

**Untersuchung der Beteiligung der Rho-Kinase und der
reaktiven Sauerstoffspezies an der
Autophagie-Regulation durch Druckbelastung
in PDL-Zellen**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
Bonn

Miriam Hardt, geb. Dickten

aus Wuppertal

2025

Angefertigt mit der Genehmigung
der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. Andreas Jäger
2. Gutachter: PD Dr. Benedikt Eggers

Tag der Mündlichen Prüfung: 19.12.2024

Aus der Zahnklinik und Poliklinik für Kieferorthopädie

Für meine Familie

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	7
1. Einleitung	11
1.1 Das Parodont	11
1.1.1 Aufbau und Funktion des Parodonts	11
1.1.2 Parodontale Ligamentzellen	14
1.2 Die kieferorthopädische Zahnbewegung	15
1.2.1 Phasen der Zahnbewegung	17
1.2.2 Biologie der kieferorthopädischen Zahnbewegung	19
1.2.3 Signaltransduktion von mechanischen Reizen in PDL-Zellen	21
1.2.4 Rho-Kinase	22
1.3 Die Autophagie	25
1.3.1 An der Autophagie-Regulation beteiligte Signalwege	29
1.3.2 ROS als „Second Messenger“	34
1.3.3 Autophagie und Biomechanik	40
1.4 Autophagie und Zahnbewegung	43
1.5 Zielsetzung	44
2. Material und Methoden	45
2.1 Material	45
2.1.1 Zellen	45
2.1.2 Medien und Puffer	45
2.1.3 Chemikalien und Reagenzien	47
2.1.4 Verbrauchsmaterialien	49
2.1.5 Geräte	50
2.2 Methoden	52
2.2.1 Zellkultur	52
2.2.2 Stimulation der Zellen	53
2.2.3 Färbung	56

2.2.4	Durchflusszytometrische Analyse	57
2.2.5	Statistische Auswertung	58
3.	Ergebnisse	59
4.	Diskussion	66
4.1	Zusammenfassung der Ergebnisse	66
4.2	Methodendiskussion	66
4.2.1	Druckstärken	66
4.2.2	Zeitpunkte	67
4.2.3	In-vitro-Modell	68
4.3	Ergebnisdiskussion	69
4.3.1	Autophagie unter Druck	69
4.3.2	ROCK-Inhibitor Auswirkungen auf die Autophagie	71
4.3.3	ROS-Inhibitor Auswirkungen auf die Autophagie	73
4.4	Schlussfolgerung	75
5.	Zusammenfassung	77
6.	Abbildungsverzeichnis	79
7.	Tabellenverzeichnis	80
8.	Literaturverzeichnis	81
9.	Danksagung	97

Abkürzungsverzeichnis

2-ME	2-Methoxyestradiol
Abb.	Abbildung
AKT	Proteinkinase B
AMP	Adenosinmonophosphat
AMPK	AMP-aktivierte Proteinkinase
ATG	Autophagy-related gene (engl.), Autophagie-Gen
ATP	Adenosintriphosphat
Bcl-2	B-cell lymphoma 2 (engl.)
BECN1	Beclin-1
BNIP3	BCL2 and adenovirus E1B 19-kD-interacting protein 3 (engl.)
CAMKK2	Ca ²⁺ - Calcium/Calmodulin-abhängige Proteinkinase 2
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CMA	Chaperon-vermittelte Autophagie
COX	Cyclooxygenase
CQ	Chloroquine
DEPTOR	DEP domain containing mTOR interacting protein
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium (engl.)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DPBS	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (engl.)
ECM	extracellular matrix (engl.), extrazelluläre Matrix
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERK	extracellular-signal regulated kinase (engl.)
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FAK	focal adhesion kinase (engl.), Fokale Adhäsionskinase
FBS	fetal bovine serum (engl.), fötales Rinderserum
FSC	Forward Scatter (engl.), Vorwärtsstreulicht
GABARAP	γ-aminobutyric acid receptor-associated protein (engl.)

GAP	GTPase-activating protein (engl.), GTPase-aktivierende Protein
GATE-16	Golgi-assoziiierter ATPase-Enhancer von 16kDa
GPCR	G protein coupled receptor (engl.), G-Protein gekoppelter Rezeptor
GDP	Guanosindiphosphat
GEF	guanine-nucleotide exchange factor (engl.), Guanin- Nukleotid-Austauschfaktoren
GF	growth factor (engl.), Wachstumsfaktor
GTP	Guanosintriphosphat(n)
HIF1	hypoxia-inducible factor (engl.), Hypoxie-induzierter Faktor 1
HOPS	homotypic fusion and protein sorting (engl.)
HPdLF	human periodontal ligament fibroblasts (engl.), humane parodontale Ligamentfibroblasten
IKK	I κ B-Kinasen
IL	Interleukin
IP3	Inositoltrisphosphat
JNK1	c-Jun N-terminale Proteinkinase 1
K	Kontrolle/Kontrollgruppe
kDa	Kilodalton
LC3	Microtubule-associated protein light chain 3 (engl.), Mikrotubuli-assoziierte leichte Kette 3
MAPK	Mitogen-activated protein kinase (engl.)
MLC	Myosin light chain (engl.), Myosin-leichte Kette
mLST8	mammalian lethal with Sec13 Protein 8 (engl.)
MMP	Matrix -Metalloprotease
mTOR	mechanistic target of Rapamycin (engl.)
MYPT1	myosin phosphatase unit target 1 (engl.), Myosinphosphatase - Zieluntereinheit 1
NAC	N-Acetyl-L-cystein

NK	Negativkontrolle/Negativkontrollgruppe
NOX	NADPH-Oxidase
NRF2	nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (engl.)
OPN	Osteopontin
OPG	Osteoprotegerin
OTM	orthodontic tooth movement (engl.), kieferorthopädische Zahnbewegung
PAS	Phagophore Assembly Site (engl.)
PDL	Parodontales Ligament
PDLSCs	PDL-Stammzellen
PDL-Zellen	parodontale Ligamentzellen
PE	phosphatidylethanolamine (engl.), Phosphatidylethanolamin
PEITC	β-Phenylethylisothiocynat
PH	pleckstrin homology (engl.)
PI	Phosphatidylinositol
PI3P	phosphatidylinositol 3-phosphate (engl.)
PI3K	class III phosphoinositide 3-kinase (engl.)
PI3KC3	Klasse-III-Phosphatidylinositol-3-Kinase
PK	Positivkontrolle/Positivkontrollgruppe
PRAS40	mammalian lethal with Sec13 Protein 8 (engl.)
PTEN	Phosphatase und Tensin Homolog
RANK	receptor activator of nuclear factor- κB (engl.)
RANKL	receptor activator of nuclear factor- κB ligand (engl.)
RAPTOR	regulatory-associated protein of mTOR (engl.)
Ras	Rat sarcoma (engl.)
ROCK	rho-associated protein kinase (engl.)
ROS	Reactive oxygen species (engl.)
RTK	rezeptor tyrosine kinase (engl.), Rezeptortyrosinkinase
SNAP29	synaptosomal-assoziierte Protein 29

SNAREs	soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment receptors (engl.)
SQSTM1	Sequestosom 1
SSC	Side Scatter (engl.), Seitwärtsstreulicht
STX17	Syntaxin17
Tab.	Tabelle
TIGAR	TP53-induzierter Glykolyse- und Apoptose- Regulator
TFEB	Transkriptionsfaktor EB
TNF	Tumornekrosefaktor, Tumor Necrosis Factor (engl.)
TSC	tuberous sclerosis complex 2 (engl.)
ULK1	Unc-51-ähnliche Kinase 1
VAMP8	Vesikel-assoziierte Membranprotein 8
Vps15	Vacuolar protein sorting 15 (engl.)
Vps34	Vacuolar protein sorting 34 (engl.)
WIP1	WD-repeat protein interacting phosphoinositide 2 (engl.), WD-Repeat-Domain-Phosphoinositid-interagierendes Protein 2
Y-27632	Trans - 4 - [(1R) -Aminoethyl] -N- (4 - Pyridinyl) Cyclohexancarboxamidihydrochlorid

1. Einleitung

1.1 Das Parodont

Der Begriff Parodont ist eine Ableitung aus den griechischen Wörtern παρά (pára; „bei, neben, entlang“) und ὀδούς (odous; „Zahn“) und beschreibt eine entwicklungsgeschichtliche, biologische sowie funktionelle Einheit (Müller, 2012). Diese schließt vier unterschiedliche Gewebearten, die Gingiva, das Wurzelzement, den Alveolarknochen und das parodontale Ligament (PDL) ein (Cho und Garant, 2000; Müller, 2012).

Das Parodont ist eine dynamische Struktur, welche eine einzigartige Gefäßanordnung, ein Lymphsystem und ein hochspezialisiertes nervöses Netzwerk besitzt (Hassell, 1993). Beim Menschen sind pathologische Veränderungen des Parodonts weit verbreitet. Entzündlich- und nicht-entzündlich bedingte Erkrankungen des Zahnfleisches und des Zahnhalteapparates werden unter dem Begriff Parodontopathien beschrieben (Hellwig, 2006). Eine wichtige Rolle spielt das Parodont auch bei kieferorthopädischen Behandlungen, welche anhand von Zahnbewegungen bestehende Zahnfehlstellungen therapieren und somit Funktion und Ästhetik verbessern.

Um pathologische parodontale Veränderungen erkennen, verstehen und behandeln zu können ist die Kenntnis über Anatomie und Funktion des gesunden Parodonts unerlässlich (Hellwig, 2006).

1.1.1 Aufbau und Funktion des Parodonts

Die vier Gewebearten des Parodonts lassen sich in einen Weichgewebeanteil, die Gingiva und das PDL, sowie in einen Hartgewebeanteil, den Alveolarknochen und das Wurzelzement gliedern (Müller, 2012).

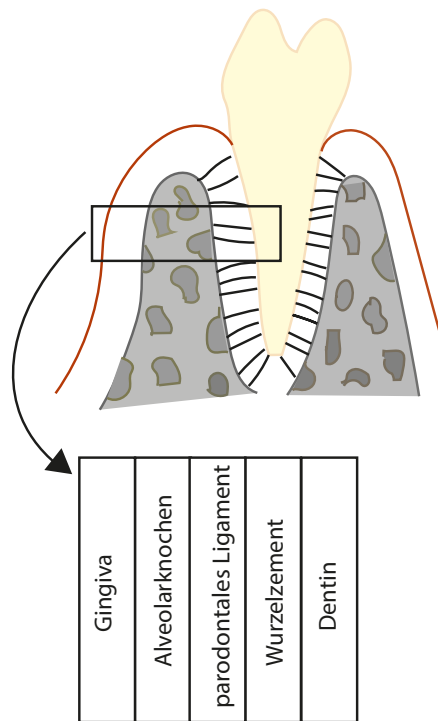


Abb. 1: Aufbau des Parodonts. Das Parodont wird auch als Zahnhalteapparat bezeichnet und umfasst die den Zahn umgebenden Gewebe. Zu den vier verschiedenen Strukturen zählen Gingiva, Alveolarknochen, parodontales Ligament und Wurzelzement

Die Hauptaufgaben des Zahnhalteapparates bestehen in der Verankerung der Zähne in der knöchernen Alveole, der Dämpfung von Kaukräften und der Abwehr von äußeren Noxen (Hellwig, 2006). Nach traumatischen Insulten kommt dem Parodont auch eine reparierende Aufgabe zu (Müller, 2012). Zudem hat das Parodont in Form von Schmerz- und Druckwahrnehmung, sowie von Tastempfinden sensorische Funktionen (Müller, 2012). Die Eigenschaft des Parodonts durch Knochenremodelierung Zahnstellungsänderungen zu

ermöglichen, wird zum Beispiel bei der kieferorthopädischen Behandlung genutzt (Memmert et al., 2019). Um eine kieferorthopädische Therapie planen, durchführen und Schädigungen des Parodonts vorbeugen zu können, ist auch in diesem Fachbereich der Zahnmedizin die Kenntnis über die Anatomie und Funktion dieser Gewebe Voraussetzung. Bei Inspektion der Mundhöhle ist nur die Gingiva als Weichgewebeanteil des Parodonts klinisch sichtbar (Hassell, 1993). Das klinisch gesunde Zahnfleisch ist blassrosa, girlandenförmig, weist keine Gefäßzeichnung auf, ist straff, fest und flach auslaufend (Plagmann, 1998).

Das PDL zählt neben der Gingiva zu dem Weichgewebeanteil des Parodonts und entwickelt sich präeruptiv aus einem lockeren nicht strukturierten Bindegewebe, welches anfänglich die sich bildende Wurzel umgibt (Plagmann, 1998). Das PDL ist ein gut vaskularisiertes, zell- und faserreiches Bindegewebe, das sich im Parodontalspalt zwischen Wurzelzement und Alveolarknochen erstreckt und so den Zahn federnd in der Alveole verankert (Müller, 2012). Seine Breite variiert zwischen 100 bis 400 µm und es gilt aufgrund seiner Zellvielfalt, der umfassenden Blutversorgung und dem neuronalen Netzwerk als heterogenes Gewebe (De Jong et al., 2017). Als Strukturmerkmal des PDLs ist der bindegewebige Anteil, vorwiegend bestehend aus kollagenen Fasern, auch Sharpeyische Fasern genannt, und zu einem kleineren Teil bestehend aus Oxytalanfasern, anzusehen (Plagmann, 1998). Schon vor dem Zahndurchbruch beginnt bei den Milch- und Zuwachszähnen die Faserbildung im koronalen Bereich, gefolgt von den nach apikal liegenden Bereichen, wobei es während des fortschreitenden Zahndurchbruchs zu Veränderungen in der Verlaufsrichtung der Fasern kommt (Plagmann, 1998). Im Gegensatz dazu, bilden sich die apikalen Faserbündel bei den Ersatzzähnen erst nach Erreichen der Okklusionsebene und unter funktioneller Belastung (Plagmann, 1998). Die vorherrschende Zellpopulation im PDL sind die humanen parodontalen Ligamentzellen (PDL-Zellen) (De Jong et al., 2017). Neben den unterschiedlichen Zellen besteht das PDL auch aus einem extrazellulären Kompartiment mit kollagenen und nicht kollagenen Matrixbestandteilen (Nanci und Bosshardt, 2006). Die extrazelluläre Matrix (extracellular matrix, ECM) besteht zum größten Anteil, etwa 75 %, aus Kollagen Typ I, zu 20 % aus Kollagen Typ III und zu 5 % aus Kollagen Typ V (Butler et al., 1975; Hudson et al., 2017). Die Umsatzrate und Umbaukapazität des PDLs ist im

Vergleich zu der von Gingiva und Knochen um das Vielfache erhöht (Hirashima et al., 2019).

Ein weiterer Bestandteil des Parodonts ist der Alveolarknochen, welcher sich vom Zahnsäckchen ableitet und somit ektomesenchymalen Ursprungs ist (Müller, 2012). Der Alveolarknochen unterliegt aufgrund seiner hohen Sensibilität gegenüber externen mechanischen Reizen einem ständigen Umbauprozess, wodurch dieser als labilste Struktur des Parodonts angesehen wird (Monje et al., 2015). Die vorherrschenden Zellpopulationen im Alveolarknochen sind Osteoblasten, Osteoklasten und Osteozyten (Hellwig, 2006). Die andere Hartgewebsstruktur des Parodonts ist das Wurzelzement. Es ist ein hartes, avaskuläres Bindegewebe, welches die Zahnwurzel bedeckt und dem Dentin aufliegt (Nanci und Bosshardt, 2006). Es entstammt ebenfalls dem eigentlichen Zahnsäckchen und ist somit ektomesenchymalen Ursprungs (Müller, 2012).

1.1.2 Parodontale Ligamentzellen

Das PDL verbindet durch die Sharpeyischen Fasern, bestehend aus Kollagen Typ I, das Wurzelzement mit dem Alveolarknochen (Jiang et al., 2016). Als Hauptaufgaben sind zum einen die Übertragung und Absorption von mechanischem Stress, die nutritive Versorgung von Zement, Alveolarknochen und dem PDL selbst, sowie die sensorischen Funktionen, die Homöostase-Eigenschaft und die Reparatur von geschädigtem Gewebe zu nennen (Jiang et al., 2016; Hirashima et al., 2019). Da das PDL nicht mineralisiert ist, kann es sich bei einer Kompression des Zahnhalteapparates verformen und so die mechanische Belastung abfangen (Naveh et al., 2012). Das PDL gilt aufgrund der Anzahl verschiedener Zellpopulationen als komplexes Gewebe und als Depot für Zellen, welche an der Bildung von Zement, PDL selbst und Alveolarknochen beteiligt sind. (Nanci und Bosshardt, 2006). Zu den enthaltenen Zelltypen zählen unter anderem fibroblastische Subpopulationen, Osteoblasten, Osteoklasten, Zementoblasten, Endothelzellen, Malassez' Epithelzellreste, Odontoklasten, undifferenzierte mesenchymale Zellen, perivaskuläre Zellen und

Epithelzellen (Nanci und Bosshardt, 2016). Ferner sind im PDL auch Abwehrzellen in Form von Makrophagen und Mastzellen zu finden (Jiang et al., 2016).

Die im PDL mit 50 – 60 % vorherrschenden Zellen sind die PDL-Zellen, welche aufgrund ihrer verschiedenen Subpopulationen als heterogene Klasse gelten (Jiang et al., 2016; Ullrich et al., 2019). Ihren Ursprung haben die PDL-Zellen aus ektomesenchymalen Zellen des Schädelneuralkamms (Barczyk et al., 2013). Zu ihren Funktionen zählt die Regulation der Gewebekomöostase und die Bildung kollagener Strukturproteine (Ullrich et al., 2019). Zudem sind sie bei der Regulation der angeborenen Immunabwehr von Bedeutung und spielen ebenfalls eine wichtige Rolle bei kieferorthopädischen Zahnbewegungen (orthodontic tooth movement, OTM) (Ullrich et al., 2019).

Studien zufolge werden kieferorthopädische Kräfte, die während einer Therapie auf die Zähne wirken, auf das PDL und die PDL-Zellen weitergeleitet, wodurch mechanosensitive Rezeptoren und Signalkaskaden aktiviert werden und dies wiederum zu entsprechenden Gewebeantworten führt (Memmert et al., 2019; Ullrich et al., 2019).

Für labortechnische Untersuchungen und die biologische Grundlagenforschung zur OTM werden häufig diese mechanosensiblen PDL-Zellen herangezogen.

1.2 Die kieferorthopädische Zahnbewegung

Durch Übermittlungen aus der griechischen und römischen Ära kann man heute sagen, dass schon zu dieser Zeit ein schönes Lächeln und eine regelmäßige Anordnung der Zähne von Wichtigkeit war und somit schon damals der Wunsch nach Korrektur von Zahnfehlstellungen bestand (Krishnan und Davidovich, 2015). In der Antike begann man durch Fingerdruck eine Fehlstellung zu korrigieren, wobei sich die Frage auftat, warum sich Zähne unter mechanischer Belastung bewegen lassen (Krishnan und Davidovich, 2015). Im späten 19. Jahrhundert (1888) stellte *Farrar* die These auf, dass sich der Alveolarknochen durch die kieferorthopädisch wirkende Kraft verbiegt oder resorbiert und es dadurch zu einer Zahnbewegung kommt (Krishnan und Davidovich, 2015). Die Knochenresorption als

Erklärung für Zahnbewegungen wurde 1901 und 1904 von *Sandstedt* in seiner Publikation histologisch an Hundezähnen untersucht und bewiesen (Krishnan und Davidovich, 2015). Heutzutage wird die OTM als Knochenumbau in Form einer Kopplung von Knochenneubildung und Knochenresorption nach der Druck-Spannungs-Theorie angesehen (Li et al., 2018). Wirkt zum Beispiel durch eine festsitzende kieferorthopädische Apparatur eine mechanische Kraft auf einen Zahn, so ändert dieser binnen weniger Sekunden nach Kraftapplikation seine Position im Parodontalspalt und es kommt zu einer Auslenkung des Zahnes, wodurch sich im Parodont Druck-Areale und Dehnungs-Areale bilden (Li et al., 2018; Miliati et al., 2019). Neben dem PDL, welches sich histologisch in den Kompressionsbereich und den Spannungsbereich gliedern lässt, werden weitere Regionen wie Zahnwurzel, Alveolarknochen, ECM, Gingiva und die Zellen der Zahnpulpa von orthodontischen Kräften beeinflusst (Krishnan und Davidovich, 2009; Zainal Ariffin et al., 2011). Im Druckbereich werden die Blutgefäße komprimiert und passen sich der applizierten Kraft an, sodass es zu einer Desorganisation des PDLs, einer verminderten Zellreplikation und einer verminderten Faserproduktion kommt (Miliati et al., 2019; Rygh, 1973). Infolge der Kraftapplikation auf der Kompressionsseite verändert sich der Blutfluss und die Mikroumgebung des PDLs, was in einer akuten Entzündungsreaktion mit Sekretion von unterschiedlichen Entzündungsmediatoren und anschließendem Knochenumbau resultiert (Nimeri et al., 2013). Während sich der Blutfluss im Kompressionsbereich verringert, wird der Blutfluss in den Zugarealen aufrechterhalten oder sogar erhöht. (Li et al., 2018). Als Reaktion auf die Dehnung der PDL-Faserbündel erfolgt eine Stimulation mit Zunahme der Zellreplikation, was wiederum zu Knochenneubildung in den Spannungsarealen führt (Krishnan und Davidovich, 2006).

Über die Größe und Dauer der applizierten Kraft kann die OTM reguliert werden (Nimeri et al., 2013). Um eine möglichst effiziente Umpositionierung ohne Schädigung von Zahn oder PDL erreichen zu können, ist eine optimale Kraftapplikation essenziell (Krishnan und Davidovich, 2006). Schon 1932 untersuchte *Schwarz* die Reaktionen des Gewebes auf unterschiedliche Kraftgrößen an Hundezähnen und klassifizierte mit diesen Ergebnissen kieferorthopädische Kräfte in vier biologische Wirkungsgrade (Krishnan und Davidovich, 2015). Kräfte, welche so minimal sind, dass sie zu keiner Zahnbewegung führen, zählen

zum 1. biologischen Wirkungsgrad. Der 2. biologische Wirkungsgrad umfasst Kräfte, die unterhalb des im PDL vorherrschenden Blutdrucks liegen und damit die Blutzirkulation im PDL weiter gewährleisten. Kräfte des 3. und 4. biologischen Wirkungsgrades werden als stark oder sehr stark eingestuft und sind höher als der kapillare PDL-Blutdruck, wodurch es aufgrund von Zirkulationsstörungen zu Nekrosen, Parodontalschäden und Resorptionen der Zahnwurzel kommen kann (Wichelhaus, 2012). *Schwarz* erkannte, dass der im PDL herrschende Blutdruck 15-20 mmHg beträgt und schlussfolgerte ein optimales Kraftniveau von 20-26 g zu 1 cm² Wurzeloberfläche bei kieferorthopädischen Behandlungen (Krishnan und Davidovich, 2015). Jüngere Literatur (Gonzales et al., 2008) empfiehlt ebenfalls leichtere Kräfte von 10-50 Centinewton (cN), da diese im Vergleich zu höheren Kräften (100 cN) eine effektivere Zahnbewegung unter weniger Resorptionen der Zahnwurzel versprechen (Wichelhaus, 2012).

Je nach Kraftangriffspunkt sind unterschiedliche Formen der Zahnbewegung wie zum Beispiel Kippungen, Rotationen, Extrusionen und Intrusionen, sowie Translationen möglich.

1.2.1 Phasen der Zahnbewegung

Die OTM kann unter Einbeziehung der verschiedenen aufeinanderfolgenden Reaktionen, in drei Phasen gegliedert werden:

- Initiale Dämpfung, Anfangsphase
- Hyalinisation, Verzögerungsphase
- Resorptionsphase, Beschleunigungsphase

Die erste Phase der OTM dauert etwa 24-48 Stunden an und ist durch eine schnelle, in wenigen Sekunden eintretende, Zahnauslenkung gekennzeichnet (Zainal Ariffin et al., 2011). Dabei kann die Auslenkung des Zahnes zwischen 0,4 bis 0,9 mm betragen (Wichelhaus, 2012).

Die zweite Phase der OTM ist die Verzögerungsphase, bei der keine oder nur eine geringe Zahnverschiebung stattfindet (Krishnan und Davidovich, 2015). Diese Phase kann je nach Quelle zwischen 20-30 Tage oder 2-10 Wochen andauern und ist durch PDL-Hyalinisierung

und Nekrose, welche durch eine unterbrochene Blutzirkulation und eine darauffolgende Hypoxie entstehen, charakterisiert (Feller et al., 2015; Wichelhaus, 2012). Im Spannungsbereich des PDLs vergrößern sich ruhende Osteoblasten und beginnen mit der Produktion von Knochenmatrix (Andrade, 2013). Eine weitere Zahnbewegung erfolgt erst, wenn es zu einer vollständigen zellulären Entfernung des nekrotischen Gewebes gekommen ist (Krishnan und Davidovich, 2015). Etwa 30 Tage nach der ersten Kraftapplikation setzt die dritte Phase, die durch eine allmählich oder plötzlich gesteigerte Bewegungsrate gekennzeichnet ist und den größten Anteil der OTM ausmacht, ein (Zainal Ariffin et al., 2011).

Neueren Studien zufolge setzt sich die beschleunigte Zahnbewegung der dritten Phase in einer vierten Phase (Linearphase) fort, womit dritte und vierte Phase die reale Zahnbewegung umfassen (Pilon et al., 1996; Von Böhl et al., 2004; Krishnan und Davidovich, 2006).

