskopisch kontrolliert. Nach erreichter Konfluenz erfolgte eine Trypsinierung und Neuaussaat der Zellen, die Passagenzahl erhöhte sich um 1. Dazu wurde das Medium zunächst abgesaugt und die Zellen mit PBS gewaschen. Nach Entfernung des PBS wurde 1 ml Trypsin (T4049, Sigma–Aldrich) hinzugefügt und die Zellen für 4 min bei 37°C inkubiert. Die Zugabe von 1 ml Vollmedium stoppte die Reaktion. Nach Zentrifugation (1200 rpm für 5 min) wurde der Überstand erneut abgesaugt und das Zellpellet wieder in Medium aufgenommen. Die Zellzählung erfolgte mittels Coulter Counter (Z2, Beckman Coulter). Dazu wurden 100 µl Zellsuspension in 10 ml isotone Kochsalzlösung gegeben, gemischt und anschließend vermessen. Pro Passage wurden 700.000 Zellen in eine neue T75 Flasche überführt. Das Wachstum wurde anschließend wieder regelmäßig bis zur Konfluenz lichtmikroskopisch kontrolliert, es erfolgte dabei jeden zweiten bis dritten Tag ein Wechsel des Mediums. Nicht benötigte und überzählige Zellen wurden für die spätere Verwendung und Kultivierung eingefroren. Hierfür wurde 10% Dimethylsulfoxid (DMSO) zur Zellsuspension gegeben und das Material in Kryoröhrchen bei -80 °C über Nacht inkubiert und anschließend in flüssigen Stickstoff (-196 °C) überführt. Für die Versuchsreihen wurden Zellen verwendet, deren Passagenzahl zwischen 4 und 7 lag. Diese wurden in 6-Well Zellkulturplatten ausgesät, die Zellzahl pro Well betrug 70.000 Zellen, welche in 2 ml Vollmedium bis zu einer Konfluenz von etwa 70% kultiviert wurden. Die Überprüfung des Fortschritts des Zellwachstums und des Zustands der Zellen erfolgte täglich mittels Lichtmikroskop. Die weitere Behandlung dieser Proben wird im folgenden Kapitel erläutert.

### 2.1.2 Versuchsaufbau zur Druckapplikation

Die PDL-Fibroblasten wurden mit mechanischen Kräften in Form eines Drucks von 2 g/cm<sup>2</sup> kontinuierlich über einen Zeitraum von 24 h belastet. Der Druck wurde unter Verwendung von Glaszylindern (Höhe: 7,8 mm; Durchmesser: 33 mm; Masse: 17,44 g) aufgebaut, welche auf die Zellen in den 6-Well-Platten gelegt wurden. Hierfür wurden die Zylinder sterilisiert (2 h bei 250°C im Trockenschrank) und anschließend für 15 min in Vollmedium gelagert, um eine Sättigung der Oberfläche und eine dadurch erreichte Ernährung der Zellen unterhalb der Zylinder

gewährleisten zu können (Römer et al., 2013). Nach Verwerfen des alten Mediums wurden die Zylinder in frischem Vollmedium auf die Zellen gegeben, worauf eine Inkubation über 24 h im Brutschrank erfolgte. Das Medium der nichtbehandelten Kontrollen wurde dabei ebenfalls gewechselt. Nach Abschluss der Inkubation wurden die Glaszylinder vorsichtig entfernt, um Schäden am Zellrasen zu vermeiden und die Zellen im Rahmen der ROS-Messung mittels Durchflusszytometrie weiterbehandelt.

### 2.1.3 Versuchsaufbau zur Hypoxie

Zweiter Bestandteil der Arbeit war die Untersuchung, inwiefern sich Hypoxie auf den Stoffwechsel der PDL-Fibroblasten auswirkt und ob dieser Zustand oxidativen Stress bei den betroffenen Zellen auslöst. Verwirklicht wurde die Hypoxie durch die Verwendung des GasPak-EZ Beutelsystems (260683, BD Biosciences). Dabei handelt es sich um Einmal-Inkubationsbeutel, welche laut Herstellerangaben innerhalb von 2,5 h eine anaerobe Atmosphäre erzeugen, die Kohlendioxidkonzentration beträgt nach 24 h 10% oder mehr. Die wirksamen Bestandteile stellen hierbei Ascorbinsäure, Aktivkohle und Wasser dar. In den Beuteln wurden die Zellschalen nach erreichter 70-prozentiger Konfluenz luftdicht verpackt und das zugehörige GasPak-EZ-Beutelsystem-Säckchen hinzugegeben. Die Funktionstüchtigkeit des Systems und somit der Sauerstoffgehalt der Atmosphäre im Beutel konnte über einen Farbumschlag der enthaltenen Indikatortablette kontrolliert werden. In diesem Zustand wurden die untersuchten Zellen 48 h belassen. Die Inkubation der Vergleichsproben fand unter aeroben aber ansonsten identischen Bedingungen statt. Die weiteren Untersuchungen wurden ebenfalls über das Verfahren der Durchflusszytometrie durchgeführt.

### 2.1.4 Versuchsaufbau zur Austestung der Bakterienlysate

Weiter wurde die Reaktion der Fibroblasten auf parodontalpathogene Keime untersucht. Bei den verwendeten Bakterien handelte es sich *Porphyromonas gingivalis* und *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. Es lagen hitzeinaktivierte Lysate vor, welche uns freundlicherweise vom Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene des Universitätsklinikums Regensburg durch Herrn Dr. Josef Köstler zur Verfügung gestellt wurden. Für die Behandlung der PDL-Fibroblasten wurden Ansätze hergestellt, die 90% Vollmedium und 10% Bakterienlysat enthielten. Das Volumen in den Wells betrug 2 ml, so dass letztlich 1,8 ml Vollmedium und 200 µl Lysat enthalten waren. Das entsprach etwa einer Bakterienzahl von  $2 \cdot 10^7$  Zellen. Die

Zellen wurden im Anschluss über Zeiträume von zwölf und 96 Stunden inkubiert und für die jeweiligen Analysen mittels Durchflusszytometrie weiterbehandelt.

Es wurde außerdem ein Versuch durchgeführt, für den Zellen mit einer Kombination aus *Porphyromonas gingivalis* (10%) und N-Acetylcystein (NAC, A7250, Sigma-Aldrich) behandelt wurden. Bei NAC handelt es sich um eine antioxidativ wirkende Substanz, die eine Vielzahl von therapeutischen Wirkungen aufweist und auch oxidativem Stress entgegen wirken kann (Aruoma et al., 1989). Es sollte daher überprüft werden, ob sich dies auch auf den Stoffwechsel der PDL-Fibroblasten auswirkt.

Hierfür wurden 65 µg des in Pulverform vorliegenden NAC in 1950 µl PBS und 50 µl HEPES-Puffer (25mM) gelöst und anschließend steril filtriert. Man erhielt somit eine 200 mM Stammlösung. Sie wurde anschließend im Verhältnis 1:10 in die einzelnen Wells pipettiert, sodass die NAC-Konzentration jeweils 20 mM betrug. Es erfolgte analog zu den zuvor genannten Versuchen eine Inkubation über 96 Stunden und die durchflusszytometrische Auswertung.

#### 2.1.5 Versuchsaufbau zu Untersuchungen mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Für einen Vorversuch sollten PDL-Fibroblasten unterschiedlichen Wasserstoffperoxid-Konzentrationen ausgesetzt werden. Hierzu wurde eine H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Stammlösung in PBS verdünnt und für die folgende Herstellung der Versuchsansätze verwendet. Die verdünnte Flüssigkeit wurde steril filtriert und daraufhin in Medium auf die jeweiligen Endkonzentrationen gebracht, welche 100 µM, 500 µM, 1 mM, 5 mM, 10 mM, 25 mM und 50 mM betragen. Die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösungen wurden anschließend zu den PDL-Fibroblasten in die 6-Well-Platten pipettiert. Dabei wurde das Nährmedium, in dem die Zellen zuvor herangewachsen waren, abgesaugt und durch die jeweiligen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Ansätze ersetzt, das Endvolumen in den einzelnen Wells betrug weiterhin 2 ml. Zusätzlich wurde eine Kontrollprobe mit Medium ohne H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> angesetzt. Im Anschluss erfolgten Inkubation im Brutschrank und regelmäßige lichtmikroskopische Kontrollen. Nach 60 Minuten konnten erste massive Schäden am Zellrasen festgestellt werden und es erfolgte die ROS-Bestimmung mittels Durchflusszytometrie. Da für die Fluoreszenzfärbung der Zellen 30 Minuten benötigt wurden, betrug die Gesamtinkubationszeit in diesem Fall somit 90 min.

Ein weiterer Bestandteil der Arbeit waren Experimente, die die Auswirkungen von oxidativem Stress auf die Expression verschiedener Zytokine untersuchten. Dafür wurden die Zellen ebenfalls H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ausgesetzt. Es fand eine Inkubation über verschiedene Zeiträume (30 min, 2 h, 4 h, 6 h) statt. Um übermäßige Schäden an den Zellen über diese längeren Zeiträume zu vermeiden, wurde eine H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentration von 0,1 mM verwendet. Die Herstellung der jeweiligen Proben

verlief dabei analog zu den ROS-Untersuchungen und die Inkubation erfolgte im Brutschrank über die angegebenen Zeiträume. Es schloss sich die Analyse der Genexpression von Interleukin-8 (IL-8) an, wie im folgenden Kapitel beschrieben.

Im zweiten Teil dieser Reihe wurde eine Inkubationszeit von 2 Stunden gewählt und zusätzlich die Genexpression weiterer Zytokine untersucht. Es handelte sich um Interleukin-6, Interleukin-8 und Cyclooxygenase-2. Zusätzlich wurden analog zu Kapitel 2.1.4 Proben mit einer Kombination aus H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0,1 mM) und NAC (20 mM) angelegt und die Genexpression nach einer Inkubationszeit von 24 h untersucht. Die genaue Vorgehensweise dieser RNA-Analysen wird im nachfolgenden Kapitel erläutert.

## **2.2 RNA-Analytik**

### **2.2.1 RNA-Isolierung**

Die RNA Isolierung erfolgte mit Hilfe der Trizol Methode. Zunächst wurden die stimulierten Zellen mit PBS gewaschen. Anschließend wurde 1 ml peqGOLD TriFast™ (PEQLAB Biotechnology) pro Well hinzugefügt und durch Auf- und Abpipettieren gemischt. Nach 5 min Inkubation bei Raumtemperatur wurden 200 µl Chloroform zu der Lösung gegeben und sie für 15 sec gevortext. Nach 10 min bei Raumtemperatur wurden die Zellen für 10 min bei 13.000 rpm und 4°C zentrifugiert. Der klare Überstand wurde in ein neues Gefäß überführt und mit 1 ml Isopropanol ausgefällt. Nach 10 min auf Eis wurde die gefällte RNA bei 13.000 rpm für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet zweimal mit 1 ml Ethanol (70%) gewaschen. Abschließend wurde das Pellet getrocknet und in 20 µl nukleasefreiem Wasser (T143, Carl Roth) resuspendiert.

### **2.2.2 cDNA-Synthese**

Die extrahierte RNA wurde im nächsten Schritt in cDNA umgeschrieben. Hierzu wurde zuerst mittels Absorbanz-Messung bei 260 nm durch Vergleich mit einer Leerprobe die Konzentration der Probe in ng/µl errechnet. Im Anschluss erfolgte die reverse Transkription der RNA. Dafür wurde eine standardisierte Menge RNA mit 0,1 nmol Oligo-dT (SO131, Thermo Fisher Scientific), 0,1 nmol Random Hexamer (SO142, Thermo Fisher Scientific), 40 nmol dNTP (L785.2, Carl Roth), 1 fach M-MLV-Puffer (M1705, Promega), 40 U RNase Inhibitor (EO0381, Thermo

Fisher Scientific) und 200 U Reverse Transcriptase (M1705, Promega) vermischt und mit nukleasefreiem Wasser (T143, Carl Roth) auf 20 µl aufgefüllt. Die Proben wurden für 60 min bei 37°C inkubiert. Durch die anschließende Erhitzung auf 95°C für 2 min wurde die Reverse Transkriptase inaktiviert.

### 2.2.3 Quantitative Real-Time Polymerase-Kettenreaktion (RT-qPCR)

Im Gegensatz zur in Kapitel 2.1.1.3 beschriebenen semiquantitativen PCR, kann bei der RT-qPCR eine Quantifizierung der untersuchten Gene erfolgen. Ermöglicht wird dies durch den Einsatz eines Fluoreszenzfarbstoffes. Zum Einsatz kam der Farbstoff SYBR Green Jump Start Taq Ready Mix (S4438, Sigma–Aldrich). Er bindet an doppelsträngige DNA, absorbiert blaues Licht bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 494$  nm und emittiert grünes Licht bei  $\lambda = 521$  nm (Ponchel et al., 2003). Diese Fluoreszenz kann gemessen werden und ist proportional zur Menge an doppelsträngiger DNA, wodurch quantitative Aussagen möglich sind (Holzapfel and Wickert, 2007; Logan, 2009). Zur Durchführung der RT-qPCR wurde der Mastercycler ep realplex-S Thermocycler (Eppendorf) verwendet. Je 1,5 µl cDNA (1:10 verdünnt) wurden mit einem Primermix, bestehend aus 7,5µl SYBR Green Jump Start Taq ReadyMix und 7,5 pmol des respektiven Primerpaares (3.75 pmol/primer, Tabelle 2), vermischt und mit nukleasefreiem Wasser (T143, Carl Roth) auf ein Gesamtvolumen von 15 µl aufgefüllt. Das anschließend ausgeführte RT-qPCR Programm zur cDNA-Amplifikation wurde nach einer initialen Hitzeaktivierung (95°C/5 min) in 45 Zyklen aus Denaturierung (95°C/10 sec), Annealing (60°C/8 sec) und Verlängerung (72°C/8 sec) durchgeführt.

**Tab. 2.** Primersequenzen der für die RT-qPCR verwendeten Ziel- und Referenzgene.

Abkürzung	Genname	forward Primer	reverse Primer
COX-2	Cyclooxygenase 2	CTTCACGCATCAGTTTTTCAAG	TCACCGTAAATATTTAAGTCCAC
IL-6	Interleukin 6	CAGGAGCCCAGCTATGAACT	AGCAGGCAACACCAGGAG
IL-8	Interleukin-8	AGACAGCAGAGCACACAAGC	ATGGTTCCTTCCGGTGGT
POLR2A	RNA Polymerase II Subunit A	GCACCACGTCCAATGACA	AGCCATCAAAGGAGATGACG

Neben den Primern für die untersuchten Gene wurde zusätzlich ein Ansatz für ein Housekeeping-Gen erstellt (RNA-Polymerase), was im Rahmen der späteren Auswertung von Bedeutung war.

#### 2.2.4 Auswertung der RT-qPCR mittels $2^{-\Delta\Delta C_T}$ -Methode

Als Ergebnis lieferte das Programm nach Abschluss der RT-qPCR eine grafische und tabellarische Darstellung der Fluoreszenzentwicklung und für jede untersuchte Probe den jeweiligen  $C_T$ -Wert (Threshold Cycle, Schwellenwertzyklus). Dieser Wert bezeichnet den Zeitpunkt, an dem die Fluoreszenz der jeweiligen Probe den eingestellten Schwellenwert überschreitet. Es können somit also quantitative Aussagen über die ursprüngliche Menge an Genmaterial getroffen werden. Die Auswertung erfolgt schließlich über die sog.  $2^{-\Delta\Delta C_T}$ -Methode. Dabei handelt es sich um eine relative Quantifizierungsmethode, welche sich für die Auswertung von Real-Time PCR Daten etabliert hat (Schmittgen and Livak, 2008). Folgende Berechnungen werden hierbei durchgeführt:

$$\Delta C_T = C_T (\text{Zielgen}) - C_T (\text{Referenzgen})$$

$$\Delta\Delta C_T = \Delta C_T (\text{Behandelte Probe}) - \Delta C_T (\text{Kontrolle})$$

$$\text{Relative Expression} = 2^{-\Delta\Delta C_T}$$

Im ersten Schritt wird für jedes Gen ein  $\Delta C_T$ -Wert gebildet. Dafür subtrahiert man den  $C_T$ -Wert eines Referenzgens (hier: RNA-Polymerase) von demjenigen des zu untersuchenden Zielgens. Die so erhaltenen Werte können anschließend in Relation zu den Vergleichsproben gesetzt werden. Es werden also die  $\Delta C_T$ -Werte der Kontrollen von den  $\Delta C_T$ -Werten der behandelten Proben subtrahiert und man erhält den  $\Delta\Delta C_T$ -Wert. Aus diesem Wert kann man über die Formel  $\text{Expression} = 2^{-\Delta\Delta C_T}$  dann im letzten Schritt die relative Genexpression im Vergleich zur Kontrollprobe berechnen.

