

Einfluss der Wachstumsmatrix auf die Differenzierung von Mausmakrophagen zu Osteoklasten-ähnlichen Zellen

Dissertation

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

der Medizinischen Fakultät

der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität

Bonn

Annika Sophie Both

aus Bonn

2025

Angefertigt mit der Genehmigung
der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachterin: Priv.-Doz. Dr. Svenja Beisel-Memmert
2. Gutachter: Prof. Dr. Jochen Walter

Tag der mündlichen Prüfung: 23.07.2025

Aus der Poliklinik für Kieferorthopädie des Universitätsklinikums Bonn

In Liebe und Dankbarkeit meiner Familie gewidmet.

Inhaltsverzeichnis

	Abkürzungsverzeichnis	7
1.	Einleitung	13
1.1	Die orthodontische Zahnbewegung	13
1.1.1	Molekulare Mechanismen der orthodontischen Zahnbewegung	16
1.2	Osteoklasten	18
1.2.1	Osteoklastogenese	21
1.2.2	Osteoklasten-Matrix-Interaktion	24
1.3	Orthodontisch-induzierte externe apikale Wurzelresorptionen	26
1.3.1	Molekulare Mechanismen externer apikaler Wurzelresorptionen	29
1.4	Zielsetzung	32
2.	Material und Methoden	33
2.1	Herstellung der Hartgewebepulver	33
2.2	Darstellung der Hartgewebepulver mittels Rasterelektronenmikroskopie	34
2.3	Zellkultivierung und -stimulation	36
2.4	Zellernte	38
2.5	RNA-Isolation	39
2.6	Synthese von komplementärer DNA (cDNA)	39
2.7	Quantitative Genexpressionsanalyse mittels RT-PCR	40
2.7.1	Fluoreszenzverfahren	40
2.7.2	Relative Quantifizierung	41
2.7.3	Schmelzkurvenanalyse	42
2.7.4	Primer	43
2.7.5	Herstellung des Reaktionsansatzes	43
2.7.6	RT-PCR-Reaktion	44
2.8	Quantitativer Proteinnachweis durch Enzyme-linked Immunosorbent Assays (ELISA)	44
2.8.1	Herstellung der Verdünnungsreihen	46
2.8.2	ELISA-Protokoll	47
2.8.3	Photometrische Auswertung	49

2.9	Statistik	50
3.	Ergebnisse	51
3.1	Genexpressionsanalyse durch RT-PCR	51
3.1.1	HSPA1b-Genexpression	51
3.1.2	GDF15-Genexpression	52
3.1.3	CXCL2-Genexpression	53
3.1.4	IGF-1-Genexpression	54
3.1.5	ACP5-Genexpression	55
3.1.6	CTSK-Genexpression	56
3.1.7	OSCAR-Genexpression	57
3.2	Proteinnachweis durch ELISA-Tests	58
3.2.1	HSPA1b-Proteinkonzentration	58
3.2.2	GDF15- Proteinkonzentration	59
3.2.3	CXCL2- Proteinkonzentration	60
3.2.4	IGF-1- Proteinkonzentration	61
4.	Diskussion	62
5.	Zusammenfassung	75
6.	Abbildungsverzeichnis	77
7.	Tabellenverzeichnis	79
8.	Literaturverzeichnis	80
9.	Erklärung zum Eigenanteil	95
10.	Veröffentlichungen	96
11.	Danksagung	97

Abkürzungsverzeichnis

ACP5	Acid phosphatase 5
AK	Alveolarknochen
Akt	Protein Kinase B
ALP	Alkaline phosphatase
ANOVA	Varianzanalyse (ANalysis Of VAriance)
CA	Carboanhydrase
cdc7	Cell division cycle 7
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
cFMS	Colony-stimulating factor-1-Rezeptor
CFU-M	Makrophagen-Kolonie-bildende Einheiten
CGRP	Calcitonin gene-related peptide
CHX	Chlorhexidin
Cl ⁻	Chloridionen
ClC-7	Chloridkanal 7
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
COX-2	Cyclooxygenase-2
Csf1	Colony stimulating factor 1
c-Src	Zelluläre Tyrosinkinase Src
Ct	Cycle threshold
CTSK	Cathepsin K

CXCL2	C-X-C motif chemokine 2
D	Dentin
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
EAWR	Externe apikale Wurzelresorption
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assays
eNOS	Endotheliale Stickstoffmonoxid Synthase
ERK	Extracellular-signal regulated kinases
EZM	Extrazelluläre Matrix
FBS	Fetales Kälberserum
FSD	Functional secretory domain
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GC	Guanosin-Cytosin
GDF15	Growth differentiation factor 15
GDP	Guanosindiphosphat
Grb2	Growth factor receptor-bound protein 2
GTP	Guanosintriphosphat
H ⁺	Protonen
H ₂ O	Wasser
HCl	Salzsäure
HCO ₃ ⁻	Bicarbonat

HIF-1	Hypoxia inducible factor-1
hPDL	Humanes parodontales Ligament
HSP70	Heat shock protein 70
HSPA1b	Heat shock protein A1b
HVZ	Hämatopoetische Vorläuferzelle
HZ	Hyaline Zone
IGF-1	Insulin-like growth factor
IL-1 β	Interleukin-1 β
IL-6	Interleukin-6
IL-8	Interleukin-8
IL-10	Interleukin-10
JNK	c-Jun-N-terminale Kinase
K	Knochen
M-CSF	Macrophage colony stimulating factor
MAPK	Mitogen-activated protein-kinase
MCP-1	Monocyte chemoattractant protein-1
MIC-I	Macrophage inhibitory cytokine- I
MIP2	Macrophage inflammatory protein 2
MMP	Matrixmetalloproteinasen
mRNA	Messenger-Ribonukleinsäure
MZ	Multinukleäre Osteoklasten-ähnliche Zelle
NaOCl	Natriumhypochlorit

NF- κ B	Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
NFATc1	Nuclear Factor of Activated T cells 1
NK	Negativkontrolle
NO	Stickstoffmonoxid
Npp1	Nucleoside pyrophosphatase/phosphodiesterase 1
OPG	Osteoprotegerin
OSCAR	Osteoclast-associated receptor
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase chain reaction
PDL	Parodontales Ligament
PGE2	Prostaglandin E2
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
Rac	Ras-related C3 botulinum toxin substrate
RANK	Receptor activator of NF- κ B
RANKL	Receptor activator of NF- κ B ligand
RANTES	Regulated upon Activation, Normal T-cell Expressed and Secreted
REM	Rasterelektronenmikroskop
RGD	Arginin, Glycin, Asparaginsäure
Rho-GTPase	Ras homologous guanosin triphosphatase
RL	Resorptionslakune
RLT	RNeasy lysis buffer

RNA	Ribonukleinsäure
RT-PCR	Real-Time Quantitative Polymerase Chain Reaction
RUNx2	Runt-related transcription factor 2
RZ	Resorptionszone
SEM	Standardfehler
Seq	Sequenzierung
SIBLING	Small integrin-binding ligand N-linked glycoprotein
SK	Stimulationskontrolle
SNARE	Soluble N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein attachment protein receptors
Syk	Milztyrosinkinase
SZ	Sealing zone
S1P	Sphingosin-1-Phosphat
TGF- β	Transforming growth factor- β
T _m	Melting temperature
Tnfrsf11b	Tumor necrosis factor receptor superfamily member 11B
Tnfsf11	Tumor necrosis factor (ligand) superfamily member 11
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
TNF- β	Tumornekrosefaktor- β
TRAF	TNF-receptor associated factors
TRAP	Tartrate-resistant acid phosphatase
V-ATPase	Vakuoläre Adenosintriphosphatase

VEGF	Vascular endothelial growth factor
Z	Zement
z'	Zementoid
β -ME	β -Mercaptoethanol

1. Einleitung

1.1 Die orthodontische Zahnbewegung

Eine kieferorthopädische Therapie zielt darauf ab, Zahnfehlstellungen durch anhaltende und gesteuerte Kraftapplikation im Rahmen eines beschleunigten Knochenumbaus zu korrigieren (Nakai et al., 2023). Die orthodontische Zahnbewegung ist das Resultat eines sterilen Entzündungsvorgangs im parodontalen Ligament (PDL), dessen biomechanische Reaktionen auf einem engen Zusammenspiel zwischen parodontalen Ligament-fibroblasten, Osteozyten, Osteoblasten, Osteoklasten sowie Immunzellen und dessen gesteuerter Freisetzung von bioaktiven Molekülen basieren, die zusammen einen koordinierten Gewebeumbau des Desmodonts und Alveolarknochens hervorrufen (Li et al., 2021).

Ein vereinfachtes Modell der orthodontischen Zahnbewegung beschreibt eine Druck- und Zug- bzw. Resorptions- und Appositionsseite des PDL. Die dabei stattfindende Kopplung zwischen Knochenresorption und -apposition erfolgt durch interagierende Osteoblasten und Osteoklasten (Henneman et al., 2008) (Abb. 1).

Initial bewirkt eine einwirkende Kraft über $0,2 \text{ N/cm}^2$ Wurzeloberfläche eine geringe Auslenkung (0,4 - 0,9 mm) des Zahnes innerhalb des Knochenfaches, welche die erste Phase der orthodontischen Zahnbewegung darstellt (Rygh et al., 1982) (Abb. 1). Dabei nähert sich die Zahnwurzel auf der Resorptionsseite dem Alveolarknochen an, wodurch eine Stauchung der parodontalen Faserbündel und Verdrängung des parodontalen Fluids resultiert. Des Weiteren kommt es zu einer Kompression der Kapillaren mit einer Verringerung des Blutflusses, wodurch der Sauerstoffpartialdruck im Gewebe sinkt. Die nachfolgenden Reaktionen werden maßgeblich von der Kraftintensität beeinflusst: Während geringe Kräfte lokale Osteoklasten innerhalb des PDL direkt aktivieren, die eine kontinuierliche, frontale Resorption des Alveolarknochens hervorrufen, bewirken hohe Kräfte eine Kompression der umliegenden Kapillaren des PDL und Alveolarknochens. Bei vollständigem Gefäßverschluss resultiert eine absolute Gewebshypoxie, wodurch lokale Nekrosezonen entstehen, die auf Grund ihrer glasartigen Erscheinung auch als hyaline Zonen bezeichnet werden (Friedrichsdorf et al., 2019; Rygh, 1977).

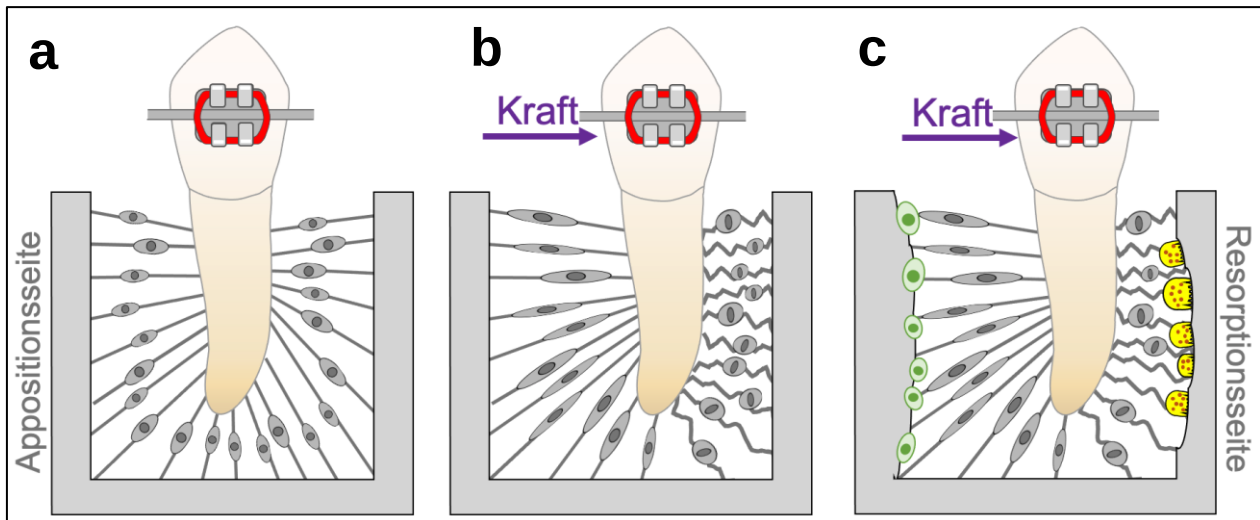


Abb. 1: Vereinfachtes Schema der orthodontischen Zahnbewegung (modifiziert nach Hennemann et al., 2008). **a** Die Zahnwurzel ist umgeben von parodontalen Faserbündeln, die eine Verankerung im Alveolarknochen gewährleisten. **b** Die Einwirkung einer externen Kraft bewirkt initial eine Auslenkung der Zahnwurzel innerhalb des Parodontalspalts. Dadurch kommt es zu einer Stauchung der Faserbündel auf der Resorptionsseite und einer Dehnung der Faserbündel auf Appositionsseite. **c** Nach persistierender Krafteinwirkung wird die Knochenresorption durch Osteoklasten (gelb) auf der Resorptionsseite und die Knochenapposition durch Osteoblasten (grün) auf der Appositionsseite eingeleitet (Hennemann et al., 2008).

Da in diesen Nekrosezonen keine lokalen Osteoklasten aktiviert werden können, kommt es zunächst zu einem Stillstand der Zahnbewegung (Abb. 2). Diese Phase der Stagnation kann in Abhängigkeit der Knochendichte und der einwirkenden Kraftintensität bis zu 10 Wochen andauern, bis das nekrotische Material durch einwandernde Monozyten und Makrophagen vollständig eliminiert wurde (Brudvik und Rygh, 1994a; Reitan, 1989). Im Rahmen der anschließenden Resorptionsphase wird der Knochenumbau durch einwandernde Osteoklasten initiiert, die den Knochen ausgehend von der Unterseite der Lamina dura unterminierend resorbieren und somit die Zahnbewegung fortsetzen (Proffit et al., 2019) (Abb. 2).

Für eine effiziente Zahnbewegung wird angestrebt, das Maximum an Kraftintensität auszuschöpfen und gleichzeitig das Risiko für die Entstehung von hyalinen Zonen möglichst zu minimieren. Dabei sollte der Fokus auf eine körperliche anstatt kippende Zahnbewegung gelegt werden, um große Belastungsspitzen zu vermeiden. In der Praxis

ist es jedoch nahezu unmöglich, die Entstehung von Nekrosezonen vollständig zu verhindern (Proffit et al., 2019).

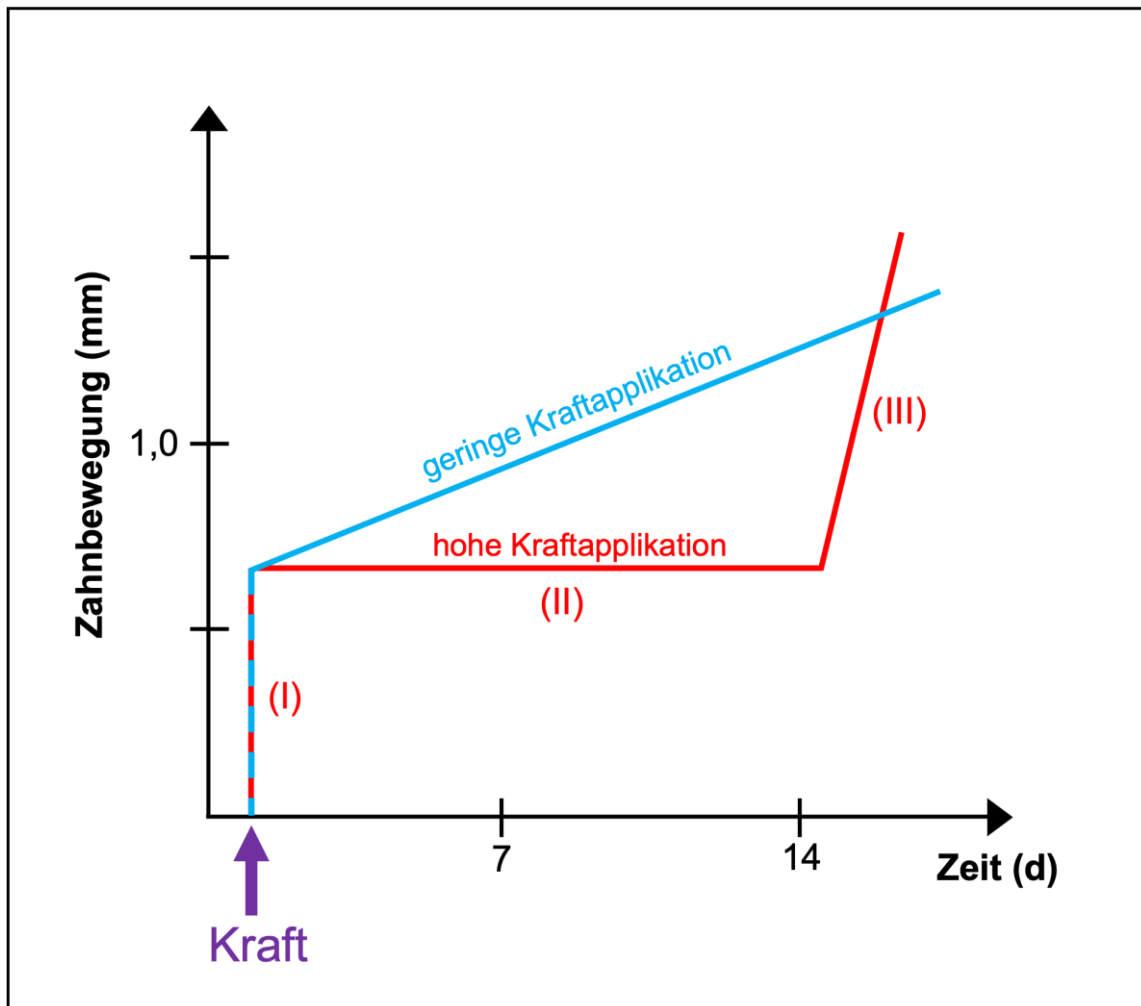


Abb. 2: Phasen der orthodontischen Zahnbewegung (modifiziert nach Proffit et al., 2019). Im Rahmen einer geringen Kraftapplikation (blauer Graph) kommt es nach initialer Auslenkung des Zahnes innerhalb des Parodontalspalts zu einer kontinuierlichen Zahnbewegung im Sinne einer frontalen Knochenresorption durch lokale Osteoklasten. Die Einwirkung hoher Kräfte (roter Graph) führt nach initialer Auslenkung des Zahnes im Parodontalspalt (Phase I: Dislokation) zu einer lokalen Gefäßkompression. In Folge der lokalen Hypoxie entstehen hyaline Zonen, bestehend aus nekrotischem, zellfreiem Material (Phase II: Hyalinisierung). Die Zahnbewegung stagniert für 2 bis 10 Wochen. Nach Beseitigung des nekrotischen Materials kommt es zur Einwanderung von Osteoklasten aus umliegenden Knochenmarksabschnitten, die die Knochenresorption in Form einer unterminierenden Resorption einleiten, wodurch die Zahnbewegung fortgesetzt wird (Phase III: Resorption) (Proffit et al., 2019).

1.1.1 Molekulare Mechanismen der orthodontischen Zahnbewegung

Im Rahmen der ausgelösten Hypoxie kommt es zu einer Freisetzung und Aktivierung verschiedener Entzündungsmediatoren im PDL, wie Prostaglandine und Zytokine (zB. IL-1 β). Zusätzlich führt der Abfall der Sauerstoff- und die Steigerung der Kohlenstoffdioxidkonzentration zu einer Aktivierung des Transkriptionsfaktors HIF-1 (Hypoxia inducible factor-1), wodurch weitere Mediatoren, wie VEGF und RANKL in PDL-Fibroblasten und Osteoblasten aktiviert werden, die den Umbauprozess des parodontalen Ligaments und Alveolarknochens initiieren. Zusätzlich bewirkt die einwirkende Kraft eine mechanische Scherbelastung und Verformung der extrazellulären Knochenmatrix und Osteozytenmembranen sowie kollagenen Fasern des PDL (Li et al., 2018). Parodontale Ligamentfibroblasten und Osteozyten fungieren dabei als wichtige Mechanosensoren des PDL bzw. Alveolarknochens, die die Geweberemodellation einleiten. Wichtige Bestandteile dieser mechanosensitiven Zellen sind Integrine, die als Transmembranproteine eine Kopplung zwischen extrazellulärer Matrix und Zytoskelett herstellen und intrazelluläre Signalkaskaden aktivieren, wodurch verschiedene Entzündungsmediatoren freigesetzt werden (Li et al., 2021). Zusätzlich kommt es zu einer mechanischen Stimulation freier Nervenendigungen, die in direktem Kontakt mit Kapillaren stehen und eine Freisetzung vasoaktiver Neurotransmitter, wie Substanz P und CGRP (Calcitonin gene-related peptide) hervorrufen. Diese Mediatoren interagieren mit Gefäßendothelzellen und bewirken eine Vasodilatation und Erhöhung der Gefäßpermeabilität innerhalb des PDL. Die aktivierten Endothelzellen binden und rekrutieren aus der Blutbahn stammende Entzündungszellen, darunter Leukozyten, Monozyten und Makrophagen, die eine akute Entzündungsreaktion des PDL einleiten. In der Folge kommt es zur Freisetzung diverser Entzündungsmediatoren und Wachstumsfaktoren, wie IL-1 β , IL-6, IL-10, Stickstoffmonoxid (NO), Prostaglandine, TNF- α und TNF- β , Growth differentiation factor 15 (GDF15), Macrophage colony stimulating factor (M-CSF), Osteoprotegerin (OPG) und Receptor activator of NF- κ -Ligand (RANKL). Zusätzlich bewirken Prostaglandine (PGE2) eine Stimulation der Osteoblastendifferenzierung, die vermehrt RANKL und M-CSF und vermindert OPG freisetzen, was insgesamt zu einer Stimulation der Osteoklastogenese und folglich der Knochenresorption führt (Li et al., 2018). Die freigesetzten Zytokine, unter anderem IL-1 β und TNF- α , führen zu einer Freisetzung weiterer Entzündungsmediatoren, wie MCP-1,

RANTES und CXCL2, welche die Rekrutierung und Aktivierung von Vorläuferzellen der Monozyten-Makrophagenlinie auf der Resorptionsseite und dessen Differenzierung zu Osteoklasten fördern (Alhashimi et al., 1999). Im Rahmen der sterilen Entzündungsreaktion werden zusätzlich protektive Moleküle, wie Insulin-like growth factor (IGF-1) und Hitzeschockproteine (z.B. HSP70) exprimiert, die die Gewebemöostase während des Entzündungsvorganges aufrechterhalten und einer übermäßigen Gewebedestruktion des PDL entgegenwirken (Han und Amar, 2003; Marciniak et al., 2019).

Auf der Zugseite dominieren vorrangig Mediatoren, die die Neubildung der Knochenmatrix durch Osteonblasten initiieren. Unter anderem bewirken Zugspannungen eine Aktivierung der endothelialen Stickstoffmonoxid Synthase (eNOS) in PDL-Fibroblastenzellen und eine verstärkte Freisetzung von Stickstoffmonoxid (NO), wodurch die Knochenneubildung durch aktive Osteoblasten induziert wird. Der Anstieg des Entzündungsmediators IL-10 führt zu einer vermehrten Freisetzung von OPG sowie einer verringerten Freisetzung von RANKL in Osteoblasten, was zu einer verstärkten Osteoblastogenese und verminderten Osteoklastogenese führt. Erhöhte Konzentrationen von IL-10 stimulieren zudem die Rekrutierung und Differenzierung von Osteoblasten-Vorläuferzellen (Li et al., 2018).

1.2 Osteoklasten

Osteoklasten sind gewebespezifische Makrophagen und für die Resorption von Knochen verantwortlich (Kim et al., 2020). Hervorgehend aus pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen der Monozyten-Makrophagen-Linie entwickeln sie sich zu 30-100 µm großen multinukleären Riesenzellen, die durch die Freisetzung von Salzsäure (HCl) und proteolytischen Enzymen innerhalb einer geschlossenen Resorptionszone die Auflösung von anorganischer und organischer Knochenmatrix hervorrufen (Baron et al., 1986; Charles und Aliprantis, 2014; Kim et al., 2020; Lee et al., 2021).

Zusammen mit Osteoblasten bewirken Osteoklasten eine Regulation des Knochenstoffwechsels. Die enge Kopplung der beiden Zelltypen durch direkte Zell-zu-Zell-Kontakte und sekretorische Signalproteine ist essenziell, um eine konstante Knochendichte und -qualität zu gewährleisten (Kim et al., 2020). Durch die ständige Remodellation der Knochenmatrix können die überlebenswichtigen Funktionen des Knochens, wie die Bildung des Stütz- und Bewegungsapparates, die Protektion innerer Organe sowie die Speicherung von Mineralsalzen dauerhaft aufrecht erhalten werden (Feng und McDonald, 2011). Ein Ungleichgewicht zwischen Knochenmodellation und -resorption kann hingegen zu schwerwiegenden Erkrankungen, wie Osteoporose, führen (Khosla et al., 2012). Auch während der orthodontischen Zahnbewegung ist eine genau abgestimmte Aktivität von Osteoklasten und Osteoblasten erforderlich, um Schäden des Parodonts zu vermeiden.

Physiologisch aktive Osteoklasten kennzeichnen sich durch die Ausbildung charakteristischer Membrandomänen. Dazu zählt die Ruffled border (deutsch „Faltensaum“), Sealing zone (deutsch „Versiegelungszone“) und Functional secretory domain (deutsch „Ausscheidungsdomäne“). Dieser Prozess wird als Polarisation bezeichnet und bildet eine wichtige Voraussetzung für die Knochenresorption (Stenbeck, 2002; Takito et al., 2018). Die Sealing zone ermöglicht eine dichte Adhäsion der Osteoklastenzelle an der zu resorbierenden Knochenoberfläche und grenzt die saure Resorptionszone zum Extrazellularraum hin ab (Takito et al., 2018; Väänänen und Horton, 1995) (Abb. 3). Die Ruffled border entsteht durch Einfaltungen der knochenzugewandten Osteoklastenmembran, durch die eine Oberflächenvergrößerung erzielt wird, dessen Ausdehnung je nach Aktivitätszustand der Osteoklastenzelle variieren kann. Wichtige

Bestandteile der Ruffled border sind Membran-verankerte Protonenpumpen (V-ATPasen) und Chloridkanäle (ClC-7), über die Protonen (H^+) und Chloridionen (Cl^-) in die Resorptionszone freigesetzt und durch die Bildung von Salzsäure (HCl) die Demineralisation der anorganischen Knochenmatrix hervorrufen. Hierfür wird ein Protonengradient durch die Carboanhydrase (CA) im Zytoplasma bereitgestellt, die Kohlenstoffdioxid (CO_2) und Wasser (H_2O) zu Bikarbonat (HCO_3^-) und Protonen (H^+) umwandelt. An der basolateralen Membran wird das Bicarbonat im Austausch gegen Chloridionen (Cl^-) aus der Zelle geschleust (Stenbeck, 2002) (Abb. 3).

Durch die Anreicherung von Protonen innerhalb der Resorptionszone werden Calciumionen aus den Hydroxylapatitkristallen herausgelöst, wodurch die kollagenen und nicht-kollagenen Knochenmatrixproteine freigelegt werden. Die Spaltung dieser Proteine wird durch verschiedene Proteasen, wie Matrixmetalloproteinasen (MMPs), lysosomale Cysteinprotease Cathepsin K (CTSK) und Tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP), auch bekannt als Acid Phosphatase 5 (ACP5), induziert, die aus Speichervesikeln an der Ruffled border in die Resorptionszone freigesetzt werden (vesikuläre Exozytose) (Rucci und Teti, 2016). Die Gene CTSK und TRAP bzw. ACP5, die für die proteolytischen Enzyme codieren, sind als wichtige Osteoklastenmarker etabliert (Bernhardt et al., 2021). Die im Rahmen der Resorption entstehenden Abbauprodukte werden an der Ruffled border von der Osteoklastenzelle aufgenommen (Endozytose) und in Vesikeln durch die Zelle geschleust (Transzytose). Die Freisetzung in den Extrazellularraum erfolgt über die Functional secretory domain (Itzstein et al., 2011; Stenbeck, 2002) (Abb. 3).

Im Zuge der Knochenresorption entstehen Resorptionslakunen (Howship-Lakunen), die lichtmikroskopisch als unregelmäßige Vertiefungen in der Knochenoberfläche dargestellt werden können (Jones und Boyde, 1993). Nach Abschluss der Resorption dringen Knochensaumzellen in die Resorptionslakunen ein und befreien diese zunächst von restlichem organischem Gewebe. Durch Absonderung einer dünnen Kollagenschicht kann anschließend die neue Knochenmatrix durch einwandernde Osteoblasten gebildet werden (Everts et al., 2002).

