

Aus der Poliklinik für Kieferorthopädie  
des Klinikums der Universität München

Direktorin: Prof. Dr. med. dent. Andrea Wichelhaus

**Mechanobiologie und Genetik  
des Knochenremodelling  
unter besonderer Berücksichtigung  
der kieferorthopädischen Zahnbewegung**

Kumulative Habilitationsschrift  
zur Erlangung der Venia Legendi  
im Fach

**Experimentelle Zahnheilkunde**

vorgelegt von

Dr. rer. nat. Uwe Reinhard Volker Baumert, Diplom-Biologe

2020

Mutter,

Danke für Alles!

# Inhaltsverzeichnis

<b>Verzeichnis der Abkürzungen</b>	<b>V</b>
<b>1 Einleitung und Zielsetzung</b>	<b>1</b>
<b>2 Eigene Arbeiten</b>	<b>3</b>
2.1 Genetik des Knochenremodelling: Dysostosis cleidocranialis	3
2.1.1 [Referenz #17]: <b>Baumert</b> , Golan, Redlich, Akinin, Muessig (2005). Cleidocranial dysplasia: molecular genetic analysis and phenotypic-based description of a Middle European patient group. Am J Med Genet A 139:78-85.	4
2.1.2 [Referenz #19]: <b>Baumert</b> , Golan, Driemel, Reichert, Reicheneder, Muessig, Rose (2006). Dysostosis cleidocranialis: Beschreibung und Analyse einer Patientengruppe. Mund Kiefer Gesichtschir 10:385-393.	4
2.2 Mechanobiologie des Knochenremodelling durch kieferorthopädische Zahnbewegung	6
2.2.1 Zentrifugationsmodell	8
2.2.1.1 [Referenz #20]: <b>Baumert</b> , Golan, Becker, Hrala, Redlich, Roos, Palmon, Müßig (2004). Pressure simulation of orthodontic force in osteoblasts: a pilot study. Orthod Craniofac Res 7:3-9.	8
2.2.1.2 [Referenz #234]: Shi, <b>Baumert</b> , Folwaczny, Wichelhaus (2019). Influence of static forces on the expression of selected parameters of inflammation in periodontal ligament cells and alveolar bone cells in a co-culture in vitro model. Clin Oral Invest 23(6):2617-2628.	9
2.2.1.3 [Referenz #235]: Shi, Folwaczny, Wichelhaus, <b>Baumert</b> (2019). Differences in RUNX2 and P2RX7 gene expression between mono- and coculture of human periodontal ligament cells and human osteoblasts under compressive force application. Orthod Craniofac Res 22(3):168-176.	11
2.2.2 Das „Weight Approach Based“-Modell (WAB-Modell)	13
2.2.2.1 [Referenz #106]: Janjic, Docheva, Trickovic Janjic, Wichelhaus, <b>Baumert</b> (2018). In vitro weight-loaded cell models for understanding mechanodependent molecular pathways involved in orthodontic tooth movement: a systematic review. Stem Cells Int. 2018: 3208285.	14
2.2.2.2 [Referenz #107]: Janjic Rankovic, Docheva, Wichelhaus, <b>Baumert</b> (2020). Effect of static compressive force on in vitro cultured PDL fibroblasts: monitoring of viability and gene expression over 6 days. Clin Oral Invest 24(7):2497-2511.	15
2.3 <i>Stress während bzw. durch kieferorthopädische Behandlung</i>	17
2.3.1 [Referenz #259]: Tzortzi, Proff, Redlich, Aframian, Palmon, Golan, Wichelhaus, Muessig, <b>Baumert</b> (2009). Cortisol daily rhythm in saliva of healthy school children. Int Dent J 59:12-18	17
<b>3 Diskussion, Zusammenfassung und Ausblick</b>	<b>19</b>
3.1 <i>RUNX2-Mutationen und Dysostosis cleidocranialis</i>	19
3.1.1 Genotyp-Phänotyp-Korrelation bei Dysostosis cleidocranialis	19
3.1.2 RUNX2-Mutationen	21
3.1.3 Dentaler Phänotyp	23
3.2 Mechanobiologie	25
3.2.1 Gene des Knochenumbaus: RUNX2 und P2RX7	26

3.2.3	Entzündungsmediatoren und mechanosensitive Gene: TNFA, COX, IL6, PGE <sub>2</sub> , cFOS, HB-GAM	27
3.2.4	In-vitro-Simulation kieferorthopädischer Kräfte	31
3.3	Kieferorthopädische Zahnbewegung, Glucocorticoide und diurnale Rhythmik	33
3.4	Zusammenfassung und Ausblick	34
<b>4</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>36</b>
<b>5</b>	<b>Verzeichnis der dieser kumulativen Habilitationsschrift zugrundeliegenden Originalarbeiten</b>	<b>46</b>
5.1	<i>Baumert</i> , Golan, Redlich, Akin, Muessig (2005). Cleidocranial dysplasia: molecular genetic analysis and phenotypic-based description of a Middle European patient group. <i>Am J Med Genet A</i> 139:78-85.	46
5.2	<i>Baumert</i> , Golan, Driemel, Reichert, Reicheneder, Muessig, Rose (2006). Dysostosis cleidocranialis: Beschreibung und Analyse einer Patientengruppe. <i>Mund Kiefer Gesichtschir</i> 10:385-393.	46
5.3	<i>Baumert</i> , Golan, Becker, Hrala, Redlich, Roos, Palmon, Müßig (2004). Pressure simulation of orthodontic force in osteoblasts: a pilot study. <i>Orthod Craniofac Res</i> 7:3-9.	46
5.4	Shi*, <i>Baumert*</i> , Folwaczny, Wichelhaus (2019). Influence of static forces on the expression of selected parameters of inflammation in periodontal ligament cells and alveolar bone cells in a co-culture in vitro model. <i>Clin Oral Invest</i> 23(6):2617-2628.	47
5.5	Shi, Folwaczny, Wichelhaus, <i>Baumert</i> (2019). Differences in RUNX2 and P2RX7 gene expression between mono- and coculture of human periodontal ligament cells and human osteoblasts under compressive force application. <i>Orthod Craniofac Res</i> 22(3):168-176.	47
5.6	Janjic, Docheva, Trickovic Janjic, Wichelhaus, <i>Baumert</i> (2018). In vitro weight-loaded cell models for understanding mechanodependent molecular pathways involved in orthodontic tooth movement: a systematic review. <i>Stem Cells Int.</i> 2018: 3208285.	47
5.7	Janjic Rankovic, Docheva, Wichelhaus, <i>Baumert</i> (2020). Effect of static compressive force on in vitro cultured PDL fibroblasts: monitoring of viability and gene expression over 6 days. <i>Clin Oral Invest</i> 24(7): 2497-2511.	47
5.8	Tzortzi, Proff, Redlich, Aframian, Palmon, Golan, Wichelhaus, Muessig, <i>Baumert</i> (2009). Cortisol daily rhythm in saliva of healthy school children. <i>Int Dent J</i> 59:12-18.	48
<b>6</b>	<b>Danksagung</b>	<b>49</b>

## Verzeichnis der Abkürzungen

ALP	Alkalische Phosphatasen
AP-1	Activator protein 1
B2M	Beta-2-Mikroglobulin
BGLAP	Osteocalcin
BMAL1	<i>Brain and muscle ARNT-like 1 (Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator like, ARNTL)</i>
CBF $\beta$	<i>Core-binding factor subunit beta (CBFB)</i>
CCD	Dysostosis cleidocranialis ( <i>cleidocranial dysplasia</i> )
cDNA	<i>Complementary DNA</i>
(c)FOS	<i>Fos proto-oncogene, AP-1 transcription factor subunit (FOS)</i>
(c)JUN	<i>Jun proto-oncogen, AP-1 transcription factor subunit (JUN)</i>
CLOCK	<i>Clock circadian regulator</i>
COL1A1	Collagen I $\alpha$ 1
EARR	Externe, apikale Wurzelresorption
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
FKO	Funktionskieferorthopädie
GAPDH	<i>Glyceraldehyde-3-phosphatase dehydrogenase</i>
GCF	<i>Gingival Crevicular Fluid</i>
GPK	Genotyp-Phänotyp-Korrelation
HABO(s)	humane Alveolarknochen-Osteoblasten ( <i>human alveolar bone-derived osteoblasts</i> )
HB-GAM	<i>Heparin binding growth associated molecule (pleiotrophin, PTN)</i>
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HOMALS	<i>Homogeneity Analysis by Means of Alternating Least Squares</i>
HPA	Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse
HPDF(s)	humane Parodontalligament-Fibroblasten ( <i>human periodontal ligament-derived fibroblasts</i> )
IL6	Interleukin 6
KEGG	<i>Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes</i> (URL: <a href="http://www.kegg.jp">www.kegg.jp</a> )
KZB	Kieferorthopädische Zahnbewegung
LDH	Laktatdehydrogenase
M-CSF	<i>Macrophage colony-stimulating factor</i> (auch CSF-1)
MAP	<i>Mitogen-activated protein</i>
MDMHB	<i>Metaphyseal Dysplasia with Maxillary Hypoplasia with or without Brachydactyly</i>
MIQE	<i>Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments</i>
MMP13	Kollagenase 3 (Matrix-Metalloproteinase 13)
mRNA	Boten-RNA ( <i>messenger RNA</i> )
OMIM	<i>Online Mendelian Inheritance in Man</i> (URL: <a href="http://www.omim.org">www.omim.org</a> )
OPG	Osteoprotegerin (TNFRSF11B)
P2RX7	<i>Purinergic receptor P2X 7</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDL	Parodontalligament
PER1	<i>Period circadian regulator 1</i>
PER2	<i>Period circadian regulator 2</i>
PGE <sub>2</sub>	Prostaglandin E2
PGK1	<i>Phosphoglycerate kinase 1</i>

PLGA	<i>Polylactic-co-glycolic acid</i>
PLLA	<i>Poly-L-lactide acid</i>
PPI	<i>Protein Protein Interaction</i>
PRISMA	<i>Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses</i>
PTGS2	<i>Prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (Cyclooxygenase-2, „COX2“)</i>
PubMed	<i>Public Medline (URL: <a href="http://www.pubmed.gov">www.pubmed.gov</a>)</i>
Rab	<i>Ras-related in brain (GTPase)</i>
RANK	<i>Receptor activator of nuclear factor-<math>\kappa</math>B</i>
RANKL	<i>Receptor activator of nuclear factor-<math>\kappa</math>B ligand</i>
RHD	<i>Runt homologous domain</i>
RPL13A	<i>Ribosomal protein L13a</i>
RT-qPCR	<i>Quantitative Real-Time-PCR</i>
RUNX1	<i>Runt-related transcription factor 1 (AML1, CBFA2)</i>
RUNX2	<i>Runt-related transcription factor 2 (AML3, CBFA1)</i>
RUNX3	<i>Runt-related transcription factor 3 (AML2, CBFA3)</i>
sAA	<i>Speichel-<math>\alpha</math>-Amylase</i>
SSP1	<i>Osteopontin</i>
STRING	<i>Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins (URL: <a href="http://string-db.org">string-db.org</a>)</i>
TNFA	<i>Tumor necrosis factor alpha (TNF)</i>
TNFRSF11B	<i>TNF receptor superfamily member 11b (Osteoprotegerin, „OPG“)</i>
TNFSF11	<i>TNF superfamily member 11 (Receptor activator of nuclear factor <math>\kappa</math>-B ligand, „RANKL“)</i>
WAB	<i>Weight Approach Based</i>

# 1 Einleitung und Zielsetzung

Die Kieferorthopädie lässt sich in die orthodontische und orthopädische Therapie unterteilen. In beiden Therapieformen hat die Knochenremodellierung („*bone remodelling*“) eine große Bedeutung. In der orthopädischen Therapie werden während des Wachstums der Patienten skelettale Umbauprozesse durch muskuläre Effekte induziert oder gehemmt; eine Stabilisierung erfolgt anschließend durch skelettale Adaptation („*form follows function*“) [276, S. 286]. In der orthodontischen Therapie dagegen werden Umbauprozesse im Parodontalligament (PDL) und Alveolarknochen durch Kraft-Applikation („kieferorthopädische Kraft“) auf Zähne induziert und diese dadurch im Zahnhalteapparat bewegt (kieferorthopädische Zahnbewegung, KZB).

Histologisch sind die Abläufe während der KZB sehr gut dokumentiert. Die eingeleitete Kraft induziert Umbauprozesse im umgebenden PDL und im Alveolarknochen: in Richtung der Kraft („Druckseite“) stimuliert sie Knochenabbau durch Aktivierung von Osteoklasten und auf der entgegengesetzten Seite („Zugseite“) Knochenaufbau durch die Aktivierung von Osteoblasten. Die Umbauprozesse sind an ein intaktes PDL gekoppelt. Dies lässt auf eine Kommunikation zwischen den Geweben schließen. Wie diese intra- bzw. interzelluläre Kommunikation im Detail stattfindet, welche Signale bzw. Signalmoleküle daran beteiligt sind und inwieweit diese Kraft- und Richtungsabhängig ist, sind Gegenstand der aktuellen Forschung.

Hinzu kommen näher zu bestimmende Patienten-spezifische Komponenten. Bereits 1932 stellte A. M. Schwarz fest, dass auch bei gleicher Kraftgröße Patienten unterschiedlich schnell reagieren und dass diese individuellen Unterschiede auf unterschiedlich schnell ablaufende Knochenumbauprozesse zurückzuführen seien [230, S. 351]. Daher müsste auch die kieferorthopädische Therapie der individuellen Biologie eines Patienten Rechnung tragen. Genetische und epigenetische Faktoren und weitere individuelle Risikofaktoren werden in der Forschung diskutiert, um eine individualisierte, biologisierte Therapie des individuellen Patienten zu ermöglichen.

Im *ersten Teil* meiner wissenschaftlichen Arbeiten habe ich mich mit der Genetik des Knochenremodelling beschäftigt [17-19]. Dysostosis cleidocranialis ist eine seltene, autosomal-dominant vererbte Fehlbildung, die alle knochenbildenden Zentren betrifft und durch heterozygote Mutationen im Transkriptionsfaktor RUNX2 hervorgerufen wird. Sie zeigt phänotypische Plastizität und in familiären Fällen eine starke phänotypische Variabilität. Dies macht dieses Syndrom und das Gen *RUNX2* auch für Untersuchungen zum Knochenumbau gleichermaßen interessant.

Im *zweiten Teil* meiner wissenschaftlichen Arbeiten lag der Fokus auf mechanobiologischen Aspekten der Knochenremodellierung. In Zellkulturmodellen wurde die Druckkomponente der kieferorthopädischen Zahnbewegung simuliert und die zellulären Signalwege in Osteoblasten und PDL-Fibroblasten untersucht [20, 106, 107, 234, 235]. Hierzu wurden bereits etablierte Simulationsverfahren dahingehend erweitert, dass sie entweder Simulationen über längere Zeiträume als bisher [106, 107] oder die Bestimmung der interzelluläre Kommunikation zwischen verschiedenen Zelltypen in einem Co-Kultur-Modell [234, 235] erlauben.

Der *dritte Teil* meiner wissenschaftlichen Arbeit lag auf dem Gebiet der hormonellen Regulation der KZB und der individuellen Reaktion der Patienten [259]. Patienten berichten über schmerzhafte Erfahrungen während unterschiedlicher Behandlungs-Stadien. Über die Konzentration des Stresshormons Cortisol im Speichel lässt sich mentaler bzw. psychischer Stress objektiv bestimmen.

Die Cortisol-Sekretion im Speichel unterliegt einem diurnalen Rhythmus. Dieser ist für Erwachsene bekannt und beschrieben, für Jugendliche der Altersgruppe zwischen 10 und 14 Jahren dagegen nicht. Daher sollte in dieser Studie das Cortisol-Tagesprofil bestimmt werden und somit eine Basis für weitere Studien liefern [259].



## 2 Eigene Arbeiten

Im Folgenden werden acht, in Peer-begutachteten Fachzeitschriften veröffentlichte Originalarbeiten zusammengefasst und anschließend diskutiert.

### 2.1 Genetik des Knochenremodelling: Dysostosis cleidocranialis

Dysostosis cleidocranialis (CCD; OMIM 119600) ist eine seltene, autosomal-dominant vererbte allgemeine Dysplasie der dentalen und knöchernen Gewebe [17, 19, 188]. Das phänotypische Spektrum der CCD reicht von milden Formen mit isolierten dentalen Anomalien ohne skelettale Befunde über den klassischen Trias aus verspätetem Suturenverschluss, hypo- oder aplastisch angelegten Schlüsselbeinen und kraniofazialen Merkmalen (u. a. hochgradige Überzahl und Retention der bleibenden Zähne, Persistenz der Milchzähne sowie Hypoplasie des Mittelgesichtes und Wormsche Knochen im Hinterhauptbereich), bis hin zu den schweren Formen inklusive Kleinwuchs, weiteren Veränderungen des Skeletts und mentaler Retardierung [19, 39, 187]. Patienten mit CCD zeigen einen stark variierenden Phänotyp mit variabler Penetranz und in familiären Fällen intrafamiliärer Variabilität [17, 39, 63, 68, 187]. Aufgrund der starken phänotypischen Variabilität und das Auftreten milder CCD-Phänotypen ist davon auszugehen, dass CCD häufiger auftritt als die in der Literatur genannte Inzidenz von 1 : 1.000.000 [171] nahelegt.

Heterozygote Mutationen im Lokus des Transkriptionsfaktors *RUNX2* (OMIM 600211) wurden als genetische Ursache der CCD identifiziert [188, 196]. *RUNX2* ist Mitglied der Familie der *Runt*-Transkriptionsfaktoren, zu der beim Menschen ebenfalls *RUNX1* und *RUNX3* gehören [102, 151]. Allen gemeinsam ist die sogenannte *Runt*-Domäne, auch „*runt homologous domain*“ (RHD) genannt. Die RHD-Sequenz ist evolutiv stark konserviert [113] und für die spezifische Bindung des Transkriptionsfaktors an die entsprechenden DNA-Promotorsequenzen der *RUNX2*-regulierten Gene (u. a. alkalische Phosphatase, Kollagen  $\alpha 1$ , Kollagenase 3 (MMP13), Osteopontin und Osteocalcin) verantwortlich. Durch Bindung der CBF $\beta$ -Untereinheit („*Core Binding Factor Beta*“; OMIM 121360) an die RHD wird der funktionale, dimerisierte Transkriptionsfaktor gebildet [257, 294]. *RUNX2* ist an sehr vielen Prozessen primärer oder sekundärer Biomineralisation beteiligt: unter anderem an der Knochen-Knorpel-Differenzierung [Übersicht in 298], der Zahnmorphogenese [2], der Entstehung von osteolytischen Läsionen bei Brustkrebs [15], bei Arterienverkalkung [37] und der vaskulären Kalzifizierung bei chronischer Nieren-Erkrankung [20]. Eine wesentliche Rolle spielt *RUNX2* ebenfalls in der Mechanotransduktion von PDL-Fibroblasten [306] und Osteoblasten [20].

Knochenbildung während der Embryonalentwicklung und Knochen-Remodellierung sind Prozesse, in denen *RUNX2* eine zentrale Rolle einnimmt. Daher wird es als „Master“-Gen der Knochenbildung und -entwicklung angesehen [187]. Untersuchungen an *RUNX2*-Knock-out-Mäusen unterstreichen dies: homozygoten *RUNX2*<sup>-/-</sup>-Mäusen fehlt jegliche Ossifikation [196]. Sie sterben kurz nach der Geburt, da aufgrund des fehlenden Brustkorbes die Atmung aussetzt. Heterozygote *RUNX2*<sup>+/-</sup>-Mäuse dagegen zeigen einen skelettalen Phänotyp, der dem CCD-Phänotyp des Menschen sehr ähnlich ist [133, 196].

*RUNX2*-Mutationen rufen durch Haploinsuffizienz CCD hervor [187, 188]: im heterozygoten Zustand stehen nur 50 % des nicht-mutierten Genproduktes zur Verfügung und diese verbleibende Restaktivität bzw. -menge reicht nicht aus, um die normalen Funktionen zu erfüllen.

Zurzeit (17.02.2020) werden in der öffentlichen Variante der „*Human Gene Mutation Database*“<sup>1</sup> 201 verschiedene Mutationen im *RUNX2*-Genlokus gelistet: darunter 80 Missense- bzw. Nonsense-Mutationen, 102 kleine und große Deletionen bzw. Insertionen und 11 Splice-Varianten. Die Missense- bzw. Nonsense-Mutationen verhindern oder mindern z. B. unter anderem die DNA-Sequenz-Erkennung, behindern die Komplexbildung mit der CBF $\beta$ -Untereinheit, oder destabilisieren die DNA-Bindung [19, 188].

2.1.1 [Referenz #17]: **Baumert, Golan, Redlich, Akin, Muessig (2005)**. *Cleidocranial dysplasia: molecular genetic analysis and phenotypic-based description of a Middle European patient group*. *Am J Med Genet A* 139:78-85.

und

2.1.2 [Referenz #19]: **Baumert, Golan, Driemel, Reichert, Reicheneder, Muessig, Rose (2006)**. *Dysostosis cleidocranialis: Beschreibung und Analyse einer Patienten-gruppe*. *Mund Kiefer Gesichtschir* 10:385-393.

Diese Studie [19] stellt eine Nachuntersuchung der in [17, 18] publizierten CCD-Patientenkohorte dar. Beide Artikel werden daher gemeinsam zusammengefasst.

*Einleitung:* Aufgrund des breiten phänotypischen Spektrums und der zum Teil altersabhängigen Penetranz des Phänotyps ist die Etablierung einer Genotyp-Phänotyp-Korrelation (GPK) bei CCD bisher nur teilweise geglückt [195, 253, 295, 303]. Yoshida et al. [295] stellten z. B. eine Korrelation zwischen der Körpergröße von CCD-Patienten und der Anzahl an überzähligen Zähnen bzw. zwischen Körpergröße und der Lokalisation von *RUNX2*-Mutationen in der RHD her. Tessa et al. [253] konnten keine Beziehung zwischen kleiner Statur und *RUNX2*-Mutationen in der *Runt*-Domäne herstellen.

In beiden Studien [17-19] wurden die Ergebnisse der Phänotyp- und Genotyp-Analysen [63-69] von 31 gut-charakterisierten CCD-Patienten inklusive 20 Indexpatienten zusammengefasst und im Zusammenhang analysiert. Die Analyse des klinischen Phänotyps der Patienten wurde mittels Homogenitäts-Analyse (HOMALS) durchgeführt und mit dem Genotyp der Patienten verglichen. Die Patientenkohorte wurde zwischen 1999 und 2005 gemäß dem Votum der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Universität Regensburg am Zentrum für kraniofaziale Genetik der Universität Regensburg rekrutiert.

*Patienten und Methode:* Die formale CCD-Diagnose wurde anhand der charakteristischen skelettalen, fazialen und dentalen Befunde gestellt. Bei Patienten mit mildem Phänotyp wurde zusätzlich eine Familienanamnese durchgeführt. Aufgrund der phänotypischen Variabilität wurde der Schweregrad der einzelnen Befunde in drei Kategorien eingeteilt: „keine“, „mild“ oder „schwer“ [17, Tab. 1]. Die Körpergröße wurde gemäß den Wachstumsperzentilen [202] in sieben Größenklassen unterteilt.

Zum Mutationsscreening wurde aus peripherem EDTA-Blut der Patienten genomische DNA isoliert, alle acht Exone des *RUNX2*-Gens mit intronischen Exon-spezifischen Primern durch Polymerasekettenreaktion (PCR) amplifiziert [19, Abb. 4] und die PCR-Produkte sequenziert [67].

---

<sup>1</sup> URL: <http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php> (Letzter Zugriff: 17.02.2020)

In familiären Fällen wurde mittels Restriktionslängenpolymorphismus-Analyse die Segregation potenzieller Sequenzvarianten mit dem Phänotyp überprüft [19, Abb. 4]. Im Falle von *De-novo*-Mutationen wurden mögliche Polymorphismen durch den Vergleich mit 100 mitteleuropäischen, Kontrollchromosomen ausgeschlossen.

Die statistische Analyse des Phänotyps erfolgte mittels HOMALS („*homogeneity analysis by means of alternating least squares*“; SPSS 12.0-Modul „Categories“, SPSS, Inc., Chicago, IL, USA). Es handelt sich hierbei um eine Hauptkomponentenanalyse für kategoriale Daten, in der die „Kategorien jeder einzelnen Variablen so quantifiziert werden, dass Personen innerhalb derselben Kategorie nahe beieinander platziert werden, während Personen in verschiedenen Kategorien weit voneinander verortet werden.“ [Übersetzung aus 17, Seite 80] Werden alle Personen eines Datensatzes über alle Variablen in homogene Untergruppen eingeteilt, kann mit HOMALS die Beziehung zwischen zwei und mehr Variablen in einer einzelnen zweidimensionalen Grafik dargestellt werden.