### 2.3 Durchflusszytometrie-Messungen mittels FlowCytometer (FACS)

#### 2.3.1 Funktionsweise

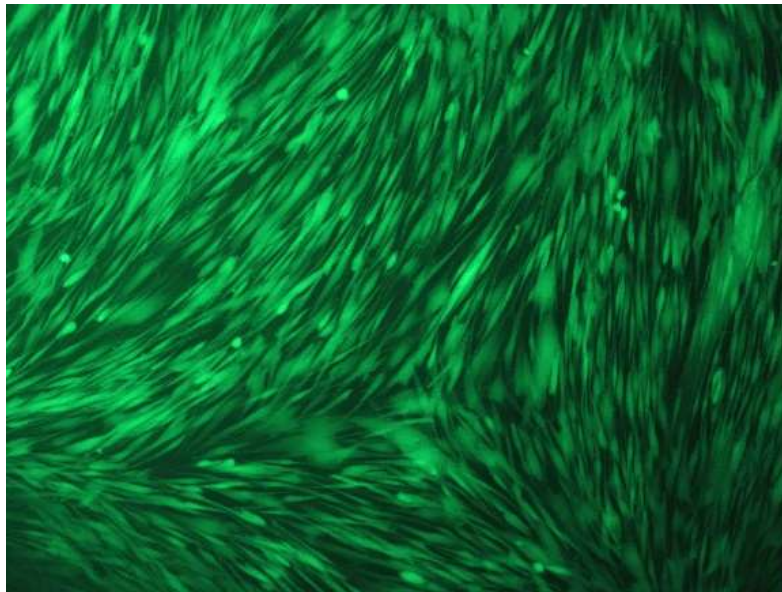
Neben der Analyse der behandelten Zellen über die RT-qPCR wurden auch Untersuchungen mittels Durchflusszytometrie (Fluorescence activated cell sorting, FACS; Gerät: FACS-Canto, BD) durchgeführt. Hierbei handelt es sich um ein bedeutsames Untersuchungsverfahren zur Zellsortierung und Fluoreszenzmessung (Givan, 2011). Innerhalb einer Trägerflüssigkeit

werden die untersuchten Zellen transportiert. Es liegt ein Kanal vor, den die Zellen einzeln passieren. Dort findet eine Vermessung durch Laser unterschiedlicher Wellenlängen statt. Die Schlüsselparameter in der Zellsortierung sind dabei die Werte für das Vorwärtsstreulicht (Forward scattered light, FSC) und das Seitwärtsstreulicht (Side scattered light, SSC). Vereinfacht lässt sich sagen, dass der FSC-Wert Auskunft über die Zellgröße gibt, wohingegen der SSC-Wert auf die Anzahl der Zellorganellen, also die Zellkomplexität schließen lässt (Picot et al., 2012; Givan, 2011). In der vorliegenden Arbeit sollte neben der Zellmorphologie allerdings auch das Vorliegen reaktiver Sauerstoffspezies untersucht werden. Daher wurde als zusätzlicher Parameter die Fluoreszenz der Zellen geprüft. Hierzu wurden die Zellen vor der Messung mit dem Fluoreszenzfarbstoff Dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA) behandelt. Dabei handelt es sich um eine Verbindung, welche in ihrer Ausgangsform in der Lage ist, die Membran der untersuchten Zellen zu penetrieren. Im Zellinneren wird sie dann durch Esterasen zu Dichlorodihydrofluorescein deacetyliert. Anschließend erfolgt, hauptsächlich durch  $H_2O_2$ , die Umwandlung in die fluoreszierende Form Dichlorofluorescein (DCF) (Wang and Joseph, 1999). Auf Grund der Aktivierung durch  $H_2O_2$  und auch andere reaktive Sauerstoffspezies lässt sich durch den Farbstoff also indirekt oxidativer Stress in den Zellen nachweisen (Eruslanov and Kusmartsev, 2010). Gemessen wird diese Fluoreszenz ebenfalls mit Hilfe des verwendeten FACS-Canto Durchflusszytometers. Dazu werden durch einen Laser, dessen Wellenlänge zu dem verwendeten Farbstoff passt, die Farbstoffmoleküle angeregt und anschließend die Fluoreszenz über spezifische Filter und Detektoren (Photomultiplier tubes, PMT) registriert.

### 2.3.2 Vorbereitung der Zellen und Fluoreszenzfärbung

Für die Durchflusszytometrie lagen PDL-Fibroblasten vor, welche, wie in Kapitel 2.1 beschrieben, unterschiedlich vorbehandelt und stimuliert worden waren. Sie waren zuvor in 6-Well-Zellkulturplatten kultiviert worden. Zunächst fand die DCF-Färbung 30 min vor dem jeweiligen Inkubationsende der Proben statt. Hierfür wurden 2  $\mu$ l des Fluoreszenzfarbstoffes direkt in die Wells gegeben, die DCF-Konzentration betrug somit 2  $\mu$ M. Um eine Verfälschung des Ergebnisses ausschließen zu können, wurde dabei für jedes Well eine neue Pipettenspitze verwendet. Außerdem wurde ab diesem Schritt unter abgedunkelten Bedingungen gearbeitet, um eine UV-Exposition und somit eine mögliche vorzeitige Aktivierung des Farbstoffes zu vermeiden. Für die anschließende 30-minütige Inkubation wurden die 6-Well-Platten deshalb in Alufolie gewickelt. Um die Wirkung des Farbstoffes zu überprüfen, wurden zu Beginn der Arbeit unter

dem Fluoreszenzmikroskop Aufnahmen von gefärbten Zellen angefertigt. Abb. 3 zeigt eine der gewonnenen Aufnahmen.



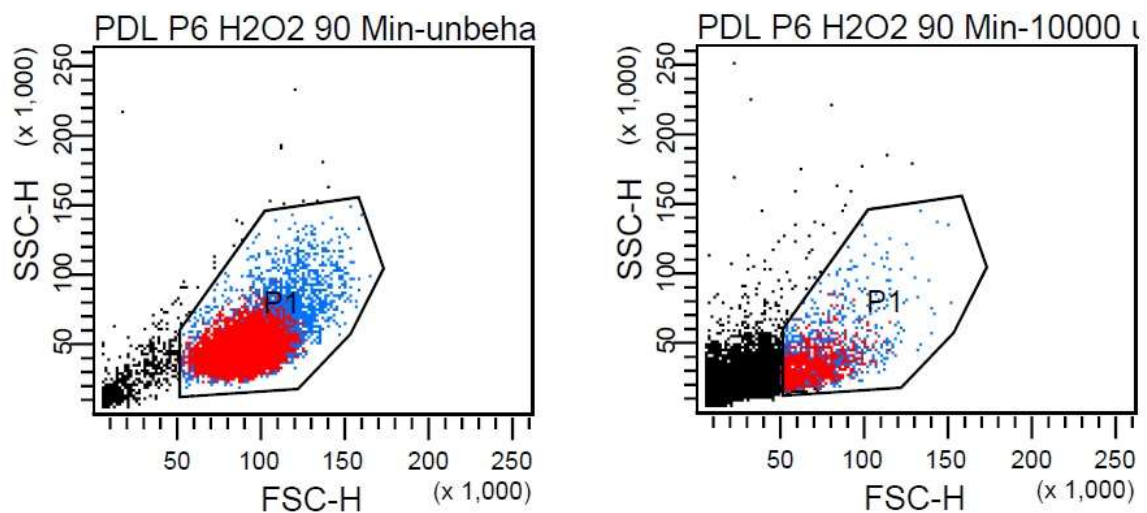
**Abb. 3.** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von mittels DCF gefärbten PDL-Fibroblasten in 200facher Vergrößerung.

Nach Abschluss der Inkubationszeit fand die Zellernte statt. Dafür wurde zunächst der Überstand verworfen. Anschließend wurden die Zellen mit 500  $\mu$ l Trypsin nach 4 min von der Platte gelöst. Nach Zugabe von 1 ml gekühltem PBS wurden die Zellen in die FACS-Röhrchen überführt und bei 600 g und 4°C für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 1 ml PBS resuspendiert. Nach einer erneuten Zentrifugation bei 600 g und 4°C für 5 min und Entfernen des Überstands wurden die Zellen in 500  $\mu$ l PBS aufgenommen. Die gereinigten PDL-Fibroblasten wurden nun unter Benutzung des Zytometers vermessen. Dies erfolgte über das vom Hersteller angebotene Programm FACSDiva (BD). Zu Beginn jeder Messung mussten die Betriebsspannungen des Gerätes angepasst werden, um ein optimales Ergebnis zu erhalten. Für die Auswertung wurde der blaue Argon-Laser des Gerätes verwendet, dessen Wellenlänge 488 nm beträgt. Weiterhin wurden die vom Programm angebotenen FITC- und PE-Kanäle betrachtet (FITC: Exzitationsmaximum: 488 nm, Emissionsmaximum: 519 nm; PE: Exzitationsmaximum: 496 nm, Emissionsmaximum: 578 nm). Die Voreinstellungen entsprachen somit den Eigenschaften des verwendeten DCF-Fluoreszenzfarbstoffes.

### 2.3.3 Bestimmung des prozentualen Anteils vitaler Zellen

Nun wurde der Anteil an Zellen, bei dem es sich um abgestorbenes und nicht relevantes Zellmaterial handelte, von vornherein ausgegrenzt. Dazu wurden die in Kapitel 2.1.5 erläuterten Vorversuche herangezogen, in denen die Zellen mit aufsteigenden  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentrationen behandelt und dadurch schließlich auch abgetötet wurden. Abb. 4 zeigt im Vergleich unbehandelte Zellen und solche, welche über 90 min einer  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentration von 10 mM ausgesetzt waren. Die durch den hohen  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Gehalt aufgetretenen Schäden waren auch lichtmikroskopisch klar sichtbar. Die hier ausgegrenzten Zellen wurden dann als abgestorbene Zelltrümmer behandelt und in der Auswertung nicht berücksichtigt. Weiterhin konnten damit in den späteren Messungen Rückschlüsse auf die Überlebensraten und somit auch auf die Zytotoxizität der einzelnen Behandlungen gezogen werden.

Das Programm lieferte für jede untersuchte Probe einen Datensatz, der exportiert und für die spätere Auswertung verwendet werden konnte. Um den prozentualen Anteil vitaler Zellen zu erhalten, wurden, wie in Abb. 4 dargestellt, die Ergebnisse aus erwähntem Vorversuch verglichen.



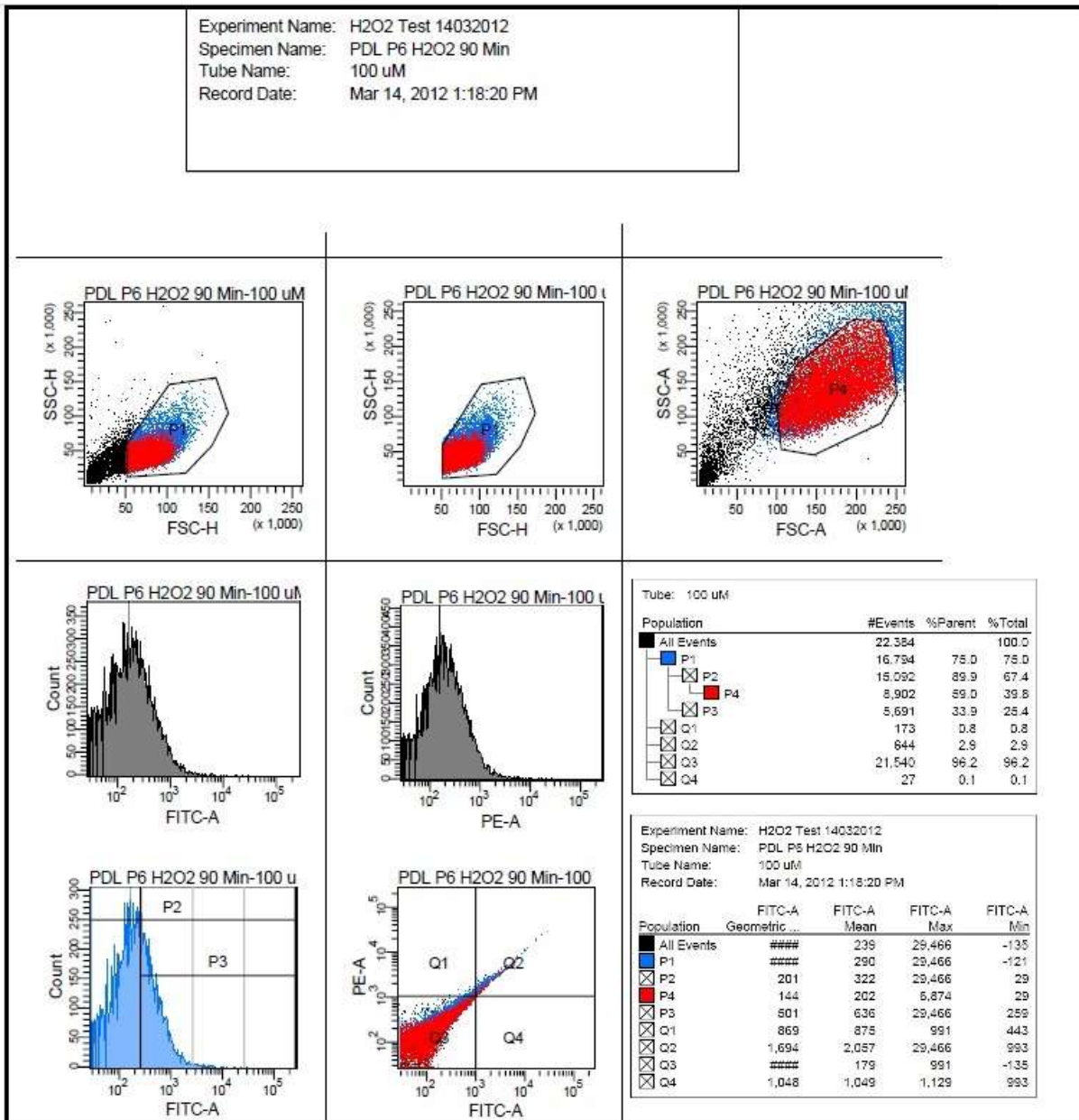
**Abb. 4.** Vergleich unbehandelte PDL-Zellen / PDL-Zellen nach  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Exposition (10 mM) über 90 Minuten.

Man erkennt deutlich eine Verschiebung der Ereignisse in Richtung des Koordinatenursprungs, die Werte für Seitwärts-Streulicht (SSC) und Vorwärtsstreulicht (FSC) sinken. Da diese Auskunft über Zellkomplexität und -größe geben, handelt es sich also bei den schwarzgefärbten Ereignissen um apoptotische Zellen und Zelltrümmer. Ausgehend von den Versuchen wurde

nun der P1-Bereich festgesetzt, in dem die späteren Messungen vorgenommen werden sollten. Der Anteil an P1-Ereignissen in Relation zur Gesamtzahl lieferte somit einen Anhaltspunkt für die Zellüberlebensrate nach Behandlung. Im gezeigten Beispiel waren dies bei der Konzentration 10 mM (Abb. 4, rechter Graph) 1827 P1-Ereignisse im Vergleich zu insgesamt 20471 registrierten Messungen, was einer Überlebensrate von 8,9% entsprach. Da solche Werte allerdings nicht absolut gesehen werden können, wurden immer unbehandelte Vergleichsproben mituntersucht, so dass stets relative Änderungen ermittelt werden konnten. Für die anschließenden Messungen zur Detektion reaktiver Sauerstoffspezies wurde festgelegt, dass die Messung nach 10000 Ereignissen im P1-Bereich abgeschlossen war.

#### 2.3.4 Quantifizierung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS)

Es wurde die Fluoreszenzaktivität der untersuchten Zellproben gemessen. Da diese proportional zur Anzahl gebundener DCF-Farbstoffmoleküle war, konnten daraus direkte Rückschlüsse auf die Konzentration reaktiver Sauerstoffspezies gezogen werden, an die der Farbstoff spezifisch band. Die im FITC-Kanal gemessenen Werte der behandelten Zellen mussten also mit denen der unbehandelten Kontrollproben verglichen werden und man erhielt den relativen Anstieg der ROS-Konzentration. Dabei war voreingestellt, dass das Programm das geometrische Mittel dieser Werte ausgibt (Abb. 5).



**Abb. 5.** Exemplarisches Datenblatt einer FACS-Messung.

Der dargestellte Bereich P2 stellt hierbei die Fluoreszenz-Verteilung der untersuchten Ereignisse im Anteil der vitalen Zellen (P1) dar. In diesem Fall entspricht das geometrische Mittel der Fluoreszenzwerte dem Wert 201. Er konnte anschließend mit im selben Versuchsdurchlauf ausgewerteten Kontrollproben verglichen werden. Es war dabei von großer Bedeutung, dass für jeden gemessenen Probenblock eigene Referenzen angelegt wurden. Die Fluoreszenzwerte an sich konnten nur in Relation zu diesen Kontrollen verglichen werden, eine quantitative Analyse war nicht möglich.