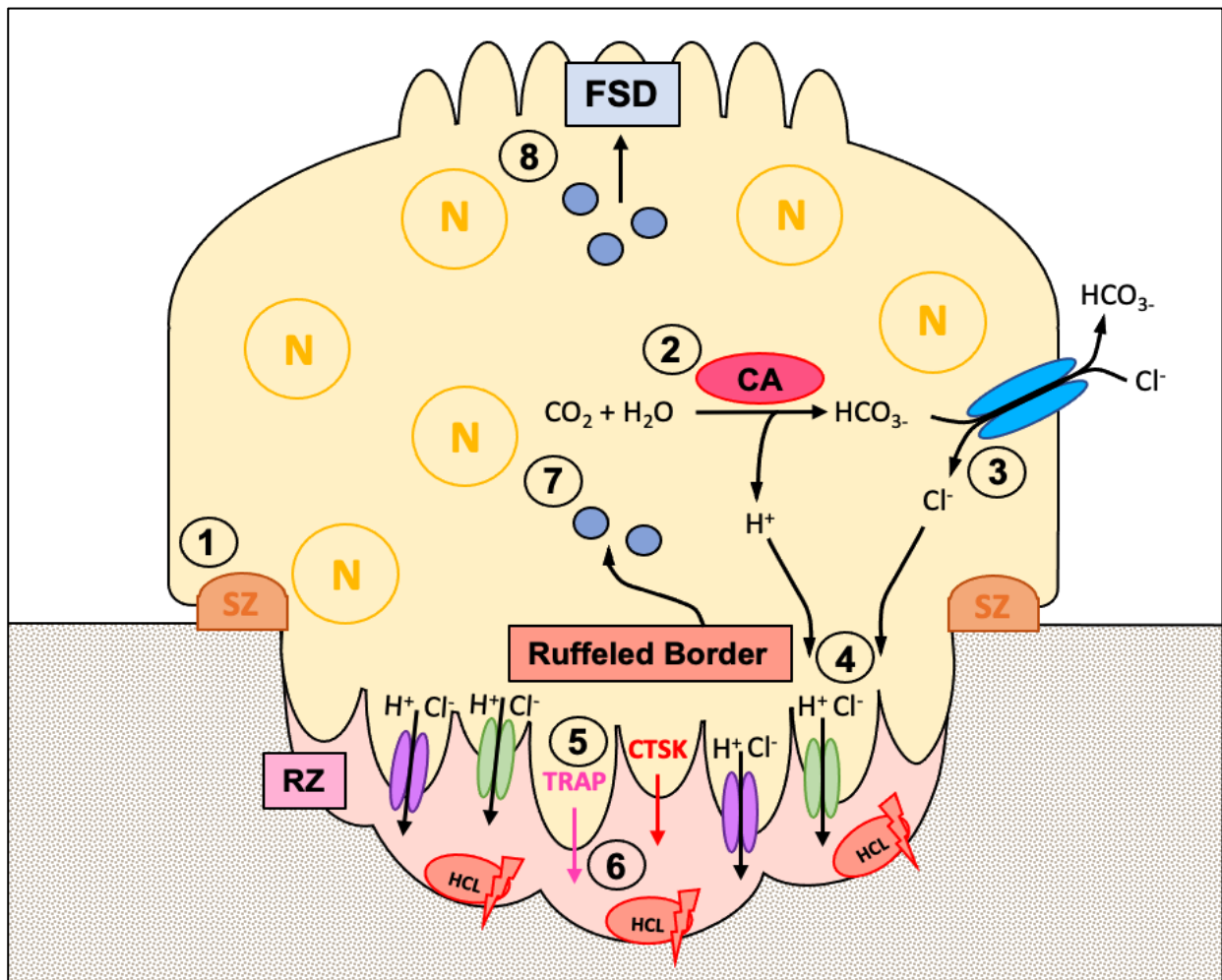


Abb. 3: Schematischer Aufbau einer aktiven Osteoklastenzelle (modifiziert nach Stenbeck, 2002). (1) Über die Sealing zone (SZ) entsteht eine enge Verbindung zwischen Osteoklastenzelle und Hartgewebe, die die Resorptionszone (RZ) zum Extrazellulärraum abdichtet; (2) Durch die Carboanhydrase (CA) werden intrazelluläre Cl^- - und H_2O -Ionen zu Bikarbonat (HCO_3^-) und Protonen (H^+) umgewandelt; (3) HCO_3^- wird im Austausch mit Cl^- aus der Zelle ausgeschleust. (4) Es kommt zum Anstieg der intrazellulären Protonen- und Chloridkonzentration, Cl^- - und H^+ -Ionen werden über Chloridkanäle und Protonenpumpen (V-ATPasen) der Ruffled border in die Resorptionszone befördert. (5) Zusätzlich kommt es zur Sekretion von Proteasen, wie TRAP und CTSK; (6) Die Bildung von Salzsäure (HCl) bewirkt zusammen mit den aktiven Proteasen die Auflösung der anorganischen und organischen Knochenmatrix; (7) Die anfallenden Abbauprodukte werden an der Ruffled border in die Osteoklastenzelle aufgenommen, eingeschlossen in Vesikeln durch die Zelle transportiert und schließlich an der Functional secretory domain (FSD) in den Extrazellulärraum ausgeschleust (8) (Stenbeck, 2002).

1.2.1 Osteoklastogenese

Trotz ihrer engen Interaktion unterscheiden sich Osteoblasten und Osteoklasten deutlich in ihrem Ursprung. Während Osteoblasten aus mesenchymalen Embryonalzellen des neuralen Ektoderms hervorgehen, sind Osteoklasten Abkömmlinge des mononukleär-phagozytären Systems (Yasuda et al., 1998).

Im Rahmen der Osteoklastogenese bewirken spezifische Mediatoren zunächst eine Umwandlung von hämatopoetischen Stammzellen zu Makrophagen-Kolonie-bildenden Einheiten (CFU-M), die gemeinsame Vorläuferzellen von Makrophagen und Osteoklasten darstellen. Daraufhin differenzieren sich die CFU-M durch die Liganden-Rezeptor-Interaktion zwischen RANKL und RANK (Receptor activator of NF- κ B ligand bzw. Receptor activator of NF- κ B) weiter zu mononukleären Osteoklasten, welche miteinander zu einer multinukleären Osteoklastenzelle fusionieren. Durch eine dichte Anlagerung an die mineralisierte Knochenmatrix kommt es zur Polarisierung der multinukleären Osteoklastenzelle, die die Knochenresorption initiiert (Kim et al., 2020) (Abb. 4).

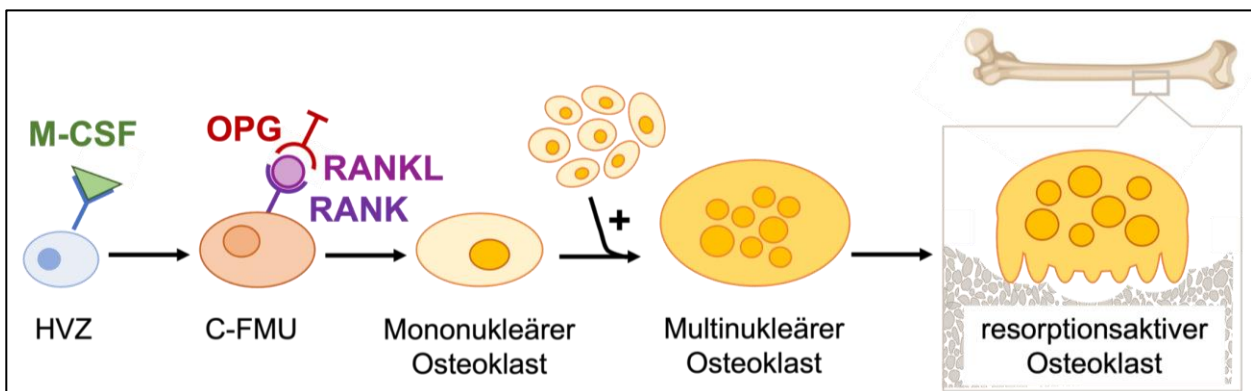


Abb. 4: Phasen der Osteoklastogenese (modifiziert nach Kim et al., 2020). Osteoklasten gehen aus einer hämatopoetischen Vorläuferzelle (HVZ) hervor, die durch Bindung von M-CSF an den Rezeptor c-FMS zu Makrophagen-Kolonie-bildenden Einheiten (CFU-M) umgewandelt werden, welche die gemeinsamen Vorläuferzellen von Makrophagen und Osteoklasten darstellen. Durch die Bindung des RANK-Liganden (RANKL) an den RANK-Rezeptor entstehen einkernige Osteoklastenzellen, die miteinander zu einer multinukleären Osteoklastenzelle fusionieren. Erst in direktem Kontakt zur Knochenoberfläche erfolgt die Aktivierung (Polarisation) der multinukleären Osteoklasten, die die Knochenresorption initiieren (Kim et al., 2020).

Wichtige Schlüsselmoleküle während der Osteoklastogenese stellen die Zytokine Macrophage colony stimulating factor (M-CSF) und Receptor activator of NF- κ B ligand

(RANKL) dar (Kim et al., 2020). M-CSF wird primär von mesenchymalen Stromazellen, Osteoblasten und Osteozyten exprimiert und bindet an seinen korrespondierenden membrangebundenen Tyrosinkinase-Rezeptor c-FMS, welcher sich aus einer extrazellulären, transmembranären und zytoplasmatischen Tyrosinkinasedomäne zusammensetzt (Hamilton, 2008). Die zytoplasmatische Domäne beinhaltet verschiedene Tyrosinreste, über die nachgeschaltete Signalwege aktiviert werden können. Durch die spezifische Ligand-Rezeptorbindung kommt es durch die Phosphorylierung des Tyrosinrests Y559 und Y721 über PI3K zur Aktivierung des Akt-Signalwegs. Die Phosphorylierung von Y-697 und Y974 führt zur Rekrutierung von Grb2, wodurch über die Signalkaskaden Ras/Raf/MEK der ERK-Signalweg aktiviert wird. Durch die Aktivierung von ERK und Akt wird die Proliferation der Osteoklasten-Vorläuferzellen angeregt und die Überlebensrate der Zellen gefördert (Feng und Teitelbaum, 2013). Mutationen in dem für M-CSF codierenden Gen *Csf1* führten in Tierexperimenten zu einer unzureichenden Osteoklasten-Differenzierung und damit einhergehenden Osteopetrose, was die essenzielle Funktion des Zytokins im Rahmen des Knochenstoffwechsels verdeutlicht (Wiktor-Jedrzejczak et al., 1990). Darüber hinaus konnten wichtige Effekte von M-CSF auf reife Osteoklastenzellen beschrieben werden, indem die Apoptose-Rate der Zellen gesenkt und die Überlebensrate gesteigert wird (Fuller et al., 1993) (Abb. 5a).

Der Osteoklasten-Differenzierungsfaktor RANKL zählt zur Familie der Tumornekrosefaktoren und spielt nicht nur im Rahmen des natürlichen Knochenstoffwechsels, sondern auch während der orthodontischen Zahnbewegung eine übergeordnete Rolle. Hierbei konnte eine verstärkte Expression des Zytokins durch Osteoblasten, Osteozyten, PDL-Fibroblasten sowie aktivierte T-Zellen auf der Kompressionsseite des PDLs nachgewiesen werden (Nakai et al., 2003).

RANKL bindet an seinen korrespondierenden Transmembranrezeptor RANK, welcher von Osteoklasten-Vorläuferzellen sowie von reifen Osteoklasten exprimiert wird. Die Aktivierung des Rezeptors bewirkt eine Interaktion mit verschiedenen Adapterproteinen – so genannten TRAFs (TNF-receptor associated factors) – über funktionelle TRAF-Bindungsstellen (Motif 1-3), wodurch wichtige Signalwege, wie NF- κ B, p38, ERK, JNK, Akt und NFATc1, in Osteoklasten-Vorläuferzellen initiiert werden. Primär vermittelt durch Motif 1, welches mit TRAF6 einen Signalkomplex bildet, führt die

RANKL-RANK-Interaktion zu einer Aktivierung des Akt-, NF- κ B-, JNK-, p38-, ERK- und NFATc1-Signalweges. Weiterhin bewirkt die Bindung von TRAF3, TRAF2 bzw. TRAF5 an Motif 2 und Motif 3 eine Aktivierung des NF- κ B und p38-Signalwegs. Die Aktivierung der verschiedenen Signalwege fördert die Reifung der Osteoklasten-Vorläuferzellen zu TRAP-positiven mononukleären Osteoklasten, die anschließend zu mehrkernigen Riesenzellen fusionieren, die die reifen Osteoklasten darstellen (Boyle et al., 2003; Feng und Teitelbaum, 2013; Kim et al., 2020; Kodama und Kaito, 2020). Weiterhin fördert die über Motif 1 vermittelte Aktivierung des NF- κ B, ERK und Akt-Signalweges die Überlebensrate von Osteoklasten (Abb. 5b).

Ein in diesem Kontext wichtiges Regulatormolekül ist Osteoprotegerin (OPG), welches einen löslichen RANKL-Rezeptor darstellt und die Funktion eines Decoy-Rezeptors („Köder-Rezeptors“) erfüllt. Durch die Bindung von RANKL an OPG stehen dem funktionalen RANK-Rezeptor weniger Liganden zur Verfügung, wodurch die Aktivierungsrate von Osteoklasten gesenkt wird. Im Rahmen dieser kompetitiven Inhibi-

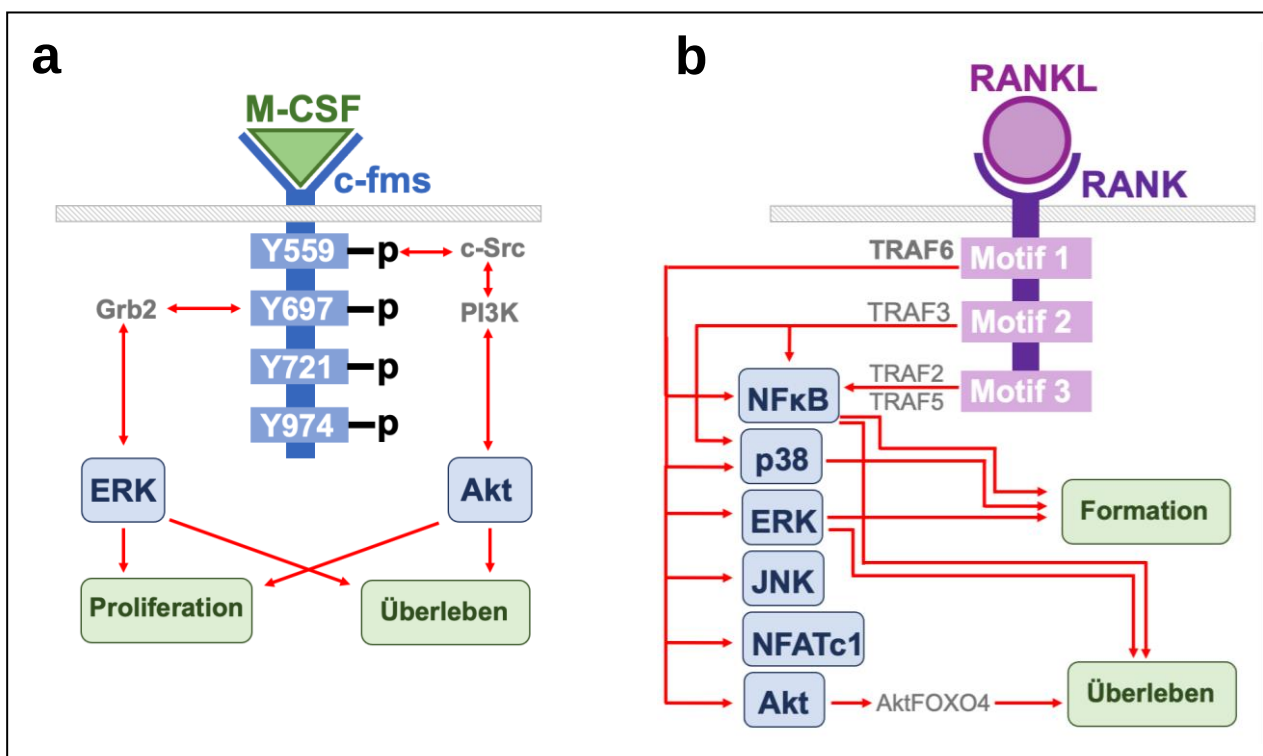


Abb. 5: Wichtige M-CSF (a) und RANKL-Signalwege (b) während der Osteoklastogenese (modifiziert nach Feng und Teitelbaum, 2013)

tion kommt es zu einer negativen Regulation der Knochenresorption (Hofbauer und Heufelder, 2001).

1.2.2 Osteoklasten-Matrix-Interaktion

Die extrazelluläre Matrix (EZM) des Knochens wird durch Osteoblasten gebildet und setzt sich aus einer anorganischen Komponente – hauptsächlich kristallinem Hydroxylapatit – und einer organischen Komponente aus Kollagen und nicht-kollagenen Proteinen zusammen (Boskey und Posner, 1984). Neben der Gewährleistung mechanischer, physikalischer und chemischer Eigenschaften des Knochens zeigt die EZM eine wichtige Interaktion mit Osteoblasten, Osteoklasten und Osteozyten, wobei sie die Aktivität dieser Zellen und somit den Knochenstoffwechsel beeinflussen kann (Licini et al., 2019; Marie, 2009).

Die Zell-Matrix-Interaktion zwischen der Knochenmatrix und Osteoklasten wird primär durch Integrin-Rezeptoren – insbesondere $\alpha_v\beta_3$ – gesteuert. Hierbei handelt es sich um einen heterodimeren Transmembranrezeptor, bestehend aus einer α - und β -Untereinheit, der über eine extrazelluläre, transmembranäre und zytoplasmatische Domäne verfügt (Horton et al., 2003) (Abb. 6). Die spezifische Rezeptorbindung bewirkt die Aktivierung eines kanonischen Signalwegs, der die Polarisation der Osteoklastenzelle bedingt. Die Liganden des $\alpha_v\beta_3$ -Rezeptors stellen die nicht-kollagenen SIBLING (Small integrin-binding ligand N-linked glycoprotein)-Proteine der organischen Knochenmatrix dar, die die gemeinsame Aminosäuresequenz Arg-Gly-Asp (RGD-Sequenz) aufweisen. Hierzu gehören die nicht-kollagenen Matrixproteine Osteopontin, Dentin Sialoprotein und Bone Sialoprotein. Das Schlüsselmolekül des nachfolgenden Signalwegs ist die Tyrosinkinase c-Src, die an die β_3 -Untereinheit des Integrin-Rezeptors gekoppelt ist. Die Bindung der RGD-Sequenz von SIBLING-Proteinen an die extrazelluläre Domäne der β_3 -Untereinheit führt zu einer Aktivierung von c-Src, wodurch die Phosphorylierung von Syk – einer weiteren Tyrosinkinase, die zum β_3 /c-Src-Komplex rekrutiert wird – erfolgt. Nachfolgend kommt es zur Rekrutierung des zytosolischen Adapterproteins Slp76, welches einen aktiven Komplex mit dem Guaninnukleotidaustauschfaktor Vav3 bildet. Vav3 vermittelt den Austausch von Guanindiphosphat (GDP) gegen Guanintriphosphat (GTP), wodurch monomere Rho-GTPasen, wie Rac, aktiviert werden. Die ausgelöste Signalkaskade bewirkt eine Umstrukturierung des Zytoskeletts (Abb. 6). Dabei bildet das

F-Aktin, welches ein essenzielles Strukturprotein des Zytoskeletts darstellt, ringförmige Aktin-Strukturen, durch die eine feste Adhäsion der Osteoklastenzelle an die Hartgewebematrix und eine Abdichtung der Resorptionszone zum Extrazellulärraum gewährleistet wird (Sealing zone). Des Weiteren kommt es zu einer Aktivierung des membranständigen SNARE (Soluble N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein attachment protein receptors)-Komplexes, wodurch zytosolische Vesikel mit der knochen zugewandten Membrandomäne fusionieren und somit die Entstehung der Ruffled border hervorrufen (Feng und Teitelbaum, 2013; Zou und Teitelbaum, 2010).

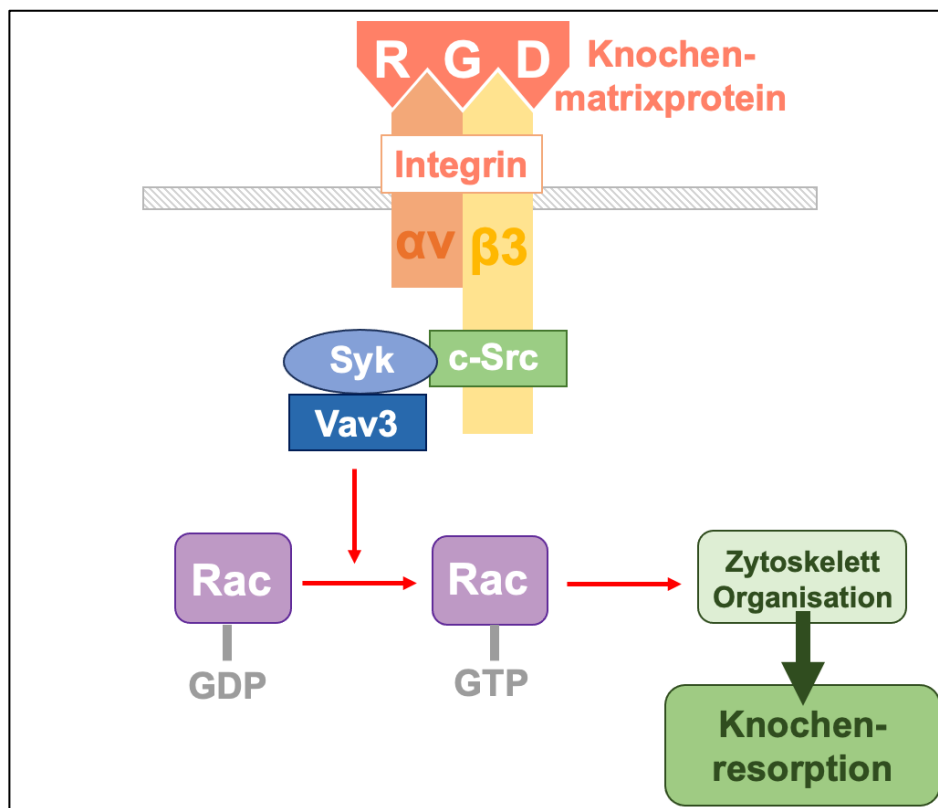


Abb. 6: Modell des Integrin $\alpha_v\beta_3$ -vermittelten Signalwegs in Osteoklasten (modifiziert nach Feng und Teitelbaum, 2013)

Die essenzielle Funktion des Integrin-Rezeptors $\alpha_v\beta_3$, der die Wechselwirkung zwischen der EZM und Osteoklasten vermittelt, konnte in Rahmen zahlreicher Studien beleuchtet werden: Mc Hugh et al. zeigten, dass das Fehlen der β_3 -Untereinheit des Integrin-Rezeptors zu einer fehlerhaften Ausbildung der Ruffled border führte und eine Hypokalzämie und Osteosklerose bei Versuchstieren auslöste, die auf eine mangelhafte

Osteoklastenfunktion zurückzuführen waren (McHugh et al., 2000). Auch Teitelbaum et al. konnten durch eine Blockade des Integrinrezeptors $\alpha_v\beta_3$ eine abgeschwächte Osteoklastenfunktion zeigen und stellten dies als möglichen Wirkmechanismus im Rahmen einer Osteoporose-Therapie dar (Teitelbaum, 2000).

Ein weiterer Integrin-Rezeptor, der durch Osteoklasten exprimiert wird und eine wichtige Verknüpfung zur extrazellulären Matrix darstellt, ist $\alpha_2\beta_1$. Durch die spezifische Bindung an Kollagen Typ I wird die Migration und Fusion von Osteoklasten-Vorläuferzellen zu mehrkernigen Osteoklasten gefördert (Rucci und Teti, 2016). Auch der Osteoclast-associated receptor (OSCAR) gewährleistet eine Kopplung zwischen der EZM und Osteoklasten. Dabei handelt es sich um einen Kollagen-Rezeptor, der in Osteoklasten und speziell Osteoklasten-Vorläuferzellen während späteren Phasen der Osteoklastogenese durch RANKL-Stimulation exprimiert wird. Durch Bindung an spezifische Motive in fibrillären Kollagenen der Knochenmatrix entfaltet OSCAR durch Aktivierung des Transkriptionsfaktors NFATc1 kostimulatorische Effekte auf die Osteoklastogenese (Barrow et al., 2011).

1.3 Orthodontisch-induzierte externe apikale Wurzelresorptionen

Während die Osteoklasten-vermittelte Resorption des Alveolarknochens eine wichtige Voraussetzung der orthodontischen Zahnbewegung darstellt, gelten externe apikale Wurzelresorptionen (EAWR) als schwerwiegende Komplikation einer kieferorthopädischen Therapie, die mit einem irreversiblen Verlust der radikulären Zahnhartgewebe Zement und Dentin einhergehen (Sameshima und Iglesias-Linares, 2021; Yassir et al., 2021). Aus histologischen Untersuchungen geht hervor, dass nahezu 80 bis 90 % aller kieferorthopädisch bewegten Zähne EAWR aufweisen (Harry und Sims, 1982; Motokawa et al., 2012; Stenvik und Mjör, 1979). Dabei handelt es sich jedoch hauptsächlich um minimale und klinisch insignifikante Resorptionserscheinungen, welche einem natürlichen durch Zementoblasten gesteuerten Reparaturmechanismus unterliegen (Feller et al., 2016). Schwerwiegende Substanzdefekte, die über ein Drittel der ursprünglichen Wurzellänge betreffen, können bei 1 bis 5 % aller orthodontisch bewegten Zähne beobachtet werden (Weltman et al., 2010). Am häufigsten betroffen sind maxilläre Inzisiven und Zähne mit graziler (z.B. pipettenförmiger) Wurzelform (Sameshima und Sinclair, 2001).

Je nach Ausmaß des Defektes können EAWR in unterschiedliche Schweregrade eingeteilt werden (Brezniak und Wasserstein, 2002):

1. **Oberflächliche Zementresorption** mit vollständiger Reparatur durch Zementoblasten. Dieser Prozess ähnelt der physiologischen Knochenremodellation und ist klinisch unbedeutend.
2. **Tiefe Resorption** mit zusätzlicher Dentinbeteiligung. In der Regel erfolgt eine Reparatur des Defekts durch Zement. Die vollständige Wiederherstellung der ursprünglichen Wurzelform ist jedoch ausgeschlossen.
3. **Zirkumferente apikale Wurzelresorption**: Es kommt zur vollständigen Hartgeweberesorption mit röntgenologisch sichtbarer Verkürzung der Zahnwurzel. Eine Wiederherstellung der ursprünglichen Wurzelform durch Zementoblasten ist ausgeschlossen (Brezniak und Wasserstein, 2002).

Die Diagnostik von EAWR ist bislang auf die dentale Radiographie limitiert. Hierfür haben sich besonders Panoramaröntgenaufnahmen in der Kieferorthopädie etabliert, die sich durch eine schnelle und technisch leichte Durchführbarkeit auszeichnen. Da es im Rahmen dieser zweidimensionalen Bildgebung jedoch häufig zu geometrischen Verzerrungen und Überlagerungseffekten kommt und keine Informationen über die räumliche Tiefe gewonnen werden können, ist eine exakte Abbildung der Resorption nicht garantiert. Zudem lassen sich ausschließlich manifeste Defekte und keine initialen Läsionen der Wurzeloberfläche darstellen. Auch kann kein Aufschluss darüber erfolgen, ob es sich um einen ruhenden oder progredienten Prozess handelt. Eine weitere, erhebliche Einschränkung stellt die Strahlenbelastung der Röntgenaufnahmen dar, die die Diagnostik in ihrer Anwendbarkeit limitiert (Mah und Prasad, 2004).

Auf Grund des allgemein asymptomatischen Verlaufs sind festgelegte radiologische Kontrolluntersuchungen während und nach Abschluss einer kieferorthopädischen Therapie unerlässlich (Savoldi et al., 2015) (Abb. 7). Erst bei ausgeprägten EAWR können sich klinische Symptome, wie Zahnschmerzen, Zahnverfärbungen sowie eine erhöhte Zahnbeweglichkeit manifestieren (Heboyan et al., 2022). In solchen Fällen ist ein langfristiger Zahnerhalt stark gefährdet (Patel et al., 2010).

