

Beeinflussung der zirkadianen Rhythmik von Parodontalligamentzellen durch mechanischen Stress

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades (Dr. med. dent.)

der Medizinischen Fakultät

der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität

Bonn

Lena Isabell Peters

aus Bonn

2025

Angefertigt mit der Genehmigung
der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. med. dent. Andreas Jäger
2. Gutachter: Prof. Dr. med. dent. Helmut Stark

Tag der mündlichen Prüfung: 14.04.2025

Aus der Poliklinik für Kieferorthopädie

Inhaltsverzeichnis

	Abkürzungsverzeichnis	4
1.	Deutsche Zusammenfassung	5
1.1	Einleitung	5
1.2	Material und Methoden	9
1.3	Ergebnisse	13
1.4	Diskussion	18
1.5	Zusammenfassung	25
1.6	Literaturverzeichnis der deutschen Zusammenfassung	27
2.	Veröffentlichung	32
3.	Danksagung	33

Abkürzungsverzeichnis

Abb	Abbildung
ANOVA	Varianzanalyse (<i>Analysis Of Variance</i>)
ARNTL/BMAL1	Arylkohlenwasserstoffrezeptor-Kerntranslokator-ähnliches Protein Basic Helix-Loop-Helix ARNT Like 1
CLOCK	Circadian Locomotor Output Cycles Kaput
COL1A	Kollagen-Typ 1 α
CRY1	Chrytochrom 1
CRY2	Chrytochrom 2
DMEM	Dulbeccos minimal esstinal Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
Elisa	Enzyme-Linked-Immunsorbent- Assay
FBS	fetales Rinder Serum
IL-1 β	Interleukin-1 beta
OTM	kieferorthopädische Zahnbewegung
PDL-Zellen	parodontale Ligamentzellen
qRT PCR	quantitative Echtzeit Polymerasekettenreaktion
PER1	Period 1
PER2	Period 2
RUNX2	Runt-verwandter Transkriptionsfaktor 2
RNA	Ribonukleinsäure

1. Deutsche Zusammenfassung

1.1 Einleitung

Die kieferorthopädische Behandlung erfolgt mit herausnehmbaren oder festsitzenden Apparaturen, die von den Kieferorthopäden eingesetzt und von den Patienten nach Anweisung getragen werden. Insbesondere die herausnehmbaren Apparaturen bzw. die herausnehmbaren Teile der festsitzenden Apparaturen sind vom Patienten nach Anweisung des Behandlers selbständig zu tragen. Bei herausnehmbaren Apparaturen ergeben sich ästhetische und funktionelle Einschränkungen (z.B. beim Sprechen), so dass sich die Tragezeit insbesondere auf die Nacht konzentriert. Jedoch erfolgt eine differentielle Regulation von physiologischen Abläufen und Metabolismen in Abhängigkeit von exogenen Faktoren wie Licht und Dunkelheit oder Nahrungsaufnahme. Endogene Zyklusabläufe in Säugetieren werden durch eine biologische zirkadiane Uhr gesteuert. Die lateinische Phrase „circa diem“ wird in dem deutschen Begriff „zirkadian“ aufgegriffen und beschreibt Zyklusabläufe, die sich innerhalb von 24 h periodisch wiederholen. Die zirkadiane Rhythmik dient als entscheidender Faktor bei wichtigen physiologischen Prozessen im menschlichen Körper, wie zum Beispiel bei der Regulation des Glucose- und Insulin-Metabolismus oder des Schlaf- und Wach-Rhythmus (van Cauter et al., 1997; Sack et al., 2007). Kommt es zu Irritationen in dem System der zirkadianen Rhythmik, können pathophysiologische Abläufe auftreten. Die bekanntesten Beeinträchtigungen sind die zirkadianen Schlaf- Wach- Rhythmusstörungen, wie der Jetlag (Sack et al., 2007). Weitere Erkrankungen des Körpers wie zum Beispiel Diabetes mellitus, kardiovaskuläre Störungen und sogar auch Krebs können ebenfalls durch Störungen dieses Systems begünstigt werden (Sinha et al., 1996; Scheer, Frank A J L et al., 2009; Wang et al., 2016). Stoffwechselaktivitäten und Umbauprozesse, wie sie für eine Zahnbewegung notwendig sind, werden also durch Umweltreize beeinflusst, die als sogenannte Zeitgeber dienen (Fu und Yang, 2017).

Der zentrale Regulator unserer inneren Uhr ist der suprachiasmatische Nucleus (SCN), der am vorderen Teil des Hypothalamus liegt und von Licht als Umweltreiz bzw. Zeitgeber gesteuert wird (Reppert und Weaver, 2001). Er dient als Hauptschrittmacher für die zeitliche Koordination der zirkadianen Rhythmik und dirigiert die peripheren Uhren, wie die der Organe und Gewebe, über neuronale oder hormonelle Signalwege und

synchronisiert diese (Albrecht, 2012; Buijs und Kalsbeek, 2001; Zhang et al., 2014; Reppert und Weaver, 2002).

Die zirkadiane Rhythmik wird zudem auch durch periphere Schrittmacher in verschiedenen Körperzellen gesteuert. Um das sogenannte Entrainment bzw. die Synchronisation der Uhren im peripheren Gewebe aufrechtzuerhalten, benötigt das Organ/Gewebe periphere molekulare Oszillatoren, bekannt als Clock-Gene. Auf molekularer Ebene werden durch verschiedene Clock-Gene interagierende transkriptionale Rückkopplungsschleifen gebildet. Das Basissystem der Rückkopplungsschleife startet mit den Transkriptionsfaktoren Arylkohlenwasserstoffrezeptor-Kerntranslokator-ähnliches Protein/Basic Helix-Loop-Helix ARNT Like 1 (ARNTL/BMAL1) und Zircadian Locomotor Output Cycles Kaput (CLOCK), welche als heterodimere an einen E-Box-Verstärker binden. Dadurch kommt es zur Eröffnung der negativen Rückkopplungsschleife durch die Transkription der Period- (PER1/PER2/PER3) und Cryptochrom-Gene (CRY1/CRY2). Die gebildeten Proteine mPer und mCry wandern zu dem Heterodimerkomplex CLOCK und/oder BMAL1 und inhibieren diesen, sodass auch die Produktion der Transkriptionsfaktoren PER und CRY herunterreguliert wird. Damit ist die negative Rückkopplungsschleife geschlossen (Kume et al., 1999; Lowrey und Takahashi, 2011; Takahashi, 1993; Zheng et al., 2001; Reppert und Weaver, 2002). Nach Takahashi et al. wird diese Rückkopplungsschleife auch als „Kern-Oszillatormechanismus“ für alle Säugetiere beschrieben (Abb 1; Lowrey und Takahashi, 2011).

Der Einfluss der peripheren Schrittmacher auf die Zellhomöostase wurde auch bereits in oralen Zellen, wie dentalen Pulpazellen, Ameloblasten, Odontoblasten, Fibroblasten der Gingiva und parodontale Ligament (PDL) Zellen nachgewiesen (Janjić et al., 2017, 2018; Janjić und Agis, 2019; Hilbert et al., 2019; Zhao et al., 2018; Zheng et al., 2014; Zheng et al., 2013).

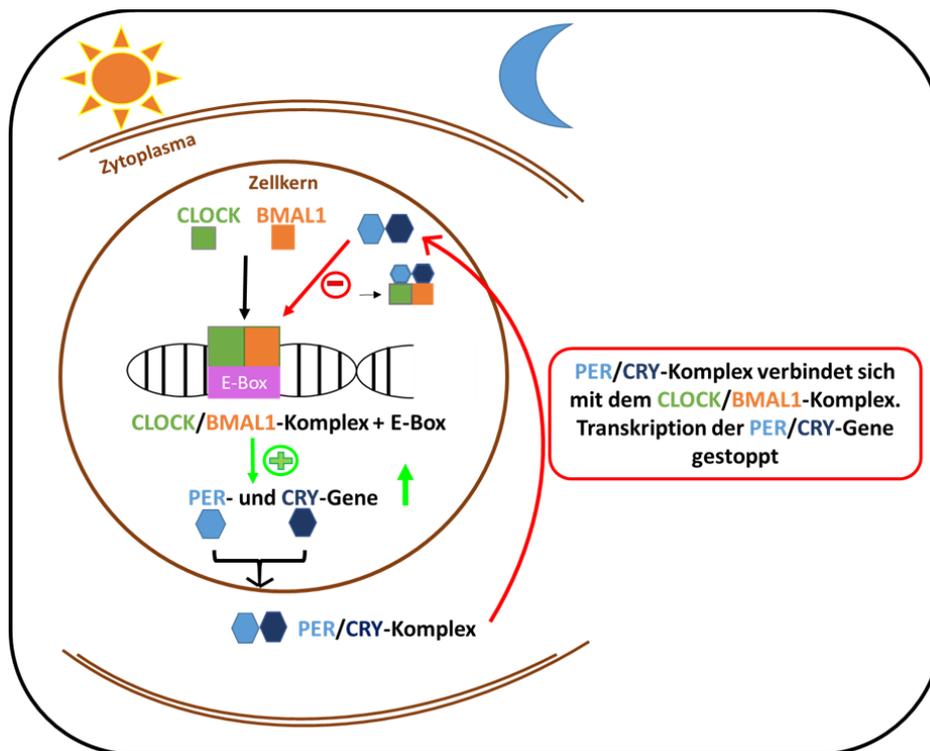


Abb 1: Darstellung der transkriptionalen zellulären Rückkopplungsschleife der peripheren zirkadianen Uhr. Abbildung modifiziert nach Reppert und Waeber, 2002.