*Ergebnisse:* Auf Basis der molekulargenetischen Analyse wurden drei familiäre und sieben *de-novo* Fälle identifiziert. Innerhalb der Patientenkohorte konnten acht verschiedene bisher unveröffentlichte und vier verschiedene bereits veröffentlichte *RUNX2*-Mutationen nachgewiesen werden. Dies entsprach 70 % (14/20) der Index-Patienten. Bei sechs Index-Patienten (6/20; 30 %) konnten keine Mutationen im kodierenden Bereich des *RUNX2*-Gens gefunden werden (Tab. 2 in [17]; Abb. 5 in [19]).

Klinisch wurden 26 Patienten aus 18 nicht-verwandten Familien untersucht. In 13/18 Fällen handelte es sich um spontane Mutationen. Der HNO-ärztliche Befund war in allen Patienten manifestiert, während der dentale Befund sowohl intra- als auch interfamiliär phänotypische Variabilität zeigte. Im Allgemeinen war die Körpergröße der CCD-Patienten kleiner (~16te Wachstumszentile nach Prader) [17, Tab. 3].

Mittels HOMALS wurde eine zwei-dimensionale Lösung berechnet, die insgesamt 77,4 % der Gesamtvarianz des Datensatzes erklärte (Dimension 1: Eigenwert 0,503; Dimension 2: Eigenwert 0,271). Die erste Dimension dominierten die klinischen Variablen, die vornehmlich den Gesichtschädel beschrieben (u. a. verspäteter Zahndurchbruch, hypoplastisches Mittelgesicht, überzählige Zähne). Die zweite Dimension wurde durch die Anwesenheit Wormscher Knochen, Pneumatisationsstörungen des Mastoids und/oder des Sinus frontalis, prominenter Stirn („*frontal bossing*“) und der Zentile der Körpergröße geprägt (Tab. 4 und Abb. 6 in [17]; Tab. 1 und Abb. 6 in [19]).

*Zusammenfassung:* Der CCD-Genotyp konnte durch die hier identifizierten bisher unveröffentlichten *RUNX2*-Mutationen erweitert werden. Ihre Häufigkeit und Typ bestätigte die in der Literatur beschriebene Korrelation zwischen Mutationstyp und Lokalisation der Mutation. Während in der RHD hauptsächlich Missense-Mutationen gefunden wurden, traten Nonsense- und Leseraster-Mutationen über die gesamte kodierende Gensequenz verteilt auf. Der hohe Anteil an Missense-Mutationen in der RHD ist ihrer evolutiv extremen Sequenzkonservierung geschuldet; daher ist ihre Fehlertoleranz geringer als in den übrigen Bereichen des *RUNX2*-Gens.

Die HOMALS-Analyse der phänotypischen Charakteristika dieser Patientengruppe vereinfachte die Eingruppierung in unterscheidbare Untergruppen und verdeutlichte die intra- und interfamiliäre Phänotyp-Variabilität.

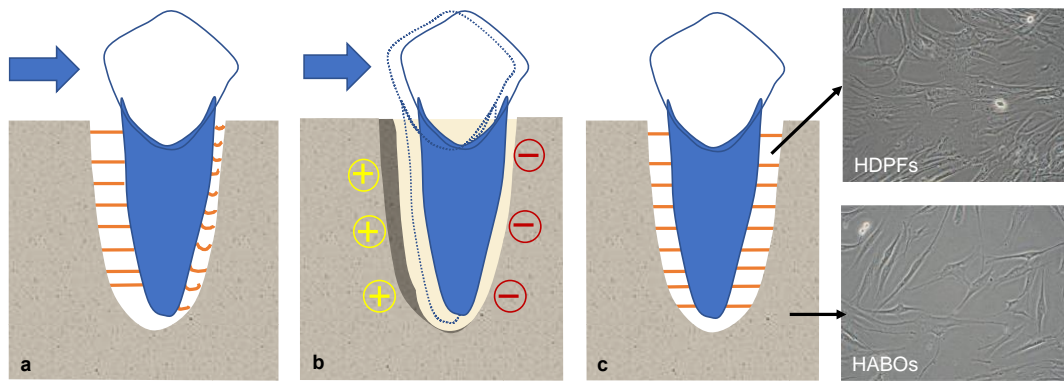
## 2.2 Mechanobiologie des Knochenremodelling durch kieferorthopädische Zahnbewegung

Seit der Formulierung des Wolffschen Transformationsgesetzes 1892 ist die Bedeutung der funktionellen, mechanischen Belastung für die Entwicklung, die Form und den Erhalt von Struktur und Dichte knöcherner Gewebe bekannt [278]. In der klinischen Literatur ist zweifelsfrei dokumentiert, dass die biophysikalische Belastung wichtig für die Homöostase des Knochengewebes ist, mit klarem Nachweis von Knochenresorption nach Funktionsverlust [149] und Knochenbildung nach Steigerung von physischer Aktivität [148, 249]. Die remodellatorische Anpassungsfähigkeit des Knochens ist auch die Voraussetzung für jede kieferorthopädische Zahnbewegung – ein Umstand, den Hunter vor mehr als 200 Jahren mit den folgenden Worten beschrieb [96, Seite 75]: „[...] *but we find that the very principle upon which Teeth are made to grow irregularly, is capable, if properly directed, of bringing them even again. This principle, is the power which many parts (especially bones) have of moving out of the way of mechanical pressure.*“

Obwohl die Wichtigkeit der mechanischen Belastung für die Knochenentwicklung und die Aufrechterhaltung der Knochenintegrität unbestritten ist, ist über die Transduktionswege und die Mechanismen wenig bekannt, die auf zellulärer und subzellulärer Ebene in Abhängigkeit von der funktionellen, mechanischen Belastung den Auf- oder Abbau von Knochen induzieren und regulieren. Es scheint aber, dass die extrazelluläre Matrix, Stress-aktivierte Ionenkanäle, Signalmoleküle, Zytoskelett und Integrine für die Mechanotransduktion eine fundamentale Rolle spielen [100]. Von besonderem Interesse scheint der MAP-Kinase-Weg zu sein, der als einer der grundlegenden Signaltransduktions-Kaskaden mit der Mechanotransduktion assoziiert ist [90, 146, 200]. Integrine, die das Zytoskelett mit der extrazellulären Matrix verbinden und eine Reihe von Signal-Kaskaden vermitteln, könnten die mechanischen Stimuli in biochemische Signale umsetzen [201]. Komponenten der Mechanotransduktion können Inositol-(1,4,5)-triphosphat [223] und  $\text{Ca}^{2+}$  [42], ebenso nachgeschalteten Mediatoren wie z. B. Proteinkinase C [59] und kleine GTP-bindende Proteine der Rab-Familie [16] sein.

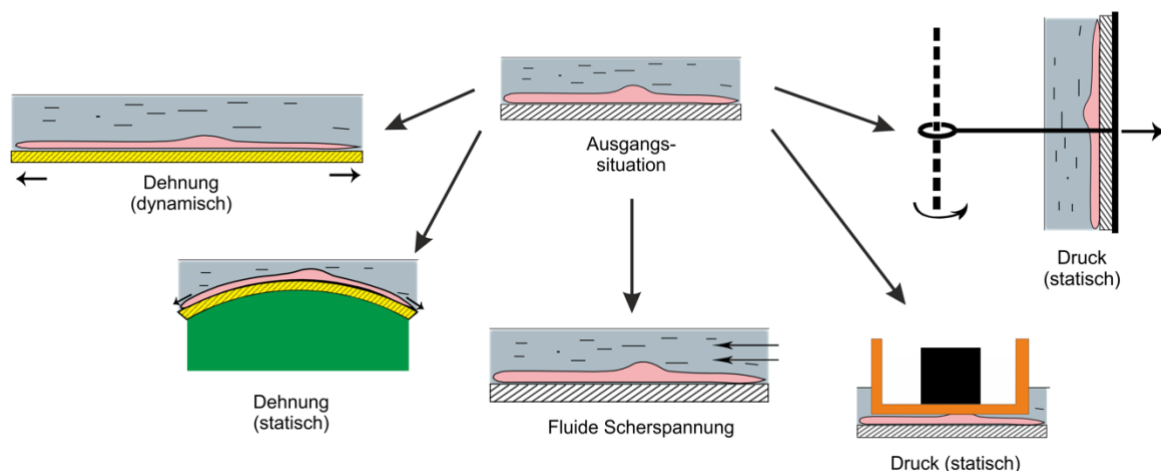
Ziel einer orthodontischen Behandlung ist es, einen falsch positionierten Zahn durch die Applikation einer kontinuierlichen Kraft zu bewegen. Diese Kraft stimuliert Umbauprozesse im umliegenden Gewebe, dem Parodontalligament (PDL) und dem Alveolarknochen. Diese führen zu Knochenabbau in Richtung der Kraft („Druckseite“) und Knochenaufbau in der entgegengesetzten Richtung („Zugseite“) (**Abb. 2.1a-b**): kieferorthopädische Zahnbewegung (KZB) basiert auf der Stimulation des Knochenremodelling durch die Applikation einer kieferorthopädischen Kraft [276].

Histologisch ist der grundlegende Ablauf der KZB sehr gut bekannt [44]. Eine wesentliche Rolle während der KZB spielen die Parodontalligament-Fibroblasten (HPDF) im PDL und die Osteoblasten (HABO) bzw. Osteoklasten im Alveolarknochen. Im Gegensatz zu den HABOs, die einen gut charakterisierte Zelltyp darstellen, repräsentieren HPDFs eine Misch-Population meist Fibroblasten-ähnlicher Zellen [43, 189] (**Abb. 2.1c**). Die darin enthaltenen mesenchymalen Stammzellen [231] sind von speziellem Interesse, da sie die Quelle von Vorläuferzellen sind, die für die Regeneration und die Remodellierung nicht nur des PDL, sondern auch der Alveolarknochen verantwortlich zeichnen.



**Abb. 2.1.** Knochenremodellierung während der kieferorthopädischen Zahnbewegung. (a) Applikation einer kieferorthopädischen Kraft bewirkt eine initiale Verschiebung des Zahnes im PDL. Hierdurch werden die Fasern im PDL auf der Zugseite gedehnt und auf der gegenüberliegenden Seite gestaucht (Druckseite). (b) Nach längerer Kraftapplikation führt dies auf der Zugseite zur Neubildung von Knochen und auf der Druckseite zu Resorptionen. (c) Phasenkontrastaufnahmen von humanen PDL-Fibroblasten (HPDFs) und humanen Alveolarknochen-Osteoblasten (HABOs) in Zellkultur. (Modifiziert nach einer Abbildung aus Janjic et al. [106], CC BY 4.0)

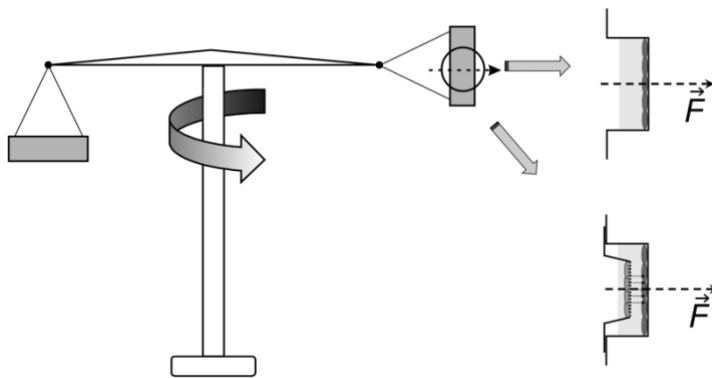
Aufgrund der komplexen räumlichen Anordnung der an der KZB beteiligten Gewebe [174] ist die direkte Analyse inter- und intrazelluläre Vorgänge während der KZB innerhalb eines Zelltyps und zwischen Zellen verschiedener Zelltypen schwierig. Daher wurden in den 1980er und 1990er Jahren erste *In-vitro*-Modelle zur Untersuchung der zellulären Reaktion auf unterschiedliche Stress-Modalitäten etabliert: fluide Scherspannung 1981 [46], dynamische Dehnung 1994 [224], statische Dehnung 1995 [16] und statischer Druck durch Zentrifugation 1993 [101] (Abschnitt 2.2.1) bzw. durch das „*Weight Approach Based*“-Modell 1992 [114] (Abschnitt 2.2.2) (**Abb. 2.2**). Die Untersuchungen selbst erfolgten in Mono-Kultur an Zellen tierischen oder humanen Ursprungs, u. a. an PDL-Fibroblasten, Osteoblasten, Gingiva-Fibroblasten und diversen Zelllinien [106, 140, 141, 155, 156, 264, 289]. In neuerer Zeit gewinnt die interzelluläre Kommunikation immer mehr Aufmerksamkeit. Dem wird durch die Etablierung von Co-Kultur-Modellen Rechnung getragen [186, 221, 234, 235] (Abschnitt 2.2.1).



**Abb. 2.2.** *In vitro*-Modelle zur Simulation kieferorthopädischer Zahnbewegung mit verschiedenen Kraftmodalitäten (von links nach rechts): statische und dynamische Dehnung, fluide Scherspannung und statischer Druck mittels WAB-Modell und Zentrifugation (nach verschiedenen Autoren).

### 2.2.1 Zentrifugationsmodell

Eine Möglichkeit, die auf der „Druckseite“ während der KZB auftretende Kompression des PDL zu simulieren, wurde 1993 publiziert [101] und kurze Zeit später für die Simulation von Druckstress an HPDFs adaptiert [212-214]: Zellen werden in einer Zentrifuge platziert und zentrifugiert (**Abb. 2.3**). Mit dieser Anordnung werden kieferorthopädische Druckkräfte im Bereich zwischen ca. 20 – 70 g/cm<sup>2</sup> simuliert [20, 59, 101, 136, 212-214, 254]. Ein Nachteil dieses Modells soll nicht unerwähnt bleiben: die Temperatur-Sensitivität biologischer Systeme. In der Regel wird die Kultur humaner Zellen bei 37 °C durchgeführt. Erfolgt über einen längeren Zeitraum die Kultivierung unterhalb dieser Temperatur, werden höchstwahrscheinlich Apoptose und Zelltod induzieren. Diese Temperatur-Sensitivität wurde bisher nur von wenigen Autoren berücksichtigt [101], während im Großteil der Studien dieses Modell bei Raumtemperatur angewandt wird [20, 75, 212-214]. In unseren späteren Studien [234, 235] wurde die Temperatur-Sensitivität einbezogen und die Zentrifugationen bei 30 °C durchgeführt.



**Abb. 2.3.** *In-vitro*-Modell zur Kraft-Simulation einer orthodontischen Zahnbewegung. Die Zellen werden in einem Ausschwingrotor platziert. Während der Zentrifugation steht der Kraftvektor  $\vec{F}$  senkrecht zur Wachstumsebene der Zellen. Die Vergrößerungen rechts zeigen die Situation in Mono- (oben) und Co-Kultur (unten). (Abbildung modifiziert aus Shi et al. [234])

2.2.1.1 [Referenz #20]: **Baumert, Golan, Becker, Hrala, Redlich, Roos, Palmon, Müßig (2004).** *Pressure simulation of orthodontic force in osteoblasts: a pilot study. Orthod Craniofac Res 7:3-9.*

*Einleitung:* Aufgrund der zentralen Bedeutung des RUNX2-Transkriptionsfaktors für die Knochenhomöostase und die Knochenremodellierung [55, 133] und der lokalen, strukturellen Adaptationsfähigkeit des Knochens nach mechanischer Belastung [31, 220, 240] wurde postuliert, dass eine Kraft-abhängige Regulation der Expression des RUNX2-Transkriptionsfaktors ebenfalls in Osteoblasten stattfinden könnte [20]. Für PDL-Fibroblasten konnte dies bereits *in vitro* nach mechanischer Dehnung [306] bzw. Druckapplikation mittels Zentrifugation [212-214] gezeigt werden.

In dieser Studie sollte daher kieferorthopädischer Druckstress auf humane Osteoblasten *in vitro* durch Zentrifugation appliziert und Änderungen in der RUNX2-Genexpression mittels quantitativer PCR (RT-qPCR) bestimmt werden.

*Material und Methode:* Humane Osteoblasten wurden nach Standardmethode kultiviert und in der vierten Passage in 12-Well-Zellkulturplatten subkultiviert. Druckstress (40,3 g/cm<sup>2</sup>) wurde durch Zentrifugation in einer Zentrifuge mit Ausschwingrotor für 30 bzw. 90 Minuten appliziert (**Abb. 2.3**). Identisch vorbereitete Zellen ohne Zentrifugation dienten als Negativkontrolle. Unmittelbar vor ( $T_0$ ) und zu definierten Zeitpunkten nach Zentrifugation (1,5, 2,5, 4,5, 8,5, 16,5 und 32,5 min) wurde Gesamt-RNA gemäß Standardprotokoll aus behandelten und Kontroll-Zellen

gewonnen. Definierte Mengen der Gesamt-RNA wurden in cDNA umgeschrieben. Die Genexpression von *RUNX2* zu den definierten Zeitpunkten nach Zentrifugation wurde mit RT-qPCR bestimmt (Referenz-Gen: *GAPDH*) und gegen die  $T_0$ -Proben normalisiert.

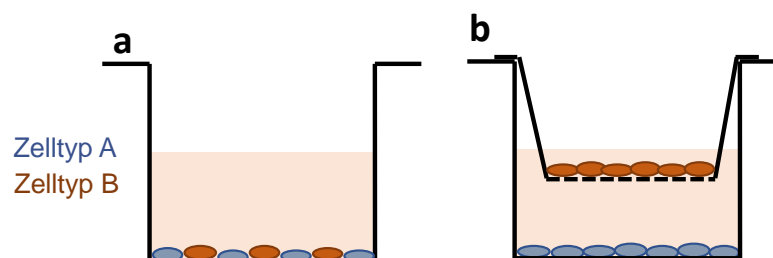
*Ergebnisse:* Die Genexpressionsprofile nach 30 und 90 min Druckapplikation zeigen deutliche Unterschiede. Eine 90-minütige Kraftapplikation induzierte keine signifikante Stimulation des *RUNX2*-Gens über den Zeitraum bis 32 min Post-Zentrifugation. Nur bei der 30-minütigen Kraftapplikation war ein stimulierender Effekt beobachtbar: 2,5 min Post-Zentrifugation stieg die *RUNX2*-Genexpression 1,7-fach (SD: 0,14) an [20, Abb. 2].

*Zusammenfassung:* *In vitro*-Applikation eines Druckstresses durch Zentrifugation induzierte in Osteoblasten einen Anstieg der *RUNX2*-Genexpression, die innerhalb kurzer Zeit (ca. 6 min) auf den Ausgangswert zurückreguliert wurde.

2.2.1.2 [Referenz #234]: Shi, **Baumert**, Folwaczny, Wichelhaus (2019). *Influence of static forces on the expression of selected parameters of inflammation in periodontal ligament cells and alveolar bone cells in a co-culture in vitro model.* *Clin Oral Invest* 23(6):2617-2628.

*Einleitung:* Im Gegensatz zur klinischen Situation wird in der *In-vitro*-Simulation der KZB in der Regel ein Zelltyp in Monokultur einer mechanischen Kraft ausgesetzt und dessen zelluläre Antwort bestimmt. *In vivo* dagegen besteht zwischen PDL-Fibroblasten, Osteoblasten und Osteoklasten ein enges Geflecht unterschiedlichster inter- und intrazellulärer Signalwege [264].

Zur Untersuchung der interzellulären Kommunikation sind in letzter Zeit zwei unterschiedliche Co-Kultur-Modelle [154, 186, 221] in den Fokus gerückt (Abb. 2.4): direkte [221] und indirekte Co-Kultur [88]. In der direkten Co-Kultur werden zwei verschiedene Zelltypen in direktem Kontakt miteinander kultiviert; eine Zelltyp-spezifische Analyse ist nur nach Trennung beider Zelltypen voneinander möglich. Dagegen wachsen in der indirekten Co-Kultur die Zellen beider Typen räumlich voneinander getrennt im gleichen Nährmedium. Die Trennung erfolgt in der Regel durch eine poröse Membran, die beide Zelltypen räumlich voneinander trennt und für Zellkulturmedium und darin gelöste Moleküle wie Zytokine oder Wachstumsfaktoren permeabel ist.



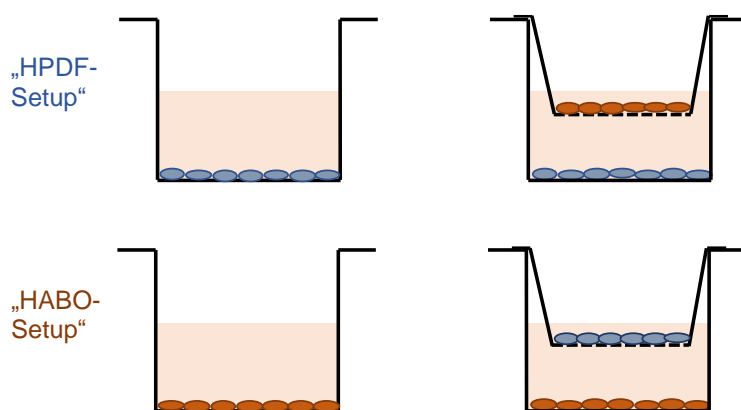
**Abb. 2.4.** Gebräuchliche Co-Kultur-Modelle. (a) Direkte Co-Kultur: Zellen beider Zelltypen A und B haben direkten physischen Kontakt zueinander. (b) Indirekte Co-Kultur: die Zellen beider Zelltypen sind physisch voneinander durch eine poröse Membran getrennt. Die interzelluläre Kommunikation findet über das Zellkulturmedium statt.

In dieser Studie [234] sollte eine indirekte Co-Kultur aus humanen PDL-Fibroblasten (HPDFs) und Alveolarknochen-Osteoblasten (HABOs) etabliert und diese dann einer statischen Druckkraft [20] ausgesetzt werden. Im Vergleich zwischen Mono- und Co-Kultur-Situation sollte dann in beiden

Zelltypen getestet werden, ob (1) interzelluläre Kommunikation zwischen HPDFs und HABOs existiert und diese (2) die Regulation der mechanisch-induzierten Expression von Zytokinen (TNFA, IL6), Enzymen (PTGS2 = COX2) und Metaboliten (PGE<sub>2</sub>) beeinflusst. Um die Temperatur-Sensitivität biologischer Systeme zu berücksichtigen, sollten die Zentrifugationen bei 30 °C durchgeführt werden.

*Material und Methode:* HPDFs und HABOs wurden aus Zähnen bzw. Knochen gewonnen. Das Studienprotokoll wurde von der lokalen Ethikkommission freigegeben (Az. 045-09). Die Entnahme des Materials geschah ausschließlich aufgrund einer kieferorthopädischen und/oder kieferchirurgischen Indikation.

Kieferorthopädische Druckkräfte wurden durch Zentrifugation von HPDFs und HABOs sowohl in Mono- als auch in Co-Kultur für 1, 2 und 4 Stunden bei 47,6 g/cm<sup>2</sup> und 30 °C simuliert [20, 213]. Während der gesamten Zentrifugation wurde die Temperatur in der Zentrifuge durch Messfühler überwacht. Im Fall der Co-Kultur wurden die Zentrifugationen mit den jeweiligen Zellen in vertauschten Positionen wiederholt (**Abb. 2.5**). Als Negativkontrolle dienten identisch-kultivierte Zellen, die bei 30 °C inkubiert wurden. Von jeder Zelltyp-Kultur-Kombination wurden sechs Replikationen durchgeführt.



**Abb. 2.5.** Mono- (links) und Co-Kultur-Setup (rechts) im Vergleich. Die Benennung erfolgt immer durch den Zelltyp am Boden der Vertiefung.

In einem parallelen Ansatz wurde die Apoptose-Induktion überprüft. Hierzu wurden HPDFs bzw. HABOs bei 30 °C bzw. 37 °C für bis zu 4 Stunden inkubiert. Eine Apoptose-Positivkontrolle wurde durch Stimulation mit 4 mM Dithiothreitol erzeugt. Die Apoptose-Induktion wurde mit einem mikroskopischen Multiparameter-Assay-Kits getestet, das verschiedene Apoptose-Stadien gleichzeitig darzustellen vermag.

