

Biomechanisch induzierte Regulation von Damage-Regulated Autophagy Modulator 1 in parodontalen Zellen und Geweben

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades (Dr. med.)

der Medizinischen Fakultät

der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität

Bonn

**Anemone Andriamampionona Ranavalona Konradine
Mannes**

aus Bonn

2025

Angefertigt mit der Genehmigung
der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachterin: PD Dr. med. dent. Svenja Beisel-Memmert
2. Gutachter: Prof. Dr. Helmut Stark

Tag der mündlichen Prüfung: 19. September 2025

Aus der Poliklinik für Kieferorthopädie der Universität Bonn

Inhaltsverzeichnis

	Abkürzungsverzeichnis	4
1.	Deutsche Zusammenfassung	6
1.1	Einleitung	6
1.2	Material und Methoden	7
1.3	Ergebnisse	13
1.4	Diskussion	17
1.5	Zusammenfassung	22
1.6	Literaturverzeichnis der deutschen Zusammenfassung	24
2.	Veröffentlichung	28
3.	Erklärung zum Eigenanteil	29
4.	Danksagung	30

Abkürzungsverzeichnis

AB	alveolar bone
AKT	alpha serine/threonine-protein kinase
ARRIVE-Richtlinien	Animal Research: Reporting of <i>in vivo</i> Experiments
ATG	autophagy related Protein
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
DAB	Diaminobenzedin
DMEM	Dulbecco's Minimal Essential Medium
DRAM1	damage-regulated autophagy modulator 1
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
<i>F. nucleatum</i>	<i>Fusobacterium nucleatum</i>
3-MA	3 Methylalanin
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HRP	Horseradish Peroxidase
IgG	Immunglobulin G
KGaA	Kommanditgesellschaft auf Aktien
mTOR	mammalian Target of Rapamycin
O ₂	Sauerstoff
PDL	periodontalem Ligament
PI-3K	Phosphatidylinositol-3-Kinasen Typ III

PCR	Polymerasekettenreaktion
RNA	Ribonukleinsäure
rpl22	ribosomale Protein L22
RT-qPCR	quantitative Echtzeit-Polymerasekettenreaktion
SEM	Standardfehler des Mittelwerts
UNESP	Universität São Paulo

1. Deutsche Zusammenfassung

1.1 Einleitung

Die Basis einer kieferorthopädischen Behandlung zur Herstellung eines harmonischen und funktionell intakten Kausystems wird durch die Kraftapplikation auf die Zähne und das umliegende Parodontium bewirkt, das aus Zahnfleisch, Alveolarknochen, Wurzelzement und periodontalem Ligament (PDL) besteht (Nakai et al., 2023). Entscheidend für die Zahnbewegung sind die PDL-Zellen, da diese die Verbindung zwischen Zahn und Alveolarknochen herstellen (Gao et al., 2022).

Eine wichtige, ungeklärte Frage in der Kieferorthopädie ist die nach der idealen Kraft für eine Zahnbewegung, denn im PDL entstehen durch eine Kraftapplikation Druck- und Zugbereiche. Widmet man sich auf molekularbiologischer Ebene der aufgeworfenen Fragestellung, ist die Betrachtung der Druckbereiche von besonderem Interesse, denn auf Ebene der Zellen kommt es durch den applizierten Druck zur Hypoxie und Inflammation. PDL-Zellen reagieren auf mechanischen Stress, indem sie Umbauprozesse initiieren und chemische Mediatoren wie Zytokine und Prostaglandine freisetzen. Die Zusammensetzung dieser Mediatoren variiert jedoch je nach Stärke der aufgebrachten Kraft. Während physiologischer Stress für die Gewebekomöostase notwendig ist, führt mechanische Überbelastung zu Zelltod und Gewebeschäden (Gao et al., 2022; Li et al., 2021; Nakai et al., 2023; Tang et al., 2006). Ein Adaptationsprozess, der auf zellulärer Ebene dafür bekannt ist, dass er je nach Reizstärke das Überleben von Zellen sichert oder den Zelltod einleitet, ist die Autophagie (King, 2012; Mariño et al., 2014). Auch bei der Anpassung an mechanischen, hypoxischen und inflammatorischen Stress spielt die Autophagie eine zentrale Rolle. Konsequenterweise wurde bereits nachgewiesen, dass dieser Prozess entscheidend ist für die Anpassung von PDL-Fibroblasten an mechanische Herausforderungen (Blawat et al., 2020; Memmert et al., 2020).

Ein wichtiges Protein in diesem Zusammenhang ist das „damage-regulated autophagy modulator 1“ (DRAM1). DRAM1 ist ein lysosomales Membranprotein, das sowohl an der Fusion von Autophagosomen und Lysosomen als auch an der p53-vermittelten Apoptose beteiligt ist (Crighton et al., 2007; Hu et al., 2019; Wu et al., 2018; Zhang et al., 2013). Die

zentralen Funktionen in Signalwegen des Zellüberlebens und des Zelltods machen DRAM1 zu einem interessanten Kandidaten für eine Schlüsselrolle bei der Bestimmung des Zellschicksals nach Krafteinwirkung. Die Krafteinwirkung spielt dabei eine zentrale Rolle, zumal ihre entscheidende Bedeutung im Parodont bereits bekannt ist – insbesondere im Zusammenhang mit der Anpassung von PDL-Fibroblasten an entzündliche Herausforderungen, die auch als sterile Inflammation mit einer Zahnbewegung einhergehen (Memmert et al., 2018).

In-vivo-Studien haben bereits einen Einfluss der Autophagie auf die Zahnbewegung gezeigt. Eine Hemmung der Autophagie unter mechanischer Belastung verändert die Genexpression entzündlicher Marker und beeinflusst somit die Freisetzung chemischer Mediatoren durch PDL-Fibroblasten (Chen und Hua, 2021; Mayr et al., 2021). Dies führte bei Mäusen zu verringerter Knochendichte und unstrukturierter Anordnung des PDL, jedoch auch zu beschleunigter Zahnbewegung. Umgekehrt führte die Förderung der Autophagie zu weniger Entzündungen, erhöhter Knochendichte und geordneterem PDL. Dies zeigt, dass eine ausreichende Autophagie für die parodontale Gesundheit nach einer kieferorthopädischen Behandlung entscheidend ist (Chen und Hua, 2021).

Wir stellen daher in unserer Studie die Hypothese auf, dass die DRAM1-Expression in PDL-Fibroblasten in Abhängigkeit von der Höhe der aufgebrachten Kräfte zunimmt und dass die Hemmung der Autophagie diesen Effekt möglicherweise abschwächen könnte. Zusammengefasst ist es das Ziel dieser Studie, zu untersuchen, wie unterschiedliche Krafteinwirkungen die DRAM1-Expression in parodontalen Zellen und Geweben beeinflussen und welche Rolle die Autophagie dabei spielt.

1.2 Material und Methoden

In-vitro-Analyse der DRAM1-Expression

Die für die *In-vitro*-Experimente dieser Studie verwendeten menschlichen PDL-Fibroblasten wurden in der zweiten Passage von Lonza (Basel, Schweiz; #CC-7049) bezogen. Die Zellen in den Passagen 3 bis 5 wurden in Dulbecco's Minimal Essential Medium (DMEM) mit 10 % fötalem Kälberserum (FBS), 100 Einheiten/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin (bezogen von Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland) bei

37 °C und 5 % CO₂ in einer konstant feuchten Umgebung bis einen Tag vor der Stimulation kultiviert. Um die Zellen optimal mit Nährstoffen zu versorgen, wurde das Medium alle 3 bis 4 Tage gewechselt. Für die Experimente wurden die Zellen auf Zellkulturschalen mit einem ultradünnen, gasdurchlässigen Boden (lumox® Schale 35, Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland) kultiviert. Um die Zelladhäsion zu unterstützen, wurde ein Anheftungsfaktor (Biological Attachment Factor 1X, Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) verwendet. Zu Beginn wurden 100.000 Zellen ausgesät und bis zur Erreichung einer Konfluenz von 80 % angezüchtet. Einen Tag vor Beginn des Experiments wurde die FBS-Konzentration im Medium auf 1 % reduziert.