Die PDL-Zellen nehmen eine entscheidende Rolle für die Organisation der Umbauprozesse ein, die bei der kieferorthopädischen Zahnbewegung (OTM – orthodontic tooth movement) in Form von Resorption und Apposition den die Zähne umgebenden Knochenträger remodellieren (Roberts et al., 2004). Während der OTM, werden kieferorthopädische Kräfte durch die Zähne auf das umliegende Gewebe übertragen und es entstehen Kompressions- und Dehnungsareale. Dieser mechanische Stress löst ein biochemisches Signal im parodontalen Gewebe aus. Bei der Weiterleitung der biomechanischen Signale und der daraus resultierenden Umbauprozesse spielen die PDL-Zellen eine entscheidende Rolle (Roberts et al., 2004).

Die biomechanischen Signale führen im weiteren Verlauf zu einer Ausschüttung von u.a. Interleukin-1 β (IL-1 β). Dieses Zytokin gehört zu den Entzündungsmediatoren und löst im mechanisch gestressten Gewebe eine sterile Entzündung aus (Davidovitch et al., 1988; Iwasaki et al., 2001; Saito et al., 1991; Shimizu et al., 1992). In der Folge kommt es durch IL-1 β und weitere Botenstoffe zu einer Differenzierung und Aktivierung von Osteoblasten und Osteoklasten, die für den Knochenumbau unabdingbar sind (Asiry, 2018; He et al., 2004). Andere bekannte Marker des kieferorthopädisch induzierten Knochenumbaus sind

der Runtt- verwandte Transkriptionsfaktor 2 (RUNX2) und Kollagen-Typ 1 α (COL1A). Grundsätzlich ist RUNX2 entscheidend für die Osteoblastendifferenzierung während der Knochenentwicklung und sorgt für eine höhere Proliferation der Osteoblastenvorläuferzellen (Komori, 2019). Osteoblasten sind wichtig für die Bildung von extrazellulärer Matrixproteinen die nach ihrer Mineralisation die Knochengrundsubstanz bilden (Hadjidakis und Androulakis, 2006). COL1A wird vorwiegend von PDL-Zellen und Osteoblasten synthetisiert und formt stabile Fasern zwischen Zement und Alveolarknochen (Beertsen et al., 1997). Seine elastischen Eigenschaften schützen das PDL vor den einwirkenden mastikatorischen Kräften (Bumann et al., 1997). Sowohl RUNX2 als auch COL1A können durch unterschiedlich stark ausgeprägte Kräfte differentiell reguliert werden (Sun et al., 2022).

Es konnte gezeigt werden, dass mechanische Stimulationen *in-vivo* und *in-vitro* die Genexpression von RUNX2 in Osteoblasten und PDL-Zellen steigern, die Abwesenheit von Kräften durch Immobilisierung oder Mikrogravitation führt hingegen zu einer Reduktion der RUNX2-Expression (Baumert et al., 2004; Ziros et al., 2008). Während der Zahnbewegung wird Kollagen in den Kompressionsarealen vermindert gebildet, während in den Dehnungsarealen die Kollagenproduktion ansteigt (Jiang et al., 2016).

Eine Arbeitsgruppe um Hilbert konnte mit ihren Untersuchungen erste Hinweise auf molekulare Mechanismen der zirkadianen Rhythmik in PDL-Zellen geben. So konnte unter anderem die Expression der Clock-Gene nach Synchronisation der PDL-Zellen in einem zirkadianen Muster nachgewiesen werden (Hilbert et al., 2019).

An diese Untersuchungen knüpft die vorliegende Studie an. Es sollte untersucht werden, ob eine mechanische Belastung, wie sie auch bei kieferorthopädischen Zahnbewegungen induziert wird, die Expression der Clock-Gene in PDL-Zellen beeinflusst. Zudem sollte analysiert werden, ob mechanische Kräfte in Abhängigkeit der zirkadianen Rhythmik einen differentiellen Einfluss auf regulatorische Proteine der PDL-Zellhomöostase haben. Die folgenden 2 Nullhypothesen (H_0) sollten getestet werden:

1. Eine mechanische Kraft hat keinen Einfluss auf die peripheren Oszillatoren der zirkadianen Rhythmik.
2. Durch das Einwirken einer mechanischen Kraft an unterschiedlichen Zeitpunkten im zirkadianen Rhythmus wird die Expression der regulatorischen Proteine der PDL-Zellhomöostase nicht differentiell beeinflusst.

1.2 Material und Methoden

Kultivierung und Vorbehandlung der PDL-Zellen

Von der Firma Lonza wurde eine Zelllinie der 2. Passage von humanen PDL-Zellen (Lonza Ltd., Basel, Schweiz; # CC-7049) erworben und in den Laboren der Poliklinik für Kieferorthopädie kultiviert. Für die durchgeführten Versuche wurden die Zellen in der Passage 6 verwendet. Die Zellen wurden auf 6-Well Zellkulturplatten mit dehnbaren Kollagenmembranen ausplattiert (Flexcell International, Hillborough, NC, USA). Ein Mediumwechsel fand alle drei bis vier Tage statt. Die Basis des Kulturmediums bestand aus Dulbeccos Minimal Essential Medium (DMEM, Karlsruhe). Zusätzlich wurden 10 % fetales Rinder-Serum (FBS), 1 % Pepstrep (110µg/ml Antibiotika), Plasmocin und Vitamin C dem Kulturmedium beigefügt.

Nach Ausplattierung erfolgte die Kultivierung bei 37°C und 5 % CO₂ Zufuhr in einem Inkubator. 24 h vor den Versuchen wurde der FBS Gehalt im Medium von 10 % auf 1 % reduziert.

Synchronisation und mechanische Dehnung der PDL-Zellen

Zu Beginn der 1. Versuchsreihe wurden in zwei Versuchsgruppen – eine Kontrollgruppe und eine Dehnungsgruppe (STSH-Gruppe) – jeweils 6 Wells 30 min lang mit Dexamethason (100 nM Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland), gelöst im Medium, synchronisiert. Für die Synchronisation haben wir uns bestehender Protokolle aus vorherigen Studien bedient (Balsalobre et al., 2000a; Hilbert et al., 2019). Anschließend wurde das Dexamethason-haltige Medium wieder durch Medium mit reduzierter FBS-Konzentration ohne Dexamethason ersetzt. Die Wells der Zellen der Dehnungsgruppen wurden in einer statischen Dehnungsapparatur (Abb 2) um 20 % gedehnt und zurück in den Inkubator gestellt (Memmert et al., 2019). Die verwendete Apparatur wurde durch eine Kooperation innerhalb der Klinischen Forschergruppe 208 entwickelt wurde und ist mit verschiedenen Dehnungsprotokollen im Labor der Poliklinik für Kieferorthopädie etabliert. Anschließend wurden in 4 h Intervallen jeweils 6 Proben pro Versuchsreihe in den beiden Versuchsgruppen über 24 h geerntet. Insgesamt wurden hierdurch 7 Mess-Zeitpunkte (t 0, t 4, t 8, t 12, t 16, t 20, t 24) generiert.



Abb 2: Dehnungsapparatur bestehend aus zwei Platten, sechs Dehnungsstempeln und zwei Schrauben. Die sechs Stempel werden auf die Platte mit den sechs Vertiefungen gesetzt. Darauf wird die 6 Well Zellkulturplatte mit der dehnbaren Membran platziert. Die obere gefensterte Platte wird über zwei Schrauben mit der unteren Platte fixiert. Das Ausmaß der Zell-Dehnung wird über die Dicke der Stempel definiert.

Für die 2. Versuchsreihe wurden vier Versuchsgruppen (jeweils zwei Kontrollgruppen und zwei Dehnungsgruppen) durch das beschriebene Verfahren mit Dexamethason synchronisiert. Durch diese Versuchsreihe sollte die 2. Hypothese getestet werden. Die mechanische Dehnung wurde hierfür zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Synchronisation initiiert und die Auswirkungen auf die regulatorischen Proteine IL-1 β , RUNX2 und COL1A untersucht. Direkt nach Synchronisation zum Zeitpunkt t0 wurde das erste Dehnungsintervall von 4 h (Gruppe SI1) gestartet. Zum Zeitpunkt t12 wurde das Dehnungsintervall der zweiten Dehnungsgruppe (Gruppe SI2) initiiert. Beide Dehnungsgruppen wurden jeweils einer 4-stündigen Dehnung ausgesetzt in der die Zellen alle 2 h geerntet wurde (jeweils 6 Proben pro Zeitpunkt und Versuchsreihe). So ergaben sich die Mess-Zeitpunkte t0, t2, t4, t12, t14, t16.

RNA- Isolation der Clock-Gene

Die Zellen wurden mit RLT-Puffer und β -Mercaptoethanol geerntet und mit Hilfe des RNeasy Kits (RNeasy Protect Kit, Qiagen, Hilden, Deutschland) wurde die RNA der Zellen isoliert. Anschließend wurde die RNA-Konzentration durch das Nanodrop 2000 Spektralphotometer (NanoDrop 2000 Spektralphotometer, Wilmington, Deutschland) bei 260 nm gemessen. Das Spektralphotometer wurde vorab mit 1 μ l sterilem H₂O kalibriert. In einem zweiten Schritt erfolgte die Umwandlung der RNA in cDNA. Dazu wurde das iScript cDNA synthesis kit (Bio-Rad Labor, München, Deutschland) nach Herstellerangaben verwendet. Alle Proben wurden während dieses Versuchsschritts auf

Eis gelagert. Ein Thermal Cycler wurde verwendet, um die Umwandlung der RNA zu cDNA abzuschließen (PTC-200 Peltier Thermal Cycler, Bio-Rad, Laboratories, Hercules, CA, USA).