Die Genexpression von *TNFA*, *PTGS2* und *IL6* wurde mittels quantitativer Real-Time-PCR (RT-qPCR) nach Standardmethoden bestimmt. Nach Beendigung der einzelnen Zentrifugationen wurden die Zellen auf den Böden der einzelnen Wells (Experiment und Kontrolle) lysiert, aus den Zelllysaten Gesamt-RNA isoliert und definierte Mengen in cDNA umgeschrieben. Die Quantifizierung der Genexpression erfolgte nach der  $2^{-\Delta\Delta C_T}$ -Methode [164] (Referenzgen: Beta-2-Mikroglobulin, *B2M*). Die Primer-Effizienz wurde mittels Standardkurven und serieller Verdünnung der cDNA ermittelt. Alle cDNA-Proben wurden zweimal gemessen. Daraus ergibt sich für jede Gen-Zelltyp-Kultur-Kombination 12 PCR-Reaktionen. In den Zellkulturüberständen wurden mittels ELISA die Konzentrationen von IL6, TNFA und PGE<sub>2</sub> bestimmt. Alle Messungen wurden im Triplikat durchgeführt.



Die statistische Auswertung erfolgte mittels Mann-Whitney-U-Test (Kraftapplikation vs. Kontrolle; Mono- vs. Co-Kultur). Die Bonferroni-Korrektur für multiples Testen (3 Gen-Loci) wurde angewandt; somit ergab sich ein korrigiertes Signifikanzniveau von  $p_{\text{corr}} = 0,017$ .

*Ergebnisse:* Die Ergebnisse dieser Studie lassen sich wie folgt zusammenfassen:

1. Apoptose: Eine Apoptose-Induktion war in beiden Zelltypen nach 4-Stündiger Inkubation bei 30 °C nicht nachweisbar.
2. Expression in Mono-Kultur: Die Genexpression von *TNFA*, *PTGS2* und *IL6* war im Vergleich zur jeweiligen Negativkontrolle unabhängig von der Dauer der Zentrifugation in beiden Zelltypen hochreguliert. Im Zellkulturüberstand war die PGE<sub>2</sub>-Konzentration nach 1- bzw. 2-stündiger Zentrifugation in beiden Zelltypen erhöht. Die IL6-Konzentration dagegen war nur in HPDFs nach 2 und 4 Stunden Zentrifugation erhöht.
3. Expression in Co-Kultur und Vergleich zur Mono-Kultur: Unabhängig von der Zentrifugationsdauer waren in HPDFs sowohl die Genexpression von *TNFA*, *PTGS2* und *IL6* als auch die IL6- und PGE<sub>2</sub>-Konzentrationen in den Zellkulturüberständen im Vergleich zur Mono-Kultur deutlich erniedrigt. Im direkten Vergleich zwischen Co- und Mono-Kultur zeigte sich in der HABO-Co-Kultur eine erniedrigte Genexpression von *TNFA*, *PTGS2* und *IL6*. Im Vergleich zur Mono-Kultur waren in der HABO-Zellkultur die PGE<sub>2</sub>-Konzentrationen im Zellkulturüberstand nach 1 und 4 Stunden Zentrifugation und die IL6-Konzentration nach 1 h Zentrifugation erniedrigt.

*Zusammenfassung:* Um mögliche Temperatur-Einflüsse auf den Metabolismus der verwendeten Zellen zu reduzieren, wurde das Zentrifugationsmodell bei 30 °C etabliert. Nach 4-stündiger Inkubation bei dieser Temperatur konnte im Vergleich zur Kultivierung bei 37 °C eine Apoptose-Induktion nicht nachgewiesen werden. Dennoch kann bei länger andauernder Inkubation bei 30 °C eine Induktion von zellulärer Apoptose bzw. Nekrose nicht ausgeschlossen werden.

In der Co-Kultur aus HPDFs und HABOs zeigte die mechanisch-induzierte Hochregulation der Genexpression beachtliche Änderungen im Vergleich zur Mono-Kultur. Aufgrund des experimentellen Setups wanderten ins Medium sezernierte Moleküle entlang des Kraftvektors von den Zellen im Zellkultur-Einsatz zu den Zellen am Boden der Vertiefung und modifizieren dort die Genexpression. Dies deutet auf einen parakrinen Signalweg zwischen HPDFs und HABOs hin, der zu einer Herunterregulation der *TNFA*-, *PTGS2*- und *IL6*-Genexpression während der Kraftapplikation führte.

2.2.1.3 [Referenz #235]: *Shi, Folwaczny, Wichelhaus, Baumert (2019). Differences in RUNX2 and P2RX7 gene expression between mono- and coculture of human periodontal ligament cells and human osteoblasts under compressive force application. Orthod Craniofac Res 22(3):168-176.*

*Einleitung:* Auf die zentrale Rolle des RUNX2-Transkriptionsfaktors bei der Knochenentwicklung und dem Knochenumbau wurde bereits verwiesen [17, 54]. Es wurde ebenfalls gezeigt, dass die *RUNX2*-Genexpression durch mechanische Kräfte sowohl in Osteoblasten als auch in PDL-Fibroblasten stimuliert wird [20, 306]. Daher liegt die Vermutung nahe, dass beide Zelltypen am Knochenumbau teilnehmen [305]. In diesem Zusammenhang rückte in letzter Zeit der ATP-abhängige Ionenkanal P2RX7 in den Fokus [4, 267]. Zellen sezernieren unter Stress ATP [82]. Dieses bindet extrazellulär an den P2RX7-Ionenkanal, öffnet ihn und zweiwertige Kationen (insbesondere Ca<sup>2+</sup>)

strömen in die Zelle hinein. Dies führt zur Freisetzung zentraler, proinflammatorischer Mediatoren, die regulierend auf die Knochenhomöostase wirken [4].

Ziel dieser Studie [235] war es, die Genexpression von *RUNX2* und *P2RX7* nach simuliertem Druckstress unterschiedlicher Dauer in HPDFs und HABOs zu bestimmen. Um den Einfluss einer interzellulären Kommunikation zwischen beiden Zelltypen auf die Genexpression beider Gene zu evaluieren, sollte dies sowohl in Mono- als auch mit indirekter Co-Kultur [234] durchgeführt werden.

*Material und Methode:* Der experimentelle Aufbau folgte im Wesentlichen dem vorherigen [234]. Kurz zusammengefasst, wurden HPDFs und HABOs aus Zähnen bzw. Knochen isoliert und nach Standardmethoden kultiviert.

HPDFs und HABOs wurden entsprechend publizierten Protokollen in Mono- bzw. Co-Kultur in 12-Well-Platten ausgesät [20, 213, 234]. Der Druckstress („*pulse*“) wurde durch Zentrifugation für 1, 2 und 4 Stunden bei  $200\times g$  ( $\sim 47,4 \text{ g/cm}^2$ ) und  $30 \text{ }^\circ\text{C}$  appliziert. Negativkontrollen wurden identisch – aber ohne Zentrifugation – behandelt. Für jede Kombination aus Zelltyp, Kulturtyp und Post-Zentrifugationszeit wurden drei Replikate vermessen. Die jeweiligen Wells wurden 2, 4, 8 und 16 Minuten Post-Zentrifugation („*chase*“) lysiert und aus den Lysaten Gesamt-RNA präpariert. Die korrespondierenden Negativkontrollen wurden parallel prozessiert.

Eine mögliche Induktion der zellulären Apoptose wurde in einem parallel-durchgeführten Ansatz geprüft [234].

RT-qPCR wurde nach Standardmethoden durchgeführt. Die Auswertung erfolgte nach der  $2^{-\Delta\Delta C_T}$ -Methode [164] (Referenzgen: Beta-2-Mikroglobulin, *B2M*). Alle cDNA-Proben wurden zweimal vermessen, d. h. für jede Kombination aus Zelltyp, Kulturtyp und Post-Zentrifugationszeit wurden sechs PCR-Amplifikationen ausgewertet.

*A-Priori* wurde eine Power-Analyse durchgeführt, um die Mindest-Probengröße zu bestimmen:  $n = 5$  mit einer Power  $\geq 0,8$ . Der Mann-Whitney-U-Test wurde angewandt, um Gruppenunterschiede festzustellen (Zentrifugation vs. Kontrolle; Mono- vs. Co-Kultur). Der Einfluss der Dauer einer Krafeinwirkung (1, 2 und 4 Stunden) wurde mit dem Kruskal-Wallis-Test bewertet. Die Bonferroni-Korrektur für multiple Vergleiche wurde angewandt.

*Ergebnisse:* Die Ergebnisse dieser Studie lassen sich wie folgt zusammenfassen:

1. Apoptose: Unabhängig von der Temperatur war eine Apoptose-Induktion nicht nachweisbar.
2. Mono-Kultur: In HPDFs war die *RUNX2*-Genexpression unabhängig von der Dauer der Krafeinwirkung direkt nach der Zentrifugation erhöht. In HABOs war sie dagegen nur nach 1- bzw. 2-stündiger Zentrifugation erhöht. Während in HPDFs die *P2RX7*-Genexpression nur zu drei Zeitpunkten Post-Zentrifugation signifikant erhöht war (1 h / 2 min, 2 h / 2 min und 4 h / 4 min), war in HABOs eine Hochregulation der *P2RX7*-Expression zu mehreren Postzentrifugationszeitpunkten nach 1- bzw. 2-stündiger Zentrifugation zu beobachten. Nach 4-stündiger Zentrifugation war eine deutliche Herunterregulation zu beobachten.
3. Co-Kultur: Die *RUNX2*-Genexpression war unabhängig von der Zentrifugationsdauer sowohl in HPDFs als auch in HABOs herunterreguliert. Während die *P2RX7*-Genexpression in HPDFs unabhängig von der Zentrifugationsdauer herunterreguliert war, war sie in HABOs nach einer einstündigen Zentrifugation signifikant hochreguliert. Längere Zentrifugationen hatten keinen signifikanten Einfluss auf die *P2RX7*-Genexpression.

*Zusammenfassung:* Eine Apoptose-Induktion konnte nach einer 4-stündigen Inkubation bei niedrigerer Temperatur ( $30 \text{ }^\circ\text{C}$ ) nicht festgestellt werden.

In dieser Studie wurde – wie in einer früheren auch [20] – ein „Pulse-Chase“-Regime eingesetzt: die Zellen wurden eine definierte Zeit lang zentrifugiert („pulse“). Nach Abschluss der Zentrifugation wurde die Expression von *RUNX2* und *P2RX7* über einen längeren Zeitraum zu bestimmten Zeitpunkten („chase“; Post-Zentrifugation) verfolgt. Somit wäre es möglich, die Stärke bzw. Dauer eines regulativen Effektes (hier: Zentrifugation) auf das Antwortverhalten verschiedener Gene („sehr früh“, „früh“, „späte“) zu untersuchen [8].

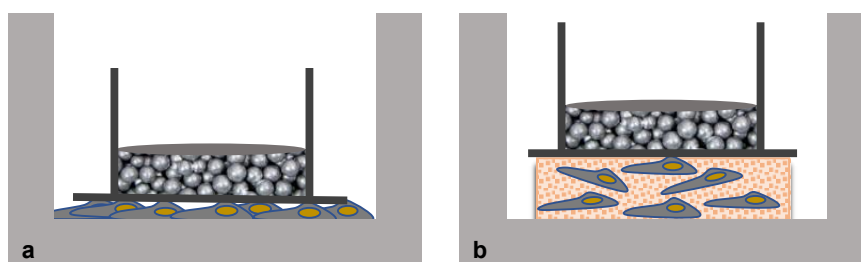
In Mono-Kultur war die *RUNX2*-Genexpression in HPDFs direkt mit der Dauer der Krafteinwirkung verknüpft – in HABOs dagegen nur transient. Die *P2RX7*-Genexpression wurde in beiden Zelltypen durch Krafteinwirkung stimuliert. In Co-Kultur waren sowohl *RUNX2*- als auch *P2RX7*-Genexpression in beiden Zelltypen generell herunterreguliert.

Somit kann auf eine Kommunikation zwischen HPDFs und HABOs in Co-Kultur geschlossen werden, wenn diese zusammen zentrifugiert werden. Diese interzelluläre Kommunikation scheint parakrin zu sein und die Genexpression von *RUNX2* und *P2RX7* zu inhibieren.

### 2.2.2 Das „Weight Approach Based“-Modell (WAB-Modell)

Während mit dem Zentrifugationsmodell in der Regel für einen kürzeren Zeitraum (bis 6 h) höhere Druckkräfte (20 – 70 g/cm<sup>2</sup>) *in vitro* appliziert werden, wird das „Weight Approach Based“-Modell (WAB-Modell) zur Applikation niedrigerer Druckkräfte (ca. 0,5 – 5 g/cm<sup>2</sup>) über einen längeren Zeitraum (bis 4 Tage) eingesetzt [289] (Abb. 2.6). Ursprünglich von Kanai et al. [114] im Jahr 1992 zur Simulation kieferorthopädischer Kräfte entwickelt, wird es seitdem in den verschiedensten Disziplinen angewendet [50, 289].

Nach dem Auflegen eines Gewichtes auf eine Zellschicht wirkt eine unidirektional-wirkende Gewichtskraft auf diese und komprimiert sie (Abb. 2.6). Als Gewichte dienen meistens ein steriler Glaszylinder [114] oder ein Stapel steriler, runder Deckgläser [125]. Das Gewicht und damit die auf die Zellen wirkende Gewichtskraft wird durch die Höhe des Deckglasstapel bzw. den Zylinder und die darin befindliche Menge z. B. an Stahlschrot bestimmt.



**Abb. 2.6.** Schematische Darstellung des statischen (a) 2D- und (b) 3D-*In Vitro*-Belastungsmodells nach dem „Weight Approach“. (Modifiziert nach einer Abbildung aus Janjic et al. [106], CC BY 4.0)

2.2.2.1 [Referenz #106]: Janjic, Docheva, Trickovic Janjic, Wichelhaus, **Baumert** (2018). *In vitro weight-loaded cell models for understanding mechanodependent molecular pathways involved in orthodontic tooth movement: a systematic review. Stem Cells Int. 2018: 3208285.*

*Einleitung:* Primäres Ziel dieser Studie [106] war es, einen Überblick über die mit dem WAB-Modell auf dem Gebiet der Kieferorthopädie gewonnenen Ergebnisse zu erhalten und eventuelle Lücken zu identifizieren. Augenmerk wurde dabei ebenfalls auf Details zur Zellkultur, Dauer und Größe der einwirkenden Kraft und Informationen über molekulare Ereignisse in Zusammenhang mit der KZB gelegt; 2D- und 3D-Studien wurden separat erfasst.

*Material und Methode:* Dieser systematische Übersichtsartikel wurden analog zum PRISMA-2015-Statement [184] erstellt. Nach Definition der Einschlusskriterien wurden separate Such-Strategien für die 2D- und 3D-WAB-Anwendung formuliert und die Recherchen in PubMed durchgeführt [106, Anhang 1]. Relevante Studien wurden im Volltext gesichtet und zusätzliche Studien durch Handsuche und Durchsicht der Referenzlisten der inkludierten Studien identifiziert.

Aus jeder Volltext-Studie wurden neben den bibliographischen Daten Informationen zum verwendeten Zelltyp, den Zellkulturbedingungen, Kraftdauer und Kraftgröße, den untersuchten Genen oder Substanzen, zur Genexpression oder Substanz-Sekretion, soweit sie auf eine direkte mechanische Stimulation zurückführen ließen. Unklarheiten bzgl. der Gene oder Metaboliten wurde durch elektronische PCR oder Klärung der Antikörper- bzw. Inhibitor-Spezifität eruiert. Die erhobenen Daten wurden in mehreren Tabellen zusammengefasst.

Die untersuchten Gene und Metaboliten wurden separat für HPDFs und HABOs im 2D-WAB-Modell zusammengestellt und Protein-Protein-Interaktions-Netzwerke mittels STRING-Analyse [245] erstellt. Durch Abgleich mit der KEGG-Datenbank [52] wurden Hauptsignalwege identifiziert.

*Ergebnisse:* Insgesamt 2.284 Abstracts wurden mit der Suchstrategie „2D“ in PubMed identifiziert; hinzukamen sieben zusätzliche Artikel. Im Volltext wurden 107 Artikel evaluiert, von diesen entsprachen 56 den definierten Einschlusskriterien. Mit der Suchstrategie „3D“ wurden 1.038 Abstracts in PubMed identifiziert. Weitere vier kamen durch Handsuche hinzu. Im Volltext wurden 50 Artikel evaluiert; 15 davon entsprachen den Einschlusskriterien und wurden detailliert analysiert. Alle eingeschlossenen Studien wurden tabellarisch zusammengefasst [106, Anhänge 2-4]. Die wichtigsten Ergebnisse beider Suchstrategien fasst **Tabelle 2.1** zusammen.

*Zusammenfassung:* Das WAB-Modell ist eine einfache und effektive Methode zur Untersuchung der molekularen Grundlagen der KZB. Die systematisch durchgeführte Literaturübersicht zeigte die aktuell vorhandenen Ergebnisse auf und wies auf einige Schwachstellen in diesem Modell hin.

Ein Großteil der 2D- bzw. 3D-Studien wurden mit HPDFs durchgeführt, die mittels Explantat-Methode oder enzymatischer Verdauung isoliert wurden. Letztere resultiert in einer mit mesenchymalen Stammzellen angereicherten HPDF-Population [231].

Mit dem 2D-WAB-Modell wurden hauptsächlich Druckkräfte von 2 g/cm<sup>2</sup> (Bereich: 0,25 – 5,0 g/cm<sup>2</sup>) für bis zu 24 h (max. 72 h) appliziert, während im 3D-WAB-Modell mit Kollagen-Gerüst höhere Kräfte (6 g/cm<sup>2</sup>) im gleichen Zeitraum angewendet wurden. Die mit dem 2D-WAB-Modell applizierten Druckkräfte lagen deutlich unterhalb der von Schwarz [230] genannten Grenze einer optimalen kieferorthopädischen Kraft von ~25 g/cm<sup>2</sup> (dies entspricht dem Kapillar-Blutdruck). Die Wahl der Kraftgröße im 3D-WAB-Modell hing von der Steifigkeit des verwendeten Stütz-

materials ab: 6 g/cm<sup>2</sup> für Stützmaterial aus Kollagen und 25 g/cm<sup>2</sup> für PLGA- bzw. PLLA-Stützmaterialien.

In den ersten 10 Tagen der KZB finden wichtige initiale Prozesse statt [215]. Daher ist die Dauer der Kraftapplikation in den hier untersuchten Studien zu kurz, um die molekularen Mechanismen der KZB zu untersuchen. Vor allem bei länger andauernden Studien sollte mehr Augenmerk auf Zellproliferation und Lebensfähigkeit der Zellen gelegt werden, da dies zu einem Bias führen könnte.

Während die Anwendungen der etablierten 2D-WAB-Methode in sich stimmige Ergebnisse zeigten, waren die Ergebnisse der 3D-WAB-Methode inkonsistent. Hier ist eine weitere Standardisierung notwendig, um vergleichbare Ergebnisse zu erhalten.

**Tabelle 2.1.** Die wichtigsten Ergebnisse der „2D“- und „3D“-Suchstrategien im systematischen Übersichtsartikel [106].

	2D-WAB-Modell (n = 56)	3D-WAB-Modell (n = 15)
Zellen:	HPDFs (38/56); zusätzlich: HABOs, Zellen des Knochenmarks, humane und tierische Zelllinien	HPDFs (13/15); zusätzlich: murine Zellen
HPDF-Isolationsmethode:	Explant-Methode (18/56), enzymatischer Verdau (9/56), sonstige	Explant-Methode (4/15), enzymatischer Verdau (6/15), sonstige
Gerüstsubstanz:	<i>Nicht anwendbar.</i>	Kollagen, PLGA, PLLA
Druckkräfte:	0,25 – 5 g/cm <sup>2</sup> (2 g/cm <sup>2</sup> )	Kollagen: 0,5 – 9,5 g/cm <sup>2</sup> (6 g/cm <sup>2</sup> ) PLGA, PLLA: 5 – 35 g/cm <sup>2</sup> (25 g/cm <sup>2</sup> )
Druckdauer:	0,5 – 72h (24h)	Kollagen: 0,5 – 72h (12h, 24h) PLGA: 3 – 72h PLLA: 1 – 14d
Die 5 häufigsten Gene bzw. Metaboliten in HPDF-Studien:	<i>TNFSF11</i> („RANKL“), <i>TNFRSF11B</i> („OPG“), <i>PTGS2</i> („COX2“), PGE <sub>2</sub>	
Gen-Listen für PPI-Analyse:	HPDF: 48 verschiedene Gene HABO: 51 verschiedene Gene	<i>Nicht angewendet (siehe Text)</i>

PLGA: *Poly(lactic-co-glycolic acid)*; PLLA: *Poly-L-lactide acid*

2.2.2.2 [Referenz #107]: *Janjic Rankovic, Docheva, Wichelhaus, Baumert (2020). Effect of static compressive force on in vitro cultured PDL fibroblasts: monitoring of viability and gene expression over 6 days. Clin Oral Invest 24(7):2497-2511.*

*Einleitung:* Im oben vorgestellten systematischen Übersichtsartikel zum WAB-Modell wurden in den relevanten Studien Defizite (u. a. Dauer der Kraftapplikation und fehlende Verifizierung der Zellvitalität) identifiziert [106]. Unter Berücksichtigung dieser Defizite war es Ziel dieser Studie [107], HPDFs über sechs Tage mit einer Druckkraft von 2 g/cm<sup>2</sup> zu belasten. Während dieser sechs Tage sollten täglich die Expression mechanosensitiver (*cFOS*, *HB-GAM*), inflammatorischer (*PTGS2*, *IL6*, *TNFA*) und an der Knochenremodellierung beteiligter Gene (*RUNX2*, *P2RX7*) bzw. Metaboliten (PGE<sub>2</sub>) bestimmt und Zellviabilität und -proliferation während der Kraftapplikation gemessen werden.

*Material und Methode:* Die Isolation und Kultivierung der HPDFs erfolgte wie beschrieben [107, 234, 235]. Zellen der fünften Passage wurden für alle Experimente genutzt.

Ein Druck von 2 g/cm<sup>2</sup> wurde mit dem WAB-Setup auf HPDFs in 6-Well-Platten über einen Zeitraum von 6 Tagen ausgeübt. Identisch vorbereitete HPDFs ohne Druckapplikation dienten als Negativkontrollen. Das Medium wurde alle drei Tage gewechselt. Täglich wurden je fünf Wells des WAB-Setups und der korrespondierenden Negativkontrolle für die Beprobung genutzt: je drei für RT-qPCR und ELISA und je zwei für Zellviabilität und Zellproliferation.

Zur Bestimmung der Zellproliferation wurde mittels Resazurin-Reduktion eine Standardkurve (Zellzahl versus Resazurin-Reduktion) erstellt. Während des Experiments wurde die Resazurin-Reduktion in den benannten Wells ermittelt und die Zellzahl im jeweiligen Well durch Vergleich mit der Standardkurve berechnet. Die Zellviabilität wurde mit einem kommerziellen Kit bestimmt (spezifische Fluoreszenzmarkierung lebender und toter Zellen).

RT-qPCR erfolgte nach beschriebenen Standards und den MIQE-Leitlinien [29]. Nach Abbau des WAB-Setups wurde die Zellkulturüberstände der WAB-Proben und der Negativkontrollen für die ELISA-Bestimmungen gesammelt. Anschließend wurden die Zellen lysiert und aus den Zelllysaten Gesamt-RNA isoliert. Definierte Mengen cDNA jeder Probe wurden für die RT-qPCR eingesetzt. Die Auswertung erfolgte nach der 2<sup>- $\Delta\Delta C_T$</sup> -Methode [164] (Referenzgene: *PGK1* und *RPL13A*). Alle cDNA-Proben wurden zweimal vermessen, d. h. für jede Kombination aus Gen, Kulturtyp und Beobachtungs-Tag wurden sechs PCR-Amplifikationen ausgewertet.

Die Bestimmung der TNFA- und PGE<sub>2</sub>-Konzentrationen im Zellkulturüberstand erfolgte mit kommerziellen ELISA-Kits. Die PGE<sub>2</sub>-Konzentration wurde auf die Zellzahl normalisiert.

Der Mann-Whitney-U-Test wurde angewandt, um Gruppenunterschiede festzustellen (WAB vs. Kontrolle). Der Einfluss der Dauer der Krafterwirkung (1 – 6 Tage) wurde mit dem Kruskal-Wallis-Test (Bonferroni-Korrektur für multiple Vergleiche) bewertet.