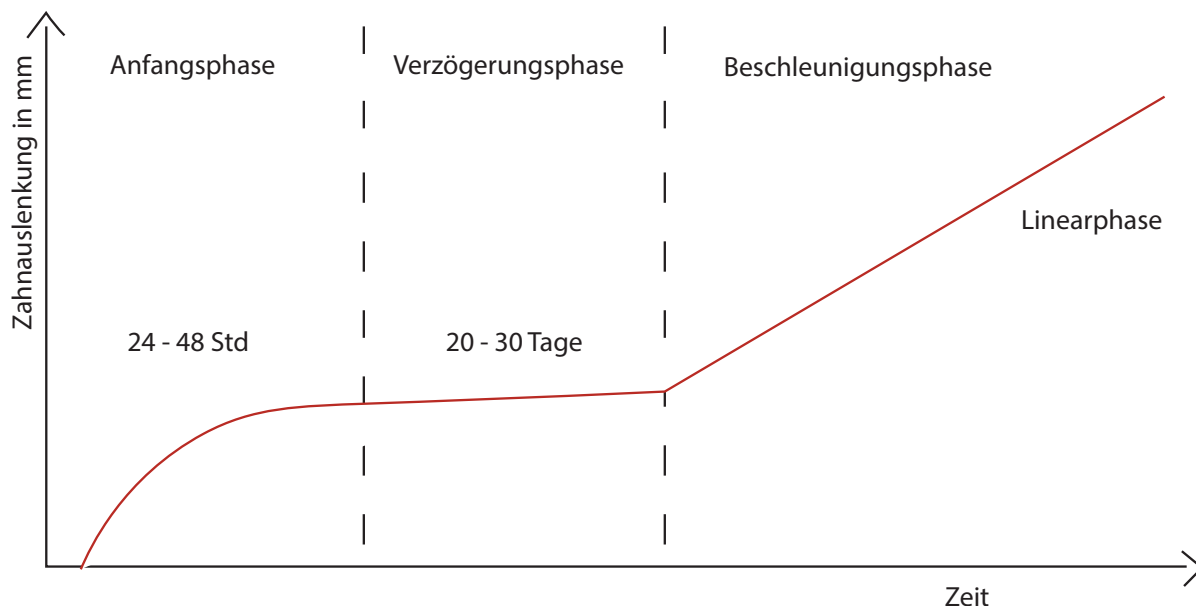


Abb. 2: Phasen der Zahnbewegung. Nach Kraftapplikation kommt es in der Anfangsphase zu einer schnell auftretenden Zahnauslenkung. In der darauffolgenden Verzögerungsphase ist höchstens eine sehr geringe bis keine Zahnbewegung zu vermerken. Erst etwa einen Monat nach der ersten Kraftanwendung erfolgt in der Beschleunigungsphase eine

merkliche und gesteigerte Zahnauslenkung. Diese beschleunigte Zahnbewegung geht in die Linearphase über (modifiziert nach Wichelhaus, 2012)

Zusammengefasst liegt der Bewegung des Zahnes ein Osteoklasten- und Osteoblasten-vermittelter Knochenumbau zugrunde (Feller et al., 2015). Aus zellulärer Sicht übernehmen die PDL-Zellen eine bedeutende Rolle bei der OTM und werden in der kieferorthopädischen Grundlagenforschung intensiv untersucht (Ullrich et al., 2019). Die molekularen Mechanismen, mit welchen die PDL-Zellen unter mechanischer Belastung an der OTM beteiligt sind, wurden bereits durch einige Studien dargelegt (He et al., 2004; Kanzaki et al., 2002; Ullrich et al., 2019). So führt eine Verformung der PDL-Zellen durch Druck- und Zugkräfte zu einer Verarbeitung und Weiterleitung dieser mechanischen Signale. Dieser Prozess wird Mechanotransduktion genannt und ist dafür zuständig, dass bei mechanisch verformten PDL-Zellen mechanosensitive Rezeptoren in ihrer Zellmembran stimuliert werden (Ullrich et al., 2019). Auf die Aktivierung der unterschiedlichen Rezeptoren folgen dann verschiedene aktivierte Signalwege und molekulare Reaktionen, welche zu einer Knochenremodellierung und somit zur OTM führen (Ullrich et al., 2019). Die nacheinander ablaufenden Gewebeveränderungen während der OTM können histologisch durch spezifische Biomarker charakterisiert und den jeweiligen Phasen der Zahnbewegung zugeordnet werden (Zainal Ariffin et al., 2011).

1.2.2 Biologie der kieferorthopädischen Zahnbewegung

Nach von Böhl et al. (2004) definiert sich die OTM als das Ergebnis einer biologischen Reaktion auf eine Störung des physiologischen Gleichgewichts im dentofazialen Komplexes durch eine von extern applizierte Kraft. Diese ausgeübte Kraft wirkt sowohl auf mineralisierte (Alveolarknochen) als auch auf nicht mineralisierte (PDL/Gingiva) Gewebe des Parodonts und ruft umfangreiche zelluläre und molekulare Veränderungen hervor (Andrade et al., 2014).

Die ersten Zell- und Gewebeveränderungen, wie Verschiebung von PDL-Flüssigkeiten sowie Zell- und Matrixverzerrungen, beginnen in der Anfangsphase unmittelbar nach

Krafteinwirkung und führen zu Wechselwirkungen zwischen diesen Gewebeelementen (Krishnan und Davidovich, 2006).

Durch die mechanisch hervorgerufene Zahnauslenkung entsteht im PDL ein Kompressionsbereich, in dem die verringerte Mikrozirkulation des Gefäßsystems zu einer Ischämie und Hypoxie mit anschließender Hyalinisierung und Nekrose führt (Feller et al., 2015; Andrade et al., 2014). Histologisch ist die Hyalinisierung durch das Vorhandensein von Zellen mit pyknotischen Kernen und zellfreien Bereichen zu erkennen, wobei das Ausmaß an Hyalinisation eine definierte Beziehung zur Kraftgröße aber nicht zur Geschwindigkeit der OTM aufweist (Krishnan und Davidovich, 2006).

Die für die OTM besonders bedeutsamen PDL-Zellen vermitteln über die Expression verschiedener Signalmoleküle zell-molekulare Reaktionen, welche durch Gewebeveränderungen zu einer Bewegung der Zähne führen. Im Kompressionsbereich folgt auf die mechanische Verformung der PDL-Zellen eine Aktivierung von mechanosensitiven Rezeptoren und Ionenkanälen, die im Anschluss eine PDL-vermittelte sterile inflammatorische Reaktion auslösen (Ullrich et al., 2019).

Aufgrund der entstandenen aseptischen Entzündungsreaktion, welche durch parodontale Vasodilatation und Migration von Leukozyten aus den Kapillaren charakterisiert ist, werden biologische Mediatoren, wie unter anderem Interleukine (IL), Tumornekrosefaktoren (TNF), Matrix-Metalloproteasen (MMP) und Wachstumsfaktoren (GF) von den Migrationszellen als auch von den PDL-Zellen produziert (Feller et al., 2015; Krishnan und Davidovich, 2006; Zainal Ariffin et al., 2011). Die PDL-Zellen weisen als Antwort auf die sterile Inflammation eine erhöhte Expression von IL-6, IL-8 und Cyclooxygenase-2 (COX) auf (Ullrich et al., 2019). Die Freisetzung der verschiedenen biologischen Mediatoren führt zu Knochenumbauprozessen des Alveolarknochens in Form von Knochenresorption auf der Kompressionsseite und Knochenapposition auf der Zugseite und damit zu einer gesteuerten Zahnbewegung (Andrade et al., 2014). Weitere wichtige exprimierte Mediatoren sind das Osteopontin (OPN), das Osteoprotegerin (OPG), der Receptor Activator of nuclear factor- κ B (RANK) und der Receptor Activator of nuclear factor- κ B Ligand (RANKL), welche unter anderem über das RANK-RANKL-OPG-System eine

Feinregulierung der Knochenmodulation und das Ausmaß der Knochenresorption regulieren (Feller et al., 2015; Hofbauer und Rachner, 2010; Murshid, 2017). Nach *Jacobs et al.* (2010) wird angenommen, dass der Prozess des Knochenumbaus bei der OTM zu einem Großteil von Osteozyten gesteuert wird. Dagegen postulieren die Studien von *He et al.* (2004), *Kanzaki et al.* (2002) und *Ullrich et al.* (2019) eine bedeutende Rolle der PDL-Zellen bei der OTM durch molekulare und zelluläre PDL-vermittelte und gesteuerte Prozesse.

1.2.3 Signaltransduktion von mechanischen Reizen in PDL-Zellen

Lebende Zellen sind permanent mechanischen Impulsen ausgesetzt und sind in der Lage Veränderungen in ihrer Mikroumgebung zu erfassen, darauf zu reagieren und weiterzuleiten (Geng und Wang, 2016).

Als zelluläre Signaltransduktion werden Prozesse angesehen, bei denen extrazelluläre und mechanische Signale in intrazelluläre molekulare Signale umgewandelt werden (Tietze et al., 2020; Tschumperlin, 2011). Durch intrazelluläre Signalkaskaden werden die mechanischen Impulse verarbeitet und regulieren maßgeblich überlebenswichtige Zellfunktionen wie Proliferation, Differenzierung, Migration, Autophagie und Apoptose (Tietze et al., 2020).

Da es sich bei der OTM um einen mechanischen Stimulus handelt, wird die Signalweiterleitung und -verarbeitung in den Zellen als Mechanotransduktion bezeichnet (Wichelhaus, 2012). Nach *Krishnan und Davidovich* (2015) wird die Mechanotransduktion durch ein komplexes Zusammenspiel von ECM, Transmembran-Integrin-Rezeptoren, Zytoskelettstrukturen und Signalmolekülen vermittelt.

Jüngstem Wissensstand zufolge läuft die zelluläre Signalübertragung auf unterschiedlichen Wegen, wie über den Mitogen-aktivierte-Proteinkinase-Kaskadeweg (MAPK), den Wnt/ β -Catenin-Weg, über Integrine und G-Proteine ab (Premaraj et al., 2011; Guo et al., 2020; Wichelhaus, 2012).

Des Weiteren kann eine Signaltransduktion auch über mechanosensitive- oder Calcium-spezifische Ionenkanäle, sowie über stressabhängige Ionenkanäle, wie den Adenosintriphosphat (ATP)- abhängigen P2X7-Rezeptor, erfolgen (Ridone et al., 2019; Wichelhaus, 2012). Als Second Messenger wird den Reaktiven Sauerstoffspezies (Reactive oxygen species, ROS) eine wichtige regulatorische Aufgabe von intrazellulären Signalwegen zugeschrieben (Brieger et al., 2012).

Weitere wichtige Komponenten der Mechanotransduktion sind sekundäre Botenstoffe wie Inositoltrisphosphat (IP3) und cyclisches Adenosinmonophosphat (cAMP), sowie intrazelluläre Signalmoleküle wie Rho, Rat sarcoma (Ras), Extracellular-signal Regulated Kinases (ERK) und SMADs. Neben Rho gilt sein Regulationsmolekül Rho-assoziierte Proteinkinase (rho-associated protein kinase, ROCK) als ein weiterer bedeutender Baustein in der Biologie der Signaltransduktion in PDL-Zellen.

1.2.4 Rho-Kinase

ROCK ist ein Enzym, welches zu den Serin-Threonin-Kinasen gehört, ein Effektor der kleinen GTPase Rho ist und eine essenzielle Rolle bei der Zellteilung, Zellkontraktion, Zellpolarität und -motilität, sowie bei der Genexpression und vor allem bei der Signaltransduktion spielt (Amano et al., 2010; Feng et al., 2016). Das Molekulargewicht beträgt in etwa 160 Kilodalton (kDa) (Shimokawa et al., 2016). Mit ROCK1 (auch ROCK I, ROK β oder p160ROCK) und ROCK2 (auch ROCK II, ROK α) existieren zwei bekannte Isoformen der Proteinkinase, die eine Homologie von 64 % in ihrer primären Aminosäuresequenz aufweisen und in verschiedenen Geweben exprimiert werden (Julian und Olson, 2014; Liu et al., 2015; Wettschureck und Offermanns, 2002). Die Gene der ROCK befinden sich beim Menschen auf dem Chromosom 18 für ROCK1, sowie Chromosom 2 für ROCK2 (Julian und Olson, 2014; Shimokawa et al., 2016). Strukturell können die ROCKs in eine N-terminale katalytische Kinasedomäne, eine zentrale Coiled-Coil-Domäne und in eine C-terminale Pleckstrin Homology (PH)-Domäne gegliedert werden (Amano et al., 2010; Matsui et al., 1996). Die höchste strukturelle Übereinstimmung zwischen den beiden Isoformen liegt in der Kinasedomäne vor und beträgt, je nach Autor, zwischen 83 % (Amando et al., 2010) und 92 % (Julian und Olson, 2014). Die zentralen Coiled-Coil-Domänen von ROCK1 und ROCK2, mit 55 % am geringsten homolog, weisen

die wichtige Bindungsstelle für die GTPase Rho auf (Julian und Olson, 2014; Wettschureck und Offermanns, 2002).

Eine Aktivierung der ROCKs erfolgt über den Verlust ihrer Autoinhibition aufgrund der Bindung von aktivierten Rho-Proteinen an die Bindungsstelle innerhalb der α -helikalen Coiled-Coil-Domäne (Liu et al., 2015).

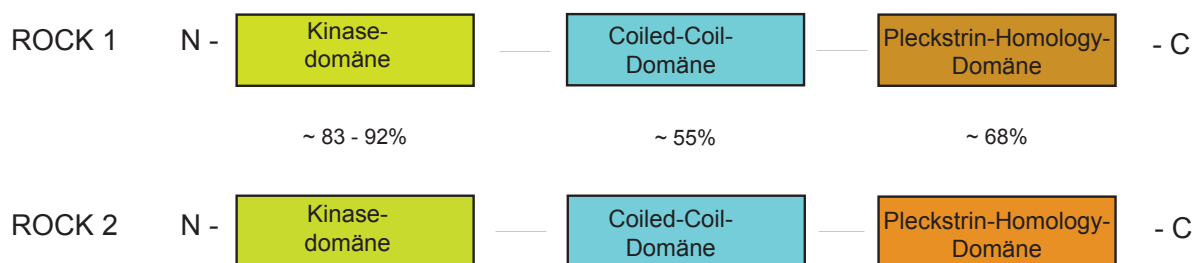


Abb. 3: Struktureller Aufbau der Isoformen von ROCK1 und ROCK2 und ihre Homologien. Die Struktur der ROCKs kann in die Hauptbestandteile N-terminale katalytische Kinasedomäne, zentrale Coiled-Coil-Domäne und C-terminale PH-Domäne gegliedert werden. Die Homologien der einzelnen Abschnitte unter ROCK1 und ROCK2 liegen zwischen 55 % und 92 % (modifiziert nach Julian und Olson, 2014)

Rho-Proteine gehören zur Unterfamilie der GTPasen, haben ein Molekulargewicht von 20-30 kDa und können in 20 Mitglieder unterteilt werden, wobei Rho A, B und C auf Aminosäureebene hoch homolog sind (Liu et al., 2015; Narumiya und Thumkeo, 2018). GTPasen, auch kleine G-Proteine genannt, sind eine Protein-Superfamilie von Guanosintriphosphatasen mit mehr als 100 Mitgliedern und einer molekularen Masse von 20-40 kDa, die als molekulare Schalter an nahezu allen Aspekten der Zellbiologie beteiligt sind (Reiner und Lundquist, 2018; Takai et al., 2001). Aufgrund ihrer unterschiedlichen Sequenzen ist eine Einteilung in fünf Subfamilien, Ras, Rho, Rab, Sar1/Arf und Ran möglich (Reiner und Lundquist, 2018).

Die kleinen G-Proteine haben zwei interkonvertierbare Formen, eine inaktive Guanosindiphosphat (GDP)-gebundene und eine aktive Guanosintriphosphat (GTP)-

gebundene Konformation, um in Signaltransduktionsketten als „Ein-“ und „Ausschalter“ fungieren zu können (Etienne-Manneville und Hall, 2002; Takai et al., 2001). Die Aktivierung und Inaktivierung der kleinen G-Proteine können als ein Zyklus angesehen werden.

Bedingt durch ein Signal wird Rho durch Guanin-Nukleotid-Austauschfaktoren (guanine-nucleotide exchange factor, GEF) veranlasst das gebundene GDP freizusetzen und GTP zu binden (Liu et al., 2015; Takai et al., 2001). Die GEFs selbst werden wiederum durch Rezeptortyrosinkinasen (receptor tyrosine kinases, RTK), G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (G protein coupled receptors, GPCRs), Zytokine und Integrine aktiviert (Hartmann et al., 2015). Die Inaktivierung zu GDP erfolgt durch die Abspaltung eines Phosphat-Restes des gebundenen GTPs durch das GTPase-aktivierende Protein (GTPase-activating protein, GAP) (Takai et al., 2001).

Da es sowohl eine Rho-abhängige, als auch eine Rho-unabhängige Aktivierung gibt, kann die ROCK auch durch Lipide wie die Arachidonsäure über ihre Bindung an die PH-Domäne aktiviert werden (Amando et al., 2010; Araki et al., 2001; Shimokawa et al, 2016). Eine Rho-unabhängige Aktivierung ist auch über die spezifische Spaltung und Entfernung der autohemmenden Domäne von ROCK1 durch Caspase-3 und von ROCK2 durch Granzym B möglich (Julian und Olson, 2014; Shimokawa et al, 2016).

Beim Rho/ROCK-Signalweg führt die aktivierte ROCK zu einer Phosphorylierung seiner verschiedenen Substrate, zu denen unter anderem die Myosin-leichte-Kette (Myosin light chain, MLC), die LIM-Kinasen, Ezrin/Radixin und Moesin, Adducin, die Phosphatase und Tensin Homolg (PTEN) und Myosinphosphatase-Zieluntereinheit 1 (myosin phosphatase unit target 1, MYPT1) zählen (Amano et al., 2010; Hartmann et al., 2015). Durch die Phosphorylierung des breiten Spektrums an Zielsubstraten können wichtige zelluläre Prozesse wie Muskelkontraktion, Stressfaseranordnung, die Formation von fokalen Adhäsionen, Zytokinese, sowie Zellproliferation, -migration und -polarität reguliert werden (Amano et al., 2010; Hartmann et al., 2015).

In der Forschung ist die bedeutende Rolle des Rho/ROCK-Signalwegs in Hinblick auf die Mechanotransduktion in Zellen bereits erkannt und studiert worden. Die Arbeiten von *Holle und Engler* (2011) und *Martino et al.* (2018) legen dar, dass das Rho/ROCK-System eines der Hauptakteure in der zellulären Mechanosensorik ist und über aktiviertes Rho die mechanische Signalausbreitung und - Verarbeitung kontrolliert werden kann.

Die zentralen regulatorischen Funktionen der ROCKs und ihre Zusammenhänge werden in der Forschung durch das Einsetzen von Inhibitoren noch weiter im Detail untersucht. Um die Beteiligung der ROCK an der Autophagie-Induktion zu untersuchen, wurde in der vorliegenden Arbeit der Trans-4-[(1R) -Aminoethyl] -N-(4-Pyridinyl) Cyclohexancarboxamidhydrochlorid ROCK- Inhibitor (Y-27632) eingesetzt. Die inhibierende Wirkung des zellpermeablen kleinen Moleküls Y-27632 beruht dabei auf einer selektiven Hemmung von ROCK durch Bindung an die ATP-Bindungsstelle (Wang et al., 2017).

1.3 Die Autophagie

Vor über 50 Jahren wurde der Begriff Autophagie, welcher aus dem Griechischen abgeleitet wird und so viel wie „Selbstessen“ bedeutet, durch wissenschaftliche Beobachtungen von lysosomalen Abbaus intrazellulärer Strukturen in der Rattenleber von Christian de Duve geprägt (Deter und De Duve, 1967; Glick et al., 2010). Seither werden auslösende Faktoren, der Mechanismus und die Regulierung der Autophagie untersucht. Nach *Levine und Yuan* (2005) kann Autophagie als ein zellulärer Selbstverdauungsprozess angesehen werden, der bei Veränderungen der Zellhomöostase und bei Unterversorgung mit Nährstoffen und Wachstumsfaktoren zum einen das Überleben der Zelle ermöglicht, zum anderen aber auch zum Zelltod führen kann. Zu den auslösenden Faktoren zählen unter anderem Hypoxie, Entzündungen, DNA-Schäden, metabolische Unterversorgungen und mechanische Belastungen (Hernández-Cáceres et al., 2021). Die Autophagie gilt als Schutz der Zelle vor stressinduzierten Schäden, indem nicht funktionelle und unzureichende Zellstrukturen erkannt und einer Degradation zugeführt werden (King, 2012). Somit dient diese Reinigungsfunktion dem Erhalt der zellulären Homöostase, einer

verstärkten Belastbarkeit der Zelle gegenüber Umweltfaktoren, sowie einer Förderung des Zellüberlebens (Hernández-Cáceres et al., 2021). Der zelluläre Abbau- und Recyclingprozess, der in allen Eukaryoten hoch konserviert ist, kann in Säugetierzellen in drei Haupttypen, in die Mikroautophagie, die Makroautophagie und in die Chaperon-vermittelte Autophagie (chaperone-mediated autophagy; CMA) gegliedert werden (Parzych und Klionsky, 2014). Obwohl bei den drei Autophagietypen der Mechanismus unterschiedlich ist, gilt das Lysosom bei allen als letzte katabolische Abbaustanz (Kirchner et al., 2019).

Bei der Mikroautophagie ist das Hauptmerkmal die Aufnahme und Bindung der autophagischen Ladung anhand einer Invagination der Membran, welche aufgrund ihrer charakteristischen Architektur und Funktion als „autophagische Röhre“ bezeichnet wird (Li et al., 2012; Schuck, 2020). Nach Internalisierung der Ladung in kleine Vesikel, lösen sich diese nach innen in das Lumen ab und werden lysosomal abgebaut (Kaushik und Cuervo, 2018).

Ein weiterer Recyclingprozess der Zelle kann über die CMA erfolgen. Dabei wird autophagische Ladung durch einen Erkennungsmechanismus spezifisch registriert und ein Chaperon-Substrat-Komplex wird gebildet (Kirchner et al., 2019; Kaushik und Cuervo, 2018; Yang et al., 2019). Dieser Komplex gelangt dann an die Lysosomenmembran, wo eine Entfaltung und Translokation des Substrates ins Lumen folgt (Kaushik und Cuervo, 2018; Parzych und Klionsky, 2014; Yang et al., 2019). Schließlich wird das entfaltete Substrat durch lysosomale Proteasen abgebaut (Pajares et al., 2018).

Der bekannteste und am meisten untersuchte Autophagietyp ist die Makroautophagie, welche in einer Vielzahl an Studien und auch in dieser Arbeit im Folgenden als Autophagie bezeichnet wird. Der Autophagie-Prozess kann allgemein in folgende sieben Phasen: die Initiation, die Nukleation, die Elongation, die Autophagosomenverschmelzung, die Maturation, die Fusion zum Autolysosom und in die Degradation unterteilt werden (Hernández-Cáceres et al., 2021).

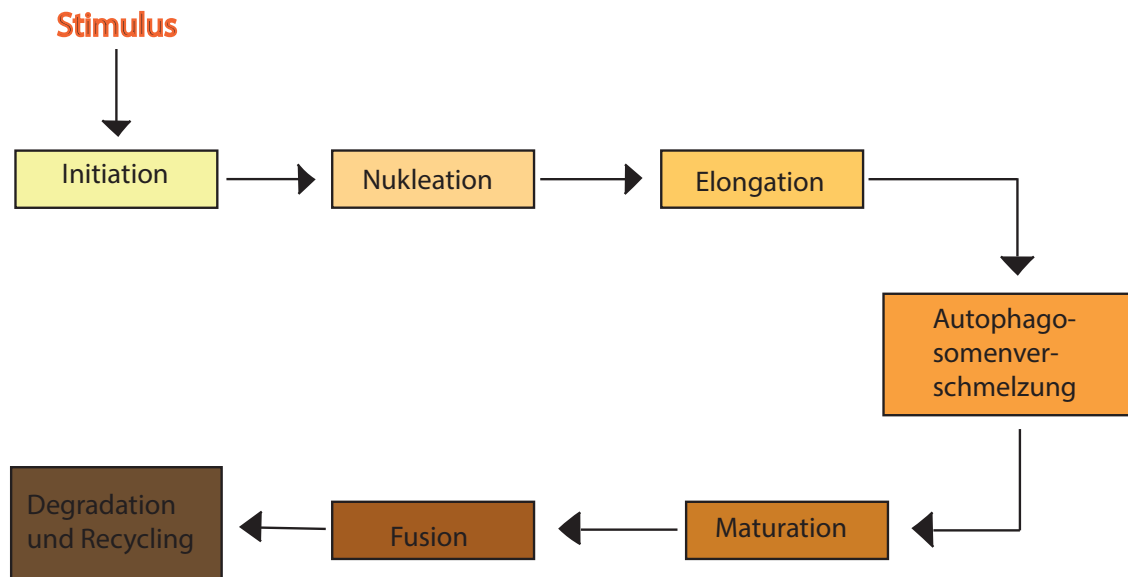


Abb. 4: Prozessphasen der Autophagie. Die Autophagie kann nach Einsetzen eines Stimulus bis hin zum lysosomalen Abbau in die folgenden sieben Phasen gegliedert werden: Initiation, Nukleation, Elongation, Autophagosomenverschmelzung, Maturation, Fusion und Degradation

Unterscheiden lässt sich die nicht-selektive Autophagie unter Hungerbedingungen, von der selektiven Autophagie, welche speziell für den Abbau von beschädigten oder überzähligen Komponenten aktiviert wird (Feng et al., 2014; Kaushik und Cuervo, 2018). Nach stressinduzierter Einleitung des autophagischen Abbauprozesses bildet sich eine Phagophore, eine aus einer Lipiddoppelschicht bestehende Isolationsmembran, und dehnt sich weiter aus um abzubauenende zelluläre Komponenten aufnehmen und umschließen zu können (Glick et al., 2010). Ist die Ladung vollständig umgeben, verschmilzt die Phagophore zu einem kugelförmigen Doppelmembran-Autophagosom (Parzych und Klionsky, 2014). Im nächsten Schritt der Autophagie verschmelzen Autophagosom und Lysosom, indem die äußere Membran des Autophagosoms mit der lysosomalen Membran

zu einem Autolysosom fusioniert (Glick et al., 2010; Parzych und Klionsky, 2014). Nach Fusionierung erfolgt der lysosomale Abbau der eingeschlossenen Ladung, sowie der inneren autophagosomalen Membran durch das hydrolytische Milieu und die darauffolgende Freisetzung einzelner Nebenprodukte ins Zytoplasma, um der Zelle diese zur Wiederverwertung bereitstellen zu können (Dikic und Elazar, 2018). Da die Autophagie überzählige und defekte zelluläre Komponenten abbaut, ist dieser Mechanismus von grundlegender Bedeutung für die Gesundheit von Zellen und Organismen (Schuck, 2020). Über die Funktion der Sicherung der Zellhomöostase hinaus ist die Autophagie ein Prozess zur Adaptation der Zelle an Hungersituationen, ausgelöst durch verminderte extrazelluläre Nährstoffe oder verminderte intrazelluläre Metabolitenkonzentrationen (Chiara Maiuri et al., 2007). Kommt es zu einer fehlregulierten oder verminderten Autophagie, so kann dies zu ernsthaften Zell- und Organismusschäden führen und das Auftreten verschiedener Krankheiten wie Krebs, Neurodegenerationen, Myopathien und Herz-Kreislauf-Erkrankungen begünstigen (Kim et al., 2011; King, 2012; Levine und Kroemer, 2019; Mizushima und Komatsu, 2011).