Nachweis der Genexpression der Clock-Gene

Für den Gen-Nachweis der untersuchten Clock-Gene wurde eine quantitative Echtzeit Polymerasekettenreaktion (qRT PCR) zu den Zeitpunkten 0 h, 4 h, 8 h, 12 h, 16 h, 20 h, 24 h durchgeführt. Als Referenz-Gen für die Quantifizierung wurde Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) verwendet. Dieses Housekeeping-Gen wurde u.a. auch von Hilbert et al. genutzt (Barber et al., 2005; Hilbert et al., 2019). Die Proben wurden jeweils in Triplikaten bestimmt. In jedem Well befand sich 2,5 µl QuantiTect Primer (QuantiTect Primer Assay, Qiagen, Hilden Deutschland), 12,5 µl QuantiTect Syber Green Master-Mix (QuantiTect SYBR Green PCR Kit, Qiagen, Hilden Deutschland), 5 µl Nuklease-freies Wasser (Qiagen, Hilden, Deutschland), und 5 µl der c-DNA Probe. Als PCR-Gerät wurde der iCycler IQ5 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, Kalifornien, USA) verwendet.

In den durchgeführten Versuchen wurde das qRT PCR-Protokoll verwendet, das bereits in der Arbeit von Hilbert et al. zum Einsatz kam. Zusammengefasst wurden in der ersten Phase die Proben auf 95°C erhitzt und die spezifischen Enzyme aktiviert. Dabei wird in insgesamt 50 Zyklen bei 95°C eine Denaturierung initiiert und somit die Wasserstoffbrückenbindungen gelöst. In einer zweiten Phase erfolgte die Hybridisierung der Primer bei 60°C für 30 sek. In der dritten Phase findet die Elongation, die Verlängerung der einzelnen DNA-Stränge, statt. Eine Schmelzkurven-Analyse wurde nach jeder qRT PCR durchgeführt. Die Clock-Genexpression wurde wie bei Hilbert et al. gemäß der Methode nach Pfaffl mit der jeweiligen Kontrolle unter Verwendung der $\Delta\Delta CT$ Methode berechnet (Hilbert et al., 2019; Pfaffl, 2001).

Die Expressionsanalyse der regulatorischen Proteine IL1- β , COL1A und RUNX2 erfolgte nach dem gleichen Verfahren, wie die der Clock-Gene.

Nachweis der Protein-Expression der untersuchten regulatorischen Proteine

Von jedem Well wurde der Zellüberstand bei der Zellernte abgenommen und für einen Proteinnachweis durch Enzyme-Linked-Immunsorbent- Assays (Elisa) verwendet. Für die einzelnen regulatorischen Proteine wurden unterschiedliche Elisa-Kits verwendet. IL1 β – Human IL-1 β Elisa Kit (Invitrogen, Thermo Fischer Scientific, Wien, Österreich) –, COL1A – COL1A -Human Pro-Collagen I alpha DuoSet Elisa (R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland) –, RUNX2 – RUNX2 Elisa Kit (Human) (Aviva Systems Biology, San Diego, CA, USA). Es wurden zu jedem Protokoll die Herstellerangaben beachtet. Jede Elisa-Platte wurde mit dem Elisa-Reader (Epoch, Bio Tek Instruments, Winooski, VT, USA) bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen. Die Bezugswellenlänge lag bei allen Messungen bei 620 nm.

Statistik

Bei jedem Versuch wurden die Proben in Triplikaten bestimmt und die Versuche mindestens dreimal wiederholt. Das Programm Graphpad Prism wurde für die statistischen Analysen genutzt. Die Software diente ebenfalls für die Erstellung der Graphen (Version 7.00 für Windows, GraphPad Software, San Diego, Kalifornien, USA, www.graphpad.com). Alle Daten wurden als Mittelwerte mit Standardfehler des Mittelwertes (SEM) dargestellt. Für die Statistik wurden folgende Post-hoc-Tests durchgeführt. Zu Einem der Dunnett-Test, der bei Mehrfachvergleichen eine Ermittlung der Signifikanz von mehreren Gruppen zu einer Kontrollgruppe zulässt. Zum anderen die Šidák-Korrektur, die einen paarweisen multiplen Vergleich von Stichproben ermöglicht. Das Signifikanzniveau wurde auf $p < 0,05$ festgelegt.

1.3 Ergebnisse

Expression der Clock-Gene

Um die zirkadiane Rhythmik zu synchronisieren wurden die PDL-Zellen mit einem etablierten Verfahren behandelt (Balsalobre et al., 1998; Hilbert et al., 2019).

In der Kontrollgruppe konnte bei drei von vier Clock-Genen (ARNTL, PER1 und PER2) eine Rhythmik durch signifikante Veränderungen (ohne Dehnung) im Verlaufe der 24 h nach der Synchronisation nachgewiesen werden (Abb 3 a-d). Die CLOCK-Genexpression zeigte dagegen keine signifikante Veränderung innerhalb der 24 h in der Kontrollgruppe. Die mechanische Stimulation führte bei allen getestete Clock-Genen zu signifikante Veränderungen im Vergleich zur Kontrolle (Peters et al., 2024).

ARNTL

Nach der Synchronisation konnte in der Kontrollgruppe nach dem Zeitpunkt t8 für alle weiteren untersuchten Zeitpunkten eine Steigerung der Genexpression von ARNTL gezeigt werden. Nach 20 h wurde eine Expressionssteigerung um das 7,2-fache der Kontrolle erreicht, der Maximalwert aller untersuchten Zeitpunkte. Durch den mechanischen Stress war die Expression ab dem Zeitpunkt t8 signifikant geringer als in der Kontrollgruppe und verblieb in etwa auf dem Niveau der Kontrollgruppe zum Zeitpunkt t0. Innerhalb der Dehnungsgruppe konnten somit keine signifikanten Veränderungen der Expression über die Zeit gemessen werden (Abb 3a) (Peters et al., 2024).

CLOCK

CLOCK zeigte keine signifikante Veränderung in der Kontrollgruppe über die 24 h nach Synchronisation. Die mechanische Stimulation rief eine signifikant erhöhte Genexpression zum Zeitpunkt t4 hervor. Zum Zeitpunkt t12 war die Genexpression im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant reduziert (Abb 3b) (Peters et al., 2024).

PER1:

Die Genexpression in der Kontrollgruppe verzeichnete ausgehend vom Zeitpunkt t0 signifikante Steigerungen zu den Zeitpunkten t12, t20 und t24 (Abb 3c). Die mechanische Stimulation führt zu einer signifikant erhöhten Genexpression zu dem Zeitpunkt t12.

Innerhalb der Dehnungsgruppe kam es nach 12 h zu jedem gemessenen Zeitpunkt zu einer gesteigerten Genexpression (Peters et al., 2024).

PER2:

Die Genexpression der Kontrollgruppe zeigt nach 4 h einen signifikanten Anstieg, während anschließend im Vergleich zum Zeitpunkt t0 zu jedem weiteren gemessenen Zeitpunkt eine signifikante Reduktion zu verzeichnen war (Abb 3d). Auch bei diesem Clock-Gen induzierte die Dehnung eine gesteigerte Genexpression an t4, t12, t16 und t20 im Vergleich zu der Kontrollgruppe. In der Dehnungsgruppe konnte eine Zunahme der Genexpression nach 4 h und eine Abnahme nach 24 h festgestellt werden. (Peters et al., 2024).