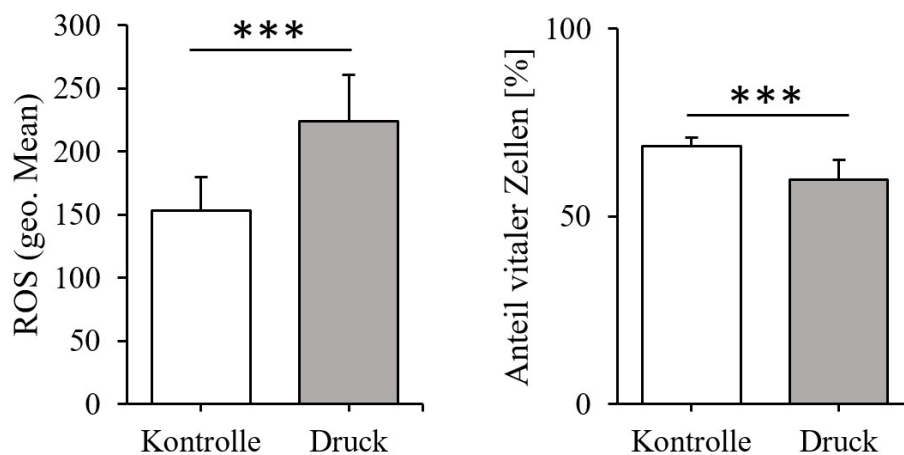
## 2.4 Statistische Auswertung

Die erhaltenen Werte wurden mit Hilfe des Programms Microsoft Excel ausgewertet und anschließend in Diagrammform aufbereitet. Die Überprüfung der erhaltenen Ergebnisse hinsichtlich statistischer Signifikanz erfolgte, soweit es hinsichtlich Probenanzahl sinnvoll war, auf Basis des Student's t-Test. Dieser wurde ebenfalls mit Hilfe des genannten Programms Microsoft Excel durchgeführt. Ein statistisch signifikantes Ergebnis lag bei einem Signifikanzniveau von  $p \leq 0,05$  vor.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Einfluss von Druckapplikation auf die Entstehung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) und den Anteil vitaler Zellen

Die Stimulation der PDL-Fibroblasten erfolgte durch mechanische Belastung, die in Form eines Drucks von  $2 \text{ g/cm}^2$  ausgeübt wurde. Diesem waren die PDL-Fibroblasten über einen Zeitraum von 24 h ausgesetzt. Abb. 6 zeigt die dadurch bedingte Erhöhung der ROS-Konzentration. Bezogen auf die unbehandelten Kontrollen, liegt ein Anstieg des geometrischen Mittelwerts von 46,16% vor. Mit einem p-Wert unter 0,001 ist dieses Ergebnis als statistisch signifikant einzustufen. Dasselbe gilt für die Entwicklung des Anteils an vitalen Zellen. Hier kam es zu einer Abnahme von 9,02% ( $p < 0,001$ ).

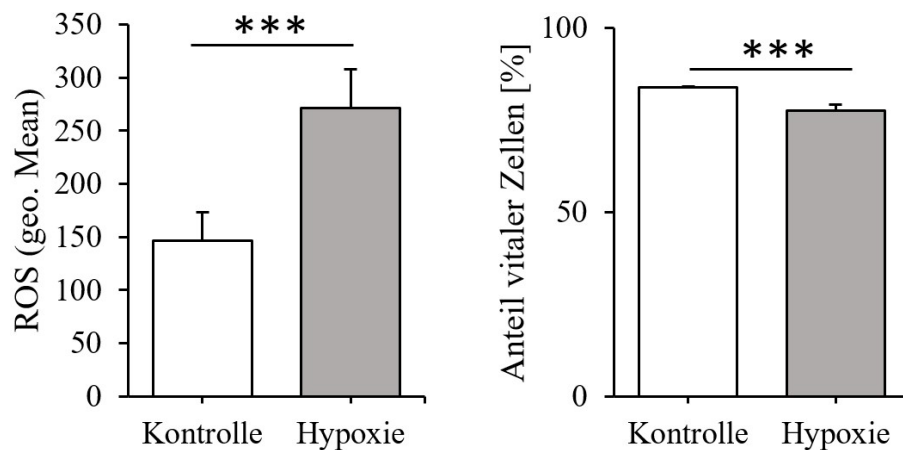


**Abb. 6.** Entstehung von ROS und Zellüberlebensrate von PDL-Fibroblasten nach Stimulation mit Druck ( $2 \text{ g/cm}^2$ ) über einen Zeitraum von 24 h. Fluoreszenzwerte und Überlebensraten sind als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung angegeben. Die Probenzahl für Kontroll- und Testgruppe betrug jeweils  $n=9$ . Statistik: ungepaarter Student's t-Test.  $***p \leq 0,001$ .

#### 3.2 Einfluss von Hypoxie auf die Entstehung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) und den Anteil vitaler PDL-Fibroblasten

Mit Hilfe des GasPak-EZ Beutelsystems (BD) wurden hypoxische Bedingungen geschaffen, denen die PDL-Fibroblasten für 48 h ausgesetzt wurden. Es fand eine erhöhte Bildung von ROS

und damit verbunden eine Zunahme der Fluoreszenz statt (Abb. 7). Die Steigerung beträgt, bezogen auf die Kontroll-Proben, 84,84%. Mit einem p-Wert unter 0,001 liegt ein statistisch signifikantes Ergebnis vor. Hinsichtlich des Anteils an vitalen Zellen kam es bei den behandelten Proben zu einem leichten Abfall im Vergleich zu den Kontrollen. Dieser beträgt 6,27% und weist mit einem p-Wert  $< 0,001$  ebenfalls hohe statistische Signifikanz auf.

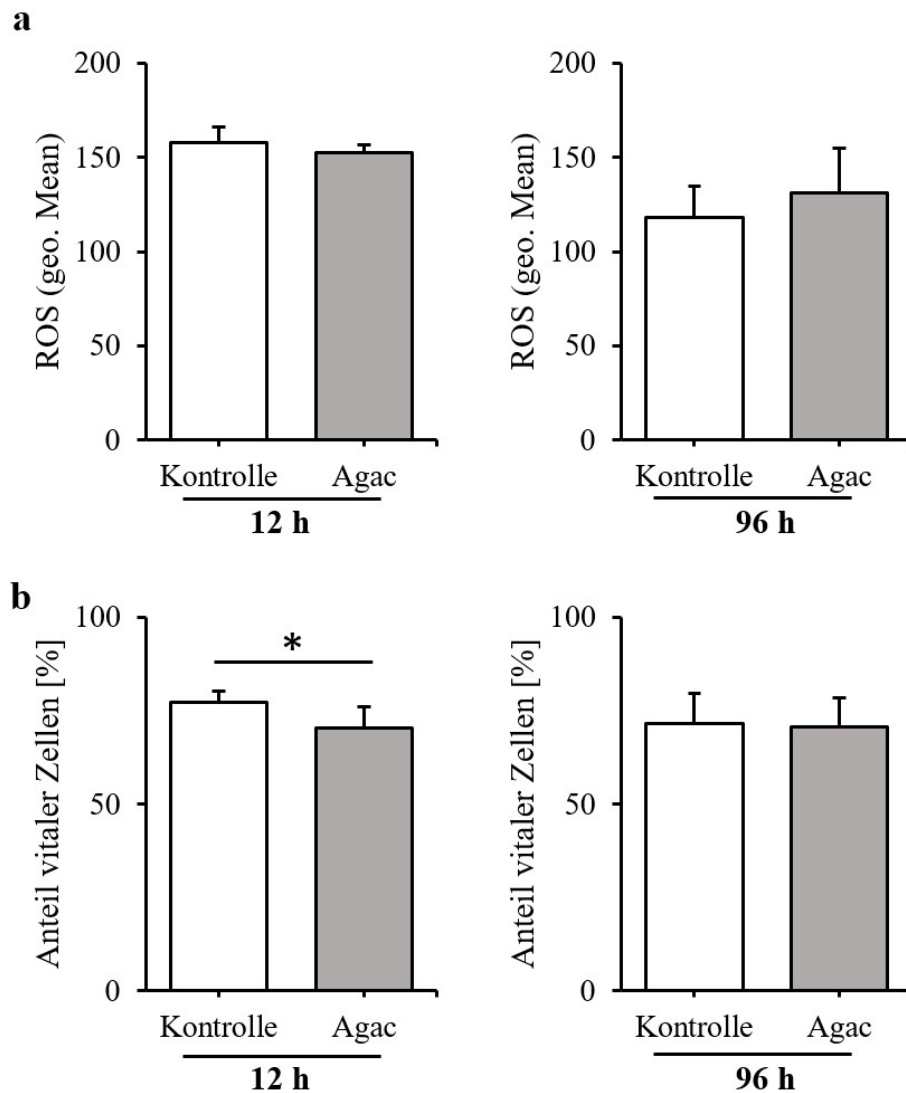


**Abb. 7.** Entstehung von ROS und Zellüberlebensrate von PDL-Fibroblasten nach Stimulation durch Hypoxie über einen Zeitraum von 48 h. Fluoreszenzwerte und Überlebensraten sind als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung angegeben. Die Probenzahl für Kontroll- und Testgruppe betrug jeweils  $n=6$ . Statistik: ungepaarter Student's t-Test.  $***p \leq 0,001$ .

### 3.3 Einfluss von *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* auf die Entstehung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) und den Anteil vitaler Zellen

Untersucht wurde die Entwicklung der ROS-Bildung und der Anteil vitaler Zellen in Folge einer Stimulation der PDL-Fibroblasten durch *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Agac, 10%) über 12 h und 96 h. Abb. 8 zeigt die Ergebnisse im Detail. Es war kein signifikanter Anstieg der ROS-Bildung feststellbar. Mit Blick auf den Anteil vitaler PDL-Fibroblasten findet man einen statistisch signifikanten Abfall vitaler Zellen nach Inkubation in Bakterienlysat für 12 h (Abb. 8b).

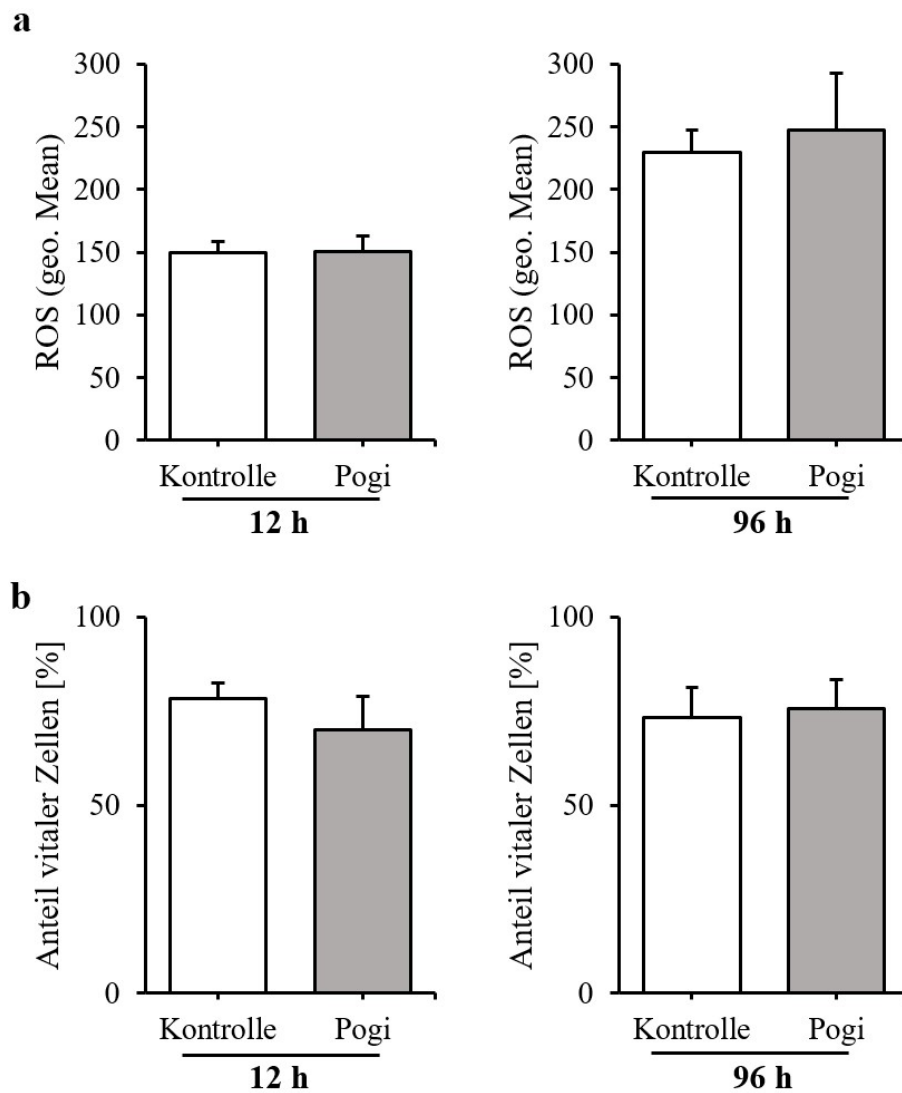
Nach Kultivierung der Zellen in 10-prozentiger *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*-Lösung über eine Dauer von 96 h erhielt man das in Abb. 8 dargestellte Ergebnis. Es zeigt sich im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle kein Unterschied in der ROS-Bildung oder dem Anteil vitaler Zellen.



**Abb. 8.** ROS-Bildung (a) und prozentualer Anteil vitaler Zellen (b) 12 h bzw. 96 h nach Stimulation mit Bakterienlysat von *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Agac, 10%). Fluoreszenzwerte und Überlebensraten sind als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung angegeben. Die Probenzahl für Kontroll- und Testgruppe betrug jeweils n=6. Statistik: ungepaarter Student's t-Test. \* $p \leq 0,05$ .

### 3.4 Einfluss von *Porphyromonas gingivalis* auf die Entstehung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) und den Anteil vitaler PDL-Fibroblasten. Rolle von N-Acetylcystein.

Die Messung der ROS-Bildung und die Bestimmung des prozentualen Anteils vitaler Zellen erfolgte auch mit Bakterienlysat von *Porphyromonas gingivalis* (Pogi) nach 12 h und 96 h Stimulation.

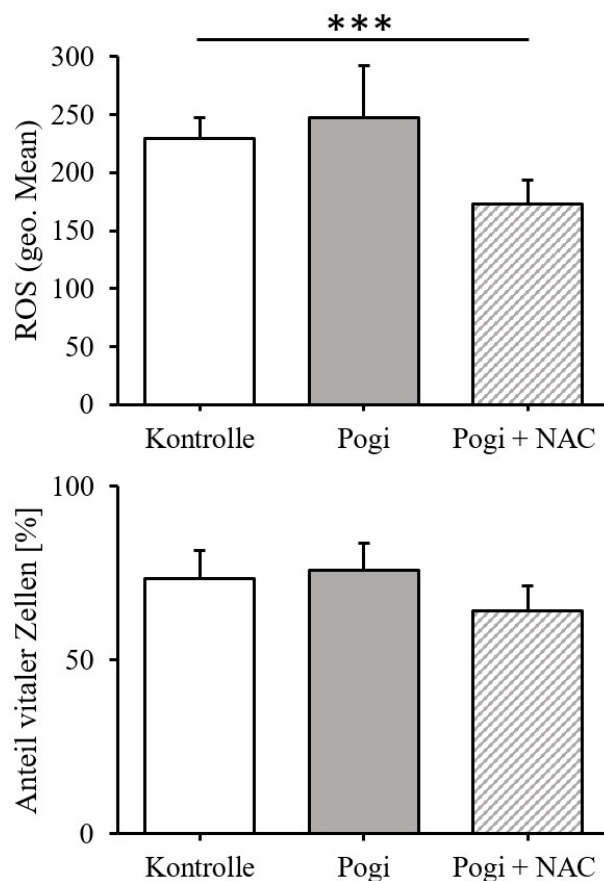


**Abb. 9.** ROS-Bildung (a) und prozentualer Anteil vitaler Zellen (b) 12 h bzw. 96 h nach Stimulation mit Bakterienlysat von *Porphyromonas gingivalis* (Pogi, 10 %). Daten sind als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung angegeben. Die Probenzahl für Kontroll- und Testgruppe betrug jeweils  $n=6$ . Statistik: ungepaarter Student's t-Test.

Abb. 9 stellt die in Folge der Produktion von ROS durch die stimulierten PDL-Fibroblasten veränderte Fluoreszenzintensität 12 h nach Behandlung mit Bakterienlysat dar. Es ist keine signifikante Erhöhung der Fluoreszenz feststellbar, welche auf eine gesteigerte ROS-Bildung durch die PDL-Fibroblasten zurückzuführen wäre. Im Vergleich zur unbehandelten Kontrollprobe stiegen die ROS lediglich um 0,34% an. Der prozentuale Anteil vitaler Zellen verringerte sich nicht signifikant um 8,25% im Vergleich zu den Kontrollen (Abb. 9a).

Auch nach 96 h Stimulation mit Bakterienlysat von *Porphyromonas gingivalis* zeigte sich eine um 8,07% leicht erhöhte Freisetzung von ROS in den PDL-Fibroblasten im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 9a). Der Anstieg ist allerdings mit einem p-Wert von  $p = 0,222$  statistisch nicht signifikant. Hinsichtlich der Zellüberlebensrate gab es auch nach 96 h Stimulation keine auffälligen und statistisch signifikanten Veränderungen (Abb. 9b). Der Anteil an vitalen Zellen stieg minimal um 2,4% an. Der p-Wert betrug dabei  $p = 0,609$ .