Neben der Autophagie gilt die Apoptose, die Form des programmierten Zelltodes, als ein wichtiger Prozess der zellulären „Selbsterstörung“, wobei der Zusammenhang zwischen beiden Formaten sehr komplex und essentiell für die physiologische Regulation des Zellumsatzes eines Organismus ist (Chiara Maiuri et al., 2007; Mariño et al., 2014). Während die Autophagie eine adaptive Reaktion auf unterschiedliche Stressoren ist und durch den Recyclingprozess den Zelltod umgehen möchte, führt die Apoptose durch ausbleibende Zellreifung und -teilung letztendlich zum Absterben der Zelle (Chiara Maiuri et al., 2007; D'Arcy, 2019).

Studien belegen, dass bestimmte stressassoziierte Signalwege sowohl Autophagie als auch Apoptose regulieren, weshalb die Autophagie häufig der Apoptose vorausgeht und bei einem, in Ausmaß und Dauer, kritischen Wert übersteigenden Stimulus die Zelle in die Apoptose leitet (Chiara Maiuri et al., 2007). Die Untersuchungen von *Mariño et al.* (2014) und *Young et al.* (2012) belegen ein enges Wechselspiel zwischen beiden Mechanismen. So kann eine induzierte Autophagie zur Hemmung der Apoptose, aber auch zu ihrer

Induktion führen und eine induzierte Apoptose kann zu einer Inaktivierung der Autophagie führen.

1.3.1 An der Autophagie-Regulation beteiligte Signalwege

Um ihren komplexen Selbstverdauungsprozess zu regulieren, bedient sich die Zelle unterschiedlicher Signalwege, welche zum einen Teil miteinander konvergieren, sich zum anderen Teil aber auch wechselseitig beeinflussen können. Eine zentrale Bedeutung bei der Autophagie-Regulierung spielt dabei die hochkonservierte Kinase mechanistic target of Rapamycin (früher: mammalian target of Rapamycin, mTOR) (Memmert et al., 2019; Wang und Zhang, 2019). Neben einer Vielzahl beteiligter Komponenten ist mTOR als Schlüsselement für die Balance zwischen Zellwachstum und Selbstverdauung bei physiologischen Bedingungen und unter pathophysiologischem Zellstress anzusehen (Jung et al., 2010).

Die Serin/Threonin-Protein Kinase mTOR führt im aktiven Zustand zu einer Hemmung der Autophagie (Jung et al., 2010). Die Kinase ist in zwei verschiedenen Proteinkomplexen, mTORC1 und mTORC2, vorzufinden, wobei nur mTORC1 an der direkten Regulierung der Autophagie beteiligt ist (Dikic und Elazar, 2018). Der mTORC1-Multiproteinkomplex wird neben mTOR aus den Proteinen regulatory-associated protein of mTOR (RAPTOR), mammalian lethal with Sec13 Protein 8 (mLST8), proline-rich Akt substrate of 40 kDa (PRAS40) und DEP domain containing mTOR interacting protein (DEPTOR) gebildet (Wang und Zhang, 2019). Neben dem Schlüsselregulator mTOR sind eine Reihe von autophagiebezogenen Genen (autophagy-related genes, ATGs) an den Autophagie-Signalwegen beteiligt, so sind die meisten ATGs unter anderem für eine effiziente Autophagosomen-Bildung erforderlich (Glick et al., 2010; Levine und Kroemer, 2019). Im Jahr 2016 wurden insgesamt 40 ATGs in der Hefe identifiziert und scheinen mit nur einigen Ausnahmen auch in Pflanzen und Säugetieren konserviert (Kim et al., 2019). Neben ihrer Beteiligung bei der Bildung von Autophagosomen wird auch jeder andere Schritt des Autophagieprozesses in hohem Maße von einer Vielzahl der ATGs koordiniert, so

konfigurieren sich diese ATGs zu Clustern und können je nach gebildetem ATG-Komplex an den verschiedenen Stadien der Autophagie ihre Funktion ausüben (Kim et al., 2019).

Ist die Zelle mit ausreichend Nährstoffen versorgt, so ist mTOR aktiv und reguliert über Hemmung des Unc-51 Like Autophagy Activating Kinase 1 (ULK1) -Komplexes die Autophagie negativ (Kim und Guan, 2015). Der ULK1-Komplex, als direktes Ziel von mTOR, besteht neben der ULK1-Kinase aus den regulatorischen Proteinen ATG13, ATG101 und FIP200 (Jung et al., 2009; Wong et al., 2013). Die Hemmung der Komplex-Aktivität geschieht dabei über eine mTOR-vermittelte Phosphorylierung von ATG13 und ULK1 (Jung et al., 2009; Jung et al., 2010).

Bei vorliegendem Nährstoffmangel wird die mTOR-Aktivität gehemmt und führt zu einer Dephosphorylierung von ULK1 und ATG13, was wiederum zur Aktivierung des ULK1-Komplexes und zur Initiierung der Autophagie führt (Jung et al., 2010; Reiling und Sabatini, 2006; Jung et al., 2010). Neben mTOR und ULK1 gilt die Adenosinmonophosphat (AMP)-aktivierte Proteinkinase (AMP activated protein kinase, AMPK) als ein weiterer Hauptregulator. AMPK dient dabei als ein wichtiger Energiesensor um die Energiehomöostase im Einklang zuhalten (Kim et al., 2011). Ein erhöhter AMP- oder verringerter intrazellulärer ATP-Spiegel, sowie ein bestehender Glukosemangel führen zu einer Aktivierung der AMPK, worauf hin diese mTOR hemmt und dadurch ULK1 und folglich die Autophagie initiiert wird (Kim et al., 2011; Wong et al., 2013). Nach *Kim et al.* (2011) aktiviert AMPK bei Energiemangel ULK1 durch Phosphorylierung auch direkt.

Ist die Autophagie eingeleitet, folgt als nächste Phase die Entstehung der Phagophore und die ATG-Protein-gesteuerte Bildung des Autophagosoms. Nach *Nishimura und Tooze* (2020) sind neben den ATGs verschiedene Lipide als Hauptbestandteile der dynamischen autophagischen Membranumgestaltung involviert. Entscheidend für die Autophagosomenbildung sind das Phosphatidylinositol-3-Phosphat (phosphatidylinositol 3-phosphate, PI3P) und das Phosphatidylethanolamin (phosphatidylethanolamine, PE) (Nishimura und Tooze, 2020). Die für die Phagophoren-Expansion bedeutendsten ATGs

sind die der ATG8-Familie, zu denen die Unterfamilien Mikrotubuli-assoziierte leichte Kette 3 (microtubule-associated protein light chain 3, LC3), γ -Aminobuttersäure-Rezeptor-assoziiertes Protein (γ -aminobutyric acid receptor-associated protein, GABARAP) und Golgi-assoziiierter ATPase-Enhancer von 16 kDa (GATE-16) zählen (Dikic und Elazar, 2018; Slobodkin und Elazar, 2013).

Auf molekularer Ebene ist das Protein Beclin-1 (BECN1) eine wichtige Komponente in der Signalkaskade, da es die Phagophoren-Formation und die Rekrutierung von ATGs an die Phagophore Assembly Site (PAS) steuert und damit die Elongation der Phagophore einleitet (Lippai und Szatmári, 2017). BECN1 bildet mit Vacuolar protein sorting 34 (Vps34), Vacuolar protein sorting 15 (Vps15) und ATG14 den Klasse-III-Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3KC3) -Komplex (Menon und Dhamija, 2018). Aufgrund der Phosphorylierung von Bestandteilen dieses Komplexes beginnt die Keimbildung der Phagophore durch die lokale PI3P-Produktion am Omegasom, einer charakteristischen Struktur aus der Membran des endoplasmatischen Retikulums (ER) (Dikic und Elazar, 2018). Vps34, eine Klasse-III-Phosphoinositid-3-Kinase (class III phosphoinositide 3-kinase, PI3K) phosphoryliert sein Substrat Phosphatidylinositol (PI) zu PI3P, welches für die Elongation der Phagophore und für die Rekrutierung von ATGs von hoher Bedeutung ist (Glick et al., 2010; Levine und Kroemer, 2019; Russell et al., 2013).

Neben der kontrollierten Keimbildung durch BECN1 und Vps34 am ER sind weitere Komplexe und Prozessschritte an der Maturation zum Autophagosomen beteiligt (Glick et al., 2010).

So ist der multimere ATG5-ATG12-ATG16L-Komplex, der nach seiner Entstehung mit der Phagophore assoziiert, zu nennen. Dieser Komplexbildung gehen einige Schritte voraus, wie die ATP-abhängige Aktivierung von ATG12 durch ATG7, die darauffolgende Übertragung von ATG12 auf ATG10, die kovalente Bindung von ATG12 an ATG5 und die Vervollständigung des Komplexes durch die Bindung des ATG16L-Dimers an ATG5/ATG12 (Glick et al., 2010).

Daneben hat das WD-Repeat-Domain-Phosphoinositid-interagierendes Protein 2

(WIPI2) die Fähigkeit ATG16L direkt zu binden und somit den ATG5-ATG12-ATG16L-Komplex zur PAS zu rekrutieren, wo sich mehrere Konjugate zu einem großen Proteinkomplex zusammenfügen können (Dikic und Elazar, 2018).

Der zweite bedeutende Prozess ist die Umwandlung des freien zytosolischen LC3 in eine membranverankerte LC3-II-Form (Dikic und Elazar, 2018). LC3 wird dabei zuerst durch ATG4 proteolytisch gespalten, sodass LC3-I entsteht, welches wiederum von ATG7 aktiviert, auf ATG3 übertragen und mit PE zu LC3-II konjugiert wird (Glick et al., 2010; Tanida et al., 2004). Studien zufolge korreliert das Vorkommen von LC3-II mit der Anzahl reifer Autophagosomen (Albanese et al., 2019). Die Expansion der Phagophore beruht dann auf einem Zusammenspiel zwischen den zwei Ubiquitin-ähnlichen Proteinkonjugationssystemen ATG5-ATG12-ATG16L und der ATG8-Untereinheiten LC3/GABARAP mit PE (Dikic und Elazar, 2018; Levine und Kroemer, 2019).

Während sich die Phagophore verlängert, biegen sich die Enden leicht nach innen, um die charakteristische kugelförmige Struktur zu bilden und die abzubauen Ladung umschließen zu können. Der genaue Mechanismus ist noch nicht bekannt.

Akkumulierenden Hinweisen zufolge ist die Auswahl der Ladung ein selektiver Prozess, der durch die Interaktion von LC3-II als Rezeptor an der expandierenden Membran und dem Adaptermolekül Sequestosom 1 (SQSTM1) zustande kommt (Glick et al., 2010). Nach Abschluss der Elongation und anschließender Versiegelung der Phagophorenmembran ist das Autophagosom entstanden. Im nächsten Schritt erfolgt die Reifung und Vorbereitung zur Fusion mit einem Lysosom zum Autolysosom. Dabei wird das Autophagosom an Mikrotubuli gebunden und in die Region der Lysosomen transportiert (Yu et al., 2018).

Während der Maturation des Autophagosoms werden die ATGs peu à peu von der äußeren Membran entfernt und müssen am Ende für eine erfolgreiche Fusion vollständig abgelöst sein (Dikic und Elazar, 2018; Lőrincz und Juhász, 2020). Nach der Dissoziation von PI3P, ATG8/LC3 und anderen ATGs durch ATG4, werden diese recycelt und der Zelle für die weitere Phagophorenbildung und -expansion zur Verfügung gestellt (Reggiori und Ungermann, 2017). Um die Fusion einleiten zu können werden die benötigten Komponenten und Motoren an die Membran rekrutiert. An der Verschmelzung sind diverse

Elemente, wie die soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment receptors (SNAREs), Syntaxin17 (STX17), das synaptosomal-assoziierte Protein 29 (SNAP29), sowie das Vesikel-assoziierte Membranprotein 8 (VAMP8), der homotypic fusion and protein sorting (HOPS) -Komplex, kleine GTPasen und Motor- und Adapterproteine beteiligt (Lörincz und Juhász, 2020; Yu et al., 2018).

Nach erfolgter Fusion wird die zu autophagierende Ladung durch lysosomale saure Hydrolasen abgebaut und die Nebenprodukte für den Aufbau von Makromolekülen und zur Energiegewinnung wiederverwertet (Glick et al., 2010). Der komplizierte Autophagie-Mechanismus kann neben dem komplexen Zusammenspiel zwischen den Hauptregulatoren AMPK, mTOR und ULK1 auch über weitere Signalwege und Regulatorproteine koordiniert werden.

Nach *Menon und Dhamija* (2018) ist der PI3K-III-Komplex ein ebenso wichtiger Signalweg, welcher den Autophagie-Fluss und die Homöostase zwischen Autophagie und Apoptose reguliert.

Während das Protein BECN1 essenziell für eine erhöhte autophagische Aktivität ist, wirkt sich B-Cell Lymphoma 2 (Bcl-2) negativ auf die Autophagie aus. Bcl-2 gilt als anti-apoptotisches Protein und übt aufgrund seiner Wechselwirkung mit BECN1 auch eine anti-autophagische Funktion aus (Xu und Qin, 2019).

Ist Bcl-2 an BECN1 gebunden und bildet den Bcl-2-BECN1-Komplex, wird dadurch die BECN1-abhängige Autophagie gehemmt (Xu und Qin, 2019). Dieser Effekt kann infolge einer Bcl-2-Phosphorylierung durch die c-Jun N-terminale Proteinkinase 1 (JNK1) aufgehoben werden, sodass BECN1 aus dem Komplex dissoziiert und die Autophagie induzieren kann (Xu und Qin, 2019).

Ein weiterer wichtiger Induktor der Autophagie ist das Makrolid-Immunsuppressivum Rapamycin, welches durch die Hemmung von mTOR die Autophagie in Gang setzt (Arriola Apelo und Lamming, 2016; Sotthibundhu et al., 2016).

Auch die Antimalariamedikamente Chloroquine (CQ) und Hydrochloroquine greifen, und zwar negativ, in die Autophagie ein und werden in den letzten Jahren als vielversprechende

Pharmazeutika in der Krebsbehandlung erforscht (Kimura et al., 2013). CQ wirkt erst zu einem späteren Prozessschritt der Autophagie und trägt zu einer verminderten Lysosomenfunktion bei, indem es nach Eintritt in das Lysosom protoniert wird und durch einen Anstieg des pH-Wertes zu weniger sauren, degradierenden Bedingungen führt (Kimura et al., 2013). Zudem hemmt CQ die Fusion zu Autophagolysosomen, weshalb es zu einer Ansammlung der Vorstufe, also dem Autophagosom, kommt (Blawat et al., 2020). Diese Autophagosomen-Akkumulation macht man sich bei labortechnischen Untersuchungen der Autophagie zu Nutze.

Eine Termination der Autophagie kann auch über verschiedene Rückkoppelungsmechanismen und durch die Einleitung der Apoptose erfolgen (Antonioli et al., 2017).

1.3.2 ROS als „Second Messenger“

ROS sind eine Gruppe von heterogenen Sauerstoffverbindungen, welche durch eine partielle, unvollständige Reduktion von elementarem Sauerstoff entstehen (Brenner, 2019). Neben der mitochondrialen Atmung, bei der ROS als Nebenprodukte entstehen, werden sie außerhalb der Mitochondrien durch den membrangebundenen Enzymkomplex NADPH-Oxidase (NOX) oder zusätzlich durch andere intrazelluläre Enzyme, wie COX und Lipoxygenasen, oder auch durch Umweltbelastungen gebildet (Finkel, 2011; Halasi et al., 2013; Li et al., 2015). ROS sind kleine, kurzlebige Moleküle mit einer hohen Reaktionsfähigkeit, die ungepaarte Valenzelektronen oder instabile Bindungen aufweisen und daher zum Teil auch als Sauerstoffradikale bezeichnet werden (Brieger et al., 2012; Li et al., 2015; Li et al., 2016). Zu den bekanntesten ROS-Mitgliedern zählen das Superoxid-Anion (O_2^-), Wasserstoffperoxid (H_2O_2), das Hydroxyl-Radikal ($OH\cdot$), das Hypochlorid - Anion (OCl^-), sowie das Singulett-Sauerstoff-Molekül (1O_2) (Brenner, 2019; Brieger et al., 2012; Li et al., 2016).

In früheren Jahren wurde den ROS eine alleinige zellschädigende Funktion zugesprochen, wobei man sie nun auch anhand der neusten Erkenntnisse als wichtige physiologische Regulatoren von intrazellulären Signalwegen sieht (Brieger et al., 2012; Finkel, 2011). So

werden essenzielle zelluläre Parameter wie Entzündungsreaktionen, Wachstumsfaktorregulation, Autophagie, Apoptose und auf Systemebene der Blutdruck, kognitive Funktionen und die Immunfunktion durch ROS-Signale reguliert (Brieger et al., 2012; Finkel, 2011). Durch ROS wird die Produktion und Freisetzung von Zytokinen erhöht, weshalb sie in der Lage sind Entzündungsreaktionen aufrechtzuerhalten und den Körper durch Immunantworten vor Krankheitserregern zu schützen, wobei eine übermäßige ROS-Produktion mit dementsprechender hochregulierten Entzündungsreaktion jedoch zu Gewebeschäden führen kann (Li et al., 2016).

So resultiert eine erhöhte ROS-Konzentration in der Zelle in oxidativem Stress und die ROS können leichter mit Zellkomponenten wie Proteinen, Lipiden, Kohlenhydraten und Nukleinsäuren reagieren und oxidieren, wodurch dysregulierte Signale zu irreversiblen funktionellen Veränderungen und des Weiteren zu einer Vielzahl humaner Krankheiten, wie unter anderem Krebs, neurologischen Störungen, Herz-Kreislauf-Erkrankungen und chronischen Entzündungen, führen können (Brieger et al., 2012; Finkel, 2011).

Um sich vor Zellschäden durch oxidativen Stress zu schützen, bedient sich die menschliche Zelle an Antioxidantien, welche entweder bereits gebildete ROS direkt abfangen, die ROS-Bildung hemmen oder ROS-spezifische Störungen beseitigen können (Li et al., 2016).

Die oxidative Homöostase wird durch eine in der Waage gehaltene Wechselwirkung zwischen ROS und Antioxidantien aufrechterhalten, wobei ein Anstieg an ROS, eine Abnahme an Antioxidantien oder eine Kombination aus beidem zu einem unterschiedlich stark ausgeprägten Grad an oxidativem Stress führt (Li et al., 2015; Li et al., 2016).

Bei einem kurzweiligen Anstieg des ROS-Spiegels geht man aufgrund der zelleigenen antioxidantischen Abwehrmechanismen von keiner relevanten Zellschädigung aus, sondern man nimmt an, dass ROS über Redoxsignalisierung physiologische Reaktionen induzieren (Li et al., 2016).

Kommt es zu einer vorübergehenden erhöhten ROS-Konzentration, findet die Redoxsignalisierung statt, bei der ROS als Second Messenger wirken und über Redoxreaktionen physiologische Zellantworten hervorrufen (Li et al., 2016).

Second Messenger sind kleine Moleküle, die in ihre vier Hauptgruppen, cyclische Nukleotide, wie cAMP, Lipidbotenstoffe, Ionen, wie Ca^{2+} und freie Radikale wie ROS unterteilt werden (Newton et al., 2016). Diese Botenstoffe haben die Fähigkeit extrazelluläre Stimuli nach Rezeptoraktivierung durch wenige Prozessschritte in das Zellinnere weiterzuleiten (Li et al., 2016). Zuerst erfolgt die extrazelluläre Bindung des First Messengers an einen in die Zielzell-Membran eingelassenen Rezeptor, wodurch es zu einer Rezeptoraktivierung mit darauffolgender intrazellulärer Aktivierung eines Second Messengers, sowie zu einer anschließenden Aktivierung der Effektorproteine mit ihrer codierten Zellantwort kommt (Li et al., 2016; Newton, 2016).

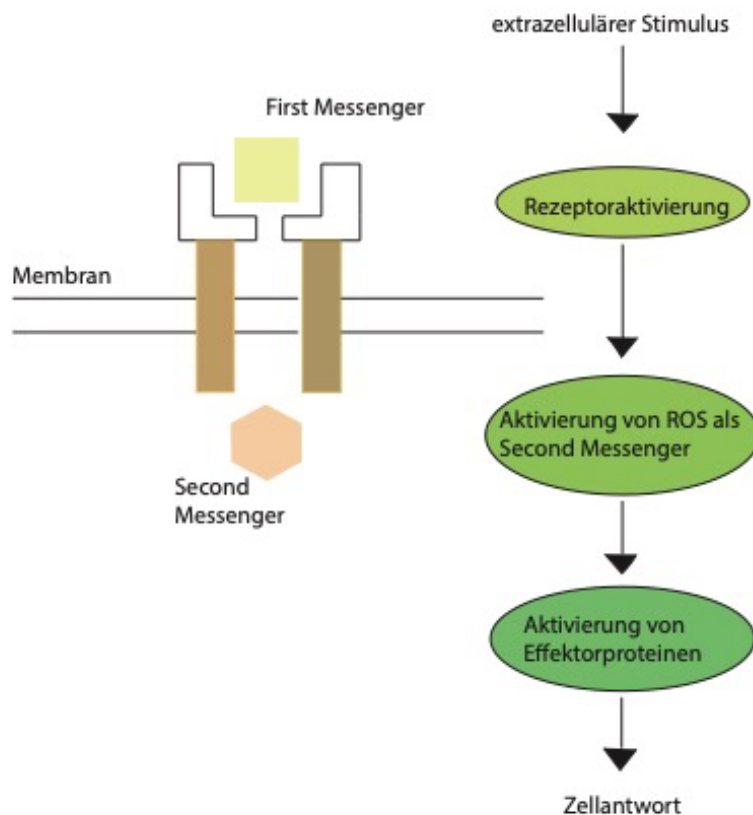


Abb. 5: ROS als Second Messenger. Durch die extrazelluläre Bindung eines First Messengers an einen Transmembranrezeptor erfolgt die Aktivierung dessen. Die Rezeptoraktivierung führt sodann zur Aktivierung eines intrazellulären Second Messengers,

welcher wiederum darauffolgende Effektorproteine aktiviert. Als Ergebnis dieser Signalkaskade steht die entsprechende Zellantwort (modifiziert nach Li et al., 2016)

Jüngste Studien haben die enge Beziehung zwischen ROS, Autophagie und Apoptose untersucht. So besteht nach *Li et al.* (2015) eine enge Wechselwirkung zwischen ROS und Autophagie durch ihre gegenseitige Beeinflussung, indem eine erhöhte ROS-Konzentration zu oxidativem Stress mit folglich induzierter Autophagie und eine aktivierte Autophagie zur Verringerung der ROS führt.

Wissenschaftliche Untersuchungen legen ROS-induzierte Regulationsmechanismen der Autophagie über molekulare Signalwege, wie die ROS-FOXO3-LC3/BCL2 and adenovirus E1B 19-kD-interacting protein 3 (BNIP3)-Autophagie, ROS-nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (NRF2)-p62-Autophagie, ROS-hypoxia-inducible factor (Hypoxie-induzierter Faktor 1, HIF1)-BNIP3-Autophagie, NIX- Autophagie und die ROS-TP53-induzierter Glykolyse- und Apoptose- Regulator (TIGAR)-Autophagie dar (Li et al., 2016).