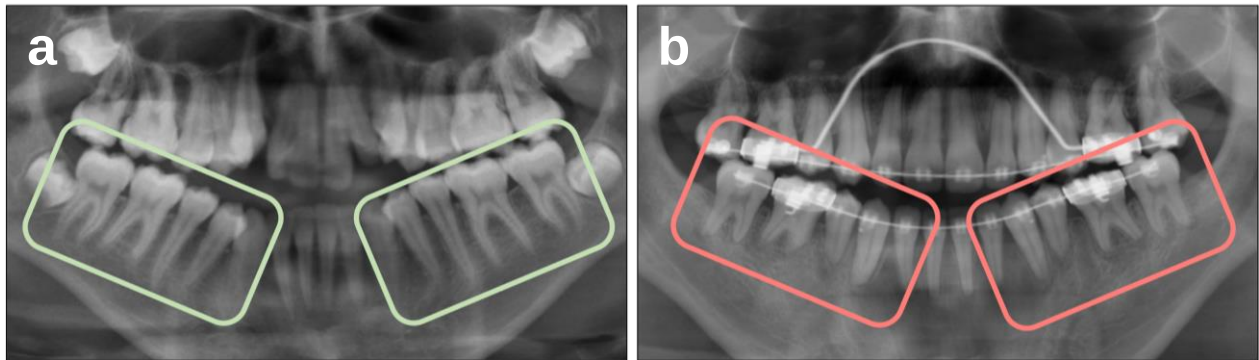


Abb. 7: Kieferorthopädisch induzierte EAWR an einem Fallbeispiel. **a** Panoramaröntgenaufnahme vor Beginn der kieferorthopädischen Therapie. Die Prämolaren und Molaren des Unterkiefers zeigen eine physiologische Wurzellänge (grüne Kästen); **b** Panoramaröntgenaufnahme des selben Patienten während festsitzender kieferorthopädischer Therapie. Zu erkennen sind deutliche EAWR, besonders an den Zähnen 33-37 und 43-47 (rote Kästen). (Eigene Grafik)

Die genaue Ätiologie von EAWR ist bis heute nicht hinreichend geklärt. Der zugrundeliegende Mechanismus basiert auf einem komplexen multikausalen Geschehen bestehend aus patientenspezifischen sowie iatrogenen Faktoren (Tab. 1) (Yassir et al., 2021). Am häufigsten beschrieben werden durch den Behandler applizierte exzessive Kräfte, die auf den Zahn wirken und eine Überkompression des parodontalen Faserapparates hervorrufen (Gonzales et al., 2008). Neue Untersuchungen konnten hingegen zeigen, dass EAWR auch im Rahmen von geringfügigen orthodontischen Kräften auftreten können und vielmehr durch patientenspezifische Faktoren beeinflusst werden (Behnaz et al., 2020). Der heutige Forschungsschwerpunkt fokussiert sich besonders auf die Erkennung möglicher genetischer Faktoren, wie Polymorphismen, die das individuelle Risiko bezüglich EAWR bestimmen (Pinheiro et al., 2024).

Tab. 1: Übersicht über mögliche patienten- und therapiebezogene Risikofaktoren für EAWR

patientenbezogene Risikofaktoren	therapiebezogene Risikofaktoren
Ethnie (v.a. lateinamerikanische Herkunft) * ¹	Intensität Kraft * ⁷
gen. Polymorphismen (z.B. IL-1 β -, COX-2-Polymorphismus) * ²	Kontinuität der Krafteinwirkung (v.a. kontinuierlich wirkende Kraft) * ⁸
systemische Erkrankungen (z.B. Asthma bronchiale) * ³	Art der Zahnbewegung (v.a. Intrusionsbewegungen) * ⁹
traumatisch sowie bakteriell bedingte parodontale Vorschäden * ^{4,5}	Strecke der Zahnbewegung (v.a. Lückenschluss bei Extraktionstherapie) * ¹⁰
Morphologie der Zahnwurzel (v.a. lange, pipettenförmige Wurzeln) * ¹	Gesamtdauer der kieferorthopädischen Therapie * ¹¹
Beschaffenheit des Alveolarknochens * ⁶	

*¹(Sameshima und Sinclair, 2001), *²(Pinheiro et al., 2024), *³(McNab et al., 1999), *⁴(Malmgren et al., 1982), *⁵(Wehrbein et al., 1990), *⁶(Iglesias-Linares et al., 2016), *⁷(Gonzales et al., 2008), *⁸(Ozkalayci et al., 2018), *⁹ (Han et al., 2005), *¹⁰(Peker und Meriç, 2024), *¹¹(Jiang et al., 2010)

1.3.1 Molekulare Mechanismen externer apikaler Wurzelresorptionen

Im Rahmen von histologischen Studien konnten initiale Resorptionsläsionen der Zahnwurzel in unmittelbarer Umgebung von hyalinen Zonen lokalisiert werden, die durch mechanische Überkompression des PDL entstanden sind (Abb. 8). Ursächlich sind vermutlich Zellen, die in die hyalinen Zonen einwandern und für die Elimination des nekrotischen Materials zuständig sind. Dabei kommt es zunächst zur Migration von Makrophagen, die neben dem Zelldetritus vermutlich auch Bereiche des Zementoids resorbieren, welches eine äußere organische Schutzmatrix der Zahnwurzel darstellt (Abass und Hartsfield, 2007; Jäger et al., 1993). Im weiteren Verlauf werden einwandernde TRAP-positive Osteoklasten-ähnliche Zellen beschrieben, die an der denudierten Zahnwurzel anhaften und die Resorption der mineralisierten Wurzelgewebe einleiten. Eine protektive Rolle hierbei spielen Zementoblasten, welche die entstehenden Oberflächendefekte durch Absonderung von Reparaturzement auffüllen und somit einer fortschreitenden Resorption in tiefere Wurzelschichten entgegenwirken. Sobald die Reparaturkapazität der Zementoblasten jedoch überschritten wird, kann der irreversible Abbau der Wurzelhartgewebe nicht mehr aufgehalten werden (Inubushi et al., 2013; Jäger et al., 2008).

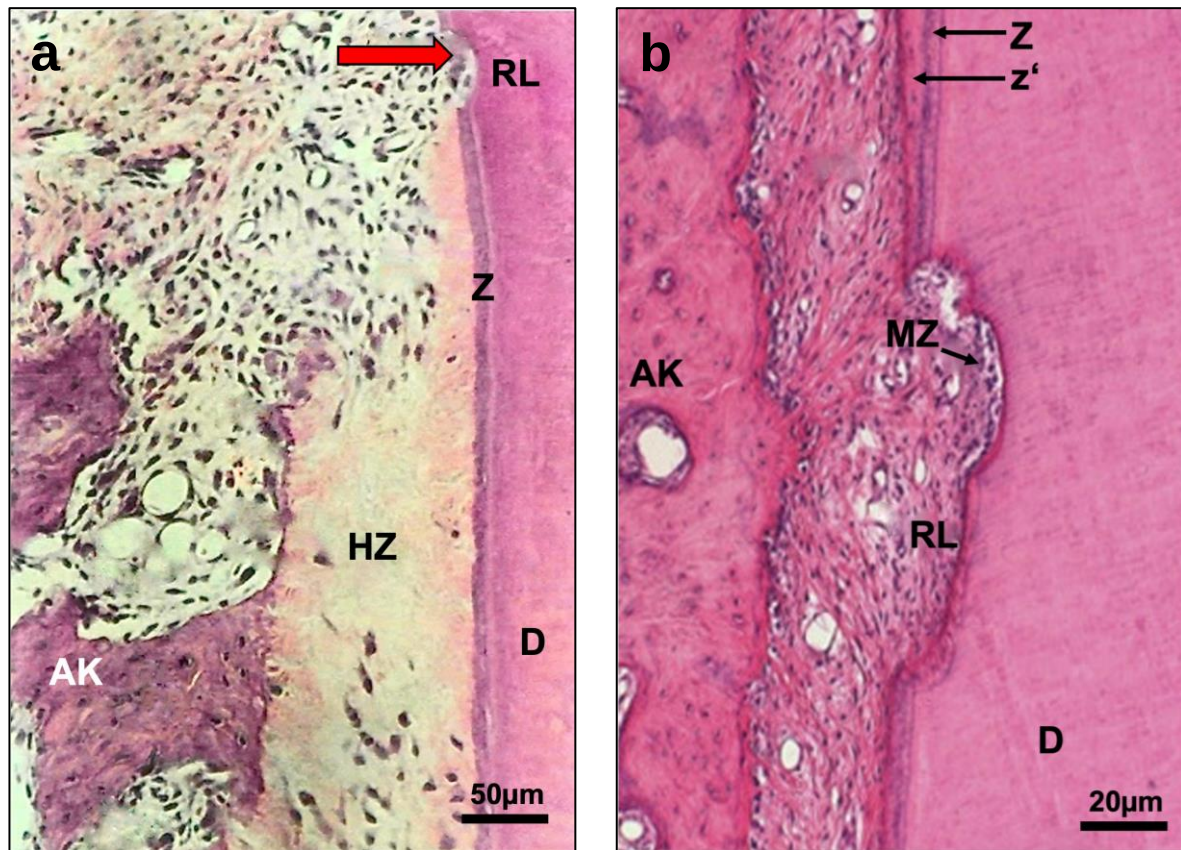


Abb. 8: Histologische Darstellung von EAWR nach orthodontischer Krafteinwirkung (modifiziert nach Brudvik und Rygh, 1994b; Maltha et al., 2015). **a** Zu erkennen ist die glasartig erscheinende Hyaline Zone (HZ) angrenzend an den Alveolarknochen (AK) und die Zementschicht (Z), die das Dentin (D) des Zahnes umgibt. Im Zuge des Remodelings können vereinzelt auftretende Resorptionslakunen (RL) in Assoziation mit Osteoklasten-ähnlichen multinukleären Zellen entlang der Zahnwurzel identifiziert werden (roter Pfeil). **b** Vergrößerte Darstellung einer Resorptionslakune (RL) in der Wurzeloberfläche. Nach Entfernung des organischen Zementoids (z') und der mineralisierten Zementschicht (Z) dringen die multinukleären Osteoklasten-ähnlichen Zellen (MZ) in tiefer gelegene Dentinbereiche vor und hinterlassen charakteristische Resorptionslakunen, die anschließend durch Reparaturzement aufgefüllt werden können (Brudvik und Rygh, 1994b; Maltha et al., 2015).

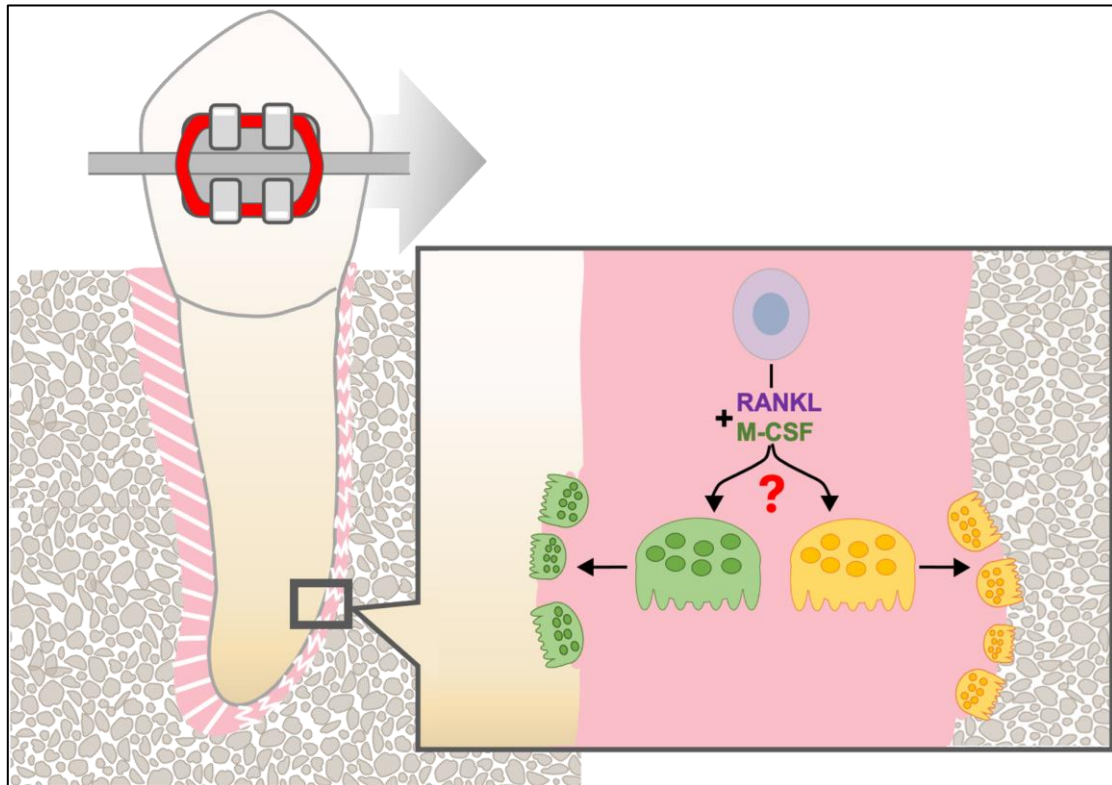


Abb. 9: Vereinfachtes Modell der Osteoklasto- bzw. Odontoklastogenese während orthodontischer Kraftapplikation. Osteoklasten und Odontoklasten gehen vermutlich aus gemeinsamen hämatopoetischen Vorläuferzellen hervor. Durch den Einfluss von verschiedenen Stimulantien, wie RANKL und M-CSF, erfolgt die Maturation zu reifen Osteoklasten- bzw. Odontoklastenzellen, die Knochen- bzw. Zahnhartgewebe resorbieren. Bislang ist ungeklärt, welche genauen Faktoren den spezifischen Differenzierungsweg der Vorläuferzellen vorgeben. (Eigene Grafik)

Die Osteoklasten-ähnlichen Zellen, die die Hauptakteure bei EAWR darstellen, werden in der Literatur auch als Odontoklasten bzw. Dentinoklasten und Zementoklasten bezeichnet und zeigen charakteristische Osteoklasten-spezifische Merkmale: Es handelt sich ebenfalls um mehrkernige, TRAP-positive Zellen, die im aktivierten Zustand Osteoklasten-spezifische Membrandomänen, wie die Ruffled border und Sealing zone ausbilden. Die Spaltung von organischer sowie anorganischer Zahnhartgewebematrix wird gleichermaßen durch die Freisetzung von Protonen und proteolytischen Enzymen, wie TRAP und Cathepsin K (CTSK), innerhalb einer Resorptionslakune erzielt (Feller et al., 2016; Oshiro et al., 2001). Auch der RANKL/RANK/OPG-Signalweg spielt eine bedeutsame Rolle bei der Regulation der Aktivität dieser Zellen (Aidos et al., 2018; Terpos

et al., 2003). Auf Grund ihrer morphologischen sowie funktionellen Ähnlichkeiten mit Osteoklasten geht man davon aus, dass diese vermutlich aus identischen hämatopoetischen Vorläuferzellen hervorgehen und sich im Laufe ihrer Differenzierung auf die Resorption eines konkreten Hartgewebes, wie Knochen, Zement oder Dentin, spezialisieren (Abass und Hartsfield, 2007; Feller et al., 2016; Wang und McCauley, 2011). Die genauen Faktoren, die die Transformation der Vorläuferzellen zu den differenzierten Klastenzellen vorgeben, sind bislang jedoch nicht bekannt (Abb. 9).

1.4 Zielsetzung

Mit der Kenntnis, dass die Knochenmatrix intensiv mit Osteoklasten interagiert und dabei einen erheblichen Einfluss auf die Differenzierung und Aktivität der Zellen darstellt (Kleinhans et al., 2015; Purdue et al., 2014) lässt sich die Hypothese aufstellen, dass die verschiedenen Hartgewebesubstrate Knochen, Zement und Dentin den Differenzierungsweg der spezifischen Osteoklasten-ähnlichen Zellen möglicherweise beeinflussen. Zur Klärung dieser Fragestellung wurden in der vorliegenden Studie Vorläuferzellen einer murinen Osteoklasten-ähnlichen Zelllinie auf den unterschiedlichen oralen Hartgeweben Knochen, Dentin bzw. Zement stimuliert und dessen Differenzierung anhand individueller Genexpressionsprofile verglichen. Hierbei konnte Ibrahim bereits einen Überblick über die genomweite Expression der verschiedenen Kulturen verschaffen (Ibrahim, 2020). Auf Grundlage seiner erhobenen Sequenzierungsdaten wurden interessant regulierte Moleküle (HSPA1b, GDF15, CXCL2, IGF-1, ACP-5, CTSK, OSCAR) ausgewählt, dessen Expression auf Gen- und Proteinebene mittels RT-PCR und ELISA-Tests näher untersucht werden sollten.

Die Identifizierung der vorliegenden Zielgene soll eine nützliche Grundlage für die Aufklärung der molekularen Mechanismen von EAWR bieten und zukünftig zu einer Etablierung neuer diagnostischer Verfahren zur frühzeitigen Erkennung von EAWR beitragen.

2. Material und Methoden

2.1 Herstellung der Hartgewebepulver

Die Studie orientierte sich an den ethischen Richtlinien der revidierten Deklaration von Helsinki des Weltärztebundes (1983) sowie den entsprechenden gesetzlichen Grundlagen und wurde vorab durch die zuständige Ethikkommission geprüft und genehmigt (# 458/22). Nach mündlicher sowie schriftlicher Aufklärung und Einwilligung der Patienten wurden humanes Knochen- und Zahnhartgewebe (Dentin und Wurzelzement) gesammelt, die als Wachstumsmatrix für die Mausmakrophagen-Kulturen dienen sollten. Da aus ethischen Aspekten nicht genügend Hartgewebematerial eines einzigen Spenders zur Verfügung stand, wurden die Hartgewebesubstrate unterschiedlicher Spender vermengt eingesetzt.

Als Knochenmaterial wurde humaner Beckenkammknochen (Spongiosa und Kortikalis) ausgewählt, welcher in der Abteilung für Mund-Kiefer- und Gesichtschirurgie im Rahmen von Zysten-Augmentationen bzw. plastischen Kieferrekonstruktionen als autologes Transplantationsgewebe eingesetzt wird. Hierbei kam ausschließlich überschüssiger Transplantatknochen zum Einsatz, welcher nach erfolgtem Eingriff in der Regel entsorgt wird. Die Zahnhartgewebe Dentin und Wurzelzement wurden von Zähnen gewonnen, die aus medizinischer Indikation extrahiert wurden. Auf Grund einer potenziellen bakteriellen Kontamination der Wurzelhartgewebe wurden parodontal geschädigte Zähne ausgeschlossen.

Die Proben wurden nach folgendem Protokoll behandelt:

1. grobe Entfernung des Weichgewebes von der Wurzel- und Kortikalisoberfläche mit Hilfe eines chirurgischen Skalpells
2. Lagerung des Knochens bzw. der Zähne für mindestens 24 h in 0,5 % Natriumhypochlorit (NaOCl) (Karl Roth, #0078.1, Karlsruhe, Deutschland) zur Keimreduktion und Entfernung des restlichen Weichgewebes
3. Lagerung für 1 min in 0,1 % Chlorhexidin (CHX) (Sigma Aldrich, #PHR1294, St. Louis, USA) für zusätzliche antiseptische Wirkung

4. Waschung mit Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS) (Sigma Aldrich, # P3813, St. Louis, USA)
5. Lufttrocknung für 24 h

Die Beckenkammpongiosa wurde anschließend mit Hilfe eines chirurgischen Skalpells und die Kortikalis mit Hilfe einer chirurgischen Hartmetallfräse (Komet Dental, # H162ST, Lemgo, Deutschland) in Pulverform zerkleinert. Zur Gewinnung von pulverisiertem Zement wurde das apikale Drittel der Zahnwurzel mit einer identischen chirurgischen Hartmetallfräse zirkumferent präpariert. Nach Entfernung der zervikalen Zementschicht wurde mit einer chirurgischen Hartmetallfräse Dentinpulver erzeugt (Abb. 10). Um im Rahmen des Fräsvorgangs große Hitzeeinwirkung und dadurch eine mögliche Protein-Denaturierung zu vermeiden, erfolgte die Hartgewebepreparation auf gekühlten Glasplatten.

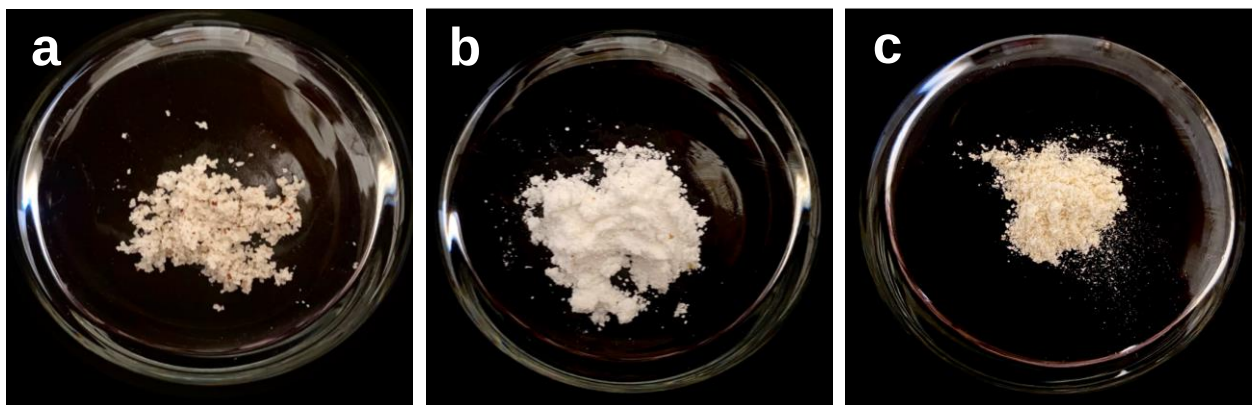


Abb. 10: Hergestellte Hartgewebepulver. **a** Knochenpulver; **b** Dentinpulver; **c** Zementpulver (Eigene Grafik)

2.2 Darstellung der Hartgewebepulver mittels Rasterelektronenmikroskopie

Nach Herstellung der Hartgewebepulver wurden diese elektronenmikroskopisch untersucht, um die Partikelgröße zu vergleichen. Hierfür wurden die Proben zunächst auf einem leitfähigen Kohlepad angebracht und auf dem Probenteller positioniert (Abb. 11 a, b). Im Rahmen eines Sputter-Coating-Verfahrens wurde anschließend eine feine Gold-Palladium-Schicht auf die Proben abgeschieden, um eine elektrische Leitfähigkeit des anorganischen Materials herzustellen. Nach kurzer Abkühlung wurde der

Vorgang zwei Mal wiederholt. Die Probenkammer des Rasterelektronenmikroskops (REM XL-30 Field Emission ESEM, FEI/Philips, Amsterdam, Niederlande) wurde belüftet, um die Probenträger auf dem Probentisch zu montieren. Anschließend wurde in der Probenkammer mit Hilfe einer Vakuumpumpe ein Vakuum von 10^{-5} mbar erzeugt (Abb. 11 c). Das nachfolgende Erhitzen der Wolfram-Glühkathode führte zur Emission von Elektronen, die in einem Elektronenstrahl gebündelt und durch Anlegen einer Spannung mit hoher Geschwindigkeit auf die Proben auftrafen. Durch den Everhart-Thornley-Detektor wurden die freigesetzten Sekundärelektronen registriert und in Form von hochauflösenden dreidimensionalen Bildern dargestellt (Abb. 12).

Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen zeigten, dass die durchschnittliche Partikelgröße des gewonnenen Zement- und Dentinpulvers 400 bis 800 μm betrug. Die durchschnittliche Größe der Knochenpartikel reichte von 500 bis 1.100 μm . Die Knochenpartikel kennzeichneten sich durch eine größere Oberflächenrauigkeit als die Zement- und Dentinpartikel (Abb. 12).

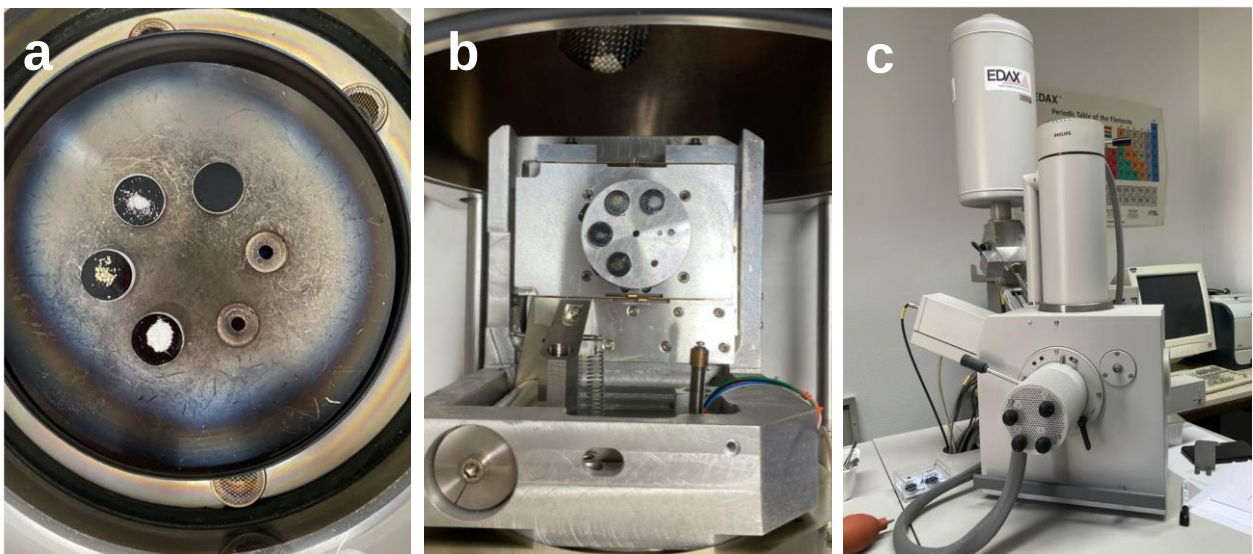


Abb. 11: Rasterelektronenmikroskop. **a** verschiedene Hartgewebeproben auf kohlebeschichteten Objektträgern; **b** Objektträger auf Probentisch des REM montiert; **c** Rasterelektronenmikroskop, bestehend aus Vakuumeinheit, Probenkammer und Elektronenquelle (Eigene Grafik)

2.3 Zellkultivierung und -stimulation

Die Zellkulturarbeiten erfolgten an einer sterilen Sicherheitswerkbank. Alle eingesetzten Materialien und Geräte wurden zuvor desinfiziert, sterilisiert bzw. autoklaviert.

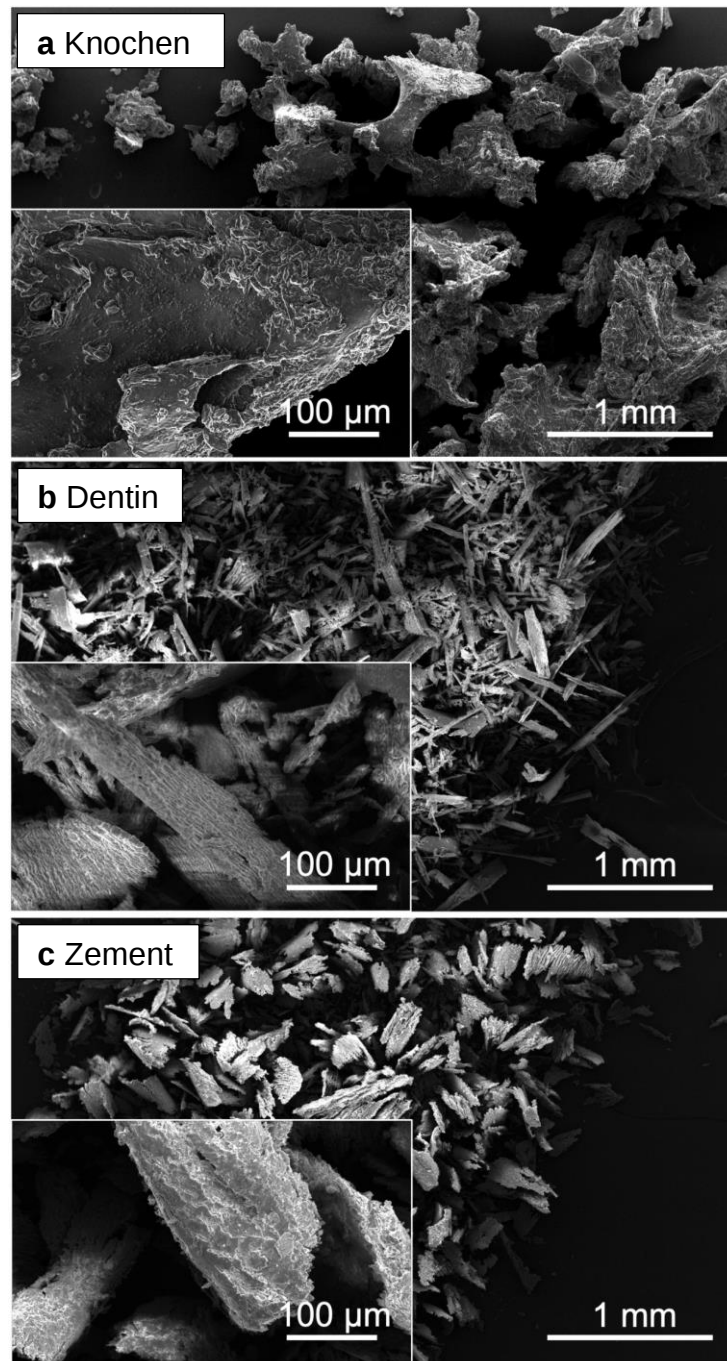


Abb. 12: Darstellung der Hartgewebepulver mittels Rasterelektronenmikroskopie in 25-facher und 250-facher Vergrößerung. **a** Knochen; **b** Dentin; **c** Zement (modifiziert nach Both et al., 2025)

Das vorliegende Experiment umfasste insgesamt fünf Versuchsgruppen (Abb. 13). Für jede Versuchsgruppe wurde eine 6-Well-Zellkulturplatte (sechs biologische Replikate) verwendet. In drei Versuchsgruppen wurden Vorläuferzellen der murinen Makrophagen-Zelllinie auf den verschiedenen Hartgewebesubstraten Knochen, Dentin bzw. Zement kultiviert und zur Differenzierung stimuliert. Hierfür wurden vorab 0,01 g des zuvor hergestellten Zement-, Knochen- bzw. Dentinpulvers in jedes Well gegeben und die Platten anschließend für 1 h unter UV-Licht sterilisiert. Zwei weitere Versuchsgruppen dienten als Stimulations- und Negativkontrolle. Hierbei wurden die Zellen lediglich auf Kunststoff (Polystyrol) ohne Hartgewebesubstrat mit bzw. ohne Stimulation kultiviert.