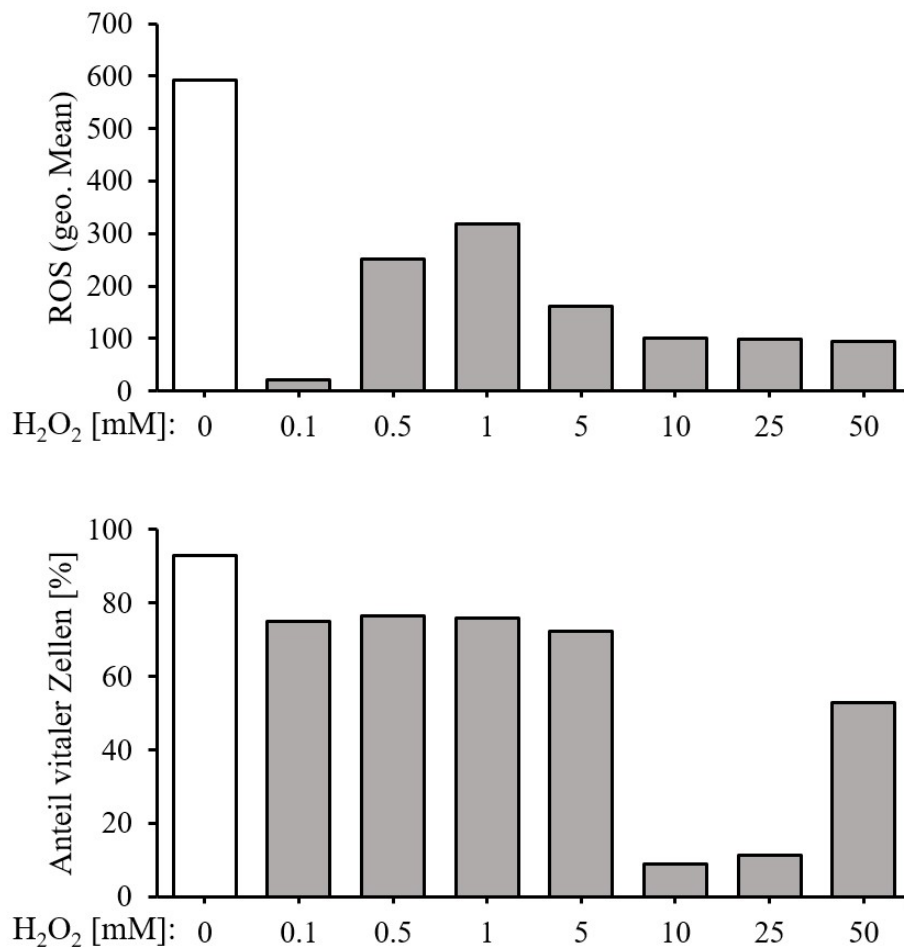
Zusätzlich wurde hier eine Stimulation mittels einer Kombination aus *Porphyromonas gingivalis* (Pogi; 10%) und N-Acetylcystein (NAC, 20 mM) für 96 h durchgeführt. Abb. 10 zeigt die Ergebnisse der Untersuchung. Bei der Kombination aus *Porphyromonas gingivalis* und N-Acetylcystein zeigte sich ein signifikanter Abfall der ROS-Bildung ( $p = 0,001$ ). Bei der Zellüberlebensrate fand sich ebenfalls ein Rückgang um 9,21%. Dieser wies allerdings keine statistische Signifikanz auf ( $p > 0,05$ ).



**Abb. 10.** ROS-Bildung und Zellüberlebensrate nach Stimulation durch *Porphyromonas gingivalis* (10 %) und durch Pogi+NAC über einen Zeitraum von 96 h. Daten sind als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung angegeben. Die Probenzahl für Kontroll- und Testgruppen betrug jeweils  $n=6$ . Statistik: ungepaarter Student's t-Test. \*\*\* $p \leq 0,001$ .

### 3.5 Einfluss von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> auf die Entstehung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), den Anteil vitaler Zellen und die Expression von proinflammatorischen Genen

In einem Vorversuch wurden die PDL-Fibroblasten einer Reihe von unterschiedlichen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentrationen ausgesetzt. Nach 60 Minuten wurden lichtmikroskopisch erste massive Zellschäden festgestellt und die Messung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) mittels FACS durchgeführt. Die Gesamtexpositionszeit betrug inklusive der Fluoreszenzfärbung 90 Minuten.

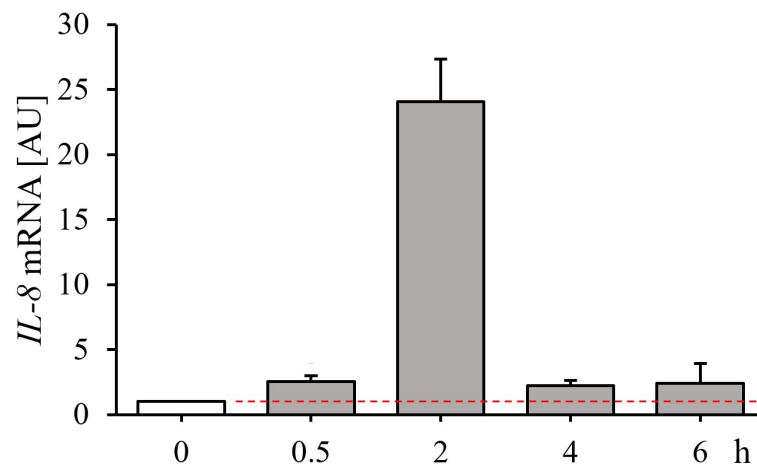


**Abb. 11.** Messung der Fluoreszenzintensität als Nachweis für ROS und Bestimmung des prozentualen Anteils vitaler Zellen nach Stimulation durch verschiedene H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentrationen über 90 min. Die Probenzahl für Kontroll- und Testgruppen betrug jeweils n=1.

Dabei konnte sowohl die Fluoreszenzaktivität der Proben verglichen als auch die Zellüberlebensrate eingeschätzt werden (Abb. 11). Hinsichtlich Fluoreszenz zeigte sich innerhalb der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Proben eine Zunahme der Intensität bis zu einer Konzentration von 1 mM, anschließend fiel diese stark ab und stagnierte.

Ein vergleichbares Bild zeigte sich beim Anteil der vitalen Zellen. Hier lagen die Werte für Konzentrationen bis 5 mM innerhalb der ersten 90 min auf einem vergleichbaren Niveau, wenn auch niedriger als bei der Kontrollprobe. Ab dem Konzentrationswert 10 mM kam es zu einem massiven Rückgang der Überlebensrate (Abb. 11). Mit Hilfe des Versuchs konnten erste Erkenntnisse hinsichtlich des Zellverhaltens gewonnen werden.

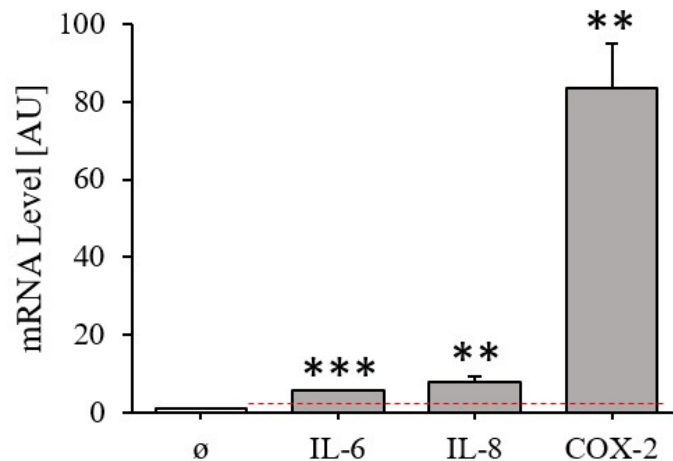
Für die folgenden Messungen wurde auf Grund der längeren Behandlungszeiten von mehreren Stunden eine  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentration von nur 0,1 mM verwendet. Dadurch sollte vermieden werden, dass es zu übermäßigen Schäden innerhalb der Zellpopulationen kommt. Da das Experiment für diesen Vorversuch nur einmal durchgeführt wurde, konnten höchstens erste Tendenzen abgeschätzt werden. Eine statistische Aussage war dabei nicht möglich.



**Abb. 12.** Relative Genexpression von *IL-8* nach Stimulation durch  $\text{H}_2\text{O}_2$  (0,1 mM) über verschiedene Zeiträume (0,5 h, 2 h, 4 h, 6 h), bezogen auf die Kontrollgruppe (entspricht einer Expression von 1). Relative Genexpressionswerte sind als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung angegeben. Die Anzahl der jeweils untersuchten Proben betrug  $n = 2$ . AU=arbiträre Einheiten.

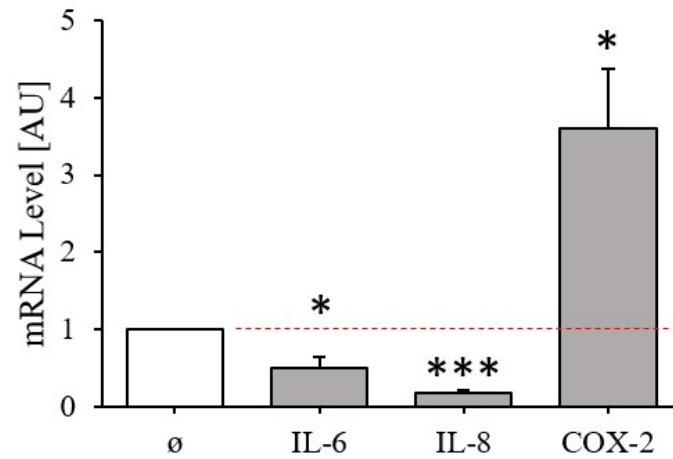
Die PDL-Fibroblasten wurden durch Wasserstoffperoxid in einer Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  über unterschiedliche Zeiträume stimuliert. Die Zeiträume betragen 30 min, 2 h, 4 h und 6 h. Anschließend wurde die Expression des Gens für *Interleukin-8* (*IL-8*) gemessen. In Abb. 12 ist die relative Genexpression dargestellt, welche auf eine unbehandelte Kontrollgruppe bezogen wurde. Es fand in allen Zeiträumen eine Hochregulierung der Genexpression statt. Am höchsten fiel diese nach 2 h aus. Hier erreichte die Expression den 24fachen Wert der Kontrollgruppe. Auf Grund der geringen Fallzahl wurden keine statistischen Berechnungen durchgeführt.

Es erfolgte eine zweite Messung, bei der ein Zeitraum von 2 h für die Stimulation gewählt wurde, welche abermals mittels  $H_2O_2$  (0,1 mM) stattfand. Untersucht wurde dieses Mal zusätzlich die Expression weiterer Gene. Wie in Abb. 13 dargestellt, kam es bei den gezeigten Genen (*Interleukin-6*, *Interleukin-8*, *Cyclooxygenase-2*) stets zu einer statistisch signifikanten Hochregulierung der jeweiligen Genexpressionswerte ( $p < 0,05$ ). Diese wurden wieder in Relation zur unbehandelten Kontrollprobe angegeben.



**Abb. 13.** Relative Genexpression von *IL-6*, *IL-8* und *COX-2* nach Stimulation durch  $H_2O_2$  (100  $\mu$ M) über 2 h, bezogen auf die Kontrollgruppe (entspricht einer Expression von 1). Relative Genexpressionswerte sind als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung angegeben. Die Anzahl der jeweils untersuchten Proben betrug  $n = 3$ . Statistik: ungepaarter Student's t-Test. \*\* $p \leq 0,01$ . \*\*\* $p \leq 0,001$ . AU=arbiträre Einheiten.

In einem weiteren Teil sollte erneut die Rolle des Antioxidantiums NAC geprüft werden. Die Stimulation erfolgte dabei durch eine Kombination aus  $H_2O_2$  (0,1 mM) und NAC (20 mM) über einen Zeitraum von 24 h. Untersucht wurde erneut die Expression der Gene *IL-6*, *IL-8* und *COX-2*. Bei den Genen für *IL-6* und *IL-8* zeigte sich ein signifikanter ( $p < 0,05$ ) Abfall der relativen Genexpression. Im Falle von *COX-2* kam es, bezogen auf die Kontrollprobe zu einer Hochregulation auf einen Faktor 3,6. Auch dieser Unterschied wies statistische Signifikanz auf ( $p < 0,05$ ). Dargestellt ist dies in Abb. 14.



**Abb. 14.** Relative Genexpression von *IL-6*, *IL-8* und *COX-2* nach Stimulation durch  $H_2O_2$  (0,1 mM) + NAC (20 mM) über 24 h, bezogen auf die Kontrollgruppe (entspricht einer Expression von 1). Relative Genexpressionswerte sind als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung angegeben. Die Anzahl der jeweils untersuchten Proben betrug  $n = 3$ . Statistik: ungepaarter Student's t-Test. \* $p \leq 0,05$ , \*\*\* $p \leq 0,001$ . AU=arbiträre Einheiten.

## 4 Diskussion

### 4.1 Zielsetzung und Kurzüberblick über die Ergebnisse

Wie einleitend bereits erwähnt, wird sich die Zahnmedizin, in Zukunft einem Anstieg von behandlungsbedürftigen Parodontitis-Fällen gegenüber sehen, begründet durch den demographischen Wandel in der Bevölkerung (Schwendicke et al., 2018; Tonetti et al., 2017). Ein solcher Wandel hat auch eine höhere Anzahl an erwachsenen Patienten in der Kieferorthopädie, teilweise mit eben dieser Komorbidität parodontaler Schäden zur Folge. Auch wenn Kombinationsbehandlungen mittlerweile seit Jahrzehnten untersucht werden und etabliert sind (Boyd et al., 1989; Eliasson et al., 1982), so stellen sie die Behandler und auch die Patienten immer noch vor komplexe Aufgaben. Gerade wegen der Erkenntnisse aus der aktuellen Mundgesundheitsstudie (Jordan et al., 2016) ist die Untersuchung der hierbei auftretenden Vorgänge auch auf molekularer Ebene heute wieder aktueller denn je, um zum Beispiel das Risiko von Wurzelresorptionen bei solchen Patientengruppen zu verringern (Kirschneck et al., 2017a).

Eine wesentliche Rolle bei entzündlichen Vorgängen der Parodontitis zum einen, aber auch bei den Knochenumbauprozessen während der Zahnbewegung zum anderen, wird heute den reaktiven Sauerstoffspezies zugeschrieben. In der Vergangenheit konnten zahlreiche Studien die Bedeutung von oxidativem Stress vor allem in der Pathogenese der Parodontitis belegen (D'Aiuto et al., 2010; Chapple and Matthews, 2007). Für den kieferorthopädischen Bereich sind die Veröffentlichungen zu diesem Thema derzeit noch begrenzt. Dasselbe gilt für die eingangs genannten Kombinationsfälle aus kieferorthopädischem Behandlungswunsch und parodontaler Erkrankung. Die vorliegende Arbeit sollte daher dazu beitragen, die unter diesen Umständen auftretenden und immer noch nicht vollständig aufgeklärten Signalkaskaden im Knochenstoffwechsel weiter zu ergründen. Der Schwerpunkt lag dabei auf der Rolle des oxidativen Stresses und der kombinierten Betrachtung von Kieferorthopädie und Parodontologie.

Die durchgeführten *in-vitro*-Untersuchungen beschäftigten sich im ersten Teil mit den Auswirkungen verschiedener Faktoren auf PDL-Fibroblasten, wobei deren Reaktion in Form von ROS-Bildung mittels fluoreszenzaktivierter Durchflusszytometrie gemessen wurde. Die Stimulation der Fibroblasten geschah einerseits durch mechanischen Druck und Hypoxie, andererseits durch Lysate der parodontalpathogenen Bakterienspezies *Porphyromonas gingivalis* und

*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. Es wurden also Milieus simuliert, die bei kieferorthopädischer Zahnbewegung (Niklas et al., 2013; Henneman et al., 2008) und Parodontitis (Slots and Ting, 1999) vorherrschen. Dabei konnten vor allem bei Druck und Hypoxie signifikante Steigerungen hinsichtlich der ROS-Bildung nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu wurden bei den Untersuchungen mit Bakterienlysaten allenfalls Tendenzen gefunden, allerdings waren die Änderungen nicht statistisch signifikant. Ein ähnliches Bild zeigte sich bei der Betrachtung der Zellüberlebensrate nach den jeweiligen Arten der Stimulation. Sie war bei Hypoxie und Druck verringert, Bakterienlysate bewirkten auch hier keine signifikanten Abweichungen. Zusätzlich sollten in diesem Teil die Auswirkungen des Antioxidantiums N-Acetylcystein (NAC) bei gleichzeitiger Stimulation durch *P. gingivalis* ergründet werden. Es zeigte sich ein signifikanter Abfall des ROS-Levels nach Verwendung der Substanz.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde durch den Einsatz von  $H_2O_2$  ein Zustand oxidativen Stresses im Zellverbund künstlich geschaffen. Das Molekül stellt einen Hauptvertreter der reaktiven Sauerstoffspezies dar (Sies, 2014). Im Anschluss wurde die Expression verschiedener proinflammatorischer Gene mittels RT-qPCR gemessen. Es konnten signifikante Steigerungen in der Expression der Gene für IL-6, IL-8 und COX-2 nachgewiesen werden, welche sowohl in der Zahnbewegung als auch im Verlauf der Parodontitis eine bedeutsame Rolle spielen (Meikle, 2006; Noguchi and Ishikawa, 2007). Wieder wurden hier die Auswirkungen von NAC nachgeprüft. Es fanden sich im Vergleich zu den zuvor erhaltenen Ergebnissen deutlich verringerte Expressionswerte.