Auch *Liu et al.* (2017) untersuchten die Wechselwirkungen zwischen Autophagie und ROS und kamen zu dem Schluss, dass eine vermehrte ROS-Exposition in der Zelle sowohl zu einer Regulation der Autophagie als auch zu einer erhöhten Zelltoderate führen kann. Die autophagische Koordinierung verläuft dabei über unterschiedliche Signalwege. So sind ROS in der Lage Bcl-2 durch JNK1 zu phosphorylieren und dadurch die Trennung des BECN1-Bcl-2-Komplexes zu induzieren, wodurch das gelöste BECN1 die Autophagie aktivieren kann (Liu et al., 2017). Ferner kann eine erhöhte ROS-Konzentration durch NF- κ B-Aktivierung zu einer direkten Hochregulierung von ATGs und BECN1 führen (Liu et al., 2017). Darüber hinaus kann die Autophagosomenbildung über ein direktes Einwirken von ROS auf den ATG5-ATG12-ATG16L-Komplex positiv reguliert werden (Liu et al., 2017). Zudem führt eine ROS-induzierte Hemmung des PI3K-Proteinkinase B (AKT)-mTOR-Signalwegs zur Autophagie-Induktion (Chang et al., 2022).

Ein weiterer ROS-abhängiger Mechanismus ist die Aktivierung der AMPK, da diese durch Phosphorylierung des tuberous sclerosis complex 2 (TSC2) den TSC1-TSC2-Komplex

aktiviert, was zur Inhibierung von mTORC1, zur Stimulierung von ULK1 und zur Induktion der Autophagie führt (Liu et al., 2017).

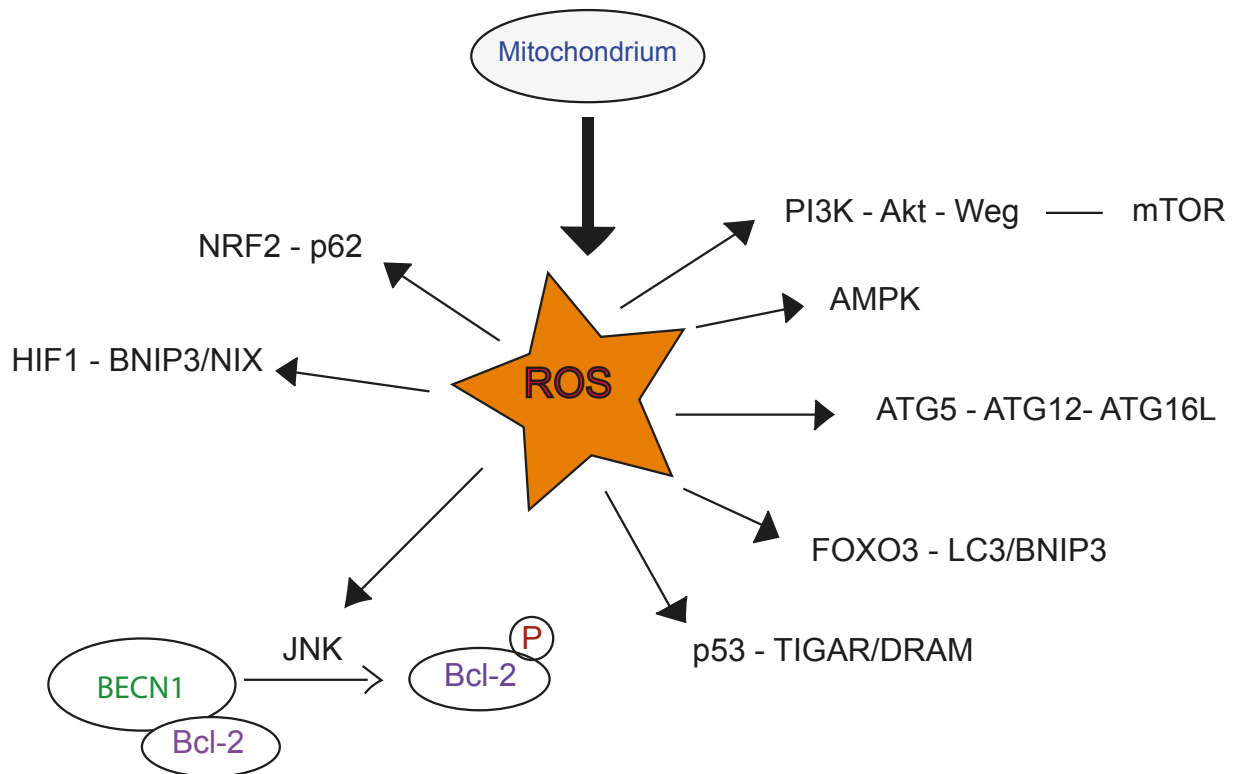


Abb. 6: ROS-induzierte Regulationsmechanismen der Autophagie. Durch die unterschiedlichen ROS-induzierten Signalwege wird die enge Wechselwirkung zwischen ROS und Autophagie deutlich. So können ROS zum Beispiel über JNK1, AMPK und den ATG5-ATG12-ATG16L-Komplex aktivierend auf die Autophagie wirken. Auch die Oxidierung von ATG4, sowie die Aktivierung der Transkriptionsfaktoren p53, FOXO3, HIF1 und NRF2 führen zu einer Autophagie-Induktion. Durch die Blockade des PI3K-AKT-Weges wird die Autophagie ebenfalls gesteigert. Eine Oxidierung von ATG3, ATG7 und ATG10 resultieren hingegen in einer reduzierten Autophagie. Die Inaktivierung von TFEB und PTEN resultiert ebenfalls in der Autophagie-Hemmung

Umgekehrt ist eine negative Regulierung der Autophagie über die Aktivierung des PI3K-AKT-Weges mit resultierender mTOR-Hemmung möglich (Liu et al., 2017).

Auch die jüngste Studie von *Chang et al.* (2022) postuliert, dass ROS eine duale Rolle bei der Autophagieregulierung spielen und diese sowohl induzieren als auch hemmen können. Dabei führt die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren wie p53, HIF1, FOXO3 und NRF2, eine Oxidierung von ATG4 und eine Inaktivierung des PI3K-AKT-Weges zu einer Autophagie-Induktion (Chang et al., 2022). Demgegenüber resultiert eine Oxidierung von ATG3, ATG7 und ATG10 in einer reduzierten Autophagie (Chang et al., 2022). Auch die ROS-induzierte Hemmung des Transkriptionsfaktors EB (TFEB) führt durch die reduzierte Biogenese von Autophagosom und Lysosom zu einer verringerten Autophagie (Chang et al., 2022). Nach *Chang et al.* (2022) wird die Autophagie zudem durch die Inaktivierung von PTEN und der daraus resultierenden negativen Regulierung des PI3K-AKT-mTOR-Weges inhibiert.

Zusammenfassend kann davon ausgegangen werden, dass durch eine adäquate ROS-Konzentration das Überleben der Zelle gesichert bleibt, während eine übermäßige ROS-Ansammlung zum Zelltod führen kann. Die gegenseitige Beeinflussung von ROS und Autophagie führt zum einen durch erhöhte ROS-Konzentrationen zur Autophagie-Induktion und zum anderen zu einer Reduktion der ROS durch die aktivierte Autophagie (Li et al., 2015).

Um die ROS-Signalwege weiter zu untersuchen und ihr Bedeutung zum Beispiel in der Krebstherapie deuten zu können, werden in der Forschung verschiedene ROS-Induktoren, als auch ROS-Inhibitoren verwendet. In klinischen Studien werden die ROS-Induktoren β -Phenylethylisothiocynat (PEITC), 2-Methoxyestradiol (2-ME), Imexon und ATN-224 schon auf ihre Wirkung bei unterschiedlichen Krebstypen getestet (Halasi et al., 2013).

Ein bereits bekannter ROS-Inhibitor ist N-Acetyl-L-Cystein (NAC). Dieser Hemmstoff ist eine synthetische Vorstufe von intrazellulärem Cystein und Glutathion und wird oftmals zur Bestätigung einer ROS-beteiligten arzneimittelinduzierten Apoptose herangezogen, da die anti-apoptotische Wirkung von NAC bekannt ist (Halasi et al., 2013). Seine hemmende Wirkung ist dabei auf eine sogenannte Radikalfängereigenschaft zurückzuführen, welche entweder direkt über das Redoxpotential von Thiolen oder sekundär über einen gesteigerten Glutathionspiegel wirkt (Halasi et al., 2013).

1.3.3 Autophagie und Biomechanik

Zellen haben die essenzielle Fähigkeit Veränderungen ihrer physischen Umgebung, zum Beispiel durch biomechanischen Stress, wahrzunehmen, darauf zu reagieren und sich anzupassen (King et al., 2011). Der Begriff der Biomechanik beschäftigt sich mit der Beziehung zwischen mechanischer Belastung einer Zelle und ihrer korrelierenden Reaktion darauf. Die Studien von *King et al.* (2011, 2012) ergaben, dass die Autophagie neben biochemischen und metabolischen Reizen auch durch biomechanische Reize ausgelöst werden kann. Weiterhin wurde gezeigt, dass biomechanischer Stress, beispielsweise in Form einer Zell-Kompression oder in Form von Scherkräften, die Autophagosomenbildung entsprechend dem Grad der Verformung induziert (King et al., 2011). Die Autophagie kann durch mechanische Prozesse auf eine direkte Weise, in Form zellulärer Signalübertragungen und eine indirekt Weise, durch Auswirkungen auf das Zytoskelett, aktiviert werden (Hernández-Cáceres et al., 2021).

Eine Adaption an mechanische Belastungen erfolgt, indem diese externen Reize von Mechanosensoren erfasst, durch die Mechanotransduktion in das Zellinnere weitergeleitet und in biochemische Signale umgewandelt werden (Hernández-Cáceres et al., 2021). Die auf den mechanischen Reiz folgende zelluläre Reaktion dauert dann so lange an, bis die Zelle durch Anpassung in der Lage ist den Stress abzubauen (King et al., 2012). Wird die Zelle allerdings durch den mechanischen Stimulus, hinsichtlich seiner Kraftgrößen oder seiner Wirkdauer, überbelastet, geht die Zelle in die Apoptose über (Chen et al., 2015; King, 2012; Ma et al., 2013).

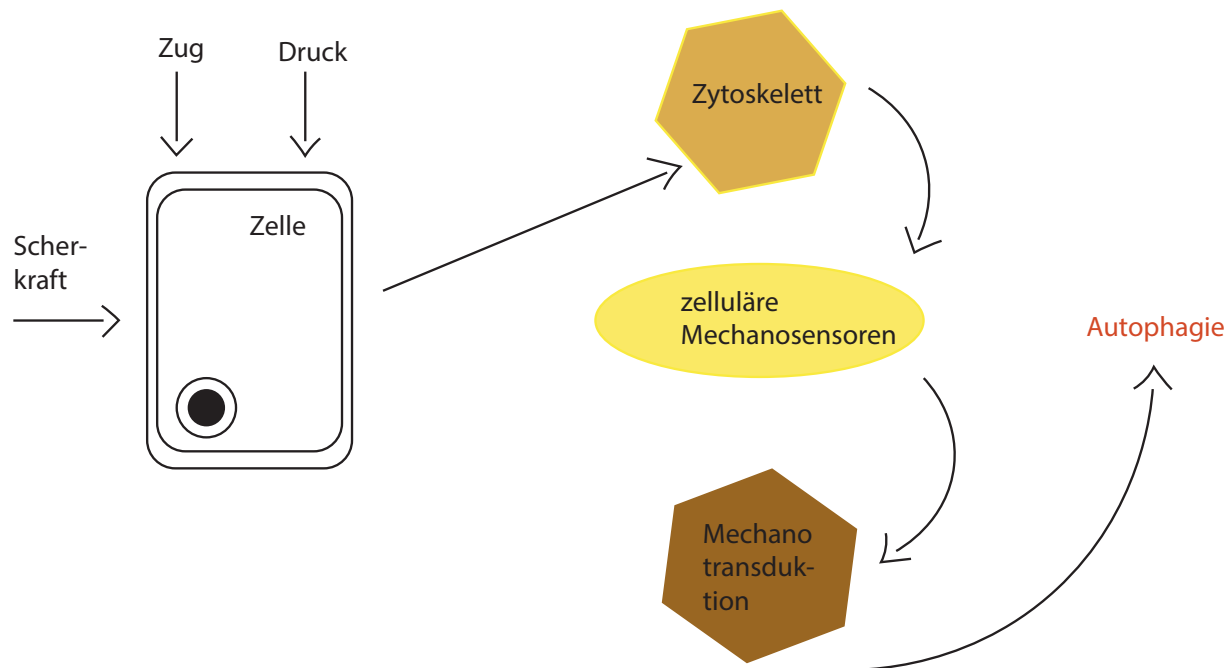


Abb. 7: Zusammenhang zwischen zellulärer Biomechanik und Autophagie. Durch verschiedene auf die Zelle einwirkende biomechanische Reize werden zelluläre Mechanosensoren aktiviert. Die Mechanotransduktion sorgt dann für die Signalweiterverarbeitung - und Umwandlung im Zellinneren. Je nach Ausmaß und Dauer der einwirkenden Kraft kann die Zelle durch Autophagie die Homöostase wiederherstellen oder geht bei Überlastung in die Apoptose über (modifiziert nach Hardt et al., 2024)

Die genaue Regulation und die beteiligten Signalwege der mechanisch-induzierten Autophagie sind nur teilweise geklärt und deshalb Bestandteil aktueller Studien.

Die Untersuchung von *Blawat et al.* (2020) an PDL-Zellen deutet darauf hin, dass die mechanische Autophagie-Induktion durch den klassischen mTOR/AKT-Signalweg reguliert wird. Des Weiteren ist bekannt, dass durch eine mechanische Belastung unterschiedliche Signalwege wie der Inositol (1,4,5) -Triphosphat-Signalweg, Calcium-Signalwege, die Fokale Adhäsionskinase (FAK)-Signalwege sowie die MAPK-Signalwege aktiviert werden, welche auch bei der Regulation der Autophagie beteiligt sind (King, 2012).

In der Literatur ist beschrieben, dass mechanischer Stress durch eine Veränderung der extrazellulären Matrix von der Zelle wahrgenommen und über Integrin-vermittelte Adhäsion weitergeleitet wird, wobei Matrixbestandteile die Autophagie positiv als auch negativ regulieren können (Hernández-Cáceres et al., 2021). Als Aktivatoren gelten unter anderem Decorin, Kollagen VI und Endostatin, während Laminin A2 den autophagischen Mechanismus inhibiert (Hernández-Cáceres et al., 2021). Weniger gut untersucht ist die Wirkung von mechanischen Reizen auf Zell-Zell-Adhäsionen und ihre Rolle bei der Autophagie-Regulierung, wobei eine Stimulierung des autophagischen Prozesses durch Kraftanwendung auf E-Cadherin bestätigt werden konnte (Hernández-Cáceres et al., 2021). Ein Augenmerk liegt auch auf der autophagischen Funktion verschiedener Ionenkanäle, die an der Initiierung der Phagophorenbildung bis hin zur Fusion zum Autophagolysosom beteiligt sind und sowohl stimulierende als auch hemmende Wirkungen auf die Autophagie ausüben (Kondratskyi et al., 2018). Die Forschungsgruppe von *Kondratskyi et al.* (2018) beschäftigte sich mit der Wirkung von calciumpermeablen Ionenkanälen auf Zellproliferation, Apoptose und Autophagie und fand heraus, dass ein durch mechanosensitive Kanäle vermittelter Calciumeinstrom die Initiations- und Elongationsstadien der Autophagie beeinflussen kann. Somit wird ein Anstieg von freiem Ca^{2+} im Zytosol als ein starker Autophagie-Induktor als wahrscheinlich angesehen und eine Calcium-induzierte Autophagie über den Ca^{2+} - Calcium/Calmodulin-abhängige Proteinkinase 2 (CAMKK2) -AMPK- Weg diskutiert (Kondratskyi et al., 2018). Neben den calciumpermeablen Kanälen ist eine Regulierung durch weitere Ionenkanäle wie Natrium-, Chlorid- und Kalium- Kanäle noch weitestgehend ungeklärt und ihre Auswirkungen auf die Autophagie Gegenstand aktueller Forschungen (Kondratskyi et al., 2018).

Des Weiteren ist eine mögliche Beteiligung von ROS an der mechano-induzierten Autophagie wahrscheinlich, da ein durch mechanosensitive Ionenkanäle ansteigender zytosolischer Ca^{2+} -Spiegel eine erhöhte Produktion an ROS veranlasst (Amma et al., 2005). Die Untersuchungen von *Amma et al.* (2005) legen nahe, dass die induzierte intrazelluläre ROS-Produktion eine Tyrosinkinasekaskade initiiert und dadurch zu einer Aktivierung von I κ B-Kinasen (IKKs) führt. Infolgedessen wird I κ B phosphoryliert, NF- κ B zum Zellkern

transloziert und der NF-kB-Signalweg gefördert, was wiederum zu einer Hochregulation von ATGs und BECN1 und somit zu einer positiven Beeinflussung der Autophagie führen kann (Amma et al., 2005; Liu et al., 2017).

1.4. Autophagie und Zahnbewegung

Bei der OTM wirken kontrollierte mechanische Kräfte auf die Zähne ein und führen über verschiedene biologische Prozesse zu einer geplanten und zielgerichteten Zahnbewegung. Dabei ist eine optimale Kraftapplikation wünschenswert, da zu geringe Kräfte zu einer verzögerten Zahnbewegung und folglich zu einer verlängerten Therapiedauer führen und zu hohe Kraftgrößen Ursache von Wurzelresorptionen und parodontalen Schäden sein können. Nach *Wang et al.* (2018) beträgt eine durchschnittliche kieferorthopädische Therapie zwischen 20 bis 36 Monate. Da eine lange oder verlängerte Behandlungsdauer mit einem erhöhten Risiko für Demineralisationen, Zahnfleischentzündungen, Karies, Parodontitis und Wurzelresorptionen einhergeht, ist die biologische Grundlagenforschung für die Klinik äußerst bedeutsam und eine mögliche Beschleunigung der Zahnbewegungsrate mit folglich verkürzter Behandlungsdauer wünschenswert (Andrade et al., 2014; Wang et al., 2018).

Aus der Literatur ist zu entnehmen, dass bei der OTM durch eine einwirkende Kraft eine lokale Hypoxie aufgrund von Gewebe- und Blutgefäßkompression entsteht und die Faktoren Kraft und Hypoxie des Weiteren eine aseptische Entzündungsreaktion infolge einer Migration von Immunzellen aus dem Endothel induzieren (Feller et al., 2015; Krishnan und Davidivich, 2006; Zainal Ariffin et al., 2011).

Die jüngste Studie von *Li et al.* (2021) beschäftigt sich mit dem Einfluss der Autophagie auf die OTM und ihre Rolle bei der Regulierung der begleitenden Entzündungsreaktion während dieser. Die Untersuchungen an erwachsenen männlichen Mäuse-Molaren zeigten bei einer Aktivierung der Autophagie durch Rapamycin eine verminderte Osteoklastenrekutierung, sowie eine verminderte Zahnbewegung, weshalb anhand der Ergebnisse vermutet wird, dass die belastungs-induzierte Autophagie während der OTM

die Entzündungsreaktion und den Knochenumsatz negativ reguliert um die Knochenhomöostase aufrecht zu erhalten (Li et al., 2021; Wang et al., 2021).

Die Forschungsgruppe von *Wang et al.* (2021) befasste sich ebenfalls mit der Auswirkung der OTM auf Autophagie und Apoptose und stellte fest, dass ein kontinuierlicher mechanischer Druck die Autophagie induziert. Untersucht wurde die Expression von BECN1 und LC3-II, deren Niveaus nach einstündiger mechanischer Belastung signifikant erhöht und nach 7 Tagen deutlich gesunken waren, was darauf hinweist, dass die Autophagie initial kurz nach Kraftapplikation stimuliert wird, die Induktion der Apoptose aber im Vergleich relativ langsam verläuft (Wang et al., 2021).

1.5 Zielsetzung

Die Autophagie ist ein wichtiger Mechanismus bei der zellulären Stressadaptation und spielt daher eine bedeutende Rolle sowohl bei Parodontopathien als auch bei der kieferorthopädischen Zahnbewegung.

Ziel der vorliegenden Arbeit war eine weiterreichende Untersuchung der autophagischen Adaptationsprozesse auf biomechanische Stressoren und auf bestimmte Inhibitoren. Dabei sollte die Auswirkung sowohl des ROCK-Inhibitors Y-27632, sowie des ROS-Inhibitors NAC auf die mechanisch-induzierte Autophagie in humanen PDL-Zellen *in vitro* untersucht werden. Dabei sollte speziell der bei mechanischer Belastung aktivierte ROCK-Signalweg und die ROS als Second Messenger bei der Autophagieinduktion und -regulation durch unterschiedlich starke mechanische Belastung in humanen PDL-Zellen untersucht werden. Die Arbeit ging von der Hypothese aus, dass nachdem durch den Einsatz entsprechender Inhibitoren die Induktion der Autophagie unter mechanischer Belastung herauf bzw. herunter reguliert wurde, eine entsprechende Regulation des ROCK-Signalwegs und der ROS als Second Messenger bei der mechanisch-induzierten Autophagie beobachtet werden kann.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Zellen

Bei dem in den Versuchen verwendeten Zellentyp handelt es sich um humane parodontale Ligamentfibroblasten (*human periodontal ligament fibroblasts*, HPdLF) der Firma Lonza (Basel, CHE), welche aus dem PDL von menschlichen Molaren isoliert wurden. Nach Herstellerangaben sind alle Zellen negativ auf Mykoplasmen, Bakterien, Hefen und Pilzen. Die HPdLF werden kryokonserviert geliefert und für die Experimente durch Passagieren subkultiviert.

2.1.2 Medien und Puffer

Während des Zellkulturprozesses wurden die HPdLF in Dulbecco's Modified Eagle Medium (Dulbecco's minimal essential medium, DMEM, Gibco, Life Technologies Limited, Paisley, UK) kultiviert. Dabei wurde das Medium durch 10 % fötales Rinderserum (fetal bovine serum, FBS, Invitrogen, Massachusetts, USA), 1 % Penicillin und 1 % Streptomycin (Invitrogen), sowie 0,2 % Plasmocin (Invitrogen) und 25 mg Vitamin C (Sigma-Aldrich, Missouri, USA) ergänzt. Durch die Zugabe der Antibiotika Penicillin und Streptomycin sollte eine Kontamination der Zellkultur, ausgelöst durch grampositive und gramnegative Bakterien, verhindert werden. Das Reagenz Plasmocin diente zusätzlich zur Vorbeugung einer Mykoplasmenkontamination. Um die Zellkultur vor oxidativem Stress zu schützen und die Kollagenfaserbildung der Zellen zu unterstützen, wurde Vitamin C dem Nährmedium hinzugefügt.

Neben dem DMEM mit 10 %er FBS-Konzentration wurde am Vortag der Zellstimulation ein Medium mit 1 % FBS-Konzentration verwendet. Durch die Reduzierung der FBS-Konzentration sollen die Zellen für die Versuche sensibilisiert werden und eine Beeinflussung durch Serumbestandteile reduziert werden.

Um möglichst optimale Bedingungen bei der Arbeit mit den Zellen zu schaffen, wurde die Dulbecco's Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (Dulbeccos's Phosphate Buffered Saline, DPBS, Gibco) verwendet. Der Puffer ist eine ausgeglichene salzhaltige Lösung, die unter anderem Natriumchlorid, Kaliumchlorid, Dinatriumhydrogenphosphat und Kaliumdihydrogenphosphat enthält und für einen konstanten pH-Wert während der Arbeit mit Zellkulturen sorgt. Da der DPBS-Puffer isotonisch und ungiftig für Zellen ist, wurde er zudem auch für Zellkulturanwendungen wie dem Waschen von Zellen, dem Zell- und Gewebetransport, dem Ansetzen von Reagenzien und dem Verdünnen von Zellen eingesetzt.

Tab. 1: Medien

Substanz	Zusammensetzung	Bezugsquelle
DMEM 10 %	50 ml FBS (10 %) 5 ml Penicillin (1 %) 5 ml Streptomycin (1 %) 1 ml Plasmocin (0,2 %) 25 mg Vitamin C	Gibco, Life Technologies Limited, Paisley, UK
DMEM 1 %	5 ml FBS (1 %)	Gibco, Life Technologies Limited, Paisley, UK
Einfriermedium	20 % Dimethylsulfoxid (DMSO) 80 % FBS	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, DEU

Tab. 2: Puffer

Substanz	Zusammensetzung	Bezugsquelle
DPBS	137 mM NaCl 2,7 mM KCl 1,42 g Na ₂ HPO ₄ 0,27 g KH ₂ PO ₄ pH-Wert 7-7,3	Gibco, Life Technologies Limited, Paisley, UK

2.1.3 Chemikalien und Reagenzien

Um die Auswirkungen auf die Autophagie genau untersuchen zu können, wurde diese pharmakologisch durch Rapamycin (50 nM, Enzo Life Sciences, Farmingdale, NY, USA) induziert und durch CQ (20 µM, Enzo Life Sciences, Farmingdale, NY, USA) inhibiert. Somit ergab sich für die Versuchsreihe eine Positivkontrollgruppe mit Rapamycin-Behandlung. Die Induktion der Autophagie durch Rapamycin kann durch eine unterschiedliche Beeinflussung von mTORC1 und mTORC2 begründet werden. Dabei führt eine kurzzeitige und gering konzentrierte Rapamycin-Behandlung zu einer Hemmung von mTORC1. Da mTORC2 gegenüber Rapamycin unempfindlich ist, kommt es erst bei höheren Konzentrationen des Inhibitors zu einer Hemmung dieses Proteinkomplexes (Gao et al., 2020).