Nach Vorbereitung der Zellkulturplatten erfolgte die Aussäung der Mausmakrophagen-Zellen (American Type Culture Collection, #TIB-71, Manassas, USA) in einer Konzentration von 3×10^4 Zellen/Well. Als Nährmedium wurden 2 mL Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Thermo fisher scientific, #11965092, Waltham, USA) mit einem Zusatz von 10 % fetalem Kälberserum (FBS) (Sigma Aldrich, #F7524, St. Louis, USA), 1 % Penicillin/ Streptomycin, Plasmocin (Thermo fisher scientific, #15140122, Waltham, USA) und Vitamin C (Karl Roth, #3525.1, Karlsruhe, Deutschland) pro Well verwendet.

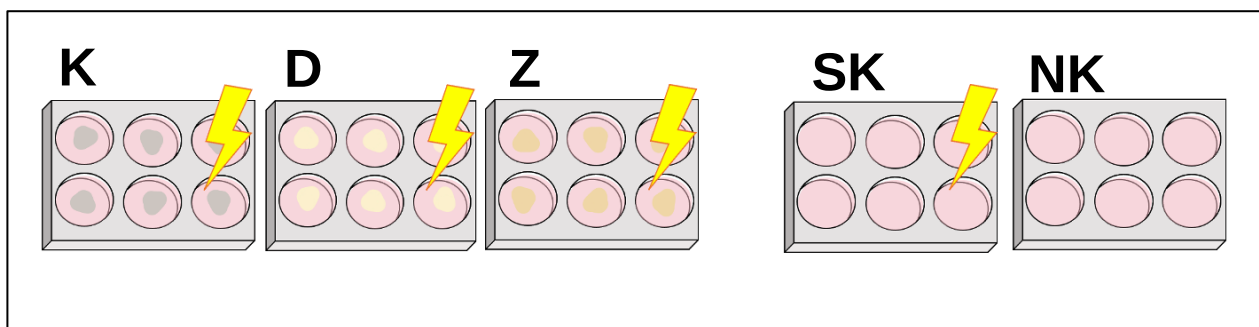


Abb. 13: Darstellung der Versuchsgruppen. Stimulation der Mausmakrophagen auf Knochen- (K), Dentin- (D) bzw. Zementpulver (Z); Stimulation der Mausmakrophagen ohne Hartgewebesubstrat (SK); Kultivierung der Mausmakrophagen ohne Stimulation und Hartgewebesubstrat (NK). Jeder Versuchsdurchgang umfasste sechs biologische Replikate. (Eigene Grafik)

Die fünf Proben wurden zunächst bei 37 °C, 5 % CO₂ und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 97 % inkubiert. Nach 2 d erfolgte die Stimulation der Hartgewebegruppen und Stimulationskontrolle mit 30 ng/mL RANKL (Enzo, # ALX-522-131-C010, Farmingdale,

NY, USA) und 20 ng/mL M-CSF (R&D Systems, # 416-ML, Minneapolis, MN, USA) pro Well. Alle 72 h wurde ein Mediumwechsel durchgeführt und die Zellkulturen lichtmikroskopisch untersucht (Abb. 14).

2.4 Zellernte

Die Zellernte erfolgte nach 12-tägiger Stimulation. Zunächst wurden die Zellüberstände der einzelnen Wells abpipettiert und in 2 mL-Tubes bei -80 °C für den späteren Proteinnachweis aufbewahrt. Um restliche Medium-Überstände zu entfernen, wurde jedes Well mit 1 mL Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS) (Sigma Aldrich, # P3813, St. Louis, USA) gespült. Anschließend erfolgte die Zellyse durch die Zugabe von 350 µL Buffer RLT (RNeasy lysis buffer, QIAGEN, Hilden, Germany) und β -ME (β -Mercaptoethanol) (Sigma Aldrich, #M6250, St. Louis, USA) pro Well. Um einen vorzeitigen Abbau der RNA zu verhindern, wurde der Vorgang auf Eis durchgeführt. Nach zehnmalem Schwenken der Platten wurde das Lysat abpipettiert und in 1,5 mL-Tubes bei -80 °C gelagert.

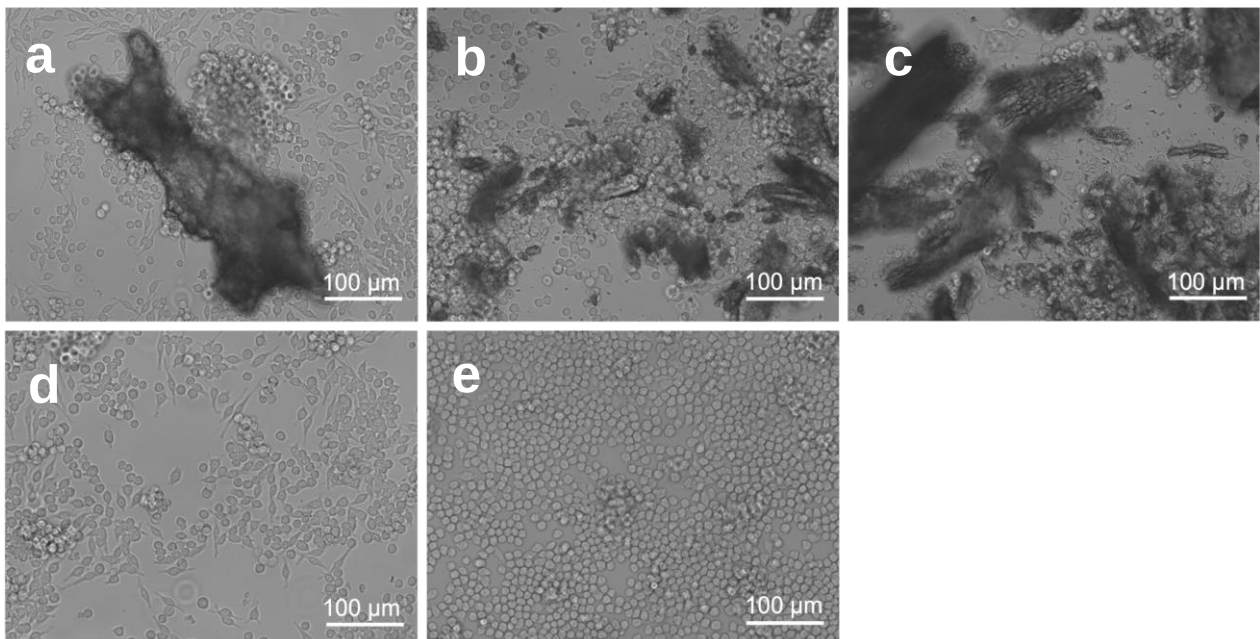


Abb. 14: Makrophagenkulturen auf unterschiedlichen Substraten nach 12-tägiger Stimulation. **a** Knochen; **b** Dentin; **c** Zement; **d** Polystyrol (Stimulationskontrolle); **e** Polystyrol (Negativkontrolle). Aufgenommen mit ZOE Fluorescent Cell Imager (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA). (Eigene Grafik)

2.5 RNA-Isolation

Die Isolation der Gesamt-RNA erfolgte mit Hilfe des RNeasy Mini Kit (QIAGEN, #74106, Hilden, Deutschland).

Zuvor wurden 350 µL Zellsuspension der drei Hartgewebegruppen auf QIAshredder-Säulen (QIAGEN, #79656, Hilden, Deutschland) pipettiert und bei 16.100 x g für 2 min zentrifugiert, um die Zellen von den Hartgeweben zu trennen.

Die RNA-Isolation erfolgte nach folgendem Protokoll (Quelle: RNeasy Mini Handbook 04/2023, QIAGEN, Hilden; Deutschland):

1. Zu 350 µL Zelllysate aller Versuchsgruppen 350 µL 70 %-iges Ethanol zugeben, durch vorsichtiges Pipettieren homogenisieren und auf die RNeasy-Säulen pipettieren. Die Säulen anschließend für 15 s bei 8.000 x g zentrifugieren. Den im Auffangtube enthaltenen Durchfluss verwerfen.
2. 700 µL RW1-Buffer auf die Säulen pipettieren und für 15 s bei 8.000 x g zentrifugieren. Durchfluss verwerfen.
3. 500 µL Buffer RPE auf die Säulen pipettieren und für 15 s bei 8.000 x g zentrifugieren. Durchfluss verwerfen.
4. Vorgang wiederholen und für 2 min bei 8.000 x g zentrifugieren. Durchfluss verwerfen.
5. Säulen in neues 1,5 mL-Auffangtube stecken
6. 30 µL RNase-freies H₂O auf die Säulen pipettieren und für 1 min bei 8.000 x g zentrifugieren für RNA-Elution
7. Säulen verwerfen, Auffangtube verschließen und bei -80 °C lagern

Die Konzentrationsbestimmung der extrahierten RNA wurde mit Hilfe des NanoDrop[™] 2000 Spektralphotometers (Thermo fisher scientific, Waltham, USA) bei einer Wellenlänge von 260 nm durchgeführt.

2.6 Synthese von komplementärer DNA (cDNA)

Im Folgenden wurde die einsträngige mRNA in eine wesentlich stabilere, doppelsträngige cDNA umgeschrieben, um anschließende Genexpressionsanalysen durchzuführen.

Hierfür wurde das iSCRIPT Synthesis Kit (Bio Rad Laboratories, #4106228, Hercules, USA) und der PTC-200 Peltier Thermal Cycler verwendet (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA). Die RNA wurde zunächst in PCR-Zentrifugenröhrchen pipettiert. Das jeweilige RNA-Volumen errechnete sich durch die Division von 1.000 ng durch die zuvor gemessene RNA-Konzentration. Nachfolgend erfolgte die Verdünnung der RNA, indem das Tube mit Nuklease-freiem H₂O bis zu einem Gesamtvolumen von 13 µL aufgefüllt wurde. Anschließend wurden 4 µL iScript, 2 µL Oligo-dT-Primer und 1 µL Reverse Transkriptase hinzugegeben. Die insgesamt 30 Röhrchen wurden in den Aussparungen des Heizblockes fixiert und die reverse Transkription nach folgendem Protokoll gestartet:

1. 42 °C, 1h 30 min: Reverse Transkription mit cDNA-Synthese
2. 85 °C, 5 min: Enzyminaktivierung
3. nach Reaktionsabschluss auf 4 °C halten

Die hergestellte cDNA wurde anschließend mit Nuklease-freiem H₂O auf ein Gesamtvolumen von 60 µL aufgefüllt. Die Lagerung der cDNA erfolgte bei 8 °C.

2.7 Quantitative Genexpressionsanalyse mittels RT-PCR

Die Real-Time Quantitative Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) ist eine Nukleinsäure-Amplifikationstechnik, die eine quantitative Analyse von Ziel-DNA ermöglicht. Durch den Einsatz eines Fluoreszenzmarkers kann die Amplifikation während des Laufs gemessen und parallel am Computer dargestellt werden. Somit unterscheidet sich das Verfahren von einer konventionellen PCR, bei der die quantitative Auswertung erst im Anschluss durch Agarose-Gelelektrophorese erfolgen kann.

2.7.1 Fluoreszenzverfahren

Als Reaktionsansatz wurde iQTM SYBR[®] Green supermix (Bio-Rad Laboratories, #1708880, Hercules, USA) verwendet, welches sich aus dem Fluoreszenzfarbstoff Fluoreszin, iTaqTM DNA-Polymerase, desoxyNukleosidTriPhosphate (dNTPs) sowie Puffern zusammensetzt. Während der Fluoreszenzfarbstoff im ungebundenen Zustand nur schwach fluoresziert, kommt es im Zuge der Amplifikation zu einer Einlagerung des Farbstoffes in kleine Furchen der doppelsträngigen DNA, wodurch das Fluoreszenzsignal

proportional zur steigenden dsDNA-Konzentration zunimmt und ein Maximum von 520 nm erreichen kann (Quelle: iQ SYBR Green Supermix, Instruction Manual). Das Fluoreszenzsignal wird über den Verlauf der Zyklen gemessen und in Form einer sigmoidalen Amplifikationskurve am Monitor abgebildet. Hierbei ergeben sich vier charakteristische Phasen (Artika et al., 2022):

1. Basislinienphase: Diese bildet die beginnenden Amplifikationszyklen ab. Hierbei liegt das gemessene Fluoreszenzsignal unterhalb der Detektionsgrenze.
2. Exponentielle Phase: Es kommt zu einer exponentiellen Amplifikation, wodurch das Fluoreszenzsignal exponentiell ansteigt. Hierbei können die zuverlässigsten Aussagen über die Menge der Ausgangs-DNA getroffen werden.
3. Lineare Phase: Da die Menge der Reagenzien (dNTPs, Primer) begrenzt ist, verlangsamt sich die Amplifikation. Der Anstieg des Fluoreszenzsignals ist nicht mehr exponentiell.
4. Plateauphase: Die Amplifikation kommt zum Stillstand. Das Fluoreszenzsignal erreicht ein Maximum und bleibt konstant (Artika et al., 2022).

Wichtige Parameter der Amplifikationskurve sind:

- Threshold: Stellt einen festgelegten Schwellenwert des Fluoreszenzsignals dar, welcher über dem Hintergrundrauschen liegt und ab dem die Amplifikation der Ziel-DNA messbar wird (Artika et al., 2022).
- Ct-Wert (Cycle Threshold): Gibt den Zyklus an, in dem die Fluoreszenz des amplifizierten DNA-Produkts erstmals den vordefinierten Threshold-Wert überschreitet. Ein niedriger Ct-Wert deutet auf eine hohe und ein hoher Ct-Wert eine geringe Ausgangskonzentration der Ziel-DNA hin (Artika et al., 2022).

2.7.2 Relative Quantifizierung

Im vorliegenden Versuch erfolgte eine relative Quantifizierung mit Hilfe des Housekeeping-Gens GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase). Hierbei wird die Expression des Zielgens durch Normalisierung auf das Referenzgen ermittelt. Nach Amplifikation und Bestimmung des Ct-Wertes des Zielgens und Housekeeping-

Gens wurde die relative Expression mit der $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode bestimmt (Livak und Schmittgen, 2001):

1. Für jede Probe wird der ΔCt -Wert berechnet, der die Differenz zwischen dem Ct-Wert des Zielgens und dem Ct-Wert des Housekeeping-Gens darstellt:

$$\Delta\text{Ct} = \text{Ct}_{\text{Zielgen}} - \text{Ct}_{\text{Housekeeping-Gen}}$$

2. Die Differenz des ΔCt -Wertes zwischen Test- und Referenzprobe ergibt den $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Wert:

$$\Delta\Delta\text{Ct} = \Delta\text{Ct}_{\text{Kontrollgruppe}} - \Delta\text{Ct}_{\text{Referenzprobe}}$$

3. Die relative Genexpression des Zielgens wird als Fold Change (Faltungsänderung) berechnet:

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

2.7.3 Schmelzkurvenanalyse

Während der PCR-Reaktion kommt es zusätzlich zur Bildung von unspezifischen Reaktionsprodukten und Primer-Dimeren, die das Fluoreszenzsignal verfälschen. Nach Abschluss der Amplifikation wird daher eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt, die die Differenzierung zwischen spezifischem Reaktionsprodukt und Nebenprodukten ermöglicht. Dies ist besonders wichtig bei der Verwendung eines unspezifischen Fluoreszenzfarbstoffes, wie SYBR Green, welcher an alle doppelsträngigen DNA-Moleküle – einschließlich unspezifischer Amplifikate und Primer-Dimere – bindet.

Hierfür wird am Ende jedes PCR-Durchganges die Probenkammer kleinschrittig auf 95 °C erwärmt und das Fluoreszenzsignal gemessen. Die Temperaturerhöhung bewirkt eine Aufspaltung der doppelsträngigen DNA-Fragmente und Freisetzung des Fluoreszenzfarbstoffes, was zu einem drastischen Abfall des Fluoreszenzsignals (Peak) führt. Der Punkt, an dem 50 % der DNA-Doppelstränge geschmolzen sind, wird als T_m (Melting temperature) bezeichnet. Jedes DNA-Fragment besitzt einen spezifischen T_m , welcher von Strangelänge, Basenzusammensetzung (besonders GC-Gehalt) und Basensequenz der doppelsträngigen Fragmente abhängt. Spezifische Amplifikate zeigen einen einzigen, scharfen Peak bei einem spezifischen T_m . Unspezifische Amplifikate bzw. Primer-Dimere sind meist kürzer und verfügen somit über einen niedrigeren T_m , wodurch kleinere Peaks bei niedrigeren Temperaturen resultieren (Ririe et al., 1997).

2.7.4 Primer

Für die quantitative Genexpressionsanalyse der ausgewählten Zielgene wurden kommerzielle Standardprimer (QuantiTect® Primer Assays) der Firma QIAGEN (Hilden, Deutschland) verwendet (Tab. 2).

Tab. 2: Auflistung der für die RT-PCR verwendeten QuantiTect® Primer-Assays

Primer	Offizielle Bezeichnung	GeneGlobe Id/ Kat.-Nr.	Bezeichnung Hersteller	Spezies	Annealing-Temperatur
Acp5	acid phosphatase 5, tartrate resistant	QT00131012	Mm_Acp5_1_SG QuantiTect® Primer Assay	Mus musculus	55 °C
Ctsk	cathepsin K	QT00150703	Mm_Ctsk_1_SG QuantiTect® Primer Assay	Mus musculus	55 °C
Oscar	osteoclast associated receptor	QT01167257	Mm_Oscar_1_SG QuantiTect® Primer Assay	Mus musculus	55 °C
Cxcl2	chemokine (C-X-C motif) ligand 2	QT00113253	Mm_Cxcl2_1_SG QuantiTect® Primer Assay	Mus musculus	55 °C
Igf1	insulin-like growth factor 1	QT02423379	Mm_Igf1_2_SG QuantiTect® Primer Assay	Mus musculus	55 °C
Gdf15	growth differentiation factor 15	QT00124481	Mm_Gdf15_1_SG QuantiTect® Primer Assay	Mus musculus	55 °C
Hspa1b	heat shock protein 1B	QT00254436	Mm_Hspa1b_1_SG QuantiTect® Primer Assay	Mus musculus	55 °C

2.7.5 Herstellung des Reaktionsansatzes

Für die PCR-Reaktion wurde zunächst der Mastermix (iQ™ SYBR® Green Supermix, Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA) wie folgt angesetzt (Tab. 3). Anschließend wurden 1 µL cDNA und 40 µL Nuklease-freies H₂O in jedes Well einer PCR-Platte pipettiert. Hinzu kamen 24 µL / Well des Mastermixes. Zur Erhöhung der Messgenauigkeit wurde jede Probe in Triplikaten gemessen.

Tab. 3: Reaktionsansatz Mastermix

Mastermix Volumen pro Probe	Mastermix gesamt (30 Proben x 3)
12,5 µL SYBR Green	1,125 mL SYBR Green
2,5 µL Primer	225 µL Primer
9 µL RNase freies H ₂ O	810 µL RNase-freies H ₂ O

2.7.6 RT-PCR-Reaktion

Nach Versiegelung der PCR-Platte erfolgte die RNA-Amplifikation durch den Thermocycler iCycler MyiQ Single Color Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA) mit der Software iQ5-Standardsoftware (Version 2.0, Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA). Das Temperaturprogramm wurde entsprechend der Herstellerangaben der verwendeten QuantiTect® Primer Assays programmiert (Tab. 4).

Tab. 4: RT-PCR-Protokoll für QuantiTect® Primer Assays

PCR-Reaktionsschritt	Temperatur	Inkubationszeit	Ramp
Aktivierung HotStarTaq DNA Polymerase und Denaturierung cDNA	95 °C	15 min	20 °C/s
PCR-Amplifizierung (35 - 40x)			
Denaturierung	94 °C	15 s	2 °C/s
Annealing (Primeranlagerung)	55 °C	20 s	2 °C/s
Elongation	72 °C	20 s	2 °C/s
Schmelzkurvenanalyse	65 – 95 °C	60 s	0,5 °C/s

(Quelle: QuantiTect Primer Assay Handbook, QIAGEN, Hilden, Deutschland)

2.8 Quantitativer Proteinnachweis durch Enzyme-linked Immunosorbent Assays (ELISA)

Die quantitative Bestimmung der Proteinkonzentration von CXCL2, IGF-1, GDF15 und HSPA1b im Zellkulturüberstand erfolgte mittels Enzyme-linked Immunosorbent Assays (ELISA). Dabei handelt es sich um ein biochemisches Nachweisverfahren, basierend auf einer spezifischen Antikörper-Antigen-Bindung und damit verknüpften enzymatischen Farbreaktion. Bei dem Sandwich-ELISA wird das Zielantigen (Nachweisprotein) durch

zwei unterschiedliche Antikörper erkannt, die an unterschiedliche Epitope binden. Hierbei werden spezifische Mikrotiterplatten eingesetzt, die mit einem monoklonalen Antikörper (Capture-Antikörper) beschichtet sind. Nach Zugabe der Probe kommt es zu einer spezifischen Bindung des Coat-Antikörpers an das in der Probe vorhandene Nachweisantigen. Im Rahmen des darauffolgenden Waschschrilles werden nicht- bzw. unspezifisch gebundene Antigene entfernt. Anschließend wird ein enzymgekoppelter polyklonaler Antikörper (Detektions-Antikörper) hinzugegeben, welcher an das gebundene Nachweisantigen bindet. In einem zweiten Waschschrill werden ungebundene enzymgekoppelte Antikörper entfernt. Es folgt die Zugabe der Substrat-Lösung, wodurch eine katalytische Farbreaktion des gebundenen Enzyms ausgelöst wird. Die Reaktion kennzeichnet sich durch Blaufärbung der Probe. Durch Zugabe der Stop-Lösung wird die Farbreaktion angehalten, wodurch ein Farbumschlag von blau nach gelb erkennbar ist. Die anschließende photometrische Messung gibt Auskunft über die Antigenkonzentration, die sich proportional zur Farbintensität verhält (Quelle: Mouse Heat Shock 70 kDa Protein 1B, HSPA1B ELISA Kit-Handbook, BT LAB, Shanghai, China).

Folgende kommerziell erwerbliche ELISA-Kits wurden verwendet (Tab. 5):

Tab. 5: Auflistung der verwendeten ELISA-Kits

Protein	Hersteller	Katalog-nummer	Nachweis-verfahren
CXCL2/MIP-2 (Maus)	R&D Systems, MN, USA	MM200	Sandwich-ELISA
IGF-1 (Maus)	R&D Systems, MN, USA	MG100	Sandwich-ELISA
GDF15 (Maus)	R&D Systems, MN, USA	DY6385	Sandwich-ELISA
HSPA1B (Maus)	BT LAB, Shanghai, China	E2120Mo	Sandwich-ELISA

2.8.1 Herstellung der Verdünnungsreihen

Für die quantitative Auswertung wurden zunächst Verdünnungsreihen der Standards nach Herstellerangaben hergestellt (Tab. 6-9).

Tab. 6: Verdünnungsreihe Mouse CXCL2/ MIP-2 Immunoassay (R&D Systems, Minneapolis, USA)

Standard	Konzentration	Verdünnungsfaktor
Originalstandard	500 pg/mL	1
Standard Nr. 6	250 pg/mL	1:2
Standard Nr. 5	125 pg/mL	1:4
Standard Nr. 4	62,2 pg/mL	1:8
Standard Nr. 3	31,3 pg/mL	1:16
Standard Nr. 2	15,6 pg/mL	1:32
Standard Nr. 1	7,8 pg/mL	1:64
Nullstandard	0 pg/mL	-

Tab. 7: Verdünnungsreihe Mouse/ Rat IGF-1 Immunoassay (R&D Systems, Minneapolis, USA)

Standard	Konzentration	Verdünnungsfaktor
Originalstandard	2.000 pg/mL	1
Standard Nr. 6	1.000 pg/mL	1:2
Standard Nr. 5	500 pg/mL	1:4
Standard Nr. 4	250 pg/mL	1:8
Standard Nr. 3	125 pg/mL	1:16
Standard Nr. 2	62,5 pg/mL	1:32
Standard Nr. 1	31,3 pg/mL	1:64
Nullstandard	0 pg/mL	-

Tab. 8: Verdünnungsreihe Mouse GDF-15 DuoSet ELISA (R&D Systems, Minneapolis, USA)

Standard	Konzentration	Verdünnungsfaktor
Originalstandard	1.000 pg/mL	1
Standard Nr. 7	500 pg/mL	1:2
Standard Nr. 6	250 pg/mL	1:4
Standard Nr. 5	125 pg/mL	1:8
Standard Nr. 4	62,5 pg/mL	1:16
Standard Nr. 3	31,1 pg/mL	1:32
Standard Nr. 2	15,6 pg/mL	1:64
Standard Nr.1	7,81 pg/mL	1:128
Nullstandard	0 pg/mL	-

Tab. 9: Verdünnungsreihe HSPA1b ELISA Kit (BT LAB, Shanghai, China)

Standard	Konzentration	Verdünnungsfaktor
Originalstandard	128 ng/mL	1
Standard Nr. 5	64 ng/mL	1:2
Standard Nr. 4	32 ng/mL	1:4
Standard Nr. 3	16 ng/mL	1:8
Standard Nr. 2	8 ng/mL	1:16
Standard Nr. 1	4 ng/mL	1:32
Nullstandard	0 pg/mL	-

2.8.2 ELISA-Protokoll

Die Reagenzien und Proben wurden entsprechend der Herstellerangaben vorbereitet und auf Raumtemperatur gebracht. Die Proteinnachweise erfolgten nach folgenden Protokollen:

CXCL2 und IGF-1 (Quelle: Quantikine ELISA Mouse CXCL2 bzw. IGF-1 Immunoassay-Handbook, R&D Systems, Minneapolis, USA):

1. 50 μ L Calibrator Diluent RD5-38 (CXCL2) bzw. RD5Z (IGF-1) in jede Vertiefung der 96-Well-Platte pipettieren.
2. 50 μ L Standard, Kontrolle bzw. Probe hinzugeben. Die Platte mit einer Klebefolie versiegeln und bei Raumtemperatur für 2 h inkubieren. Die IGF-1 Mikrotiterplatte dabei auf einem Mikrotiterplatten-Schüttler bei 500 rpm durchmischen.
3. Platte ausschütten, in jede Vertiefung 400 μ L Waschpuffer geben, Platte ausschütten und auf Zellstoff ausklopfen, Waschschrift viermal wiederholen.
4. 100 μ L Mouse IGF-1- bzw. MIP-2-Konjugat in jedes Well pipettieren. Mikrotiterplatte versiegeln, erneute Inkubation (siehe Schritt 2).
5. Schritt 3 und 4 wiederholen.
6. 100 μ L Substrate Solution in jedes Well pipettieren.
7. 30 min Inkubation bei Raumtemperatur, dabei vor Lichtzufuhr schützen.
8. 100 μ L Stop Solution in jede Vertiefung pipettieren. Platte vorsichtig durch leichtes Klopfen durchmischen.
9. Die photometrische Messung bei 450 nm innerhalb der nächsten 30 min durchführen.