Die Zellen wurden mechanisch stimuliert, indem Druckkräfte in zwei Größenordnungen angewendet wurden: eine physiologische Belastung von 2 g/cm² und eine pathologische Belastung von 8 g/cm². Die Intensität dieser durch Glasgewichte erzeugten Kräfte basierte auf etablierten Protokollen zur kieferorthopädischen Krafteinwirkung *in-vitro* (Abb. 1a) (Blawat et al., 2020; Mayr et al., 2021; Nikolettou et al., 2013). Der gasdurchlässige Boden der lumox®-Platten stellte eine kontinuierliche Sauerstoffversorgung sicher, auch unter den aufliegenden Glasgewichten. Zusätzlich wurde die DRAM1-Expression sowohl in Anwesenheit als auch in Abwesenheit des Autophagie-Inhibitors 3-Methyladenin (3-MA, 5 mM, Sigma-Aldrich, Darmstadt, Deutschland; Abb. 1b) untersucht. Dieser Inhibitor blockiert die frühen Phasen der Autophagie, indem er die Bildung von Autophagosomen durch Hemmung der Phosphatidylinositol-3-Kinasen Typ III (PI-3K) verhindert. Mayr et al. (2021) zeigten, dass die Autophagie in PDL-Fibroblasten unter Druckeinwirkung zuverlässig durch 3-MA gehemmt werden kann.

Die Genexpression von DRAM1 wurde durch eine quantitative Echtzeit-Polymerasekettenreaktion (RT-qPCR) analysiert. Dazu wurden PDL-Fibroblasten entweder mechanischem Druck in Form einer physiologischen oder pathologischen Belastung ausgesetzt oder unbehandelt gelassen. Nach der Zellernte wurde die RNA mit dem RNeasy Protect Minikit (Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland) extrahiert. Die RNA-Konzentration wurde mit einem Nano-Drop® ND-1000-Spektrophotometer bei 260 nm (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA) quantifiziert und anschließend mit dem iScript™ Select cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad Laboratories GmbH, Feldkirchen, Deutschland) in cDNA umgeschrieben. Ein Mikroliter dieser cDNA wurde in die

Reaktionsmischung integriert, die den QuantiTect SYBR Green Master Mix (12,5 µl, Qiagen), den QuantiTect Primer Assay (2,5 µl, Qiagen) und nukleasefreies Wasser umfasste. Die RT-qPCR wurde im iCycler iQ™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad Laboratories GmbH) gemäß folgendem Protokoll durchgeführt: eine Heizphase bei 95 °C für 5 Minuten zur Aktivierung des Enzyms, gefolgt von 40 Zyklen, die aus einem Denaturierungsschritt bei 95 °C für 10 Sekunden und einem kombinierten Annealing- und Verlängerungsschritt bei 60 °C für 30 Sekunden bestanden. Nach jedem Zyklus wurde eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt. Für die Normalisierung der Daten diente das ribosomale Protein L22 (rpl22) als Housekeeping-Gen. Die Experimente mit dem Autophagie-Inhibitor 3-MA wurden ebenfalls gemäß dieser Vorgehensweise durchgeführt, wobei 3-MA eine Stunde vor der mechanischen Stimulation hinzugefügt wurde.

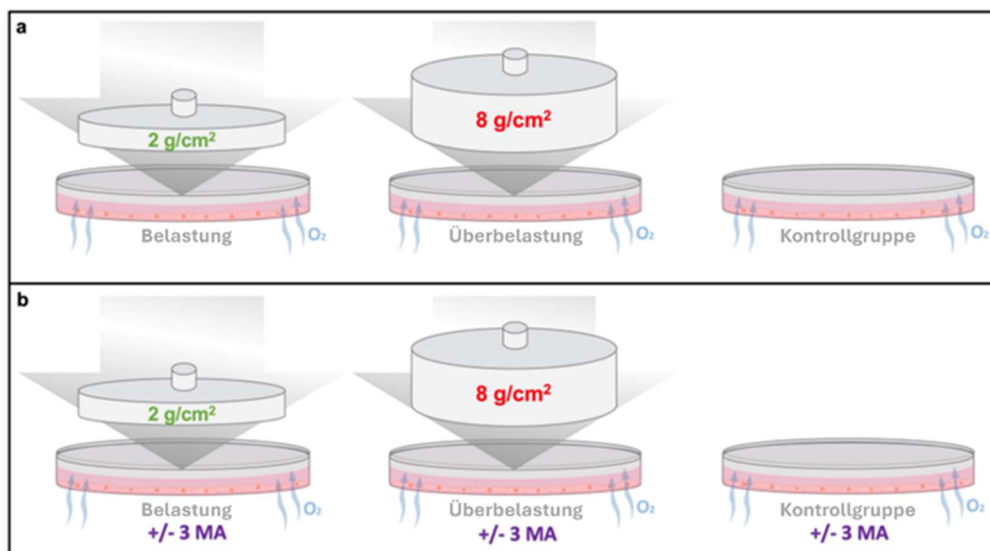


Abb.1: Versuchsaufbau für die In-vitro-Experimente. (a) Zellen wurden auf Zellkulturplatten mit gasdurchlässigem Boden ausgesät und mit Gewichten zweier unterschiedlicher Größenordnungen (2 g/cm² und 8 g/cm²) für 24 h und 48 h stimuliert. Die Analyse erfolgte mittels RT-qPCR und ELISA. (b) Um die Bedeutung autophagieassoziiierter Signalwege bei der DRAM1-Expression zu bestimmen, wurden die Zellen 24 Stunden lang mit und ohne Druck in Gegenwart und Abwesenheit des Autophagie-Inhibitors 3-MA stimuliert und mittels RT-qPCR analysiert. Ohne Druckanwendung behandelte Zellen dienten als Kontrollgruppe. Abbildung modifiziert nach Mannes et al., 2025.

Die DRAM1-Proteinkonzentration im zellfreien Überstand von sowohl stimulierten als auch unstimulierten Zellen wurde nach 1 und 2 Tagen mit einem kommerziell erhältlichen ELISA-Kit (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) (LSBio, Seattle, WA, USA) gemäß den Herstelleranweisungen bestimmt. Die Absorption wurde bei 450 nm mit einem Mikroplattenlesegerät (Epoch™ Microplate Spectrophotometer, BioTek Instruments, Winooski, VT, USA) gemessen. Zur Normalisierung der Daten wurden die Zellen nach Entfernung des Überstands gezählt.

In-vivo-Untersuchung von DRAM1

Die Regulation der DRAM1-Genexpression wurde in parodontalen Biopsien während der frühen Phase der Zahnbewegung anhand eines Rattenmodells untersucht (Kanzaki et al., 2002; Memmert et al., 2018). Die Studie erhielt die Zustimmung des Ethikkomitees für Tierversuche der Zahnmedizinischen Fakultät der Staatlichen Universität São Paulo (UNESP) in Araraquara (Protokollnummer 23/2012). Das Experiment wurde gemäß den ARRIVE-Richtlinien durchgeführt. Die Tiere wurden in Plastikkäfigen bei konstanten Bedingungen gehalten: eine Temperatur von 22–25 °C, ein 12-stündiger Hell-Dunkel-Zyklus, uneingeschränkter Zugang zu Wasser und eine Standard-Labordiät. Die Stichprobengröße wurde auf Grundlage der Ergebnisse einer vorherigen Studie mit einer Teststärke von 80 % und einem Alpha von 0,05 berechnet (Memmert et al., 2020). Basierend auf den Genexpressionsunterschieden zwischen den Gruppen in der Studie von Memmert et al. (2020) wurde ein Mittelwert von 1,0 für die Kontrollgruppen (Scheinoperation) und ein Mittelwert von 3,0 für die experimentellen Zahnbewegungsgruppen angenommen, bei einer Standardabweichung von 1,0. Daraus ergab sich eine notwendige Stichprobengröße von 4 Tieren pro Gruppe. Insgesamt wurden 24 erwachsene, männliche Holtzman-Ratten für die *In-vivo*-Experimente eingesetzt, verteilt auf 6 Gruppen mit jeweils 4 Tieren. Die Ratten, die im Durchschnitt 300 g wogen, wurden zufällig verschiedenen Gruppen zugeteilt: den experimentellen Zahnbewegungsgruppen oder den Kontrollgruppen mit denselben Zeiträumen (1, 7 und 15 Tage). Für die Platzierung der Feder erhielten die Tiere eine Vollnarkose, die aus 10 % Ketaminhydrochlorid (0,08 ml/100 g Körpergewicht) und 2 % Xylazinhydrochlorid (0,04 ml/100 g Körpergewicht) bestand. Die Zahnbewegung erfolgte mittels einer