*Ergebnisse:* Während der gesamten Versuchsdauer war Zellwachstum in beiden Gruppen (WAB und Kontrolle) zu beobachten. Die Zellen der Kontrollgruppe wuchsen schneller und erreichten am 6. Tag eine Plateau-ähnliche Phase. Diese Beobachtung wurde durch die mikroskopische Auswertung der Zellviabilität-Markierungen gestützt.

Die *cFOS*-Genexpression war während der gesamten Dauer der Kraftapplikation signifikant stimuliert. Dagegen zeigte die Expression des zweiten mechanosensitiven Gens, *HB-GAM*, keinerlei Änderungen im Vergleich zur Negativkontrolle. Unabhängig von der Dauer der Kraftapplikation war die Expression der inflammatorischen Gene *IL6*, *TNFA* und *COX2* signifikant hochreguliert. Während die PGE<sub>2</sub>-Konzentration im Zellkulturüberstand über die gesamte Dauer der Kraftapplikation kontinuierlich anstieg, erreichte die *COX2*-Expression am 3. und 4. Tag ihr Maximum. TNFA war im Zellkulturüberstand nicht nachweisbar. Unabhängig von der Kraftdauer war *P2RX7* herunterreguliert; die *RUNX2*-Expression dagegen zeigte eine Kraftdauer-abhängige Regulation.

*Zusammenfassung:* Diese Ergebnisse zeigen, dass selbst nach 6 Tagen Kraftapplikation *in vitro* noch Änderungen in der Genaktivität der untersuchten Gene zu beobachten sind. Daher besteht der Bedarf an länger-andauernden *in vitro*-Studien, die weitere an der KZB-beteiligte Gene und Metaboliten einschließen.

## 2.3 Stress während bzw. durch kieferorthopädische Behandlung

Neben der Applikation von mechanischem Stress ist die kieferorthopädische Behandlung auch mit mentalem Stress verbunden. Patienten in kieferorthopädischer Behandlung berichten über schmerzhaft Erfahrungen während unterschiedlicher Behandlungsstadien und bei unterschiedlichen Arten der Behandlung. In einer retrospektiven Studie berichteten von 203 mit festsitzenden Apparaturen behandelten erwachsenen Patienten 91 % über Schmerzen als Folge der Apparatur und 39 % über Schmerzen und Unannehmlichkeiten unabhängig vom Behandlungsstadium, wie z. B. beim Einsetzen eines neuen Drahtbogens in ein Bracket [152]. In einer prospektiven Studie mit Kindern und Erwachsenen klagten 95 % der befragten Patienten über Schmerz aufgrund der kieferorthopädischen Behandlung [144, 226]. Als Hauptursache für Schmerz werden die kieferorthopädischen Kräfte angesehen, die eine Zahnbewegung bewirken: z. B. elastische Separatoren, vollständiges Bekleben mit dem ersten Bogen und „*Rapid Palatinal Expansion*“ [58, 129, 160].

Eine objektive Bestimmung des Stresses/Schmerzes ist durch die Bestimmung des Cortisol-Spiegels im Blut oder im Speichel betroffener Patienten möglich. Wie alle Glucocorticoide wird Cortisol in der Nebennierenrinde gebildet. Es ist Bestandteil des menschlichen Stressreaktionssystems und wird durch Aktivierung der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse (HPA) ausgeschüttet. Cortisol aktiviert katabole Stoffwechselforgänge (z. B. Glykogen-Synthese in der Leber, Proteinabbau im Muskel, Lipolyse in den Fettzellen) und stellt so u. a. den Blutzuckerspiegel sicher. Des Weiteren wirkt Cortisol entzündungshemmend (inhibiert die Arachidonsäure- und damit die PGE<sub>2</sub>-Synthese [211]), immunsuppressiv und kann darüber hinaus Apoptose induzieren [191]. Störungen im Cortisol-Stoffwechsel führen zum Cushing-Syndrom, während die therapeutische Gabe von hohen Dosen Cortisol im Knochen Osteoporose und Osteonekrose induzieren kann.

Die Bestimmung der Speichel-Cortisol-Konzentration ist eine einfache und nicht-invasive Alternative zur Cortisol-Bestimmung aus Blutproben. Aufgrund seiner chemischen Eigenschaften gelangt das Molekül durch passive, intrazelluläre Diffusion in den Speichel. Daher hat die Speichelflussrate auch keinen Einfluss auf die Cortisol-Konzentration im Speichel [126, 268] und diese korreliert bei Kindern und Erwachsenen sehr stark mit der im Blut [72]. Der Speichel-Cortisol-Spiegel reflektiert die biologisch aktive, d. h. ungebundene Cortisol-Konzentration [268].

Die Cortisol-Sekretion im Speichel unterliegt einem diurnalen Rhythmus. In gesunden Erwachsenen sinkt die Speichel-Konzentrationen zwischen 8:00 morgens und 20:00 abends um den 8- bis 10-fachen Wert [205, 225, 227, 274]. Physischer und mentaler Stress induzieren die Cortisol-Ausschüttung und erhöhen damit die Cortisol-Konzentration im Speichel [79, 126, 205, 227]. Daher kann über die Messung des Speichel-Cortisol die Reaktion auf belastende Stimuli oder die Effektivität von Behandlungen zur Stressreduktion bestimmt werden [11, 24, 80, 84].

### 2.3.1 [Referenz #259]: Tzortzi, Proff, Redlich, Aframian, Palmon, Golan, Wichelhaus, Muessig, **Baumert** (2009). Cortisol daily rhythm in saliva of healthy school children. *Int Dent J* 59:12-18

*Einleitung:* Detaillierte Informationen über das Cortisol-Tagesprofil Erwachsener liegen vor [274]. Dagegen existieren für Jugendliche im Alter von 10 – 14 Jahren nur Referenzwerte, die zu drei verschiedenen Zeitpunkten des Tages ermittelt wurden [76, 123]. Ziel dieser Studie [259] war es daher, das Cortisol-Tagesprofil im Speichel von Schulkindern der Altersgruppe zwischen 10 und 14 Jahren zu bestimmen.

*Material und Methode:* Das Studienprotokoll dieser Studie wurde von der Ethikkommission des Klinikums der Universität Regensburg begutachtet und freigegeben. Von allen teilnehmenden Schulkindern und ihre Eltern wurde das informierte Einverständnis eingeholt.

Entsprechend den Ausschlusskriterien wurden Schulkinder beider Geschlechter im Alter zwischen 10 und 14 Jahren an lokalen Schulen bzw. durch direkte Ansprache von Kollegen rekrutiert. Von den über 100 angesprochenen Testpersonen konnten schlussendlich die Proben von 21 Teilnehmern analysiert werden.

Über den Tag verteilt mit Beginn direkt nach dem Aufwachen am Morgen bis unmittelbar vor der Nachtruhe wurden von jedem Studienteilnehmer in definierten Intervallen insgesamt 20 Speichelproben gesammelt. Um externe Stressoren [76] möglichst auszuschließen, wurden die Probenentnahme an Wochenenden, Feiertagen oder Urlauben durchgeführt. Die Speichel-Cortisol-Bestimmung erfolgte mit einem kommerziellen Cortisol-Lumineszenz-Immunoassay nach Herstellerangaben. Alle Proben wurden in Doppelbestimmung quantifiziert und die Proben eines Teilnehmers gemeinsam analysiert.

Die statistische Analyse erfolgte mittels allgemeinen linearen Modell (GLM) für wiederholte Messungen, um eine mögliche Interaktion zwischen Geschlecht und zeitlichem Verlauf festzustellen. Der Mann-Whitney-U-Test wurde als Posthoc-Test für die GLM-Analyse und zum Testen des Einflusses der Aufwachzeiten und geschlechtsspezifische Unterschiede zwischen diesen verwendet.

*Ergebnisse:* Die Cortisol-Konzentration im Speichel folgte einem deutlichen täglichen Rhythmus. Innerhalb von 20 min nach dem Aufwachen erreichte die Speichelkonzentration den höchsten Level ( $9,69 \pm 3,89$  nmol/L), fiel dann in den nächsten 90 min um 50 % ab, und stagnierte in den darauffolgenden 3 – 8 h bei  $4,14 (\pm 1,93)$  nmol/L. Eine Geschlechtsspezifität des Cortisol-Spiegels konnte – bis auf drei Zeitpunkte (3, 10 und 11 Stunden nach dem Aufwachen) – nicht festgestellt werden.

*Zusammenfassung:* Das Profil der Cortisol-Konzentration im Speichel 10 bis 14-jähriger Schulkinder konnte etabliert werden. Im Verlauf der Studie wurden Hinweise zur Probensammlung und dem Probandenverhalten gesammelt, die für zukünftige Studien eine wichtige Grundlage sein werden.



## 3 Diskussion, Zusammenfassung und Ausblick

### 3.1 *RUNX2*-Mutationen und Dysostosis cleidocranialis

Aufgrund der zentralen Bedeutung des *RUNX2*-Gens für die Knochenbildung und die Knochenremodellierung ist es seit seiner Identifikation 1997 [187, 188] Gegenstand intensiver Forschung [12, 108, 217, 283]. Von klinischem Interesse überwiegen zum einen die Abklärung des Phänotyp-Spektrums der Dysostosis cleidocranialis (CCD) und zum anderen die Genotypisierung der betroffenen Patienten. Eine mögliche Genotyp-Phänotyp-Korrelation könnte Hinweise für die klinische Behandlung des Phänotyps und gleichzeitig Informationen zur genetischen Beratung derselben liefern.

Zum Zeitpunkt der Veröffentlichung der hier vorgestellten Studien [17-19] und einer Aufklärungsrate von 30 – 40 % war nicht zu erwarten, dass weitere „spannende“ neue Mutationen gefunden werden könnten. Seitdem hat sich aber diesbezüglich durch die Anwendung neuer Mutations-Screening-Methoden und die Entdeckung weiterer Genregulationsmechanismen der Knochenentwicklung und Knochenremodellierung im Allgemeinen und *RUNX2* im speziellen eine rasante Entwicklung ergeben. Diese soll im Folgenden zusammen mit den hier zusammengefassten Publikationen [17-19] diskutiert werden.

#### 3.1.1 Genotyp-Phänotyp-Korrelation bei Dysostosis cleidocranialis

Im Laufe der letzten 20 Jahre haben mehrere Arbeitsgruppen Genotyp-Phänotyp-Korrelation (GPK) bei CCD etablieren können (Übersicht in **Tabelle 3.1**):

- (1) die Lokalisation des Genotyps korreliert mit der „Schwere“ der Mutation [303], d. h. mit den Folgen der Mutation für das Genprodukt;
- (2) die Lokalisation von Mutationen in der *Runt*-Domäne (RHD) korreliert mit Kleinwuchs [284, 295, 296];
- (3) Kleinwuchs korreliert mit der Anzahl überzähliger Zähne in CCD-Patienten-Kohorten [295, 296] bzw. männlicher CCD-Patienten allein [300];
- (4) das Auftreten von Mutationen in der RHD korreliert mit der Anzahl retinierter permanenter und überzähliger Zähne [28];
- (5) das Auftreten von Mutationen in der RHD korreliert mit gravierenden Zahnanomalien, milden HNO-Befunden und normalen Schlüsselbeinen [237];
- (6) das Auftreten von Mutationen in der Q/A-Domäne korreliert mit Zahnanomalien und dem Auftreten von normal-entwickelten Schlüsselbeinen [237];
- (7) Nonsense-Mutationen in der Q/A-Domäne gehen mit einem weniger ausgeprägten Phänotyp einher [17].

In anderen Studien (**Tabelle 3.1**) konnte ein Zusammenhang zwischen Kleinwuchs und Mutationen der RHD bzw. der Anzahl überzähliger Zähne nicht hergestellt werden [17, 81, 169, 242, 251, 253, 302]. Ma et al. [169] führten eine „Mini“-Metaanalyse publizierter CCD-Fälle durch und zeigten, dass sehr wohl Missense-Mutationen in der RHD mit überzähligen Zähnen, Hypoplasie der Maxilla oder mandibulärer Protrusion einhergehen. Dies steht in klarem Widerspruch zu Bufalino et al. [28]. Darüber hinaus weisen mehrere Studien auf die Altersabhängigkeit des Phänotyps „überzählige Zähne“ hin [17, 242, 293, 302]: die exakte Bestimmung der Anzahl überzähliger Zähne kann nur nach Abschluss aller chirurgischen Maßnahmen im Erwachsenenalter erfolgen [62].

**Tabelle 3.1.** Studien zur Genotyp-Phänotyp-Korrelation (GPK) bei Dysostosis cleidocranialis. Angegeben sind die Anzahl der untersuchten Familien (Anteil an Spontan-Mutationen) und die Anzahl der genotypisierten Familien.

Jahr	Studie	Fallzahl (Spontan)	Genotyp	Bemerkungen
<i>GPK etabliert</i>				
1999	Zhou et al. [303]	26 (?)	17	GPK: Korrelation zwischen Lokalisation des Genotyps und der „Schwere“ der Mutation.
2002	Yoshida et al. [295]	24 (9)	17	Phänotypische Variabilität; GPK: Kleinwuchs korreliert mit Mutationen in der RHD und mit der Anzahl überzähliger Zähne.
2003	Yoshida et al. [296]			
2005	Baumert et al. [17]	20 (7)	14	HOMALS-Analyse zur Beschreibung des Phänotyps; phänotypische inter- und intrafamiliäre Variabilität; GPK: Nonsense-Mutationen in der Q/A-Domäne gehen mit einem weniger ausgeprägten Phänotyp einher.
2008	Xuan et al. [284]	4 (3)	4	GPK: Mutationen in der RHD korrelieren in allen vier Fällen mit Kleinwuchs.
2010	Zhang et al. [300]	6 (3)	5	In zwei familiären Fällen keine überzähligen Zähne; große inter- und intrafamiliäre Variabilität des Phänotyps; GPK: leichte („slight“) Korrelation zwischen der Anzahl überzähliger Zähne und der Körpergröße männlicher CCD-Patienten.
2012	Bufoalino et al. [28]	5 (1)	4	Dentaler Phänotyp: extreme inter- und intrafamiliäre Variabilität; GPK: Patienten mit Mutationen in der Runt-Domäne haben eine höhere Anzahl an retinierten, permanenten und an überzähligen Zähnen.
2015	Singh et al. [237]	1 (1)	1	Atypischer Phänotyp: normalentwickelte Schlüsselbeine; benutzen Score nach Baumert et al. [17] zur Phänotyp-Klassifizierung; GPK: (1) Korrelation zwischen Zahnanomalien und normalen Schlüsselbeine mit Mutationen in der Q/A-Domäne; (2) Korrelation zwischen gravierenderen Zahnanomalien, milden HNO-Befunden und normalen Schlüsselbeinen und Mutationen in der RHD.
<i>GPK nicht etabliert</i>				
2003	Tessa et al. [253]	14 (7)	11	Atypischer Phänotyp: zwei nicht-verwandte Patienten mit Myopathie der Schultermuskeln; phänotypische Variabilität in familiären Fällen; keine Korrelation zwischen Kleinwuchs und Mutationen in der RHD [295].
2007	Suda et al. [241]	1 (1)	1	Breite intrafamiliäre Variabilität bzgl. des dentalen Phänotyps.
2007	Tang et al. [251]	1 (1)	1	Atypischer Phänotyp: hyperplastische Nägel (aufgrund der <i>RUNX2</i> -Mutation?); GPK nicht möglich.
2010	Suda et al. [242]	5 (2)	5	Inkludiert monozygotes Zwillingpaar (unterschiedliche Anzahl an überzähligen Zähnen); Anzahl der überzähligen Zähne steigt mit dem Alter [293].
2013	Wang et al. [270]	1 (1)	1	Monozygote Zwillinge mit identischem Phänotyp in beiden Zwillingkindern; sehr ausführlicher klinischer Befund; Abweichungen bei den Füßen.
2017	Diñçsoy Bir et al. [47]	11 (7)	10	Osteoporose als weiterer CCD-Phänotyp (?); ausführlicher klinischer Befund inkl. Hormonstatus.
2017	Hordyjewska et al. [94]	1 (0)	1	Intrafamiliäre Variabilität.
2017	Zhang et al. [302]	4 (2)	4	Moderate klinische Variabilität; GPK nicht möglich.
2017	Zeng et al. [299]	4 (3)	4	Inter- und intrafamiliäre Variabilität des Phänotyps mit Fokus auf oralen Phänotyp.
2018	Ha et al. [81]	12 (?)	8	Eindeutige GPK konnte nicht etabliert werden.
2018	Ma et al. [169]	1 (0)	1	GPK konnte nicht etabliert werden; „Mini“-Metaanalyse zeigte weitere CCD-Fälle, in denen Missense-Mutationen in der RHD mit überzähligen Zähnen, Hypoplasie der Maxilla oder mandibulärer Protrusion einhergehen; klarer Widerspruch zu Bufoalino et al. [28].
2019	Gao et al. [61]	7 (5)	7	Subzelluläre Lokalisation.
2019	Hordyjewska-Kowalczyk et al. [95]	11 (8)	11	Funktionelle Mutations-Assays; Variante R225W in dbSNP, obwohl pathogen.
2019	Ma et al. [170]	1 (?)	1	CCD mit Epilepsie; ausführlicher klinischer Befund inkl. Blutwerte, etc.

Variable Penetranz des Genotyps und die daraus resultierende intra- und interfamiliäre Variabilität des Phänotyps stellen die größten Hindernisse in der Etablierung einer GPK bei CCD-Patienten dar. Darüber hinaus sind die vorhandenen Studien und Fallberichte aufgrund eines fehlenden standardisierten Protokolls zur Evaluation des klinischen Phänotyps bei CCD schwer miteinander vergleichbar. Singh et al. [237] nutzten das von Baumert et al. [17] angewandte Klassifikationschema und konnten so den von ihnen beschriebenen CCD-Patienten mit normalentwickelten Schulterbeinen mit publizierten Fällen vergleichen.

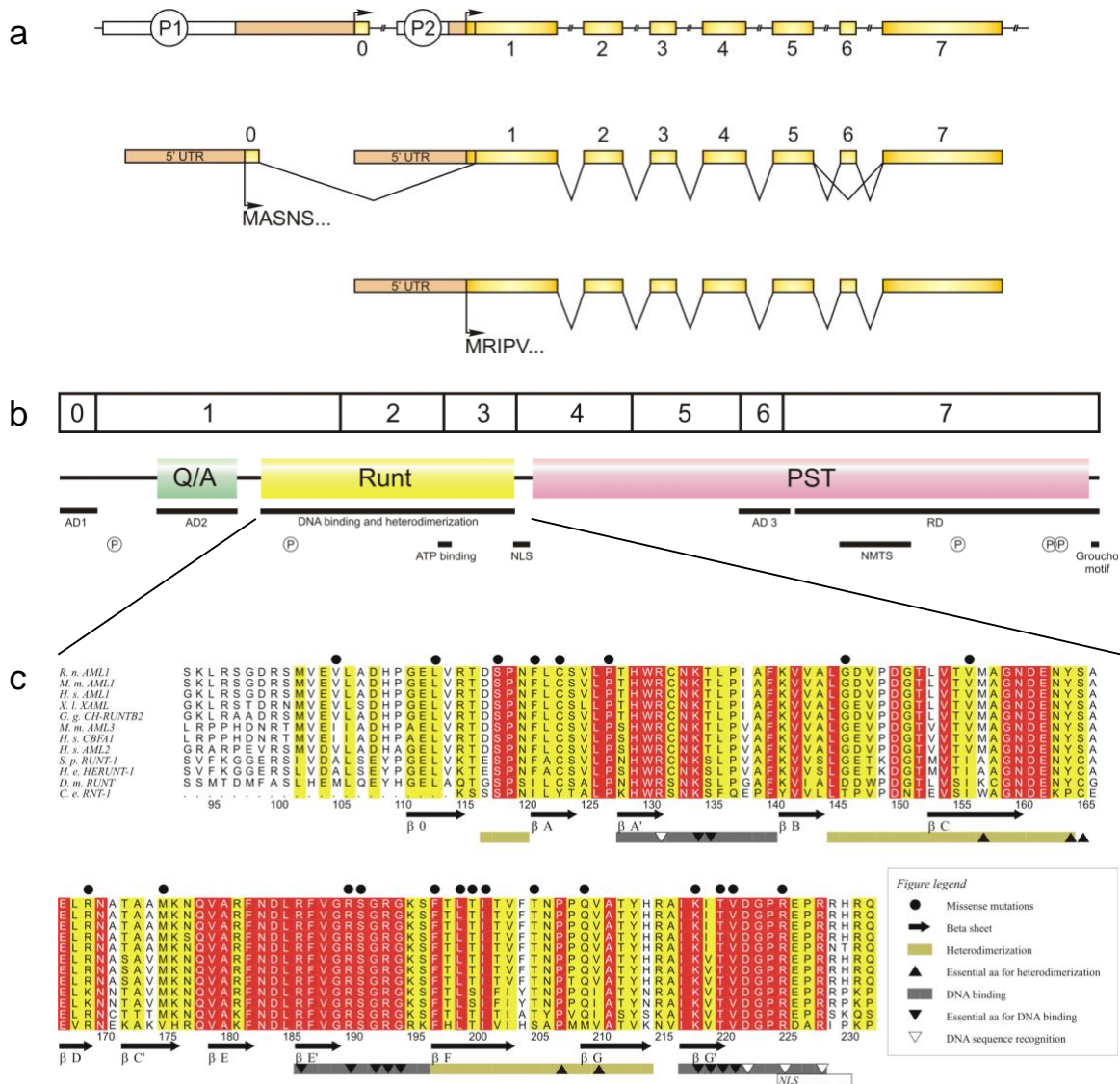
### 3.1.2 RUNX2-Mutationen

RUNX2 wird durch acht Exone kodiert, deren mRNAs sich durch alternatives, gewebsspezifisches Splicen in ihrer Länge geringfügig unterscheiden (**Abb. 3.1a**). Das längere Genprodukt kodiert die 521 Aminosäure lange „MASNS“-Isoform, die hauptsächlich in Knochenzellen exprimiert wird, während die 19-Aminosäure kürzere Isoform in Knochen und anderen Geweben zu finden ist [14]. Alle Isoformen zeigen dieselbe Domänenstruktur aus Q/A-Domäne, *Runt*-Domäne (RHD) und PST-Domäne (**Abb. 3.1b**). Die RHD ist für die DNA-Bindung (und damit die Transaktivierung von Genen) und die Heterodimerisierung mit CBF $\beta$  notwendig [257]. Q/A- und PST-Domäne enthalten Bereiche, die in der Interaktion mit anderen Signalmolekülen eine Rolle spielen und entweder aktivierend (AD1-AD3) oder reprimierend (RD) wirken. Die *RUNX2*-Expression wird auf Transkriptions-Ebene u. a. durch Autoregulation (RUNX2-Bindungsstellen im *RUNX2*-Promotor), andere Transkriptions- oder Wachstumsfaktoren, Glucocorticoide, alternatives Splicen und 1,25-Dihydroxy-Vitamin D<sub>3</sub> reguliert [27, 229]. Translational-regulierend wirken die posttranslationalen Modifikationen des RUNX2-Proteins (u. a. Phosphorylierungen und Azetylierungen), die Translokation vom Cytoplasma zurück in den Zellkern und die Interaktion mit Partner-Molekülen [27, 70].

Die meisten Studien stimmen darin überein, dass die Lokalisation der Mutationen bzw. deren Typ (und damit die betroffene RUNX2-Domäne) mit dem Schweregrad des betreffenden CCD-Patienten korreliert [17, 95, 208]. Nonsense-Mutationen, die zu einem verkürzten Genprodukt führen, treten über das gesamte Gen verstreut auf [17, 28, 172, 194, 253], ebenso Splice- und Leseraster-Mutationen, Insertionen, Deletionen [17, 94] und Duplikationen [194]. Den größten Anteil an CCD-auslösenden Mutationen haben Missense-Mutationen in der RHD [17, 94, 194]. Diese ist evolutiv sehr stark konserviert (**Abb. 3.1c**) und für ihre Aufgaben „DNA-Bindung“ und „Transaktivierung“ optimiert; daher ist ihre Fehlertoleranz gegenüber Missense-Mutationen geringer als in den übrigen Bereichen des *RUNX2*-Gens. Bei einigen beschriebenen CCD-Patienten gehen RHD-Mutationen mit schweren dentalen Anomalien inklusive überzähliger Zähne einher [28, 94, 237, 295].