GDF15 (Quelle: Duo Set ELISA Mouse GDF-15-Handbook, R&D Systems, Minneapolis, USA):

1. Den Capture-Antikörper in PBS ohne Trägerprotein auf die Arbeitskonzentration verdünnen. 100 μ L des verdünnten Capture-Antikörpers in jede Vertiefung der 96-Well-Mikroplatte geben. Die Platte verschließen und über Nacht bei Raumtemperatur inkubieren.
2. Überstand entfernen, 400 μ L Waschpuffer zugeben, Platte ausschütten und auf Zellstoff abklopfen. Waschvorgang zwei Mal wiederholen.
3. 300 μ L Reagent Diluent in jede Vertiefung pipettieren
4. 100 μ L Standard bzw. Probe hinzugeben. Die Platte mit einer Klebefolie versiegeln und bei Raumtemperatur für 2 h inkubieren.
5. Waschschrift aus Schritt 2 wiederholen

6. 100 μ L der Working Dilution von Streptavidin-HRP B in jede Vertiefung geben. Platte abdecken und für 20 min bei Raumtemperatur inkubieren. Dabei vor Lichtzufuhr schützen.
7. Waschschrift aus Schritt 2 wiederholen
8. 200 μ L der Substrate Solution in jede Vertiefung pipettieren. Inkubation der Platte für 20 min bei Raumtemperatur. Dabei vor Lichtzufuhr schützen.
9. 50 μ L der Stop Solution in jede Vertiefung pipettieren, Platte durch leichtes Klopfen vermischen.
10. Die photometrische Messung bei 540 nm oder 570 nm innerhalb der nächsten 30 min durchführen.

HSPA1B (Quelle: Mouse Heat Shock 70 kDa Protein 1B, HSPA1B ELISA Kit-Handbook, BT LAB, Shanghai, China):

1. 50 μ L Standard bzw. 40 μ L Probe in entsprechenden Vertiefungen pipettieren.
2. 10 μ L Mouse HSPA1B Antibody in jede Vertiefung pipettieren.
3. 50 μ L Streptavidin-HRP in jede Vertiefung (außer Blanc control) pipettieren.
4. Platte durch leichtes Klopfen vermischen, mit Folie versiegeln und für 60 min bei 37 °C inkubieren.
5. Platte ausschütten.
6. 300 μ L Waschpuffer hinzugeben, Platte ausschütten und auf Zellstoff ausklopfen, Waschschrift viermal wiederholen.
7. 50 μ L Substrate Solution A in jedes Well pipettieren
8. 50 μ L Substrate Solution B in jedes Well pipettieren
9. Platte mit Folie versiegeln und für 10 min bei 37 °C inkubieren, dabei vor Lichtzufuhr schützen.
10. 50 μ L Stop Solution in jedes Well pipettieren.
11. Die photometrische Messung bei 450 nm innerhalb der nächsten 10 min durchführen.

2.8.3 Photometrische Auswertung

Die photometrischen Messungen der Mikrotiterplatten (Abb. 15) wurden mit dem Mikroplattenleser PowerWave X (BioTek Instruments, Winooski, USA) bei einer

Wellenlänge von 450 nm durchgeführt. Anhand der gemessenen Extinktion der hergestellten Verdünnungsreihen wurden Standardkurven erstellt, wodurch die Konzentrationen der Nachweisantigene ermittelt werden konnten. Anschließend wurden die Proteinkonzentrationen mit Hilfe der Ausgangs-DNA-Konzentrationen normiert.

2.9 Statistik

Die statistische Analyse aller erhobenen Daten erfolgte mittels ANOVA (Analysis of Variance). Die Normalverteilung wurde vorab mit dem Kolmogorov-Smirnov-Test überprüft. Weiterführende Mehrfachvergleiche wurden mit dem Tukey-Post-hoc-Test durchgeführt. Dabei wurde ein p-Wert von 0,05 als signifikant festgelegt. Für die Analyse, Visualisierung und Interpretation der erhobenen Daten diente die Statistiksoftware GraphPad Prism (Version 10.4.0 für Windows, GraphPad Software, San Diego, California, USA).

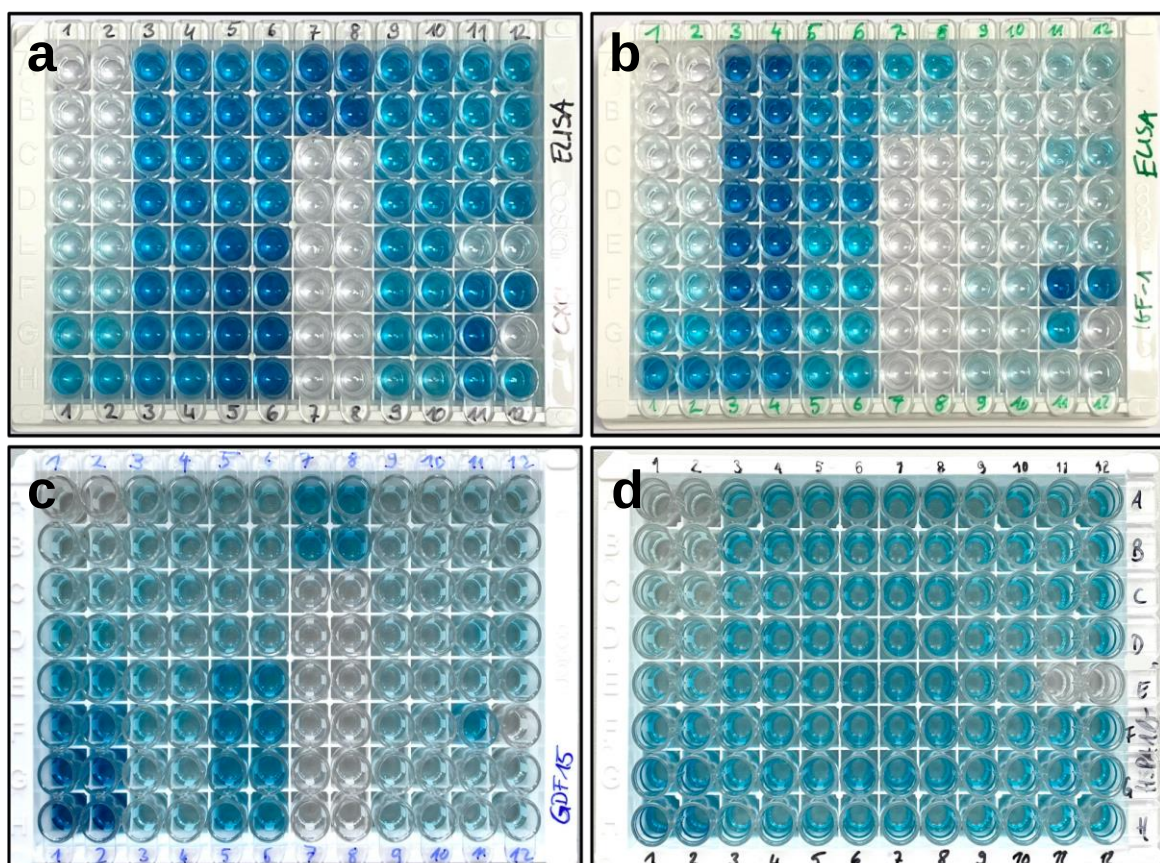


Abb. 15: ELISA-Mikrotiterplatten nach Farbreaktion. Die Farbtintensität der einzelnen Wells verhält sich proportional zur Konzentration des Analyten CXCL2 (a), IGF-1 (b), GDF15 (c) bzw. HSPA1b (d). (Eigene Grafik)

3. Ergebnisse

3.1 Genexpressionsanalyse durch RT-PCR

3.1.1 HSPA1b-Genexpression

Eine signifikante Expressionssteigerung von HSPA1b zeigte sich in den Kulturen auf Zement (Z) im Vergleich zu den Kulturen auf Dentin (D) und Knochen (K) sowie zur Stimulations (SK)- und Negativkontrolle (NK) (Abb. 16).

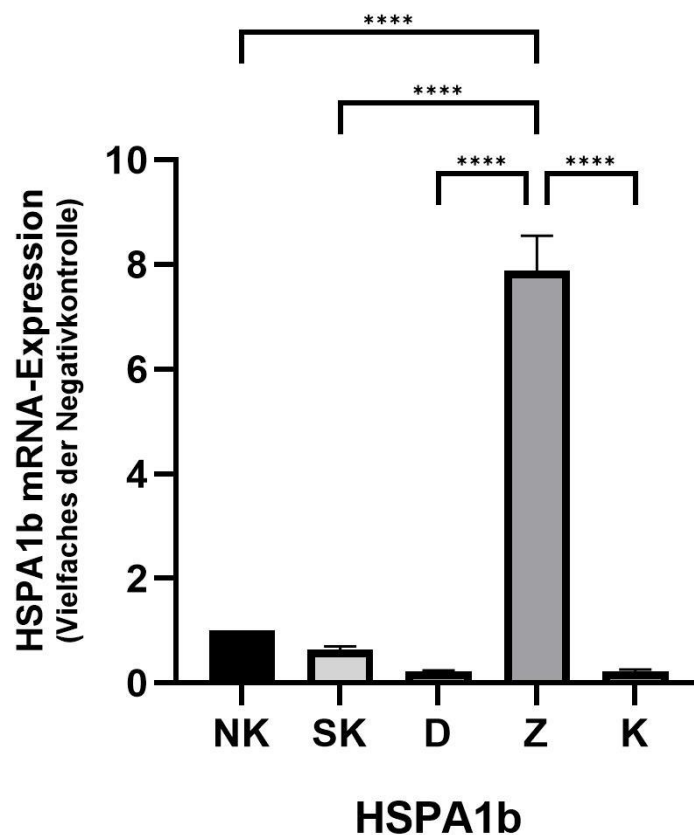


Abb. 16: HSPA1b-Genexpression (modifiziert nach Both et al., 2025). Effekte der Stimulation von Mausmakrophagen unter Einfluss verschiedener Substrate (NK: Negativkontrolle, SK: Stimulationskontrolle, D: Dentin, Z: Zement, K: Knochen) auf die mRNA-Expression von HSPA1b. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen gemäß Tukey-Mehrfachvergleichstest. Die Daten sind als Mittelwert $\pm$ SEM angegeben und repräsentieren drei unabhängige Experimente (n=3) mit jeweils sechs biologischen Replikaten pro Bedingung. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001; ****p<0,0001.

3.1.2 GDF15-Genexpression

Im Rahmen der Stimulation auf Polystyrol (SK) und insbesondere Dentin (D) ließ sich eine im Vergleich zur Negativkontrolle (NK) positive Regulation von GDF15 feststellen. Die Makrophagenkulturen auf Zement (Z) kennzeichneten sich durch eine im Vergleich zur Stimulationskontrolle (SK) negative GDF15-Expression (Abb. 17).

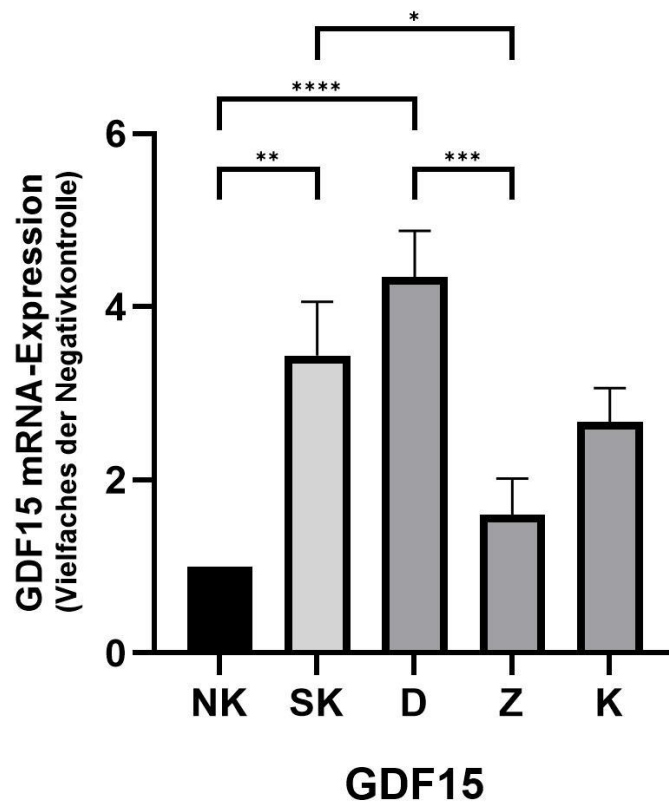


Abb. 17: GDF-15-Genexpression (modifiziert nach Both et al., 2025). Effekte der Stimulation von Mausmakrophagen unter Einfluss verschiedener Substrate (NK: Negativkontrolle, SK: Stimulationskontrolle, D: Dentin, Z: Zement, K: Knochen) auf die mRNA-Expression von GDF15. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen gemäß Tukey-Mehrfachvergleichstest. Die Daten sind als Mittelwert $\pm$ SEM angegeben und repräsentieren drei unabhängige Experimente (n=3) mit jeweils sechs biologischen Replikaten pro Bedingung. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001; ****p<0,0001.

3.1.3 CXCL2-Genexpression

Die Genexpression von CXCL2 wurde im Rahmen der Kultivierung auf Knochen (K), Dentin (D) und Zement (Z) im Vergleich zur Stimulations- (SK) und Negativkontrolle (NK) signifikant gesteigert. Hierbei überwiegte die CXCL2-Expression in den Kulturen auf Knochen (K). Die Expressionsniveaus zwischen Stimulations- (SK) und Negativkontrolle (NK) waren unverändert (Abb. 18).

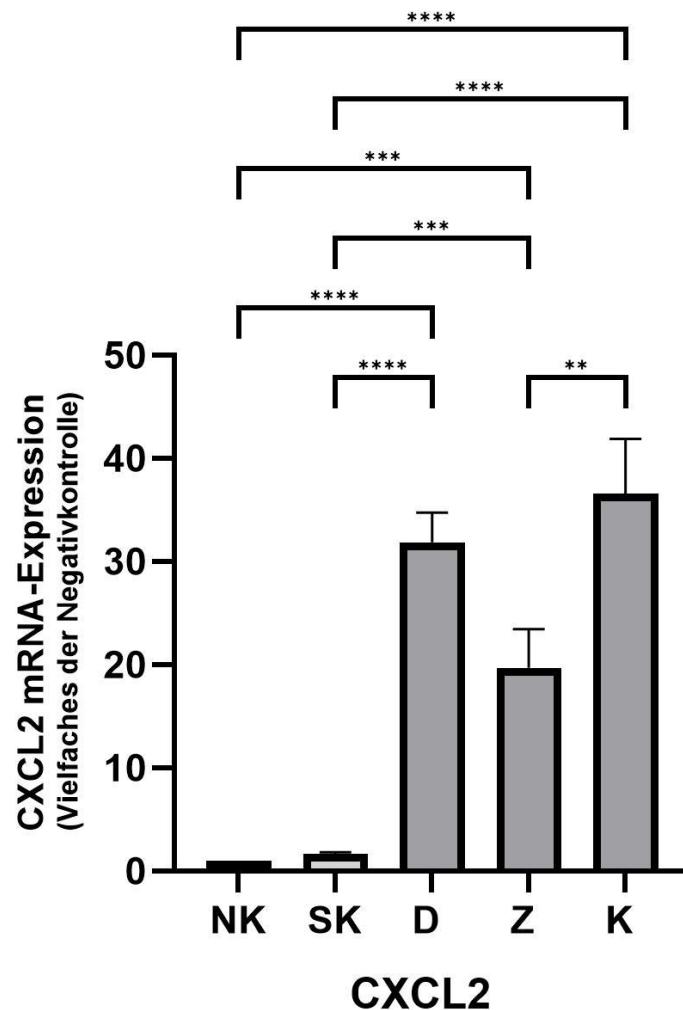


Abb. 18: CXCL2-Genexpression (modifiziert nach Both et al., 2025). Effekte der Stimulation von Mausemakrophagen unter Einfluss verschiedener Substrate (NK: Negativkontrolle, SK: Stimulationskontrolle, D: Dentin, Z: Zement, K: Knochen) auf die mRNA-Expression von CXCL2. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen gemäß Tukey-Mehrfachvergleichstest. Die Daten sind als Mittelwert $\pm$ SEM angegeben und repräsentieren drei unabhängige Experimente ($n=3$) mit jeweils sechs biologischen Replikaten pro Bedingung. * $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$; **** $p<0,0001$.

3.1.4 IGF-1-Genexpression

Die Stimulation der Mausmakrophagen ergab eine im Vergleich zur Negativkontrolle (NK) signifikant herunterregulierte IGF-1-Expression in allen Versuchsgruppen. Die IGF-1-Expression der Makrophagenkulturen auf Dentin (D) war im Vergleich zur Stimulation auf Polystyrol (SK), Zement (Z) und Knochen (K) signifikant gesteigert (Abb. 19).

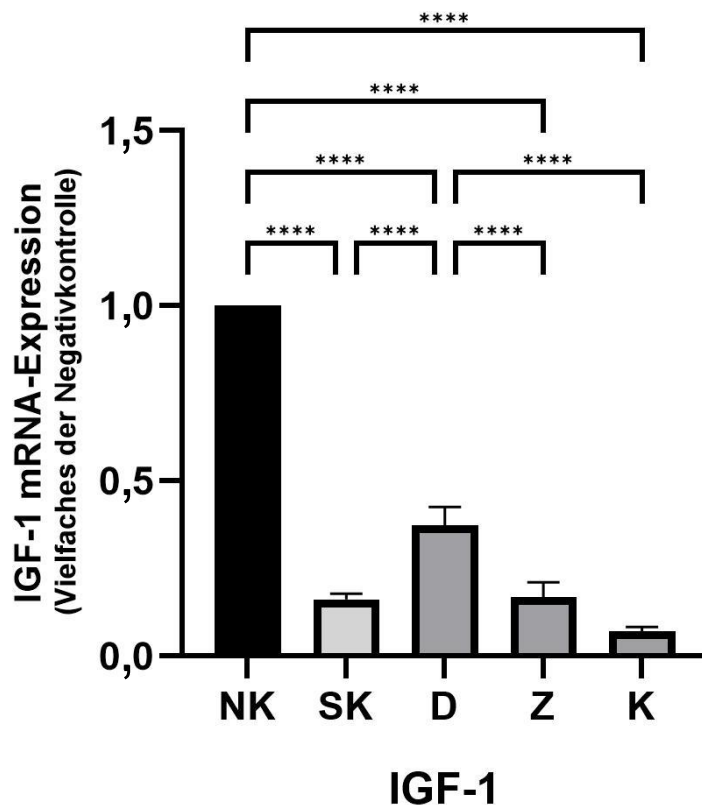


Abb. 19: IGF-1-Genexpression (modifiziert nach Both et al., 2025). Effekte der Stimulation von Mausmakrophagen unter Einfluss verschiedener Substrate (NK: Negativkontrolle, SK: Stimulationskontrolle, D: Dentin, Z: Zement, K: Knochen) auf die mRNA-Expression von IGF-1. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen gemäß Tukey-Mehrfachvergleichstest. Die Daten sind als Mittelwert $\pm$ SEM angegeben und repräsentieren drei unabhängige Experimente (n=3) mit jeweils sechs biologischen Replikaten pro Bedingung. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001; ****p<0,0001.

3.1.5 ACP5-Genexpression

Im Rahmen der Stimulation der Mausmakrophagen auf Zement (Z) zeigte sich eine im Vergleich zu den Kulturen auf Polystyrol (NK und SK), Dentin (D) und Knochen (K) signifikant gesteigerte ACP5-Expression (Abb. 20).

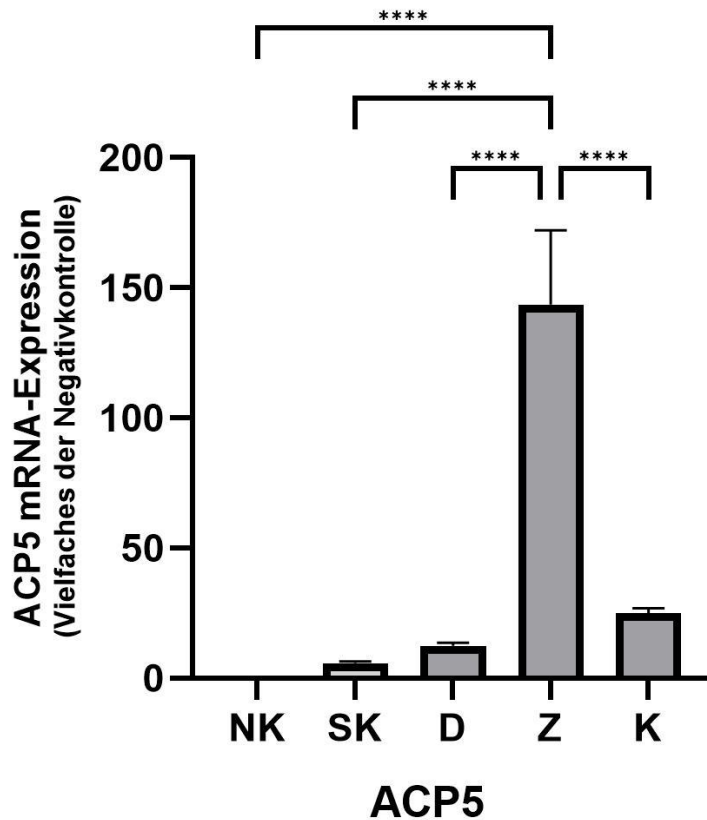


Abb. 20: ACP5-Genexpression. Effekte der Stimulation von Mausmakrophagen unter Einfluss verschiedener Substrate (NK: Negativkontrolle, SK: Stimulationskontrolle, D: Dentin, Z: Zement, K: Knochen) auf die mRNA-Expression von ACP5. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen gemäß Tukey-Mehrfachvergleichstest. Die Daten sind als Mittelwert $\pm$ SEM angegeben und repräsentieren zwei unabhängige Experimente (n=2) mit jeweils sechs biologischen Replikaten pro Bedingung. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001; ****p<0,0001. (Eigene Grafik)

3.1.6 CTSK-Genexpression

Die Kultivierung auf Zement (Z) und Knochen (K) ergab eine signifikante Steigerung der CTSK-Expression im Vergleich zur Kultivierung auf Polystyrol (NK und SK) und Dentin (D) (Abb. 21).

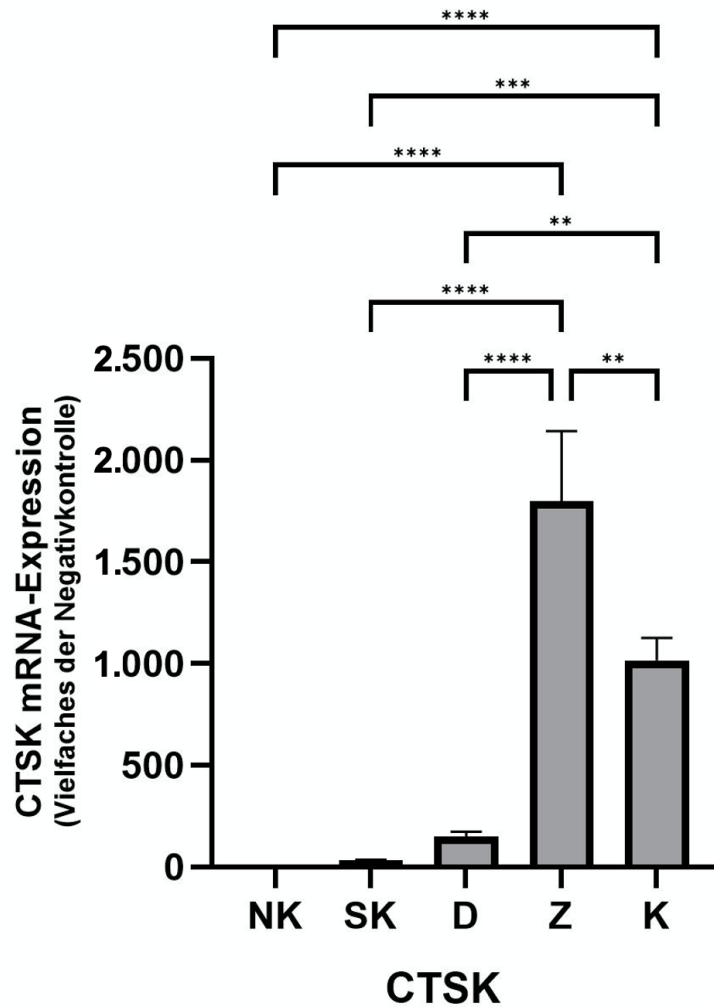


Abb. 21: CTSK-Genexpression. Effekte der Stimulation von Mausmakrophagen unter Einfluss verschiedener Substrate (NK: Negativkontrolle, SK: Stimulationskontrolle, D: Dentin, Z: Zement, K: Knochen) auf die mRNA-Expression von CTSK. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen gemäß Tukey-Mehrfachvergleichstest. Die Daten sind als Mittelwert $\pm$ SEM angegeben und repräsentieren zwei unabhängige Experimente (n=2) mit jeweils sechs biologischen Replikaten pro Bedingung. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001; ****p<0,0001. (Eigene Grafik)

3.1.7 OSCAR-Genexpression

Die Mausmakrophagen, die auf Zement (Z) stimuliert wurden, zeigten eine gesteigerte Expression von OSCAR im Vergleich zur Kultivierung auf Polystyrol (NK und SK), Dentin (D) und Knochen (K) (Abb. 22).

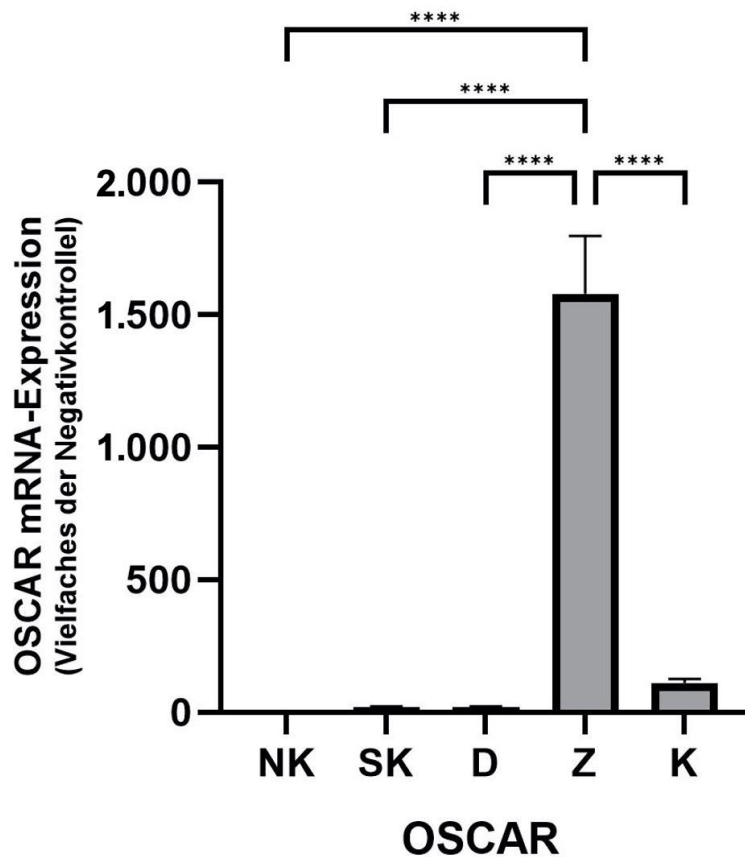


Abb. 22: OSCAR-Genexpression. Effekte der Stimulation von Mausmakrophagen unter Einfluss verschiedener Substrate (NK: Negativkontrolle, SK: Stimulationskontrolle, D: Dentin, Z: Zement, K: Knochen) auf die mRNA-Expression von OSCAR. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen gemäß Tukey-Mehrfachvergleichstest. Die Daten sind als Mittelwert $\pm$ SEM angegeben und repräsentieren zwei unabhängige Experimente (n=2) mit jeweils sechs biologischen Replikaten pro Bedingung. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$. (Eigene Grafik)

3.2 Proteinnachweis durch ELISA-Tests

3.2.1 HSPA1b-Proteinkonzentration

Die Konzentration von HSPA1b im Kulturüberstand war durch die Kultivierung auf Zement (Z) gegenüber der Negativ- (NK) und Stimulationskontrolle (SK) und den Kulturen auf Dentin (D) sowie Knochen (K) signifikant erhöht (Abb. 23).