geschlossenen Nickel-Titan-Feder (Sentalloy®, Dentsply GAC, München, Deutschland), die zwischen den ersten oberen Molaren und den mittleren oberen Schneidezähnen angebracht wurde (Abb. 2). Dabei wurde eine Kraft von 25 g angewendet. Um ein Verrutschen der Feder zu verhindern, wurden Rillen um die mittleren Schneidezähne präpariert, ein 0,2 mm dicker Stahldraht eingefügt und mit Komposit fixiert. Die Feder wurde auch auf der Okklusalfäche der ersten Molaren mit Komposit gesichert, und die unteren ersten Molaren wurden entfernt, um okklusale Störungen zu vermeiden. Nach 1 Tag, 7 Tagen und 15 Tagen kieferorthopädischer Kraftanwendung oder einer Scheinoperation wurden die Tiere durch eine Überdosis Anästhetikum euthanasiert. Das parodontale Gewebe um die ersten oberen Molaren wurde entnommen und die RNA wurde, wie zuvor beschrieben, für die RT-qPCR-Analyse extrahiert.

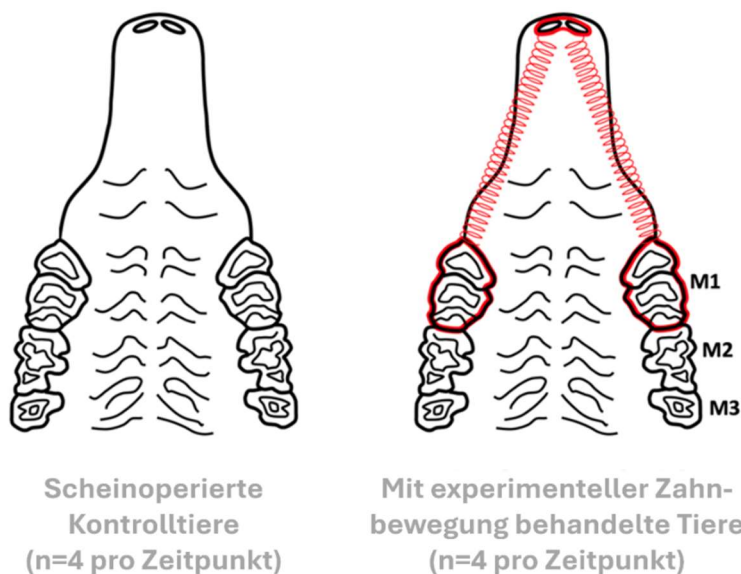


Abb. 2: Versuchsaufbau *in-vivo*. Simulation einer kieferorthopädischen Zahnbewegung an Holtzman-Ratten durch Befestigung einer geschlossenen Nickel-Titan-Feder (rot) (Sentalloy®, Dentsply GAC, München, Deutschland) an den ersten oberen Molaren und den mittleren oberen Schneidezähnen mit einer Kraft von 25 g im Vergleich zu den Kontrollgruppen. Abbildung modifiziert nach Mannes et al., 2025.

Für die immunhistochemische Analyse wurden die Kiefer unbehandelter Ratten zunächst 2 Tage in 4 % Paraformaldehyd fixiert und anschließend über 3 Monate in EDTA (10 %, 0,5 M) entkalkt. Danach erfolgte die Einbettung in Paraffin, um sagittale Serienschritte von 5 µm Dicke anzufertigen. Diese Schnitte wurden auf Objektträger (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) aufgebracht und über Nacht bei 37 °C getrocknet. Im nächsten Schritt wurde das Gewebe entparaffiniert und nach einer 10-minütigen Spülung mit TBS (TRIS von MP Biomedicals, Illkirch, Frankreich, und NaCl von Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) rehydriert. Zur Blockierung der endogenen Peroxidase wurde eine Behandlung mit 0,3 % Methanol (AppliChem, Darmstadt, Deutschland) und H₂O₂ (Merck KGaA) für 10 Minuten im Dunkeln durchgeführt. Der vorbereitete Schnitt wurde anschließend über Nacht bei 4 °C in einer feuchten Kammer mit einem polyklonalen Kaninchen-Antikörper gegen DRAM1 (1:500; Bio-Techne GmbH, Wiesbaden Nordenstadt, Deutschland) inkubiert. Als Sekundärantikörper diente Ziegen-Anti-Kaninchen-IgG-HRP (Dako, Hamburg, Deutschland), das 30 Minuten bei Raumtemperatur aufgetragen wurde. Die Immunreaktivität wurde schließlich durch eine 10-minütige Inkubation mit DAB-Chromogen (Thermo Fisher Scientific) sichtbar gemacht. Die Gegenfärbung erfolgte mit Mayers Hämatoxylin (Merck KGaA). Standardisierte Bilder wurden mithilfe eines Axioskop 2-Mikroskops (Carl Zeiss, Jena, Deutschland), ausgestattet mit einer AxioCam MRc-Kamera und der Software AxioVision 4.7 (Carl Zeiss), aufgenommen.

Statistische Analyse

Die *In-vitro*-Experimente wurden mindestens dreimal wiederholt und die resultierenden Daten sind als Mittelwerte $\pm$ Standardfehler des Mittelwerts (SEM) angegeben. Die statistischen Analysen erfolgten mit Prism (Version 9.00 für Windows, GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Die Normalverteilung wurde überprüft. Da die Daten nicht normalverteilt waren, wurde zur Bestimmung der Signifikanz zwischen zwei Gruppen der Mann-Whitney-Test verwendet. Für Vergleiche zwischen mehr als zwei Gruppen wurden nichtparametrische Verfahren angewendet (Kruskal-Wallis-Test mit geeigneten Post-hoc-Analysen).

1.3 Ergebnisse

In-vitro-Ergebnisse

Unsere Untersuchungen zeigten, dass eine mechanische Überlastung von 8 g/cm² über einen Zeitraum von einem Tag mit einer 6,6-fachen Erhöhung der DRAM1-Genexpression in PDL-Fibroblasten verbunden ist. Im Gegensatz dazu führte eine physiologische Belastung von 2 g/cm² im gleichen Zeitraum zu keiner signifikanten Veränderung der DRAM1-Genexpression (Abb. 3a). Nach einer zweitägigen Exposition durch beide Druckniveaus, sowohl der physiologischen Belastung als auch der Überlastung, stieg die DRAM1-Genexpression jedoch um das 4,8-fache bzw. 8,6-fache an (Abb. 3b). Die erhöhten DRAM1-Transkriptionsniveaus in PDL-Fibroblasten korrelierten erst nach zwei Tagen Belastung mit der Proteinsekretion. Bereits nach einem Tag zeigte sich lediglich eine Tendenz zur Hochregulation (Abb. 3c). Nach zwei Tagen stiegen die DRAM1-Proteinspiegel in den Überständen der PDL-Fibroblasten bei sowohl physiologischer Belastung als auch Überlastung jedoch signifikant um das 3,9-fache bzw. 6,8-fache, wie mittels ELISA-Analyse festgestellt wurde (Abb. 3d).