Neben der RHD ist vor allem die Q/A-Domäne mit ihren Trinukleotid-Wiederholungen der Codone für Glutamin (Q) und Alanin (A) von Interesse: auf 23 aufeinanderfolgende Glutamine folgen 17 aufeinanderfolgende Alanine (Q<sub>23</sub>A<sub>17</sub>) [188]. Durch Strangverschiebung („*slippage replication*“) während der DNA-Replikation können Fehlpaarungen der Trinukleotid-Wiederholungen zu Mutationen führen [294]. Dies kann zu einer Verlängerung oder Verkürzung der Trinukleotid-Wiederholungen führen und damit zum CCD-Phänotyp [237, 253, 299]. Polymorphe Änderungen in der Q/A-Domäne werden mit Unterschieden in der Knochenmineraldichte und Fraktur-Anfälligkeit in Verbindung gebracht [265]. *In vitro* konnte gezeigt werden, dass Ala<sub>6</sub>-Deletionen keinen Einfluss auf die Translokation des Transkriptionsfaktors in den Zellkern haben, aber sehr wohl die Transaktivierung von Osteocalcin in einem Reporter-Assay herabsetzen [299]. Darüber hinaus werden Polymorphismen der Q/A-Ratio mit Variationen in der Gesichtsmorphologie

von Primaten in Verbindung gebracht [216, 262] und zeigen eine positive Korrelation mit Variationen in der relativen Gesichtslänge. Für Nonsense-Mutationen in dieser Domäne wird ein verkürztes RUNX2-Protein ohne RHD und damit RNA- bzw. Protein-Instabilität oder Nonsense-vermittelter-mRNA-Abbau postuliert [17].



**Abb. 3.1.** Struktur des *RUNX2*-Gens aus (a) acht Exons. Alternatives Spleißen der Promotoren „P1“ bzw. „P2“ ergibt die beiden *RUNX2*-Isoformen „MASNS“ und „MRIPV“. (b) Korrelation zwischen Exon-Struktur der „MASNS“-Isoform und der Domänen-Struktur des *RUNX2*-Proteins mit den drei Protein-Domänen Q/A, *Runt* (RHD) und PST; weitere Abkürzungen: AD1 – AD3, Aktivierungsdomänen; RD, Reprimierungsdomäne; NLS, „Nuclear Localisation Signal“; NMTS, „Nuclear Matrix Targeting Signal“; P, Phosphorylierungsstellen. (c) Multiples Sequenz-Alignment der Proteinsequenz der *Runt*-Domäne verschiedener Spezies. Wichtige Sekundärstrukturen und Sequenzmotive sind eingezeichnet (Nach diversen Autoren).

Generell wird davon ausgegangen, dass CCD durch Haploinsuffizienz hervorgerufen wird [85, 166, 208, 242, 270, 303]: das Produkt eines autosomalen Gen-Allels reicht für die Aufrechterhaltung der normalen Proteinfunktion nicht aus. Für *RUNX2* bedeutet dies: (1) keine DNA-Bindung und damit Transaktivierung von Genen [208, 301, 303] oder (2) es gelangt nicht genug *RUNX2* in den Zellkern, da die Translokation in den Nukleus nicht funktioniert [208, 295, 301]. Aus der beobachteten

intrafamiliären klinischen Variabilität wurde geschlossen, dass hypomorphe Mutationen oder Modifikationsgene („*modifier genes*“) die klinische Expressivität dieser Mutationen verändern könnten [17, 23, 301, 303]. Im Unterschied zur Haploinsuffizienz wird durch die hypomorphe Mutation eines proteinkodierenden Gens die Funktion des Proteins herabgesetzt, geht aber nicht vollständig verloren. Für einige Mutationen konnten hypomorphe Effekte in der Zwischenzeit experimentell nachgewiesen werden [166, 175, 251, 301, 303]. Darüber hinaus werden dominant-negative Effekte [270], nicht-genetische Regulation [242] z. B. durch Toxine und epigenetische Regulation [86, 158, 185, 241, 242] diskutiert.

Neben den oben beschriebenen *Loss-of-function*-Mutationen wurde kürzlich eine *Gain-of-function*-Duplikation der Exone 3-5 des *RUNX2*-Gens beschrieben [183], die zur metaphysären Dysplasie mit maxillärer Hypoplasie und Brachydaktylie (MDMHB; OMIM 156510) führt. Im Vergleich stellt der MDMHB-Phänotyp in einigen Punkten quasi ein „Spiegelbild“ der CCD dar [183]: hypoplastische oder aplastische Schlüsselbeine und überzählige Zähne in der CCD aber vergrößerte Schlüsselbeine in der MDMHB und Zahndystrophie in der MDMHB. Die *Gain-of-function*-Wirkung dieser Duplikation wurde in einem *in vitro*-Modell bestätigt [183].

In mehreren größeren CCD-Studien wurden bei ca. 30 – 70 % der untersuchten Fälle keine Mutationen im *RUNX2*-Gen gefunden [17, 195, 295, 300]. Verschiedene Gründe können hierfür ursächlich sein, die zukünftig eine Anpassung und Erweiterung der Protokolle zur Mutationsdetektion und -verifikation notwendig machen: (1) durch Exon-spezifische PCR-Amplifikation und anschließende Sequenzierung der PCR-Produkte werden keine Variationen in der Kopienzahl des entsprechenden Genomabschnitts oder Gen-spezifische Deletionen oder Duplikationen detektiert [242]. (2) Die Regulation der Osteoblasten-Differenzierung und der Knochenremodellierung durch epigenetische Faktoren (microRNAs) [86, 87, 297] stellt eine zusätzliche Herausforderung dar, die bei der Mutationsanalyse und deren Interpretation unter Umständen mit berücksichtigt werden sollte [241, 242]. (3) Ebenso könnte eine CBF $\beta$ -Defizienz durch Haploinsuffizienz zu einem CCD-Phänotyp führen [35, 198].

### **3.1.3 Dentaler Phänotyp**

Die Zahnentwicklung ist durch eine zeitlich und räumlich komplexe Abfolge von Epithel-Mesenchym-Wechselwirkungen gekennzeichnet [112, 255, 256] und wird durch mehr als 300 Gene und deren Genprodukte gesteuert [Übersicht in 190]. Im Mausmodell wird *Runx2* im dentalen Mesenchym vom Knospen- bis zum frühen Glockenstadium exprimiert [41]. Im Gegensatz zu Osteoblasten, die während der gesamten Differenzierung *Runx2* exprimieren, erfolgt in differenzierten Odontoblasten eine Herunterregulierung der *Runx2*-Expression [132, 181]. Eine anhaltende *Runx2*-Expression induziert die Transdifferenzierung von Odontoblasten zu Osteoblasten [181]. In homozygot *Runx2*-defizienten Mäusen (*Runx2*<sup>-/-</sup>) sind die Molaren (ihre Entwicklung arretiert vor Erreichen des Kappen-Stadiums) stärker betroffen als die Schneidezähne; ebenso die Zahnanlagen im Unterkiefer mehr als die entsprechenden im Oberkiefer [2].

Die mesenchymale Expression von *Runx2* wird durch Signale des dentalen Epithels gesteuert. *Runx2* wiederum steuert die Expression mesenchymaler Moleküle, die auf die Zellen im Epithel einwirken, die Differenzierung des Schmelzorgans („*enamel organ*“) beeinflussen und damit indirekt Odonto- und Ameloblastendifferenzierung [41]. Insoweit ist *Runx2* in der Zahnentwicklung eine besondere Funktion zuzuschreiben, die unabhängig von der Rolle in der Osteogenese ist [26, 28, 41, 110, 288, 303]. Dieser Sonderrolle könnte die hohe Penetranz des dentalen Phänotyps im Spektrum der *RUNX2*-Mutationen zuzuschreiben sein [303].

Neben skelettalen Befunden wird bei Patienten mit Dysostosis cleidocranialis ein charakteristischer dentaler Phänotyp beschrieben: Persistenz der Milchzähne, verspäteter Zahndurchbruch und Hyperdontie („*supernumerary teeth*“) in der zweiten Dentition [17, 19, 28, 62, 63, 67, 81]. In den letzten Jahrzehnten wurden verschiedene Thesen entwickelt, die diesen dentalen Phänotyp und seine Beschränkung auf die zweite Dentition zu erklären versuchten [128, 132, 138, 139, 178, 181, 198, 258, 292]. Nach Pan et al. [198] werden folgende Thesen zur Entstehung des verspäteten oder ausbleibenden Zahndurchbruchs der bleibenden Dentition und damit die Persistenz der Milchzähne diskutiert: (1) fehlender zellulärer Zahnzement an der Spitze der Zahnwurzel von CCD-Patienten; (2) höhere Knochendichte des Alveolarknochens, der die nichtdurchgebrochenen Zähne überdeckt; (3) eine herabgesetzte Knochenresorption bzw. eine verzögerte Resorption der Zahnwurzeln der ersten Dentition [81, 109, 138, 139]. Bezüglich des fehlenden zellulären Zahnzements gibt es widersprüchliche Studien [40, 173]. Eine herabgesetzte Knochenresorption wurde an PDL-Fibroblasten von CCD-Patienten [165] und *Runx2*<sup>+/-</sup>-Mäusen [292] gezeigt. Darüber hinaus könnten Anzahl und Lokalisation überzähliger Zähne mechanisch einen regelgerechten Zahnwechsel erschweren [81].

Überzählige Zähne sind kein Alleinstellungsmerkmal der Dysostosis cleidocranialis. Sie sind Begleitsymptom mehrere Syndrome und treten auch nichtsyndromal auf [167, 243]. Im Gegensatz zur regelgerechten Entwicklung bildet sich bei CCD-Patienten die Zahnleiste nicht vollständig zurück und odontogene Epithelzellen verbleiben im parodontalen Gewebe [138, 168]. Diese könnten die Zahnkeime der überzähligen Zähne darstellen [81, 138] und damit zu Überresten einer „dritten Dentition“ gehören [128, 138, 192]. Ebenso könnte die oben skizzierte Beziehung zwischen *RUNX2*-Gendosis und Odontoblasten-Differenzierung eine Hyperaktivität der Zahnleiste induzieren und damit zu überzähligen Zähnen führen [28]. Ebenso werden Umweltfaktoren, epigenetische Kontrolle und *Copy-Number*-Variationen [7, 74, 83, 177, 183] bei der Entstehung überzähliger Zähne diskutiert [242]. Eine abschließende Klärung steht weiterhin aus. Aufgrund der Monophyodontie der Mäuse kann dieses Modell für Untersuchungen zum Zahnwechsel nicht herangezogen werden [112, 138] – hier wäre z. B. das Schweinmodell eine Möglichkeit [279].

Zusätzlich zeichnen sich CCD-Patienten durch offene Fontanellen aus [17, 19, 187, 188]. Eine kürzlich erschienene Studie ging dieser Frage nach und führte systematisch differenzielle Genexpressionsstudien an Wildtyp- und *Runx2*<sup>+/-</sup>-Mäusen durch [206]. Sie zeigte, dass direkt durch *Runx2* regulierte Signalwege (u. a. *Hedgehog*, *Fgf* und *Wnt*) in den *Runx2*<sup>+/-</sup>-Suturen im Vergleich zu den *Runx2*<sup>+/-</sup>-Calvaria herunterreguliert waren. Weitere Untersuchungen dieser Gruppe an Organ-Kulturen lassen die Annahme zu, dass im Vergleich zur Calvaria >50 % der *Runx2*-Gendosis für die Proliferation mesenchymaler Suture-Zellen notwendig ist [206].

Zellen und Gewebeproben, die CCD-Patienten entnommen wurden, sind ebenfalls Gegenstand der Forschung. Bei Kenntnis des Donor-Genotyps ergäben sich hier ebenso Möglichkeiten einer Genotyp-Phänotyp-Korrelation und/oder Hinweise auf mögliche neue *RUNX2*-Interaktionen.

Im Zusammenhang mit den Durchbruchstörungen stehen auch die oben erwähnten Untersuchungen zum Zahnzement bei CCD-Patienten [40, 173]. Ach et al. [3] untersuchten immunhistochemisch den Kollagen-I-Gehalt der oralen Mukosa von 6 CCD-Patienten im Vergleich zu Proben von 12 Gesunden. Die immunhistochemische Untersuchung zeigte bei CCD-Patienten einen signifikant höheren Kollagen-I-Gehalt in der oralen Mukosa im Vergleich zu den Gesunden. Ursache hierfür scheint ein verminderter Kollagen-Abbau durch eine verringerte Kollagenase-Genexpression [111] zu sein. Im Promoter der Kollagen-I-Gene befinden sich *RUNX2*-Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen; Kollagenase-3 (MMP13) wird ebenfalls über *RUNX2* aktiviert. *RUNX2*-

Haploinsuffizienz könnte daher die „*typisch derbe, fibriotische Beschaffenheit der oralen Mukosa*“ [3, S. 250] und damit die Persistenz der Milchzähne und überzähliger Zähne erklären [187].

### 3.2 Mechanobiologie

Die lokale, strukturelle Adaptationsfähigkeit des Knochens nach mechanischer Belastung ist von fundamentaler Bedeutung für fast alle orthodontischen und orthopädischen Verfahren [43, 140, 141]. Erhöhte mechanische Belastung stimuliert Knochenbildung und unterdrückt die Knochenresorption. Verminderte mechanische Belastung hat den gegenteiligen Effekt und fördert den Knochenabbau durch Osteoklasten [43, 140, 141]. Während in der orthopädischen Therapie über die Muskulatur adaptive Umbauprozesse im Knochen induziert werden [209, 210, 276], werden in der orthodontischen Therapie durch Applikation einer kieferorthopädischen Kraft Umbauprozesse im Knochen induziert und so Zähne im Knochen bewegt; dies ist an ein intaktes Parodontalligament gekoppelt [44, 141, 276]. Die kieferorthopädischen Kräfte variieren stark in Abhängigkeit von der verwendeten Therapie [276]. Hinweise auf eine „optimale“ Kraftgröße gab bereits A. M. Schwarz 1932 [230]. Um unerwünschte Nebeneffekte (z. B. Wurzelresorptionen) zu vermeiden, sollte die Größe der Kraft den Blutdruck in den Blutkapillaren von  $0,15 - 0,2 \text{ N/cm}^2$  ( $= 15 - 20 \text{ g/cm}^2$ ) bezogen auf die Wurzeloberfläche nicht übersteigen [91, 92, 230].

Grundlegende Informationen zu den Gewebsreaktionen während der orthodontischen Therapie wurden in tierexperimentellen Studien gewonnen [Übersichten in 44, 264]. Aufgrund der komplexen räumlichen Anordnung der beteiligten Gewebe ist eine tiefergehende Analyse der inter- und intrazellulären Kommunikation im Tiermodell nicht möglich. Daher wurden *In-vitro*-Zellkulturmodelle entwickelt, mit denen der Einfluss simulierter kieferorthopädischer Kräfte unterschiedlicher Modalitäten (**Abb. 2.2**) auf zellulärer Ebene untersucht wurde [aktuelle Übersicht in 264]: in Richtung der kieferorthopädischen Kraft induzieren Druckkräfte Umbauprozesse im angrenzenden Alveolarknochen, in entgegengesetzter Richtung Zugkräfte Knochenaufbau (**Abb. 2.1**).

In den hier vorgestellten Studien wurden humane Osteoblasten (HABOs) und PDL-Fibroblasten (HPDFs) simulierten kieferorthopädischen Druckkräften für kürzere (30 min bis 4 h) und längere (1 – 6 Tage) Perioden ausgesetzt und die Expression verschiedener osteogener, inflammatorischer oder anderer regulatorischer Gene, Genprodukte und Metaboliten untersucht [20, 107, 234, 235]. Hierzu wurden zwei unterschiedliche, etablierte Simulationsmethoden angewandt: die kurzzeitige Applikation von Druckkräften erfolgte mit dem Zentrifugationsmodell [20]. Nachfolgend wurde es zur Simulation von Druckkräften auf Zellen in indirekter Co-Kultur adaptiert [234, 235]. Das „*Weight Approach Based*“-Modell (WAB-Modell) [106] wurde entsprechend den Ergebnissen unseres systematischen Übersichtsartikels [106] so modifiziert, dass eine konstante, statische Druckkraft über 6 Tage [107] angewandt werden konnte.

In **Tabelle 3.2** sind die wichtigsten Daten dieser Studien zusammengefasst. Im Folgenden werden die Ergebnisse dieser Methoden für ausgewählte Gene und Genprodukte bzw. Metaboliten miteinander verglichen und diskutiert.

**Tabelle 3.2.** Gegenüberstellung der wichtigsten Studien-Kenngrößen [20, 107, 234, 235].

	Baumert et al. [20]	Shi et al. [234]	Shi et al. [235]	Janjic Rankovic et al. [107]
Kraftmodalität:	Druck (Zentrifugation)	Druck (Zentrifugation)	Druck (Zentrifugation)	Druck (WAB)
Kraftgröße:	40,3 g/cm <sup>2</sup>	47,4 g/cm <sup>2</sup>	47,4 g/cm <sup>2</sup>	2,0 g/cm <sup>2</sup>
Kraftdauer:	30 min, 90 min	1 h, 2 h, 4 h	1 h, 2 h, 4 h	1 bis 6 Tage
Temperatur:	Raumtemperatur	30 °C	30 °C	37 °C
Zellen:	HABOs	HABOs, HPDFs	HABOs, HPDFs	HPDFs
Kultivierung:	Mono-Kultur	Mono- und Co-Kultur	Mono- und Co-Kultur	Mono-Kultur
RT-qPCR (Referenzgen):	<i>RUNX2</i> ( <i>GAPDH</i> )	<i>TNFA</i> , <i>COX2</i> , <i>IL6</i> ( <i>B2M</i> )	<i>RUNX2</i> , <i>P2RX7</i> ( <i>B2M</i> )	<i>COX2</i> , <i>TNFA</i> , <i>IL6</i> , <i>cFOS</i> , <i>HB-GAM</i> , <i>RUNX2</i> , <i>P2RX7</i> ( <i>PGK1</i> , <i>RPL13A</i> )
ELISA:	./.	IL6, TNF, PGE <sub>2</sub>	./.	TNF, PGE <sub>2</sub>
Sonstiges:	<i>Pulse-Chase</i> -Protokoll	Apoptose-Induktion	Apoptose-Induktion; <i>Pulse-Chase</i> -Protokoll	Zellproliferation, Zellvitalität

### 3.2.1 Gene des Knochenumbaus: *RUNX2* und *P2RX7*

Aufgrund seiner zentralen Bedeutung für die Knochenhomöostase und die Knochenremodellierung [55, 120, 133, 232, 269, 272] liegt die Vermutung nahe, dass kieferorthopädische Kräfte *RUNX2*-Genexpression induzieren und *RUNX2* an den Umbauprozessen während der kieferorthopädischen Zahnbewegung beteiligt ist [20, 306]. Der ATP-abhängige Ionenkanal *P2RX7* wird ebenfalls in Zusammenhang mit der KZB diskutiert [4, 267], vor allem auch durch seine mögliche Beteiligung an der Entstehung von Wurzelresorptionen [22, 97]. Seine genaue Rolle während der KZB ist aber weiterhin unklar [267]. ATP ist ein zelluläres Stresssignal [82]. Es wird von Zellen z. B. während mechanischer Belastung sezerniert [120]. Durch ATP-Bindung öffnet der Ionenkanal und zweiwertige Kationen (insbesondere Ca<sup>2+</sup>) strömen in die Zelle hinein. Dies führt zur Freisetzung zentraler, proinflammatorischer Mediatoren, die regulierend auf die Knochenhomöostase wirken [4].

Um die Mechanosensitivität dieser Gene zu untersuchen wurden HPDFs und HABOs in Mono- und Co-Kultur über kürzere (30 min bis 4 h) und längere Zeiträume (1 d bis 6 d) Druckkräften ausgesetzt und die Genexpression beider Gene bestimmt [20, 107, 235].

In Mono-Kultur-HABOs war die *RUNX2*-Genexpression direkt mit der Dauer der Kraftapplikation verknüpft. Eine transiente Hochregulation war nach einer kurzen 30-minütigen [20] bzw. 1- oder 2-stündigen Zentrifugation [235] zu beobachten. Längere Applikationszeiten (90 min, 4 h) beeinflussten diese dagegen nicht. Auch in Mono-Kultur-HPDFs war die *RUNX2*-Genexpression mit der Dauer der Kraftapplikation verknüpft; eine länger-andauernde Hochregulation war nur nach 4-stündiger Zentrifugation zu beobachten [235]. Nach kürzeren Zentrifugationen fiel die Genexpression unmittelbar nach Ausbleiben der Druckkraft auf den Wert der Negativkontrolle ab. Im WAB-Modell [107] zeigte sich ähnliches: transiente, aber nicht-signifikante Hochregulation der *RUNX2*-Genexpression nach 3 Tagen Druckapplikation. In Co-Kultur hatte die Dauer der Kraftapplikation keinen Einfluss auf die *RUNX2*-Genexpression in beiden Zelltypen [235].

Die vorgelegten Ergebnisse demonstrieren, dass die *RUNX2*-Genexpression durch simulierte Druckkräfte herunterreguliert wird [20, 107, 235]: in Mono-Kultur in Abhängigkeit von der Kraftdauer und dem Zelltyp und in Co-Kultur unabhängig von beiden Parametern; lediglich die Kraftgröße scheint einen Einfluss auf die Dauer einer temporären Hochregulation zu haben [32, 56, 57].



*In-vitro*-Studien zur Knochenbildung auf der „Zugseite“ der orthodontischen Zahnbewegung zeigten eine Hochregulation dieses Gens [232, 269, 272, 306]. Ein autoregulatorischer Feedback-Mechanismus im *RUNX2*-Gen könnte hier ebenfalls eine Rolle spielen [55]. Wie zuvor erwähnt, befinden sich im *RUNX2*-Promoter-Bereich Bindungsstellen für diesen Transkriptionsfaktor, die stimulierend oder inhibitorisch auf die Genexpression wirken und damit autosuppressive Effekte auf *RUNX2* ausüben könnten [51]. *RUNX2* ist das Mastergen des osteoblastären Phänotyps und wird als solches in entwickelten Osteoblasten exprimiert. Wird ein Osteoblast mechanisch stimuliert, könnte dieser Feedback-Mechanismus die beobachteten Änderungen in der *RUNX2*-Genexpression erklären [20]: eine temporäre Erhöhung und eine anschließende Herunterregulation zum ursprünglichen Expressionsgrad – und dies unabhängig von der Dauer und der Methode der Druckstressapplikation [20, 21, 107, 150, 235]. Gleichzeitig wird durch die Herunterregulation der *RUNX2*-Genexpression auf der simulierten „Druckseite“ der KZB Knochenumbau durch Osteoklasten gefördert. Zusätzlich wird durch kontinuierlichen Druckstress auf Osteoblasten die Expression alkalischer Phosphatase [197] vermindert und gleichzeitig die Sekretion von  $PGE_2$  (siehe unten) [107, 197, 234] gefördert. Auch dies inhibiert Osteoblasten-Differenzierung.

*P2RX7*-Expression wurde u. a. in Monozyten und Makrophagen [38], Osteoblasten, Osteozyten und Osteoklasten [4] und in PDL-Fibroblasten [117] nachgewiesen. Vicilli et al. [267] zeigten im *P2RX7*-Knockout-Mausmodell, dass sich innerhalb von neun Tagen nach Beginn einer KZB nekrotisches Gewebe im PDL ansammelte. Da ein Abbau des nekrotischen Gewebes nicht erfolgte, erhöhte sich in diesem Bereich der mechanische Stress im PDL und es waren vermehrt Wurzelresorptionen zu beobachten. Die Autoren führten dies u. a. auf eine verminderte Sekretion von IL1B zurück, das u. a. für die Rekrutierung von Makrophagen und damit für die Knochenhomöostase verantwortlich ist [117, 118].

Kurzzeitiger Druckstress führte in mono-kultivierten HABOs und HPDFs zu einer signifikanten Erhöhung der *P2RX7*-Genexpression [235]. In co-kultivierten Zellen war sie dagegen im Vergleich zu den korrespondierenden Negativkontrollen unabhängig von der Kraftdauer herunterreguliert [235]. Längere Druckstressapplikation auf HPDFs im WAB-Modell resultierte unabhängig von der Druckdauer in einer signifikanten Herunterregulation der *P2RX7*-Transkription im Vergleich zur Negativkontrolle [107].

Statischer Druckstress induziert sowohl in mono-kultivierten HPDFs als auch in HABOs die Expression inflammatorischer Gene und Mediatoren (*TNFA*, *IL1B*, *IL6*, *COX2*,  $PGE_2$ ) [107, 234] (siehe folgender Abschnitt). In PDL-Stammzellen führen inflammatorische Bedingungen zu einer verminderten *P2RX7*-Expression und damit zu einer verminderten osteogenen Differenzierung dieser Zellen [282]. Es ist zu vermuten, dass dies hier auch zutreffen könne. Die Rolle des auf HPDFs und HABOs exprimierten *P2RX7*-Ionenkanals während der KZB ist im Detail noch nicht aufgeklärt.