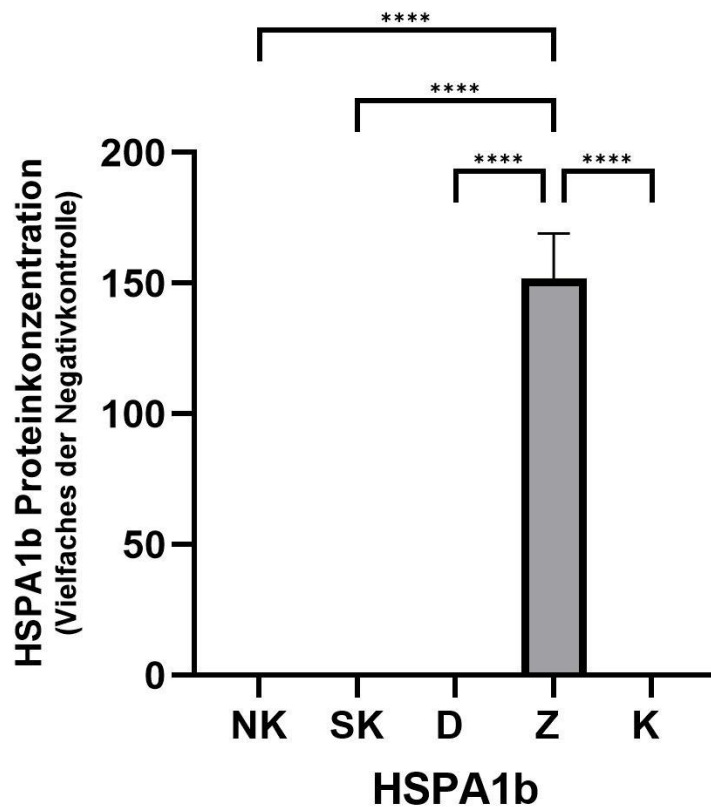


Abb. 23: HSPA1b-Konzentration im Zellüberstand (modifiziert nach Both et al., 2025). Effekte der Stimulation von Mausemakrophagen unter Einfluss verschiedener Substrate (NK: Negativkontrolle, SK: Stimulationskontrolle, D: Dentin, Z: Zement, K: Knochen) auf die Proteinsekretion von HSPA1b. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen gemäß Tukey-Mehrfachvergleichstest. Die Daten sind als Mittelwert $\pm$ SEM angegeben und repräsentieren zwei unabhängige Experimente (n=2) mit jeweils drei biologischen Replikaten pro Bedingung. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001; ****p<0,0001.

3.2.2 GDF15-Proteinkonzentration

Im Vergleich zur Negativ- (NK) und Stimulationskontrolle (SK) zeigte sich eine signifikant erhöhte Proteinkonzentration von GDF15 in den Kulturen auf Dentin (D). Mausmakrophagen, die auf Knochen (K) bzw. Zement (Z) stimuliert wurden, kennzeichneten sich durch eine im Vergleich zu beiden Kontrollgruppen (SK und NK) signifikant verringerte GDF15-Sekretion (Abb. 24).

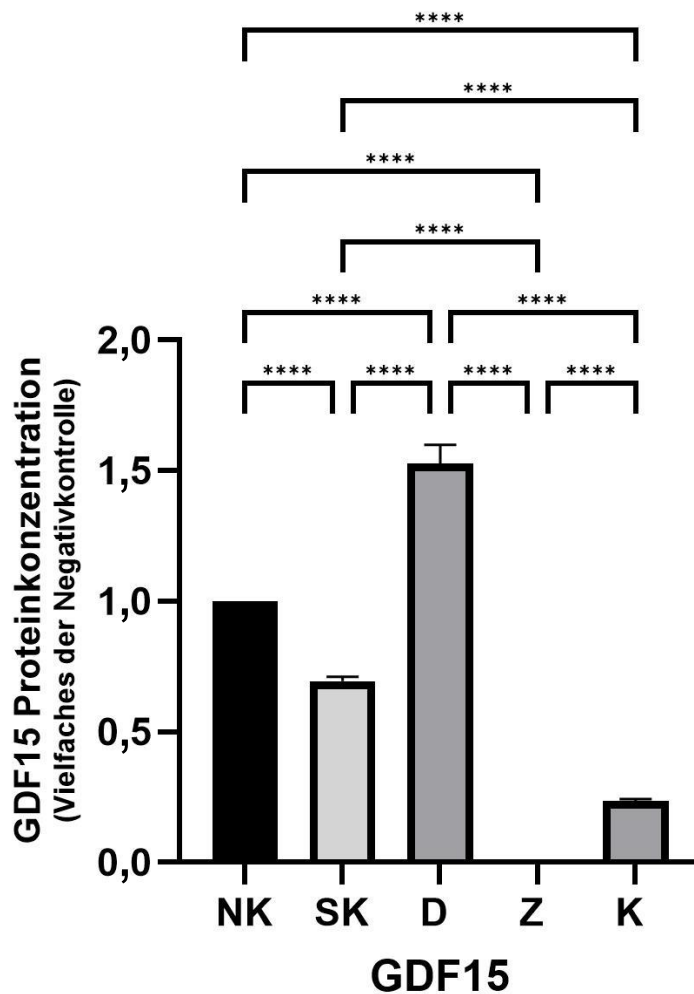


Abb. 24: GDF15-Konzentration im Zellüberstand (modifiziert nach Both et al., 2025). Effekte der Stimulation von Mausmakrophagen unter Einfluss verschiedener Substrate (NK: Negativkontrolle, SK: Stimulationskontrolle, D: Dentin, Z: Zement, K: Knochen) auf die Proteinsekretion von GDF15. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen gemäß Tukey-Mehrfachvergleichstest. Die Daten sind als Mittelwert $\pm$ SEM angegeben und repräsentieren zwei unabhängige Experimente (n=2) mit jeweils drei biologischen Replikaten pro Bedingung. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001; ****p<0,0001.

3.2.3 CXCL2-Proteinkonzentration

Im Rahmen der Stimulation auf Polystyrol (SK) ließ sich eine im Vergleich zur Negativkontrolle (NK) erhöhte CXCL2-Proteinsekretion feststellen. Die CXCL2-Konzentration im Kulturüberstand auf Dentin (D) war gegenüber der Negativkontrolle (NK) und allen weiteren stimulierten Versuchsgruppen (SK, Z, K) erhöht. Auch die Kultivierung auf Knochen (K) führte im Vergleich zur Negativkontrolle (NK) zu einer signifikant gesteigerten und im Vergleich zur Stimulationskontrolle (SK) signifikant verringerten CXCL2-Konzentration. Im Kulturüberstand der Zement-Kulturen (Z) zeigte sich eine geringe CXCL2-Konzentration (Abb. 25).

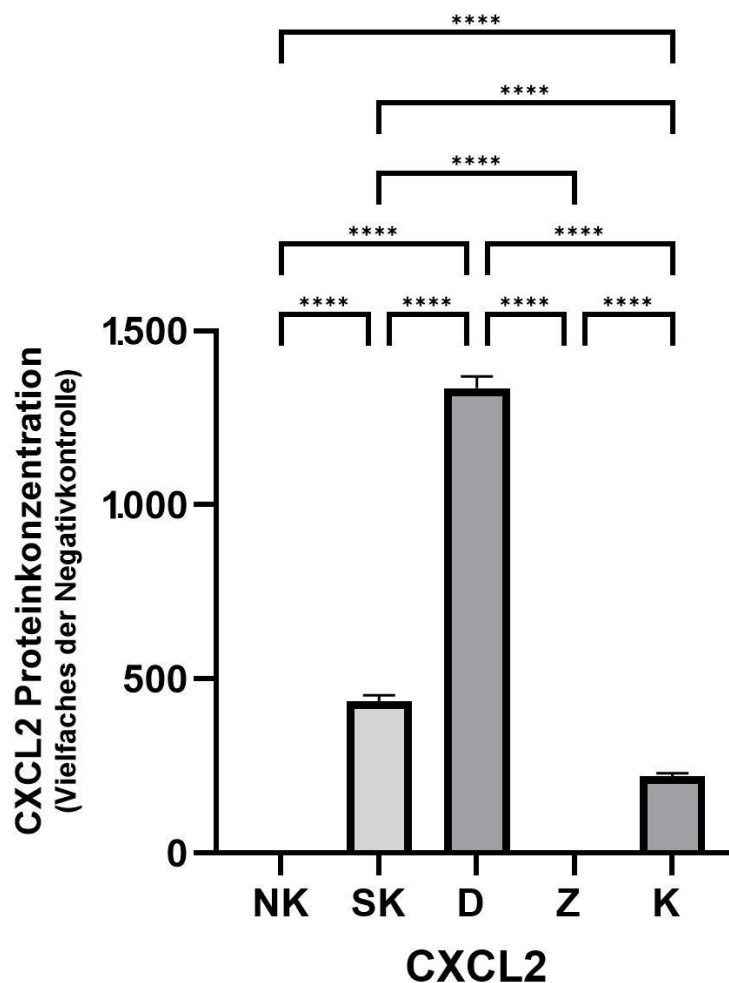


Abb. 25: CXCL2-Konzentration im Zellüberstand (modifiziert nach Both et al., 2025). Effekte der Stimulation von Mausmakrophagen unter Einfluss verschiedener Substrate (NK: Negativkontrolle, SK: Stimulationskontrolle, D: Dentin, Z: Zement, K: Knochen) auf die Proteinsekretion von CXCL2. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen gemäß Tukey-Mehrfachvergleichstest. Die Daten sind als Mittelwert $\pm$ SEM angegeben und repräsentieren zwei unabhängige Experimente (n=2) mit jeweils drei biologischen Replikaten pro Bedingung. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001; ****p<0,0001.

3.2.4 IGF-1-Proteinkonzentration

Die Stimulation auf Polystyrol (SK) führte im Vergleich zur Negativkontrolle (NK) zu einer verminderten Proteinkonzentration von IGF-1 im Kulturüberstand. Die Proteinkonzentration der Dentin- (D), Zement- (Z) und Knochengruppe (K) war im Vergleich zur Negativkontrolle (NK) und Stimulationskontrolle (SK) reduziert. Die Stimulation auf Dentin zeigte im Vergleich zu Zement und Knochen eine erhöhte IGF-1-Sekretion (Abb. 26).

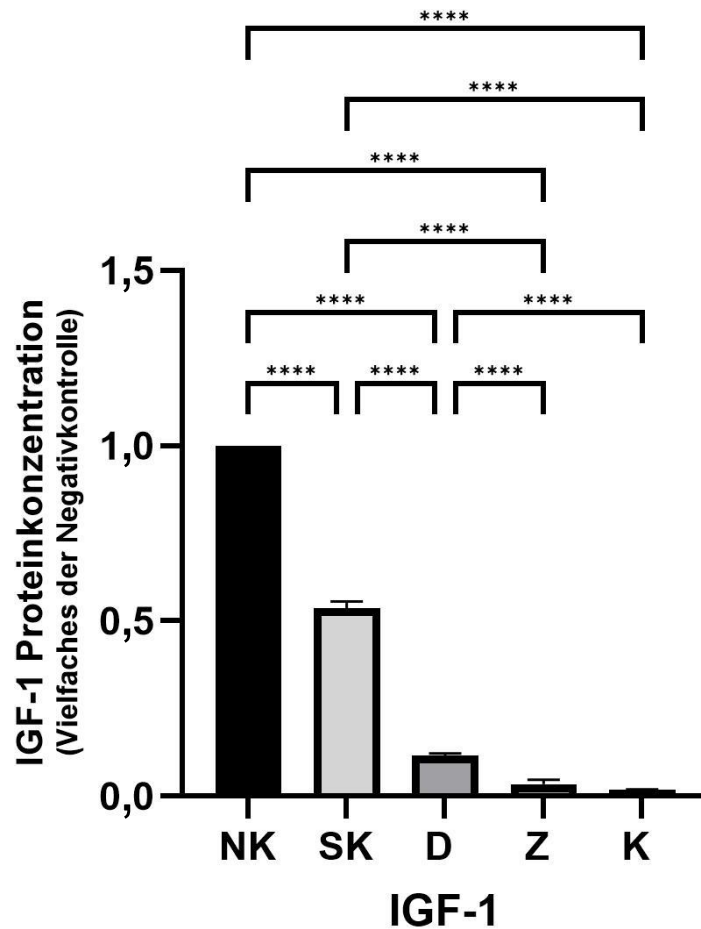


Abb. 26: IGF-1-Konzentration im Zellüberstand (modifiziert nach Both et al., 2025). Effekte der Stimulation von Mausmakrophagen unter Einfluss verschiedener Substrate (NK: Negativkontrolle, SK: Stimulationskontrolle, D: Dentin, Z: Zement, K: Knochen) auf die Proteinsekretion von IGF-1. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen gemäß Tukey-Mehrfachvergleichstest. Die Daten sind als Mittelwert $\pm$ SEM angegeben und repräsentieren zwei unabhängige Experimente (n=2) mit jeweils drei biologischen Replikaten pro Bedingung. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001; ****p<0,0001.

4. Diskussion

Das Ziel dieser Arbeit war, den Einfluss verschiedener oraler Hartgewebesubstrate auf die Differenzierung von Mausmakrophagen hinsichtlich ihrer Expression ausgewählter Zielgene zu untersuchen. Hierfür wurden Vorläuferzellen einer murinen Zelllinie auf zuvor hergestelltem Knochen-, Dentin- und Zementpulver für 12 d kultiviert und mittels RANKL und M-CSF zur Differenzierung stimuliert. Als Stimulations- bzw. Negativkontrolle dienten Zellen, die lediglich auf Kunststoff (Polystyrol) stimuliert bzw. nicht stimuliert wurden. Nach der Zellernte wurde die RNA der differenzierten Osteoklasten-ähnlichen Zellen extrahiert und für die weiterfolgenden Analysen in cDNA umgeschrieben. Auf Grundlage der von Ibrahim erhobenen genomweiten Sequenzierung (Ibrahim, 2020) wurden auffällig regulierte Zielgene (HSPA1b, GDF15, CXCL2, IGF-1, ACP5, CTSK und OSCAR) ausgewählt, dessen Expression auf Gen- und Proteinebene mittels RT-PCR und ELISA-Tests weiter untersucht werden sollten. Die vorliegenden Ergebnisse verdeutlichen, dass verschiedene orale Hartgewebe einen signifikanten Einfluss auf die Differenzierung essenzieller Wachstumsfaktoren und Entzündungsmediatoren während der Differenzierung von Osteoklasten-ähnlichen Zellen haben. Besonders hervorzuheben ist die erhöhte Expression von HSPA1b in den Kulturen auf Zement, die auf anti-resorptive Effekte des Zements hindeuten und als möglicher Abwehrmechanismus gegen EAWR interpretiert werden könnte.

Anhand der erhobenen Sequenzierungsdaten wurden für die vorliegenden Untersuchungen folgende Zielgene herausgefiltert, die im Rahmen der Kultivierung auf den verschiedenen Substraten besonders auffällig exprimiert wurden: Die genomweite Sequenzierung ergab, dass CXCL2 durch das gewählte Stimulationsprotokoll positiv reguliert wurde. Die Kultivierung der Mausmakrophagen auf allen drei Hartgeweben führte insbesondere zu einer positiven Regulation der Wachstumsfaktoren IGF-1 und GDF15, während ACP5 und CTSK in allen drei Hartgewebegruppen negativ reguliert wurden. Osteoklasten-ähnliche Zellen, die speziell auf Zement kultiviert wurden, zeigten eine negative Regulation von OSCAR, wohingegen die Expression von HSPA1b durch die Kultivierung auf Zement auffällig gesteigert wurde (Ibrahim, 2020).

Das Hitzeschockprotein HSPA1b, auch bezeichnet als HSP70-2, gehört zur Familie der HSP70-Proteine, die eine hoch konservierte Gengruppe aus 17 Subgruppen darstellt. Als konstitutiv exprimierte molekulare Chaperone unterstützen sie die Faltung und Stabilisierung neu synthetisierter Proteine und erleichtern den Proteintransport durch die Zellmembran. Unter pathologischen Bedingungen, wie der Einwirkung thermischer Hitze, mechanischer Belastung und Hypoxie kommt es zusätzlich zu einer Stress-induzierten Freisetzung der Hitzeschockproteine, besonders von HSPA1b, was die Zellhomöostase fördern und somit das Überleben der Zelle sicherstellen soll (Daugaard et al., 2007). In diesem Zusammenhang konnten wichtige antiinflammatorische Effekte des Hitzeschockproteins HSP70 beschrieben werden, die unter anderem auf eine negative Regulation des MAPK- und NF- κ B-Signalwegs zurückzuführen ist (Luo et al., 2008). Im Rahmen der kieferorthopädischen Zahnbewegung zeigte sich eine verstärkte Expression von HSP70 als Reaktion auf mechanisch induzierten Stress in hPDL-Fibroblasten, wobei die antiinflammatorische Wirkung von HSP70 einer übermäßigen Gewebeschädigung des Parodonts entgegenwirken soll (Marciniak et al., 2019; Thulasidharan et al., 2021). Mitsuhashi et al. stellten hierbei inhibitorische Effekte des HSP70 auf die Expression von TNF- α und RANKL im parodontalen Ligament dar und schlossen somit auf eine dämpfende Wirkung von HSP70 auf die Osteoklastenaktivierung (Mitsuhashi et al., 2011). Diesen Ansatz konnten Marciniak et al. und Wolf et al. bestätigen, indem sie unter Einwirkung des HSP70-Hemmstoffs VER15008 einen signifikanten Anstieg von aktiven Osteoklasten zeigten (Marciniak et al., 2019; Wolf et al., 2019).

Im Rahmen der Kultivierung von Mausmakrophagen auf Zement konnte Ibrahim eine im Vergleich zur Stimulationskontrolle 226,6-fache Hochregulation von HSPA1b in ausdifferenzierten Osteoklasten-ähnlichen Zellen zeigen (Ibrahim, 2020). Diese auffällige Expression von HSPA1b in den Kulturen auf Zement konnte in der vorliegenden Studie sowohl auf Genebene als auch auf Proteinebene bestätigt werden. Unter Annahme der in der Literatur beschriebenen inhibitorischen Wirkung von HSP70-Proteinen auf die Osteoklasten-Differenzierung könnte die durch Zement hervorgerufene signifikante Expressionssteigerung von HSPA1b auf eine autologe Hemmung der Osteoklasten-ähnlichen Zellen hindeuten, sobald diese in Kontakt mit der Zementoberfläche treten.

GDF15 (Growth differentiation factor 15), auch bekannt als MIC-1 (Macrophage inhibitory cytokine- 1) codiert für das gleichnamige Protein GDF15, welches der Transforming growth factor- β (TGF- β)-Superfamilie zugeordnet wird. Eine gesteigerte Expression von GDF15 wird vorrangig mit Entzündungsprozessen in Verbindung gebracht (Bootcov et al., 1997). Im Rahmen der orthodontischen Zahnbewegung konnten proinflammatorische Effekte von GDF15 bei der Reaktion von hPDL-Fibroblasten unter mechanischer Belastung beschrieben werden, indem die Expression und Sekretion von Zytokinen, wie IL-6, IL-8 und COX-2, und die Aktivierung von Entzündungszellen stimuliert wird (Li et al., 2020). Gleichzeitig fördert GDF15 die Differenzierung und Aktivität von Osteoklasten, die mit einer verstärkten Knochenresorption einhergehen (Westhrin et al., 2015). In dem Zusammenhang stellten Symmank et al. GDF15 als essenziellen Mediator des kieferorthopädisch induzierten Knochenumbaus dar (Symmank et al., 2019). Auch Li et al. und Hinoi et al. konnten eine unter mechanischem Stress erhöhte GDF15-Expression in hPDL-Fibroblasten und Osteozyten darstellen, die eine verstärkte RANKL-Expression und über den NF κ B- und ERK-Signalweg eine gesteigerte Osteoklasten-Differenzierung im parodontalen Ligament induziert (Hinoi et al., 2012; Li et al., 2020). Darüber hinaus vermuteten Symmank et al., dass die Expression von GDF15 auch eine zentrale Rolle bei der Entstehung von dentalen Wurzelresorptionen spielen könnte (Symmank et al., 2019). Während Ibrahim eine signifikante Expressionssteigerung von GDF15 in allen Hartgewebe-Kulturen beschrieb (Ibrahim, 2020), konnten seine Ergebnisse in der vorliegenden Untersuchung weiter spezifiziert und besonders im Rahmen der Kultivierung auf Dentin eine deutliche Expressionssteigerung von GDF15 sowohl auf Gen- als auch auf Proteinebene ermittelt werden. Demzufolge könnte GDF15 einen interessanten molekularen Marker von manifesten EAWR darstellen, welcher Aufschluss auf eine Resorption von Dentin geben und diese von einer rein oberflächlichen Zementresorption abgrenzen kann.

C-X-C motif chemokine 2 (CXCL2), auch bekannt als Macrophage inflammatory protein 2 (MIP2), codiert für ein Protein aus der Gruppe der CXC-Chemokine. Der Entzündungsmediator wird durch unterschiedliche Zelltypen, darunter Makrophagen, Monozyten und Osteoklasten freigesetzt und gilt als molekularer Marker verschiedener Entzündungsprozesse (Rath-Deschner et al., 2022; Wang et al., 2021). Studien zeigen,

dass die Expression von CXCL2 durch RANKL über den JNK-und NFkB-Signalweg induziert wird und dabei wichtige Schlüsselfunktionen während der Adhäsion, Proliferation und Differenzierung von Osteoklasten-Vorläuferzellen zu reifen Osteoklasten übernimmt (Ha et al., 2010; Wang et al., 2021). Demzufolge stellte Ibrahim eine signifikante Expressionssteigerung des Entzündungsmediators CXCL2 im Rahmen der RANKL-vermittelten Stimulation dar (Ibrahim, 2020). Im Kulturüberstand der Stimulationskontrollgruppe konnte im vorliegenden Experiment ebenfalls eine signifikant erhöhte CXCL2-Proteinkonzentration nachgewiesen werden.

Während der orthodontischen Zahnbewegung zeigten Alhashimi et al. bereits wenige Tage nach Kraftapplikation einen deutlichen Expressionsanstieg von CXCL2 auf der parodontalen Kompressionsseite. Die Freisetzung von Chemokinen, wie CXCL2, wird demnach zur akuten Entzündungsreaktion des parodontalen Ligaments gezählt, die die Rekrutierung von Zellen der Monozyten-/Makrophagenlinie und dessen Differenzierung zu mehrkernigen Osteoklastenzellen hervorrufen und dabei wichtige Umbauprozesse im Bereich des Alveolarknochens induzieren (Alhashimi et al., 1999). In diesem Zusammenhang konnte in den vorliegenden Kulturen auf Knochen sowohl auf Gen- als auch auf Proteinebene eine statistisch relevante Expressionssteigerung von CXCL2 in Osteoklasten-ähnlichen Zellen ermittelt werden. Zusätzlich zeigte sich ein erheblicher Expressionsanstieg von CXCL2 in den Kulturen auf Dentin, was auf eine wichtige Beteiligung des Entzündungsmediators bei dentalen Wurzelresorptionen schließen lässt und CXCL2 als interessanten molekularen Marker bei der Resorption von Dentin hervorhebt. Auch in den Kulturen auf Zement ließ sich auf Genebene ein signifikanter Anstieg der CXCL2-Expression nachweisen. Im Kulturüberstand der Zement-Kulturen zeigte sich hingegen nur eine geringe CXCL2-Proteinkonzentration, die vermutlich unterhalb der optimalen Assay Range lag und somit nicht zuverlässig quantifiziert werden konnte. Der spezifische Einfluss von Zement auf die Expression des Entzündungsmediators CXCL2 sollte daher in weiteren Untersuchungen überprüft werden.

Der Wachstumsfaktor IGF-1 (Insulin-like growth factor-1) gilt als essenzieller Mediator des physiologischen Knochenstoffwechsels sowie skelettalen Entwicklungsprozessen. Neben der induktiven Wirkung auf die Reifung und Aktivität von Osteoblasten (Zhang et al., 2012) konnten stimulatorische Effekte auf die Differenzierung von Osteoklasten beschrieben

werden. Dabei konnten Wang et al. durch gezielten IGF-1-Knockout eine reduzierte Anzahl und Größe von Osteoklasten mit verringerter Resorptionsleistung nachweisen (Wang et al., 2006). Die Freisetzung von IGF-1 wird zum einen durch Osteoblasten und Stromazellen vermittelt, welches an korrespondierende IGF-1-Rezeptoren auf der Oberfläche von Osteoklasten-Vorläuferzellen bindet und die Proliferation und Multinukleation der Zellen stimuliert (Fiorelli et al., 1996). Darüber hinaus wurde die Expression von IGF-1 auch durch Osteoklasten-Vorläuferzellen selbst nachgewiesen, was auf einen zusätzlichen autokrinen Wirkmechanismus der Zellen hindeutet (Hou et al., 1997; Lazowski et al., 1994; Wang et al., 2006). Neben dem natürlichen Knochenstoffwechsel konnten oralbiologische Forschungsarbeiten eine Beteiligung von IGF-1 bei der Entstehung von dentalen Wurzelresorptionen verdeutlichen. Hierbei konnten Götz et al. im Rahmen von immunhistochemischen Untersuchungen eine verstärkte IGF-Konzentration in Resorptionslakunen der Zahnwurzel sowie in resorptionsaktiven Osteoklasten-ähnlichen Zellen nachweisen (Götz et al., 2006). In dem Zusammenhang zeigte Ibrahim einen signifikanten Anstieg der IGF-1-Expression in den Osteoklastenkulturen auf Dentin und Wurzelzement, was auf eine Beteiligung von IGF-1 bei der Resorption der Hartgewebe schließen lässt (Ibrahim, 2020). Auch in der vorliegenden Versuchsreihe ließ sich im Rahmen der Stimulation auf Dentin eine im Vergleich zur Stimulationskontrolle deutliche Expressionssteigerung von IGF-1 nachweisen. Im Verhältnis zur negativen Kontrollgruppe zeigte sich jedoch sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene eine negative IGF-1-Regulation in allen stimulierten Versuchsgruppen. In Übereinstimmung hierzu konnten in vorausgehenden Forschungsarbeiten inhibitorische Effekte von RANKL auf die Regulation von IGF-1 in RAW-Osteoklasten dargestellt werden (Ma et al., 2023). Hierbei beschrieben Xu et al. einen spezifischen OPG/RANKL/RANK/IGF-1-Signalweg, der mit einer wechselseitigen negativen Beeinflussung zwischen der Expression von RANKL und IGF-1 einhergeht (Xu et al., 2020).

ACP5 (Acid phosphatase 5), auch bekannt als TRAP (Tartrate-resistant acid phosphatase), und CTSK (Cathepsin K) codieren für zwei gleichnamige funktionelle Enzyme, die synergistisch am Abbau der Knochenmatrix – speziell der Spaltung von organischen Knochenmatrixproteinen, wie Osteopontin und Bone-Sialoprotein – beteiligt

und zudem als wichtige Biomarker resorptionsaktiver Osteoklasten etabliert sind (Domon et al., 1999; Janckila und Yam, 2009; Purdue et al., 2014). In-vivo Studien konnten zeigen, dass die gezielte Inhibition der TRAP- und CTSK-Proteinaktivität zu einem osteopetrotischen Phänotyp von Versuchsmäusen führt, was auf eine gestörte Resorptionsleistung von Osteoklasten zurückzuführen ist (Hayman et al., 1996; Ohba et al., 2000). Neben dem Knochenstoffwechsel konnte auch im Rahmen von physiologisch sowie pathologisch bedingten dentalen Wurzelresorptionen eine verstärkte Expression von ACP5 und CTSK durch aktive Odontoklastenzellen nachgewiesen werden. Entsprechend der durch Osteoklasten vermittelten Knochenresorption bewirken die Enzyme eine Spaltung von extrazellulären Dentin-Matrixbestandteilen und induzieren somit den Hartgewebeabbau der Zahnwurzel (Wen et al., 2016).

OSCAR (Osteoclast-associated receptor) stellt ein weiteres Osteoklasten-spezifisches Markergen dar, welches durch Osteoklasten-Vorläuferzellen und reife Osteoklasten exprimiert wird und für das Transmembran-Rezeptorprotein OSCAR codiert. In der Literatur wird eine spezifische Interaktion zwischen dem Transmembranrezeptor OSCAR und extrazellulären Knochenmatrixproteinen beschrieben (Barrow et al., 2011; Haywood et al., 2016). Im Fokus stehen vor allem organische Knochenmatrixproteine – besonders Kollagen Typ I, II und III – die als Liganden über spezifische Sequenzmotive in ihrer Primärstruktur an den Rezeptor OSCAR binden. In der Folge kommt es zur Aktivierung von Transkriptionsfaktoren, wie NFATc1, wodurch ergänzend zu dem RANKL-RANK-Signalweg eine kostimulatorische Wirkung auf die Osteoklasten-Differenzierung erzielt wird (Barrow et al., 2011). Gleichzeitig konnten Vitale et al. durch Interaktion mit spezifischen Knochenmatrixproteinen eine gesteigerte Genexpression von OSCAR in Osteoklasten-ähnlichen Zellen darstellen (Vitale et al., 2023).