Um eine mögliche Abhängigkeit der Regulation von DRAM1 unter mechanischer Stimulation von autophagieassoziierten Signalwegen festzustellen, haben wir die Zellen während der Druckanwendung mit und ohne den Autophagie-Inhibitor 3-MA inkubiert. Ohne den Inhibitor zeigte sich nach einem Tag eine signifikante Hochregulierung der DRAM1-Genexpression in PDL-Fibroblasten, die sowohl Belastung als auch Überlastung ausgesetzt waren (Abb. 4a). In den mit 3-MA behandelten Zellen hingegen war die DRAM1-Genexpression in beiden mechanisch stimulierten Gruppen nicht signifikant anders als in der Kontrollgruppe. Die Hemmung der autophagieassoziierten Signalwege durch 3-MA führte somit zu einer signifikanten Reduktion der DRAM1-Genexpression in beiden Druckgruppen im Vergleich zur DRAM1-Regulation in den entsprechenden Gruppen ohne 3-MA.

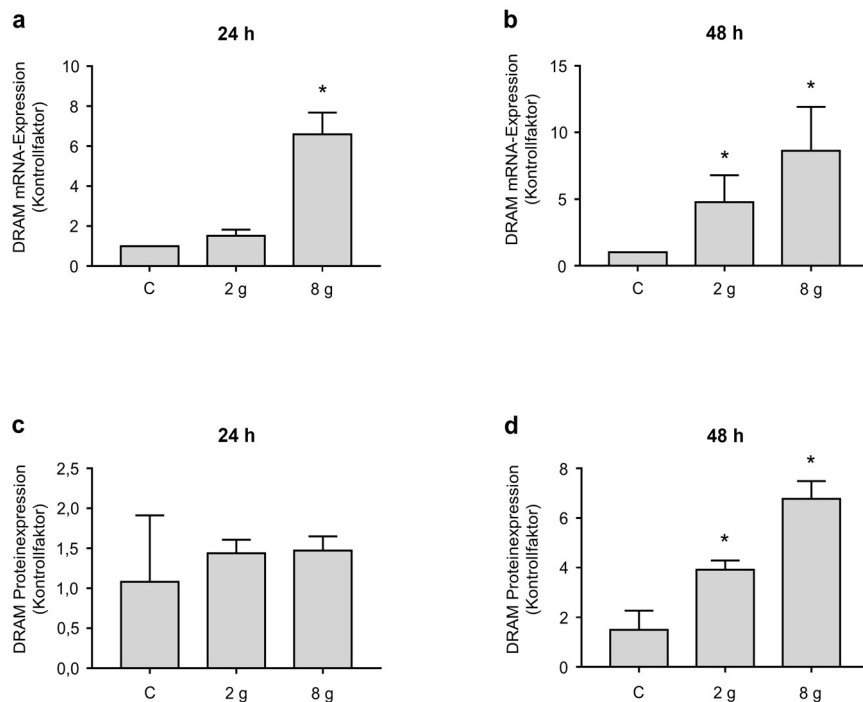


Abb. 3: (a) Die DRAM1-mRNA-Expression wurde mittels RT-qPCR analysiert. PDL-Fibroblasten wurden 1 Tag lang unter Druckanwendung (2 g/cm² oder 8 g/cm²) kultiviert. Unbehandelte Zellen dienen als Kontrolle. Mittelwert $\pm$ SEM (n = 9) * signifikant (p < 0,05); (b) Die DRAM1-mRNA-Expression wurde mittels RT-qPCR analysiert. PDL-Fibroblasten wurden 2 Tage lang unter Druckanwendung (2 g/cm² oder 8 g/cm²) kultiviert. Unbehandelte Zellen dienen als Kontrolle. Mittelwert $\pm$ SEM (n = 9) * signifikant (p < 0,05); (c) Die DRAM1-Proteinsekretion wurde mittels ELISA analysiert. PDL-Fibroblasten wurden 1 Tag lang unter Druckanwendung (2 g/cm² oder 8 g/cm²) kultiviert. Unbehandelte Zellen dienen als Kontrolle. Mittelwert $\pm$ SEM (n = 9) * signifikant (p < 0,05); (d) Die DRAM1-Proteinsekretion wurde durch ELISA analysiert. PDL-Fibroblasten wurden 2 Tage lang unter Druckanwendung (2 g/cm² oder 8 g/cm²) kultiviert. Unbehandelte Zellen dienen als Kontrolle. Mittelwert $\pm$ SEM (n = 9) * signifikant (p < 0,05); Abbildung modifiziert nach Mannes et al., 2025.

In-vivo-Ergebnisse

Zunächst wollten wir die Lokalisation der DRAM1-Expression im Parodontium der Ratte ermitteln. Dazu führten wir eine immunhistochemische Färbung des Parodontiums von unbehandelten Kontrolltieren mit einem polyklonalen Antikörper gegen DRAM1 und DAB-Chromogen durch (Abb. 4b). Unsere Ergebnisse zeigten, dass DRAM1 vorwiegend im parodontalen Ligament exprimiert wird, also in dem Gewebe, das den Zahn direkt umgibt. Die Färbung war am stärksten in den Zellen neben dem Zahn und nahm in Richtung des

Alveolarknochens ab. Darüber hinaus konnten wir feststellen, dass DRAM1 auch im Zahnfleischgewebe exprimiert wird (Abb. 4b).

Um die Regulation von DRAM1 durch mechanische Stimulation *in-vivo* zu untersuchen, haben wir männliche, erwachsene Holtzman-Ratten als Tiermodell herangezogen. Die DRAM1-Genexpression im parodontalen Gewebe der ersten Molaren wurde nach 1, 7 und 15 Tagen analysiert. Nach einem Tag der Kraftanwendung zeigten die behandelten Ratten im Vergleich zur Kontrollgruppe keine signifikante Veränderung der DRAM1-Genexpression im parodontalen Gewebe. Bei längerer Krafteinwirkung, insbesondere nach 7 und 15 Tagen, konnte jedoch eine signifikante Erhöhung der DRAM1-Genexpression festgestellt werden, die um das 2,2-fache bzw. 1,2-fache höher war als in der scheinooperierten Kontrollgruppe (Abb. 4c).