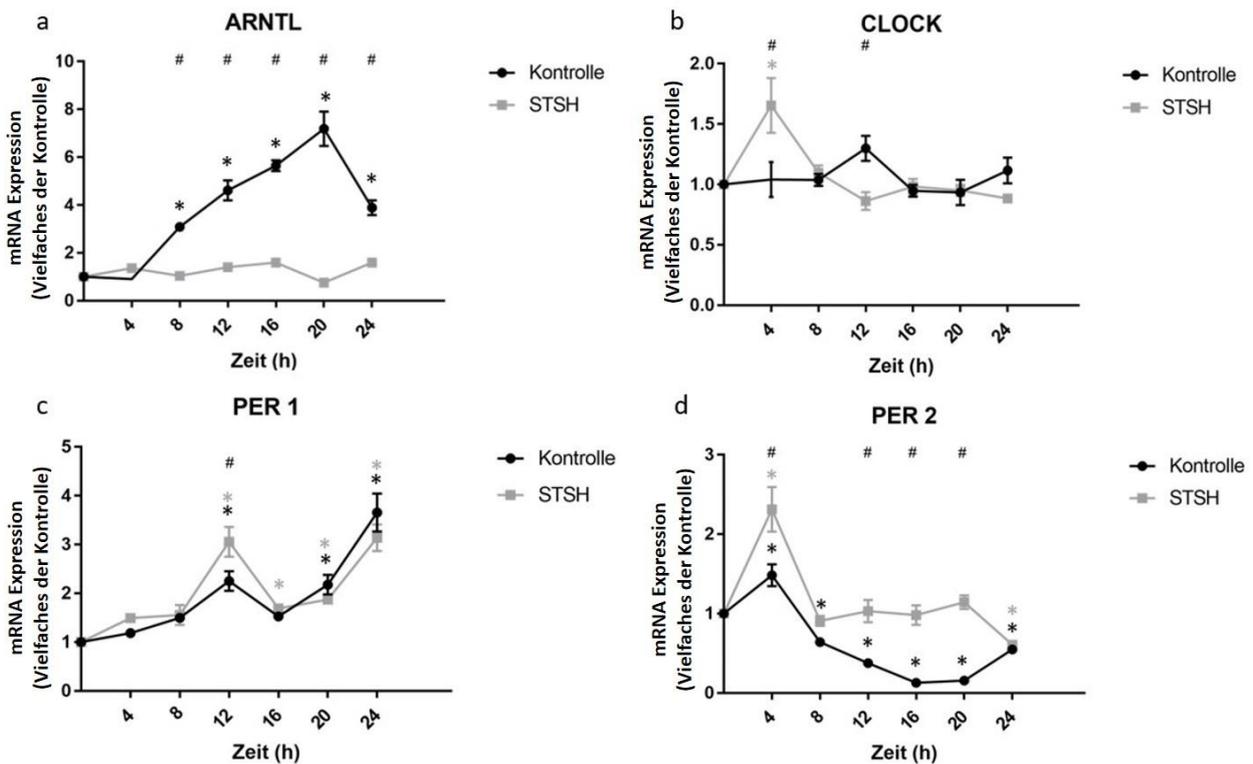


Abb 3: Darstellung der Clock-Genexpressionen (ARNTL (a), CLOCK (b), PER1(c), PER2 (d)) nach mechanischer Stimulation im Vergleich zur ungedehnten Kontrollgruppe über einen Zeitverlauf von 24 h. # statistisch signifikanter Unterschied zwischen der Kontrollgruppe und der gedehnten Gruppe (STSH) ($p < 0,05$) * statistisch signifikanter Unterschied innerhalb der Gruppen im Vergleich zu t0 ($p < 0,05$). Abbildung modifiziert nach Peters et al., 2024.

Ergebnisse für die regulatorischen Proteine

Basierend auf den Ergebnissen der Genexpressionsanalyse der Clock-Gene wurden zwei Zeitpunkte nach Synchronisation für den Beginn der mechanischen Stimulation festgelegt. Es wurden die Zeitpunkte t0 und t12 nach Synchronisation gewählt. Die Messintervalle wurden auf 2 h verkürzt, die Gesamtzeit der jeweiligen Stimulation betrug 4 h. Die Dehnung erfolgte somit in zwei Zeitintervallen SI1 (t0-t4) und SI2 (t12-t16). Die Stimulationsgruppen wurden jeweils mit der Genexpression am Beginn des Intervalls also an t0 und t12 verglichen (Peters et al., 2024).

COL1A

Die Genexpression von COL1A zeigte zu den Zeitpunkten 2 h und 4 h nach Synchronisation keine signifikante Veränderung. Ein Trend zu einer Steigerung ließ sich jedoch erkennen (Abb 4a). Auf Proteinebene war die gesteigerte Expression sowohl nach 2 h als auch nach 4 h signifikant. Zu den Zeitpunkten t14 und t16 nach Synchronisation war eine signifikante Reduktion der Genexpression erkennbar. Auf Proteinebene war 16 h nach Synchronisation eine geringgradig vermehrte Proteinexpression nachweisbar (Abb 4b). Durch die mechanische Belastung konnte auf Genexpressionsebene zu den Zeitpunkten t4 und t14 eine signifikante Verringerung der COL1A Genexpression nachgewiesen werden (Abb 4a). Auf Proteinebene war durch die mechanische Dehnung kein Unterschied zur Kontrollgruppe feststellbar (Abb 4b). Innerhalb der Dehnungsgruppe war die Genexpression nach 14 h und 16 h reduziert (Abb 4a). Die Proteinexpression änderte sich im Vergleich zu t0 an beiden gemessenen Zeitpunkten t2 und t4 im Sinne einer Steigerung. Interessanterweise, verringerte sich die Genexpression im Intervall SI2 im Vergleich zu t12 am Zeitpunkt t16 signifikant (Abb 4b; Peters et al., 2024).

IL1- β :

Die Genexpression von IL-1 β wurde 4 h nach Synchronisation signifikant hochreguliert. Während sie 14 h und 16 h nach Synchronisation im Vergleich zu t12 signifikant herunterreguliert war. Eine Dehnung führte in dem ersten Zeitintervall SI1 zu keiner signifikanten Änderung der Genexpression im Vergleich zur Kontrolle. Jedoch im zweiten Zeitintervall war nach 2 h Dehnung, also zum Zeitpunkt t14 nach Synchronisation, eine signifikante Steigerung der Genexpression erkennbar (Abb 4c). Auf Proteinebene waren

die Schwankungen innerhalb der einzelnen Gruppen und Experimente jedoch sehr hoch, sodass zu keinem Zeitpunkt eine signifikante Veränderung gemessen werden konnte (Abb 4d). Die Dehnung rief sowohl im ersten Dehnungsintervall SI1 als auch im zweiten Dehnungsintervall SI2 eine Steigerung der Genexpression hervor, jedoch zu unterschiedlichen Zeitpunkten (Abb 4c; Peters et al., 2024).

RUNX2

Zu dem Zeitpunkt t4 nach Synchronisation konnte eine gesteigerte Genexpression von RUNX2 nachgewiesen werden, während an t14 und t16 die Genexpression erniedrigt war (Abb 4e). Auch durch den Elisa-Test wurde nach 2 h und 4 h eine vermehrte Proteinmenge von RUNX2 nachgewiesen. Zu den Zeitpunkten 14 h und 16 h war die Proteinmenge im Vergleich zu dem 12 h Zeitpunkt jedoch nicht signifikant verändert (Abb 4f). Durch die Dehnung ergaben sich keine signifikanten Veränderungen im Vergleich zur Kontrollgruppe. Jedoch wurde in der Dehnungsgruppe an t4 eine Zunahme der Genexpression gemessen und an t14 eine Abnahme, jeweils im Vergleich zu dem jeweiligen Startzeitpunkt (Abb 4e). Auf Proteinebene zeigten sich nur im ersten Versuchsintervall SI1 Signifikanzen. Hier war die Proteinmenge sowohl nach 2 h, als auch nach 4 h gesteigert (Abb 4f; Peters et al., 2024).

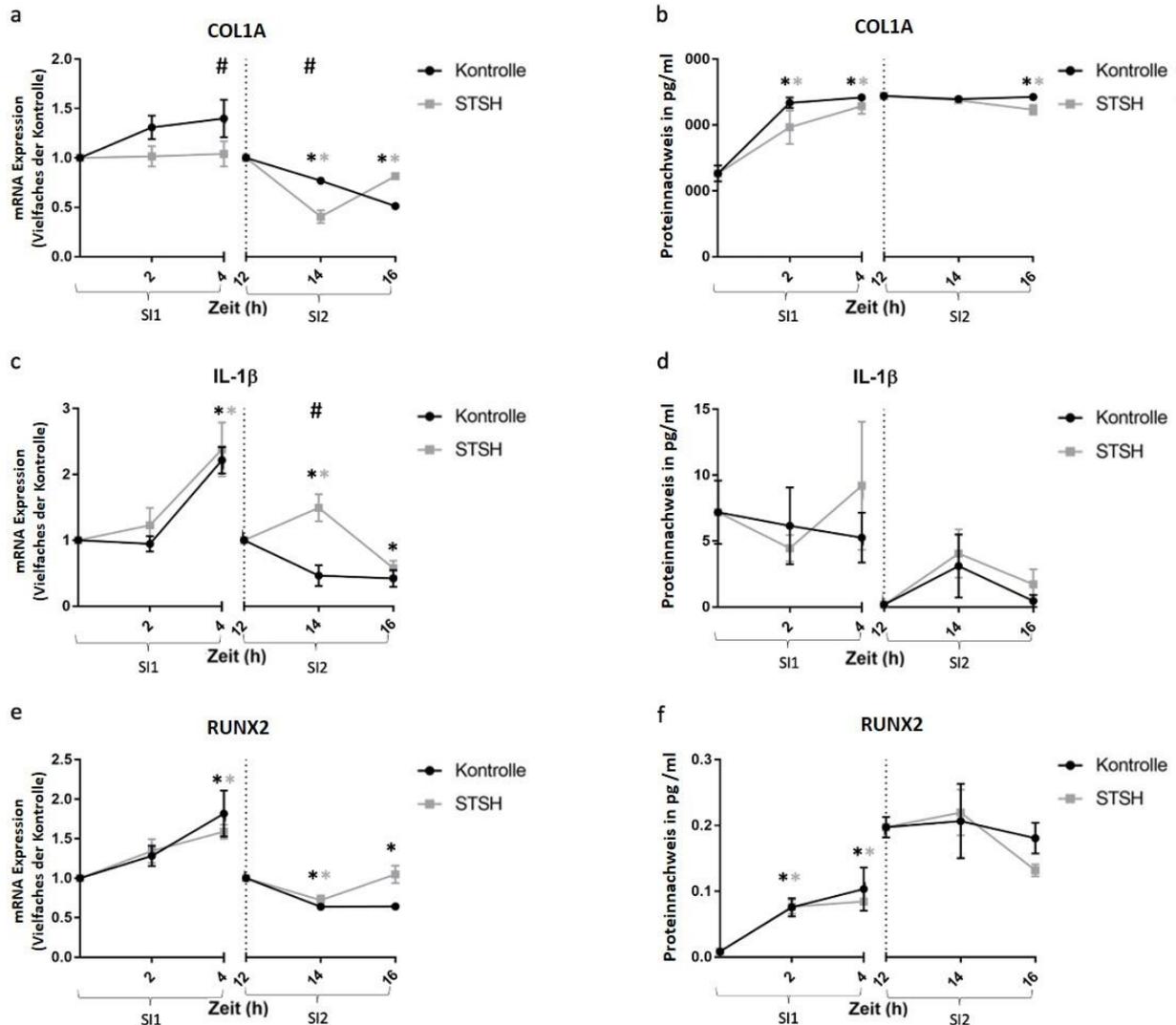


Abb 4: Darstellung der Genexpression und der Proteinmenge der regulatorischen Proteine COL1A (a, b), IL-1 β (c, d) und RUNX2 (e, f) im ersten und zweiten untersuchten Zeitintervall SI1 (t0-t4) und SI2 (t12-t16). # statistisch signifikanter Unterschied zwischen der Kontrollgruppe und der gedehnten Gruppe (STSH) ($p < 0,05$) * statistisch signifikanter Unterschied innerhalb der Gruppen im Vergleich zu t0 ($p < 0,05$). Abbildung modifiziert nach Peters et al., 2024.