#### **4.2 Einfluss der untersuchten Stimuli auf die ROS-Bildung und Zellvitalität**

Die zu untersuchenden Fibroblasten wurden zuerst über einen Zeitraum von 24 h einem Druck von  $2 \text{ g/cm}^2$  ausgesetzt. Es sollte eine wesentliche Komponente der kieferorthopädischen Zahnbewegung simuliert werden, bei der durch das Anlegen genau definierter Kräfte Umbau- und entzündungsähnliche Prozesse im Zahnhalteapparat in Gang gesetzt werden (Meikle, 2006; Reitan, 1960). Nach aktuellem Forschungsstand wird bei diesen Vorgängen zwischen zwei Zonen unterschieden. Solchen, in denen bei mechanischer Belastung des Zahnes eine Zugbelastung auf das umliegende PDL ausgeübt wird und Bereichen, in denen eine Druckbelastung entsteht. Die Ausübung von Druck führt im Kiefer letztlich zu einem Knochenabbau in den betroffenen Arealen. Bei der komplexen Antwort auf die mechanischen Stimuli nehmen die PDL-Fibroblasten eine wichtige Stellung ein, sowohl als Rezeptoren als auch in der Verarbeitung der

Reize (Lekic and McCulloch, 1996; Basdra and Komposch, 1997; Sokos et al., 2015). In Folge der Druckbelastung konnte eine signifikant erhöhte Bildung reaktiver Sauerstoffspezies gemessen werden. Es schien also, bedingt durch die eingesetzten Kräfte, ein Zustand von oxidativem Stress vorzuherrschen. Generell kommt es nach mechanischen Belastungen der Zähne im angrenzenden parodontalen Ligament zu einer Vielzahl von molekularen Reaktionen, bei denen die Rolle von ROS als Transmitter aber noch nicht vollständig geklärt ist. In den Untersuchungen zu diesem Thema hat sich besonders der RANKL-OPG-Signalweg als sehr bedeutsam herausgestellt (Sokos et al., 2015). RANKL-Moleküle werden von Osteoblasten sezerniert und binden an den RANK-Rezeptor. Sie beeinflussen hierdurch die Osteoklastenaktivität und -proliferation. RANKL steigert diese, wohingegen OPG indirekt inhibierend wirkt. Es bindet RANKL und verhindert dadurch wiederum die Aktivierung der RANK-Rezeptoren. Kommt es nun zu einer mechanischen Belastung der PDL-Zellen, verschiebt sich das RANKL/OPG Gleichgewicht zu Gunsten von RANKL, die Aktivität der Osteoklasten steigt und es kommt zum Knochenabbau (Yamaguchi, 2009; Boyle et al., 2003). Die Steuerung des Verhältnisses zwischen den beiden Molekülen wurde in den letzten Jahren intensiv untersucht und es wurden verschiedene Reaktionskaskaden formuliert. Wichtig erscheint hierbei der  $\text{PGE}_2/\text{COX-2}$  Signalweg. Kanzaki et al. (2002) konnten zeigen, dass mechanische Kräfte eine gesteigerte Expression von COX-2 zur Folge haben, wodurch wiederum die Produktion von  $\text{PGE}_2$  ansteigt. Sie stellten weiterhin fest, dass dies sich stimulierend auf die RANKL-Aktivität auswirkte, was durch weitere Experimente bestätigt wurde (Mayahara et al., 2012). Auch Entzündungsmediatoren und Zytokine beeinflussen den Knochenstoffwechsel, indem sie die Reaktionskaskaden modulieren. Nachgewiesen wurde das für verschiedene Interleukine. IL-1, IL-6, IL-8, welche durch uns ebenfalls untersucht wurden, sowie der Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) scheinen dabei besonders relevant zu sein (Li et al., 2019; Kook et al., 2011). Innerhalb dieser komplexen Reaktionsmechanismen beschäftigte sich die vorliegende Arbeit mit der Rolle der ROS. Sie stehen in enger gegenseitiger Wechselwirkung mit NF- $\kappa$ B und wirken sich somit auf die Osteoklastogenese und den Knochenstoffwechsel aus (Morgan and Liu, 2010; Chapple and Matthews, 2007). Auch Auswirkungen auf den RANKL-Mechanismus konnten bereits gezeigt werden (Lee et al., 2005). Des Weiteren ist bekannt, dass solche Sauerstoffradikale eine wichtige Funktion innerhalb der Entzündungsreaktionen im Körper und somit auch im Vorgang der Zahnbewegung einnehmen, bei der ebenfalls inflammatorische Mediatoren beteiligt sind (Finkel, 1998; Sena and Chandel, 2012). Unsere Untersuchungen fanden bei mechanischer Druckbelastung eine erhöhte ROS-Konzentration und können somit das Bild der reaktiven Sauerstoffspezies als bedeutsamen Teil dieser komplizierten Signalkaskaden weiter festigen.

Begleitend wurde bei den behandelten Zellen eine im Vergleich zu den Referenzproben verringerte Zellüberlebensrate gefunden. Das Ergebnis deckt sich mit den Erkenntnissen von Kanzaki et al. (2002), nach denen es bei zunehmenden Druckkräften zu einer Schädigung der Proben kommt. Dies ist einerseits durch mechanische Überlastung bedingt. Andererseits ist aber auch ein Zusammenhang mit der ROS-Konzentration wahrscheinlich, deren Einfluss unter anderem auf die Apoptoserate innerhalb der Zellkolonie bereits gezeigt werden konnte (Redza-Dutordoir and Averill-Bates, 2016; Kaminsky and Zhivotovsky, 2014).

Neben den mechanischen Belastungen, die bei der Zahnbewegung auf die PDL-Fibroblasten wirken, gibt es mit der Hypoxie einen weiteren wichtigen Stimulus für die ablaufenden Stoffwechselfvorgänge. Bereits 1970 konnten Khouw and Goldhaber zeigen, dass es als Folge von mechanischer Krafteinwirkung auf Zähne in den Druckzonen innerhalb des Parodonts zu Bereichen mit vermindertem Sauerstoffgehalt kommt. Diesen Zustand kann man durch die Kompression der Gefäße und die dadurch verringerte Durchblutung erklären. Weiter fanden sie in jenen wenig durchbluteten Bereichen eine erhöhte Knochenabbaurate. Andere Untersuchungen betrachteten seitdem isoliert die Auswirkung von Sauerstoffarmut auf die Stoffwechselprozesse in den beteiligten Geweben. Sie kamen zu dem Ergebnis, dass sich auch Sauerstoffarmut förderlich auf Osteoklastenaktivität und -proliferationsrate auswirkt. Es wird also, wie durch mechanische Belastung, Knochenabbau begünstigt (Niklas et al., 2013; Tuncay et al., 1994). Hypoxie ist aber nicht nur bei andauernden mechanischen Belastungen der Zähne von Bedeutung. So finden sich auch sauerstoffarme Bereiche als Folge der entzündlichen Prozesse im Rahmen der Parodontitis. Wir konnten zeigen, dass es analog zu den Messungen bei Druckbelastung auch unter hypoxischen Bedingungen zu einem signifikanten Anstieg von oxidativem Stress kommt. Das Ergebnis spricht ebenfalls für die bereits genannte hohe Relevanz der reaktiven Sauerstoffspezies innerhalb der komplexen Reaktionsketten, welche beim Gewebeumbau und auch bei dessen Zerstörung im Rahmen der Parodontitis stattfinden. Betrachtet man den Stoffwechsel der Zellen unter hypoxischen Bedingungen, so ist vor allem der Hypoxie-induzierte Faktor 1 (HIF-1) von großer Bedeutung. Hierbei handelt es sich um einen Komplex aus den Untereinheiten HIF-1 $\alpha$  und HIF-1 $\beta$ . HIF-1 $\alpha$  ist unter normoxischen Bedingungen instabil. Erst bei Hypoxie entsteht der aktive Transkriptionsfaktor HIF-1. Er steuert eine Vielzahl von Reaktionen und Umbauprozessen im Organismus, darunter in den Bereichen Vaskularisierung, Zellproliferation und Apoptose (Gleadle and Ratcliffe, 1998; Semenza, 2000). Neue Untersuchungen zeigten aber auch das enge Zusammenspiel von HIF-1 und TNF- $\alpha$  bei den Abbauprozessen im PDL-Gewebe während Zahnbewegung und bei entzündlichen Zuständen (Ng et al., 2011).

Dabei spielen die von uns gefundenen erhöhten ROS-Konzentrationen ebenfalls eine Rolle, indem sie scheinbar direkt Einfluss auf die HIF-1 Freisetzung während entzündlicher Prozesse nehmen (Movafagh et al., 2015). Unsere Ergebnisse können also die Annahme weiter bestärken, dass ROS einen wesentlichen Schritt in der Signaltransduktion während der Umbauprozesse im PDL darstellen.

Mit Blick auf die Zellüberlebensrate bietet sich ein ähnliches Bild wie bei den Versuchen zur Druckbelastung. Es zeigte sich erneut eine Verringerung. Neben der bereits erwähnten Steuerung durch ROS kommt dabei auch noch der Faktor HIF-1 zum Tragen, der bei der gesteuerten Apoptose von Zellen ebenfalls beteiligt scheint (Piret et al., 2002).

Im Verlauf parodontaler Erkrankungen spielen, neben den veränderten Bedingungen im Gewebe als Folge von Entzündungs- und Immunreaktionen, auch die Pathogene der auslösenden Bakterienspezies eine Rolle. Der Fokus unserer Arbeit lag dabei auf der Untersuchung von Bakterienlysaten der Spezies *P. gingivalis* und *A. actinomycetemcomitans* als Leitkeime der Pathogenese der Parodontitis (van der Weijden et al., 1994). Wir konnten hier allerdings keinen signifikanten Anstieg der ROS-Bildung innerhalb der von uns gewählten Untersuchungsparameter feststellen. So blieb der Wert nach einem Inkubationszeitraum von 12 h relativ konstant, nach 96 h ließen sich geringe Tendenzen eines ROS-Anstiegs erkennen, allerdings wiesen diese keine statistische Signifikanz auf. Hier könnten eventuell höhere Probenzahlen weiter Aufschluss geben. Indirekte Nachweise von ROS nach Stimulation durch bakterielle Lipopolysaccharide fanden bereits statt. Dabei wurden anhand der gesteigerten Genexpression für radikalbildende Enzyme wie die Mangan-Superoxid-Dismutase (Skaleric et al., 2000) und NADPH-Oxidase-4 (Gözl et al., 2014) Belege für eine Zunahme von oxidativem Stress gefunden. Generell ist auch bekannt, dass die verwendeten Bakterienspezies in der Lage sind, die Stoffwechselprozesse während der Parodontitis direkt zu beeinflussen. Studien konnten zeigen, dass *P. gingivalis* bei Osteoblasten und auch Fibroblasten die Produktion von RANKL anregt, die Ausschüttung von OPG verringert und damit insgesamt den Knochenabbau beschleunigt (Kassem et al., 2015; Belibasakis et al., 2007). Auch kommt es als Reaktion auf *P. gingivalis* im Rahmen der Immunantwort zur Freisetzung verschiedener Interleukine. Zu nennen sind vor allem IL-1 $\beta$  und IL-6, welche diesen Reaktionsmechanismus zusätzlich verstärken (Mysak et al., 2014). Ähnliches konnte für *A. actinomycetemcomitans* gezeigt werden. Bodet et al. (2007) fanden heraus, dass diese Parodontalpathogene ebenfalls in der Lage sind, die Gewebszerstörung über

eine Steigerung von AP-1 und NF- $\kappa$ B zu verstärken. Kim et al. (2007) konnten für beide Bakterienspezies zeigen, dass sie die ROS-Bildung und die Expression von IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 und TNF- $\alpha$  erhöhen.

Im Hinblick auf unsere Ergebnisse wären also gegebenenfalls weitere Versuche mit erhöhter Probenzahl notwendig, um hierzu statistisch aussagekräftigere Werte zu erhalten. Es scheint aber zuzutreffen, dass die direkte Wirkung von Bakterienlysaten auf die Zellen, zumindest in unserem Versuchsaufbau, weniger ausgeprägt ist, als dies bei den geänderten Umgebungsparametern Druck und Hypoxie der Fall ist. Dasselbe Bild zeigt sich auch bei der Betrachtung der Zellüberlebensrate, bei der sich größtenteils keine signifikanten Veränderungen ergaben.

### **4.3 Einfluss des Antioxidantiums N-Acetylcystein auf die ROS-Bildung und Zellvitalität**

Die Forschung der letzten Jahre identifizierte oxidativen Stress als einen bedeutenden Faktor in der Entstehung zahlreicher systemischer und entzündlicher Krankheitsbilder. Unter anderem zeigte sich eine Beteiligung an Atherosklerose, Alzheimer, Parkinson, Diabetes mellitus, verschiedenen malignen Tumorerkrankungen und der Zellalterung allgemein (Duracková, 2010). Daher rückten auch antioxidativ wirkende Substanzen in den Blickpunkt, da sie den Verlauf dieser Krankheiten unter Umständen beeinflussen könnten (Valko et al., 2007). Wir untersuchten dazu die Auswirkungen von N-Acetylcystein (NAC) auf die Zellantwort nach Reizung durch Bakterienlysate. Bei NAC handelt es sich um ein Molekül, das über eine Thiolgruppe verfügt, welche leicht oxidiert werden kann. ROS werden durch sie reduziert und dadurch inaktiviert. Bevorzugte ROS sind hierbei das von uns vermessene H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und das Hydroxylradikal. Die antioxidative Funktion wird im Organismus noch dadurch verstärkt, dass NAC in der Leber verstoffwechselt wird und das dabei freiwerdende Cystein vom Körper anschließend für die Produktion von Glutathion, dem wichtigsten körpereigenen Antioxidans, verwendet werden kann (Gillissen et al., 1997). Die Wirksamkeit der Substanz wurde in zahlreichen *in-vitro*- und *in-vivo*-Untersuchungen belegt und sie findet bereits Anwendung in der Prophylaxe von Lebernekrosen nach Paracetamol-Intoxikation (Bonanomi and Gazzaniga, 1980). Eine adjuvante Verwendung bei der Therapie von COPD (Chronisch obstruktive Lungenerkrankung) wurde zuletzt kontrovers diskutiert (Decramer et al., 2005). In unseren Untersuchungen führte der Einsatz von NAC zu einer signifikanten Verringerung des oxidativen Stresses bei zuvor mit P.

gingivalis stimulierten PDL-Fibroblasten. Das deckt sich mit den Erkenntnissen, die die Forschung in den letzten Jahren zu diesem Thema gewonnen hat. Nach diesen wirkt sich eine adjuvante NAC-Gabe positiv aus, die entzündlichen Vorgänge werden abgemildert (Kim et al., 2007). Auch eine kürzlich veröffentlichte klinische Studie zu dem Thema lieferte erste vielversprechende Ergebnisse, nach denen die Einnahme von NAC in Verbindung mit chirurgischer Parodontitis-Therapie eine signifikante Verbesserung der Ergebnisse bewirkt (Alkadasi et al., 2017).

#### **4.4 ROS-Produktion und Zellvitalität nach Stimulation durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und Einfluss auf die Expression proinflammatorischer Gene**

Im abschließenden Teil der Arbeit sollte die Beteiligung von reaktiven Sauerstoffspezies, in unserem Fall H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, innerhalb der komplexen Signalkaskaden, die zur Expression verschiedener proinflammatorischer Gene führen, überprüft werden. Hierfür wurden die Zellen in Vorversuchen unterschiedlichen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentrationen ausgesetzt. Es erfolgten lichtmikroskopische Kontrollen, die nach 60 Minuten erste deutliche Schäden bei den höchsten Konzentrationen zeigten. Darauf begannen die Vorbereitungen für die FACS-Messung. Sie zeigte, dass es bei den Zellen ab einer H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentration von 5 mM zu einem starken Abfall der Überlebensrate gekommen war. Der intrazelluläre ROS-Wert fiel ab dem Wert für 1 mM deutlich ab, nachdem er zuvor angestiegen war. Bei den Werten kann allerdings auf Grund der zu geringen Probenzahl keine statistische Aussage getroffen werden. Auch lieferte die Messung für die unbehandelten Kontrollen einen im Vergleich zu den anderen Versuchen ungewöhnlich hohen Wert und erschien nicht valide. Die Untersuchungen dienten aber hauptsächlich dazu, eine geeignete Wasserstoffperoxid-Konzentration zu finden, welche die Zellen in unserem Versuchsaufbau über die Untersuchungszeiträume nicht übermäßig schädigen sollte. Da vordergründig die Zellvitalität relevant war, wurde der Fragestellung nicht weiter nachgegangen. Weil für die geplanten Messungen längere Expositionszeiträume angesetzt werden sollten, wurde eine Konzentration von 0,1 mM als am besten verträglich veranschlagt.