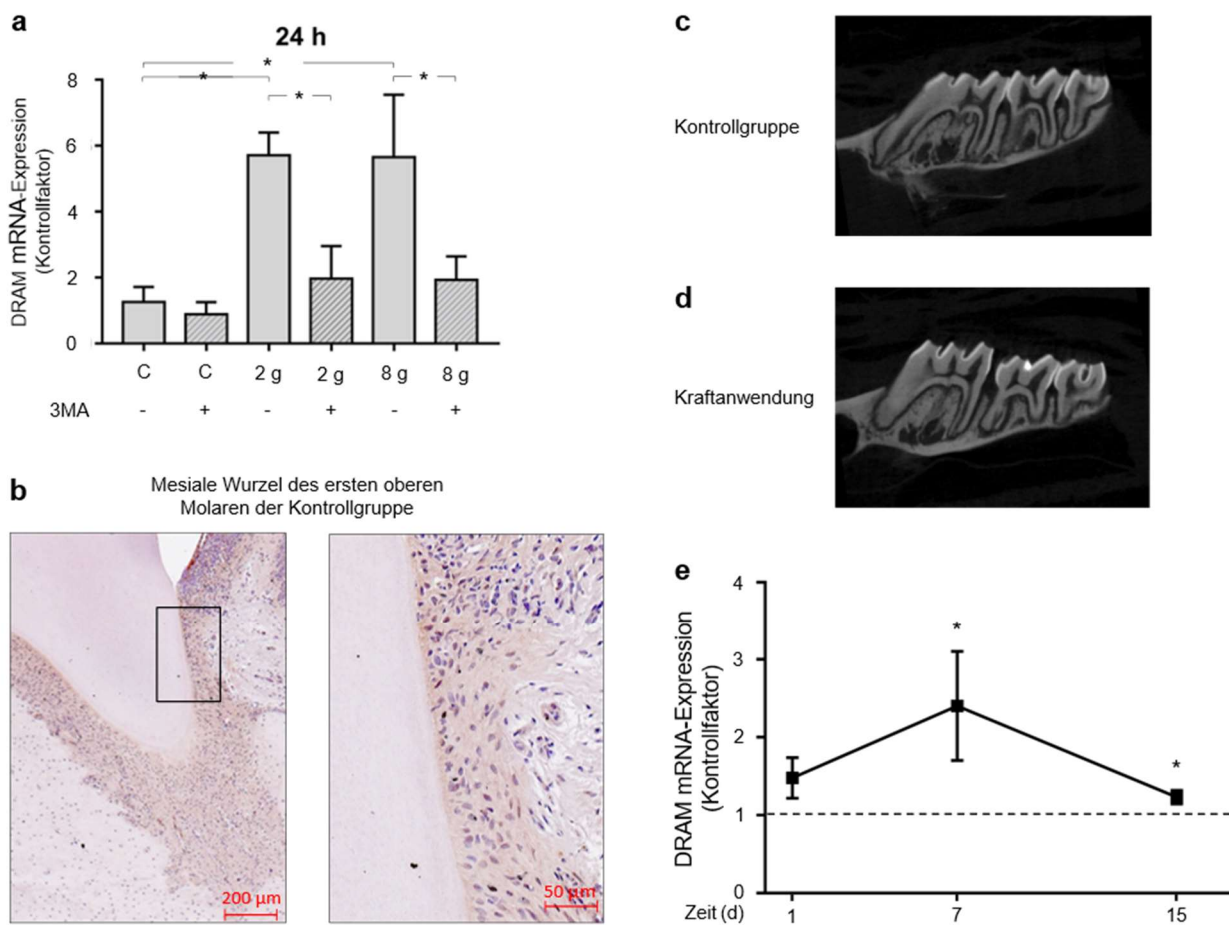


Abb. 4: (a) Die DRAM1-mRNA-Expression wurde mittels RT-qPCR analysiert. PDL-Fibroblasten wurden 1 Tag lang unter Druckanwendung (2 g/cm^2 oder 8 g/cm^2) mit oder ohne Autophagie-Inhibitor 3-MA kultiviert. Unbehandelte Zellen dienten als Kontrolle. Mittelwert $\pm$ SEM ($n = 9$); n.s. – nicht signifikant; * signifikant ($p < 0,05$); (b) DRAM1-Protein in unbehandelter mesialer Wurzel des ersten Oberkiefermolaren von Kontrolltieren, gefärbt mit Anti-DRAM1 und DAB-Chromogen. Gegenfärbung mit Mayers Hämatoxylin. Die Abkürzungen in den Bildern bezeichnen folgende Gewebe: G – Zahnfleischgewebe, T – mesiale Wurzel des ersten Oberkiefermolaren, PDL – parodontales Ligament, AB – Alveolarknochen (c) Auswirkungen der Kraftanwendung auf die DRAM1-Genexpression im parodontalen Gewebe von Ratten im Vergleich zu Geweben der scheinoperierten Kontrollgruppe nach 1 Tag, 7 Tagen und 15 Tagen. Der Vergleich wurde zwischen der Versuchsgruppe und der jeweiligen Kontrollgruppe zum gleichen Zeitpunkt durchgeführt. Mittelwert $\pm$ Standardfehler des Mittelwerts ($n = 4$ pro Gruppe); * signifikanter ($p < 0,05$) Unterschied zwischen den Gruppen. Abbildung modifiziert nach Mannes et al., 2025.

1.4 Diskussion

Nach einem Tag mechanischer Überlastung mit 8 g nahm die DRAM1-Genexpression in PDL-Fibroblasten signifikant zu, während eine physiologische Belastung von 2 g keine Veränderung hervorrief. Allerdings zeigte sich nach 2 Tagen in beiden Gruppen, sowohl bei Belastung als auch bei Überlastung, ein signifikanter Anstieg der DRAM1-Genexpression. Auf Proteinebene blieb DRAM1 nach einem Tag unter sowohl physiologischer Belastung als auch Überlastung unverändert, jedoch führte eine längere Krafteinwirkung zu einem Anstieg der Proteinspiegel bei beiden Druckstärken. Zudem konnten wir einen Zusammenhang zwischen der DRAM1-Expression und der durch 3-MA vermittelten Hemmung der Autophagie nachweisen. Im Tiermodell fanden wir eine Korrelation zwischen der DRAM1-Genexpression und der Dauer der Krafteinwirkung. Während nach einem Tag keine signifikante Hochregulierung beobachtet wurde, zeigte sich nach 7 und 15 Tagen eine signifikante Erhöhung der DRAM1-Genexpression. Zusammengefasst zeigt unsere Studie also eine Korrelation zwischen der Dauer und Stärke des auf parodontale Zellen und Gewebe ausgeübten Drucks und der Regulation von DRAM1.

Das Ziel dieser Studie war es, den Einfluss verschiedener Kraftstärken auf die DRAM1-Expression in parodontalen Zellen und Geweben zu untersuchen. Um ein tieferes Verständnis für dieses Schlüsselprotein zu gewinnen, das sowohl bei der Autophagie als auch bei der Apoptose eine Rolle spielt, nutzten wir sowohl *In-vitro*- als auch *In-vivo*-Modelle.

In-vitro-Studien ermöglichen eine präzise Analyse der Auswirkungen mechanischer Stressreize auf PDL-Fibroblasten. Der Vorteil dieses Ansatzes liegt darin, dass so verschiedene Stressreize isoliert untersucht werden können. Dies ist insbesondere für die Untersuchung der Autophagie von Bedeutung, da dieser Prozess durch viele Stressfaktoren ausgelöst werden kann, beispielsweise auch durch Hypoxie und Entzündungen, die eng mit der mechanischen Stimulation des Parodonts verbunden sind (King, 2012; Gao et al., 2022). Diese isolierte Stimulation durch mechanischen Stress konnte durch die Anwendung von lumox®-gasdurchlässigen Zellkulturplatten erzielt werden. Diese spezielle Anordnung stellt sicher, dass die PDL-Fibroblasten während der

mechanischen Druckanwendung ausreichend mit Sauerstoff versorgt werden (Memmert et al., 2019). Wir setzten mechanischen Stress in zwei Intensitäten ein: eine physiologische Belastung von 2 g/cm² und eine pathologische Überlastung von 8 g/cm². Dieses Druckmodell wurde in früheren Studien etabliert und basiert auf den Arbeiten von Kanzaki und Kollegen (Blawat et al., 2020; Mayr et al., 2021; Nikolettou et al., 2013). Anders als Kanzaki und sein Team verwendet unsere Gruppe jedoch die lumox®-gasdurchlässigen Zellkulturplatten, die eine getrennte Untersuchung von hypoxischer und mechanischer Stimulation ermöglichen. Unsere Einstufung von 8 g/cm² als pathologische Überlastung basiert auf früheren Studien, da nur dieser Druck zu allen untersuchten Zeitpunkten Apoptose induzieren konnte (Blawat et al., 2020). Blawat et al. (2020) zeigten zudem, dass eine eintägige Stimulation mit 2 g/cm² die Apoptoserate nicht signifikant erhöhte und bei kurzfristiger Anwendung sogar zellschützende Effekte hatte. Li et al. (2025) bestätigen die zellschützenden Effekte bei einer Kraftanwendung von 2 g/cm². Dies bestätigt, dass diese Druckstärke als physiologische Kraft angesehen werden kann (Blawat et al., 2020). Autophagie ist ein Prozess, der eine schnelle Anpassung an verschiedene Herausforderungen ermöglicht. Diese Flexibilität wird durch posttranslationale Modifikationen gewährleistet, während bei länger andauernden Stressfaktoren spezifische Transkriptionsfaktoren aktiviert werden, die dann Veränderungen in der Genexpression auslösen (Ibrahim et al., 2017). In dieser Studie wählten wir die Zeitpunkte 1 Tag und 2 Tage, um die Veränderungen der Genexpression zu untersuchen. Zusätzlich wurde so auch eine Vergleichbarkeit mit der Studie gewährleistet, welche die DRAM1 Regulation nach entzündlicher und mikrobieller Stimulation untersuchte (Memmert et al., 2019).