1.4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine mechanische Belastung in Form von statischer Dehnung einen Einfluss auf die zirkadiane Rhythmik, genauer gesagt auf die Expression von Clock-Genen in PDL-Zellen hat. Damit wurde die erste Hypothese abgelehnt. Auf der anderen Seite legen unsere Ergebnisse nahe, dass die zirkadiane Rhythmik ihrerseits in PDL-Zellen die Reaktion auf mechanische Stimulation beeinflussen kann. Eine mechanische Dehnung führte zu einer Regulation von COL1A und IL-1 β im Vergleich zur Kontrollgruppe. Interessanterweise kam es aber in Abhängigkeit vom Zeitpunkt der induzierten Dehnung innerhalb des zirkadianen Rhythmus zu einer differentiellen Regulation der untersuchten regulatorischen Proteine. Somit wurde auch die zweite Hypothese abgelehnt. (Peters et al., 2024).

Wie einleitend erwähnt, ist der zentrale Zeitgeber wichtig für die Initiation der zirkadianen Rhythmik. In *in-vivo* Untersuchungen konnten der Futterzyklus sowie Veränderungen der zugeführten Nährstoffe den zirkadianen Rhythmus jeweils unterschiedlich stark beeinflussen (Oosterman et al., 2015). Auch in Tiermodell-Studien wurde Dexamethason eingesetzt, um die zirkadiane Rhythmik zu beeinflussen (Wu und Fu, 2017). In der vorliegenden Studie ist kritisch zu betrachten, dass ein *In-vitro*-Modell nie den komplexen Vorgängen eines *In-vivo*-Versuchsaufbaus gerecht wird. Jedoch bietet ein reines *In-vitro*-Modell mehr Kontrolle in der Minimierung von verzerrenden Faktoren und die peripheren Oszillatoren können gesondert betrachtet werden, ohne die Einflüsse des zentralen Zeitgebers. Um die Messungen möglichst vergleichbar zu weiteren Studien der Arbeitsgruppe zu halten, wurde das von Hilbert et al. etablierte Laborprotokoll genutzt (Hilbert et al., 2019). Als zentraler Zeitgeber der Zellkultur wurde daher der künstliche Schrittmacher Dexamethason verwendet (Hilbert et al. 2019, Peters et al., 2024). Die Studien von Balsalobre et al. zeigten, dass Dexamethason als Serumkomponente mit hoher Reliabilität eine Synchronisation der peripheren Oszillatoren bewirkt (Balsalobre et al., 1998; Balsalobre et al., 2000b). Jedoch können andere Serumkomponenten des für Zellversuche verwendeten fetalen Kälberserums wie Ca²⁺, Proteinkinase C und Glukokortikoidhormone ebenfalls für eine Synchronisation von Zellen genutzt werden (Balsalobre et al., 2000a; Balsalobre et al., 1998; Peters et al., 2024). Betrachtet man die in dieser Studie verwendeten Zusätze, wie beispielsweise Pepstrep, Plasmocin und Vitamin C für das DMEM ist eine mögliche zusätzliche Beeinflussung nicht

auszuschließen. Insbesondere zu nennen ist hier das Vitamin C, ein Antioxidans, für welches eine Beeinflussung des zirkadianen Rhythmus bereits nachgewiesen wurde (Wilking et al., 2013). Es gibt jedoch derzeit noch keine ausführlichen Studien, die den genauen Zusammenhang zwischen oxidativem Stress und der zirkadianen Rhythmik in Zellen analysiert haben.

Bei den Messungen haben wir uns auf einen Zeitraum von 24 h beschränkt, da Hilbert et al. in ihren Ergebnissen verdeutlicht, dass die nachweisbare zirkadiane Rhythmik in der Zellkultur im Verlauf von 48 h nachlässt (Peters et al., 2024; Hilbert et al., 2019). Außerdem wurde eine Dehnungsbelastung von 20% angewendet, die von den Autoren Kanzaki et al. für kieferorthopädische Zahnbewegungen als „stark“ eingestuft wurde (Kanzaki et al., 2002). Um ein größeres Verständnis über die Komplexität der Thematik zu erhalten, wären Studien interessant, in denen geringere Kräfte oder auch Belastungen in Form von Druck oder dynamische Belastungen analysiert würden.

Um weitere mögliche Einflussfaktoren auf die zirkadiane Rhythmik in PDL-Zellen zu minimieren ist auch die Auswahl der Zellpassage essenziell. Sind die Zellpassagen zu weit fortgeschritten, so kann die Zellenseneszenz einen Einfluss auf die zirkadiane Expression von Clock-Genen *in-vitro* nehmen (Kunieda et al., 2006). Kuneida et al. wiesen eine erniedrigte zirkadiane Expression von Clock-Genen in hohen Passagen im Vergleich zu frühen Zellpassagen in humanen vaskulären Muskelzellen der Aorta nach. In Bezug auf PDL-Zellen untersuchte Shimizu et al. die Zellalterung in humanen PDL-Zellen auch im Hinblick auf den Einfluss mechanischer Belastung (Shimizu et al., 1997). In dieser Studie wurden die Passagen 5-6 als juvenile Passagen bezeichnet. Marker für Seneszenz wurden ab der 22. Passage registriert. Da es in unserer Studie primär um die Bedeutung von Clock-Genen ging wurde, wie bereits in der Arbeit von Hilbert et al., eine juvenile Passage der PDL-Zellen verwendet (Peters et al., 2024; Hilbert et al., 2019).

Das aus anderen Arbeiten bereits bekannte Muster der zirkadianen Rhythmik in PDL-Zellen zeigte sich auch bei unseren Versuchen, insbesondere durch die zeitabhängige Regulation der Clock-Gene ARNTL, PER1 und PER2. Die Steuerung der zyklischen Regulation der Clock-Gene in PDL-Zellen als Oszillatoren für deren peripheren zirkadianen Rhythmus wurde bereits von Hilbert et al. nachgewiesen (Hilbert et al., 2019). Dabei zeigten die Genexpressionen von ARNTL und Per2 einen entgegengesetzten Verlauf, was ein bekanntes Merkmal der molekularen Uhr darstellt. ARNTL oder auch

BMAL1 bildet einen aktivierenden Faktor der molekularen Rückkopplungsschleife, während die Periodengene PER1-3 zu den deaktivierenden Faktoren der Rückkopplungsschleife zählen (Takarada et al., 2017). Auch bei Hilbert et al. konnten ähnliche Regulationen der Clock-Gene ARNTL und PER2 demonstriert werden. CLOCK und PER1 zeigten sowohl in unserer Studie als auch in der Studie von Hilbert et al. eine geringere Schwankung. PER2 und ARNTL scheinen möglicherweise für die Regulation der molekularen Uhr in PDL-Zellen von entscheidender Bedeutung sein. Jedoch sind weitere Untersuchungen notwendig, um diese Vermutung zu stützen. Denn sowohl bei der vorliegenden Studie als auch bei Hilbert et al. wurden alle Experimente mit PDL-Zellen der Firma Lonza und im selben Labor durchgeführt.

Der aktivierende Faktor der Rückkopplungsschleife ANTL wurde durch die mechanische Belastung im Sinne einer Reduktion verändert. Sein Bindungspartner CLOCK wurde durch die mechanische Stimulation differenzierter beeinflusst. Zum Zeitpunkt t4 wurde ein Anstieg gemessen, während bei t12 eine Verringerung beobachtet wurde. Die deaktivierenden Gene PER1 und PER2 der Rückkopplungsschleife wurden durch die Zugbelastung im Sinne einer erhöhten Genexpression reguliert. Unsere Ergebnisse stimmen mit Ergebnissen einer *In-vivo*-Studie von Qin et al. überein. Dort wurden PDL-Zellen *in vitro* und zusätzlich auch in einem *in vivo*-Modell an der Ratte nach kieferorthopädischer Zahnbewegung untersucht. Auch Qin et al. konnten durch die mechanische Stimulation, im Sinne einer Zahnbewegung, einen Anstieg der Genexpression von PER1 induzieren (Qin et al., 2019).

Unsere zweite Hypothese beschäftigte sich mit der Hypothese, dass das Einwirken einer mechanischen Kraft an unterschiedlichen Zeitpunkten im zirkadianen Rhythmus die Expression der regulatorischen Proteine der PDL-Zellhomöostase nicht differentiell beeinflusst. Um diese Hypothese zu untersuchen, wurde in der vorliegenden Studie zu unterschiedlichen Zeitpunkten im zirkadianen Rhythmus mit der mechanischen Stimulation begonnen. Wir haben die daraus resultierenden Auswirkungen der mechanischen Kraft auf wichtige regulatorische Proteine untersucht. Als Startpunkte der vierstündigen Dehnungsintervalle wurden die Zeitpunkte t0 und t12 ausgewählt. Ab dem Zeitpunkt t8 wiesen ARNTL und PER2 in der nicht mechanisch stimulierten Kontrollgruppe eine entgegengesetzte Regulation auf. Der Zeitpunkt t12 nach Synchronisation wurde schon von Hilbert et al. näher untersucht. Die Genexpressionen von regulatorischen

Faktoren in PDL-Zellen wiesen in dieser Studie zu diesem Zeitpunkt signifikante Veränderungen im Vergleich zu t0 auf (Hilbert et al., 2019).