Durch die Stimulation mit CQ wird der autophagische Flux unterbrochen. CQ hemmt die Fusion von Autophagosomen und Lysosomen zu Autophagolysosomen als auch ihren Abbau, wodurch es mit der Zeit zu einer Akkumulation von Autophagosomen kommt. Die in den Zellen angesammelten Autophagosomen können dann über einen gewissen Zeitraum quantifiziert werden.

Außerdem wurden die Zellen mit dem ROCK-Inhibitor Y-27632 (10 µM, Tocris, Bristol, UK) und dem ROS-Inhibitor NAC (5mM, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, DEU) behandelt.

Y-27632 hemmt spezifisch ROCK1 und ROCK2, indem der Inhibitor mit ATP um die Bindung an die katalytische Stelle konkurriert.

Der ROS-Inhibitor NAC ist ein bekanntes Antioxidant in klinischen Studien und in der experimentellen Zellbiologie. NAC ist ein synthetischer Vorläufer von intrazellulärem Cystein und Glutathion. Er wirkt aufgrund seiner Radikalfängereigenschaft hemmend auf die ROS-Aktivität. Diese Eigenschaft ergibt sich entweder direkt über das Redoxpotential von Thiolen oder sekundär über die Erhöhung des intrazellulären Glutathionspiegels. Als Negativkontrolle dienten unbehandelte beziehungsweise unstimulierte und ungefärbte Zellen.

Um den autophagischen Fluss zu ermitteln und auswerten zu können wurden die stimulierten Zellen mittels des Cyto-ID® Autophagy Detection Kits (Enzo Life Sciences, #ENZ-51031) behandelt.

Weitere bei den Versuchen verwendeten Chemikalien und Reagenzien sind der nachfolgenden Tabelle 3 zu entnehmen.

Tab. 3: Chemikalien und Reagenzien

Substanz	Bezugsquelle
Attachment Faktor	Biologics Attachment Factor 1X, Gibco, Life Technologies Corporation, NY, USA
CQ	Enzo Life Sciences, Farmingdale, NY, USA
Cyto-ID® Autophagy Detection Kit #ENZ-51031	Enzo Life Sciences GmbH, Lörrach, DEU
Cyto-ID® Green Detection Reagent	Enzo Life Sciences GmbH, Lörrach, DEU
DMSO	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, DEU
NAC	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, DEU
Rapamycin	Enzo Life Sciences, Farmingdale, NY, USA
Trypsin-EDTA	Biochrom GmbH, Berlin, DEU
Y-27632	Tocris Bioscience, Bristol, UK

2.1.4 Verbrauchsmaterialien

In der nachstehenden Tabelle 4 sind die verwendeten Verbrauchsmaterialien aufgelistet.

Tab. 4: Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Bezugsquelle
Einmalspritzen BD Discardit II (5 ml)	Becton Dickinson GmbH, New Jersey, USA
Glasstempel (2 g/cm ²)	Glas Söller GmbH, Bonn, DEU
Handschuhe Peha-soft® nitrile	Paul Hartmann AG, Heidenheim, DEU
Parafilm™M™	Bemis™, Wisconsin, USA
Pasteurpipetten (225 mm)	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim, DEU
Pipettenspitzen TipOne (100 µl, 200 µl, 1000 µl)	Starlab International GmbH, Hamburg, DEU
pluriStrainer®-Mini 40 µm (Zellsieb)	pluriSelect Life Science UG & Co. KG, Leipzig, DEU
Polypropylen Röhrchen Cellstar® Tubes (15 ml, 50 ml)	Greiner Bio-One International GmbH, Kremsmünster, AUT
Reagenzröhren Flow Cytometry (5 ml, 75x12 mm, PS)	Sarstedt, Nümbrecht, DEU
Serologische Pipetten Cellstar® (5 ml, 10 ml)	Greiner Bio-One International GmbH, Kremsmünster, AUT
Spritzenvorsatzfilter Minisart® (0,2 µm)	Sartorius stedim biotech, Göttingen, DEU
Zellkulturflaschen Cellstar® Cell Culture Flask 75 cm ²	Greiner Bio-One International GmbH, Kremsmünster, AUT
Zellkulturschale Lumox® dish (35 mm Durchmesser)	Sarstedt, Nümbrecht, DEU

2.1.5 Geräte

Die verwendeten Geräte sind in Tabelle 5 einzusehen.

Tab. 5: Geräte

Bezeichnung	Bezugsquelle
Brutschrank ICO150med (37 °C, 5 % CO ₂)	Memmert GmbH & Co. KG, Schwabach, DEU
Brutschrank Function Line B12 (37 °C, 5 % CO ₂)	Heraeus, Hanau, DEU
FACS FC 500	Beckman Coulter, Kalifornien, USA
FACSCalibur	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
Feinwaage New Classic MF Jewellery JP (Max:140 g; Min:700 Karat)	Mettler Toledo, Ohio, USA
Gefrierschrank – 20 °C	Liebherr, Bulle, CHE
Gefrierschrank – 80 °C TSX Series	Thermo Fisher Scientific Inc., Massachusetts, USA
Kühlschrank Privileg (5 °C)	Whirlpool Corporation, Michigan, USA
Lichtmikroskop Axioscope	Carl Zeiss AG, Oberkochen, DEU
Lichtmikroskop Axiovert 25	Carl Zeiss AG, Oberkochen, DEU
Neubauer Zählkammer BLAUBRAND®	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim, DEU
Pipetten (100 µl, 1000 µl)	Eppendorf, Hamburg, DEU
Pipettierhilfe pipetus®-akku	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Eberstadt, DEU
Sicherheitswerkbank HERAsafe®	Heraeus, Hanau, DEU
Vortexmischer	Starlab International GmbH, Hamburg, DEU
Waage New Classic MF Pharmacy PHS (Max:3200 g; Min:500 mg)	Mettler Toledo, Ohio, USA
Wasserbad WNB 7 (37 °C)	Memmert GmbH & Co. KG, Schwabach, DEU
Zentrifuge 5415R	Eppendorf, Hamburg, DEU
Zentrifuge 5804R	Eppendorf, Hamburg, DEU

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

Die im Röhrchen kryokonserviert gelieferten HPdLF wurden in einem Wasserbad (Memmert GmbH & Co. KG) bei 37 °C erwärmt, bis sich alle Eiskristalle aufgelöst hatten. Danach erfolgte unter der Sicherheitswerkbank (Heraeus) die Überführung des Inhaltes in mit Medium vorgefüllte Zentrifugenröhrchen. Durch das Ausschleudern in der Zentrifuge (Eppendorf) bildete sich am Röhrchenboden ein Zellpellet. Der Überstand wurde verworfen und das gewonnene Zellpellet in einem frischen Medium resuspendiert. Zur weiteren Zellkultivierung wurden je 0,1 ml der Suspension mit je 10 ml DMEM (10 % FBS-Konzentration) in 75 cm² Zellkulturflaschen (Greiner Bio-One International GmbH) gefüllt und im Brutschrank (Memmert GmbH & Co. KG und Heraeus) bei 37 °C und 5 % CO₂ Atmosphäre gelagert.

Während der Phase der Zellkultivierung erfolgte zweimal wöchentlich ein Medium-Wechsel mit DMEM 10 %-FBS-Konzentration unter sterilen Bedingungen. Hierbei wurde das verbrauchte Nährmedium vorsichtig mit einer Pipettenspitze (Greiner Bio-One International GmbH) der Absaugpumpe entfernt und verworfen, sowie 10 ml frisches Medium hinzugefügt. Für die Experimente wurden Zellen der 4. bis 6. Passage verwendet. Lag nach etwa 2-3 Wochen eine Konfluenz von über 90 % vor, welche unter dem Lichtmikroskop (Zeiss) kontrolliert wurde, konnte die Zellernte für die Versuche vorgenommen werden.

Zur Versuchsvorbereitung wurde das alte Nährmedium erneut verworfen, die adhärennten Zellen mit DPBS gewaschen und mit Trypsin-EDTA (Biochrom GmbH, Berlin, DEU) vom Kulturflaschenboden abgelöst. Die Zellen (100.000 Zellen/Well) wurden nun auf den sauerstoffdurchlässigen Zellkulturschalen Lumox[®] dish (Sarstedt, Nümbrecht, DEU) ausgesät und bis zu einer Konfluenz von 80-90 % weiter im Inkubator kultiviert. Die Besonderheit dieser Zellkulturschalen ist ihr gasdurchlässiger Folienboden, der einen optimalen Gasaustausch und kurze Diffusionswege verspricht. Somit wird eine gute Sauerstoffversorgung der HPdLFs und ein Abtransport von Stoffwechselprodukten wie CO₂ gewährleistet.

Vor der Zellstimulation wurden die Zellen auf Lumox®-Kulturschalen gesät, wobei zur verbesserten Zelladhäsion und zur Wachstumsförderung ein Attachment Factor (Biologics Attachment Factor 1X, Gibco, Life Technologies Corporation, NY, USA) verwendet wurde. Dazu wurden die Zellen zunächst mit DPBS gewaschen. Mittels Trypsin-EDTA wurden die adhärenen Zellen im weiteren Schritt von der Oberfläche der Zellkulturschalen abgelöst. Das Trypsin-EDTA wurde für 5 Minuten auf den Zellen belassen und dann mittels 10 % FBS DMEM neutralisiert. Die Zellen wurden in einer Zentrifuge gesammelt und der zellfreie Überstand wird abgenommen. Anschließend wurden die Zellen mit DPBS resuspendiert und auf die Lumox®-Kulturschalen aufgebracht. Die FBS-Konzentration wurde einen Tag vor den Versuchen auf 1 % reduziert.

2.2.2 Stimulation der Zellen

Nach erfolgreicher Kultivierung wurde die Stimulation der HPdIFs nach dem in Tabelle 6 abgebildeten Versuchsprotokoll durchgeführt.

Vor Versuchsbeginn erfolgte die mikroskopische Kontrolle der Zellen, das Erneuern des Mediums und die Beschriftung der einzelnen Wells nach Versuchsgruppe. Pro Versuchsgruppe und Versuch wurden je 2 Lumox® Wells angefertigt.

Bis auf die Negativkontrollgruppe wurden die PDL-Zellen mit dem Autophagie-Inhibitor CQ (20 μ M) behandelt.

Neben der Kontrollgruppe mit CQ wurde eine Positivkontrolle mit CQ und dem Autophagie-Induktor Rapamycin verwendet. Die Zellstimulation erfolgte dann durch ansteigende Druckbelastung in Form von 2 g/cm², 6 g/cm² und 8 g/cm², indem an den Durchmesser der Lumox® Zellkulturschalen angepasste Glasstempel (Glas Söller GmbH) verwendet wurden. Neben der zunehmenden Druckstimulation wurden die unterschiedlichen Gruppen mit und ohne ROCK-Inhibitor Y-27632 und ROS-Inhibitor NAC inkubiert. Unbehandelte und ungefärbte Zellen dienten als Negativkontrollgruppe. Während der Stimulationszeit von 16 h lagerten die Wells bei 37°C im Brutschrank.

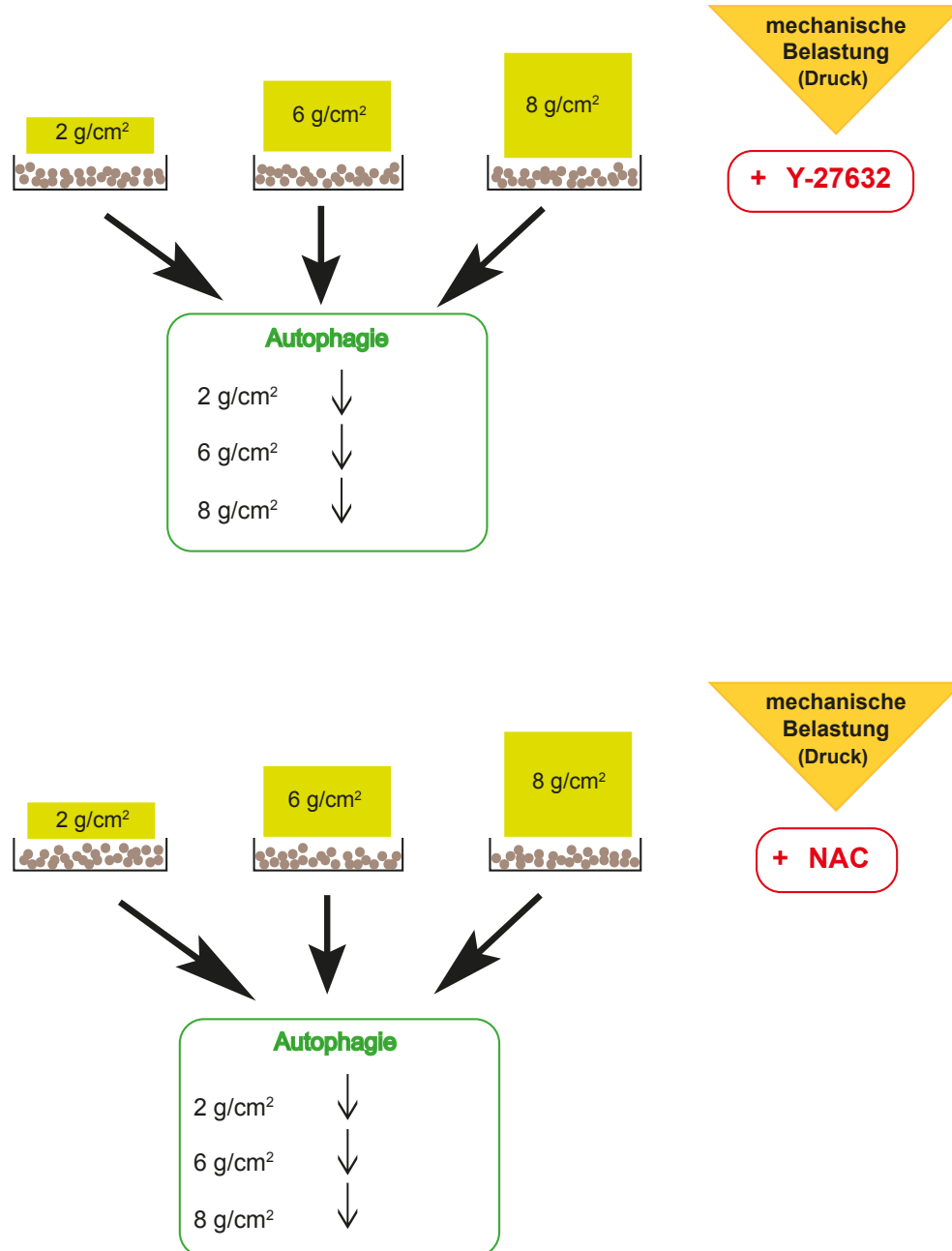


Abb. 8: Schema des Versuchsaufbaus. Die PDL-Zellen wurden in den Lumox[®] Zellkulturschalen über einen Zeitraum von 16 Stunden mechanischen Belastungen von 2 g/cm^2 , 6 g/cm^2 und 8 g/cm^2 ausgesetzt. Je nach Versuchsgruppe wurden die PDL-Zellen zusätzlich mit dem ROCK-Inhibitor Y-27632 oder dem ROS-Inhibitor NAC behandelt und deren Auswirkungen auf die Autophagie untersucht

Tab. 6: Übersicht der Versuchsgruppen

Gruppen	Stimulation	Färbung	Zeit
Negativkontrolle (NK)	1000 µl Medium (1% FBS)	keine	16h
Positivkontrolle (PK)	1000 µl Medium (1% FBS), 20 µM CQ, 50 nM Rapamycin	Cyto-ID®	16h

Gruppen	Stimulation	Färbung	Zeit
Kontrolle (K)	1000 µl Medium (1% FBS), 20 µM CQ	Cyto-ID®	16h
K +Y 27632	1000 µl Medium (1% FBS), 20 µM CQ + 10 µM Y27632	Cyto-ID®	16h
K + NAC	1000 µl Medium (1% FBS), 20 µM CQ + 5 mM NAC	Cyto-ID®	16h

Gruppen	Stimulation	Färbung	Zeit
2 g	1000 µl Medium (1% FBS), 20 µM CQ + Glasstempel 2 g/cm ²	Cyto-ID®	16h
2 g +Y 27632	1000 µl Medium (1% FBS), 20 µM CQ + 10 µM Y27632 + Glasstempel 2 g/cm ²	Cyto-ID®	16h
2 g + NAC	1000 µl Medium (1% FBS), 20µM CQ + 5 mM NAC + Glasstempel 2 g/cm ²	Cyto-ID®	16h

Gruppen	Stimulation	Färbung	Zeit
6 g	1000 µl Medium (1% FBS), 20 µM CQ + Glasstempel 6 g/cm ²	Cyto-ID®	16h
6 g +Y 27632	1000 µl Medium (1% FBS), 20 µM CQ + 10 µM Y27632 + Glasstempel 6 g/cm ²	Cyto-ID®	16h
6 g + NAC	1000 µl Medium (1% FBS), 20 µM CQ + 5 mM NAC + Glasstempel 6 g/cm ²	Cyto-ID®	16h

Gruppen	Stimulation	Färbung	Zeit
8 g	1000 µl Medium (1% FBS), 20 µM CQ + Glasstempel 8 g/cm ²	Cyto-ID®	16h
8 g +Y 27632	1000 µl Medium (1% FBS), 20 µM CQ + 10 µM Y27632 + Glasstempel 8 g/cm ²	Cyto-ID®	16h
8 g + NAC	1000 µl Medium (1% FBS), 20 µM CQ + 5 mM NAC + Glasstempel 8 g/cm ²	Cyto-ID®	16h

2.2.3 Färbung

Um die Autophagie in den unterschiedlich vorbehandelten und verschieden stark belasteten Zellen zu messen, wurde eine Zellfärbung mit dem Cyto-ID® Autophagy Detection Kit (Enzo Life Sciences, #ENZ-51031) durchgeführt. Nach der Stimulationsphase wurden die Gewichte entfernt und die Zellen mit 500 µl/Well DPBS gewaschen. Es erfolgte das Ablösen der Zellen mit 300 µl/Well Trypsin-EDTA, welches für 5 Minuten einwirkte und mit 1,5 ml/Well 10%igem Medium abgestoppt wurde. Nach der Trypsinierung folgte die

Überführung des Zell-Suspensions-Gemisches in Reaktionsgefäße (15 ml, Cellstar® Tubes, Greiner Bio-One International GmbH) und das Zentrifugieren für 5 Minuten bei 1600 rpm. Im nächsten Schritt wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet erneut mit DPBS gewaschen, danach zentrifugiert und im Anschluss in 250 µl/Tube Assay Buffer resuspendiert. Die eigentliche Färbung erfolgte dann durch 30-minütige Inkubation der Zellen mit dem Cyto-ID® Green Detection Reagent (250 µl/Tube) in Dunkelheit und bei Raumtemperatur.

Nach Ablauf der Inkubationszeit erfolgte zuletzt die Vorbereitung auf die durchflusszytometrische Analyse, indem die Zellen zentrifugiert, gewaschen, in DPBS/EDTA resuspendiert und in Reagenzröhrchen (Flow Cytometry 5 ml, Sarstedt) überführt wurden. Um Dubletten bei der Auswertung zu vermeiden, wurde die Suspension durch ein pluriStrainer®-Mini Zellsieb (pluriSelect Life Science) pipettiert.

2.2.4 Durchflusszytometrische Analyse

Die Durchflusszytometrie, auch FACS für Fluorescence Activated Cell Sorting genannt, ist eine leistungsfähige Methode, um eine große Anzahl an freien Zellen in einer flüssigen Suspension zu erfassen. Mit Hilfe von Licht können die Zellen gezählt und nach ihrer Oberflächenbeschaffenheit charakterisiert werden. Hierbei werden die Proben nacheinander in einen engen Kanal geleitet, wo Licht auf die Zellen trifft und Sensoren das unterschiedlich gestreute oder gebrochene Licht detektieren. Je nach Art der Lichtstreuung kann Vorwärtsstreulicht (FSC, Forward Scatter) von Seitwärtsstreulicht (SSC, Side Scatter) unterschieden werden. Während man anhand des FSC Informationen über die Partikelgröße erhält, gibt das SSC Auskunft über die Granularität der Zelle, sowie über die Struktur und Größe des Zellkerns und die Menge der Vesikel.

Des Weiteren kann im Vorfeld die Anwendung von unterschiedlichen Markern bzw. Fluoreszenzfarbstoffen nützlich sein, um spezifische Merkmale identifizieren und isoliert analysieren zu können. Um nur bestimmte Zellen oder einen bestimmten Bereich im gefertigten Histogramm untersuchen zu können, besteht die Möglichkeit des Gating. Bei

diesem Verfahren wird ein Gate erstellt, indem eine ausgewählte Region im Histogramm markiert und nur diese weiter in die Auswertung einbezogen wird. Durch das Gating können zum Beispiel degenerierte Zellen und weiterer „Zellabfall“ ausgeschlossen werden.

Nachdem das Färbeverfahren in der vorliegenden Arbeit nach Angaben des Herstellers durchgeführt wurde, erfolgte die weitere Auswertung mittels der Durchflusszytometrie-Methode mit dem FITC-Filter (530/30 grün) des blauen Lasers eines BD FACSCalibur (BD Biosciences, Franklin Lakes, USA). Die Analyse umfasste eine mit dem Autophagie-Induktor Rapamycin behandelte Positivkontrolle, sowie eine Negativkontrolle mit ungefärbten Zellen. Als Autophagie-Marker diente das Cyto-ID® Green Detection Reagent, da sich das Reagenz in einer pH-abhängigen Weise in autophagischen Vakuolen anreichert. Durch diese spezifische Anreicherung des Nachweisreagenz kann die Autophagie in HPdIFs nachgewiesen und quantifiziert werden.

Die quantitative durchflusszytometrische Analyse wurde anhand der frei erhältlichen Flowing Software (<http://flowingsoftware.btk.fi/>) durchgeführt.

2.2.5 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Versuche wurde mit der Software Prism (Version 9, GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA) durchgeführt. Alle Experimente wurden zweifach durchgeführt und mindestens dreimal reproduziert. Zur Bestimmung signifikanter Unterschiede zwischen einzelnen Gruppen wurde der Kruskal-Wallis Test, gefolgt vom Dunnett-Test durchgeführt. Das Signifikatsniveau wurde auf 0,05 festgelegt und somit sind Differenzen $p < 0,05$ zwischen den Gruppen als signifikant anzusehen.

3. Ergebnisse

Die Auswertung der Autophagosomenakkumulation nach 16-stündiger mechanischer Stimulation von HPdIFs mit einer physiologischen Belastung von 2 g/cm², einer Belastung von 6 g/cm² und einer Überbelastung von 8 g/cm², sowie einer Behandlung mit ROCK- und ROS-Inhibitoren, wurde mittels FACS-Analyse durchgeführt.

Als Positivkontrollen wurden mit Rapamycin vorbehandelte Zellen und als Negativkontrollen ungefärbte Zellen herangezogen. Um die zu untersuchende Zellpopulation einzugrenzen und von degenerierten Zellen zu trennen, wurde ein Zell-Gating durchgeführt (Abb. 9).

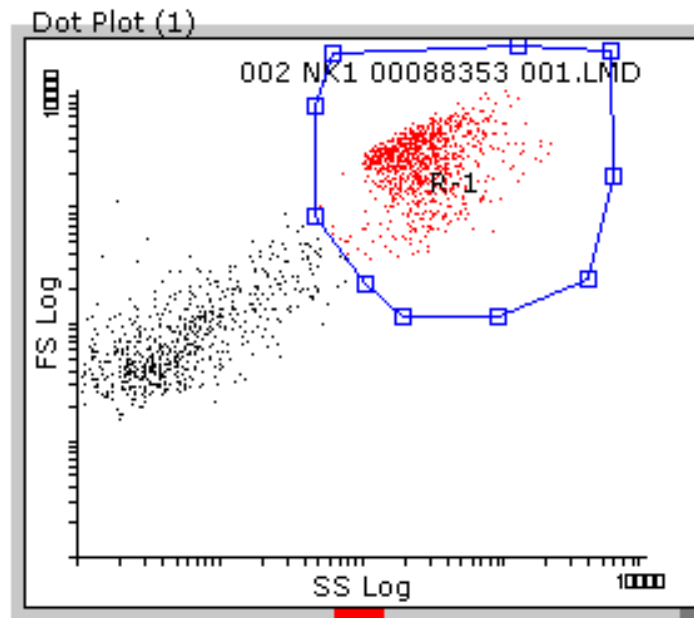


Abb. 9: Zell-Gating. Das gesetzte Gate (blaue Markierung) dient als eine definierte Region, welche für die weitere Analyse herangezogen wird. Das Gating dient somit als ein Filter, indem Zelltrümmer und Zellaggregate von der weiteren Auswertung ausgeschlossen werden

Zu Beginn wurden die Fluoreszenzen der verschiedenen Druckgruppen (2 g/cm², 6 g/cm², 8 g/cm²) mit der Fluoreszenz der Kontrollgruppe, sowie der Positiv- und

Negativkontrollgruppe verglichen. Hierbei wurde deutlich, dass in den reinen Druckgruppen mit zunehmender mechanischer Belastung eine gesteigerte Autophagie zu registrieren war (Abb. 10 und Abb. 11). Dabei fiel der Autophagie-Anstieg unterschiedlich stark aus. Die Autophagie wurde in den Stimulationsgruppen mit Be- und Überlastung (6 g/cm^2 und 8 g/cm^2) signifikant gesteigert, während bei physiologischer Belastung (2 g/cm^2) keine signifikante Veränderung zu vermerken war (Abb. 10). Ein Vergleich zwischen den Belastungen mit 6 g/cm^2 und 8 g/cm^2 zeigte, dass die Autophagie bei 8 g/cm^2 etwa doppelt so stark anstieg, als bei 6 g/cm^2 .