Der *In-vitro*-Ansatz kann die Vielschichtigkeit einer *In-vivo*-Reaktion auf kieferorthopädische Kräfte nicht vollständig nachahmen, da die Interaktionen zwischen verschiedenen Zelltypen und die vielfältigen Reize in einer *In-vitro*-Untersuchung nicht vollständig nachgestellt werden können. Daher haben wir uns eines Nagetiermodells bedient, um DRAM1 auch bei experimenteller Zahnbewegung zu analysieren. Gleichzeitig sollten die Ergebnisse aus dem Tiermodell mit einer gewissen Vorsicht interpretiert werden, da die Übertragbarkeit von Nagetiermodellen auf den Menschen begrenzt ist. Aus der Literatur geht hervor, dass Nagetiermodelle besonders in der frühen Phase der

Zahnbewegung wertvolle Erkenntnisse liefern, mit fortschreitender Zahnbewegung die Übertragbarkeit allerdings abnimmt (Ren et al., 2004). Üblicherweise wird angenommen, dass der Zahn in den ersten zwei Wochen eine Kippbewegung ausführt, was diese Phase ideal für die Untersuchung von Mechanotransduktionsprozessen macht. Es wurde zudem beschrieben, dass bei Nagetieren nach etwa zwei Wochen eine Reduktion des interradikulären Knochens auftritt, was beim Menschen nicht der Fall ist (Ren et al., 2004). Aus diesem Grund haben wir die Dauer unserer *In-vivo*-Untersuchungen auf 15 Tage festgelegt.

Unsere Ergebnisse, die die dosis- und dauerabhängige Expression von DRAM1 in Bezug auf den angewandten mechanischen Stress widerspiegeln, reihen sich gut in das bestehende Wissen über die DRAM1-Regulierung in PDL-Fibroblasten ein. Eine frühere Studie stellte einen Anstieg der DRAM1-Expression nach Einwirkung von entzündlichem oder mikrobiellem Stress fest (Memmert et al., 2018). Bei Kontakt mit *Fusobakterium nucleatum* (*F. nucleatum*) war die DRAM1-Expression bei allen getesteten Konzentrationen erhöht und zeigte somit keine Dosisabhängigkeit. Wie auch in dieser Studie unter mechanischem Stress beobachtet wurde, spielte die Expositionsdauer des mikrobiellen Stresses jedoch eine entscheidende Rolle bei der Regulierung der Proteinlevel. Die DRAM1-Proteinlevel waren erst nach zwei Tagen *F. nucleatum*-Stimulation erhöht, nicht jedoch nach einem Tag (Memmert et al., 2018). Der Unterschied in Bezug auf die Dosisabhängigkeit der Reize könnte auf die Art des Reizes und seine Genotoxizität zurückzuführen sein. Die Exposition von Zellen mit *F. nucleatum* beispielsweise besitzt eine starke genotoxische Kapazität (Nogueira et al., 2017). Zusätzlich konnte eine andere Studie zeigen, dass genotoxischer Stress parallel zur „kanonischen“ Autophagie einen alternativen Weg der Autophagie induziert, der von den Autophagie-bezogenen Genen ATG5 und ATG7 abhängig ist (Nagata et al., 2018). In diesem nicht-kanonischen Autophagieweg spielen p53 und DRAM1 eine entscheidende Rolle, was ein Grund für den Anstieg von DRAM1 nach selbst geringen Dosen von *F. nucleatum* sein könnte. Mechanischer Stress kann auch zu DNA-Schäden führen, wie in vaskulären glatten Muskelzellen nachgewiesen wurde (Geng et al., 2020). Die Literatur legt jedoch nahe, dass die Anwendung physiologischer, geringer Druckstärken keine signifikante Hochregulierung der Autophagie oder Apoptose in Abhängigkeit von der

Druckdauer verursacht (Blawat et al., 2020). Dies deutet darauf hin, dass selbst geringe Dosen von *F. nucleatum* für PDL-Fibroblasten genotoxisch sind und eine nicht-kanonische Autophagie auslösen, wohingegen geringe Druckwerte für diese Zellen ein physiologisches Phänomen sind und keine Hochregulierung zusätzlicher Autophagiewege bewirken.

Es ist allgemein anerkannt, dass DRAM1 die Autophagieregulation über verschiedene Mechanismen beeinflusst (Lorin et al., 2010; Lu et al., 2019; Mah et al., 2012; Mayr et al., 2002; Nagata et al., 2018;). Auffällig ist, dass wir festgestellt haben, dass die DRAM1-Genexpression durch die Hemmung der Autophagie mittels des Phosphoinositid-3-Kinasen (PI3K)-Inhibitors 3-MA umgekehrt beeinflusst wird. Unter Hemmung der Autophagie durch 3-MA zeigte die Anwendung von mechanischem Druck keine erhöhte DRAM1-Genexpression mehr in unseren PDL-Fibroblasten. Frühere Studien haben gezeigt, dass die DRAM1-Expression durch das mammalian Target of Rapamycin (mTOR) reguliert wird, da Rapamycin, ein bekannter mTOR-Inhibitor, in HeLa-Zellen eine Hochregulierung von DRAM1 induziert (Memmert et al., 2020). Dies könnte auf einen möglichen Off-Target-Effekt von 3-MA hindeuten, da PI3Ks zu den Signalfaktoren gehören, welche die mTOR-Aktivität regulieren, insbesondere über den PI3K/AKT/mTOR-Signalweg. Daher könnte die reduzierte DRAM1-Expression eine Folge des sekundären Effekts von 3-MA auf die mTOR-Signalgebung sein (Guan et al., 2015). Unsere Ergebnisse ergänzen die bestehende Literatur, die mTOR als vorgeschalteten Regulator der DRAM1-Expression identifiziert. Ob die Hemmung der Autophagie auch Auswirkungen auf die DRAM1-Expression in nachgeschalteten Signalwegen hat, muss jedoch noch weiter untersucht werden.

Unter Verwendung eines etablierten *In-vivo*-Modells konnten wir die zeitliche Dynamik der DRAM1-Genexpression während der kieferorthopädischen Zahnbewegung beobachten. Dies ermöglichte es uns, die DRAM1-Expression in einem realistischeren Umfeld im Vergleich zu *In-vitro*-Studien zu untersuchen. Unsere Ergebnisse zeigen, dass die DRAM1-Genexpression nach einem Tag kieferorthopädischer Zahnbewegung nicht signifikant erhöht war. Jedoch stellte sich nach sieben und fünfzehn Tagen eine deutliche Erhöhung der DRAM1-Expression ein, was sehr gut mit unseren *In-vitro*-Ergebnissen übereinstimmt und auf eine zeitliche Abhängigkeit der DRAM1-Expression sowohl *in-vitro*

als auch *in-vivo* hinweist. In der *In-vitro*-Untersuchung zeigte sich eine erhöhte DRAM1-Genexpression nach einem Tag nur unter einer Überlastung von 8 g, nicht jedoch unter einer physiologischen Belastung von 2 g. Nach zwei Tagen war die DRAM1-Expression jedoch unter beiden Belastungen hochreguliert. Übertragen auf unser Rattenmodell deutet dies darauf hin, dass die im Modell angewandte Kraft von 25 g im Vergleich zu den 8 g in der *In-vitro*-Untersuchung keine erhebliche Überlastung verursachte, da wir nach einem Tag Kraftanwendung keine signifikanten Veränderungen der DRAM1-Genexpression im parodontalen Gewebe der Ratten feststellen konnten. Mit einem PrimePCR-Assay konnten wir zeigen, dass DRAM1 nicht zu den Autophagie-assoziierten Genen gehört, die in PDL-Fibroblasten unter Spannung reguliert werden, was darauf hindeutet, dass die Regulation von DRAM1 möglicherweise empfindlicher auf Druck als auf Spannung reagiert (Wu et al., 2010). Es wäre daher interessant, in zukünftigen Studien eine ortsspezifische Bestimmung der DRAM1-Expression durchzuführen. Dennoch liefert uns die immunhistochemische Färbung von DRAM1 in den Kiefern der Ratten Hinweise darauf, welche Zellen auch unter Druck an der DRAM1-Expression beteiligt sein könnten. Da insbesondere das parodontale Ligament der Kontrollratten gefärbt war, können wir annehmen, dass diese Zellen maßgeblich zu den beobachteten Expressionsveränderungen beigetragen haben. Frühere Untersuchungen haben bereits gezeigt, dass DRAM1 in entzündlich veränderter, menschlicher Gingiva nachweisbar ist, insbesondere im Stratum basale des gingivalen Epithels und in Makrophagen des entzündlichen Infiltrats (Memmert et al., 2018). Diese Zellen könnten zusätzlich zur erhöhten DRAM1-Expression unter mechanischer Belastung in unseren Rattenexperimenten beigetragen haben.