Während vorausgehende Studien im Rahmen einer RANKL-vermittelten Stimulation von Osteoklasten einen substrat-unabhängigen Anstieg der ACP5-, CTSK- und OSCAR-Expression belegen konnten (Hu et al., 2007; Purdue et al., 2014; Vitale et al., 2023), zeigte sich in den vorliegenden Untersuchungen lediglich in den stimulierten Kulturen auf Zement ein verstärkter Expressionsanstieg von ACP5 und OSCAR. Zudem wurde die Expression von CTSK im Rahmen der Stimulation auf Zement und Knochen, nicht aber auf Dentin und Polystyrol signifikant gesteigert. Im Vergleich zu Ibrahims Expressionsanalyse ergaben sich deutliche Abweichungen der Expressionsmuster von

ACP5, CTSK und OSCAR (Ibrahim, 2020). Ibrahim stellte eine deutlich herabregulierte Expression von ACP5, CTSK und OSCAR im Rahmen der Kultivierung auf Zementgewebe gegenüber der Stimulationskontrolle dar. Die Zellen, die auf Dentin und Knochen stimuliert wurden, kennzeichneten sich durch eine negative Regulation der Osteoklasten-spezifischen Markergene ACP5, CTSK und OSCAR (Ibrahim, 2020).

Es ist darauf hinzuweisen, dass in den vorliegenden Untersuchungen Fold-Change-Werte >1.000 in den Zement-Kulturen gemessen wurden, die einer kritischen Überprüfung bedürfen. Solch extreme Messwerte deuten auf mögliche technische Artefakte hin. Eine Ursache könnte die geringe mRNA-Konzentration darstellen, die aus den vorliegenden Zement-Kulturen extrahiert wurde. Hierbei besteht ein erhöhtes Risiko für unspezifische Amplifikationen, z.B. durch die Bildung von Primer-Dimeren. Zudem können sich bei geringen RNA-Konzentrationen potenzielle Kontaminationen durch Fremd-RNA stärker auf das Amplifikationssignal auswirken, die zu falsch-positiven Ergebnissen führen. Es empfiehlt sich, die vorliegenden Expressionsanalysen der Gene ACP5, CTSK und OSCAR in weiterführenden Untersuchungen zu überprüfen.

Für den vorliegenden Versuch wurden Vorläuferzellen einer murinen Makrophagen-Zelllinie verwendet, die vielerlei Vorteile gegenüber der Kultivierung primärer Osteoklastenkulturen bietet. Durch die Fähigkeit, auf bestimmte Stimuli, wie RANKL, zu reagieren und sich zu mehrkernigen Zellen mit Osteoklasten-spezifischen Eigenschaften zu differenzieren, wurde die Zelllinie als geeignetes Modell für die Osteoklasten-Forschung etabliert (Kong et al., 2019). Im Vergleich zu primären Osteoklasten-Vorläuferzellen, die mit erheblichem technischem Aufwand aus dem Knochenmark oder Blut eines tierischen bzw. menschlichen Spenders isoliert werden müssen, können die Mausmakrophagen über spezialisierte Zellbanken kommerziell erworben und durch Kryokonservierung jahrzehntelang bewahrt werden, wodurch sie weit verfügbar und schnell einsetzbar sind. Während primäre Osteoklasten durch genetisch- sowie altersbedingte Spenderunterschiede in ihrer Differenzierung und Funktion variieren können, stellt eine Zelllinie eine homogene Zellgruppe dar, die vergleichbare und reproduzierbare Analysen ermöglicht. Auch das beschleunigte Zellwachstum, die unbegrenzte Zellteilung und die allgemeine Widerstandsfähigkeit gegenüber äußeren Einflüssen erleichtern die Handhabung und ermöglichen eine zeit- sowie kosteneffektive

Kultivierung unter standardisierten Bedingungen (Collin-Osdoby und Osdoby, 2012; Kong et al., 2019).

Das initiale Ziel von Ibrahim war es, zunächst einen geeigneten Versuchsaufbau für die Differenzierung der Mausmakrophagen zu funktionellen Osteoklasten-ähnlichen Zellen zu erstellen. Nach 12-tägiger Stimulation durch RANKL und M-CSF konnte er den Differenzierungsprozess auf Dentinscheiben nachweisen, indem sich zahlreiche multinukleäre Zellen mit charakteristischen Podosomen-Ausläufern zeigten, die Resorptionslakunen auf der Dentinoberfläche ausbildeten. Auf Grundlage seines gewählten Stimulationsprotokolls führte er anschließend eine Kultivierung auf den unterschiedlichen Pulversubstraten aus Knochen, Dentin und Zement durch und stellte im Zuge der Stimulation zahlreiche TRAP-positive Zellen dar, wodurch sich die Resorptionsaktivität der differenzierten Zellen auf den verschiedenen Hartgewebesubstraten bestätigte. Durch den Vergleich der individuellen Genexpressionsprofile mittels RNA-Sequenzierung konnte er in einem letzten Schritt deutliche Hartgewebe-spezifische Einflüsse auf die Genexpression der Osteoklasten-ähnlichen Zellen darstellen (Ibrahim, 2020). Zur Validierung dieser Ergebnisse wurde die RT-PCR-Methode für die nachfolgenden Expressionsanalysen ausgewählt, welche im Vergleich zur RNA-Sequenzierung ein technisch weniger aufwändiges, kostengünstiges, dennoch sehr präzises Verfahren zur RNA-Quantifizierung darstellt und somit mehrere Messwiederholungen zur Erhöhung der Reproduzierbarkeit ermöglicht. Da die alleinige Genexpressionsanalyse jedoch keinen Aufschluss über die tatsächliche biologische Aktivität der differenzierten Zellen geben kann, die zusätzlich durch posttranskriptionelle RNA-Modifikationen beeinflusst wird, wurden anschließend quantitative Proteinnachweise in Form von ELISA-Tests durchgeführt. Hierbei wurden die Proteinkonzentrationen in den Kulturüberständen bestimmt, da es sich bei GDF15, CXCL2 und IGF-1 in erster Linie um Proteine handelt, die aktiv sezerniert werden. Auch Hitzeschockproteine, wie HSPA1b, die als Chaperone zwar primär als intrazelluläre Proteine bekannt sind, können Exosomen-vermittelt ins extrazelluläre Milieu freigesetzt werden, wodurch sich die hier gewählte Methodik begründen lässt (Ogbodo et al., 2023; Lancaster und Febbraio, 2005).

Die spezifische Genregulation innerhalb der verschiedenen Versuchsgruppen bestätigt die vorliegende Hypothese, dass die Hartgewebe einen unmittelbaren Einfluss auf die Differenzierung der Osteoklasten-ähnlichen Zellen haben und deutet auf eine spezifische Zell-Matrix-Interaktion zwischen den Hartgeweben und Klastenzellen hin. Im Rahmen des Knochenstoffwechsels konnten verschiedene Studien bereits ein wichtiges Zusammenspiel zwischen der Knochenmatrix und anhaftenden Osteoklasten beschreiben. Kleinhans et al. stellten fest, dass Osteoklasten-Vorläuferzellen, die lediglich auf Kunststoff stimuliert wurden, zwar eine Zunahme ihrer Zellgröße sowie Multinukleation und Expression spezifischer Osteoklastenmarker, wie TRAP, CTSK und OSCAR zeigten; die terminale Differenzierung zu physiologisch aktiven Osteoklasten mit Ausbildung von Aktin-Ringstrukturen ließ sich jedoch lediglich im Rahmen der Stimulation auf Knochen darstellen (Kleinhans et al., 2015). Darüber hinaus konnten Purdue et al. wichtige Osteoklasten-spezifische Gen-Cluster identifizieren, die durch die direkte Interaktion mit der Knochenmatrix in reifenden Osteoklasten exprimiert wurden. Zudem zeigten sie eine koordinierte Unterdrückung von Genen, wie *cdc7* und *cyclin b1*, die an der Zellzyklusprogression und der Zellteilung beteiligt sind, und schlussfolgerten, dass die direkte Interaktion mit Knochen während der terminalen Osteoklasten-Differenzierung eine Umschaltung von proliferierenden Vorläuferzellen zu aktivierten Osteoklasten bewirkt (Purdue et al., 2014).

Wichtige Vermittler der Zell-Matrix-Interaktion zwischen Osteoklasten und Knochen sind vor allem nicht-kollagene Matrixproteine, wie die SIBLING-Proteine Osteocalcin, Osteopontin und Bone Sialoprotein. Diese Proteine binden mit ihrer RGD-Sequenz an den Integrin-Rezeptor $\alpha\beta_3$, wodurch nachfolgende Signalkaskaden aktiviert werden, die die Physiologie der Osteoklasten regulieren (Kleinhans et al., 2015). Auch im Hinblick auf EAWR konnten extrazelluläre Matrixproteine, wie Osteopontin, in dentalen Wurzelgeweben als zentrale Mediatoren für Odontoklasten identifiziert werden, indem sie die Anhaftung an der Wurzeloberfläche vermitteln und somit die Resorption einleiten (Iglesias-Linares und Hartsfield, 2017). Auch Rumpler et al. stellten einen deutlichen Substrat-spezifischen Einfluss auf die Resorptionsleistung und Genregulation von Osteoklasten fest, die auf unterschiedlichen mineralisierten Geweben bzw. Kunststoff kultiviert wurden und schlussfolgerten, dass spezifische Matrixproteine einen regulativen Einfluss auf die Aktivität von Osteoklasten haben könnten (Rumpler et al., 2012, 2013).

Die in der vorliegenden Versuchsreihe untersuchten Hartgewebe Knochen, Dentin und Zement weisen zwar eine grundlegende strukturelle Ähnlichkeit in ihrem Aufbau auf, unterscheiden sich jedoch hinsichtlich des Gesamtgehalts an nicht-kollagenen Matrixproteinen (McKee et al., 1996). Dies könnte eine Erklärung für die unterschiedliche Genexpression in den verschiedenen Zellkulturen sein. Zement weist im Vergleich zu Knochen und Dentin den höchsten Gehalt organischer Matrixproteine auf, wobei Osteopontin den größten Anteil ausmacht. Knochen hingegen kennzeichnet sich durch einen hohen Gehalt an Osteocalcin, gefolgt von Osteopontin und Bone Sialoprotein. In Dentin dominieren die nicht-kollagenen Matrixproteine Dentinsialoprotein und Dentisialophosphoprotein, die weder in Knochen noch in Zement nachweisbar sind. Der Gehalt an Osteopontin, Osteocalcin und Bone Sialoprotein ist im Vergleich zu Knochen und Zement hingegen gering. Zement-spezifische Matrixproteine sind zudem Cementum Attachment Protein und Cementum Protein 1, die in Knochen und Dentin nicht nachgewiesen werden können (McKee et al., 1996; Orsini et al., 2009; Swathi et al., 2024).

Während vorherige Studien primär den substrat-spezifischen Einfluss von Knochen und Dentin auf Osteoklastenkulturen untersuchten, wurde in der vorliegenden Studie Zement als weitere relevante Wachstumsmatrix eingeschlossen, dessen Resorption als limitierender Faktor bei der Initiierung von EAWR gilt (Feller et al., 2016).

Die in der Literatur beschriebene Funktion von Zement ist vielfältig. Als Bestandteil des Zahnhalteapparates vermittelt es zum einen die Verankerung des Zahnes in der knöchernen Alveole (Swathi et al., 2024). Darüber hinaus werden wichtige protektive Eigenschaften beschrieben, die die Zahnwurzel vor externen Resorptionen schützen. Durch die natürliche Schutzfunktion ist es möglich, dass die Zahnwurzel während des physiologischen Umbaus des umgebenen Alveolarknochens in der Regel unversehrt bleibt. Auch im Rahmen von periapikalen und parodontalen Infektionen, die mit einer pathologischen Knochenresorption einhergehen, kann die Zahnwurzel völlig intakt bleiben (Choi et al., 2023). Eine externe Resorptionsbarriere ist zudem die Voraussetzung dafür, dass kieferorthopädische Zahnbewegungen ohne irreversible Formveränderungen der Zahnwurzel durchgeführt werden können (Wang et al., 2020). Eine Unterbrechung der Schutzbarriere stellt hingegen eine direkte Eintrittspforte für Osteoklasten-ähnliche

Zellen dar, sich an der mineralisierten Wurzeloberfläche anzuheften und eine Resorption einzuleiten (Abass und Hartsfield, 2007).

Bislang sind verschiedene Faktoren bekannt, die die Widerstandsfähigkeit der Wurzeloberfläche gegenüber aktiven Osteoklasten bedingen. Zum einen wird die Zahnwurzel von einer oberflächlichen nicht-mineralisierten Zementoidschicht umgeben, die von Osteoklasten nicht resorbiert werden kann. Diese stellt demnach eine wichtige Resorptionsbarriere dar, die erst durchdrungen werden muss, um zur mineralisierten Zement- bzw. Dentinmatrix zu gelangen (Aidos et al., 2018). Zum anderen können initial auftretende Läsionen unmittelbar durch aktive Zementoblasten repariert werden, indem sie kleine Resorptionslakunen mit Reparaturzement auffüllen und somit eine Ausbreitung der Resorption in tiefere Wurzelschichten unterbinden (Bosshardt und Sculean, 2009; Feller et al., 2016). Auch auf molekularer Ebene werden antiresorptive Effekte speziell von Zement beschrieben, die in erster Linie durch Zementozyten vermittelt werden. Im direkten Vergleich zu Osteozyten stellten Zhao et al. eine verstärkte Expression von *Tnfrsf11b* (OPG) und verringerte Expression von *Tnfrsf11* (RANKL) durch Zementozyten dar, die unter Einwirkung von mechanischem Stress zusätzlich verstärkt wurde. Durch die erhöhte OPG/RANKL-Ratio beschrieben sie eine direkte Abschwächung lokaler Osteoklasten (Zhao et al., 2016). Zusätzlich zeigten Wang et al. eine verstärkte Expression der zementogenen Faktoren ALP und *Runx2*, die auf einen anabolischen Abwehrmechanismus von Zementozyten auf externe Reize hindeutet und die antiresorptiven Effekte von Zement bestätigen (Wang et al., 2020). Während mechanischer Belastung konnten sie außerdem eine verstärkte Expression von COX-2 und b-Catenin durch die Unterdrückung der S1P-Signalübertragung nachweisen, die eine Förderung der Zementogenese und Inhibition der Zementoklastogenese bewirken (Wang et al., 2020). Als weiterer antiresorptiver Faktor wurde *Npp1* beschrieben, welches durch Zementoblasten exprimiert wird und die Zement-Homöostase fördern soll (Choi et al., 2023; Choi et al., 2022). Die auffällige Expression von *HSPA1b* könnte auf einen weiteren Abwehrmechanismus von Zement hindeuten, indem es eine autologe Inhibition von anhaftenden Osteoklasten-Vorläuferzellen induziert und somit einer entstehenden Resorption direkt entgegenwirkt.

Im Vergleich zu Ibraims Expressionsanalyse konnten in der vorliegenden Studie Übereinstimmungen, jedoch auch Abweichungen in der Regulation der spezifischen Zielgene ermittelt werden. Besonders bei den Genen ACP5, CTSK und OSCAR zeigten sich deutliche Expressionsunterschiede. Obwohl die RNA-Sequenzierung zum Goldstandard für Transkriptom-Studien geworden ist, handelt es sich um ein anspruchsvolles und kostenintensives Verfahren, wodurch sich Ibrahim auf einen Versuchsdurchlauf beschränkte. Hierbei könnten kleinste Fehlerquellen, die im Rahmen der Probenvorbereitung, RNA-Amplifikation, Cluster-Generierung, Sequenzierung oder Datenanalyse aufgetreten sind, die Sequenzierungsergebnisse beeinflusst haben (Shi et al., 2021). Dies unterstreicht die Relevanz einer wiederholten Validierung der Seq-basierten Expressionsprofile durch alternative Verfahren, wie die RT-PCR. Zusätzlich ist zu berücksichtigen, dass die in der vorliegenden und in Ibrahims Studie eingesetzten Hartgewebesubstrate nicht von identischen Spendern gewonnen wurden. Somit könnte die Genregulation auch durch individuelle Unterschiede in der Gewebezusammensetzung beeinflusst worden sein.

Auch im Rahmen der vorliegenden Untersuchungen war es aus ethischen Aspekten nicht möglich, für alle drei Versuchsdurchgänge ausreichend Hartgewebe von einem einzigen Spender zu beziehen. Demnach musste auf verschiedene Spenderquellen zurückgegriffen werden, was eine Limitation der Studie darstellt. Zudem sollte berücksichtigt werden, dass die Mausmakrophagen hauptsächlich unter künstlichen Laborbedingungen kultiviert wurden, wodurch eine Übertragung der Ergebnisse auf den Organismus nicht sichergestellt ist. Demnach sollten die in-vitro gewonnenen Ergebnisse langfristig im Rahmen von in-vivo Studien überprüft werden, die die physiologischen Bedingungen und biologischen Prozesse des lebenden Organismus berücksichtigen.

Zusammengefasst konnten in der vorliegenden Arbeit deutliche Expressionsunterschiede ausgewählter Schlüsselmoleküle in Osteoklasten-ähnlichen Zellen nachgewiesen werden, die in direktem Kontakt zu den unterschiedlichen Hartgeweben Knochen, Dentin bzw. Zement stimuliert wurden. Die hier gewonnenen Ergebnisse bestätigen die initiale Hypothese, dass Osteoklasten-ähnliche Zellen offenbar die verschiedenen Hartgewebe Knochen, Dentin und Zement registrieren und sich vermutlich in ihrer Differenzierung anpassen können. In zukünftigen Studien sollte geklärt werden, ob die differenzierten

Zellen drei eigenständige Zelltypen darstellen, die jeweils auf die Resorption eines spezifischen Hartgewebes spezialisiert sind, oder ob es sich um einen einheitlichen Zelltyp handelt, der sich in Form einer veränderten Genexpression an die spezifische Umgebung anpasst.

Die Identifizierung von Schlüsselmolekülen, die gezielt durch den Einfluss von Dentin und Zement reguliert werden, bietet wertvolle Einblicke in die molekularen Mechanismen von EAWR. Besonders die Moleküle CXCL2, GDF15 und HSPA1b erweisen sich als vielversprechende Biomarker, die Aufschluss über das Vorliegen von EAWR geben könnten. Im klinischen Alltag könnte der Nachweis dieser Biomarker im Sulkusfluid von Patienten eine innovative diagnostische Methode für EAWR darstellen, die routinemäßig in die kieferorthopädische Therapie integriert werden könnte. Im Vergleich zur herkömmlichen Röntgendiagnostik würde dies eine strahlungsfreie Diagnostik gewährleisten, durch die bereits initiale Stadien erkannt und eine frühzeitige Intervention ermöglicht würden. Zudem könnte eine differenzierte Diagnostik zwischen aktiven und inaktiven Läsionen gewährleistet werden.

5. Zusammenfassung

Externe apikale Wurzelresorptionen (EAWR) gelten als schwerwiegende Komplikation einer kieferorthopädischen Therapie. Der irreversible Hartgewebeverlust wird durch Osteoklasten-ähnliche Zellen verursacht, die morphologische und funktionelle Ähnlichkeiten mit Osteoklasten aufweisen und wahrscheinlich aus einer gemeinsamen hämatopoetischen Vorläuferzelle hervorgehen. Die ursächlichen Faktoren, die den Differenzierungsweg dieser Zellen bestimmen, sind bislang jedoch nicht bekannt.

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Fragestellung, inwiefern drei verschiedene orale Hartgewebe den Differenzierungsprozess von Osteoklasten modulieren. Hierfür wurden Vorläuferzellen einer murinen Makrophagen-Zelllinie auf hergestellten Pulversubstraten aus Knochen, Dentin und Zement kultiviert und durch den Einfluss von RANKL und M-CSF zur Differenzierung stimuliert. Als Stimulations- bzw. Negativkontrolle wurden Zellen ohne Hartgewebeeinfluss mit bzw. ohne Stimulation kultiviert. Auf Basis einer zuvor durchgeführten genomweiten Sequenzierung (Ibrahim, 2020) wurden auffällig regulierte Zielgene (HSPA1b, GDF15, CXCL2, IGF-1, ACP5, CTSK und OSCAR) für weitere Gen- und Proteinexpressionsanalysen mittels RT-PCR und ELISA-Tests ausgewählt. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Einweg-ANOVA. Mehrfachvergleiche wurden durch Anwendung des Tukey Post-hoc-Tests durchgeführt ($p < 0,05$). Ein besonders interessantes Ergebnis lieferte die Expressionsanalyse des Hitzeschockproteins HSPA1b, welches im Rahmen der Kultivierung auf Zement sowohl auf Gen- als auch auf Proteinebene auffällig stark exprimiert wurde. Darüber hinaus zeigte sich eine deutliche Expressionssteigerung von GDF15 in den Kulturen auf Dentin im Vergleich zur negativen Kontrollgruppe. Die GDF15-Proteinkonzentration im Zellüberstand der Dentin-Kulturen war zudem gegenüber der Stimulationskontrolle signifikant erhöht. Auf mRNA- und Proteinebene konnte nachgewiesen werden, dass die Expression des Entzündungsmediators CXCL2 besonders im Rahmen der Zellkultivierung auf Dentin signifikant hochreguliert wurde. In allen stimulierten Versuchsgruppen ließ sich eine negative Regulation der IGF-1-Expression im Vergleich zur nicht stimulierten Kontrollgruppe feststellen. Verglichen zur Stimulationskontrolle war die Genexpression von IGF-1 lediglich in den Kulturen auf Dentin signifikant erhöht. Die Osteoklasten-spezifischen Moleküle ACP5, CTSK und OSCAR zeigten besonders auf

Zement eine verstärkte Expression. Die vorliegenden Ergebnisse verdeutlichen, dass verschiedene orale Hartgewebe einen signifikanten Einfluss auf die Expression essenzieller Wachstumsfaktoren und Entzündungsmediatoren während der Differenzierung von Osteoklasten-ähnlichen Zellen haben und offensichtlich eine wichtige Rolle beim Differenzierungsprozess dieser Zellen spielen. Die verstärkte Expression des Hitzeschockproteins HSPA1b könnte auf autoregulative Mechanismen in Osteoklasten-ähnlichen Zellen hindeuten, die in Kontakt mit der Zementoberfläche treten. Dies könnte eine wichtige Abwehrfunktion von Zement gegenüber EAWR darstellen. Die Kenntnis über beteiligte Zielgene soll helfen, die molekularen Mechanismen von EAWR besser zu verstehen und durch die Etablierung neuer diagnostischer Verfahren initiale Resorptionsprozesse frühzeitig zu erkennen.

6. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Vereinfachtes Schema der orthodontischen Zahnbewegung (modifiziert nach Hennemann et al., 2008)	14
Abb. 2:	Phasen der orthodontischen Zahnbewegung (modifiziert nach Proffit et al., 2019)	15
Abb. 3:	Schematischer Aufbau einer aktiven Osteoklastenzelle (modifiziert nach Stenbeck, 2002)	20
Abb. 4:	Phasen der Osteoklastogenese (modifiziert nach Kim et al., 2020)	21
Abb. 5:	Wichtige M-CSF (a) und RANKL-Signalwege (b) während der Osteoklasto-genese (modifiziert nach Feng und Teitelbaum, 2013)	23
Abb. 6:	Modell des Integrin $\alpha_v\beta_3$ -vermittelten Signalwegs in Osteoklasten (modifiziert nach Feng und Teitelbaum, 2013)	25
Abb. 7:	Kieferorthopädisch induzierte EAWR an einem Fallbeispiel	28
Abb. 8:	Histologische Darstellung von EAWR nach orthodontischer Krafteinwirkung (modifiziert nach Brudvik und Rygh, 1994b; Maltha et al., 2015)	30
Abb. 9:	Vereinfachtes Modell der Osteoklasto- bzw. Odontoklastogenese während orthodontischer Kraftapplikation	31
Abb. 10:	Hergestellte Hartgewebepulver	34
Abb. 11:	Rasterelektronenmikroskop	35
Abb. 12:	Darstellung der Hartgewebepulver mittels Rasterelektronen- mikroskopie in 25-facher und 250-facher Vergrößerung	36
Abb. 13:	Darstellung der Versuchsgruppen	37
Abb.14:	Makrophagenkulturen auf unterschiedlichen Substraten nach 12-tägiger Stimulation	38
Abb. 15:	ELISA-Mikrotiterplatten nach Farbreaktion	50
Abb. 16:	HSPA1b-Genexpression (modifiziert nach Both et al.)	51
Abb. 17:	GDF15-Genexpression (modifiziert nach Both et al.)	52
Abb. 18:	CXCL2-Genexpression (modifiziert nach Both et al.)	53
Abb. 19:	IGF-1-Genexpression (modifiziert nach Both et al.)	54
Abb. 20:	ACP5-Genexpression	55

Abb. 21:	CTSK-Genexpression	56
Abb. 22:	OSCAR-Genexpression	57
Abb. 23:	HSPA1b-Konzentration im Zellüberstand (modifiziert nach Both et al.)	58
Abb. 24:	GDF15- Konzentration im Zellüberstand (modifiziert nach Both et al.)	59
Abb. 25:	CXCL2- Konzentration im Zellüberstand (modifiziert nach Both et al.)	60
Abb. 26:	IGF-1- Konzentration im Zellüberstand (modifiziert nach Both et al.)	61

7. Tabellenverzeichnis

Tab. 1:	Übersicht über mögliche patienten- und therapiebezogene Risikofaktoren für EAWR	29
Tab. 2:	Auflistung der für die RT-PCR verwendeten QuantiTect® Primer Assays	43
Tab. 3:	Reaktionsansatz Mastermix	44
Tab. 4:	RT-PCR-Protokoll für QuantiTect® Primer Assays	44
Tab. 5:	Auflistung der verwendeten ELISA-Kits	45
Tab. 6:	Verdünnungsreihe Mouse CXCL2/ MIP-2 Immunoassay (R&D Systems, Minneapolis, USA)	46
Tab. 7:	Verdünnungsreihe Mouse/ Rat IGF-1 Immunoassay (R&D Systems, Minneapolis, USA)	46
Tab. 8:	Verdünnungsreihe Mouse GDF15 DuoSet ELISA (R&D Systems, Minneapolis, USA)	47
Tab. 9:	Verdünnungsreihe HSPA1b ELISA Kit (BT LAB, Shanghai, China)	47

8. Literaturverzeichnis

Abass SK, Hartsfield JK Jr. Orthodontics and External Apical Root Resorption. *Semin Orthod* 2007; 13: 246-256

Aidos H, Diogo P, Santos JM. Root Resorption Classifications: A Narrative Review and a Clinical Aid Proposal for Routine Assessment. *Eur Endod J* 2018; 3: 134-145

Alhashimi N, Frithiof L, Brudvik P, Bakhiet M. Chemokines are upregulated during orthodontic tooth movement. *J Interferon Cytokine Res* 1999; 19: 1047-1052

Artika IM, Dewi YP, Nainggolan IM, Siregar JE, Antonjaya U. Real-Time Polymerase Chain Reaction: Current Techniques, Applications, and Role in COVID-19 Diagnosis. *Genes (Basel)* 2022; 13: 2387

Baron R, Neff L, Tran Van P, Nefussi JR, Vignery A. Kinetic and cytochemical identification of osteoclast precursors and their differentiation into multinucleated osteoclasts. *Am J Pathol* 1986; 122: 363-378

Barrow AD, Raynal N, Andersen TL, Slatter DA, Bihan D, Pugh N, Cella M, Kim T, Rho J, Negishi-Koga T, Delaisse JM, Takayanagi H, Lorenzo J, Colonna M, Farndale RW, Choi Y, Trowsdale J. OSCAR is a collagen receptor that costimulates osteoclastogenesis in DAP12-deficient humans and mice. *J Clin Invest* 2011; 121: 3505-3516

Bernhardt A, Skottke J, von Witzleben M, Gelinsky M. Triple Culture of Primary Human Osteoblasts, Osteoclasts and Osteocytes as an In Vitro Bone Model. *Int J Mol Sci* 2021; 22: 7316

Behnaz M, Mohammad-Rahimi H, Javaheri F, Omrani MD, Noroozi R, Taheri M. The rs1143634 of IL-1 β gene is associated with external apical root resorption in Iranian population. *Meta Gene* 2020; 24: 100711

Bootcov MR, Bauskin AR, Valenzuela SM, Moore AG, Bansal M, He XY, Zhang HP, Donnellan M, Mahler S, Pryor K, Walsh BJ, Nicholson RC, Fairlie WD, Por SB, Robbins JM, Breit SN. MIC-1, a novel macrophage inhibitory cytokine, is a divergent member of the TGF-beta superfamily. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94: 11514-11519

Boskey AL, Posner AS. Bone structure, composition, and mineralization. *Orthop Clin North Am* 1984; 15: 597-612

Bosshardt DD, Sculean A. Does periodontal tissue regeneration really work? *Periodontol* 2000 2009; 51: 208-219

Both A, Ibrahim G, Marciniak J, Rath-Deschner B, Calvano Küchler E, Kirschneck C, Gözl L, Jäger A, Beisel-Memmert S. Bone, dentin and cementum differentially influence the differentiation of osteoclast-like cells. *Sci Rep* 2025; 15:19857

Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL. Osteoclast differentiation and activation. *Nature* 2003; 423: 337-342

Brezniak N, Wasserstein A. Orthodontically induced inflammatory root resorption. Part I: The basic science aspects. *Angle Orthod* 2002; 72: 175-179

Brudvik P, Rygh P. Multi-nucleated cells remove the main hyalinized tissue and start resorption of adjacent root surfaces. *Eur J Orthod* 1994a; 16: 265-273

Brudvik P, Rygh P. Root resorption beneath the main hyalinized zone. *Eur J Orthod* 1994b; 16: 249-263

Charles JF, Aliprantis AO. Osteoclasts: more than “bone eaters”. *Trends Mol Med* 2014; 20: 449-459

Choi, H, Yang, L, Liu, Y. Npp1 prevents external tooth root resorption by regulation of cervical cementum integrity. *Sci Rep* 2022; 12: 21158.