Eines der untersuchten regulatorischen Proteine war COL1A. Dieses zeigte direkt nach Synchronisation im ersten Zeitintervall (SI1) einen Anstieg der Proteinexpression nach 2 h und 4 h im Vergleich zu t0, während auf Genexpressionsebene keine signifikante Veränderung in der Kontrollgruppe nachweisbar war. Ab dem Zeitpunkt t12 (SI2) kam es in der Kontrollgruppe zu einer signifikant verringerten Genexpression an t14 und t16. Bei der Proteinexpression war zum Zeitpunkt t16 im Vergleich zu t12 ein signifikanter Anstieg zu verzeichnen. In der Studie von Hilbert et al. konnte ebenfalls eine verringerte Genexpression von COL1A 12 h nach Synchronisation der PDL-Zellen nachgewiesen werden (Hilbert et al., 2019). Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass die zirkadiane Rhythmik eine Rolle bei der COL1A-Synthese spielt. In der Studie von Qin et al. wurde die Regulation der COL1A-Synthese im Zusammenhang mit der zirkadianen Rhythmik *in-vitro* und *in-vivo* untersucht. Diese Arbeitsgruppe konnte eine Steigerung der COL1A-Genexpression *in-vitro* an mehreren Zeitpunkten nach der Synchronisation feststellen. Funktionell ist COL1A entscheidend für die Zellhomöostase und den Bindegewebsumsatz (Bumann et al., 1997; Howard et al., 1998).

IL-1 β ist ein wichtiger Entzündungsmediator, der bei kieferorthopädischer Zahnbewegung nachweisbar ist (Davidovitch et al., 1988). Wie in der Studie von Hilbert et al. wurde in der Kontrollgruppe der aktuellen Studie eine Erhöhung der Genexpression von IL1- β 2 h und 4 h nach Synchronisation beobachtet, während in dem Intervall SI2 nach 2 h und 4 h eine Reduzierung auftrat (Hilbert et al., 2019). Frühere Studien konnten ebenfalls bereits eine Verbindung zwischen der Regulation von IL1- β und dem zirkadianen Rhythmus, insbesondere des Schlaf-Wach-Rhythmus, nachweisen. So kann eine Hemmung der IL1- β -Expression den spontanen Schlaf stören (Krueger et al., 1998). Auch im Mundspeichel konnten Veränderungen von IL1- β während des Verlaufes der zirkadianen Rhythmik festgestellt werden (Reinhardt et al., 2012).

Für die kieferorthopädische Zahnbewegung ist der Knochenumbau essenziell. RUNX2 dient als wichtiger Marker, da es eine entscheidende Rolle, während der Osteoblastendifferenzierung spielt (Ziros et al., 2008). Zudem ist RUNX2 ebenfalls ein Transkriptionsfaktor für die Differenzierung von Ameloblasten. Studien zeigten, dass RUNX2 in Abhängigkeit von dem Clock-Gen Nr1d1 hochreguliert wird (Athanasiou-

Papaefthymiou et al., 2011; Ukai-Tadenuma et al., 2008). Auch in der vorliegenden Studie fanden sich Hinweise darauf, dass RUNX2 durch die Transkriptionsfaktoren der zirkadianen Rhythmik differenziell reguliert wird. Die Studie von Hilbert et al. zeigte ähnliche Ergebnisse. 12 h nach Synchronisation wurde eine verringerte Genexpression von RUNX2 im Vergleich zu t0 gemessen (Hilbert et al., 2019).

Nach mechanischer Stimulation zeigte sich lediglich auf Genebene eine hemmende Wirkung auf die Expression von COL1A. Auf Proteinebene wurde in keinem der untersuchten Zeitintervalle eine signifikante Veränderung durch die Dehnung nachgewiesen (Peters et al., 2024). Die Ergebnisse anderer Studien deuten allerdings darauf hin, dass eine mechanische Belastung in Form von Dehnung in PDL-Zellen die Proteinbiosynthese von COL1A beeinflusst. Interessanterweise wurde hier insbesondere eine Steigerung beschrieben (Müssig et al., 2005). Auch Qin et al. zeigten in ihrem *in-vitro* Versuch einen Anstieg der COL1A Expression (Qin et al., 2019). Es kann diskutiert werden, dass diese Differenz zu unseren Ergebnissen vor allem auf die variierenden Bezugspunkte innerhalb der zirkadianen Rhythmik zurückzuführen ist. Innerhalb der Dehnungsgruppe war die Genexpression nur im Dehnungsintervall SI2 verändert, Während die Proteinexpression im ersten Dehnungsintervall SI1 eine Steigerung erfuhr, zeigte sich im zweiten Dehnungsintervall SI2 eine Reduktion (Peters et al., 2024). Dadurch werden differentielle Effekte in Abhängigkeit des zirkadianen Rhythmus deutlich. Auch die Effekte der Dehnung auf IL1- β scheinen durch die zirkadiane Rhythmik beeinflusst zu werden, denn die resultierenden Expressionsänderungen waren zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Dehnungsbeginn zu verzeichnen. So wurde in der Dehnungsgruppe an t4 eine Zunahme der Genexpression gemessen und an t14 eine Abnahme, verglichen zu dem jeweiligen Startzeitpunkt. (Peters et al., 2024). Andere Autoren konnten bereits nachweisen, das intermittierende Kräfte die IL-1 β Produktion steigern, was mit den vorliegenden Ergebnissen der aktuellen Studie in Einklang zu bringen ist (Nakao et al., 2007; Nokhbehsaim et al., 2010). Die fehlenden Signifikanzen auf Proteinebene können mit dem kurzen Stimulationszeitraum und der hohen Variabilität der Ergebnisse erklärt werden.

Durch die Dehnung ergaben sich in unserer Studie für die RUNX2 Expression keine signifikanten Veränderungen im Vergleich zur Kontrollgruppe. In der Literatur hingegen wurde eine Hochregulation der Genexpression von RUNX2 durch Zugspannung sowohl

in Stammzellen von Mäusen als auch in menschlichen PDL-Zellen beschrieben (Aonuma et al., 2020; Sun et al., 2022). Entscheidend für die Regulation von RUNX2 scheint aber das Ausmaß der eingesetzten Belastung zu sein. So verursachte in der Studie von Sun et al. eine hohe mechanische Belastung in Form von Dehnung sogar eine Verringerung der Genexpression von RUNX2 (Sun et al., 2022). In unserer Studie wurde eine 20%ige Dehnung eingesetzt, was einer großen mechanischen Belastung entspricht (Kanzaki et al., 2002). Um gezieltere Rückschlüsse auf die Wechselbeziehung der mechanischen Belastung und der zirkadianen Rhythmik betreffend die Expression von RUNX2 ziehen zu können, sollten unterschiedliche Dehnungsintensitäten und Zeitintervalle in weiterführenden Studien untersucht werden. Jedoch deuten unsere Ergebnisse auf unterschiedliche Effekte der Dehnung an unterschiedlichen Zeitpunkten im zirkadianen Rhythmus hin.

Derzeit gibt es noch nicht genügend Informationen um präzise Aussagen zu einem möglichen Einfluss des Zeitpunktes der eingesetzten Kraft während einer kieferorthopädischen Behandlung in Relation zu der zirkadianen Rhythmik treffen zu können. Aber die existierende Literatur deutet auf einen solchen Einfluss hin. Eine Studie von Miyoshi et al. wies in einem Rattenmodell nach, dass die kieferorthopädisch induzierte Zahnbewegung variierte, wenn die Kraft zu unterschiedlichen Tageszeitpunkten appliziert wurde. Bei einer Anwendung im Dunkeln war die Zahnbewegung geringer, als bei Tieren, bei denen eine gleiche Kraft im Hellen appliziert wurde (Miyoshi et al., 2001). In einer weiteren Studie von Xie et al. wurde in einem Tiermodell an Ratten eine Korrelation zwischen einer kieferorthopädischen Kraftereinwirkung und der Regulation von BMAL1 in den PDL-Zellen ermittelt. Dabei wurde durch die mechanische Belastung die BMAL1-Expression im parodontalen Gewebe hochreguliert. Diese Hochregulation war abhängig von der extrazellulären Signal-regulierten Kinase (ERK) und dem Aktivatorprotein 1 (AP1). Lokal wurde in dieser Studie durch einen BMAL1-Inhibitor diese Signalkaskade gehemmt. Daraus resultierte eine verringerte osteoklastische Aktivität in komprimierten Arealen im parodontalen Gewebe (Xie et al., 2022).

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass durch eine mechanische Belastung die Expression der Clock-Gene in PDL-Zellen beeinflusst wurde. Auch zeigte sich ein differentieller Einfluss der mechanischen Kräfte in Abhängigkeit der zirkadianen Rhythmik auf regulatorische Faktoren der PDL Zellhomöostase. Diese Ergebnisse weisen darauf

hin, dass auch die kieferorthopädische Zahnbewegung von der zirkadianen Rhythmik beeinflusst werden könnte. Weitere Studien sind notwendig, um zu entschlüsseln ob kieferorthopädische Zahnbewegungen in Abhängigkeit von der Tageszeit effizienter gestaltet werden könnten.