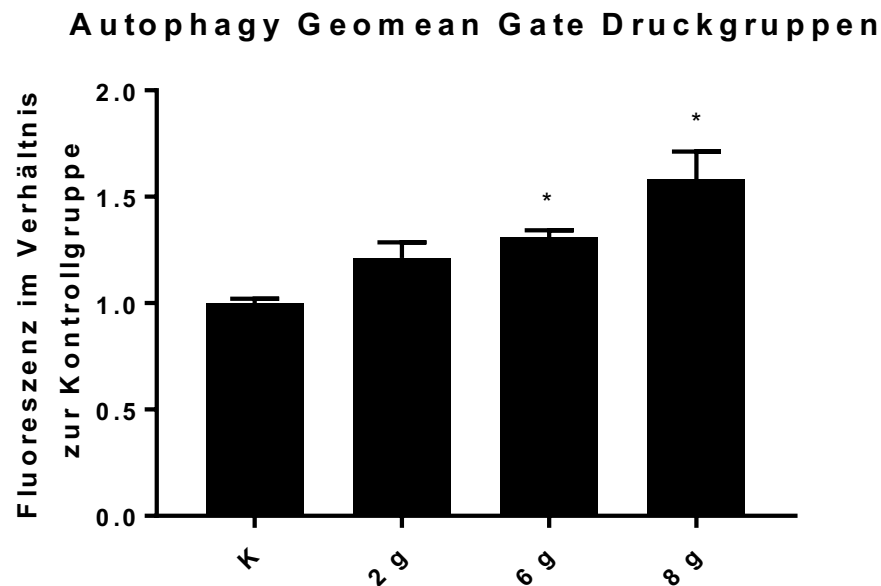


Abb. 10: Säulendiagramm der Fluoreszenzen der Druckgruppen im Vergleich zur Kontrollgruppe. Mit zunehmender mechanischer Belastung ist eine Steigerung der Autophagie zu erkennen. Bei physiologischer Belastung von 2 g/cm^2 zeigt sich keine signifikante Veränderung. Eine Belastung mit 6 g/cm^2 und 8 g/cm^2 führt hingegen zu einer signifikant gesteigerten Autophagie (modifiziert nach Hardt et al., 2024)

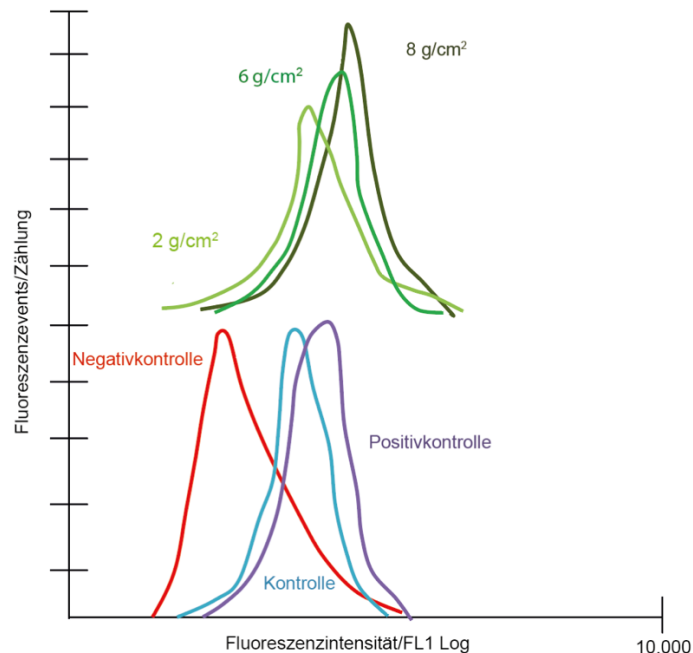


Abb. 11: Peakdiagramm als Übersicht der Fluoreszenzen der Kontrolle, Negativ- und Positivkontrolle, sowie der Druckgruppen. Die unterschiedlichen Druckgruppen von 2 g/cm² bis 8 g/cm² legen dar, dass eine zunehmende mechanische Belastung mit einer Zunahme des autophagischen Flusses einhergeht. Die x-Achse stellt dabei die Fluoreszenzintensität (FL1 Log) und die y-Achse die Fluoreszenzevents dar

Um die Auswirkungen von ROCK und ROS auf die Regulation der Autophagie untersuchen zu können, wurden die jeweiligen Inhibitoren Y-27632 und NAC herangezogen. Durch die Behandlung der Zellen mit den beiden Inhibitoren wurde die Autophagie deutlich beeinflusst. Vergleicht man die Wirkung der jeweiligen Inhibitoren auf die Kontrollgruppe, so wird ein konträres Ergebnis ersichtlich (Abb. 12). Die Behandlung mit dem ROCK-Inhibitor Y-27632 führte zu einer signifikant reduzierten Autophagie, während der Einsatz des ROS-Inhibitors NAC zu einer signifikant gesteigerten Autophagie führte. Der Vergleich des Wirkungsgrades der beiden Inhibitoren auf die Kontrollgruppe zeigte, dass Y-27632 eine ausgeprägtere Wirkung hatte. Die Hemmung der Autophagie durch Y-27632 war etwa drei Mal stärker als die Induktion der Autophagie durch NAC.

Autophagy Geomean Gate Kontrollgruppe + Inhibitoren

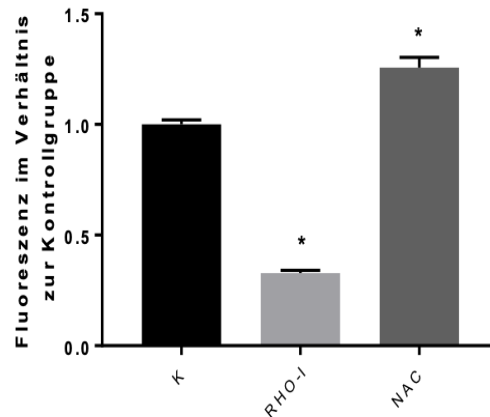


Abb. 12: Säulendiagramm zur Darstellung der Auswirkungen der Inhibitoren Y-27632 und NAC auf die Autophagie der Kontrollgruppe. Es zeigt sich eine konträre Wirkweise. Der ROCK-Inhibitor führt zu einer reduzierten Autophagie, während der ROS-Inhibitor die Autophagie erhöht. Beide Inhibitoren beeinflussen die Autophagie signifikant (modifiziert nach Hardt et al., 2024)

In den weiteren Experimenten wurde nun die Wirkung der beiden Inhibitoren auf die druckinduzierte Autophagie untersucht. Hierzu wurden die einzelnen Druckgruppen jeweils mit den Inhibitoren Y-27632 und NAC behandelt. Die Hemmung von ROCK durch Y-27632 führte in allen getesteten Belastungsgruppen (2 g/cm^2 , 6 g/cm^2 , 8 g/cm^2) zu einer signifikant reduzierten Autophagie (Abb. 13-15). Die Behandlung mit dem Inhibitor NAC führte ebenfalls in allen drei Belastungsgruppen zu einer gehemmten Autophagie. Bei physiologischem Druck (2 g/cm^2) und einer Belastung mit (6 g/cm^2) wurde die Autophagie signifikant reduziert, wohingegen dieser Effekt bei Überbelastung (8 g/cm^2) nicht mehr signifikant war (Abb. 13-15).

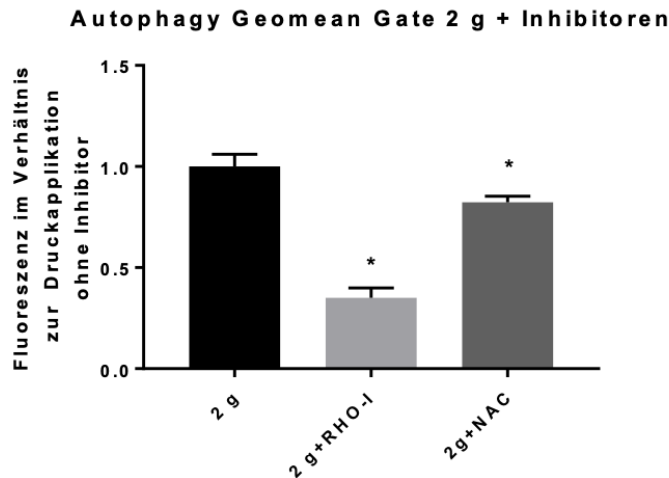


Abb. 13: Säulendiagramm zur Darstellung der Auswirkungen der Inhibitoren Y-27632 und NAC auf die druckinduzierte Autophagie bei physiologischer Belastung. Im Vergleich zur Druckgruppe 2 g/cm² ohne Inhibitor zu den Druckgruppen 2 g/cm² mit Inhibitoren, ist sowohl durch Y-27632 als auch durch NAC eine reduzierte Fluoreszenz und damit einhergehend eine reduzierte Autophagie zu vermerken. Bei beiden Inhibitorgruppen waren die beobachteten Effekte signifikant (modifiziert nach Hardt et al., 2024)

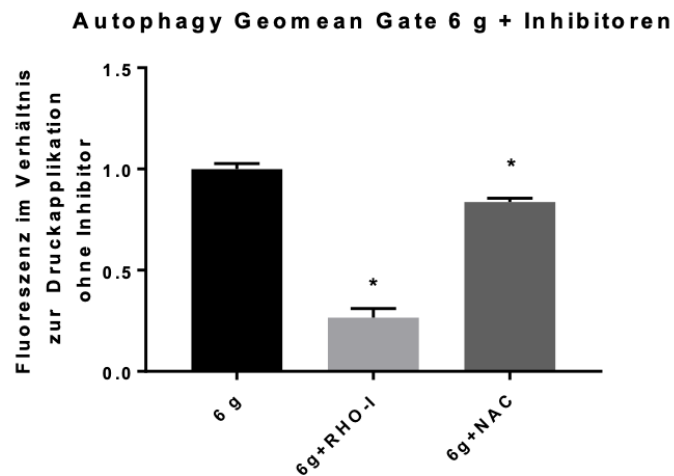
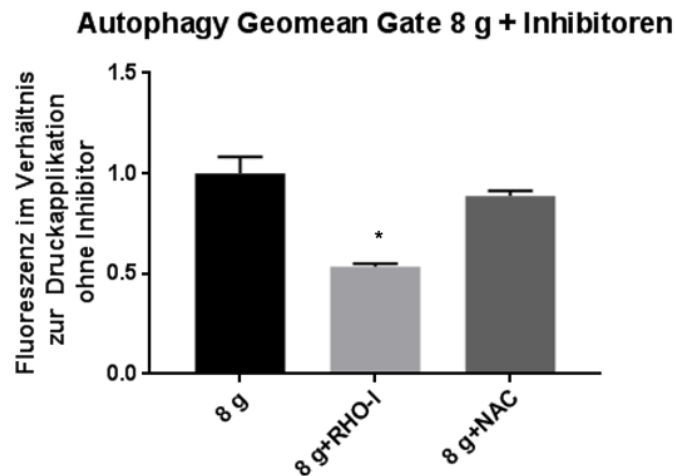


Abb. 14: Säulendiagramm zur Darstellung der Auswirkungen der Inhibitoren Y-27632 und NAC auf die druckinduzierte Autophagie bei Belastung. Die Grafik zeigt, dass die Fluoreszenz durch die Behandlung mit den beiden Inhibitoren im Vergleich zur Druckgruppe 6 g/cm² ohne Inhibitor in beiden Fällen reduziert ist. Die Autophagie wurde durch Y-27632 und NAC signifikant gehemmt (modifiziert nach Hardt et al., 2024)



Ab. 15: Säulendiagramm zur Darstellung der Auswirkungen der Inhibitoren Y-27632 und NAC auf die Autophagie bei Überbelastung. Beim Vergleich der Versuchsgruppe mit einer Druckapplikation von 8 g/cm² ohne Inhibitor mit den Versuchsgruppen unter Inhibitoren-Behandlung, ist die Fluoreszenz in beiden Inhibitorgruppen reduziert. Dieser Effekt war nur für Y-27632 signifikant reduziert (modifiziert nach Hardt et al., 2024)

Wird im Einzelnen der Effekt von Y-27632 auf die verschiedenen Druckgruppen betrachtet und verglichen, so war eine unterschiedlich starke Wirkung auf die Fluoreszenz und somit auf die Autophagie zu erkennen. Bei physiologischer Belastung von 2 g/cm² war die Autophagie im Vergleich zur Druckgruppe ohne Inhibitor um etwa zwei Drittel reduziert (Abb. 13). Betrachtet man die Gruppe mit und ohne Inhibitor bei 6 g/cm², so war die Autophagie um etwa $\frac{3}{4}$ reduziert (Abb. 14). Im weiteren Vergleich mit der Testreihe 8 g/cm² war die Autophagie hier um etwa die Hälfte reduziert (Abb. 15). Stellt man die Wirkung von Y-27632 unter mechanischer Belastung von 2 g/cm², 6 g/cm² und 8 g/cm² gegenüber, so war die stärkste Hemmung der Autophagie bei Belastung von 6 g/cm² und die geringste Hemmung der Autophagie bei Überbelastung von 8 g/cm² zu erkennen. (Abb. 13-15).

Ein Vergleich der Wirkung von NAC unter den verschiedenen mechanischen Belastungen zeigt, dass die Fluoreszenz bei allen drei Druckgruppen in einem ähnlichen Maß reduziert

wurde. Bei physiologischer Belastung, sowie bei einer Belastung mit 6 g/cm^2 war die Autophagie um weniger als $\frac{1}{5}$ reduziert. Im Vergleich dazu war die Autophagie bei Überbelastung sogar ohne Signifikanz um nur etwa $\frac{1}{10}$ gehemmt. Eine Gegenüberstellung der Auswirkungen von Y-27632 und NAC auf die einzelnen Druckgruppe legt dar, dass durch die Hemmung der ROCK durch Y-27632 in allen drei Druckgruppen ein stärkerer Effekt auf die Fluoreszenz zu vermerken war als durch die Hemmung von ROS durch den Inhibitor NAC. Durch die Y-27632-Behandlung unter mechanischer Belastung kam es sowohl bei 2 g/cm^2 , als auch bei 6 g/cm^2 und 8 g/cm^2 zu einer weitaus ausgeprägteren Reduktion der Autophagie als durch NAC.

4. Diskussion

4.1 Zusammenfassung der Ergebnisse

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit legen eine Dosisabhängigkeit der Autophagieregulation in Abhängigkeit von der Kraftgröße nahe. Allgemein wurde die Autophagie unter mechanischer Stressstimulation unterschiedlich stark induziert. Dabei wurde die Autophagie unter Belastung mit 6 g/cm^2 und Überbelastung (8 g/cm^2) signifikant hochreguliert, während bei physiologischer Belastung von 2 g/cm^2 kein signifikanter Effekt zu vermerken war. Sowohl die ROCK-, als auch die ROS-Inhibitorengruppe führte unter mechanischer Belastung zu einer reduzierten Autophagie. Die hemmende Wirkung von Y-27632 auf die Autophagie war bei allen Druckgruppen signifikant. Dabei stellte sich diese Auswirkung bei Belastungen von 2 g/cm^2 und 6 g/cm^2 im Vergleich zu 8 g/cm^2 ausgeprägter dar. Dem hingegen konnte der hemmende Effekt durch NAC nur bei Belastungen von 2 g/cm^2 und 6 g/cm^2 , nicht jedoch bei 8 g/cm^2 , als signifikant beobachtet werden. Der Vergleich zwischen den Gruppen $2 \text{ g/cm}^2 + \text{NAC}$ und $6 \text{ g/cm}^2 + \text{NAC}$ zeigte eine annähernd gleiche Reduktion des autophagischen Flusses. In der druckunabhängigen Kontrollgruppe wurde zwischen den Inhibitoren eine konträre Auswirkung auf die Autophagie sichtbar. Während bei NAC die Autophagie signifikant hochreguliert wurde, kam es durch Y-27632 zu einer signifikanten Reduktion dieser.

4.2 Methodendiskussion

4.2.1 Druckstärken

In dem vorliegenden Versuchskonzept wurden die PDL-Fibroblasten zunehmender Druckbelastung, sowie zwei verschiedenen Inhibitoren ausgesetzt. Dabei wurde eine mechanische Belastung von 2 g/cm^2 als physiologisch angesehen. Diese Größe wurde auch in früheren Studien für PDL-Zellen als physiologischer Druck beschrieben und deshalb hier ebenfalls als solcher angewendet (Blawat et al., 2021; Schröder et al., 2018). In der Literatur wurde in den letzten Jahren auch die Regulation von Autophagie und Apoptose auf eine mechanische Überbelastung der Zellen, auch Overload genannt,

erforscht. Die Studie von *Kanzaki et al.* (2002) postulierte die Überbelastung bereits bei einem Stimulus von 4 g/cm^2 , während die Experimente von *Blawat et al.* (2021) einen erhöhten Zelltod und somit folglich einen Overload beziehungsweise einen kritischen Schwellenwert bei 8 g/cm^2 ergaben. Diese unterschiedlichen Ergebnisse können höchstwahrscheinlich damit begründet werden, dass *Blawat et al.* (2021) bei den Versuchen O_2 -durchlässige Zellkulturplatten verwendeten und *Kanzaki et al.* (2002) normale Zellkulturplatten benutzen, sodass bei *Blawat et al.* (2021) eine Entkopplung von mechanischem Reiz und Hypoxie erfolgte. Bei *Kanzaki et al.* (2002) muss man nicht nur von einer Druckbelastung, sondern auch von einem zusätzlichen hypoxischen Reiz unter den Druckstempeln ausgehen, was vermutlich zu einer Akkumulation der Stimuli und somit zu einer schnelleren Überbelastung der Zellen führte.

Die vorliegende Arbeit orientierte sich bei der Druckstärke der Überbelastung mit 8 g/cm^2 an der Studie von *Blawat et al.* (2021), da hier ebenfalls O_2 -durchlässige Kulturschalen Verwendung fanden und in gleicher Weise von einer Entkopplung von Druckbelastung und Hypoxie ausgegangen wurde.

Als „regelrechte“ Belastung wurde in der vorliegenden Arbeit ein Druck von 6 g/cm^2 herangezogen. Diese Entscheidung stützt sich auf die Versuchsergebnisse von *Blawat et al.* (2021), da in dieser Studie nach 16-stündiger Belastung erst bei 6 g/cm^2 eine im Vergleich mit 2 g/cm^2 eine gesteigerte Autophagosomen-Akkumulation gemessen wurde. Die Autophagosomen-Akkumulation bei 4 g/cm^2 war im Vergleich zu 2 g/cm^2 unverändert und scheint deshalb als Druckstärke nicht aussagekräftig.

4.2.2 Zeitpunkte

Während bereits Studien die Zeitabhängigkeit der Autophagie an PDL- und MDA-MB-231-Zellen unter Zug- und Druckbelastung untersucht haben (King et al., 2011; Memmert et al., 2019), wurde in den vorliegenden Experimenten der Fokus auf die Regulierung der Autophagie durch ROCK und ROS als Second Messenger gelegt und dabei der Zeitfaktor durch eine gleichbleibende Belastungsdauer vernachlässigt. In der vorliegenden Arbeit wurden die PDL-Zellen sowohl den oben genannten Druckstärken und Inhibitoren über eine

konstante Belastungsdauer von 16 Stunden ausgesetzt. Bei *Blawat et al.* (2021) wurden die PDL-Fibroblasten über einen Zeitraum von 4h, 16h und 24h mechanisch stimuliert, wobei man bei 16h die höchste Fluoreszenz messen und folglich die größte Akkumulation an Autophagosomen verzeichnen konnte. Demgegenüber führte eine Druckbelastung über 4h und auch 24h zu deutlich geringeren Fluoreszenzintensitäten. Daraus kann gemutmaßt werden, dass kurzzeitige mechanische Belastungen von 4h zu keiner signifikant erhöhten Autophagie führen und eine Langzeitbehandlung der PDL-Fibroblasten über 24h zu einer niedrigeren Autophagie führt, da der Zelltod aufgrund der Überlastung zunimmt. Zusammenfassend erschien eine Druckbelastung von 16h adäquat um die Beteiligung von ROCK und ROS an der Autophagie-Induktion zu untersuchen.

4.2.3 In-vitro-Modell

In der vorliegenden Arbeit wurden die Versuche als in-vitro-Modell durchgeführt. Dabei ist zu beachten, dass diese künstlich hergestellten kontrollierten Versuchsbedingungen die Komplexität der in-vivo-Situation nie zu hundert Prozent abbilden können. Da die Autophagie ein äußerst komplexer Mechanismus ist, der durch unterschiedliche Stimuli beeinflusst wird, bietet ein in-vitro-Modell jedoch den Vorteil, die Autophagieregulierung unter definierten differenzierten Stimulationen zu betrachten. So führt zum Beispiel die Verwendung von O₂-durchlässigen Kulturschälchen zu einer Entkopplung von mechanischer Belastung und Hypoxie, wodurch beide Parameter getrennt voneinander betrachtet werden können, was *in-vivo* nicht möglich wäre. Daher sind, bezogen auf die Autophagie, konzentrierte in-vitro-Studien außerordentlich wichtig, um die einzelnen Stimuli und ihre Mechanismen für ein besseres Verständnis detailliert erforschen zu können. Ziel zukünftiger Studien sollte sein, die bereits erworbenen Erkenntnisse in in-vivo-Modellen zu prüfen.

4.3 Ergebnisdiskussion

4.3.1 Autophagieregulation unter Druck

Die Autophagie, als komplexer zellerhaltender Mechanismus, wurde in den letzten Jahrzehnten bereits in einer Vielzahl an Studien erforscht. Dabei wurde ein großes Augenmerk auf die induzierenden und regulierenden Faktoren, wie mechanische Belastung (Druck und Zug), Hypoxie, Nährstoffmangel, mikrobielle Stimulation und Inflammation gelegt (Blawat et al., 2020; Memmert et al., 2017 und 2018). Neben den regulierenden Stimulationen wurde die Autophagie in verschiedenen Organen und Geweben wie unter anderem Herz, Lunge, Niere und Leber untersucht (Chao et al., 2018; Ryter und Choi, 2010; Sciarretta et al., 2018; Tang et al., 2020). Um detaillierteren Aufschluss über den Effekt der Autophagie auf den Mechanismus der OTM zu erlangen, wurden bereits *in-vitro* Studien an humanen PDL-Fibroblasten und PDL-Stammzellen (PDLSCs) durchgeführt. Da bei der OTM die PDL-Zellen auf der einen Seite des Zahnes durch Zug und auf der anderen Seite des Zahnes durch Druck belastet werden, analysierte die Forschungsgruppe von Memmert et al. (2019) die Autophagieregulation unter Zugspannung und unter Druck in PDL-Fibroblasten und kam zu dem Ergebnis, dass sowohl die Autophagie, als auch ATGs im Hinblick auf Intensität und Dauer des Stimulus dosisabhängig gesteuert werden. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sprechen ebenfalls für eine dosisabhängige Induktion bei Druckbelastung und stimmen somit mit den früheren Studien überein. Sowohl King et al. (2011), als auch Memmert et al. (2019) kamen zu dem Resultat, dass dieser wichtige zelluläre Überlebensmechanismus durch mechanische Belastung in dosisabhängiger Weise aktiviert wird. Dabei ist zu erwähnen, dass niedrige mechanische Belastungen keinen signifikanten Einfluss auf die Autophagie zu haben scheinen, während mechanische Reize höherer Größe, in Form von Zugspannung und Kompression, zu einem signifikanten Anstieg des autophagischen Flusses und eine Überbelastung zum Zelltod führen (Blawat et al., 2020; Memmert et al., 2019).

Nach King et al. (2011) liegt der zur Autophagieinduktion erforderliche Druck bei MDA-MB-231-Zellen in einem physiologischen Bereich von etwa 0,2 Kilopascal, wobei bei zunehmendem Druck der Grad der Autophagie mit dem Grad der mechanischen Deformation der Zellen zu korrelieren scheint.

Übereinstimmend zu *King et al.* (2011) konnten die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass eine ansteigende Kompression der Zellen mit einem gesteigerten Autophagiefluss einhergeht und bei Druckbelastungen von 6 g/cm² und 8 g/cm² signifikant erhöht war.

Das Ziel der Zelle, die Homöostase durch die Autophagie aufrecht zu erhalten oder wiederherzustellen, kann bei zu hoher Krafteinwirkung oder zu hoher Zeitdauer nicht mehr aufrechterhalten werden. In solch einer Situation der Überbelastung geht die Zelle in den Zelltod über. Eine Reihe von Studien befassten sich mit der engen Beziehung und den Wechselwirkungen zwischen Autophagie und Apoptose. Die Versuche von *Blawat et al.* (2020) zeigten bei einer geringen Druckbelastung eine zellschützende Reduzierung der Apoptose, während eine Zellüberbelastung zu einem Anstieg an toten Zellen führte. Auch *King et al.* (2011) begründete, dass geringfügige Noxen, welche den physiologischen Kräften entsprechen, durch Aktivierung der Autophagie den Zelltod unterdrücken können. Die Studien von *Ma et al.* (2013) und *Mariño et al.* (2014) kamen zu dem Schluss, dass eine übermäßige Autophagie, entstanden durch Überlastung der Zelle durch Größe oder Dauer eines Stimulus, zum einen die Apoptose induzieren und zum anderen auch einen autophagischen Zelltod einleiten kann.