Choi H, Yang L, Liu Y, Jeong JK, Cho ES, 2023. Inactivation of Sufu in cementoblasts accelerates external tooth root resorption. *J Cell Physiol* 2023; 238: 447-458

Collin-Osdoby P, Osdoby P. RANKL-mediated osteoclast formation from murine RAW 264.7 cells. *Methods Mol Biol* 2012; 816: 187-202

Daugaard M, Rohde M, Jäättelä M. The heat shock protein 70 family: Highly homologous proteins with overlapping and distinct functions. *FEBS Lett* 2007; 581: 3702-3710

Domon S, Shimokawa H, Matsumoto Y, Yamaguchi S, Soma K. In situ hybridization for matrix metalloproteinase-1 and cathepsin K in rat root-resorbing tissue induced by tooth movement. *Arch Oral Biol* 1999; 44: 907-915

Everts V, Delaissé JM, Korper W, Jansen DC, Tigchelaar-Gutter W, Saftig P, Beertsen W. The bone lining cell: its role in cleaning Howship's lacunae and initiating bone formation. *J Bone Miner Res* 2002; 17: 77-90

Feller L, Khammissa RA, Thomadakis G, Fourie J, Lemmer J. Apical External Root Resorption and Repair in Orthodontic Tooth Movement: Biological Events. *Biomed Res Int* 2016; 2016: 4864195

Feng X, McDonald JM. Disorders of bone remodeling. *Annu Rev Pathol* 2011; 6: 121-145

Feng X, Teitelbaum SL. Osteoclasts: New Insights. *Bone Res* 2013; 1: 11-26

Fiorelli G, Formigli L, Zecchi Orlandini S, Gori F, Falchetti A, Morelli A, Tanini A, Benvenuti S, Brandi ML. Characterization and function of the receptor for IGF-I in human preosteoclastic cells. *Bone* 1996; 18: 269-276

Friedrichsdorf SP, Chavez VEA, Bradaschia-Correa V, Cattaneo PM, Dominguez GC. Infrared Light-Emitting Diode (LED) Effects on Orthodontic Tooth Movement. *Braz Dent J* 2019; 30: 410-416

Fuller K, Owens JM, Jagger CJ, Wilson A, Moss R, Chambers TJ. Macrophage colony-stimulating factor stimulates survival and chemotactic behavior in isolated osteoclasts. *J Exp Med* 1993; 178: 1733-1744

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. *Angle Orthod* 2008; 78: 502-509

Götz W, Heinen M, Lossdörfer S, Jäger A. Immunohistochemical localization of components of the insulin-like growth factor system in human permanent teeth. *Arch Oral Biol* 2006; 51: 387-395

Ha J, Choi H, Lee Y, Kwon HJ, Song YW, Kim HH. CXC chemokine ligand 2 induced by receptor activator of NF-kappa B ligand enhances osteoclastogenesis. *J Immunol* 2010; 184: 4717-4724

Hamilton JA. Colony-stimulating factors in inflammation and autoimmunity. *Nat Rev Immunol* 2008; 8: 533-544

Han G, Huang S, Von den Hoff JW, Zeng X, Kuijpers-Jagtman AM. Root resorption after orthodontic intrusion and extrusion: an intraindividual study. *Angle Orthod* 2005; 75: 912-918

Han X, Amar S. IGF-1 signaling enhances cell survival in periodontal ligament fibroblasts vs. gingival fibroblasts. *J Dent Res* 2003; 82: 454-459

Harry MR, Sims MR. Root resorption in bicuspid intrusion. A scanning electron microscope study. *Angle Orthod* 1982; 52: 235-258

Hayman AR, Jones SJ, Boyde A, Foster D, Colledge WH, Carlton MB, Evans MJ, Cox TM. Mice lacking tartrate-resistant acid phosphatase (Acp 5) have disrupted endochondral ossification and mild osteopetrosis. *Development* 1996; 122: 3151-3162

Haywood J, Qi J, Chen CC, Lu G, Liu Y, Yan J, Shi Y, Gao GF. Structural basis of collagen recognition by human osteoclast-associated receptor and design of osteoclastogenesis inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2016; 113: 1038-1043

Heboyen A, Avetisyan A, Karobari MI, Marya A, Khurshid Z, Rokaya D, Zafar MS, Fernandes GVO. Tooth root resorption: A review. *Sci Prog* 2022; 105: 368504221109217

Henneman S, Von den Hoff JW, Maltha JC. Mechanobiology of tooth movement. *Eur J Orthod* 2008; 30: 299-306

Hinoi E, Ochi H, Takarada T, Nakatani E, Iezaki T, Nakajima H, Fujita H, Takahata Y, Hidano S, Kobayashi T, Takeda S, Yoneda Y. Positive regulation of osteoclastic differentiation by growth differentiation factor 15 upregulated in osteocytic cells under hypoxia. *J Bone Miner Res* 2012; 27: 938-949

Hofbauer LC, Heufelder AE. Role of receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand and osteoprotegerin in bone cell biology. *J Mol Med (Berl)* 2001; 79: 243-253

Horton MA, Massey HM, Rosenberg N, Nicholls B, Seligsohn U, Flanagan AM. Upregulation of osteoclast alpha2beta1 integrin compensates for lack of alphavbeta3 vitronectin receptor in Iraqi-Jewish-type Glanzmann thrombasthenia. *Br J Haematol* 2003; 122: 950-957

Hou P, Sato T, Hofstetter W, Foged NT. Identification and characterization of the insulin-like growth factor I receptor in mature rabbit osteoclasts. *J Bone Miner Res* 1997; 12: 534-540

Hu R, Sharma SM, Bronisz A, Srinivasan R, Sankar U, Ostrowski MC. Eos, MITF, and PU.1 recruit corepressors to osteoclast-specific genes in committed myeloid progenitors. *Mol Cell Biol* 2007; 27: 4018-4027

Ibrahim G. Genome-wide transcriptome induced in osteoclast-like cells differentiated on three different hard tissues. - Bonn, 2020. - Dissertation, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn. Online-Ausgabe in bonndoc:

<https://nbn-resolving.org/urn:nbn:de:hbz:5-58038>

Iglesias-Linares A, Hartsfield JK Jr. Cellular and Molecular Pathways Leading to External Root Resorption. J Dent Res 2017; 96: 145-152

Iglesias-Linares A, Morford LA, Hartsfield JK Jr. Bone Density and Dental External Apical Root Resorption. Curr Osteoporos Rep 2016; 14: 292-309

Inubushi T, Tanaka E, Rego EB, Ohtani J, Kawazoe A, Tanne K, Miyauchi M, Takata T. Ultrasound stimulation attenuates resorption of tooth root induced by experimental force application. Bone 2013; 53: 497-506

Itzstein C, Coxon FP, Rogers MJ. The regulation of osteoclast function and bone resorption by small GTPases. Small GTPases 2011; 2: 117-130

Jäger A, Kunert D, Friesen T, Zhang D, Lossdörfer S, Götz W. Cellular and extracellular factors in early root resorption repair in the rat. Eur J Orthod 2008; 30: 336-345

Jäger A, Radlanski RJ, Götz W. Demonstration of cells of the mononuclear phagocyte lineage in the periodontium following experimental tooth movement in the rat. An immunohistochemical study using monoclonal antibodies ED1 und ED2 on paraffin-embedded tissues. Histochemistry 1993; 100: 161-166

Janckila AJ, Yam LT. Biology and clinical significance of tartrate-resistant acid phosphatases: new perspectives on an old enzyme. Calcif Tissue Int 2009; 85: 465-483

Jiang RP, McDonald JP, Fu MK. Root resorption before and after orthodontic treatment: a clinical study of contributory factors. Eur J Orthod 2010; 32: 693-697

Jones SJ, Boyde A. Histomorphometry of Howship's lacunae formed in vivo and in vitro: depths and volumes measured by scanning electron and confocal microscopy. *Bone* 1993; 14: 455-460

Khosla S, Oursler MJ, Monroe DG. Estrogen and the skeleton. *Trends Endocrinol Metab* 2012; 23: 576-581

Kim JM, Lin C, Stavre Z, Greenblatt MB, Shim JH. Osteoblast-Osteoclast Communication and Bone Homeostasis. *Cells* 2020; 9: 2073

Kleinhans C, Schmid FF, Kluger PJ. Comparison of osteoclastogenesis and resorption activity of human osteoclasts on tissue culture polystyrene and on natural extracellular bone matrix in 2D and 3D. *J Biotechnol* 2015; 205: 101-110

Kodama J, Kaito T. Osteoclast Multinucleation: Review of Current Literature. *Int J Mol Sci* 2020; 21: 5685

Kong L, Smith W, Hao D. Overview of RAW264.7 for osteoclastogenesis study: Phenotype and stimuli. *J Cell Mol Med* 2019; 23: 3077-3087

Maltha JC, Vandeyska-Radunovic V, Kuijpers-Jagtman AM. The biological background of relapse of orthodontic tooth movement. In: Krishnan V, Davidovitch Z, Hrsg. *Biological Mechanisms of Tooth Movement*, second edition. New Jersey: Wiley-Blackwell, 2015: 252

Lancaster GI, Febbraio MA. Exosome-dependent trafficking of HSP70: a novel secretory pathway for cellular stress proteins. *J Biol Chem* 2005; 280: 23349-23355

Lazowski DA, Fraher LJ, Hodsman A, Steer B, Modrowski D, Han VK. Regional variation of insulin-like growth factor-I gene expression in mature rat bone and cartilage. *Bone* 1994; 15: 563-576

Lee JW, Lee IH, Iimura T, Kong SW. Two macrophages, osteoclasts and microglia: from development to pleiotropy. *Bone Res* 2021; 9: 11

Li C, Fan M, Tang Z. Detection of types I, III and IV collagen in human cementum, periodontal ligament and alveolar bone. *Zhonghua Kou Qiang Yi Xue Za Zhi* 1997; 32: 70-72

Li S, Li Q, Zhu Y, Hu W. GDF15 induced by compressive force contributes to osteoclast differentiation in human periodontal ligament cells. *Exp Cell Res* 2020; 387: 111745

Li Y, Jacox LA, Little SH, Ko CC. Orthodontic tooth movement: The biology and clinical implications. *Kaohsiung J Med Sci* 2018; 34: 207-214

Li Y, Zhan Q, Bao M, Yi J, Li Y. Biomechanical and biological responses of periodontium in orthodontic tooth movement: up-date in a new decade. *Int J Oral Sci* 2021; 13: 20

Licini C, Vitale-Brovarone C, Mattioli-Belmonte M. Collagen and non-collagenous proteins molecular crosstalk in the pathophysiology of osteoporosis. *Cytokine Growth Factor Rev* 2019; 49: 59-69

Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method. *Methods* 2001; 25: 402-408

Luo X, Zuo X, Zhou Y, Zhang B, Shi Y, Liu M, Wang K, McMillian DR, Xiao X. Extracellular heat shock protein 70 inhibits tumour necrosis factor-alpha induced proinflammatory mediator production in fibroblast-like synoviocytes. *Arthritis Res Ther* 2008; 10: R41

Ma Z, Tang X, Chen Y, Wang H, Li Y, Long Y, Liu R. Epimedii Folium and Ligustri Lucidi Fructus Promote Osteoblastogenesis and Inhibit Osteoclastogenesis against Osteoporosis via Acting on Osteoblast-Osteoclast Communication. *Oxid Med Cell Longev* 2023; 2023: 7212642

Mah J, Prasad N. Dentine phosphoproteins in gingival crevicular fluid during root resorption. *Eur J Orthod* 2004; 26: 25-30

Malmgren O, Goldson L, Hill C, Orwin A, Petrini L, Lundberg M. Root resorption after orthodontic treatment of traumatized teeth. *Am J Orthod* 1982; 82: 487-491

Marciniak J, Lossdörfer S, Kirschneck C, Deschner J, Jäger A, Wolf M. Heat shock protein 70 dampens the inflammatory response of human PDL cells to mechanical loading in vitro. *J Periodontal Res* 2019; 54: 481-488

Marie PJ. Bone cell-matrix protein interactions. *Osteoporos Int* 2009; 20: 1037-1042

McHugh, KP, Hodivala-Dilke, K, Zheng, MH, Namba, N, Lam, J, Novack, D, Feng, X, Ross, FP, Hynes, RO, Teitelbaum, SL. Mice lacking beta3 integrins are osteosclerotic because of dysfunctional osteoclasts. *J. Clin. Investig* 2000; 105: 433–440

McKee MD, Zalzal S, Nanci A. Extracellular matrix in tooth cementum and mantle dentin: localization of osteopontin and other noncollagenous proteins, plasma proteins, and glycoconjugates by electron microscopy. *Anat Rec* 1996; 245: 293-312

McNab S, Battistutta D, Taverne A, Symons AL. External apical root resorption of posterior teeth in asthmatics after orthodontic treatment. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 1999; 116: 545-551

Mitsuhashi M, Yamaguchi M, Kojima T, Nakajima R, Kasai K. Effects of HSP70 on the compression force-induced TNF- α and RANKL expression in human periodontal ligament cells. *Inflamm Res* 2011; 60: 187-194

Motokawa M, Sasamoto T, Kaku M, Kawata T, Matsuda Y, Terao A, Tanne K. Association between root resorption incident to orthodontic treatment and treatment factors. *Eur J Orthod* 2012; 34: 350-356

Nakai Y, Praneetpong N, Ono W, Ono N. Mechanisms of Osteoclastogenesis in Orthodontic Tooth Movement and Orthodontically Induced Tooth Root Resorption. *J Bone Metab* 2023; 30: 297-310

Ogbodo E, Michelangeli F, Williams JHH. Exogenous heat shock proteins HSPA1A and HSPB1 regulate TNF- α , IL-1 β and IL-10 secretion from monocytic cells. *FEBS Open Bio* 2023; 13: 1922-1940

Ohba Y, Ohba T, Terai K, Moriyama K. Expression of cathepsin K mRNA during experimental tooth movement in rat as revealed by in situ hybridization. *Arch Oral Biol* 2000; 45: 63-69

Orsini G, Ruggeri Jr A, Mazzoni A, Nato F, Manzoli L, Putignano A, Di Lenarda R, Tjäderhane L, Breschi L. Non-collagenous proteins of dentin. *Endod Topics* 2009, 21: 1-18

Oshiro T, Shibasaki Y, Martin TJ, Sasaki T. Immunolocalization of vacuolar-type H⁺-ATPase, cathepsin K, matrix metalloproteinase-9, and receptor activator of NF κ B ligand in odontoclasts during physiological root resorption of human deciduous teeth. *Anat Rec* 2001; 264: 305-311

Ozkalayci N, Karadeniz EI, Elekdag-Turk S, Turk T, Cheng LL, Darendeliler MA. Effect of continuous versus intermittent orthodontic forces on root resorption: A microcomputed tomography study. *Angle Orthod* 2018; 88: 733-739

Patel S, Ricucci D, Durak C, Tay F. Internal root resorption: a review. *J Endod* 2010; 36: 1107-1121

Peker RB, Meriç P. Evaluation of External Apical Root Resorption in Cases with Extraction and Non-Extraction Fixed Orthodontic Treatment. *Diagnostics (Basel)* 2024; 14: 2338

Pinheiro LHM, Marañón-Vásquez GA, Antunes LS, Proff P, Paddenbergb E, Kirschneck C, Cavalcante-Leão BL, Baratto-Filho F, Kuchler EC, Antunes LAA. Investigation of the association between COX-2 polymorphisms and external apical root resorption in orthodontically treated patients. *Clin Oral Investig* 2024; 28: 676

Purdue PE, Crotti TN, Shen Z, Swantek J, Li J, Hill J, Hanidu A, Dimock J, Nabozny G, Goldring SR, McHugh KP. Comprehensive profiling analysis of actively resorbing osteoclasts identifies critical signaling pathways regulated by bone substrate. *Sci Rep* 2014; 4: 7595

Rath-Deschner B, Nogueira AVB, Beisel-Memmert S, Nokhbehaim M, Eick S, Cirelli JA, Deschner J, Jäger A, Damanaki A. Interaction of periodontitis and orthodontic tooth movement – an in vitro and in vivo study. *Clin Oral Investig* 2022; 26: 171-181

Reitan K. Biomechanische Prinzipien der Gewebsreaktion. In: Graber TM, Hrsg. *Grundlagen und moderne Techniken der Kieferorthopadie*. Berlin: Quintessenz; 1989: 49-270

Ririe KM, Rasmussen RP, Wittwer CT. Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. *Anal Biochem* 1997; 24: 154-160

Rucci N, Teti A. The “love-hate” relationship between osteoclasts and bone matrix. *Matrix Biol* 2016; 52-54: 176-190

Rumpler M, Würger T, Roschger P, Zwettler E, Peterlik H, Fratzl P, Klaushofer K. Microcracks and osteoclast resorption activity in vitro. *Calcif Tissue Int* 2012; 90: 230-238

Rumpler M, Würger T, Roschger P, Zwettler E, Sturmlechner I, Altmann P, Fratzl P, Rogers MJ, Klaushofer K. Osteoclasts on bone and dentin in vitro: mechanism of trail formation and comparison of resorption behavior. *Calcif Tissue Int* 2013; 93: 526-539

Rygh P. Orthodontic root resorption studied by electron microscopy. *Angle Orthod*. 1977; 47: 1-16

Rygh P, Moxham BJ, Berkovitz B. The effects of external forces on the periodontal ligament: the response to horizontal loads. In: Berkowitz B, Moxham BJ, Newman HN, Hrsg. *The Periodontal Ligament in Health and Disease*. Oxford: Pergamon Press, 1982: 269-290

Sameshima GT, Iglesias-Linares A. Orthodontic root resorption. *J World Fed Orthod* 2021; 10: 135-143

Sameshima GT, Sinclair PM. Predicting and preventing root resorption: Part I. Diagnostic factors. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2001; 119: 505-510

Savoldi F, Bonetti S, Dalessandri D, Mandelli G, Paganelli C. Incisal Apical Root Resorption Evaluation after Low-Friction Orthodontic Treatment Using Two-Dimensional Radiographic Imaging and Trigonometric Correction. *J Clin Diagn Res* 2015; 9: ZC70-74

Shi H, Zhou Y, Jia E, Pan M, Bai Y, Ge Q. Bias in RNA-seq Library Preparation: Current Challenges and Solutions. *Biomed Res Int* 2021; 2021: 6647597

Stenbeck G. Formation and function of the ruffled border in osteoclasts. *Semin Cell Dev Biol* 2002; 13: 285-292

Stenvik A, Mjör IA. Pulp and dentine reactions to experimental tooth intrusion. A histologic study of the initial changes. *Am J Orthod* 1970; 57: 370-385

Swathi S, Arjun MR, Subair K, Geethika, Rohith. Cementum Proteins: The Foundation of Dental Health. *EC Dental Science* 2024; 23.10: 1-5

Symmank J, Zimmermann S, Goldschmitt J, Schiegnitz E, Wolf M, Wehrbein H, Jacobs C. Mechanically-induced GDF15 Secretion by Periodontal Ligament Fibroblasts Regulates Osteogenic Transcription. *Sci Rep* 2019; 9: 11516

Takito J, Inoue S, Nakamura M. The Sealing Zone in Osteoclasts: A Self-Organized Structure on the Bone. *Int J Mol Sci* 2018; 19: 984

Teitelbaum SL. Osteoclasts, integrins, and osteoporosis. *J Bone Miner Metab* 2000; 18: 344-349

Terpos E, Szydlo R, Apperley JF, Hatjiharissi E, Politou M, Meletis J. Soluble receptor activator of nuclear factor kappaB ligand-osteoprotegerin ratio predicts survival in multiple myeloma: proposal for a novel prognostic index. *Blood* 2003; 10: 1064-1069

Thulasidharan MU, Vijayaraghavan N, Krishnan V. Heat shock protein 70 and the extent of nuclear damage in periodontal ligament compression side cells with orthodontic force application - An ex-vivo evaluation. *Int Orthod* 2021; 19: 487-493

Väänänen HK, Horton M. The osteoclast clear zone is a specialized cell-extracellular matrix adhesion structure. *J Cell Sci* 1995; 108: 2729-2732

Vitale M, Ligorio C, Richardson SM, Hoyland JA, Bella J. Collagen-like Osteoclast-Associated Receptor (OSCAR)-Binding Motifs Show a Co-Stimulatory Effect on Osteoclastogenesis in a Peptide Hydrogel System. *Int J Mol Sci* 2023; 25: 445

Wang H, Li T, Wang X, Yin X, Zhao N, Zou S, Duan P, Bonewald LF. The role of sphingosine-1-phosphate signaling pathway in cementocyte mechanotransduction. *Biochem Biophys Res Commun* 2020; 523: 595-601

Wang X, Sun L, He N, An Z, Yu R, Li C, Li Y, Li Y, Liu X, Fang X, Zhao J. Increased expression of CXCL2 in ACPA-positive rheumatoid arthritis and its role in osteoclastogenesis. *Clin Exp Immunol* 2021; 203: 194-208

Wang Y, Nishida S, Elalieh HZ, Long RK, Halloran BP, Bikle DD. Role of IGF-I signaling in regulating osteoclastogenesis. *J Bone Miner Res* 2006; 21:1350-1358

Wang Z, McCauley LK. Osteoclasts and odontoclasts: signaling pathways to development and disease. *Oral Dis* 2011; 17: 129-142

Wehrbein H, Harhoff R, Diedrich P. Rates of root resorption in orthodontically moved, periodontally affected and healthy teeth. *Dtsch Zahnarzt Z* 1990; 45: 176-178

Weltman B, Vig KW, Fields HW, Shanker S, Kaizar EE. Root resorption associated with orthodontic tooth movement: a systematic review. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2010; 137: 462-476

Wen X, Yi LZ, Liu F, Wei JH, Xue Y. The role of cathepsin K in oral and maxillofacial disorders. *Oral Dis* 2016; 22: 109-115

Westhlin M, Moen SH, Holien T, Mylin AK, Heickendorff L, Olsen OE, Sundan A, Turesson I, Gimsing P, Waage A, Standal T. Growth differentiation factor 15 (GDF15) promotes osteoclast differentiation and inhibits osteoblast differentiation and high serum GDF15 levels are associated with multiple myeloma bone disease. *Haematologica* 2015; 100: e511-514

Wiktor-Jedrzejczak W, Bartocci A, Ferrante AW Jr, Ahmed-Ansari A, Sell KW, Pollard JW, Stanley ER. Total absence of colony-stimulating factor 1 in the macrophage-deficient osteopetrotic (op/op) mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990; 87: 4828-4832

Proffit WR. The Biologic Basis of Orthodontic Therapy. In: Proffit WR, Fields HW, Larson BE, Sarver DM, Hrsg. *Contemporary orthodontics*, sixth edition. Amsterdam: Elsevier, 2019: 248-275

Wolf M, Marciniak J, Lossdörfer S, Kirschneck C, Brauner I, Götz W, Jäger A. Role of HSP70 protein in human periodontal ligament cell function and physiology. *Ann Anat* 2019; 221: 76-83

Xu X, Tang Y, Lang Y, Liu Y, Cheng W, Xu H, Liu Y. Oral Exposure to ZnO Nanoparticles Disrupt the Structure of Bone in Young Rats via the OPG/RANK/RANKL/IGF-1 Pathway *Int J Nanomedicine* 2020; 15: 9657-9668

Yassir YA, McIntyre GT, Bearn DR. Orthodontic treatment and root resorption: an overview of systematic reviews. *Eur J Orthod* 2021; 43: 442-456

Yasuda H, Shima N, Nakagawa N, Yamaguchi K, Kinosaki M, Mochizuki S, Tomoyasu A, Yano K, Goto M, Murakami A, Tsuda E, Morinaga T, Higashio K, Udagawa N, Takahashi N, Suda T. Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95: 3597-3602

Zhang W, Shen X, Wan C, Zhao Q, Zhang L, Zhou Q, Deng L. Effects of insulin and insulin-like growth factor 1 on osteoblast proliferation and differentiation: differential signalling via Akt and ERK. *Cell Biochem Funct* 2012; 30: 297-302

Zhao N, Nociti FH Jr, Duan P, Prideaux M, Zhao H, Foster BL, Somerman MJ, Bonewald LF. Isolation and Functional Analysis of an Immortalized Murine Cementocyte Cell Line, IDG-CM6. *J Bone Miner Res* 2016; 31: 430-442

Zou W, Teitelbaum SL. Integrins, growth factors, and the osteoclast cytoskeleton. *Ann N Y Acad Sci* 2010; 1192: 27-31

9. Erklärung zum Eigenanteil

Die Arbeit wurde in der Poliklinik für Kieferorthopädie des Universitätsklinikums Bonn unter der Betreuung von Frau Priv.-Doz. Dr. Svenja Beisel-Memmert durchgeführt.

Die Idee und Konzeption der Studie erfolgte durch Herrn Prof. Dr. Andreas Jäger und Frau Priv.-Doz. Dr. Svenja Beisel-Memmert.

Die Versuche wurden nach intensiver Einarbeitung und unter stetiger Betreuung durch Frau Ph.D. Jana Marciniak von mir eigenständig durchgeführt.

Die statistische Auswertung erfolgte mit Unterstützung durch Frau Priv.-Doz. Dr. Svenja Beisel-Memmert.

Die Literaturrecherche sowie die Interpretation und Diskussion der erhobenen Ergebnisse im wissenschaftlichen Kontext bestehender Publikationen wurde eigenständig von mir durchgeführt.

Ich versichere, die vorliegende Dissertationsschrift selbstständig verfasst und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

10. Veröffentlichungen

Teile der in dieser Dissertationsschrift dargestellten Inhalte und Ergebnisse wurden in folgender Publikation veröffentlicht:

Both A, Ibrahim G, Marciniak J, Rath-Deschner B, Calvano Küchler E, Kirschneck C, Götz L, Jäger A, Beisel-Memmert S. Bone, dentin and cementum differentially influence the differentiation of osteoclast-like cells. Sci Rep 2025; 15:19857

<https://doi.org/10.1038/s41598-025-04874-9>

11. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen herzlich bedanken, die mich auf dem Weg meiner Promotion begleitet haben.

Mein besonderer Dank gilt meiner Doktormutter, Frau Priv.-Doz. Dr. med. dent. Svenja Beisel-Memmert, für die unermüdliche Unterstützung und Bereitschaft, mir zu jeder Tageszeit mit offenem Ohr beiseite zu stehen. Danke für die wertvollen Einblicke in die Forschung, die Du mir ermöglicht hast. Ich freue mich auf weitere gemeinsame Projekte!

Herrn Prof. Dr. med. dent. Andreas Jäger möchte ich aufrichtig für die Ermöglichung und das Vertrauen danken, dieses spannende Forschungsprojekt weiterführen zu dürfen. Darüber hinaus danke ich Ihnen für die Finanzierung dieser Studie, ohne die die Forschungsarbeit in diesem Umfang nicht realisierbar gewesen wäre.

Frau Ph.D. Jana Marciniak danke ich herzlich für die liebevolle und vor allem geduldige Einführung und Betreuung im biologischen Forschungslabor.

Ein weiterer Dank gilt Herrn Dr. med. dent. Ghosn Ibrahim für den freundlichen Austausch bezüglich der vorliegenden Versuchsprotokolle und Bereitstellung der erhobenen Sequenzierungsdaten.

Zuletzt möchte ich meiner Familie, insbesondere meinen Eltern und Großeltern, meinen tiefsten Dank aussprechen, die mich nicht nur im Rahmen meiner Promotion, sondern auch während meines gesamten Studiums mit liebevollem Rat, Zuversicht und Rückhalt zur Seite gestanden haben. Ohne Eure stetige Ermutigung und Unterstützung wäre dieser Meilenstein nicht möglich gewesen. Dafür bin ich Euch von Herzen dankbar.