### **3.2.3 Entzündungsmediatoren und mechanosensitive Gene: TNFA, COX, IL6, $PGE_2$ , cFOS, HB-GAM**

In der frühen Phase einer KZB kommt es zu sterilen Entzündungsreaktionen im parodontalen Gewebe [157]. Dies führt zur Vasodilatation der Blutkapillaren, einer anschließenden Einwanderung von Leukozyten und zur Aktivierung proinflammatorischer Enzyme, Cytokinen und Chemokinen [140, 264]; hierzu gehören u. a. die in den vorgestellten Studien [107, 234] untersuchten Gene bzw. Metaboliten Interleukin 6 (IL6), Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNFA), Cyclooxygenase-2 (PTGS2) und Prostaglandin  $E_2$  ( $PGE_2$ ). Sie tragen wesentlich zur Stimulation des Knochenremodellierung durch

Hochregulation von RANKL bei [73, 119]. Mechanosensitive Gene wie cFOS und HB-GAM spielen in der Mechanotransduktion ebenfalls eine Rolle. In wieweit sie durch Druckkräfte während einer simulierten KZB reguliert werden, war ebenfalls Gegenstand der Untersuchung [107].

Die Expression der vorgenannten Gene bzw. Genprodukte und Metaboliten wurde nach kurzer [234] oder längerer [107] Druckstressapplikation auf HPDLFs und/oder HABOs in Mono- bzw. Mono- und Co-Kultur bestimmt. In Mono-Kultur war in allen genannten Fällen eine von der Dauer des Druckstress abhängige Expression zu beobachten [107, 234]. In Co-Kultur war sie zusätzlich abhängig vom Zelltyp [234].

Der Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (*TNFA*) ist nicht nur bei Entzündungsreaktionen beteiligt [193]. Im Zusammenspiel mit verschiedenen Interleukinen, Prostaglandinen, M-CSF und dem OPG-RANK-RANKL-System ist er via NF- $\kappa$ B-Aktivierung an der Osteoklastogenese beteiligt [125, 145].

Kurzzeitige Druckkraftapplikation mono-kultivierter HPDFs bzw. HABOs bewirkte eine Stimulation der *TNFA*-Genexpression in Abhängigkeit von der Druckdauer [234]. Generell war ähnliches in beiden Zelltypen in Co-Kultur ebenfalls zu beobachten [234]. Längere Druckkraftapplikation mittels WAB-Modell zeigte in mono-kultivierten HPDFs eine temporäre, signifikante Stimulation der *TNFA*-Genexpression ab dem dritten Tag bis zum sechsten Tag des Experimentes [107]. In beiden Studien konnte die *TNFA* im Zellkulturüberstand nicht nachgewiesen werden, da die Mengen unterhalb der Sensitivität des verwendeten ELISA-Systems lagen [107, 234].

Mittels Zentrifugation setzten Grimm et al. [75] HPDFs einem Druckstress von 35 g/cm<sup>2</sup> für 3 Stunden aus; sie konnten keine *TNFA*-Stimulation feststellen. Dies ist in Einklang mit den von Shi et al. [234] berichteten Daten: während in HABOs zwar nach 1-stündiger Zentrifugation die Genexpression signifikant vervierfacht wurde, ist nach 4 Stunden Zentrifugation sowohl in HABOs als auch HPDFs keine *TNFA*-Stimulation im Vergleich zur Negativkontrolle feststellbar.

Bezüglich der *TNFA*-Genexpression sind die Ergebnisse der Studien, die Druckstress mit dem WAB-Modell simulierten, widersprüchlich: einige Autoren berichten von einer maximalen Genexpression innerhalb der ersten 24 Stunden Druckapplikation auf HPDFs [180] oder SaOS-2-Osteosarkoma-Zellen [137]. Während Kang et al. [115] selbst nach 48 Stunden Druckapplikation auf HPDFs keine Änderung der Genexpression feststellten, zeigten Kim et al. [125] signifikante Genstimulation nach 24 bzw. 48 Stunden Stimulation. Im Gegensatz zu den vorgenannten konnten Janjic Rankovic et al. [107] im erweiterten WAB-Modell eine Stimulation der *TNFA*-Genexpression vom 2. bis 6. Tag der Simulation zeigen. Interessanterweise war *TNFA* weder im Zellkulturüberstand der experimentellen Gruppen (Zentrifugation bzw. WAB) noch den korrespondierenden Negativkontrollen nachweisbar [107, 234].

Interleukin 6 (IL6) ist wie *TNFA* mit Knochenhomöostase und Knochenumbau verknüpft [10, 45]. Eine Herunterregulation von IL6 kann zu einer Reduktion der Osteoblasten-Anzahl und damit zu einer Abnahme der Knochenmasse führen [13, 291]. Es nimmt eine wichtige Rolle im PDL-Umbau während einer KZB wahr [103].

Kurzzeitige Druckkraftapplikation mono-kultivierter HPDFs bzw. HABOs bewirkte eine Stimulation der *IL6*-Genexpression in Abhängigkeit von der Druckdauer [234]. In Co-Kultur war ähnliches bei beiden Zelltypen ebenfalls zu beobachten [234]. Eine Erhöhung der IL6-Konzentration im Überstand mono-kultivierter HPDFs und HABOs folgte mit Verzögerung [234]. In co-kultivierten HPDFs war keine signifikante Veränderung der Proteinsekretion bestimmbar, während in co-kultivierten HABOs eine signifikante Erhöhung nach 2- bzw. 4-stündiger Zentrifugation messbar wurde. Längere Druckkraftapplikation mittels WAB-Modell zeigte in mono-kultivierten

HPDFs eine signifikante Stimulation der *IL6*-Genexpression zwischen dem ersten und fünften Tag des Experimentes [107].

Mittels Zentrifugation setzten Grimm et al. [75] mono-kultivierte HPDFs einem Druckstress von 35 g/cm<sup>2</sup> für 3 Stunden aus; sie konnten keine *IL6*-Stimulation feststellen. Dies ist in Einklang mit den von Shi et al. [234] berichteten Daten: während in HABOs nach 4 Stunden Zentrifugation die Genexpression signifikant verfünffacht wurde, ist nach 4 Stunden Zentrifugation in HPDFs keine *IL6*-Stimulation im Vergleich zur Negativkontrolle feststellbar. Interessanterweise kam es im HABO-Co-Kultur-Modell zu einer Herunterregulation der *IL6*-Genexpression im Vergleich zur Mono-Kultur, während die *IL6*-Konzentration im Zellkulturüberstand anstieg [234]. In einer Co-Kultur aus alveolären Typ-II-Zellen und alveolären Makrophagen der Ratte beeinflussten zyklische mechanische Dehnung und CO<sub>2</sub>-Konzentration die intrazelluläre Menge und die Sekretion von TNFA und *IL6* in einer nicht-additiven Interaktion [49]. Analog wäre es daher möglich, dass die Interaktion aus Druckapplikation und interzellulärer Kommunikation die *IL6*-Transkription reduziert und gleichzeitig die *IL6*-Sekretion in HABOs erhöht.

Im Gegensatz zum Zentrifugationsmodell wurden mit dem WAB-Modell auch längere Druckstressapplikationen von bis zu 24 Stunden durchgeführt und die *IL6*-Expression bestimmt [107, 127, 143, 203, 285], die sich in Bezug auf die *IL6*-Expression teilweise widersprechen. In einigen wird von einer temporären, signifikanten Erhöhung der *IL6*-Genexpression innerhalb der ersten 12 h mechanischer Stimulation berichtet, die im weiteren Verlauf wieder auf den Wert der Negativkontrolle zurückfiel [143, 285]. Andere beschreiben dagegen keinen signifikanten Unterschied zwischen Druckapplikation (2 g/cm<sup>2</sup> für 24 h) und den korrespondierenden Kontrollen [203]. Die Anwendung des WAB-Modells über längere Zeiträume wurden von Janjic Rankovic et al. [107] (2 g/cm<sup>2</sup> für 6 d) und Schröder et al. [228] (2 g/cm<sup>2</sup> für 96 h) beschrieben. Beide berichten von einer signifikanten maximalen Hochregulation der *IL6*-Genexpression innerhalb der ersten zwei [228] bzw. drei Tage [107].

Cyclooxygenase-2 (COX2; *prostaglandin-endoperoxide synthase 2*, *PTGS2*) ist eine Schlüsselenzym in der Prostaglandin-Synthese einschließlich Prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>). Es wird durch das *PTGS2*-Gen kodiert und ubiquitär exprimiert. *PTGS2* wird wie *FOS* zu den „*immediate-early genes*“ gerechnet [222]; die Induktion der Transkription dieser Gene benötigt keine *de novo*-Proteinsynthese [8]. *PTGS2* ist an allgemeinen Entzündungsreaktionen [25] und Knochenresorption [140] beteiligt. Die *PTGS2*-Genexpression wird durch mechanische Kräfte verstärkt [119, 176]. Dies führt wiederum zu einer erhöhten PGE<sub>2</sub>-Produktion unter mechanischer Belastung [236]. Durch einen autokrinen Mechanismus führt die steigende PGE<sub>2</sub>-Konzentration in HPDFs zu einer RANKL-Hochregulation und damit zur Induktion der Osteoklastogenese [119].

In mono-kultivierten HPDFs und HABOs ist eine von der Stressdauer abhängige signifikante *PTGS2*-Stimulation zu beobachten [234]. Die PGE<sub>2</sub>-Konzentration im Zellkulturüberstand von HPDFs ist unabhängig von der Zentrifugationsdauer ebenfalls signifikant erhöht, während in mono-kultivierten HABOs eine Herunterregulation zu beobachten ist. *PTGS2*-Genexpression und PGE<sub>2</sub>-Sekretion waren in co-kultivierten HPDFs dagegen signifikant herunterreguliert. In co-kultivierte HABOs ist eine signifikante, temporäre *PTGS2*-Stimulation nach 2-stündiger Zentrifugation zu beobachten; die PGE<sub>2</sub>-Sekretion erreichte zum gleichen Zeitpunkt ebenfalls das Maximum. Druckapplikation auf HPDFs mit dem WAB-Modell (2 g/cm<sup>2</sup> für bis zu 6 Tage) resultierten in einer temporären, signifikanten Hochregulation der *PTGS2*-Genexpression zwischen dem 2.–5. Tag des Experimentes [107]. Die PGE<sub>2</sub>-Konzentration dagegen stieg im Verlauf des Experimentes immer weiter an und erreichte am 5. Tag ein Plateau.

In einer Studie von Grimm et al. [75] wurde mittels Zentrifugation ( $34,9 \text{ g/cm}^2$  für 3 h) Druckstress auf HPDFs ausgeübt. Hierdurch stieg die *PTGS2*-Expression um das 4,4-fache, während die  $\text{PGE}_2$ -Konzentrationen im Zellkulturüberstand unterhalb des Detektionslimits von  $\leq 9,7 \text{ pg/mL}$  des verwendeten ELISA-Systems lag. Während die von Shi et al. [234] berichtete 4,5-fache Stimulation mit dem oben genannten Wert übereinstimmt, ist die im Vergleich sehr niedrige  $\text{PGE}_2$ -Konzentration insofern verwunderlich. Eine mögliche Erklärung könnten die unterschiedlichen Zellkulturmedien und/oder die biologische Variabilität der verwendeten HPDFs-Quellen liegen [176]. In der murinen Osteoblastenzelllinie MC3T3-E1 konnte ebenfalls eine Druckstress-abhängige Induktion der  $\text{PGE}_2$ -Sekretion gezeigt werden [59]. Leider lassen sich die Werte nicht direkt miteinander vergleichen, da sich die Angabe der relativen Zentrifugalbeschleunigung „ $287 \times g$ “ [59] ohne weitere Geräte- und Experiment-spezifische Informationen nicht umrechnen lässt [20, 213].

Zur *PTGS2*-Genexpression und  $\text{PGE}_2$ -Sekretion nach Druckapplikation mit dem WAB-Modell liegen mehrere Studien vor: sie berichten alle von einer kontinuierlichen Stimulation der Genexpression und einer ansteigenden  $\text{PGE}_2$ -Sekretion in den Zellkulturüberstand [116, 119, 176, 203, 221]. Insofern stimmen sie mit den hier berichteten Daten überein [107]. In einigen Studien erreichte die *PTGS2*-Expression den Maximalwert zum Ende (48 h) der jeweiligen Experimente [116, 176]. Eine andere Studie dagegen berichtet von einer signifikante Hochregulation innerhalb der ersten drei Tage des Experiments mit einem Maximalwert am zweiten Tag [228]. Die von Janjic Rankovic et al. [107] berichtete zweitägige Verzögerung zwischen dem Anstieg der *PTGS2*-Genexpression und der  $\text{PGE}_2$ -Anreicherung im Zellkulturüberstand könnte an der Sensitivität des verwendeten ELISA-Systems liegen [116, 119].

Der Einfluss einer simulierten kieferorthopädischen Kraft auf die Genexpression der mechano-sensitiven Gene *FOS* und *HB-GAM* wurde mit dem WAB-Modell in HPDFs von Janjic Rankovic et al. [107] ebenfalls untersucht. Das Protoonkogen cFOS wird durch das *FOS*-Gen kodiert und bildet zusammen mit cJUN den heterodimeren Transkriptionsfaktor AP-1 (*activator protein 1*) [89]. Wie *COX2* gehört *FOS* zu den „*immediate-early*“ Genen [8]. *FOS*-Genexpression wird z. B. durch mechanische Dehnung in HPLDFs stimuliert [130, 199, 287]. *HB-GAM* (*heparin binding growth associated molecule*; Pleiotrophin, PTN) ist ein mechano-responsives Gen in Osteoblasten [98, 99] und in HPDLFs [147], dessen Expression durch mechanische Dehnung gesteuert wird [280].

Janjic Rankovic et al. [107] zeigten, dass im WAB-Modell die Applikation einer kontinuierlichen Druckkraft eine dauerhafte Hochregulation der *FOS*-Genexpression in HPDFs bewirkte. Die *HB-GAM*-Expression dagegen zeigte bis auf eine kurzzeitige Herunterregulation am 5. Tag des Experiments keine signifikanten Änderungen der Genexpression.

Vergleichbare Studien mit dem 2D-WAB-Modell konnten nicht identifiziert werden [106]. Mittels Mikroarray und RT-qPCR untersuchten Li et al. [157] die druckabhängige Genexpression in HPDFs mit dem 3D-WAB-Modell ( $25 \text{ g/cm}^2$  für 6 h, 24 h und 72 ) und zeigten eine zeitabhängige Hochregulation der *FOS*-Genexpression. In murinen MC3T3-E1-Zellen stimuliert eine 5-minütige Zentrifugation bei  $287 \times g$  gefolgt von einer 30-minütigen *Chase*-Phase die 14-fache *FOS*-Genexpression [59] während Zentrifugation ( $209 \times g$  für 5 min bis 6 h) von UMR-106-Osteoblasten (Ratte) eine transiente *FOS*-Hochregulation mit einem Maximum nach 30 Minuten Zentrifugation induzierte [153]. Zentrifugation von HPDFs ( $60 \text{ min}$  bei  $50 \text{ g/cm}^2$ ) zeigten eine transiente Aktivierung der DNA-Bindung des AP-1-Komplexes [93, 135].

### 3.2.4 *In-vitro-Simulation kieferorthopädischer Kräfte*

Im Laufe der letzten 30 Jahre wurden eine Vielzahl von Methoden zur Simulation kieferorthopädischer Kräfte auf Zellen entwickelt (**Abb. 2.2**) [50, 289]: die „Druckseite“ einer KZB wird durch Zentrifugation [20, 212], dem WAB-Modell [106, 114, 119] oder hydrostatische Kompression simuliert. Die Nachbildung der zelluläre Dehnung auf der „Zugseite“ einer KZB wird hauptsächlich durch statische oder dynamische mechanische Verformung des Substrates, auf dem die Zellen kultiviert werden, erreicht (Sun & Baumert, Manuskript in Vorbereitung) [50, 289]. Fluide Scherspannung wird in Zusammenhang mit der Rolle von Osteozyten während der KZB diskutiert [140, 250, 289].

In den hier vorgestellten Arbeiten [20, 106, 107, 234, 235] lag der Schwerpunkt auf der Etablierung und Erweiterung zweier bestehender *In-Vitro*-Methoden zur Simulation der „Druckseite“ einer KZB: die Zentrifugationsmethode [20, 234, 235] und dem WAB-Modell [106, 107].

Die Vorteile des Zentrifugationsmodells liegen auf der Hand: in jedem Zellkulturlabor gibt es eine Laborzentrifuge mit Ausschwingrotor, in der Zellkulturplatten (z. B. 6- oder 12-Well-Platten) zentrifugiert werden können. Da die Geräte- und Versuchsparameter bekannt sind, lässt sich die Druckkraft berechnen [20, 213, 214].

In den meisten Fällen werden die Drucksimulationen mittels Zentrifuge bei Raumtemperatur durchgeführt [20, 75, 212-214] – und hier liegt auch der Nachteil dieses Modells: die Temperatur-Sensitivität biologischer Systeme. Die Kultur humaner HPDFs und HABOs erfolgt im Zellkultur-Inkubator bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> in Wasserdampf gesättigter Umgebung. Eine Kultivierung der Zellen bei Temperaturen < 37 °C über einen längeren Zeitraum wird höchst wahrscheinlich Apoptose und Zelltod induzieren. Einige Autoren modifizierten daher die Temperatur-Regulation der Zentrifuge oder platzierten die Zentrifuge in einem Wärmeschrank [101, 182, 261]. Das in den meisten Zellkulturmedium verwendete pH-Puffersystem basiert auf dem Bicarbonat-Gleichgewicht zwischen dem Hydrogencarbonat im Medium und dem CO<sub>2</sub> im Inkubator. Da Zentrifugen sicherheitsbedingt während des Betriebes hermetisch verschlossen sind, findet kein CO<sub>2</sub>-Austausch mit der umgebenden Luft statt. Über einen längeren Zeitraum würde daher das Zellkulturmedium zu sauer werden. Der Austausch des Zellkulturmediums mit einem HEPES-haltigen könnte die CO<sub>2</sub>-Abhängigkeit verringern [260, 261].

Bei länger-andauernder Zentrifugation (> 4 h) besteht immer die Gefahr einer Apoptose-Induktion oder einer Zell-Nekrotisierung (Shi & Baumert; unveröffentlicht). Daher wurden in den hier vorgestellten Studien entweder Apoptose-Induktion [234, 235] oder Zellvitalität und Zellproliferation [107] bestimmt. Negative Auswirkungen auf diese Parameter konnten in den genannten Studien ausgeschlossen werden. Eine alternative Methode ist der Nachweis der Zellintegrität durch Bestimmung der Lactatdehydrogenase (LDH) im Zellkulturüberstand [77]: dieses Enzym gelangt nur durch sterbende bzw. tote Zellen in den Zellkulturüberstand. Theilig et al. [254] zentrifugierten HPDFs und humane Gingiva-Fibroblasten über 16 h bei Raumtemperatur (Negativkontrolle: ebenfalls 16 h bei Raumtemperatur) und konnten keine Beeinträchtigung der Membranintegrität mittels LDH-Assay nachweisen. Dies ist umso verwunderlicher, da Shi (unveröffentlichte Ergebnisse) nach > 8 h Inkubation bei Raumtemperatur bereits Apoptose nachwies. Das in der Zellkultur verwendete fötale Kälberserum enthält LDH und muss daher vor Anwendung hitzedeaktiviert werden; ansonsten würde eine zu hohe Hintergrundaktivität gemessen werden [77]. Inwieweit dies in der Studie von Theilig et al. [254] berücksichtigt wurde, konnte nicht ermittelt werden.

Das „WAB Loading Model“ wurde 1992 von Kanai et al. [114] zur Applikation statischen, unidirektionalen Druckes auf HPDFs eingeführt und ist zu einem quasi „Goldstandard“ im Kanon der Simulation kieferorthopädischer Kräfte geworden [107, 289]. Durch Änderung des auf die Zellen einwirkenden Gewichts wird statischer, unidirektionaler Druck zwischen  $0,25 \text{ g/cm}^2$  bis  $5 \text{ g/cm}^2$  erzeugt [106]. Aufbau-bedingt kann es in jedem  $\text{CO}_2$ -Inkubator verwendet werden und vermeidet so eines der wesentlichen Nachteile der Zentrifugation (siehe oben). Solange das Aufsetzen und Abnehmen des direkt auf den Zellen liegenden Deckglases vorsichtig genug geschehen, ist eine Zellschädigung hierdurch nicht zu befürchten [106, 107]. Dennoch ist die Kontrolle der Zellvitalität für die Anwendung eines *In-vitro*-Modelles essenziell.

Beiden Simulationsmethoden gemeinsam ist: sie ermöglichen die Analyse eines spezifischen Zelltyps unabhängig von anderen – dies ist vor allem für Untersuchungen zur intrazellulären Kommunikation wichtig, da hier Methoden angewendet werden, deren Anwendung in Geweben nicht oder nur eingeschränkt möglich sind [106, 273, 289]. Unter diesen kontrollierten Bedingungen sind Analysen einer Vielzahl verschiedener Interventionen auch in Kombination ohne weiteres möglich.

*In vivo* hängt die KZB von einer komplexen, interzellulären Kommunikation zwischen den verschiedenen Zelltypen im Zahnhalteapparat ab und insbesondere die Interaktion zwischen HPDFs und HABOs ist essentiell [140, 141, 264]. Durch Shi et al. [234, 235] wurde für das Zentrifugationsmodell die Anwendung eines indirekten *In-vitro*-Co-Kultur-Modells aus HPDFs und HABOs etabliert [9, 34, 154]. Die Autoren konnten durch Unterschiede in der Zelltyp-spezifischen Genexpression zwischen Mono- und Co-Kultur auf eine interzelluläre Kommunikation zwischen beiden Zelltypen schließen. Aufgrund der Anordnung kann davon ausgegangen werden, dass die interzelluläre Kommunikation vom Zelltyp im Insert zum Zelltyp auf dem Boden des Wells verläuft, parallel und in Richtung der Zentrifugalkraft [234, 235].

Eine weitere Annäherung an die *In-vivo*-Situation stellt die Etablierung von 3D-Zellkulturmodellen dar [106]. Kang et al. [115] applizierten konstanten, unidirektionalen Druck auf 2D- und in einer Kollagen-Matrix 3D-kultivierte HPDFs mit dem WAB-Modell ( $2 \text{ g/cm}^2$  für 2-48 h) und analysierten die Genexpression mittels cDNA-Mikroarrays. Sie stellten einen signifikanten Unterschied zwischen den Genexpressions-Profilen 2D- und 3D-kultivierter HPDLFs fest. Da die Kollagen-Matrix einige Nachteile aufweist [106], wäre die von Liao et al. [159] eingeführte hydrophilisierte PLLA-Matrix vielversprechend. Inwieweit eine Adaptation der 3D-Zellkultur an das Zentrifugationsmodell möglich ist, müssen weitere Studien zeigen.

Um die Vergleichbarkeit zukünftiger Studien zu erhöhen, wurden in mehreren systematischen Übersichtsartikeln bisherige Studien auch hinsichtlich des „*reporting bias*“ untersucht [106, 264] (Sun & Baumert, Manuskript in Vorbereitung). Hauptsächliche Defizite waren u. a. unvollständige Informationen zu den Zellspendern (Alter, Geschlecht) [176], Unterschiede in den Zellkulturbedingungen und nicht-MIQE-konformer Bericht der Genexpressionsanalysen mit RT-qPCR [29]. Kürzlich wurde von Jäger et al. [104] ein serum-freies Zellkulturmedium zur HPDF-Kultivierung vorgestellt. Inwieweit sich dies in den beschriebenen Simulationen bewährt und auch mit anderen Zelltypen verwendet werden kann, bleibt Gegenstand zukünftiger Untersuchungen.

### 3.3 Kieferorthopädische Zahnbewegung, Glucocorticoide und diurnale Rhythmik

Mit einer kieferorthopädischen Behandlung sind physikalischer und mentaler Stress (Schmerz und Angst) verbunden. Physikalischer Stress wird in Form von kieferorthopädischen Kräften in den Zahnhalteapparat eingeleitet und erzeugt dort u. a. durch Aktivierung von Schmerzrezeptoren und der Interaktion einer Vielzahl inflammatorischer Moleküle Schmerzen, der wenige Stunden nach Applikation der kieferorthopädischen Kraft beginnt und ca. fünf Tage anhält [286].