Unsere Ergebnisse sollen zu einem tieferen Verständnis der molekularbiologischen Prozesse beitragen, die bei der kieferorthopädischen Zahnbewegung eine Rolle spielen, und mögliche Biomarker-Kandidaten identifizieren. Diese Biomarker könnten zukünftig in der gingivalen Sulkusflüssigkeit während der Zahnbewegung gemessen werden und Kieferorthopäden dabei unterstützen, festzustellen, ob die auf das Parodontium ausgeübte Kraft bei einzelnen Patienten zu einer Belastung oder Überlastung führt. Das Molekül DRAM1, das eine zentrale Rolle bei Autophagie und Apoptose spielt, könnte

hierbei ein vielversprechender Kandidat sein. Die Ergebnisse dieser Studie legen nahe, dass weitere Forschungen in dieser Richtung lohnenswert sind.

1.5 Zusammenfassung

Die Autophagie ist ein wichtiger Anpassungsmechanismus während der orthodontischen Zahnbewegung in Parodontalen Ligament (PDL)-Zellen. Die gezielte Beeinflussung der Autophagie könnte innovative therapeutische Strategien ermöglichen – sowohl zur Beschleunigung der Zahnbewegung als auch zur Vorbeugung von Wurzelresorptionen (Li et al., 2025). Unsere Studie trägt zum weiteren Verständnis dieses Prozesses bei. In Abhängigkeit unterschiedlicher Druckstimuli kann dieser Mechanismus entweder ein Zellüberleben oder den Zelltod einleiten. Damage-Regulated Autophagy Modulator 1 (DRAM1) nimmt hier eine entscheidende Schlüsselfunktion ein. Ziel dieser Studie war es, den Einfluss der biomechanischen Belastung auf die DRAM1-Genexpression in parodontalen Zellen sowie Geweben zu untersuchen. Hierfür wurden humane PDL-Zellen zum einen mit einer physiologischen Kraft und zum anderen mit einer Überbelastung stimuliert. Des Weiteren wurden die Versuche in An- und Abwesenheit des Autophagie Inhibitors 3Methyladenin (3MA) durchgeführt und mit unbehandelten Kontrollzellen verglichen. Gemessen wurden die DRAM1 Expression nach 24 h und nach 48 h mittels real-Time-PCR und ELISA. Ergänzend wurden in gingivalen Biopsien von Ratten nach einem Tag, 7 und 15 Tagen kieferorthopädischer Zahnbewegung die DRAM1-Genexpression betrachtet und mit der Expression in Kontrollbiopsien verglichen. Statistisch ausgewertet wurden die Versuche mittels des Programms GraphPad Prism. Zur Überprüfung der Signifikanz zwischen zwei Gruppen wurde der Mann-Whitney-Test sowie für Vergleiche zwischen mehr als zwei Gruppen nicht parametrische Verfahren verwendet (Kruskal-Wallis-Test mit geeigneten Post-Hoc Tests). Es konnte gezeigt werden, dass bei Überbelastung ein signifikanter Anstieg der DRAM1 Genexpression bereits nach einem Tag in PDL-Zellen nachgewiesen werden konnte, während dies bei einer physiologischen Belastung erst nach 48 h zu einem signifikanten Anstieg führte. Deckungsgleich zeigten sich nach 24 h keine erhöhten Proteinlevel, allerdings nach 48 h. Signifikant reduziert wurde die DRAM1-Genexpression durch die Anwendung des Autophagieinhibitors 3MA, während dies in der Kontrollgruppe ausblieb. In der *in-vivo* Untersuchung konnte ab 7 d der orthodontischen Krafteinwirkung ein Anstieg der DRAM1-

Genexpression gemessen werden. Zusammenfassend deutet die Studie darauf hin, dass die DRAM1-Expression in Abhängigkeit von der Dosis und Dauer mechanischer Kräfte hochreguliert wird und möglicherweise durch den PI3K-AKT-mTOR-Signalweg gesteuert wird. Aufgrund dieser Eigenschaften könnte DRAM1 ein vielversprechender Kandidat für die Entwicklung eines zukünftigen Biomarkers zur Erkennung kieferorthopädischer Überlastungen sein. Dennoch ist es notwendig, in weiteren Studien die spezifische Rolle von DRAM1 bei der Bestimmung des Zellschicksals in Bezug auf die Stärke und Dauer der aufgebrachten Kräfte genauer zu untersuchen.

1.6 Literaturverzeichnis

Blawat K, Mayr A, Hardt M, Kirschneck C, Nokhbehsaim M, Behl C, Deschner J, Jäger A, Memmert S. Regulation of Autophagic Signaling by Mechanical Loading and Inflammation in Human PDL Fibroblasts. *Int J Mol Sci* 2020; 21: 9446

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

Crichton D, Wilkinson S, Ryan KM. DRAM links autophagy to p53 and programmed cell death. *Autophagy* 2007; 3(1): 72 - 74

Gao Y, Min Q, Li X, Liu L, Lv Y, Xu W, Liu X, Wang H. Immune System Acts on Orthodontic Tooth Movement: Cellular and Molecular Mechanisms. *Biomed Res Int* 2022; 9668610

Geng F, Zhang Y, Lu Z, Zhang S, Pan Y. *Fusobacterium nucleatum* Caused DNA Damage and Promoted Cell Proliferation by the Ku70/p53 Pathway in Oral Cancer Cells. *DNA Cell Biol* 2020; 39: 144 - 151

Guan JJ, Zhang XD, Sun W, Qi L, Wu JC, Qin ZH. DRAM1 regulates apoptosis through increasing protein levels and lysosomal localization of BAX. *Cell Death Dis* 2015; 6: e1624

Hu W, Chen S, Thorne RF, Wu M. TP53, TP53 Target Genes (DRAM, TIGAR), and Autophagy. *Adv Exp Med Biol* 2019; 1206: 127 - 149

Ibrahim AY, Gudhimella S, Pandruvada SN, Huja SS. Resolving differences between animal models for expedited orthodontic tooth movement. *Orthod Craniofac Res* 2017; 1: 72 - 76

Kanzaki H, Chiba M, Shimizu Y, Mitani H. Periodontal ligament cells under mechanical stress induce osteoclastogenesis by receptor activator of nuclear factor kappaB ligand up-regulation via prostaglandin E2 synthesis. *J Bone Miner Res* 2002; 17: 210 - 220

King JS. Mechanical stress meets autophagy: Potential implications for physiology and pathology. *Trends Mol Med* 2012; 18: 583 – 588

Li B, Wang L, He H. Autophagy in orthodontic tooth movement: advances, challenges, and future perspectives. *Molecular Medicine* 2025; 31: 245.