Die Beteiligung von ROS innerhalb der Vorgänge bei Zahnbewegung und Parodontitis konnte im ersten Teil der Arbeit bereits gezeigt werden. Nun sollte die genaue Funktion von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> innerhalb der sehr komplexen Reaktionsabläufe genauer ergründet werden. Verschiedene Autoren beschreiben, wie bereits erwähnt, eine erhöhte Freisetzung proinflammatorischer Zytokine durch PDL-Zellen als Antwort auf bakterielle Reize (Kim et al., 2007; Mysak et al., 2014).

Ebendiese führen über den beschriebenen RANKL-OPG-Signalweg zu gesteigerter Osteoklastenaktivität. Solche Ergebnisse finden sich auch in der Literatur zur Zahnbewegung wieder. Laut ihr haben mechanische Belastung und Hypoxie vergleichbare Auswirkungen auf die PDL-Fibroblasten. Es fanden sich bei den Autoren ebenso gesteigerte Konzentrationen von IL-1, IL-6, IL-8 und TNF- $\alpha$  (Li et al., 2019; Kook et al., 2011). Eine gesteigerte RANKL-Freisetzung war wiederum die Folge. Auch die erhöhte Aktivität im PGE<sub>2</sub>/COX-2 Signalweg sollte mit betrachtet werden (Schröder et al., 2018; Kanzaki et al., 2002). Aus diesen Gründen wählten wir für unsere Untersuchungen die Gene für IL-6, IL-8 und COX-2 aus und die Messungen erfolgten nach einer H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Exposition über 2 Stunden. Der Zeitraum hatte sich in einem weiteren Vorversuch als der aussagekräftigste ergeben. Die erhaltenen Ergebnisse zeigten für alle untersuchten Gene einen signifikanten Anstieg der Expression im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollproben. Das unterstützt die Annahme, dass ROS in der Signalweiterleitung durch die Zellen eine bedeutende Rolle spielen. So zeigten die PDL-Fibroblasten als Antwort auf den durch uns geschaffenen oxidativen Stress dieselben Reaktionen, wie dies nach Reizung durch mechanische und bakterielle Stimuli passieren würde.

Für weitere Untersuchungen wurden die PDL-Fibroblasten zusätzlich erneut mit NAC behandelt. Es ergab sich nicht nur der zu erwartende Rückgang des oxidativen Stresses und dadurch einhergehend eine Verringerung der Zytokinproduktion, wie in der Literatur bereits vielfach beschrieben wurde (Kim et al., 2007; Toker et al., 2009; Chae et al., 2011). Die Werte der mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und NAC stimulierten Proben unterschritten sogar jene der unbehandelten Kontrollen. Ein solches Ergebnis führt zu der Schlussfolgerung, dass reaktive Sauerstoffspezies, besonders H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, auch im nicht angeregten Zustand in den Zellen eine zentrale Funktion als Mediator einnehmen. Zusätzlich befindet sich stets eine Grundkonzentration an Zytokinen und Entzündungsmediatoren in den Zellen, auch wenn diese keinen äußeren Reizen ausgesetzt sind. Umgekehrt konnte gezeigt und bestätigt werden, dass NAC in der Lage ist, die Reizantwort sowohl auf bakterielle Pathogene im Verlauf einer Parodontitis als auch auf mechanische Belastung zu beeinflussen. Ein Grund hierfür ist, dass es nicht direkt die Antwort auf die genutzten Reize moduliert, sondern in die durch ebendiese Reize bedingten ROS-abhängigen Signalkaskaden eingreift. Die gefundenen Ergebnisse decken sich dabei mit der Literatur. Sie beschreibt zum einen, wie bereits erwähnt, eine Verringerung des Gewebeverlusts bei Parodontitis-Patienten nach adjuvanter Einnahme von NAC (Kim et al., 2007; Alkadasi et al., 2017). Zum anderen

wurde bereits festgestellt, dass durch Gabe von NAC und anderen Antioxidantien die Geschwindigkeit der Zahnbewegung im Rahmen kieferorthopädischer Behandlungen reduziert werden kann (Chae et al., 2011).

#### 4.5 Methodik und Limitationen

Für die einzelnen Versuche wurde in der Arbeit soweit möglich versucht, auf bereits etablierte Verfahren zurückzugreifen.

Zuerst ist hier die Gewinnung der PDL-Fibroblasten zu erwähnen. Bei vorangegangenen Arbeiten und Untersuchungen innerhalb der kieferorthopädischen Abteilung des Universitätsklinikums Regensburg erwiesen sich Weisheitszähne jüngerer Patienten (14 bis 22 Jahre) generell als Ausgangsmaterial am geeignetsten. Sie zeigten sich anderen Proben hinsichtlich der späteren Proliferation überlegen, welche zum Beispiel bei Zähnen von älteren Patienten weniger ausgeprägt war. Zusätzlich fanden sich im Vergleich weniger Kontaminationen bei der späteren Kultivierung. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen auch andere Untersuchungen (Gölz et al., 2014; Yamaguchi, 2009), weshalb sich hier die Verwendung von Zähnen junger Patienten etabliert hat.

Der im Rahmen der Druckbelastung verwendete Versuchsaufbau wurde ebenfalls bereits mehrfach in der Literatur beschrieben und hat sich als *in-vitro*-Methodik zur Simulation der Belastungen, die beim Anlegen kieferorthopädischer Apparaturen auftreten, bewährt (Kirschneck et al., 2019; Kanzaki et al., 2002; Römer et al., 2013). Kanzaki et al. sind die Urheber des eingesetzten Versuchsaufbaus. Sie stellten fest, dass es bei der Verwendung von höheren Druckkräften ab  $4 \text{ g/cm}^2$  zu einem verstärkten Auftreten von Zellschäden kommt. Für kleinere Kräfte fanden sie hingegen nur wenig aussagekräftige Resultate, weshalb in der vorliegenden Arbeit die beschriebenen  $2 \text{ g/cm}^2$  verwendet wurden. Auch bei den Versuchsaufbauten zu Hypoxie und Bakterienlysaten handelt es sich um verbreitete und erprobte Verfahren und Systeme, die seit vielen Jahren in der Diagnostik und bei der Kultivierung und Behandlung von Zell- und Bakterienproben genutzt werden. Die Vermessung der stimulierten Proben erfolgte mittels FACS. Dieses äußerst vielfältige Messverfahren ist in der modernen medizinischen und zellbiologischen Forschung heute Routine und bietet eine Vielzahl an Anwendungsmöglichkeiten (Givan, 2011; Adan et al., 2017). Dass es auch, wie in der vorliegenden Arbeit, für die Detektion von ROS verwendet werden kann, belegten in der Vergangenheit mehrere Veröffentlichungen (Amer et al., 2004; Limoli et al., 2003). Gerade für die quantitative Messung von ROS,

insbesondere H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, hat sich hierbei der verwendete Fluoreszenz-Farbstoff DCFH-DA angeboten, er wurde ebenfalls bereits ausgiebig untersucht und mehrmals in Studien verwendet (Eruslanov and Kusmartsev, 2010; Wang and Joseph, 1999; Kalyanaraman et al., 2012).

Grundsätzlich unterliegen die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Experimente einigen Einschränkungen, was die Übertragbarkeit auf den klinischen Alltag betrifft. Hierbei ist zuerst der Punkt zu nennen, dass es sich um eine *in-vitro*-Untersuchung handelt. Deren Vorzügen einer isolierten Betrachtung einzelner Zelltypen und dem Einsatz genau definierter Reize stehen diverse Nachteile gegenüber. So ist man größtenteils nicht in der Lage die äußerst komplexen und vielfältig verknüpften Reaktionen des gesamten Organismus zu simulieren, weshalb eine direkte Übertragung auf den Menschen bei diesen Ergebnissen nur bedingt möglich ist (Roberts et al., 2015). In unserem Fall wurden zu den einzelnen Teilbereichen, wie bereits dargelegt, aber auch schon *in-vivo*- und klinische Studien durchgeführt, die die gefundenen Erkenntnisse verifizieren konnten.

Die Arbeit sollte einen grundlegenden Überblick über die Beteiligung von ROS innerhalb der Signalkaskaden bei der kieferorthopädischen Zahnbewegung und der durch Parodontitis bedingten Gewebedestruktion schaffen. Daher lagen für die einzelnen Versuche jeweils nur geringe Probenzahlen vor, was auch die größte Limitation der gefundenen Ergebnisse darstellt. So ließen sich zwar innerhalb dieser Einschränkungen einige statistisch signifikante Ergebnisse finden, bei mehreren Experimenten konnten allerdings nur Tendenzen abgeschätzt werden, da in solchen Fällen die Probenzahl deutlich zu gering war, um die auftretenden Streuungen der Ergebnisse sinnvoll einordnen zu können. Für weitere Erkenntnisse zu diesen einzelnen Punkten wären also Untersuchungen mit höheren Probenzahlen notwendig.

#### **4.6 Schlussfolgerungen**

Die Arbeit konnte weitere Belege für die Bedeutung von reaktiven Sauerstoffspezies innerhalb der Signalwege, die im parodontalen Ligament ablaufen, sammeln. Wir waren in der Lage zu zeigen, dass ROS vor allem bei der Zellantwort auf Umweltreize wie mechanische Belastung und Hypoxie die Rolle eines zentralen Botenstoffes einnehmen. Weiter fanden wir heraus, dass oxidativer Stress, dem momentan eine Beteiligung an einer Vielzahl von Erkrankungen zugeschrieben wird (Duracková, 2010; Valko et al., 2006), auch im Bereich der Parodontitis von großer Bedeutung ist. Analog dazu ist eine solche Stoffwechsellage aber genauso bei den phy-

siologischen Vorgängen, die bei der kieferorthopädischen Zahnbewegung zum Tragen kommen, relevant. Es zeigte sich also auch in unseren Untersuchungen das hohe Gefahrenpotential für Patienten, bei denen eine Kombination aus beiden Faktoren vorliegt. Diese Erkenntnis deckt sich mit der vorhandenen Literatur, nach der gerade bei solchen Fällen das Risiko von nicht gewünschten Nebeneffekten steigt. Hier sind vor allem unkontrollierter Knochenverlust und Wurzelresorptionen zu nennen (Kirschneck et al., 2017a). Auf Grund des demografischen Wandels und des dadurch bedingten Anstiegs solcher Komorbiditäten muss also in Zukunft noch verstärkt auf die betroffenen Patienten geachtet werden, um gerade solche Nebenwirkungen zu vermeiden. Ein weiterer Ansatz wäre hierbei auch die gezielte und adjuvante Verwendung von Antioxidantien im Rahmen der Behandlung. In anderen Feldern der Medizin kommen solche Substanzen bereits zum Einsatz, für die Zahnmedizin liegen allerdings erst wenige klinische Studien zu diesem breiten Thema vor. Gerade das von uns verwendete NAC zeigte bereits erste Erfolge als Adjuvans in der chirurgischen Parodontitis Therapie (Alkadasi et al., 2017). Dennoch sind weitere klinische Untersuchungen notwendig, da die Fallzahlen hier noch beschränkt sind. Auch der Effekt von Antioxidantien bei kieferorthopädischer Zahnbewegung konnte bereits mehrfach durch *in-vivo*-Studien nachgewiesen werden. Versuche an Ratten offenbarten negative Auswirkungen, wenn zuvor NAC verabreicht worden war (Chae et al., 2011). Gerade in diesem Bereich stehen aber neben den Antioxidantien noch andere Präparate im Fokus. Es existieren auch hier bereits zahlreiche Ansätze, um das Ausmaß kieferorthopädischer Zahnbewegungen mit Hilfe systemischer Medikamente adjuvant zu modulieren, was ebenfalls durch *in-vivo*-Versuche an Ratten bestätigt werden konnte (Kouskoura et al., 2017; Kirschneck et al., 2017b).

Gemeinsam ist dem Großteil der Arbeiten aber, dass es sich um keine klinischen Studien an menschlichen Patienten handelt. Eine direkte Übertragung der Ergebnisse in den klinischen Alltag ist daher noch nicht ohne Einschränkungen möglich. Wie bereits erwähnt, wurden aber erste Erkenntnisse am Menschen gesammelt, welche teilweise sehr vielversprechend waren.

So beleuchteten auch unsere Experimente die Rolle von oxidativem Stress sowohl bei Zahnbewegung als auch bei Parodontitis und die enge Verzahnung und Überschneidung dieser Bereiche. Obwohl die komplexen Wechselwirkungen noch nicht abschließend geklärt sind, zeigte sich dennoch in den letzten Jahren das mögliche Potential von adjuvanten Therapieformen, die solche Prozesse modulieren. Auf der anderen Seite könnte durch solche Therapieansätze, die in mehreren Feldern der Medizin bereits routinemäßig zum Einsatz kommen, aber auch die kieferorthopädische Behandlung beeinflusst werden. Wenn Patienten beispielshalber antioxidativ

wirkende Medikamente zur Behandlung fachfremder Krankheitsbilder einnehmen, hat dies unter Umständen hemmende Folgen für die geplante Zahnbewegung, weshalb hier eine ausführliche Anamnese in diese Richtung eine noch größere Bedeutung erlangen wird.

Abschließend lässt sich aber sagen, dass, gerade mit Blick auf die prognostizierte Zunahme von komplexeren Behandlungsfällen, die weitere Forschung in diesem Bereich hoffentlich dazu beiträgt, ebensolche Patienten sicherer und erfolgreicher behandeln zu können.

## 5 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit beschäftigte sich mit der Entstehung und den Auswirkungen von oxidativem Stress in den Zellen des parodontalen Ligaments (PDL). Der Begriff Oxidativer Stress beschreibt dabei eine potenziell schädliche Stoffwechsellage, bei der auf Grund einer gesteigerten Bildung von oxidativ wirksamen Molekülen (reaktive Sauerstoffspezies, ROS) ein gestörtes Verhältnis zwischen Oxidantien und Antioxidantien vorliegt. Es wurden *in-vitro*-Experimente durchgeführt, in denen zunächst eine mögliche Freisetzung von ROS überprüft wurde. Hierdurch sollte die Fragestellung geklärt werden, ob durch bestimmte Faktoren, wie sie auch bei Parodontitis und kieferorthopädischer Zahnbewegung auftreten, überhaupt oxidativer Stress in den Zellverbänden der PDL-Fibroblasten auftritt. Im zweiten Teil der Arbeit sollten durch weitere Versuche die Auswirkungen eines ebensolchen ROS-Anstiegs auf den Zellstoffwechsel ergründet werden, indem wir die Fibroblasten direkt mittels ROS ( $H_2O_2$ ) stimulierten, worauf die Aktivität der am Knochenstoffwechsel beteiligten Gene für IL-6, IL-8 und COX-2 gemessen wurde.

Die verwendeten PDL-Zellen wurden aus Weisheitszähnen von Patienten im Alter von 14-22 Jahren isoliert, wobei darauf geachtet wurde, dass es sich um karies- und entzündungsfreie Zähne handelte, deren Entfernung medizinisch indiziert war. Nachdem die gewonnenen Zellen über spezifische Markergene identifiziert worden waren, erfolgten ihre Kultivierung und die jeweiligen Versuche.

Im ersten Teil fand eine Behandlung durch Druck ( $2g/cm^2$ ; 24 h), Hypoxie (48 h) und Lysate der parodontalpathogenen Bakterienspezies *A. actinomycetemcomitans* und *P. gingivalis* (12 h und 96 h) statt, wobei stets auch unbehandelte Kontrollen angelegt wurden. Daraufhin wurde eine Fluoreszenzfärbung der Proben mit dem Farbstoff DCFH-DA (Dichlorodihydrofluorescein diacetate) durchgeführt, worauf die Zellen mittels fluoreszenzaktivierter Durchflusszytometrie (Fluorescence activated cell sorting, FACS) vermessen werden konnten.

Wir fanden in den durch Druck und Hypoxie behandelten Proben in Relation zu den Kontrollen signifikant erhöhte ROS-Konzentrationen. Nach der Reizung durch Bakterienlysate zeigten sich hingegen allenfalls Tendenzen eines Anstiegs, die aber statistisch nicht signifikant waren. Begleitend wurde auch die Zellüberlebensrate in den Populationen untersucht, es kam dabei zu

ähnlichen Ergebnissen. Sie sank nach Stimulation durch Druck und Hypoxie signifikant, im Fall der Bakterienlysate erhielten wir auch hier keine aussagekräftigen Veränderungen.

Im zweiten Teil sollten die Auswirkungen von ROS auf den Zellstoffwechsel beleuchtet werden. Dafür wurde nach Vorversuchen eine H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentration von 0,1 mM als geeignet befunden, der die Zellen anschließend über einen Zeitraum von 2 h ausgesetzt wurden. Die Messung der Genexpression erfolgte mittels RT-qPCR. Es fanden sich dabei für alle untersuchten Gene (IL-6, IL-8, COX-2) erhöhte Expressionsraten.