Ein Maß zur „objektivierbaren“ Bestimmung mentalen Stresses ist das „Stress-Hormon“ Cortisol. Es liegt zu ca. 90 % in gebundener, biologisch-inaktiver Form im Blut vor. Das verbleibende Cortisol ist entweder an Albumin gebunden (ca. 7 %) oder zirkulieren in „freier“, ungebundener, biologisch-aktiver Form (ca. 3 %). Die Speicheldrüsen sekretieren nur die beiden letztgenannten Cortisol-Formen in den Speichel [126, 259, 274]. Die Beprobung im Speichel stellt daher eine einfache, nichtinvasive Methode zur Bestimmung dar.

Wie viele weitere Biomarker in der gingivalen krevikulären Flüssigkeit (GCF) und im Speichel unterliegt die basale Speichel-Cortisol-Konzentration einer diurnalen Rhythmik [36, 122, 238, 239]. Während für Erwachsene detaillierte Informationen über das Cortisol-Tagesprofil vorliegen [274], existieren für Jugendliche im Alter von 10 – 14 Jahren nur Referenzwerte [76, 123]. Daher wurde von Tzortzi et al. [259] das Cortisol-Tagesprofil im Speichel von Schulkindern der Altersgruppe zwischen 10 und 14 Jahren bestimmt. Im Wesentlichen stimmen das Cortisol-Tagesprofil Jugendlicher [259] und Erwachsener [274] überein: kurz nach dem Aufwachen (ca. 1 h bei Erwachsenen; ca. 30 min bei Jugendlichen) erreicht der Cortisol-Spiegel im Speichel das Maximum. Im Vergleich zum Profil Erwachsener fällt der Cortisol-Spiegel bei Jugendlichen schneller (innerhalb der folgenden 2 h) ab als bei Erwachsenen und erreicht ca. 10 h nach dem Aufwachen den Minimalwert. Die Studie von Tzortzi et al. [259] zeigt darüber hinaus anschaulich, dass der individuelle Cortisol-Spiegel über den Tag durch physikalischen oder mentalen Stress Schwankungen unterliegt [126]. Dies hat für die Versuchsplanung entsprechende Konsequenzen, da die Angabe eines definierten Zeitabschnitts mit stabiler aber niedriger Speichel-Cortisol-Basislinie nicht möglich ist. Daher sollte zu jedem experimentellen Zeitpunkt die entsprechende Basissekretion vorher bestimmt werden [5, 307]. Ein weiterer objektivierbare Messgröße stellt die Aktivitätsbestimmung der  $\alpha$ -Amylase im Speichel (sAA) dar [33, 246]. In diesem Zusammenhang wird diskutiert, dass sAA eher als Indikator akuten Stresses dienen könnte und Langzeitstress eher über die Speichel-Cortisol-Konzentration bestimmt werden könnte [6]. Inwieweit die beiden Marker eine solche Differenzierung wirklich treffen können, ist weiteren Untersuchungen vorbehalten.

Auch ohne mechanische Belastung finden ständig Umbauprozesse im Knochen statt. Während Knochenbildung und Mineralisation primär den sekretorischen Osteoblasten und Osteozyten zuzuschreiben ist, wird die Knochenresorption indirekt durch die Aktivierung von Osteoklasten gesteuert [121, 252]. Osteoklasten-Aktivierung und damit Stimulation der Knochenresorption wird durch einige proinflammatorische Zytokine, Parathormon, 1,25-Dihydroxyvitamin-D<sub>3</sub> und Glucocorticoide, insbesondere Cortisol, reguliert [71]. Calcium- und Phosphat-Stoffwechsel der Knochen unterliegen ebenfalls einer hormonellen Steuerung u.a. durch Parathormon, Calcitonin und Fibroblastenwachstumsfaktor 23 [266, 275].

Eine erhöhte Cortisol-Konzentrationen inhibiert Osteoblasten-Proliferation und Differenzierung und beeinflusst Knochenhomöostase und Knochenumbau negativ [277]. Im Tierversuch führte mentaler Stress zu einer Abnahme der KZB und einer Reduktion in der Osteoklastenanzahl um die Zahnwurzel herum [179, 263]. Inwieweit sich diese Ergebnisse auf den Menschen übertragen

lassen ist noch nicht klar [277]. Möglicherweise könnte eine durch mentalen Stress ausgelöste inflammatorische Umgebung die Mechanotransduktion im Knochen verändern [142, 277].

Knochenumbau und Knochenremodellierung unterliegen ebenso einer circadianen Rhythmik [1, 60, 134, 248, 290] wie das Parodontalligament [105, 218] und z. B. der Zahndurchbruch [204]. An der Steuerung der Differenzierung und Proliferation von Osteoblasten und Osteoklasten sind primäre *Clock*-Gene (u. a. *BMAL1*, *CLOCK*, *PER1* und *PER2*) beteiligt [248, 281]. Die Expression von Marker-Genen der Osteoblasten-Differenzierung, wie z. B. Kollagen 1, alkalische Phosphatase und *RUNX2*, ebenso wie Osteoklasten-spezifische Gene werden durch diurnale Rhythmen gesteuert [219, 290, 308]. Glucocorticoide wie Cortisol oder *in vitro* Dexamethason triggern *Clock*-Gene in Osteoblasten [1, 60, 134]. Eine Erhöhung des Glucocorticoid-Spiegels z. B. durch Medikamente oder durch andauernden mentalem Stress dagegen vermindert oder verhindert Osteoklastogenese und damit Knochenumbau [124, 304] und beeinflusst damit auch die kieferorthopädische Zahnbewegung negativ [131, 179, 207].

### 3.4 Zusammenfassung und Ausblick

Mit den beiden hier vorgestellten Studien zur Genotyp-Phänotyp-Korrelation bei Dysostosis cleidocranialis [17-19] wurde das Mutationsspektrum im *RUNX2*-Gen wesentlich erweitert. Um die phänotypischen Charakteristika der CCD-Patienten besser einordnen und statistisch auswerten zu können, wurde zusätzlich ein systematischer, einheitlicher Befundkatalog mit eindeutigen Kategorien entwickelt. Auf dieser Basis konnte gezeigt werden, dass eine Korrelation zwischen Mutationstyp und Lokalisation der Mutation existiert.

Nach dem Erscheinen beider Publikationen hat sich durch die Anwendung neuer Mutations-Screening-Methoden und die Entdeckung weiterer Genregulationsmechanismen der Knochenentwicklung und Knochenremodellierung im Allgemeinen und *RUNX2* im speziellen eine rasante Entwicklung ergeben. Ebenfalls sind weitere, vielversprechende Ansätze zur Genotyp-Phänotyp-Korrelation bei CCD-Patienten publiziert worden. Die Heterogenität im klinischen Befundbericht vermindern aber die Vergleichbarkeit untereinander. Hier wäre ein systematischer, einheitlicher Befundkatalog mit eindeutigen Kategorien und einer auch endokrinologische Parameter [30, 47, 247] umfassenden Befunderhebung von Vorteil, möglicherweise auf der Basis der von Baumert et al. [17] verwendeten Kategorien [237]. Epigenetische Kontrolle des *RUNX2*-Gens [87, 297] und das Auftreten von *Copy-Number*-Variationen erfordern eine Erweiterung des Genotypisierungs-Portfolios zur Detektion CCD-verursachender Mutationen.

Epigenetische Faktoren spielen bei der Osteoblasten-Differenzierung [86], dem durch mechanische Kräfte induzierten Knochenumbau [271], der Glucocorticoid-induzierte Osteoklasten-Differenzierung [233] und der durch diurnale Rhythmik-gesteuerten Genexpression [53] eine wichtige Rolle. Diese wäre daher sowohl bei der Genotypisierung von *RUNX2*-Mutationen als auch bei der Genexpressions-Analyse nach simulierter kieferorthopädischer Zahnbewegung zu berücksichtigen.

Zur Simulation der KZB wurden zwei *In-vitro*-Modelle der „Druckseite“ etabliert und wesentlich erweitert [20, 106, 107, 234, 235]. Mit dem Zentrifugations-Modell wurde die indirekte Co-Kultur eingeführt und eine Druckstress-induzierte interzelluläre, vermutlich parakrinen Kommunikation



zwischen HPDFs und HABOs gezeigt [234, 235], mit dem WAB-Modell die ersten 6 Tage einer KZB simuliert und damit die Anwendung des Modells wesentlich erweitert [106, 107].

Die Simulation der „Zugseite“ der KBZ wird aktuell im Labor etabliert und erste Untersuchungen zur Simulation einer fluiden Strömung und deren Auswirkungen auf HABOs und HPDFs wurden begonnen. Die Erweiterung des WAB-Modells in Richtung 3D-Kultur werden ebenso weiterverfolgt.

Um die Richtung der eingangs erwähnten „Biologisierung“ der KZB weiterzuverfolgen, ist die Etablierung einer alters- und geschlechtsspezifischer Zellkultur [176] ebenso in Vorbereitung wie die Genotypisierung der anonymisiert-gespendeten Zellen [48, 161-163, 165, 244, 283]. Damit wären Korrelationen zwischen Mechanotransduktion und spezifischen Polymorphismen (z. B. Assoziation zwischen *P2RX7*-Polymorphismen und externer, apikaler Wurzelresorption [22, 78]) möglich. Dies könnte Hinweise auf die bereits von Schwarz [230] betonten individuellen Unterschiede zwischen Patient und der Reaktion auf eine KZB geben und damit auf eine „biologisierte“, individuellere Therapie.

## 4 Literaturverzeichnis

1. Abe T, Sato T, Yoda T, Hoshi K (2019) The period circadian clock 2 gene responds to glucocorticoids and regulates osteogenic capacity. *Regen Ther* 11:199-206.
2. Åberg T, Cavender A, Gaikwad JS, Bronckers AL, Wang X, Waltimo-Sirén J, [...] D'Souza RN (2004) Phenotypic changes in dentition of Runx2 homozygote-null mutant mice. *J Histochem Cytochem* 52 (1):131-139.
3. Ach T, Baumert U, Morszeck C, Dahse R, Reichert TE, Driemel O (2007) Immunhistochemische Untersuchung des Kollagen-Typ-I-Gehalts der Gingiva bei *Dysostosis cleidocranialis* (Immunohistochemical study on collagen I content in the gingiva in cleidocranial dysplasia). *Mund Kiefer Gesichtschir* 11 (6):349-354.
4. Agrawal A, Gartland A (2015) P2X7 receptors: role in bone cell formation and function. *J Mol Endocrinol* 54 (2):R75-88.
5. Aksoy A, Cesur MG, Dagdeviren BH, Ozkaynak YA, Karacin G, Gultekin F (2019) Assessment of Pain, Anxiety, and Cortisol Levels During the Initial Aligning Phase of Fixed Orthodontic Treatment. *Turk J Orthod* 32 (1):34-40.
6. AlMaummar M, AlThabit HO, Pani S (2019) The impact of dental treatment and age on salivary cortisol and alpha-amylase levels of patients with varying degrees of dental anxiety. *BMC Oral Health* 19 (1):211.
7. Avela C, Hirvinen H, Ben Amor M, Rauch F (2014) Metaphyseal dysplasia with maxillary hypoplasia and brachydactyly in a Finnish woman: first confirmation of a duplication in RUNX2 as pathogenic variant. *Eur J Med Genet* 57 (11-12):617-620.
8. Bahrami S, Drablos F (2016) Gene regulation in the immediate-early response process. *Adv Biol Regul* 62:37-49.
9. Bai Y, Bai Y, Matsuzaka K, Hashimoto S, Fukuyama T, Wu L, [...] Inoue T (2011) Cementum- and periodontal ligament-like tissue formation by dental follicle cell sheets co-cultured with Hertwig's epithelial root sheath cells. *Bone* 48 (6):1417-1426.
10. Baker PJ, Dixon M, Evans RT, Dufour L, Johnson E, Roopenian DC (1999) CD4<sup>+</sup> T cells and the proinflammatory cytokines gamma interferon and interleukin-6 contribute to alveolar bone loss in mice. *Infect Immun* 67 (6):2804-2809.
11. Bakke M, Tuxen A, Thomsen CE, Bardow A, Alkjaer T, Jensen BR (2004) Salivary cortisol level, salivary flow rate, and masticatory muscle activity in response to acute mental stress: a comparison between aged and young women. *Gerontology* 50 (6):383-392.
12. Balioglu MB, Kargin D, Albayrak A, Atıcı Y (2018) The Treatment of Cleidocranial Dysostosis (Scheuthauer-Marie-Sainton Syndrome), a Rare Form of Skeletal Dysplasia, Accompanied by Spinal Deformities: A Review of the Literature and Two Case Reports. *Case Rep Orthop* 2018:4635761.
13. Balto K, Sasaki H, Stashenko P (2001) Interleukin-6 deficiency increases inflammatory bone destruction. *Infect Immun* 69 (2):744-750.
14. Banerjee C, Javed A, Choi JY, Green J, Rosen V, van Wijnen AJ, [...] Stein GS (2001) Differential regulation of the two principal Runx2/Cbfa1 n-terminal isoforms in response to bone morphogenetic protein-2 during development of the osteoblast phenotype. *Endocrinology* 142 (9):4026-4039.
15. Barnes GL, Hebert KE, Kamal M, Javed A, Einhorn TA, Lian JB, [...] Gerstenfeld LC (2004) Fidelity of Runx2 activity in breast cancer cells is required for the generation of metastases-associated osteolytic disease. *Cancer Res* 64 (13):4506-4513.
16. Basdra EK, Papavassiliou AG, Huber LA (1995) Rab and rho GTPases are involved in specific response of periodontal ligament fibroblasts to mechanical stretching. *Biochim Biophys Acta* 1268 (2):209-213.
17. Baumert U, Golan I, Redlich M, Akinin JJ, Muessig D (2005) Cleidocranial dysplasia: molecular genetic analysis and phenotypic-based description of a Middle European patient group. *American Journal of Medical Genetics A* 139 (2):78-85.
18. Baumert U, Golan I, Redlich M, Akinin JJ, Muessig D (2006) Clarification of data reported in "Cleidocranial Dysplasia: Molecular Genetic Analysis and Phenotypic-Based Description of a Middle European Patient Group" (AJMG 139A:78-85). *American Journal of Medical Genetics A* 140 (9):1030.
19. Baumert U, Golan I, Driemel O, Reichert TE, Reicheneder C, Muessig D, Rose E (2006) Dysostosis cleidocranialis. Beschreibung und Analyse einer Patientengruppe. *Mund Kiefer Gesichtschir* 10 (6):385-393.
20. Baumert U, Golan I, Becker B, Hrala BP, Redlich M, Roos HA, [...] Müßig D (2004) Pressure simulation of orthodontic force in osteoblasts: a pilot study. *Orthod Craniofac Res* 7 (1):3-9.
21. Benjakul S, Jitpukdeebodindra S, Leethanakul C (2018) Effects of low magnitude high frequency mechanical vibration combined with compressive force on human periodontal ligament cells *in vitro*. *Eur J Orthod* 40 (4):356-363.
22. Borilova Linhartova P, Cernochova P, Kastovsky J, Vrankova Z, Sirotkova M, Izakovicova Holla L (2017) Genetic determinants and postorthodontic external apical root resorption in Czech children. *Oral Dis* 23 (1):29-35.
23. Bourdeau A, Faughnan ME, McDonald ML, Paterson AD, Wanless IR, Letarte M (2001) Potential role of modifier genes influencing transforming growth factor-beta1 levels in the development of vascular defects in endoglin heterozygous mice with hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Am J Pathol* 158 (6):2011-2020.
24. Brand HS (1999) Anxiety and cortisol excretion correlate prior to dental treatment. *Int Dent J* 49 (6):330-336.
25. Brändström H, Jonsson KB, Ohlsson C, Vidal O, Ljunghall S, Ljunggren Ö (1998) Regulation of osteoprotegerin mRNA levels by prostaglandin E<sub>2</sub> in human bone marrow stroma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 247 (2):338-341.
26. Bronckers AL, Engelse MA, Cavender A, Gaikwad J, D'Souza RN (2001) Cell-specific patterns of Cbfa1 mRNA and protein expression in postnatal murine dental tissues. *Mech Dev* 101 (1-2):255-258.
27. Bruderer M, Richards RG, Alini M, Stoddart MJ (2014) Role and regulation of RUNX2 in osteogenesis. *Eur Cell Mater* 28:269-286.
28. Bufalino A, Paranaiba LM, Gouvea AF, Gueiros LA, Martelli-Junior H, Junior JJ, [...] Coletta RD (2012)

- Cleidocranial dysplasia: oral features and genetic analysis of 11 patients. *Oral Dis* 18 (2):184-190.
29. Bustin SA, Beaulieu JF, Huggett J, Jaggi R, Kibenge FS, Olsvik PA, [...] Toegel S (2010) MIQE précis: Practical implementation of minimum standard guidelines for fluorescence-based quantitative real-time PCR experiments. *BMC Mol Biol* 11:74.
  30. Camtosun E, Akinci A, Demiral E, Tekedereli I, Sigirci A (2019) A Case of Cleidocranial Dysplasia with a Novel Mutation and Growth Velocity Gain with Growth Hormone Treatment. *J Clin Res Pediatr Endocrinol* 11 (3):301-305.
  31. Carmeliet G, Bouillon R (1999) The effect of microgravity on morphology and gene expression of osteoblasts *in vitro*. *FASEB J* 13 Suppl:S129-134.
  32. Casa MA, Faltin RM, Faltin K, Sander FG, Arana-Chavez VE (2001) Root resorptions in upper first premolars after application of continuous torque moment. Intra-individual study. *J Orofac Orthop* 62 (4):285-295.
  33. Chaturvedi Y, Chaturvedi S, Marwah N, Chaturvedi S, Agarwal S, Agarwal N (2018) Salivary Cortisol and Alpha-amylase-Biomarkers of Stress in Children undergoing Extraction: An *in vivo* Study. *Int J Clin Pediatr Dent* 11 (3):214-218.
  34. Chen S, Ye X, Yu X, Xu Q, Pan K, Lu S, Yang P (2015) Co-culture with periodontal ligament stem cells enhanced osteoblastic differentiation of MC3T3-E1 cells and osteoclastic differentiation of RAW264.7 cells. *Int J Clin Exp Pathol* 8 (11):14596-14607.
  35. Chen W, Ma J, Zhu G, Jules J, Wu M, McConnell M, [...] Li YP (2014) *Cbfb* deletion in mice recapitulates cleidocranial dysplasia and reveals multiple functions of *Cbfb* required for skeletal development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111 (23):8482-8487.
  36. Chiappelli F, Iribarren FJ, Prolo P (2006) Salivary biomarkers in psychobiological medicine. *Bioinformatics* 1 (8):331-334.
  37. Cola C, Almeida M, Li D, Romeo F, Mehta JL (2004) Regulatory role of endothelium in the expression of genes affecting arterial calcification. *Biochem Biophys Res Commun* 320 (2):424-427.
  38. Collo G, Neidhart S, Kawashima E, Kosco-Vilbois M, North RA, Buell G (1997) Tissue distribution of the P2X7 receptor. *Neuropharmacology* 36 (9):1277-1283.
  39. Cooper SC, Flaitz CM, Johnston DA, Lee B, Hecht JT (2001) A natural history of cleidocranial dysplasia. *Am J Med Genet* 104 (1):1-6.
  40. Counts AL, Rohrer MD, Prasad H, Bolen P (2001) An assessment of root cementum in cleidocranial dysplasia. *Angle Orthod* 71 (4):293-298.
  41. D'Souza RN, Åberg T, Gaikwad J, Cavender A, Owen M, Karsenty G, Thesleff I (1999) *Cbfa1* is required for epithelial-mesenchymal interactions regulating tooth development in mice. *Development* 126 (13):2911-2920.
  42. Danciu TE, Adam RM, Naruse K, Freeman MR, Hauschka PV (2003) Calcium regulates the PI3K-Akt pathway in stretched osteoblasts. *FEBS Lett* 536 (1-3):193-197.
  43. Davidovitch Z (1991) Tooth movement. *Crit Rev Oral Biol Med* 2 (4):411-450.
  44. Davidovitch Z, Krishnan V (2015) Biological basis of orthodontic tooth movement : an historical perspective. In: Krishnan V, Davidovitch Z (eds) *Biological Mechanisms of Tooth Movement*. Wiley, Chichester, West Sussex, UK, pp 3-14.
  45. De Benedetti F, Rucci N, Del Fattore A, Peruzzi B, Paro R, Longo M, [...] Teti A (2006) Impaired skeletal development in interleukin-6-transgenic mice: a model for the impact of chronic inflammation on the growing skeletal system. *Arthritis Rheum* 54 (11):3551-3563.
  46. Dewey CF, Jr., Bussolari SR, Gimbrone MA, Jr., Davies PF (1981) The dynamic response of vascular endothelial cells to fluid shear stress. *J Biomech Eng* 103 (3):177-185.
  47. Dinçsoy Bir F, Dinçkan N, Güven Y, Baş F, Altunoğlu U, Kuvvetli SS, [...] Uyguner ZO (2017) Cleidocranial dysplasia: Clinical, endocrinologic and molecular findings in 15 patients from 11 families. *Eur J Med Genet* 60 (3):163-168.
  48. Ding B, Li C, Xuan K, Liu N, Tang L, Liu Y, [...] Jin Y (2013) The effect of the cleidocranial dysplasia-related novel 1116\_1119insC mutation in the *RUNX2* gene on the biological function of mesenchymal cells. *Eur J Med Genet* 56 (4):180-187.
  49. Dixon DL, Barr HA, Bersten AD, Doyle IR (2008) Intracellular storage of surfactant and proinflammatory cytokines in co-cultured alveolar epithelium and macrophages in response to increasing CO<sub>2</sub> and cyclic cell stretch. *Exp Lung Res* 34 (1):37-47.
  50. Dolan EB, Verbruggen SW, Rolfe RA (2018) Techniques for studying mechanobiology. In: Verbruggen SW (ed) *Mechanobiology in Health and Disease*. Academic Press, London, pp 1-53.
  51. Drissi H, Luc Q, Shakoori R, Chuva De Sousa Lopes S, Choi JY, Terry A, [...] Stein GS (2000) Transcriptional autoregulation of the bone related *CBFA1/RUNX2* gene. *J Cell Physiol* 184 (3):341-350.
  52. Du J, Yuan Z, Ma Z, Song J, Xie X, Chen Y (2014) KEGG-PATH: Kyoto encyclopedia of genes and genomes-based pathway analysis using a path analysis model. *Molecular bioSystems* 10 (9):2441-2447.
  53. Du S, Chen L, Ge L, Huang W (2019) A Novel Loop: Mutual Regulation Between Epigenetic Modification and the Circadian Clock. *Front Plant Sci* 10:22.
  54. Ducy P (2000) *Cbfa1*: a molecular switch in osteoblast biology. *Dev Dyn* 219 (4):461-471.
  55. Ducy P, Starbuck M, Priemel M, Shen J, Pinero G, Geoffroy V, [...] Karsenty G (1999) A *Cbfa1*-dependent genetic pathway controls bone formation beyond embryonic development. *Genes Dev* 13 (8):1025-1036.
  56. Faltin RM, Faltin K, Sander FG, Arana-Chavez VE (2001) Ultrastructure of cementum and periodontal ligament after continuous intrusion in humans: a transmission electron microscopy study. *Eur J Orthod* 23 (1):35-49.
  57. Faltin RM, Arana-Chavez VE, Faltin K, Sander FG, Wichelhaus A (1998) Root resorptions in upper first premolars after application of continuous intrusive forces. Intra-individual study. *J Orofac Orthop* 59 (4):208-219.
  58. Fernandes LM, Øgaard B, Skoglund L (1998) Pain and discomfort experienced after placement of a conventional or a superelastic NiTi aligning archwire. A randomized clinical trial. *J Orofac Orthop* 59 (6):331-339.
  59. Fitzgerald J, Hughes-Fulford M (1999) Mechanically induced *c-fos* expression is mediated by cAMP in MC3T3-E1 osteoblasts. *FASEB J* 13 (3):553-557.