1.5 Zusammenfassung

Die zirkadiane Rhythmik spielt im menschlichen Organismus während physiologischen und pathophysiologischen Prozessen eine wichtige Rolle. Eine periphere zirkadiane Rhythmik konnte schon in einigen Zelltypen, wie auch in oralen Zellen, nachgewiesen werden. So konnte auch in den parodontalen Ligamentzellen (PDL-Zellen), die unabdingbar für eine kieferorthopädische Zahnbewegung sind, eine periphere zirkadiane Rhythmik nachgewiesen werden. In dieser Studie sollte untersucht werden, ob eine mechanische Belastung, wie sie auch während einer kieferorthopädisch induzierten Zahnbewegung vorkommt, die zirkadiane Rhythmik auf Genebene in PDL-Zellen beeinflussen kann. Zudem sollte untersucht werden, ob eine mechanische Stimulation in Abhängigkeit der zirkadianen Rhythmik auch unterschiedliche Effekte auf regulatorische Proteine wie Interleukin-1beta (IL-1 β), runt-verwandter Transkriptionsfaktor 2 (RUNX2) und Kollagen-1alpha (COL1A) hat.

In einer *In-vitro*-Versuchsreihe wurden daher humane PDL-Zellen auf Zellkulturplatten mit dehnbarem Boden kultiviert. Diese wurden mit Dexamethason, einem Glukokortikoid, synchronisiert. Zusätzlich zur Kontrollgruppe wurde eine mechanische Stimulation der Zellen durch eine 20 %-ige statische Dehnung (STSH) durchgeführt. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten wurden im 4 h Rhythmus die Zellen über 24 h geerntet. Anschließend erfolgte mittels realtime Polymerasekettenreaktion die Analyse der Genexpression folgender Clock-Gene: Arylkohlenwasserstoffrezeptor-Kerntranslokator-ähnliches Protein (ARNTL), Zircadian Locomotor Output Cycles Kaput (CLOCK), Period 1 (PER1) und Period 2 (PER2). In einer 2. Versuchsreihe wurde eine mechanische Belastung zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Synchronisation begonnen. Im erste Zeitintervall (SI1) wurde die mechanische Stimulation zum Zeitpunkt t0 gestartet, während im zweiten Zeitintervall (SI2) zum Zeitpunkt t12 begonnen wurde. Beide Belastungen wurden über einen Zeitraum von 4 h aufrechterhalten und anschließend in 2 h Intervallen geerntet. Für die Genanalyse wurden eine quantitative Echtzeit Polymerasekettenreaktion und für den Proteinnachweis der regulatorischen Proteine IL-1 β , RUNX2 und COL1A Enzyme-Linked-Immunsorbent-Assays durchgeführt. Für die Statistik wurden die statistischen Analysen Sidak- Test und Dunnett-Test genutzt.

Bei fast allen getesteten Clock-Genen konnte in der Kontrollgruppe nach Synchronisation das zirkadiane Muster über 24 h dargestellt werden. Die mechanische Belastung zeigte eine Reduzierung der Genexpression von ARNTL, während PER1 und PER2 zu unterschiedlichen Zeitpunkten eine Steigerung der Genexpression aufwiesen. Die mechanische Dehnung führte zu einer Regulation von COL1A und IL-1 β im Vergleich zur Kontrollgruppe. Interessanterweise kam es aber zu einer differentiellen Regulation aller untersuchten regulatorischen Faktoren in Abhängigkeit von der Initiierung der mechanischen Dehnung innerhalb des zirkadianen Rhythmus.

Zusammenfassend wurde durch eine mechanische Belastung die Expression der Clock-Gene in PDL-Zellen beeinflusst. Auch zeigte sich ein differentieller Einfluss der mechanischen Kräfte in Abhängigkeit der zirkadianen Rhythmik auf regulatorische Proteine der PDL Zellhomöostase. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass auch die kieferorthopädische Zahnbewegung von der zirkadianen Rhythmik beeinflusst werden könnte. Weitere Studien sind nötig, um die Komplexität der zirkadianen Rhythmik der PDL-Zellen während orthodontischen Zahnbewegung besser verstehen zu können und mögliche Aspekte für den klinischen Alltag zu gewinnen.

1.6 Literaturverzeichnis

- Albrecht U. Timing to perfection: the biology of central and peripheral circadian clocks. *Neuron*. 2012; 74: 246-260
- Aonuma T, Tamamura N, Fukunaga T, Sakai Y, Takeshita N, Shigemi S, Yamashiro T, Thesleff I, Takano-Yamamoto T. Delayed tooth movement in Runx2(+/-) mice associated with mTORC2 in stretch-induced bone formation. *Bone Rep*. 2020; 12: 100285.
- Asiry MA. Biological aspects of orthodontic tooth movement: A review of literature. *Saudi J Biol Sci*. 2018; 25: 1027-1032
- Athanassiou-Papaefthymiou M, Kim D, Harbron L, Papagerakis S, Schnell S, Harada H, Papagerakis P. Molecular and circadian controls of ameloblasts. *Eur J Oral Sci.* 2011; 119: 35-40
- Balsalobre A, Brown SA, Marcacci L, Tronche F, Kellendonk C, Reichardt HM, Schütz G, Schibler U. Resetting of circadian time in peripheral tissues by glucocorticoid signaling. *Science*. 2000 a; 289: 2344-2347
- Balsalobre A, Damiola F, Schibler U. A serum shock induces circadian gene expression in mammalian tissue culture cells. *Cell*. 1998; 93: 929-937
- Balsalobre A, Marcacci L, Schibler U. Multiple signaling pathways elicit circadian gene expression in cultured Rat-1 fibroblasts. *Curr Biol*. 2000 b; 10: 1291-1294
- Barber RD, Harmer DW, Coleman RA, Clark BJ. GAPDH as a housekeeping gene: analysis of GAPDH mRNA expression in a panel of 72 human tissues. *Physiol Genomics*. 2005; 21: 389-395
- Baumert U, Golan I, Becker B, Hrala BP, Redlich M, Roos HA, Palmon A, Reichenberg E, Müssig D. Pressure simulation of orthodontic force in osteoblasts: a pilot study. *Orthod Craniofac Res*. 2004; 7: 3-9
- Beertsen W, McCulloch CA, Sodek J. The periodontal ligament: a unique, multifunctional connective tissue. *Periodontol* 2000. 1997; 13: 20-40
- Buijs RM, Kalsbeek A. Hypothalamic integration of central and peripheral clocks. *Nat Rev Neurosci*. 2001; 2: 521-526
- Bumann A, Carvalho RS, Schwarzer CL, Yen EH. Collagen synthesis from human PDL cells following orthodontic tooth movement. *Eur J Orthod*. 1997; 19: 29-37
- Davidovitch Z, Nicolay OF, Ngan PW, Shanfeld JL. Neurotransmitters, cytokines, and the control of alveolar bone remodeling in orthodontics. *Dent Clin North Am*. 1988; 32: 411-435
- Fu M, Yang X. The sweet tooth of the circadian clock. *Biochem Soc Trans*. 2017; 45: 871-884

- Hadjidakis DJ, Androulakis II. Bone remodeling. *Ann N Y Acad Sci.* 2006; 1092: 385-396
- He Y, Macarak EJ, Korostoff JM, Howard PS. Compression and tension: differential effects on matrix accumulation by periodontal ligament fibroblasts in vitro. *Connect Tissue Res.* 2004; 45: 28-39
- Hilbert DA, Memmert S, Marciniak J, Jäger A. Molecular biology of periodontal ligament fibroblasts and orthodontic tooth movement : Evidence and possible role of the circadian rhythm. *J Orofac Orthop.* 2019; 80: 336-347
- Howard PS, Kucich U, Taliwal R, Korostoff JM. Mechanical forces alter extracellular matrix synthesis by human periodontal ligament fibroblasts. *J Periodontal Res.* 1998; 33: 500-508
- Iwasaki LR, Haack JE, Nickel JC, Reinhardt RA, Petro TM. Human interleukin-1 beta and interleukin-1 receptor antagonist secretion and velocity of tooth movement. *Arch Oral Biol.* 2001; 46: 185-189
- Janjić K, Agis H. Chronodentistry: the role & potential of molecular clocks in oral medicine. *BMC Oral Health.* 2019; 19: 32
- Janjić K, Kurzmann C, Moritz A, Agis H. Expression of circadian core clock genes in fibroblasts of human gingiva and periodontal ligament is modulated by L-Mimosine and hypoxia in monolayer and spheroid cultures. *Arch Oral Biol.* 2017; 79: 95-99
- Janjić K, Kurzmann C, Moritz A, Agis H. Core circadian clock gene expression in human dental pulp-derived cells in response to L-mimosine, hypoxia and echinomycin. *Eur J Oral Sci.* 2018; 126: 263-271
- Jiang N, Guo W, Chen M, Zheng Y, Zhou J, Kim SG, Embree MC, Songhee Song K, Marao HF, Mao JJ. Periodontal Ligament and Alveolar Bone in Health and Adaptation: Tooth Movement. *Front Oral Biol.* 2016; 18: 1-8
- Kanzaki H, Chiba M, Shimizu Y, Mitani H. Periodontal ligament cells under mechanical stress induce osteoclastogenesis by receptor activator of nuclear factor kappaB ligand up-regulation via prostaglandin E2 synthesis. *J Bone Miner Res.* 2002; 17: 210-220
- Komori T. Regulation of Proliferation, Differentiation and Functions of Osteoblasts by Runx2. *Int J Mol Sci.* 2019; 20
- Krueger JM, Fang J, Taishi P, Chen Z, Kushikata T, Gardi J. Sleep. A physiologic role for IL-1 beta and TNF-alpha. *Ann N Y Acad Sci.* 1998; 856: 148-159
- Kume K, Zylka MJ, Sriram S, Shearman LP, Weaver DR, Jin X, Maywood ES, Hastings MH, Reppert SM. mCRY1 and mCRY2 are essential components of the negative limb of the circadian clock feedback loop. *Cell.* 1999; 98: 193-205