Ein weiterer Bestandteil der Arbeit lag in der Ergründung der Auswirkungen des Antioxidantiums N-Acetylcystein (NAC). Hierfür wurden innerhalb der Experimentreihe mit *P. gingivalis* auch Proben mit dieser Substanz versetzt, was zu einem signifikanten Rückgang der jeweiligen ROS-Konzentrationen führte. Analoge Ergebnisse fanden wir bei der Stimulation durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, nach der es ebenfalls zu einem Abfall der Expressionsraten für alle Gene kam, wenn die Zellen gleichzeitig mit NAC behandelt worden waren.

Die gefundenen Ergebnisse weisen einerseits darauf hin, dass bestimmte Reize, die während Parodontitis und kieferorthopädischer Zahnbewegung auftreten, in der Lage sind, oxidativen Stress in den Zellen des PDL auszulösen. Andererseits zeigte sich aber auch die Bedeutung gerade der ROS in der Reizantwort und der Signalweitergabe. Weiter lieferten die Untersuchungen Hinweise darauf, dass durch die Verwendung von Antioxidantien neue vielfältige Therapieansätze entstehen könnten. Mit diesen wäre es in Zukunft eventuell möglich, gerade komplexe Patientenfälle, bei denen eine Kombination aus Parodontitis und kieferorthopädischem Behandlungswunsch vorliegt, sicherer und vorhersagbarer zu behandeln.

## 6 Anhang

### 6.1 Tabellenverzeichnis

Nummer	Titel	Seite
Tab. 1.	Primersequenzen der zur Charakterisierung von PDL-Fibroblasten verwendeten Ziel- und Referenzgene (PCR).	16
Tab. 2.	Primersequenzen der für die RT-qPCR verwendeten Ziel- und Referenzgene.	22

### 6.2 Abbildungsverzeichnis

Nummer	Titel	Seite
Abb. 1.	Lichtmikroskopische Aufnahme von PDL-Fibroblasten in 100facher Vergrößerung.	15
Abb. 2.	Agarose-Gelelektrophorese der Gene für die Charakterisierung von PDL-Fibroblasten.	17
Abb. 3.	Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von mittels DCF gefärbten PDL-Fibroblasten.	25
Abb. 4.	Vergleich unbehandelte PDL-Zellen / PDL-Zellen nach H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Exposition (10 mM) über 90 Minuten.	26
Abb. 5.	Exemplarisches Datenblatt einer FACS-Messung.	28
Abb. 6.	Entstehung von ROS und Zellüberlebensrate von PDL-Fibroblasten nach Stimulation mit Druck (2g/cm <sup>2</sup> ) über einen Zeitraum von 24 h.	30
Abb. 7.	Entstehung von ROS und Zellüberlebensrate von PDL-Fibroblasten nach Stimulation durch Hypoxie über einen Zeitraum von 48 h.	31

Abb. 8.	ROS-Bildung (a) und prozentualer Anteil vitaler Zellen (b) 12 h bzw. 96 h nach Stimulation mit Bakterienlysat von <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> (Agac, 10%).	32
Abb. 9.	ROS-Bildung (a) und prozentualer Anteil vitaler Zellen (b) 12 h bzw. 96 h nach Stimulation mit Bakterienlysat von <i>Porphyromonas gingivalis</i> (Pogi, 10 %).	33
Abb. 10.	ROS-Bildung und Zellüberlebensrate nach Stimulation durch <i>Porphyromonas gingivalis</i> (10 %) und durch Pogi+NAC über einen Zeitraum von 96 h.	34
Abb. 11.	Messung der Fluoreszenzintensität als Nachweis für ROS und Bestimmung des prozentualen Anteils vitaler Zellen nach Stimulation durch verschiedene H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Konzentrationen über 90 min.	35
Abb. 12.	Relative Genexpression von <i>IL-8</i> nach Stimulation durch H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (100 µM) über verschiedene Zeiträume (0,5 h, 2 h, 4 h, 6 h), bezogen auf die Kontrollgruppe.	36
Abb. 13.	Relative Genexpression von <i>IL-6</i> , <i>IL-8</i> und <i>COX-2</i> nach Stimulation durch H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (100 µM) über 2 h, bezogen auf die Kontrollgruppe.	37
Abb. 14.	Relative Genexpression von <i>IL-6</i> , <i>IL-8</i> und <i>COX-2</i> nach Stimulation durch H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (100µM) + NAC (20 mM) über 24 h, bezogen auf die Kontrollgruppe.	38

### 6.3 Abkürzungsverzeichnis

AU	Arbitrary Unit, arbiträre Einheit
C <sub>T</sub> -Wert	Threshold Cycle, Schwellenwertzyklus
DCFH-DA	Dichlorodihydrofluorescein diacetate
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid

DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FACS	Fluorescence-activated cell sorting
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>	Doppelt destilliertes Wasser
HIF	Hypoxie-induzierter Faktor
HO•	Hydroxyl-Radikal
IL	Interleukin
M	Molar (mol/l)
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
NAC	N-Acetylcystein
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NF-κB	Nuclear factor κ-light-chain-enhancer of activated B cells
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Hyperoxid-Anion
OPG	Osteoprotegerin
<i>P. gingivalis</i>	<i>Porphyromonas gingivalis</i>
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDL	Parodontales Ligament
PG	Prostaglandin
PMT	Photo multiplier tube
RANK	Receptor Activator of NF-κB
RANKL	Receptor Activator of NF-κB Ligand
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RT-qPCR	Real-time quantitative PCR
TAE	TRIS-Acetat-EDTA
TNF-α	Tumornekrosefaktor-α

## 7 Literaturverzeichnis

- Adan, A., Alizada, G., Kiraz, Y., Baran, Y., Nalbant, A., 2017. Flow cytometry: basic principles and applications. *Crit Rev Biotechnol* 37, 163–176.
- Albandar, J.M., Susin, C., Hughes, F.J., 2018. Manifestations of systemic diseases and conditions that affect the periodontal attachment apparatus: Case definitions and diagnostic considerations. *J Clin Periodontol* 45, 171-189.
- Alkadasi, B., Abdulrab, S., Gaafer, S., Kalakonda, B., Hosny, M., Shaker, O., Hosny, M., 2017. Effect of adjunctive use of systemic antioxidant therapy (N-acetylcysteine) on soluble receptor activator nuclear factor  $\kappa$ B ligand levels in gingival crevicular fluid following surgical periodontal treatment for chronic periodontitis. *J Oral Sci* 59, 519–526.
- Amer, J., Goldfarb, A., Fibach, E., 2004. Flow cytometric analysis of the oxidative status of normal and thalassemic red blood cells. *Cytometry A* 60, 73–80.
- Armitage, G.C., 1999. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Ann Periodontol* 4, 1–6.
- Aruoma, O.I., Halliwell, B., Hoey, B.M., Butler, J., 1989. The antioxidant action of N-acetylcysteine: its reaction with hydrogen peroxide, hydroxyl radical, superoxide, and hypochlorous acid. *Free Radic Biol Med* 6, 593–597.
- Basdra, E.K., Komposch, G., 1997. Osteoblast-like properties of human periodontal ligament cells: an in vitro analysis. *Eur J Orthod* 19, 615–621.
- Beertsen, W., McCulloch, C.A.G., Sodek, J., 1997. The periodontal ligament: a unique, multifunctional connective tissue. *Periodontol* 2000 13, 20–40.
- Belibasakis, G.N., Bostanci, N., Hashim, A., Johansson, A., Aduse-Opoku, J., Curtis, M.A., Hughes, F.J., 2007. Regulation of RANKL and OPG gene expression in human gingival fibroblasts and periodontal ligament cells by *Porphyromonas gingivalis*: a putative role of the Arg-gingipains. *Microb Pathog* 43, 46–53.
- Billings, M., Holtfreter, B., Papapanou, P.N., Mitnik, G.L., Kocher, T., Dye, B.A., 2018. Age-dependent distribution of periodontitis in two countries: Findings from NHANES 2009 to 2014 and SHIP-TREND 2008 to 2012. *J Clin Periodontol* 45, 130-148.

- Bodet, C., Andrian, E., Tanabe, S.-I., Grenier, D., 2007. Actinobacillus actinomycetemcomitans lipopolysaccharide regulates matrix metalloproteinase, tissue inhibitors of matrix metalloproteinase, and plasminogen activator production by human gingival fibroblasts: a potential role in connective tissue destruction. *J Cell Physiol* 212, 189–194.
- Bonanomi, L., Gazzaniga, A., 1980. Toxicological, pharmacokinetic and metabolic studies on acetylcysteine. *Eur J Respir Dis Suppl* 111, 45–51.
- Boyd, R.L., Leggott, P.J., Quinn, R.S., Eakle, W.S., Chambers, D., 1989. Periodontal implications of orthodontic treatment in adults with reduced or normal periodontal tissues versus those of adolescents. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 96, 191–198.
- Boyle, W.J., Simonet, W.S., Lacey, D.L., 2003. Osteoclast differentiation and activation. *Nature* 423, 337–342.
- Brandt, U., 2014. Oxidoreduktasen und oxidativer Stress. In: Heinrich, P.C., Müller, M., Graeve, L. (Eds.). *Springer-Lehrbuch. Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 252–256.
- Brown, D.I., Griendling, K.K., 2009. Nox proteins in signal transduction. *Free Radic Biol Med* 47, 1239–1253.
- Bubici, C., Papa, S., Dean, K., Franzoso, G., 2006. Mutual cross-talk between reactive oxygen species and nuclear factor-kappa B: molecular basis and biological significance. *Oncogene* 25, 6731–6748.
- Chae, H.S., Park, H.-J., Hwang, H.R., Kwon, A., Lim, W.-H., Yi, W.J., Han, D.-H., Kim, Y.H., Baek, J.-H., 2011. The effect of antioxidants on the production of pro-inflammatory cytokines and orthodontic tooth movement. *Mol Cells* 32, 189–196.
- Chandel, N.S., Maltepe, E., Goldwasser, E., Mathieu, C.E., Simon, M.C., Schumacker, P.T., 1998. Mitochondrial reactive oxygen species trigger hypoxia-induced transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 11715–11720.
- Chapple, I.L.C., Matthews, J.B., 2007. The role of reactive oxygen and antioxidant species in periodontal tissue destruction. *Periodontol* 2000 43, 160–232.
- D'Aiuto, F., Nibali, L., Parkar, M., Patel, K., Suvan, J., Donos, N., 2010. Oxidative stress, systemic inflammation, and severe periodontitis. *J Dent Res* 89, 1241–1246.

- Decramer, M., Rutten-van Mölken, M., Dekhuijzen, P.N.R., Troosters, T., van Herwaarden, C., Pellegrino, R., van Schayck, C.P.O., Olivieri, D., Del Donno, M., Backer, W. de, Lankhorst, I., Ardia, A., 2005. Effects of N-acetylcysteine on outcomes in chronic obstructive pulmonary disease (Bronchitis Randomized on NAC Cost-Utility Study, BRONCUS): a randomised placebo-controlled trial. *Lancet* 365, 1552–1560.
- Duracková, Z., 2010. Some current insights into oxidative stress. *Physiol Res* 59, 459–469.
- Eickholz, P., 2013. Parodontologie von A bis Z. Grundbgriffe für die Praxis, 1st edition. Quintessenz Verl., Berlin u.a.
- Eliasson, L.A., Hugoson, A., Kurol, J., Siwe, H., 1982. The effects of orthodontic treatment on periodontal tissues in patients with reduced periodontal support. *Eur J Orthod* 4, 1–9.
- Eruslanov, E., Kusmartsev, S., 2010. Identification of ROS using oxidized DCFDA and flow-cytometry. *Methods Mol Biol* 594, 57–72.
- Fine, D.H., Patil, A.G., Loos, B.G., 2018. Classification and diagnosis of aggressive periodontitis. *J Periodontol* 89, 103-119.
- Finkel, T., 1998. Oxygen radicals and signaling. *Curr Opin Cell Biol* 10, 248–253.
- Fives-Taylor, P.M., Meyer, D.H., Mintz, K.P., Brissette, C., 1999. Virulence factors of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Periodontol* 2000 20, 136–167.
- Frede, S., Berchner-Pfannschmidt, U., Fandrey, J., 2007. Regulation of hypoxia-inducible factors during inflammation. *Meth Enzymol* 435, 405–419.
- Gillissen, A., Jaworska, M., Orth, M., Coffiner, M., Maes, P., App, E.M., Cantin, A.M., Schultze-Werninghaus, G., 1997. Nacystelyn, a novel lysine salt of N-acetylcysteine, to augment cellular antioxidant defence in vitro. *Respir Med* 91, 159–168.
- Givan, A.L., 2011. Flow cytometry: an introduction. *Methods Mol Biol* 699, 1–29.
- Gleadle, J.M., Ratcliffe, P.J., 1998. Hypoxia and the regulation of gene expression. *Mol Med Today* 4, 122–129.
- Gölz, L., Memmert, S., Rath-Deschner, B., Jäger, A., Appel, T., Baumgarten, G., Götz, W., Frede, S., 2014. LPS from *P. gingivalis* and hypoxia increases oxidative stress in periodontal ligament fibroblasts and contributes to periodontitis. *Mediators Inflamm* 2014, 986264.
- Graber, L.W., Vanarsdall, R.L., Vig, K.W.L., Huang, G.J. (Eds.), 2017. Orthodontics. Current principles and techniques. Elsevier, St. Louis, Missouri.

- Harman, D., 1956. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol* 11, 298–300.
- Henderson, B., Nair, S.P., Ward, J.M., Wilson, M., 2003. Molecular pathogenicity of the oral opportunistic pathogen *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Annu Rev Microbiol* 57, 29–55.
- Henneman, S., den Hoff, J.W. von, Maltha, J.C., 2008. Mechanobiology of tooth movement. *Eur J Orthod* 30, 299–306.
- Herrera, D., Retamal-Valdes, B., Alonso, B., Feres, M., 2018. Acute periodontal lesions (periodontal abscesses and necrotizing periodontal diseases) and endo-periodontal lesions. *J Periodontol* 89, 85-102.
- Holt, S.C., Ebersole, J.L., 2005. *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, and *Tannerella forsythia*: the "red complex", a prototype polybacterial pathogenic consortium in periodontitis. *Periodontol 2000* 38, 72–122.
- Holzappel, B., Wickert, L., 2007. Die quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR). *Methoden und Anwendungsgebiete. Biol Unserer Zeit* 37, 120–126.
- Janssen-Heininger, Y.M.W., Poynter, M.E., Baeuerle, P.A., 2000. Recent advances towards understanding redox mechanisms in the activation of nuclear factor  $\kappa$ b. *Free Radic Biol Med* 28, 1317–1327.
- Jepsen, S., Caton, J.G., Albandar, J.M., Bissada, N.F., Bouchard, P., Cortellini, P., Demirel, K., Sanctis, M. de, Ercoli, C., Fan, J., Geurs, N.C., Hughes, F.J., Jin, L., Kantarci, A., Lalla, E., Madianos, P.N., Matthews, D., McGuire, M.K., Mills, M.P., Preshaw, P.M., Reynolds, M.A., Sculean, A., Susin, C., West, N.X., Yamazaki, K., 2018. Periodontal manifestations of systemic diseases and developmental and acquired conditions: Consensus report of workgroup 3 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. *J Clin Periodontol* 45, 219-229.
- Jönsson, D., Nebel, D., Bratthall, G., Nilsson, B.-O., 2011. The human periodontal ligament cell: a fibroblast-like cell acting as an immune cell. *J Periodont Res* 46, 153–157.
- Jordan, A.R., Micheelis, W., Cholmakow-Bodechtel, C. (Eds.), 2016. Fünfte Deutsche Mundgesundheitsstudie (DMS V). Deutscher Zahnärzte Verlag DÄV, Köln.
- Kalyanaraman, B., Darley-Usmar, V., Davies, K.J.A., Dennery, P.A., Forman, H.J., Grisham, M.B., Mann, G.E., Moore, K., Roberts, L.J., Ischiropoulos, H., 2012. Measuring reactive

- oxygen and nitrogen species with fluorescent probes: challenges and limitations. *Free Radic Biol Med* 52, 1–6.
- Kaminsky, V.O., Zhivotovsky, B., 2014. Free radicals in cross talk between autophagy and apoptosis. *Antioxid Redox Signal* 21, 86–102.
- Kanzaki, H., Chiba, M., Shimizu, Y., Mitani, H., 2002. 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* 17, 210–220.
- Kassem, A., Henning, P., Lundberg, P., Souza, P.P.C., Lindholm, C., Lerner, U.H., 2015. *Porphyromonas gingivalis* Stimulates Bone Resorption by Enhancing RANKL (Receptor Activator of NF- $\kappa$ B Ligand) through Activation of Toll-like Receptor 2 in Osteoblasts. *J Biol Chem* 290, 20147–20158.
- Khouw, F.E., Goldhaber, P., 1970. Changes in vasculature of the periodontium associated with tooth movement in the rhesus monkey and dog. *Arch Oral Biol* 15, 1125–1132.
- Kim, D.Y., Jun, J.-H., Lee, H.-L., Woo, K.M., Ryoo, H.-M., Kim, G.-S., Baek, J.-H., Han, S.-B., 2007. N-acetylcysteine prevents LPS-induced pro-inflammatory cytokines and MMP2 production in gingival fibroblasts. *Arch Pharm Res* 30, 1283–1292.
- Kirschneck, C., Fanghänel, J., Wahlmann, U., Wolf, M., Roldán, J.C., Proff, P., 2017a. Interactive effects of periodontitis and orthodontic tooth movement on dental root resorption, tooth movement velocity and alveolar bone loss in a rat model. *Ann Anat* 210, 32–43.
- Kirschneck, C., Küchler, E.C., Wolf, M., Spanier, G., Proff, P., Schröder, A., 2019. Effects of the Highly COX-2-Selective Analgesic NSAID Etoricoxib on Human Periodontal Ligament Fibroblasts during Compressive Orthodontic Mechanical Strain. *Mediators Inflamm* 2019, 2514956.
- Kirschneck, C., Meier, M., Bauer, K., Proff, P., Fanghänel, J., 2017b. Meloxicam medication reduces orthodontically induced dental root resorption and tooth movement velocity: a combined in vivo and in vitro study of dental-periodontal cells and tissue. *Cell Tissue Res* 368, 61–78.
- Konermann, A., Stabenow, D., Knolle, P.A., Held, S.A.E., Deschner, J., Jäger, A., 2012. Regulatory role of periodontal ligament fibroblasts for innate immune cell function and differentiation. *Innate Immun* 18, 745–752.