Die vorliegenden Ergebnisse unterstützen die gegenwärtige Literatur, dass die Autophagie allmählich mit steigender mechanischer Krafteinwirkung hochreguliert wird, bei physiologischen Belastungen zellschützende Eigenschaften hat und erst bei höheren Belastungen signifikant gesteigert wird. Die Studie von *Memmert et al.* (2019) hat gezeigt, dass der Zelltod sowohl durch Einleitung als auch Hemmung der Autophagie induziert werden kann, da viele Stresswege Autophagie und Apoptose in einer Zelle nacheinander initiieren können. Es ist denkbar, dass durch eine gehemmte Autophagie die Ansammlung von funktionslosen Zellstrukturen zunimmt, die Homöostase dadurch aus dem Gleichgewicht gerät und die Zelle daraufhin in die Apoptose übergeht. *Memmert et al.* (2019) analysierten, dass eine Vielzahl unterschiedlicher Signalwege, zu denen Zelltod- und überlebenswege zählen, aktiviert wurden. Es ist anzunehmen, dass ab einem gewissen Punkt der Belastung die induzierte Autophagie die Zellhomöostase nicht mehr aufrechterhalten kann und die Zelle deshalb in den Zelltod übergeht.

Demgegenüber deutet die Studie von *Chen et al.* (2015) drauf hin, dass eine Hemmung der Autophagie zu einer reduzierten Apoptose führt. Diese unterschiedlichen Ergebnisse sind womöglich auf die Wechselwirkungen der verschiedenen Signalwege zurückzuführen.

4.3.2 ROCK-Inhibitor Auswirkungen auf die Autophagie

Die vorliegende Arbeit hatte zum Ziel den Einfluss des Inhibitors Y-27632 auf die Autophagieregulierung in PDL-Fibroblasten genauer zu untersuchen, um dadurch Rückschlüsse auf die Beteiligung der ROCK an der Autophagie-Induktion unter mechanischer Stimulation ziehen zu können und um die Signalwege der Mechanotransduktion weiter zu beleuchten. Unter Anwendung des ROCK-Inhibitors konnte in allen Versuchsgruppen, inklusive der Kontrollgruppe, eine signifikante Reduzierung der Autophagie beobachtet werden. Die vorliegenden Resultate können mit bereits existierenden Forschungsergebnissen aus der bestehenden Literatur verglichen werden. So untersuchten *Wang et al.* (2017) die Auswirkungen von Y-27632 unter anderem auf die Proliferation, Apoptose, Migration und Wundheilungsfähigkeit von multipotenten PDLSCs. Die inhibierende Wirkung des zellpermeablen kleinen Moleküls beruht dabei auf einer selektiven Hemmung von ROCK durch Bindung an die ATP-Bindungsstelle. Die Versuchsergebnisse von *Wang et al.* (2017) haben gezeigt, dass die Anwendung von Y-27632 zu einer gesteigerten Proliferation und Migration von PDLSCs führte, ohne eine signifikante Wirkung auf den Zelltod zu haben. Der Einsatz von 10 μM und 20 μM des Inhibitors hatte eine gesteigerte Proliferation und Migration zu Folge, während die Apoptose nicht erhöht wurde. In den vorliegenden Versuchen wurde eine vergleichbare Konzentration von 10 μM des Inhibitors Y-27632 verwendet. Andere Studien von *Dakic et al.* (2016), *Diao und Hong* (2015), sowie *Ichikawa et al.* (2012) demonstrierten eine anti-apoptotische Wirkung von Y-27632, welche bei humanen Keratinozyten, humanen Hornhautendothelzellen und humanen embryonalen Stammzellen zu einer Hemmung der Apoptose führte. Diese abweichenden Untersuchungsergebnisse werden nach *Wang et al.* (2017) den unterschiedlichen Wirkungsweisen von Y-27632 auf die Apoptose in den verschiedenen Zelltypen zuschreiben.

Im Gegensatz zu den oben genannten Studien wurde in der vorliegenden Arbeit der Effekt von Y-27632 auf die Autophagie, anstatt auf die Apoptose untersucht. Die Versuchsergebnisse zeigten nach Y-27632-Behandlung sowohl in der Kontrollgruppe als auch in allen Druckgruppen eine signifikante Hemmung der Autophagie.

Die Forschungsgruppe um *Mleczak et al.* (2013) untersuchte die Wirkung von ROCK auf die Autophagie in humanen embryonalen Nieren-293-Zellen. Dabei kamen die ROCK-Inhibitoren Y-27632 und H-1152 zur Anwendung. Die Ergebnisse von *Mleczak et al.* (2013) untermauern die Annahme, dass die ROCK-Signalgebung die näherstoffabhängige Autophagie moduliert und eine Rolle bei der Kontrolle der Größe von neu gebildeten Autophagosomen spielt.

Es wurde gezeigt, dass durch eine Verstärkung des ROCK-Signalweges die Autophagie gehemmt wird. Umgekehrt führte eine ROCK-Hemmung unter Aminosäuremangel zu einer schnelleren und stärkeren Autophagiereaktion mit vergrößerten frühen und späten Autophagosomen. Dies legt eine Mechanotransduktion unabhängige Komponente der Beeinflussung von ROCK auf die Autophagie nahe und stellt ein Erklärungsmodell für die Beeinflussung der Autophagie durch Y-27632 in der Kontrollgruppe ohne eine Druckbelastung dar.

Betrachtet man die vorliegenden Ergebnisse der Gruppen $2 \text{ g/cm}^2 + \text{Y-27632}$, $6 \text{ g/cm}^2 + \text{Y-27632}$ und $8 \text{ g/cm}^2 + \text{Y-27632}$, welche eine signifikant reduzierte Autophagie durch ROCK-Hemmung ergaben, stimmen diese nicht mit den Versuchsergebnissen von *Mleczak et al.* (2013) überein. *Mleczak et al.* (2013) mutmaßten, dass die Wirkweise von ROCK auf die Autophagie in Säugetierzellen von der Hefe-selektiven Autophagie zu unterscheiden ist. Es kann angenommen werden, dass diese unstimulierten Ergebnisse dadurch zustande kommen, dass ROCK die Autophagie in humanen embryonalen Nieren-293-Zellen und humanen PDL-Fibroblasten auf unterschiedliche Weise beeinflusst. Zudem muss im Weiteren untersucht werden, ob ROCK die Autophagie bei verschiedenen Stimuli, zum Beispiel Nährstoffmangel und mechanische Belastung, abweichend moduliert.

4.3.3 ROS-Inhibitor Auswirkungen auf die Autophagie

Die vorliegende Arbeit untersuchte neben der Beteiligung von ROCK auch die Beteiligung von ROS an der druckinduzierten Autophagie in PDL-Fibroblasten. In der Literatur wird von einer bedeutsamen Rolle der ROS bei der Autophagie-Induktion ausgegangen (Scherz-Shouval und Elazar, 2007 und 2011). Außerdem legt eine Anzahl an Daten nahe, dass die Autophagie als Reaktion auf diese hochreaktiven Moleküle ein selektiver Prozess ist (Scherz-Shouval und Elazar, 2007). Die detaillierten Aktivierungs- und Regulierungsmodi der ROS an der druckinduzierten Autophagie sind weitestgehend noch ungeklärt. Die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente verfolgten das Ziel, die Beteiligung der ROS als Second Messenger an der Autophagie-Induktion unter mechanischer Druckbelastung zu untersuchen. Hierfür wurde der ROS-Inhibitor NAC eingesetzt. NAC wirkt dabei als Antioxidant indem es eine Radikalfängereigenschaft besitzt. Nur wenige Studien haben bisher die genauen Auswirkungen dieses Inhibitors auf die Autophagie untersucht. Die jüngste Studie von *Fang et al.* (2021) untersuchte die Wirkung von Arsentrioxid auf die Autophagie von Makrophagen und verwendete dabei ROS als Induktoren der zellulären Autophagie. Die Versuchsergebnisse zeigten, dass NAC effektiv die durch Arsentrioxid aktivierte Autophagie blockierte, und harmonisieren demzufolge mit den Daten der vorliegenden Arbeit.

Auch *Halasi et al.* (2013) untersuchten die Wirkweise von NAC und fanden heraus, dass dieses direkt an Proteasomen-Inhibitoren bindet und implizierten, dass NAC eine zweifache Aktivität als Inhibitor sowohl von ROS als auch von Proteasomen-Inhibitoren hat. Zudem stellten Halasi et al. (2013) fest, dass NAC den durch H_2O_2 -induzierten ROS-abhängigen Zelltod vollständig aufhob. In der vorliegenden Arbeit konnte die hemmende Wirkung von NAC auf die mechanisch induzierte Autophagie gezeigt werden und kann somit in Einklang mit der Studie von *Halasi et al.* (2013) gebracht werden.

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass die Behandlung von druckbelasteten PDL-Fibroblasten mit dem ROS-Inhibitor NAC in allen Gruppen zu einer reduzierten Autophagie führte. Die mit NAC behandelten Druckgruppen mit einer physiologischen Belastung von 2 g/cm^2 und einer Belastung von 6 g/cm^2 wiesen dabei eine signifikante Autophagie-

Reduktion auf. Demgegenüber führte eine Überbelastung von 8 g/cm² zu keiner signifikanten Autophagie-Reduktion. Dieses Ergebnis kann darauf hindeuten, dass der hemmende Effekt von NAC bei hoher mechanischer Belastung eine geringere Auswirkung auf die Autophagie hat. Es könnte auch dafür sprechen, dass es einen Schwellenwert gibt, ab dem das NAC nicht mehr genügend ROS wegfängt. Denkbar wäre auch ein Schwellenwert, ab dem die Autophagie und der Zelltod ROS-unabhängig induziert werden. Da mehrere bereits genannte Studien (Leask, 2013; Zhang et al., 2010) ROS als einen Effektor der Autophagie ansehen, stimmen die Resultate der vorliegenden Arbeit gut mit der Literatur überein. Werden die Erkenntnisse der diskutierten Literatur zusammengefasst betrachtet, so wurde eine ROS-abhängige Regulierung der Autophagie bei Noxen wie oxidativem Stress, Hypoxie und Hungerzuständen aufgezeigt, welche sowohl zum Zellüberleben als auch zum Zelltod führen kann (Li et al., 2015; Scherz-Shouval und Elazar, 2007 und 2011). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit deuten ergänzend auf eine Beteiligung von ROS bei mechanischer Druckbelastung in PDL-Fibroblasten hin. Die Studie von *Liu et al.* (2017) arbeitete vier Wege heraus, auf denen ROS die Autophagie beeinflusst. Zum einen kann dies über den BECN1-Bcl-2-Komplex, über die Aktivierung der AMPK und über die NF-κB-Aktivierung geschehen. Zudem können ROS direkt auf den ATG5-ATG12-ATG16L-Komplex einwirken.

Forschungsergebnisse von *Djavaheri-Mergny et al.* (2006) postulieren einen ROS-bedingten Prozess, welcher über TNF-α den autophagischen Zelltod induziert.

Luo et al. (2019) analysierten die Effekte der ROS-induzierten Autophagie auf Apoptose, Proliferation und Differenzierung bei porcinen Trophektodermzellen. Die Studie zeigte, dass durch Anwendung von NAC die ROS-induzierte verringerte Zelllebensfähigkeit und der Zellzyklusstopp gerettet wurden. Außerdem konnten *Luo et al.* (2019) nachweisen, dass NAC die H₂O₂-induzierte ROS-Produktion aufhob. Auch diese Ergebnisse können mit den vorliegenden Daten in Einklang gebracht werden. Zudem unterdrückte NAC die H₂O₂-induzierte mRNA-Expression von IL-1β, IL-6, IL-8, IL-18 und Caspase-1 (Luo et al., 2019). Bezieht man dieses Resultat auf die Biologie der OTM, wo die PDL-Fibroblasten als Antwort auf die sterile Pseudo-Inflammation mit einer erhöhten Expression von unter

anderem IL-6 und IL-8 reagieren, könnte davon ausgegangen werden, dass ROS als Second Messenger eine Schlüsselrolle bei der OTM spielen und die mechanisch-induzierte Autophagie ein wichtiger Prozess bei der OTM ist.

Die jüngste Studie von *Chang et al.* (2022) postulierte, dass ROS die Autophagie nicht nur induzieren können, sondern auch durch direktes Oxidieren von ATG3, ATG7 und ATG10, sowie durch Inaktivierung der Modulatoren PTEN und TFEB zu einer Hemmung der Autophagie führen. In der vorliegenden Arbeit wurde in der druckunabhängigen Kontrollgruppe eine gesteigerte Autophagie unter NAC-Behandlung beobachtet. Dies könnte darauf hindeuten, dass ROS in PDL-Zellen anfänglich erst ATG's oxidieren und autophagische Kernmodulatoren inaktivieren, bevor ROS über ATG4, PI3K und unter anderem p53 zu einer Autophagie-Induktion führen. Um den Kenntnisstand zu vertiefen, sollte in Zukunft weiter erforscht werden, ob und in welchem Maß die ROS-abhängige Autophagieregulierung von Zelltyp, Stresssensation, Schwellenwert und Zeitpunkt abhängt.

4.4 Schlussfolgerung

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit legen eine Beteiligung von ROCK und ROS bei der Autophagie-Induktion unter mechanischer Belastung in PDL-Zellen nah. Anhand der Versuchsergebnisse ist ROCK in Autophagie-assoziierten Signalwegen nicht nur unter Druckbelastung, sondern auch druckunabhängig beteiligt. Um den Kenntnisstand zu erweitern, ist in Zukunft noch abzuklären, ob ROCK ab einem gewissen Schwellenwert der Belastung keinen Einfluss mehr auf die Autophagie hat.

Durch die spezifische ROS-Inhibition durch NAC, welche unter Druckstimulation eindeutig zu einer Reduktion der Autophagie führte, kann auf eine Autophagie-Induktion durch nicht gehemmte ROS als Second Messenger geschlossen werden. Da der hemmende Effekt von NAC bei hoher Belastung weniger Auswirkungen auf die Autophagie zu haben scheint, ist in zukünftigen Versuchen zu klären, ob es einen Schwellenwert gibt, ab dem NAC nicht mehr in der Lage ist, genügend ROS abzufangen.

Des Weiteren muss in weiteren Studien noch geklärt werden, ob die Autophagie und der Zelltod ab einem bestimmten Schwellenwert ROS-unabhängig induziert werden.

Die klinische Konsequenz, welche sich aus der hiesigen Arbeit ergibt, ist die Rolle der Autophagie als wichtiger Mechanismus bei der OTM. Deshalb sollte während einer kieferorthopädischen Behandlung nicht unkritisch auf freiverkäufliche Supplemente mit enthaltenen Antioxidantien geschaut werden, um eine unkontrollierte Beeinflussung der Systeme zu verhindern.

Es soll beachtet werden, dass die vorliegenden Ergebnisse aus einem in-vitro-Modell stammen und eine Übertragbarkeit auf den Menschen limitiert ist. Zudem wurden die Versuche rein an PDL-Zellen durchgeführt, weshalb keine übertragbaren Aussagen über die Beteiligung von ROCK und ROS bei der Autophagie-Regulation in den übrigen im PDL vorherrschenden Zelltypen gemacht werden können.

5. Zusammenfassung

Die Autophagie ist ein durch unterschiedliche Noxen und fehlregulierte Zellbestandteile eingeleiteter zellulärer Mechanismus, der durch verschiedene Faktoren wie Hypoxie, Nährstoffmangel, Entzündung und mechanische Belastung ausgelöst wird, um die Zellhomöostase wiederherzustellen. Dies kann zum Zellüberleben oder zum autophagischen Zelltod führen, je nach Intensität und Dauer des Stressors.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Autophagie unter mechanischer Belastung, insbesondere im Hinblick auf Rho-Kinase (ROCK) und reaktive Sauerstoffspezies (ROS) untersucht. Die PDL-Zellen wurden über 16 Stunden bei Druckbelastungen von 2 g/cm², 6 g/cm² und 8 g/cm² stimuliert. Um mechanischen Stress von Hypoxie zu trennen, wurden sauerstoffdurchlässige Zellkulturschalen verwendet. Um die Beteiligung von ROCK und ROS an der druckinduzierten Autophagie untersuchen zu können, erfolgte eine Behandlung der PDL-Zellen mit dem ROCK-Inhibitor Y-27632, sowie mit dem ROS-Inhibitor NAC. Zur Auswertung wurden die Zellen einem Färbeverfahren mittels Cyto-ID® Autophagy Detection Kit unterzogen und im Anschluss eine durchflusszytometrische Analyse des autophagischen Flusses durchgeführt. Als Positivkontrollgruppe dienten mit dem Autophagie-Induktor Rapamycin behandelte Zellen, während ungefärbte Zellen die Negativkontrollgruppe darstellten. Die Ergebnisse deuten auf eine dosisabhängige Regulierung der Autophagie hin, wobei niedriger Druck mit zellschützenden Eigenschaften assoziiert war. Die Behandlung mit Y-27632 führte zu einer signifikant reduzierten Autophagie in allen Druckgruppen. Bei NAC-Behandlung wurde die Autophagie bei niedrigem und mittlerem Druck signifikant reduziert, während bei hohem Druck kein signifikanter Effekt mehr festgestellt wurde. Dies könnte auf einen Crosstalk zwischen Autophagie und Apoptose hinweisen oder darauf deuten, dass NAC ab einem gewissen Schwellenwert nicht ausreichend ROS neutralisieren kann. In nicht druckstimulierten Kontrollgruppen zeigte sich eine gegenteilige Wirkung, wobei Y-27632 die Autophagie signifikant reduzierte, während NAC sie steigerte. Dies deutet darauf hin, dass ROCK

sowohl druckunabhängig als auch unter verschiedenen Druckbelastungen ein wichtiger Regulator der Autophagie ist.

Zukünftige Studien müssen klären, ob a) Autophagie und Zelltod ab einem bestimmten ROS-unabhängigen Schwellenwert induziert werden, b) wie ROS als Second Messenger unter verschiedenen Stressfaktoren oder zu verschiedenen Zeitpunkten Effektoren beeinflussen, die die Autophagie hemmen oder fördern, und c) ob es einen mechanischen Schwellenwert gibt, ab dem ROCK keinen Einfluss mehr auf die Autophagieregulierung hat. Diese Erkenntnisse könnten unser Verständnis der Autophagie vertiefen und in zukünftigen in-vivo-Studien angewendet werden. Diese in-vivo-Studie könnte anhand eines Tiermodells entsprechend der ARRIVE-Richtlinien (Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments) und nach Genehmigung eines Ethik-Komitees für Tierversuche an Ratten oder Mäusen durchgeführt werden. Dabei wäre vorstellbar die unterschiedlichen mechanischen Belastungen durch verschiedene an den Ratten- oder Mäusezähnen fixierte Apparaturen herbeizuführen und ROCK-hemmende, sowie ROS-hemmende Medikamente einzusetzen. Das Versuchsmodell könnte sich an der Studie von *Chen und Hua* (2021) orientieren, bei der Mäuse unter anderem in eine OTM-Gruppe, eine OTM + Autophagie-Inhibitor-Gruppe und eine OTM + Rapamycin-Gruppe aufgeteilt wurden.

6. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Aufbau des Parodonts	12
Abbildung 2:	Phasen der Zahnbewegung	18
Abbildung 3:	Struktureller Aufbau der Isoformen von ROCK1 und ROCK2 und ihre Homologien	23
Abbildung 4:	Prozessphasen der Autophagie	27
Abbildung 5:	ROS als Second Messenger	36
Abbildung 6:	ROS-induzierte Regulationsmechanismen der Autophagie	38
Abbildung 7:	Zusammenhang zwischen zellulärer Biotechnik und Autophagie	41
Abbildung 8:	Schema des Versuchsaufbaus	54
Abbildung 9:	Zell-Gating	59
Abbildung 10:	Säulendiagramm der Fluoreszenzen der Druckgruppen im Vergleich zur Kontrollgruppe	60
Abbildung 11:	Peakdiagramm als Übersicht der Fluoreszenzen der Kontrolle, Negativ- und Positivkontrolle, sowie der Druckgruppen	61
Abbildung 12:	Säulendiagramm zur Darstellung der Auswirkungen der Inhibitoren Y-27632 und NAC auf die Autophagie der Kontrollgruppe	62
Abbildung 13:	Säulendiagramm zur Darstellung der Auswirkungen der Inhibitoren Y-27632 und NAC auf die druckinduzierte Autophagie bei physiologischer Belastung	63
Abbildung 14:	Säulendiagramm zur Darstellung der Auswirkungen der Inhibitoren Y-27632 und NAC auf die druckinduzierte Autophagie bei Belastung	63
Abbildung 15:	Säulendiagramm zur Darstellung der Auswirkungen der Inhibitoren Y-27632 und NAC auf die Autophagie bei Überbelastung	64

7. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Medien	46
Tabelle 2:	Puffer	47
Tabelle 3:	Chemikalien und Reagenzien	49
Tabelle 4:	Verbrauchsmaterialien	50
Tabelle 5:	Geräte	51
Tabelle 6:	Übersicht der Versuchsgruppen	55

8. Literaturverzeichnis

Albanese F, Novello S, Morari M. Autophagy and LRRK2 in the Aging Brain, *Frontiers in Neuroscience*, 2019, 13:1352

Amano M, Nakayama M, Kaibuchi K. Rho-Kinase/ROCK: A Key Regulator of the Cytoskeleton and Cell Polarity, *Cytoskeleton*, 2010, Vol. 67, Issue 9: 545-554

Amma H, Naruse K, Ishiguro N, Sokabe M. Involvement of reactive oxygen species in cyclic stretch-induced NF- κ B activation in human fibroblast cells, *British Journal of Pharmacology*, 2005, Vol. 145, Issue 3: 364-373

Andrade I, Sousa AB, da Silva GG. New therapeutic modalities to modulate orthodontic tooth movement; *Dental Press Journal of Orthodontics*, 2014, Vol. 19, Issue 6: 123-133

Antonioli M, Di Rienzo M, Piacentini M, Fimia GM. Emerging Mechanisms in Initiating and Termination Autophagy, *Trends in Biochemical Sciences*, 2017, Vol. 42, Issue 1: 28-41

Araki S, Ito M, Kureishi Y, Feng J, Machida H, Isaka N, Amano M, Kaibuchi K, Hartshorne DJ, Nakano T. Arachidonic acid-induced Ca^{2+} sensitization of smooth muscle contraction through activation of Rho-kinase, *Pflügers Archiv*, 2001, Vol. 441, Issue 5: 596-603

Arriola Apelo SI, Lamming DW. Rapamycin: An InhibiTOR of Aging Emerges from the Soil of Easter Island, *The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences*, 2016, Vol. 71, Issue 7: 841-849

Barczyk M, Bolstad AI, Gullberg D. Role of integrins in the periodontal ligament: organizers and faciliators, *Periodontology* 2000, 2013, Vol. 63, Issue 1: 29-47

Blawat K, Mayr A, Hardt M, Krischneck C, Nokhbehsaim M, Behl C, Deschner J, Jäger A, Memmert S. Regulation of Mechanical Loading and Inflammation in Human PDL Fibroblasts, *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, Vol. 21, Issue 24: 9446

Brenner D. Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) als Signalmoleküle und metabolische Regulatoren in T-Lymphozyten, *Trillium*, Ausgabe 2019, Heft 2/2019

Brieger K, Schiavone S, Miller Jr. FJ, Krause KH. Reactive oxygen species: from health to disease, *Swiss Medical Weekly*, 2012, Vol. (?) 142: w13659

Butler WT, Birkedal-Hansen H, Beegle WF, Taylor RE, Chung E. Proteins of the periodontium. Identification of collagens with the $[\alpha 1(I)]_2\alpha 2$ and $[\alpha 1(III)]_3$ structures in bovine periodontal ligament. *Journal of Biological Chemistry*, 1975; Vol. 250, Issue 23: 8907–8912

Chang KC, Liu PF, Chang CH, Lin YC, Chen YJ, Shu CW. The interplay of autophagy and oxidative stress in the pathogenesis and therapy of retinal degenerative diseases, *Cell & Bioscience*, 2022, Vol. 12, Article number: 1

Chao X, Wang H, Jaeschke H, Ding W-X. Role and Mechanisms of Autophagy in Acetaminophen-induced Liver Injury, *Liver International*, 2018, Vol. 38, Issue 8: 1363-1374

Chen L, Hua Y. Autophagy of periodontal ligament inhibits inflammation and reduces the decline of bone density during orthodontic tooth movement of mice, *Archives of Oral Biology*, 2021, Vol. 121, 104960

Chiara Maiuri M, Zalckvar E, Kimchi A, Kroemer G. Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2007, Vol. 8, Issue 9: 741-752

Cho MI, Garant PR. Development and general structure of the periodontium, *Periodontology* 2000, 2000, Vol. 24, Issue 1: 9-27

Dakic A, DiVito K, Fang S, Supryn timer F, Gaur A, Li X, Palechor-Ceron N, Simic V, Choudhury S, Yu S, Simbulan-Rosenthal CM, Rosenthal D, Schlegel R, Liu X. ROCK-inhibitor reduces Myc-induced apoptosis and mediates immortalization of human keratinocytes, *Oncotarget*, 2016, Vol. 7, Issue 41: 66740-66753

D'Arcy MS. Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy, *Cell Biology International*, 2019, Vol. 43, Issue 6: 582-592

De Jong T, Bakker AD, Everts V, Smit TH. The intricate anatomy of the periodontal ligament and its development: Lessons for periodontal regeneration, *Journal of Periodontal Research*, 2017, Vol. 52, Issue 6: 965-974