Kunieda T, Minamino T, Katsuno T, Tateno K, Nishi J, Miyauchi H, Orimo M, Okada S, Komuro I. Cellular senescence impairs circadian expression of clock genes in vitro and in vivo. *Circ Res.* 2006; 98: 532-539

Lowrey PL, Takahashi JS. Genetics of circadian rhythms in Mammalian model organisms. *Adv Genet.* 2011; 74: 175-230

Memmert S, Damanaki A, Weykopf B, Rath-Deschner B, Nokhbehshaim M, Götz W, Gözl L, Till A, Deschner J, Jäger A. Autophagy in periodontal ligament fibroblasts under biomechanical loading. *Cell Tissue Res.* 2019; 378: 499-511

Miyoshi K, Igarashi K, Saeki S, Shinoda H, Mitani H. Tooth movement and changes in periodontal tissue in response to orthodontic force in rats vary depending on the time of day the force is applied. *Eur J Orthod.* 2001; 23: 329-338

Müssig E, Tomakidi P, Steinberg T. Molecules contributing to the maintenance of periodontal tissues. Their possible association with orthodontic tooth movement. *J Orofac Orthop.* 2005; 66: 422-433

Nakao K, Goto T, Gunjigake KK, Konoo T, Kobayashi S, Yamaguchi K. Intermittent force induces high RANKL expression in human periodontal ligament cells. *J Dent Res.* 2007; 86: 623-628

Nokhbehshaim M, Deschner B, Winter J, Reimann S, Bourauel C, Jepsen S, Jäger A, Deschner J. Contribution of orthodontic load to inflammation-mediated periodontal destruction. *J Orofac Orthop.* 2010; 71: 390-402

Oosterman JE, Kalsbeek A, La Fleur SE, Belsham DD. Impact of nutrients on circadian rhythmicity. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2015; 308: R337-50

Peters LI, Marciniak J, Kutschera E, Luiz C, Calvano Küchler E, Kirschneck C, Jäger A, Beisel-Memmert S. Influence of circadian rhythm on effects induced by mechanical strain in periodontal ligament cells. *J Orofac Orthop.* 2024; Doi:10.1007/s00056-024-00542-1. Online ahead of print

Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 2001; 29: e45.

Qin X, Li Q, Chen W, Bai Y, Baban B, Mao J. The circadian expression of osteogenic factors in periodontal tissue loading mechanical force: new concepts of the personalized orthodontic care. *EPMA J.* 2019; 10: 13-20

Reinhardt ÉL, Fernandes, Pedro Augusto Carlos Magno, Markus RP, Fischer FM. Daily rhythm of salivary IL-1 β , cortisol and melatonin in day and night workers. *Work.* 2012; 41: 5788-5790

Reppert SM, Weaver DR. Molecular analysis of mammalian circadian rhythms. *Annu Rev Physiol.* 2001; 63: 647-676

- Reppert SM, Weaver DR. Coordination of circadian timing in mammals. *Nature*. 2002; 418: 935-941
- Roberts WE, Huja S, Roberts JA. Bone modeling: biomechanics, molecular mechanisms, and clinical perspectives. *Semin Orthod*. 2004; 10: 123-161
- Sack RL, Auckley D, Auger RR, Carskadon MA, Wright KP, JR, Vitiello MV, Zhdanova IV. Circadian rhythm sleep disorders: part I, basic principles, shift work and jet lag disorders. An American Academy of Sleep Medicine review. *Sleep*. 2007; 30: 1460-1483
- Saito M, Saito S, Ngan PW, Shanfeld J, Davidovitch Z. Interleukin 1 beta and prostaglandin E are involved in the response of periodontal cells to mechanical stress in vivo and in vitro. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 1991; 99: 226-240
- Scheer, Frank A J L, Hilton MF, Mantzoros CS, Shea SA. Adverse metabolic and cardiovascular consequences of circadian misalignment. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009; 106: 4453-4458
- Shimizu N, Goseki T, Yamaguchi M, Iwasawa T, Takiguchi H, Abiko Y. In vitro cellular aging stimulates interleukin-1 beta production in stretched human periodontal-ligament-derived cells. *J Dent Res*. 1997; 76: 1367-1375
- Shimizu N, Ogura N, Yamaguchi M, Goseki T, Shibata Y, Abiko Y, Iwasawa T, Takiguchi H. Stimulation by interleukin-1 of interleukin-6 production by human periodontal ligament cells. *Arch Oral Biol*. 1992; 37: 743-748
- Sinha MK, Ohannesian JP, Heiman ML, Kriauciunas A, Stephens TW, Magosin S, Marco C, Caro JF. Nocturnal rise of leptin in lean, obese, and non-insulin-dependent diabetes mellitus subjects. *J Clin Invest*. 1996; 97: 1344-1347
- Sun C, Janjic Rankovic M, Folwaczny M, Stocker T, Otto S, Wichelhaus A, Baumert U. Effect of Different Parameters of In Vitro Static Tensile Strain on Human Periodontal Ligament Cells Simulating the Tension Side of Orthodontic Tooth Movement. *Int J Mol Sci*. 2022; 23: 1525
- Takahashi JS. Circadian-clock regulation of gene expression. *Curr Opin Genet Dev*. 1993; 3: 301-309
- Takarada T, Xu C, Ochi H, Nakazato R, Yamada D, Nakamura S, Kodama A, Shimba S, Mieda M, Fukasawa K, Ozaki K, Iezaki T, Fujikawa K, Yoneda Y, Numano R, Hida A, Tei H, Takeda S, Hinoi E. Bone Resorption Is Regulated by Circadian Clock in Osteoblasts. *J Bone Miner Res*. 2017; 32: 872-881
- Ukai-Tadenuma M, Kasukawa T, Ueda HR. Proof-by-synthesis of the transcriptional logic of mammalian circadian clocks. *Nat Cell Biol*. 2008; 10: 1154-1163
- Van Cauter E, Polonsky KS, Scheen AJ. Roles of circadian rhythmicity and sleep in human glucose regulation. *Endocr Rev*. 1997; 18: 716-738

Wang Q, Ao Y, Yang K, Tang H, Chen D. Circadian clock gene *Per2* plays an important role in cell proliferation, apoptosis and cell cycle progression in human oral squamous cell carcinoma. *Oncol Rep.* 2016; 35: 3387-3394

Wilking M, Ndiaye M, Mukhtar H, Ahmad N. Circadian rhythm connections to oxidative stress: implications for human health. *Antioxid Redox Signal.* 2013; 19: 192-208

Wu T, Fu Z. Time-dependent glucocorticoid administration differently affects peripheral circadian rhythm in rats. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai).* 2017; 49: 1122-1128

Xie Y, Tang Q, Yu S, Zheng W, Chen G, Huang X, Chen L. Orthodontic Force-Induced *BMAL1* in PDLCs Is a Vital Osteoclastic Activator. *J Dent Res* 2022; 101: 177-186

Zhang R, Lahens NF, Ballance HI, Hughes ME, Hogenesch JB. A circadian gene expression atlas in mammals: implications for biology and medicine. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014; 111: 16219-16224

Zhao J, Zhou X, Tang Q, Yu R, Yu S, Long Y, Cao C, Han J, Shi A, Mao JJ, Chen X, Chen L. *BMAL1* Deficiency Contributes to Mandibular Dysplasia by Upregulating *MMP3*. *Stem Cell Reports.* 2018; 10: 180-195

Zheng B, Albrecht U, Kaasik K, Sage M, Lu W, Vaishnav S, Li Q, Sun ZS, Eichele G, Bradley A, Lee CC. Nonredundant roles of the *mPer1* and *mPer2* genes in the mammalian circadian clock. *Cell.* 2001; 105: 683-694

Zheng L, Ehardt L, McAlpin B, About I, Kim D, Papagerakis S, Papagerakis P. The tick tock of odontogenesis. *Exp Cell Res.* 2014; 325: 83-89

Zheng L, Seon YJ, Mourão MA, Schnell S, Kim D, Harada H, Papagerakis S, Papagerakis P. Circadian rhythms regulate amelogenesis. *Bone.* 2013. 55: 158-165

Ziros PG, Basdra EK, Papavassiliou AG. *Runx2*: of bone and stretch. *Int J Biochem Cell Biol.* 2008; 40: 1659-1663

2. Veröffentlichung

Dieser Publikationsdissertation liegt die folgende, unabhängig begutachtete Veröffentlichung zugrunde:

Peters LI, Marciniak J, Kutschera E, Luiz C, Calvano Kuchler E, Kirschneck C, Jäger A, Beisel-Memmert S. Influence of circadian rhythm on effects induced by mechanical strain in periodontal ligament cells. J Orofac Orthop. 2024; doi: 10.1007/s00056-024-00542-1. Epub ahead of print. PMID: 39134880.

<https://doi.org/10.1007/s00056-024-00542-1>

3. Danksagung

Ich bedanke mich herzlichst bei Herrn Professor Jäger und Frau Privat-Dozentin Dr. Svenja Beisel-Memmert für die gute und gezielte Betreuung während meiner Promotionsarbeit und die Beantwortung tausender Fragen, die während des ganzen Prozesses ausnahmslos von Ihnen jederzeit beantwortet wurden.

Zudem bedanke ich mich bei meiner Familie, die während der ganzen Zeit immer hinter mir stand.