- Kook, S.-H., Jang, Y.-S., Lee, J.-C., 2011. Human periodontal ligament fibroblasts stimulate osteoclastogenesis in response to compression force through TNF- $\alpha$ -mediated activation of CD4<sup>+</sup> T cells. *J Cell Biochem* 112, 2891–2901.
- Kouskoura, T., Katsaros, C., Gunten, S. von, 2017. The Potential Use of Pharmacological Agents to Modulate Orthodontic Tooth Movement (OTM). *Front Physiol* 8.
- Lang, N., Bartold, P.M., Cullinan, M., Jeffcoat, M., Mombelli, A., Murakami, S., Page, R., Papapanou, P., Tonetti, M., van Dyke, T., 1999. Consensus Report: Aggressive Periodontitis. *Ann Periodontol* 4, 53.
- Lee, N.K., Choi, Y.G., Baik, J.Y., Han, S.Y., Jeong, D.-W., Bae, Y.S., Kim, N., Lee, S.Y., 2005. A crucial role for reactive oxygen species in RANKL-induced osteoclast differentiation. *Blood* 106, 852–859.
- Lee, P.Y., Costumbrado, J., Hsu, C.-Y., Kim, Y.H., 2012. Agarose gel electrophoresis for the separation of DNA fragments. *J Vis Exp*.
- Lekic, P., McCulloch, C.A., 1996. Periodontal ligament cell population: the central role of fibroblasts in creating a unique tissue. *Anat Rec* 245, 327–341.
- Li, M., Zhang, C., Yang, Y., 2019. Effects of mechanical forces on osteogenesis and osteoclastogenesis in human periodontal ligament fibroblasts: A systematic review of in vitro studies. *Bone Joint Res* 8, 19–31.
- Limoli, C.L., Giedzinski, E., Morgan, W.F., Swarts, S.G., Jones, G.D.D., Hyun, W., 2003. Persistent oxidative stress in chromosomally unstable cells. *Cancer Res* 63, 3107–3111.
- Linß, W., Fanghänel, J. (Eds.), 1999. *Histologie. Zytologie, allgemeine Histologie, mikroskopische Anatomie.* de Gruyter, Berlin.
- Liu, C., Mo, L., Niu, Y., Li, X., Zhou, X., Xu, X., 2017. The Role of Reactive Oxygen Species and Autophagy in Periodontitis and Their Potential Linkage. *Front Physiol* 8, 439.
- Logan, J. (Ed.), 2009. *Real-time PCR. Current technology and applications.* Caister Acad. Press, Norfolk.
- Marsh, P., Martin, M.V., Callaway, A.S. (Eds.), 2003. *Orale Mikrobiologie.* Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- Marsh, P.D., Bradshaw, D.J., 1995. Dental plaque as a biofilm. *J Ind Microbiol* 15, 169–175.

- Mayahara, K., Yamaguchi, A., Takenouchi, H., Kariya, T., Taguchi, H., Shimizu, N., 2012. Osteoblasts stimulate osteoclastogenesis via RANKL expression more strongly than periodontal ligament cells do in response to PGE(2). *Arch Oral Biol* 57, 1377–1384.
- Meikle, M.C., 2006. The tissue, cellular, and molecular regulation of orthodontic tooth movement: 100 years after Carl Sandstedt. *Eur J Orthod* 28, 221–240.
- Morgan, M.J., Liu, Z.-G., 2010. Reactive oxygen species in TNF $\alpha$ -induced signaling and cell death. *Mol Cells* 30, 1–12.
- Movafagh, S., Crook, S., Vo, K., 2015. Regulation of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  by reactive oxygen species: new developments in an old debate. *J Cell Biochem* 116, 696–703.
- Mysak, J., Podzimek, S., Sommerova, P., Lyuya-Mi, Y., Bartova, J., Janatova, T., Prochazkova, J., Duskova, J., 2014. *Porphyromonas gingivalis*: major periodontopathic pathogen overview. *J Immunol Res* 2014, 476068.
- Needleman, I., Garcia, R., Gkrantias, N., Kirkwood, K.L., Kocher, T., Di Iorio, A., Moreno, F., Petrie, A., 2018. Mean annual attachment, bone level, and tooth loss: A systematic review. *J Clin Periodontol* 45, 112-129.
- Ng, K.-T., Li, J.-P., Ng, K.M., Tipoe, G.L., Leung, W.K., Fung, M.-L., 2011. Expression of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  in human periodontal tissue. *J Periodontol* 82, 136–141.
- Niklas, A., Proff, P., Gosau, M., Römer, P., 2013. The role of hypoxia in orthodontic tooth movement. *Int J Dent* 2013, 841840.
- Noguchi, K., Ishikawa, I., 2007. The roles of cyclooxygenase-2 and prostaglandin E2 in periodontal disease. *Periodontol* 2000 43, 85–101.
- Papapanou, P.N., Sanz, M., Buduneli, N., Dietrich, T., Feres, M., Fine, D.H., Flemmig, T.F., Garcia, R., Giannobile, W.V., Graziani, F., Greenwell, H., Herrera, D., Kao, R.T., Kerschull, M., Kinane, D.F., Kirkwood, K.L., Kocher, T., Kornman, K.S., Kumar, P.S., Loos, B.G., Machtei, E., Meng, H., Mombelli, A., Needleman, I., Offenbacher, S., Seymour, G.J., Teles, R., Tonetti, M.S., 2018. Periodontitis: Consensus report of workgroup 2 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. *J Periodontol* 89, 173-182.
- Picot, J., Guerin, C.L., van Kim, C., Boulanger, C.M., 2012. Flow cytometry: retrospective, fundamentals and recent instrumentation. *Cytotechnology* 64, 109–130.

- Piret, J.-P., Mottet, D., Raes, M., Michiels, C., 2002. Is HIF-1alpha a pro- or an anti-apoptotic protein? *Biochem Pharmacol* 64, 889–892.
- Poljsak, B., Šuput, D., Milisav, I., 2013. Achieving the balance between ROS and antioxidants: when to use the synthetic antioxidants. *Oxid Med Cell Longev* 2013, 956792.
- Ponchel, F., Toomes, C., Bransfield, K., Leong, F.T., Douglas, S.H., Field, S.L., Bell, S.M., Combaret, V., Puisieux, A., Mighell, A.J., Robinson, P.A., Inglehearn, C.F., Isaacs, J.D., Markham, A.F., 2003. Real-time PCR based on SYBR-Green I fluorescence: an alternative to the TaqMan assay for a relative quantification of gene rearrangements, gene amplifications and micro gene deletions. *BMC Biotechnol* 3, 18.
- Redza-Dutordoir, M., Averill-Bates, D.A., 2016. Activation of apoptosis signalling pathways by reactive oxygen species. *Biochim Biophys Acta* 1863, 2977–2992.
- Reitan, K., 1960. Tissue behavior during orthodontic tooth movement. *Am J Orthod* 46, 881–900.
- Reitan, K., 1967. Clinical and histologic observations on tooth movement during and after orthodontic treatment. *Am J Orthod* 53, 721–745.
- Reuter, S., Gupta, S.C., Chaturvedi, M.M., Aggarwal, B.B., 2010. Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked? *Free Radic Biol Med* 49, 1603–1616.
- Roberts, A.E.L., Kragh, K.N., Bjarnsholt, T., Diggle, S.P., 2015. The Limitations of In Vitro Experimentation in Understanding Biofilms and Chronic Infection. *J Mol Biol* 427, 3646–3661.
- Römer, P., Köstler, J., Koretsi, V., Proff, P., 2013. Endotoxins potentiate COX-2 and RANKL expression in compressed PDL cells. *Clin Oral Investig* 17, 2041–2048.
- Roth, S., Dröge, W., 1987. Regulation of T-cell activation and T-cell growth factor (TCGF) production by hydrogen peroxide. *Cell Immunol* 108, 417–424.
- Schmittgen, T.D., Livak, K.J., 2008. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc* 3, 1101–1108.
- Schröder, A., Bauer, K., Spanier, G., Proff, P., Wolf, M., Kirschneck, C., 2018. Expressionkinetik humaner Parodontalligamentfibroblasten in den frühen Phasen der kieferorthopädischen Zahnbewegung. *J Orofac Orthop* 79, 337–351.

- Schwendicke, F., Krois, J., Kocher, T., Hoffmann, T., Micheelis, W., Jordan, R.A., 2018. More teeth in more elderly: Periodontal treatment needs in Germany 1997-2030. *J Clin Periodontol* 45, 1400–1407.
- Semenza, G.L., 2000. HIF-1: mediator of physiological and pathophysiological responses to hypoxia. *J Appl Physiol* 88, 1474–1480.
- Sena, L.A., Chandel, N.S., 2012. Physiological roles of mitochondrial reactive oxygen species. *Mol Cell* 48, 158–167.
- Sies, H., 1997. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Exp Physiol* 82, 291–295.
- Sies, H., 2014. Role of metabolic H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generation: redox signaling and oxidative stress. *J Biol Chem* 289, 8735–8741.
- Skaleric, U., Manthey, C.M., Mergenhagen, S.E., Gaspiric, B., Wahl, S.M., 2000. Superoxide release and superoxide dismutase expression by human gingival fibroblasts. *Eur J Oral Sci* 108, 130–135.
- Slots, J., Ting, M., 1999. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* in human periodontal disease: occurrence and treatment. *Periodontol 2000* 20, 82–121.
- Socransky, S.S., Haffajee, A.D., Cugini, M.A., Smith, C., Kent, R.L., 1998. Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol* 25, 134–144.
- Sokos, D., Everts, V., Vries, T.J. de, 2015. Role of periodontal ligament fibroblasts in osteoclastogenesis: a review. *J Periodont Res* 50, 152–159.
- Tamaki, N., Hayashida, H., Fukui, M., Kitamura, M., Kawasaki, K., Nakazato, M., Maeda, T., Saito, T., Ito, H.O., 2014. Oxidative stress and antibody levels to periodontal bacteria in adults: the Nagasaki Islands study. *Oral Dis* 20, 49-56.
- Teles, R., Teles, F., Frias-Lopez, J., Paster, B., Haffajee, A., 2013. Lessons learned and unlearned in periodontal microbiology. *Periodontol 2000* 62, 95–162.
- Toker, H., Ozdemir, H., Eren, K., Ozer, H., Sahin, G., 2009. N-acetylcysteine, a thiol antioxidant, decreases alveolar bone loss in experimental periodontitis in rats. *J Periodontol* 80, 672–678.
- Tomar, S.L., Asma, S., 2000. Smoking-Attributable Periodontitis in the United States: Findings From NHANES III. *J Periodontol* 71, 743–751.

- Tonetti, M.S., Bottenberg, P., Conrads, G., Eickholz, P., Heasman, P., Huysmans, M.-C., López, R., Madianos, P., Müller, F., Needleman, I., Nyvad, B., Preshaw, P.M., Pretty, I., Renvert, S., Schwendicke, F., Trombelli, L., van der Putten, G.-J., Vanobbergen, J., West, N., Young, A., Paris, S., 2017. Dental caries and periodontal diseases in the ageing population: call to action to protect and enhance oral health and well-being as an essential component of healthy ageing - Consensus report of group 4 of the joint EFP/ORCA workshop on the boundaries between caries and periodontal diseases. *J Clin Periodontol* 44, 135-144.
- Tonetti, M.S., Greenwell, H., Kornman, K.S., 2018. Staging and grading of periodontitis: Framework and proposal of a new classification and case definition. *J Clin Periodontol* 45, 149-161.
- Tuncay, O.C., Ho, D., Barker, M.K., 1994. Oxygen tension regulates osteoblast function. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 105, 457–463.
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, Mark T D, Mazur, M., Telser, J., 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 39, 44–84.
- Valko, M., Rhodes, C.J., Moncol, J., Izakovic, M., Mazur, M., 2006. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact* 160, 1–40.
- van der Weijden, G.A., Timmerman, M.F., Reijerse, E., Wolffe, G.N., van Winkelhoff, A.J., van der Velden, U., 1994. The prevalence of *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* and *P. intermedia* in selected subjects with periodontitis. *J Clin Periodontol* 21, 583–588.
- Wang, H., Joseph, J.A., 1999. Quantifying cellular oxidative stress by dichlorofluorescein assay using microplate reader. 11Mention of a trade name, proprietary product, or specific equipment does not constitute a guarantee by the United States Department of Agriculture and does not imply its approval to the exclusion of other products that may be suitable. *Free Radic Biol Med* 27, 612–616.
- Wichelhaus, A., Eichenberg, T., 2017. *Farbatlant der Zahnmedizin*, 2nd edition. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York.
- Yamaguchi, M., 2009. RANK/RANKL/OPG during orthodontic tooth movement. *Orthod Craniofac Res* 12, 113–119.

- Yamamoto, T., Kita, M., Yamamoto, K., Akamatsu, Y., Oseko, F., Kanamura, N., 2011. Mechanical stress enhances production of cytokines in human periodontal ligament cells induced by *Porphyromonas gingivalis*. *Arch Oral Biol* 56, 251–257.
- Yang, S., Zhang, Y., Ries, W., Key, L., 2004. Expression of Nox4 in osteoclasts. *J Cell Biochem* 92, 238–248.

## 8 Danksagung

Mein aufrichtiger Dank gilt meiner Doktormutter Frau PD Dr. Agnes Schröder für die geduldige und konstruktive Betreuung meiner Arbeit. In ihr fand ich eine zuverlässige und freundliche Ansprechpartnerin, die mich durch ihre äußerst motivierende und kompetente Art während der Fertigstellung der Dissertation immens unterstützte.

Ebenso möchte ich Herrn Prof. Dr. Dr. Peter Proff, Direktor der Poliklinik für Kieferorthopädie des Universitätsklinikums Regensburg, für die Bereitstellung der Infrastruktur und die wohlwollende Unterstützung danken.

Dasselbe gilt für Herrn Prof. Dr. Wolfgang Buchalla, Direktor der Poliklinik für Zahnerhaltung und Parodontologie des Universitätsklinikums Regensburg, deren Infrastruktur ich freundlicherweise ebenfalls nutzen durfte.

Hier möchte ich vor allem Herrn Prof. Dr. Dr. Helmut Schweikl als Leiter des Forschungslabors der Poliklinik für Zahnerhaltung und Parodontologie nennen. Er stellte sich freundlicherweise auch als Zweitgutachter zur Verfügung, wofür ich ihm herzlich danke.

Für die initiale Überlassung des Themas und seine Betreuung und Anregungen während der Versuche im Labor danke ich Herrn PD Dr. Piero Römer, welcher mir in der experimentellen Phase beim Entwurf der Arbeit und der Durchführung der Experimente eine große Hilfe war.

Ein besonders herzliches Dankeschön möchte ich auch an Herrn PD Dr. Dr. Christian Kirschneck richten. Er war mir bei fachlichen und organisatorischen Fragen während des gesamten Fortgangs der Arbeit stets ein äußerst kompetenter und hilfreicher Ansprechpartner. Vor allem für seine große Geduld und das Korrekturlesen meiner Arbeit danke ich ihm vielmals.

Genauso herzlich danke ich Frau Dipl.-Biol. Kathrin Bauer für die intensive Einarbeitung und ihre freundschaftliche Betreuung während der Laborversuche. Sie war mir in dieser Zeit und auch beim schriftlichen Abschluss der Arbeit eine überaus wertvolle und lieb gewonnene Hilfe.

Zuletzt möchte ich vor allem meiner Familie und meiner Partnerin für die liebevolle Unterstützung und Motivation während der letzten Jahre danken. Gerade durch sie wurde mir das Studium der Zahnmedizin und diese Dissertation erst ermöglicht, in dem beruhigenden Gefühl, stets ihre bedingungslose Unterstützung und ihr volles Vertrauen genießen zu dürfen.

## **Erklärung zum Promotionsverfahren**

Ich, Andreas Kinateder, geboren am 22.05.1986 in München, erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen. Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

---

(Ort, Datum)

---

(Unterschrift)