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

Lorin S, Pierron G, Ryan KM, Codogno P, Djavaheri-Mergny M. Evidence for the interplay between JNK and p53-DRAM signaling pathways in the regulation of autophagy. *Autophagy* 2010; 6: 153 - 154

Lu T, Zhu Z, Wu J, She H, Han R, Xu H, Qin ZH. DRAM1 regulates autophagy and cell proliferation via inhibition of the phosphoinositide 3-kinase-Akt-mTOR-ribosomal protein S6 pathway. *Cell Commun Signal* 2019; 17: 28

Mah LY, O'Prey J, Baudot AD, Hoekstra A, Ryan KM. DRAM-1 encodes multiple isoforms that regulate autophagy. *Autophagy* 2012; 8: 18 - 28

Mannes A, Nogueira A, Both A, Mayr A, Marciniak J, Küchler EC, Bekbulat F, Cirelli JA, Kirschneck C, Behl C, Deschner J, Jäger A, Beisel-Memmert S. Biomechanically induced regulation of Damage-Regulated Autophagy Modulator 1 in periodontal cells and tissues. *BBRC* 2025; 742: 151131

Mari  o G, Niso-Santano M, Baehrecke EH, Kroemer G. Self-consumption: the interplay of autophagy and apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2014; 15: 81 - 94

Mayr M, Hu Y, Hainaut H, Xu Q. Mechanical stress-induced DNA damage and rac-p38MAPK signal pathways mediate p53-dependent apoptosis in vascular smooth muscle cells. *FASEB J* 2002; 16: 1423 - 1425

Mayr A, Marciniak J, Eggers B, Blawat K, Wildenhof J, Bastos Craveiro R, Wolf M, Deschner J, Jäger A, Beisel-Memmert S. Autophagy Induces Expression of IL-6 in Human Periodontal Ligament Fibroblasts Under Mechanical Load and Overload and Effects Osteoclastogenesis in vitro. *Front Physiol* 2021; 12: 716441

Memmert S, Nogueira AVB, Damanaki A, Nokhbehsaim M, Eick S, Divnic-Resnik R, Spahr A, Rath-Deschner B, Till A, Götz W, Cirelli JA, Jäger A, Deschner J. Damage-regulated autophagy modulator 1 in oral inflammation and infection. *Clin Oral Investig* 2018; 22: 2933 - 2941

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

Memmert S, Nogueira AVB, Damanaki A, Nokhbehsaim M, Rath-Deschner B, Götz W, Gölz L, Cirelli JA, Till A, Jäger A, Deschner J. Regulation of the autophagy-marker Sequestosome 1 in periodontal cells and tissues by biomechanical loading. *J Orofac Orthop* 2020; 81: 10 - 21

Nagata M, Arakawa S, Yamaguchi H, Torii S, Endo H, Tsujioka M, Honda S, Nishida Y, Konishi A, Shimizu S. Dram1 regulates DNA damage-induced alternative autophagy. *Cell stress* 2018; 2: 55 - 65

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(4): 297 - 310

Nikoletopoulou V, Markaki M, Palikaras K, Tavernarakis N. Crosstalk between apoptosis, necrosis and autophagy. *Biochim Biophys Acta* 2013;1833: 3448 - 3459

Nogueira AVB, de Molon RS, Nokhbehsaim M, Deschner J, Cirelli JA. Contribution of biomechanical forces to inflammation-induced bone resorption. *J Clin Periodontol* 2017; 44: 31 - 41

Pietrocola F, Izzo V, Niso-Santano M, Vacchelli E, Galluzzi L, Maiuri MC, Kroemer G. Regulation of autophagy by stress-responsive transcription factors. *Semin Cancer Biol* 2013; 23: 310 - 322

Ren Y, Maltha JC, Kuijpers-Jagtman AM. The rat as a model for orthodontic tooth movement--a critical review and a proposed solution. *Eur J Orthod* 2004;26: 483 - 490

Tang LL, Xian CY, Wang YL. The MGF expression of osteoblasts in response to mechanical overload. *Arch Oral Biol* 2006; 51: 1080 - 1085

Ullrich N, Schröder A, Jantsch J, Spanier G, Proof P, Kirschneck C. The role of mechanotransduction versus hypoxia during simulated orthodontic compressive strain--an in vitro study of human periodontal ligament fibroblasts. *Int J Oral Sci* 2019; 11: 33

Wu YT, Tan HL, Shui G, Bauvy C, Huang Q, Wenk MR, Ong CN, Codogno P, Shen HM. Dual role of 3-methyladenine in modulation of autophagy via different temporal patterns of inhibition on class I and III phosphoinositide 3-kinase. *J Biol Chem* 2010; 285: 10850 - 10861

Wu X, Qin Y, Zhu X, Liu D, Chen F, Xu S, Zheng D, Zhou Y, Lu J. Increased expression of DRAM1 confers myocardial protection against ischemia via restoring autophagy flux. *J Mol Cell Cardiol* 2018; 124: 70 - 82

Zhang XD, Qi L, Wu JC, Qin ZH. DRAM1 regulates autophagy flux through lysosomes. *PloS One* 2013; 8(5): e63245

Zhang Y, Li X, Li Y, Li Y, Wang Y, Zhu L, Chen P, Tian Z, Qiu Y, Feng R, Zeng Z, He Y, Chen B, Zhang S, Mao R, Chen M. DNA Damage-Regulated Autophagy Modulator 1 (DRAM1) Mediates Autophagy and Apoptosis of Intestinal Epithelial Cells in Inflammatory Bowel Disease. *Dig Dis Sci* 2021; 66: 3375 - 3390

2. Veröffentlichung

Dieser Publikationsdissertation liegt die folgende, unabhängig begutachtete Veröffentlichung zugrunde:

Mannes A, Nogueira A, Both A, Mayr A, Marciniak J, Küchler EC, Bekbulat F, Cirelli JA, Kirschneck C, Behl C, Deschner J, Jäger A, Beisel-Memmert S. Biomechanically induced regulation of Damage-Regulated Autophagy Modulator 1 in periodontal cells and tissues. BBRC 2025; 742: 151131

<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2024.151131>

3. Erklärung zum Eigenanteil

Die vorliegende Arbeit wurde in der Poliklinik für Kieferorthopädie der Universität Bonn unter Betreuung von Priv.-Doz. Dr. med. dent. Svenja Beisel-Memmert angefertigt.

Die Konzeption und Planung der Studie erfolgten in enger Zusammenarbeit mit meiner Doktormutter Priv.-Doz. Dr. Svenja Beisel-Memmert sowie Erika Calvano Küchler, Prof. Dr. Dr. Christian Kirschneck, Prof. Dr. Christian Behl, Prof. Dr. James Deschner und Prof. Dr. Andreas Jäger.

Die in dieser Dissertation präsentierten In-vitro-Experimente zur mechanischen Stimulation von humanen PDL-Fibroblasten, die RNA-Extraktion, die cDNA-Synthese sowie die Durchführung und Analyse der RT-qPCR und ELISA-Experimente wurden nach Einarbeitung eigenständig von mir durchgeführt.

Das für die In-vivo-Experimente verwendete tierische Probenmaterial wurde im Rahmen eines bereits genehmigten Tierversuches an der Universidade Estadual Paulista (UNESP) unter Leitung von Dr. Andressa Nogueira und Prof. Dr. Joni A. Cirelli gewonnen. Die Auswertung der gewonnenen Gewebeproben (RNA-Extraktion, RT-qPCR) erfolgte eigenständig durch mich.

Die statistische Auswertung der erhobenen Daten erfolgte unter der Betreuung von Priv.-Doz. Dr. Svenja Beisel-Memmert unter Nutzung der Software GraphPad Prism.

Die Interpretation der Ergebnisse und die Erstellung der Dissertation wurden von mir eigenständig vorgenommen, wobei bei Bedarf inhaltliche und sprachliche Anregungen durch Priv.-Doz. Dr. Svenja Beisel-Memmert erfolgten.

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

4. Danksagung

In erster Linie danke ich meiner Doktormutter Frau Privat-Dozentin Dr. Svenja Beisel-Memmert für die Überlassung dieses Themas und die unermüdliche Unterstützung während der Versuche sowie der schriftlichen Ausarbeitung, sowohl vor Ort als auch per E-Mail.

Daneben danke ich von Herzen meiner Familie, die mich in jeglicher Hinsicht unterstützt hat.