Deter RL, De Duve C. Influence of glucagon, an inducer of cellular autophagy, on some physical properties of rat liver lysosomes, *Journal of Cell Biology*, 1967, Vol. 33, Issue 2: 437-439

Diao YM, Hong J. Rho-associated protein kinase inhibitor, Y-27632, significantly enhances cell adhesion and induces a delay in G1 to S phase transition in rabbit corneal endothelial cells, *Molecular Medicine Reports*, 2015, Vol. 12, Issue 2: 1951-1956

Dikic I, Elazar Z. Mechanism and medical implications of mammalian autophagy, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2018, Vol. 19, Issue 6: 349-364

Djavaheri-Mergny M, Amelotti M, Mathieu J, Besancon F, Bauvy C, Souqère S, Pierron G, Codogno P. NF-kappaB activation represses tumor necrosis factor-alpha-induced autophagy, *Journal of Biological Chemistry*, 2006, Vol. 281, Issue 41: 30373-30382

Etienne-Manneville S, Hall A. Rho GTPases in cell biology, *Nature*, 2002, Vol. 420, Issue 6916: 629-635

Fang S, Wan X, Zou X, Sun S, Hao X, Liang C, Zhang Z, Zhang F, Sun B, Li H, Yu B. Arsenic trioxide induces macrophage autophagy and atheroprotection by regulating ROS-dependent TFEB nuclear translocation and AKT/mTOR pathway, *Cell Death & Disease*, 2021, Vol. 12, Issue: 1, 88

Feller L, Khammissa RAG, Schlechter I, Moodley A, Thomadakis G, Lemmer J. Periodontal Biological Events Associated with Orthodontic Tooth Movement: The Biomechanics of the Cytoskeleton and the Extracellular Matrix, *The Scientific World Journal*, 2015, Vol. 2015: 894123

Feng Y, He D, Yao Z, Klionsky DJ. The machinery of macroautophagy, *Cell Research*, 2014, Vol. 24, Issue 1: 24-41

Feng Y, LoGrasso PV, Defert O, Li R. Rho Kinase (ROCK) Inhibitors and Their Therapeutic Potential, *Journal of Medicinal Chemistry*, 2016, Vol. 59, Issue 6: 2269-2300

Finkel T. Signal transduction by reactive oxygen species, *Journal of Cell Biology*, 2011, Vol. 194, Issue 1: 7-15

Geng Y, Wang Z. Review of cellular mechanotransduction on micropost substrates, *Medical & Biological Engineering & Computing*, 2016, Vol. 54: 249-271

Glick D, Barth S, Macleod KF. Autophagy: cellular and molecular mechanisms, *The Journal of Pathology*, 2010, Vol. 221, Issue 1: 3-12

Gonzales C, Hotokezaka H, Yoshimatsu M, Yozgatian JH, Darendeliler MA, Yoshida N. Force magnitude and duration effects on amount of tooth movement and root resorption in the rat molar, *The Angle Orthodontist*, 2008, Vol. 78, Issue 3: 502-509

Guo YJ, Pan WW, Liu SB, Shen ZF, Xu Y, Hu LL. ERK/MAPK signaling pathway and tumorigenesis, *Experimental and Therapeutic Medicine*, 2020, Vol. 19, Issue 3: 1997-2007

Halasi M, Wang M, Chavan TS, Gaponenko V, Hay N, Gartel AL. ROS inhibitor N-acetyl-L-cysteine antagonizes the activity of proteasome inhibitors, *Biochemical Journal*, 2013, Vol. 454, Issue 2: 201-208

Hardt M, Mayr A, Kutschera E, Marciniak J, Calvano Küchler E, Krischnek C, Deschner J, Jäger A, Beisel-Memmert S. Involvement of Rho-kinases and reactive oxygen species in autophagy regulation by pressure in PDL cells, *Brazilian Dental Journal*, 2024, Submission ID: BDJ-2024-5944

Hartmann S, Ridley AJ, Lutz S. The Function of Rho-Associated Kinases ROCK1 and ROCK2 in the Pathogenesis of Cardiovascular Disease, *Frontiers in Pharmacology*, 2015, Vol. 6: 276

Hassell TM. Tissues and cells of the periodontium, *Periodontology 2000*, 1993, Vol. 3, Issue 1: 9-38

He Y, Macarak EJ, Korostoff JM, Howard PS. Compression and Tension: Differential Effects on Matrix Accumulation by Periodontal Ligament Fibroblasts in Vitro, *Connective Tissue Research*, 2004, Vol. 45, Issue 1: 28-39

Hellwig E. Einführung in die Zahnerhaltung, 4. Auflage, Seite 361, 369, 371

Hernández-Cáceres MP, Munoz L, Pradenas JM, Pena F, Lagos P, Aceiton P, Owen GI, Morselli E, Criollo A, Ravasio A, Bertocchi C. Mechanobiology of Autophagy: The Unexplored Side of Cancer, *Frontiers in Oncology*, 2021, Vol. 11: 632956

Hirashima S, Kanazawa T, Ohta K, Nakamura KI. Three-dimensional ultrastructural imaging and quantitative analysis of the periodontal ligament, *Anatomical Science International*, 2019, Vol. 95, Issue 1: 1-11

Hofbauer L, Rachner T. Die Rolle des Rank/RANKL/OPG-Signalwegs im Knochenstoffwechsel, Osteoimmunologie und Osteoonkologie-Therapeutische Perspektiven der RANK-Ligand-Hemmung, Springer, 2010, Kaptiel 5, Seite 118

Holle AW, Engler AJ. More than a feeling: discovering, understanding, and influencing mechanosensing pathways, *Current Opinion in Biotechnology*, 2011, Vol. 22, Issue 5: 648-654

Hudson DM, Garibov M, Dixon DR, Popowics R, Eyre DR. Distinct post-translational features of type I collagen are conserved in mouse and human periodontal ligament, *Journal of Periodontal Research*, 2017, Vol. 52, Issue 6: 1042-1049

Ichikawa H, Nakata N, Abo Y, Shirasawa S, Yokoyama T, Yoshie S, Yue F, Tomotsune D, Sasaki K. Gene pathway analysis of the mechanism by which the Rho-associated kinase inhibitor Y-27632 inhibits apoptosis in isolated thawed human embryonic stem cells, *Cryobiology*, 2012, Vol. 64, Issue 1: 12-22

Jacobs CR, Temiyasathit S, Castillo AB. Osteocyte mechanobiology and pericellular mechanics, *Annual Review of Biomedical Engineering*, 2010, Vol. 15, Issue 12: 369-400

Jiang N, Guo W, Chen M, Zheng Y, Zhou J, Kim SG, Embree MC, Song KS, Marao HF, Mao JJ. Periodontal Ligament and Alveolar Bone in Health and Adaptation: Tooth Movement, *Frontiers of Oral Biology*, 2016, Vol. 18: 1-8

Julian L, Olson MF. Rho-associated coiled-coil containing kinases (ROCK); Small GTPases, 2014, Vol. 5, Issue 2, Article: e29846

Jung CH, Jun CB, Ro SH, Kim YM, Otto NM, Cao J, Kundu M, Kim DH. ULK-Atg13-FIP200 Complexes Mediate mTOR Signaling to the Autophagy Machinery, *Molecular Biology of the Cell*, 2009, Vol. 20, Issue 7: 1992-2003

Jung CH, Ro SH, Cao J, Otto NM, Kim DH. mTOR regulation of autophagy, *FEBS Letters*, 2010, Vol. 584, Issue 7: 1287-1295

Kanzaki H, Chiba M, Shimizu Y, Mitani H. Periodontal ligament cells under mechanical stress induce osteoclastogenesis by receptor activator of nuclear kappaB ligand up-regulation via prostaglandin E2 synthesis, *Journal of Bone and Mineral Research*, 2002, Vol. 17, Issue 2: 210-220

Kaushik S, Cuervo AM. The coming of age of chaperone-mediated autophagy, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2018, Vol. 19, Issue 6: 365-381

Kim J, Kundu M, Viollet B, Guan KJ. AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1, *Nature Cell Biology*, 2011, Vol. 13, Issue 2: 132-141

Kim YC, Guan KL. mTOR: a pharmacologic target for autophagy regulation, *Journal of Clinical Investigation*, 2015, Vol. 125, Issue 1: 25-32

Kim S, Eun HS, Jo EK. Roles of Autophagy-Related Genes in the Pathogenesis of Inflammatory Bowel Disease, *Cells*, 2019, Vol. 8, Issue 1: 77

Kimura T, Takabatake Y, Takahashi, Isaka Y. Chloroquine in Cancer Therapy: A Double-Edged Sword of Autophagy, *Cancer Research*, 2013, Vol. 73, Issue 1: 3-7

King JS, Veltman DM, Insall RH. The induction of autophagy by mechanical stress, *Autophagy*, 2011, Vol. 7, Issue 12: 1490-1499

King JS. Mechanical stress meets autophagy: potential implications of physiology and pathology, *Trends in Molecular Medicine*, 2012, Vol. 18, Issue 10: 583-588

Kirchner P, Bourdenx M, Madrigal-Matute J, Tiano S, Diaz A, Bartholdy BA, Will B, Cuervo AM. Proteome-wide analysis of chaperone-mediated autophagy targeting motifs, *PLOS Biology*, 2019, Vol. 17, Issue 5

Kondratskyi A, Kondratska K, Skryma R, Klionsky DJ, Prevarskaya N. Ion channels in the regulation of autophagy, *Autophagy*, 2018, Vol. 14, Issue 1: 3-21

Krishnan V, Davidovitch Z. Cellular, molecular, and tissue-level reactions to orthodontic force, *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics*, 2006, Vol. 129, Issue 4: 469

Krishnan V, Davidovich Z. On a Path to Unfolding the Biological Mechanisms of Orthodontic Tooth Movement, *Journal of Dental Research*, 2009, Vol. 88, Issue 7: 597-608

Krishnan V, Davidovich Z. *Biological Mechanisms of Tooth movement*, Wiley Blackwell, 2. Auflage, 2015, Seite 3,9,19

Leask A. Integrin $\beta 1$: A Mechanosignaling Sensor Essential for Connective Tissue Deposition by Fibroblasts, *Advances in Wound Care*, 2013, Vol. 2, Issue 4: 160-166

Levine B, Yuan J. Autophagy in cell death: an innocent convict?, *Journal of Clinical Investigation*, 2005, Vol. 115, Issue 10: 2679-2688

Levine B, Kroemer G. Biological Functions of Autophagy Genes: A Disease Perspective, *Cell*, 2019, Vol. 176, Issue 1-2: 11-42

Li WW, Li J, Bao JK. Microautophagy: lesser-known self-eating, *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2012, Vol. 69, Issue 7: 1125-1136

Li L, Tan J, Miao Y, Lei P, Zhang Q. ROS and Autophagy: Interactions and Molecular Regulatory Mechanisms, *Cellular and Molecular Neurobiology*, 2015, Vol. 35, Issue 5: 615-621

Li R, Jia Z, Trush MA. Defining ROS in Biology and Medicine, *Reactive Oxygen Species*, 2016, Vol. 1, Issue 1: 9-21

Li Y, Jacox LA, Little SH, Ko CC. Orthodontic tooth movement: the biology and clinical implications, *Kaohsiung Journal of Medical Sciences*, 2018, Vol. 34, Issue 4: 207-214

Lippai M, Szatmári Z. Autophagy-from molecular mechanisms to clinical relevance, *Cell Biology and Toxicology*, 2017, Vol. 33, Issue 2: 145-168

Liu J, Gao HY, Wang XF. The role of the Rho/ROCK signaling pathway in inhibiting axonal regeneration in the central nervous system, *Neural Regeneration Research*, 2015, Vol. 10, Issue 11: 1892-1896

Liu C, Mo L, Niu Y, Li X, Zhou X, Xu X. The Role of Reactive Oxygen Species and Autophagy in Periodontitis and Their Potential Linkage, *Frontiers in Physiology*, 2017, Vol. 8: 439

Lörincz P, Juhász G. Autophagosome-Lysosome Fusion, *Journal of Molecular Biology*, 2020, Vol. 432, Issue 8: 2462-2482

Luo Z, Xu X, Sho T, Zhang J, Xu W, Yao J, Xu J. ROS-induced autophagy regulates porcine trophectoderm cell apoptosis, proliferation, and differentiation, *American Journal of Physiology – Cell Physiology*, 2019, Vol. 316, Issue: 2, C198-C209

Ma Y, Galluzzi L, Zitvogel L, Kroemer G. Autophagy and cellular immune responses, *Immunity*, 2013, Vol. 39, Issue 2 :211-227

Mariño G, Niso-Santano M, Baehrecke EH, Kroemer G. Self-consumption: the interplay of autophagy and apoptosis, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2014, Vol. 15, Issue 2: 81-94

Martino F, Perestrelo AR, Vinarsky V, Pagliari S, Forte G. Cellular Mechanotransduction: From Tension to Function, *Frontiers in Physiology*, 2018 Jul 5, Issue 9: 824

Matsui T, Amano M, Yamamoto T, Chihara K, Nakafuku M, Ito M, Nakano T, Okawa K, Iwamatsu A, Kaibuchi K. Rho-associated kinase, a novel serine/threonine kinase, as a putative target for small GTP binding protein Rho, *The EMBO Journal*, 1996, Vol. 15, Issue 9: 2208-2216

Memmert S, Damanaki A, Nogueira AVB, Eick S, Nokhebsaim M, Papadopoulou AK, Till A, Rath B, Jepsen S, Götz W, Piperi C, Basdra EK, Cirelli JA, Jäger A, Deschner J. Role of Cathepsin S in Periodontal Inflammation and Infection, *Mediators of inflammation*, 2017, Vol. 2017, Article ID 4786170, <https://doi.org/10.1155/2017/4786170>

Memmert S, Nogueira AVB, Damanaki A, Nokhebsaim M, Eick S, Divnic-Resnik T, Spahr A, Rath-Deschner B, Till A, Götz W, Cirelli JA, Jäger A, Deschner J. Damage-regulated autophagy modulator 1 in oral inflammation and infection, *Clinical Oral Investigations*, 2018, Vol. 22, Issue 8: 2933-2941

Memmert S, Damanaki A, Weykopf B, Rath-Deschner B, Nokhbehsaim M, Götz W, Götz L, Till A, Deschner J, Jäger A. Autophagy in periodontal ligament fibroblasts under biomechanical loading, *Cell and Tissue Research*, 2019, Vol. 378, Issue 3: 499-511

Menon MB, Dhamija S. Beclin 1 Phosphorylation – at the Center of Autophagy Regulation, *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 2018, 6: 137

Militi A, Cutroneo G, Favalaro A, Matarese A, Di Mauro D, Lauritano F, Centofanti A, Cervino G, Nicita F, Bramanti A, Rizzo G. An immunofluorescence study on VEGF and extracellular matrix proteins in human periodontal ligament during tooth movement, *Heliyon*, 2019, Vol. 5, Issue 10

Mizushima N, Komatsu M. Autophagy: Renovation of Cells and Tissues, *Cell*, 2011 Vol. 147, Issue 4: 728-741

Mieczak A, Millar S, Tooze SA, Olson MF, Chan EYW. Regulation of autophagosome formation by Rho kinase, *Cellular Signalling*, 2013, Vol. 25, Issue 1: 1-11

Monje A, Chan HL, Galindo-Moreno P, Elnayef B, Suarez-Lopez del Amo F, Wang F, Wang HL. Alveolar Bone Architecture: A Systemic Review and Meta-Analysis, *Journal of Periodontology*, 2015, Vol. 86, Issue 11: 1231-1248

Müller HP. *Parodontologie*, 3. Auflage, Thieme Verlag KG, 2001, Seite 13, 20, 21, 23

Murshid SA. The role of osteocytes during experimental orthodontic tooth movement: A review, *Archives of Oral Biology*, 2017, Vol. 73: 25-33

Nanci A, Bosshardt DD. Structure of periodontal tissues in health and disease, *Periodontology* 2000, 2006, Vol. 40, Issue 1: 11-28

Narumiya S, Thumkeo D. Rho signaling research: history, current status and future directions, *FEBS Letters*, 2018, Vol. 592, Issue 11: 1763-1776

Naveh GR, Lev-Tov Chattah N, Zaslasky P, Shahar R, Weiner S. Tooth-PDL-bone complex: response to compressive loads encountered during mastication – a review, *Archives of Oral Biology*, 2012, Vol. 57, Issue 12: 1575-1584

Nimeri G, Kau CH, Abou-Kheir NS, Corona R. Acceleration of tooth movement during orthodontic treatment – a frontier in Orthodontics, *Progress in Orthodontics*, 2013, Vol. 14: 42

Nishimura T, Tooze SA. Emerging roles of ATG proteins and membrane lipids in autophagosome formation, *Cell Discovery*, 2020, Vol. 6: 32

Pajares M, Rojo AI, Arias E, Diaz-Carretero A, Cuervo AM, Cuadrado A. Transcription factor NFE2L2/NRF2 modulates chaperone-mediated autophagy through the regulation of LAMP2A, *Autophagy*, 2018, Vol. 14, Issue 8: 1310-1322

Parzych KR, Klionsky DJ. An Overview of Autophagy: Morphology, Mechanism, and Regulation, *Antioxidants & Redox Signaling*, 2014, Vol. 20, Issue 3: 460-473

Pilon JJAM, Kuijpers-Jagtman AM, Maltha JC. Magnitude of orthodontic forces and rate of bodily tooth movement: an experimental study in beagle dogs, *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics*, 1996, Vol. 110: 16-23

Plagmann HC. *Lehrbuch der Parodontologie*, 1. Auflage, Reprint 2004, 1998, Seite 4, 5, 6, 23, 26, 30, 31

Premaraj S, Souza I, Premaraj T. Mechanical loading activates β -catenin signaling in periodontal ligament cells, *The Angle Orthodontist*, 2011, Vol. 81, Issue 4: 592-599

Reiling JH, Sabatini DM. Stress and mTOR signaling, *Oncogene*, 2006, Vol. 25, Issue 48: 6373-6383

Reiner DJ, Lundquist EA. Small GTPases, *Wormbook*, 2018: 1-65

Ridone P, Vassalli M, Martinac B. Piezo1 mechanosensitive channels: what are they and why are they important, *Biophysical Reviews*, 2019, Vol.11, Issue 5: 795-805

Russell RC, Tian Y, Yuan H, Park HW, Chang YY, Kim J, Kim H, Neufeld TP, Dillin A, Guan KL. ULK1 induces autophagy by phosphorylating Beclin-1 and activating Vsp34 lipid kinase, *Nature Cell Biology*, 2013, Vol. 15, Issue 7: 741-750

Rygh P. Ultrastructural changes in pressure zones of human periodontium incident to orthodontic tooth movement, *Acta Odontologica Scandinavica*, 1973, Vol. 31, Issue 2: 109-122

Ryter SW, Choi AMK. Autophagy in the lung, *Proceedings of the American Thoracic Society*, 2010, Vol. 7, Issue 1: 13-21

Scherz-Shouval R, Elazar Z. ROS, mitochondria and the regulation of autophagy, *Trends in Cell Biology*, 2007, Vol. 17, Issue 9: 422-427

Scherz-Shouval R, Elazar Z. Regulation of autophagy by ROS: physiology and pathology, *Trends in Biochemical Sciences*, 2011, Vol. 36, Issue 1: 30-38

Schröder A, Bauer K, Spanier G, Proff P, Wolf M, Krischneck C. Expression kinetics of human periodontal ligament fibroblasts in the early phase of orthodontic tooth movement, *Journal of Orofacial Orthopedics*, 2018, Vol. 79, Issue 5: 337-351

Schuck S. Microautophagy – distinct molecular mechanisms handle cargoes of many sizes, *Journal of Cell Science*, 2020, Vol. 133, Issue 17

Sciarretta S, Maejima Y, Zablocki D, Sadoshima J. The Role of Autophagy in the Heart, *Annual Review of Physiology*, 2018, Vol. 80: 1-26

Shimokawa H, Sunamura S. Satoh K. RhoA/Rho-Kinase in the Cardiovascular System, *Circulation Research*, 2016, Vol. 118, Issue 2: 352-366

Slobodkin MR, Elazar Z. The Atg8 family: multifunctional ubiquitin-like key regulators of autophagy, *Essays in Biochemistry*, 2013, Vol. 55: 51-64

Sotthibundhu A, McDonagh K, von Kriegsheim A, Garcia-Munoz A, Klawiter A, Thompson K, Chauhan KD, Krawczyk J, McInerney V, Dockery P, Devine MJ, Kunath T, Barry F, O'Brien T, Shen S. Rapamycin regulates autophagy and cell adhesion in induced pluripotent stem cells, *Stem Cell Research & Therapy*, 2016, Vol. 7, Issue 1: 166

Takai Y, Sasaki T, Matozaki T. Small GTP-binding proteins, *Physiological Reviews*, 2001, Vol. 81, Issue 1: 153-208

Tang C, Livingston MJ, Liu Z, Dong Z. Autophagy in kidney homeostasis and disease, *Nature Reviews Nephrology*, 2020, Vol. 16, Issue 9: 489-508

Tanida I, Ueno T, Kominami E. LC3 conjugation system in mammalian autophagy, *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2004, Vol. 36, Issue 12: 2503-2518

Tietze S, Hofmann A, Wolk S, Reeps C. Grundlagen der zellulären Mechanotransduktion, *Gefäßchirurgie*, 2020, Vol. 25: 244-248

Tschumperlin DJ. Mechanotransduction, *Comprehensive Physiology*, 2011, Vol.1, Issue 2: 1057-1073

Ullrich N, Schröder A, Jantsch J, Spanier G, Proff P, Kirschneck C. The role of mechanotransduction versus hypoxia during simulated orthodontic compressive strain – an in vitro study of human periodontal ligament fibroblasts, *International Journal of Oral Science*, 2019, Vol. 11, Issue 4: 33

Von Böhl M, Maltha JC, Von den Hoff JW, Kuijpers-Jagtman AM. Focal hyalinization during experimental tooth movement in beagle dogs, *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics*, 2004, Vol. 125: 615-623

Wang T, Kang W, Du L, Ge S. Rho-kinase inhibitor Y-27632 facilitates the proliferation, migration and pluripotency of human periodontal ligament stem cells, *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 2017, Vol. 21, Issue 11: 3100-3112

Wang Y, Zhang H. Regulation of Autophagy by mTOR Signaling Pathway, *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 2019, Vol. 1206: 67-83

Wettschureck N, Offermanns S. Rho/Rho-kinase mediated signaling in physiology and pathophysiology, *Journal of Molecular Medicine*, 2002, Vol. 80, Issue 10: 629-638

Wichelhaus A. *Farbatlant der Zahnmedizin: Kieferorthopädie – Therapie Band 1*, 2012, Thieme, Seite 20/21, Seite 54-56

Wong PM, Puente C, Ganley IG, Jiang X. The ULK1 complex, *Autophagy*, 2013, Vol. 9, Issue 2: 124-137

Xu HD, Qin ZH. Beclin-1, Bcl-2 and Autophagy, *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 2019, Vol. 1206: 109-126

Yang Q, Wang R, Zhu L. Chaperone-Mediated Autophagy, *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 2019, Vol. 1206: 435-452

Young MM, Takahashi Y, Khan O, Park S, Hori T, Yun J, Sharma AK, Amin S, Hu CD, Zhand J, Kestter M, Wang HG. Autophagosomal membrane serves as platform for intracellular death-inducing signaling complex (iDISC)-mediated caspase-8 activation and apoptosis, *Journal of Biological Chemistry*, 2012, Vol. 287, Issue 15: 12455-12468

Yu L, Chen Y, Tooze SA. Autophagy pathway: Cellular and molecular mechanisms, *Autophagy*, 2018, Vol. 14, Issue 2: 207-215

Zainal Ariffin SH, Yamamoto Z, Zainol Abidin IZ, Megat Abdul Wahab R, Zainal Ariffin Z. Cellular and Molecular Changes in Orthodontic Tooth Movement, *Scientific World Journal*, 2011, Vol. 11: 1788-1803

Zhang Y, Peng F, Gao B, Ingram AJ, Krepinsky JC. Mechanical Strain-Induced RhoA Activation Requires NADPH Oxidase-Mediated ROS Generation in Caveolae, *Antioxidants & Redox Signaling*, 2010, Vol. 13, Issue 7: 959-973

9. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen Personen, die mich bei der Anfertigung meiner Dissertation unterstützt und betreut haben, meinen großen Dank aussprechen.

Hiermit bedanke ich mich zunächst bei Herrn Prof. Dr. med. dent. Jäger, meinem Doktorvater, für die Betreuung bei der Umsetzung dieser Arbeit.

Außerdem gilt mein besonderer Dank meiner Betreuerin Priv. Doz. Dr. med. dent. Beisel-Memmert für die Bereitstellung relevanter Dokumente, für die enorme Unterstützung und für ihre wissenschaftliche Begleitung auf diesem Weg. Ihren Rat, die produktiven Anregungen, sowie die lieben Worte werde ich in guter Erinnerung behalten. Für die Durchsicht dieser Arbeit möchte ich mich ebenfalls bei ihr bedanken.

Ein weiterer Dank geht an Kim, Alexandra und Jana für ihre Unterstützung während der wissenschaftlichen Arbeit im Labor. Zudem danke ich ihnen für die Einführung in die Durchflusszytometrische Analyse, sowie für die Einarbeitung in diverse Computer Programme zur Ergebnisauswertung.

Nicht zuletzt möchte ich einen ganz besonderen Dank an meinen Ehemann für seinen moralischen Beistand, sein Verständnis und seine aufbauenden Worte aussprechen. Des Weiteren bedanke ich mich bei meinen Eltern, die mir meinen Weg bis hierhin ermöglicht und geebnet haben.