60. Fujihara Y, Kondo H, Noguchi T, Togari A (2014) Glucocorticoids mediate circadian timing in peripheral osteoclasts resulting in the circadian expression rhythm of osteoclast-related genes. *Bone* 61:1-9.
61. Gao X, Li K, Fan Y, Sun Y, Luo X, Wang L, [...] Yu Y (2019) Identification of *RUNX2* variants associated with cleidocranial dysplasia. *Hereditas* 156:31.
62. Garg RK, Agrawal P (2008) Clinical spectrum of cleidocranial dysplasia: a case report. *Cases J* 1 (1):377.
63. Golan I, Baumert U, Hrala BP, Müßig D (2003) Dentomaxillofacial variability of cleidocranial dysplasia: clinicoradiological presentation and systematic review. *Dentomaxillofac Radiol* 32 (6):347-354.
64. Golan I, Baumert U, Hrala BP, Müßig D (2004) Early craniofacial signs of cleidocranial dysplasia. *Int J Paediatr Dent* 14 (1):49-53.
65. Golan I, Baumert U, Held P, Feuerbach S, Müßig D (2002) Radiological findings and molecular genetic confirmation of cleidocranial dysplasia. *Clin Radiol* 57 (6):525-529.
66. Golan I, Waldeck A, Baumert U, Strutz J, Mussig D (2004) Schädelanomalien bei Dysostosis cleidocranialis. Eine HNO-ärztliche und kraniofaziale Röntgenstudie. *HNO* 52 (12):1061-1066.
67. Golan I, Preising M, Wagener H, Baumert U, Niederdelmann H, Lorenz B, Müßig D (2000) A novel missense mutation of the *CBFA1* gene in a family with cleidocranial dysplasia (CCD) and variable expressivity. *J Craniofac Genet Dev Biol* 20 (3):113-120.
68. Golan I, Baumert U, Wagener H, Preising M, Lorenz B, Niederdelmann H, Müßig D (2002) Evidence of intrafamilial variability of *CBFA1/RUNX2* expression in cleidocranial dysplasia - a family study. *J Orofac Orthop* 63 (3):190-198.
69. Golan I, Baumert U, Wagener H, Dauwese J, Preising M, Lorenz B, [...] Müßig D (2002) Atypical expression of cleidocranial dysplasia: clinical and molecular-genetic analysis. *Orthod Craniofac Res* 5 (4):243-249.
70. Gomathi K, Akshaya N, Srinaath N, Moorthi A, Selvamurugan N (2020) Regulation of *Runx2* by post-translational modifications in osteoblast differentiation. *Life Sci* 245:117389.
71. Gonciulea A, de Beur SJ (2015) The dynamic skeleton. *Rev Endocr Metab Disord* 16 (2):79-91.
72. Goodyer IM, Herbert J, Altham PM, Pearson J, Secher SM, Shiers HM (1996) Adrenal secretion during major depression in 8- to 16-year-olds. I. Altered diurnal rhythms in salivary cortisol and dehydroepiandrosterone (DHEA) at presentation. *Psychol Med* 26 (2):245-256.
73. Grant M, Wilson J, Rock P, Chapple I (2013) Induction of cytokines, MMP9, TIMPs, RANKL and OPG during orthodontic tooth movement. *Eur J Orthod* 35 (5):644-651.
74. Greives MR, Odessey EA, Waggoner DJ, Shenaq DS, Aradhya S, Mitchell A, [...] Reid RR (2013) *RUNX2* quadruplication: additional evidence toward a new form of syndromic craniosynostosis. *J Craniofac Surg* 24 (1):126-129.
75. Grimm S, Wolff E, Walter C, Pabst AM, Mundethu A, Jacobs C, [...] Jacobs C (2020) Influence of clodronate and compressive force on IL-1 $\alpha$ -stimulated human periodontal ligament fibroblasts. *Clin Oral Investig* 24 (1):343-350.
76. Gröschl M, Rauh M, Dörr HG (2003) Circadian rhythm of salivary cortisol, 17 $\alpha$ -hydroxyprogesterone, and progesterone in healthy children. *Clin Chem* 49 (10):1688-1691.
77. Gstraunthaler G, Lindl T (2013) Zell- und Gewebekultur; Allgemeine Grundlagen und spezielle Anwendungen. 7. Aufl. edn. Springer, Berlin, Heidelberg.
78. Gu BJ, Sluyter R, Skarratt KK, Shemon AN, Dao-Ung LP, Fuller SJ, [...] Wiley JS (2004) An Arg307 to Gln polymorphism within the ATP-binding site causes loss of function of the human P2X7 receptor. *J Biol Chem* 279 (30):31287-31295.
79. Gunnar MR, Bruce J, Hickman SE (2001) Salivary cortisol response to stress in children. *Adv Psychosom Med* 22:52-60.
80. Gutteling BM, de Weerth C, Buitelaar JK (2005) Prenatal stress and children's cortisol reaction to the first day of school. *Psychoneuroendocrinology* 30 (6):541-549.
81. Ha SW, Jung YJ, Bae HS, Ryoo HM, Cho IS, Baek SH (2018) Characterization of dental phenotype in patients with cleidocranial dysplasia using longitudinal data. *Angle Orthod* 88 (4):416-424.
82. Hacopian N, Nik TH, Ghahremani MH, Rahimi HR, Ostad SN (2011) Effects of continuous and interrupted forces on gene transcription in periodontal ligament cells in vitro. *Acta Med Iran* 49 (10):643-649.
83. Halal F, Picard JL, Raymond-Tremblay D, de Bosset P (1982) Metaphyseal dysplasia with maxillary hypoplasia and brachydactyly. *Am J Med Genet* 13 (1):71-79.
84. Hashem AA, Claffey NM, O'Connell B (2006) Pain and anxiety following the placement of dental implants. *Int J Oral Maxillofac Implants* 21 (6):943-950.
85. Hashmi JA, Almatrafi A, Latif M, Nasir A, Basit S (2019) An 18 bps in-frame deletion mutation in *RUNX2* gene is a population polymorphism rather than a pathogenic variant. *Eur J Med Genet* 62 (2):124-128.
86. Hassan MQ, Tye CE, Stein GS, Lian JB (2015) Non-coding RNAs: Epigenetic regulators of bone development and homeostasis. *Bone* 81:746-756.
87. Hassan MQ, Gordon JA, Beloti MM, Croce CM, van Wijnen AJ, Stein JL, [...] Lian JB (2010) A network connecting *Runx2*, *SATB2*, and the miR-23a~27a~24-2 cluster regulates the osteoblast differentiation program. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107 (46):19879-19884.
88. Hatherell K, Couraud PO, Romero IA, Weksler B, Pilkington GJ (2011) Development of a three-dimensional, all-human *in vitro* model of the blood-brain barrier using mono-, co-, and tri-cultivation Transwell models. *J Neurosci Methods* 199 (2):223-229.
89. Hess J, Angel P, Schorpp-Kistner M (2004) AP-1 subunits: quarrel and harmony among siblings. *J Cell Sci* 117 (Pt 25):5965-5973.
90. Hipskind RA, Bilbe G (1998) MAP kinase signaling cascades and gene expression in osteoblasts. *Front Biosci* 3:d804-816.
91. Hohmann A, Wolfram U, Geiger M, Boryor A, Kober C, Sander C, Sander FG (2009) Correspondences of hydrostatic pressure in periodontal ligament with regions of root resorption: a clinical and a finite element study of the same human teeth. *Computer*

- Methods and Programs in Biomedicine 93 (2):155-161.
92. Hohmann A, Wolfram U, Geiger M, Boryor A, Sander C, Faltin R, [...] Sander FG (2007) Periodontal ligament hydrostatic pressure with areas of root resorption after application of a continuous torque moment. *Angle Orthod* 77 (4):653-659.
  93. Hong SY, Jeon YM, Lee HJ, Kim JG, Baek JA, Lee JC (2010) Activation of RhoA and FAK induces ERK-mediated osteopontin expression in mechanical force-subjected periodontal ligament fibroblasts. *Mol Cell Biochem* 335 (1-2):263-272.
  94. Hordyjewska E, Jaruga A, Kandzierski G, Tylzanowski P (2017) Novel Mutation of the RUNX2 Gene in Patients with Cleidocranial Dysplasia. *Mol Syndrom* 8 (5):253-260.
  95. Hordyjewska-Kowalczyk E, Sowinska-Seidler A, Olech EM, Socha M, Glazar R, Kruczek A, [...] Jamsheer A (2019) Functional analysis of novel RUNX2 mutations identified in patients with cleidocranial dysplasia. *Clin Genet* 96 (5):429-438.
  96. Hunter J (1778) *A Practical Treatise on the Diseases of the Teeth*. J. Johnson, London.
  97. Iglesias-Linares A, Hartsfield JK, Jr. (2017) Cellular and Molecular Pathways Leading to External Root Resorption. *J Dent Res* 96 (2):145-152.
  98. Imai S, Kaksonen M, Raulo E, Kinnunen T, Fages C, Meng X, [...] Rauvala H (1998) Osteoblast recruitment and bone formation enhanced by cell matrix-associated heparin-binding growth-associated molecule (HB-GAM). *J Cell Biol* 143 (4):1113-1128.
  99. Imai S, Heino TJ, Hienola A, Kurata K, Büki K, Matsusue Y, [...] Rauvala H (2009) Osteocyte-derived HB-GAM (pleiotrophin) is associated with bone formation and mechanical loading. *Bone* 44 (5):785-794.
  100. Ingber DE (1997) Tensegrity: the architectural basis of cellular mechanotransduction. *Annu Rev Physiol* 59:575-599.
  101. Inoue H, Nakamura O, Duan Y, Hiraki Y, Sakuda M (1993) Effect of centrifugal force on growth of mouse osteoblastic MC3T3-E1 cells *in vitro*. *J Dent Res* 72 (9):1351-1355.
  102. Ito Y (2004) Oncogenic potential of the RUNX gene family: 'overview'. *Oncogene* 23 (24):4198-4208.
  103. Jacobs C, Walter C, Ziebart T, Grimm S, Meila D, Krieger E, Wehrbein H (2014) Induction of IL-6 and MMP-8 in human periodontal fibroblasts by static tensile strain. *Clin Oral Investig* 18 (3):901-908.
  104. Jäger A, Heim N, Kramer FJ, Setiawan M, Peitz M, Konermann A (2020) A novel serum-free medium for the isolation, expansion and maintenance of stemness and tissue-specific markers of primary human periodontal ligament cells. *Ann Anat*:151517.
  105. Janjic K, Kurzmann C, Moritz A, Agis H (2017) Expression of circadian core clock genes in fibroblasts of human gingiva and periodontal ligament is modulated by L-Mimosine and hypoxia in monolayer and spheroid cultures. *Arch Oral Biol* 79:95-99.
  106. Janjic M, Docheva D, Trickovic Janjic O, Wichelhaus A, Baumert U (2018) *In vitro* weight-loaded cell models for understanding mechanodependent molecular pathways involved in orthodontic tooth movement: a systematic review. *Stem Cells International* 2018:3208285.
  107. Janjic Rankovic M, Docheva D, Wichelhaus A, Baumert U (2020) Effect of static compressive force on *in vitro* cultured PDL fibroblasts: monitoring of viability and gene expression over 6 days. *Clin Oral Investig* 24 (7):2497-2511.
  108. Jaruga A, Hordyjewska E, Kandzierski G, Tylzanowski P (2016) Cleidocranial dysplasia and RUNX2-clinical phenotype-genotype correlation. *Clin Genet* 90 (5):393-402.
  109. Jensen BL, Kreiborg S (1992) Dental treatment strategies in cleidocranial dysplasia. *Br Dent J* 172 (6):243-247.
  110. Jiang H, Sodek J, Karsenty G, Thomas H, Ranly D, Chen J (1999) Expression of core binding factor Osf2/Cbfa-1 and bone sialoprotein in tooth development. *Mech Dev* 81 (1-2):169-173.
  111. Jimenez MJ, Balbin M, López JM, Alvarez J, Komori T, López-Otin C (1999) Collagenase 3 is a target of Cbfa1, a transcription factor of the runt gene family involved in bone formation. *Mol Cell Biol* 19 (6):4431-4442.
  112. Jussila M, Thesleff I (2012) Signaling networks regulating tooth organogenesis and regeneration, and the specification of dental mesenchymal and epithelial cell lineages. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 4 (4):a008425.
  113. Kagoshima H, Shigesada K, Satake M, Ito Y, Miyoshi H, Ohki M, [...] Gergen P (1993) The Runt domain identifies a new family of heteromeric transcriptional regulators. *Trends Genet* 9 (10):338-341.
  114. Kanai K, Nohara H, Hanada K (1992) Initial effects of continuously applied compressive stress to human periodontal ligament fibroblasts. *Nippon Kyosei Shika Gakkai Zasshi (J Jpn Orthod Soc)* 51:153-163.
  115. Kang KL, Lee SW, Ahn YS, Kim SH, Kang YG (2013) Bioinformatic analysis of responsive genes in two-dimension and three-dimension cultured human periodontal ligament cells subjected to compressive stress. *J Periodontal Res* 48 (1):87-97.
  116. Kang YG, Nam JH, Kim KH, Lee KS (2010) FAK pathway regulates PGE<sub>2</sub> production in compressed periodontal ligament cells. *J Dent Res* 89 (12):1444-1449.
  117. Kanjanamekanant K, Luckprom P, Pavasant P (2013) Mechanical stress-induced interleukin-1beta expression through adenosine triphosphate/P2X7 receptor activation in human periodontal ligament cells. *J Periodontal Res* 48 (2):169-176.
  118. Kanjanamekanant K, Luckprom P, Pavasant P (2014) P2X7 receptor-Pannexin1 interaction mediates stress-induced interleukin-1 beta expression in human periodontal ligament cells. *J Periodontal Res* 49 (5):595-602.
  119. Kanzaki H, Chiba M, Shimizu Y, Mitani H (2002) Periodontal ligament cells under mechanical stress induce osteoclastogenesis by receptor activator of nuclear factor in  $\kappa$ B ligand up-regulation via prostaglandin E<sub>2</sub> synthesis. *J Bone Miner Res* 17 (2):210-220.
  120. Kariya T, Tanabe N, Shionome C, Manaka S, Kawato T, Zhao N, [...] Shimizu N (2015) Tension force-induced ATP promotes osteogenesis through P2X7 receptor in osteoblasts. *J Cell Biochem* 116 (1):12-21.
  121. Katsimbri P (2017) The biology of normal bone remodelling. *Eur J Cancer Care (Engl)* 26 (6).
  122. Khurshid Z, Mali M, Naseem M, Najeeb S, Zafar MS (2017) Human Gingival Crevicular Fluids (GCF) Proteomics: An Overview. *Dent J (Basel)* 5 (1).
  123. Kiess W, Meidert A, Dressendörfer RA, Schriever K, Kessler U, König A, [...] Strasburger CJ (1995) Salivary cortisol levels throughout childhood and

- adolescence: relation with age, pubertal stage, and weight. *Pediatr Res* 37 (4 Pt 1):502-506.
124. Kim HJ (2010) New understanding of glucocorticoid action in bone cells. *BMB Rep* 43 (8):524-529.
  125. Kim SJ, Park KH, Park YG, Lee SW, Kang YG (2013) Compressive stress induced the up-regulation of M-CSF, RANKL, TNF- $\alpha$  expression and the down-regulation of OPG expression in PDL cells via the integrin-FAK pathway. *Arch Oral Biol* 58 (6):707-716.
  126. Kirschbaum C, Hellhammer DH (1989) Salivary cortisol in psychobiological research: an overview. *Neuropsychobiology* 22 (3):150-169.
  127. Kirschneck C, Proff P, Maurer M, Reicheneder C, Römer P (2015) Orthodontic forces add to nicotine-induced loss of periodontal bone : An in vivo and in vitro study. *J Orofac Orthop* 76 (3):195-212.
  128. Kiso H, Takahashi K, Mishima S, Murashima-Suginami A, Kakeno A, Yamazaki T, [...] Bessho K (2019) Third dentition is the main cause of premolar supernumerary tooth formation. *J Dent Res* 98 (9):968-974.
  129. Klepac RK, Dowling J, Hauge G, McDonald M (1980) Reports of pain after dental treatment, electrical tooth pulp stimulation, and cutaneous shock. *J Am Dent Assoc* 100 (5):692-695.
  130. Kletsas D, Basdra EK, Papavassiliou AG (2002) Effect of protein kinase inhibitors on the stretch-elicited c-Fos and c-Jun up-regulation in human PDL osteoblast-like cells. *J Cell Physiol* 190 (3):313-321.
  131. Knop LAH, Shintcovsk RL, Retamoso LB, Grégio AMT, Tanaka O (2012) The action of corticosteroids on orthodontic tooth movement: a literature review. *Dental Press J Orthod* 17:20.e21-20.e25.
  132. Komori T (2010) Regulation of bone development and extracellular matrix protein genes by RUNX2. *Cell Tissue Res* 339 (1):189-195.
  133. Komori T, Yagi H, Nomura S, Yamaguchi A, Sasaki K, Deguchi K, [...] Kishimoto T (1997) Targeted disruption of *Cbfa1* results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts. *Cell* 89 (5):755-764.
  134. Komoto S, Kondo H, Fukuta O, Togari A (2012) Comparison of beta-adrenergic and glucocorticoid signaling on clock gene and osteoblast-related gene expressions in human osteoblast. *Chronobiol Int* 29 (1):66-74.
  135. Kook SH, Hwang JM, Park JS, Kim EM, Heo JS, Jeon YM, Lee JC (2009) Mechanical force induces type I collagen expression in human periodontal ligament fibroblasts through activation of ERK/JNK and AP-1. *J Cell Biochem* 106 (6):1060-1067.
  136. Kook SH, Son YO, Choe Y, Kim JH, Jeon YM, Heo JS, [...] Lee JC (2009) Mechanical force augments the anti-osteoclastogenic potential of human gingival fibroblasts in vitro. *J Periodontol Res* 44 (3):402-410.
  137. Koyama Y, Mitsui N, Suzuki N, Yanagisawa M, Sanuki R, Isokawa K, [...] Maeno M (2008) Effect of compressive force on the expression of inflammatory cytokines and their receptors in osteoblastic Saos-2 cells. *Arch Oral Biol* 53 (5):488-496.
  138. Kreiborg S, Jensen BL (2018) Tooth formation and eruption - lessons learnt from cleidocranial dysplasia. *Eur J Oral Sci* 126 Suppl 1:72-80.
  139. Kreiborg S, Jensen BL, Bjork A, Skieller V (1981) Abnormalities of the cranial base in cleidocranial dysostosis. *Am J Orthod* 79 (5):549-557.
  140. Krishnan V, Davidovitch Z (2006) Cellular, molecular, and tissue-level reactions to orthodontic force. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 129 (4):469 e461-432.
  141. Krishnan V, Park YG, Davidovitch Z (2009) Biology of orthodontic tooth movement: an overview. In: Krishnan V, Davidovitch Z (eds) *Biological Mechanisms of Tooth Movement*. Wiley-Blackwell, New York, pp 19-43.
  142. Kulkarni RN, Bakker AD, Everts V, Klein-Nulend J (2012) Mechanical loading prevents the stimulating effect of IL-1beta on osteocyte-modulated osteoclastogenesis. *Biochem Biophys Res Commun* 420 (1):11-16.
  143. Kunii R, Yamaguchi M, Tanimoto Y, Asano M, Yamada K, Goseki T, Kasai K (2013) Role of interleukin-6 in orthodontically induced inflammatory root resorption in humans. *Korean J Orthod* 43 (6):294-301.
  144. Kvam E, Gjerdet NR, Bondevik O (1987) Traumatic ulcers and pain during orthodontic treatment. *Community Dent Oral Epidemiol* 15 (2):104-107.
  145. Kwan Tat S, Padrines M, Theoleyre S, Heymann D, Fortun Y (2004) IL-6, RANKL, TNF-alpha/IL-1: interrelations in bone resorption pathophysiology. *Cytokine Growth Factor Rev* 15 (1):49-60.
  146. Kyriakis JM, Avruch J (2001) Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiol Rev* 81 (2):807-869.
  147. Lallier TE, Spencer A, Fowler MM (2005) Transcript profiling of periodontal fibroblasts and osteoblasts. *J Periodontol* 76 (7):1044-1055.
  148. Lane NE, Bloch DA, Jones HH, Marshall WH, Jr., Wood PD, Fries JF (1986) Long-distance running, bone density, and osteoarthritis. *JAMA* 255 (9):1147-1151.
  149. Leblanc AD, Schneider VS, Evans HJ, Engelbretson DA, Krebs JM (1990) Bone mineral loss and recovery after 17 weeks of bed rest. *J Bone Miner Res* 5 (8):843-850.
  150. Lee SY, Yoo HI, Kim SH (2015) CCR5-CCL axis in PDL during orthodontic biophysical force application. *J Dent Res* 94 (12):1715-1723.
  151. Levanon D, Negreanu V, Bernstein Y, Bar-Am I, Avivi L, Groner Y (1994) AML1, AML2, and AML3, the human members of the *runt domain* gene-family: cDNA structure, expression, and chromosomal localization. *Genomics* 23 (2):425-432.
  152. Lew KK (1993) Attitudes and perceptions of adults towards orthodontic treatment in an Asian community. *Community Dent Oral Epidemiol* 21 (1):31-35.
  153. Li J, Jiang L, Liao G, Chen G, Liu Y, Wang J, [...] Zhao Z (2009) Centrifugal forces within usually-used magnitude elicited a transitory and reversible change in proliferation and gene expression of osteoblastic cells UMR-106. *Mol Biol Rep* 36 (2):299-305.
  154. Li J, Wan Z, Liu H, Li H, Liu L, Li R, [...] Zhang X (2013) Osteoblasts subjected to mechanical strain inhibit osteoclastic differentiation and bone resorption in a co-culture system. *Ann Biomed Eng* 41 (10):2056-2066.
  155. Li M, Zhang C, Yang Y (2019) Effects of mechanical forces on osteogenesis and osteoclastogenesis in human periodontal ligament fibroblasts: A systematic review of in vitro studies. *Bone Joint Res* 8 (1):19-31.
  156. Li Y, Jacox LA, Little SH, Ko CC (2018) Orthodontic tooth movement: The biology and clinical implications. *Kaohsiung J Med Sci* 34 (4):207-214.

157. Li Y, Li M, Tan L, Huang S, Zhao L, Tang T, [...] Zhao Z (2013) Analysis of time-course gene expression profiles of a periodontal ligament tissue model under compression. *Arch Oral Biol* 58 (5):511-522.
158. Lian JB (2015) Epigenetic pathways regulating bone homeostasis. *Bone* 81:731-732.
159. Liao W, Okada M, Inami K, Hashimoto Y, Matsumoto N (2016) Cell survival and gene expression under compressive stress in a three-dimensional in vitro human periodontal ligament-like tissue model. *Cytotechnology* 68 (2):249-260.
160. Litt MD (1996) A model of pain and anxiety associated with acute stressors: distress in dental procedures. *Behav Res Ther* 34 (5-6):459-476.
161. Liu Y, Zhang X, Sun X, Wang X, Zhang C, Zheng S (2018) Abnormal bone remodelling activity of dental follicle cells from a cleidocranial dysplasia patient. *Oral Dis* 24 (7):1270-1281.
162. Liu Y, Sun X, Zhang X, Wang X, Zhang C, Zheng S (2019) RUNX2 mutation impairs osteogenic differentiation of dental follicle cells. *Arch Oral Biol* 97:156-164.
163. Liu Y, Wang Y, Sun X, Zhang X, Wang X, Zhang C, Zheng S (2018) RUNX2 mutation reduces osteogenic differentiation of dental follicle cells in cleidocranial dysplasia. *Mutagenesis* 33 (3):203-214.
164. Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method. *Methods* 25 (4):402-408.
165. Lossdörfer S, Abou Jamra B, Rath-Deschner B, Götz W, Abou Jamra R, Braumann B, Jäger A (2009) The role of periodontal ligament cells in delayed tooth eruption in patients with cleidocranial dysostosis. *J Orofac Orthop* 70 (6):495-510.
166. Lou Y, Javed A, Hussain S, Colby J, Frederick D, Pratap J, [...] Stein JL (2009) A Runx2 threshold for the cleidocranial dysplasia phenotype. *Hum Mol Genet* 18 (3):556-568.
167. Lubinsky M, Kantaputra PN (2016) Syndromes with supernumerary teeth. *Am J Med Genet A* 170 (10):2611-2616.
168. Lukinmaa PL, Jensen BL, Thesleff I, Andreasen JO, Kreiborg S (1995) Histological observations of teeth and periodontal tissues in cleidocranial dysplasia imply increased activity of odontogenic epithelium and abnormal bone remodeling. *J Craniofac Genet Dev Biol* 15 (4):212-221.
169. Ma D, Wang X, Guo J, Zhang J, Cai T (2018) Identification of a novel mutation of *RUNX2* in a family with supernumerary teeth and craniofacial dysplasia by whole-exome sequencing: a case report and literature review. *Medicine (Baltimore)* 97 (32):e11328.
170. Ma Y, Zhao F, Yu D (2019) Cleidocranial dysplasia syndrome with epilepsy: a case report. *BMC Pediatr* 19 (1):97.
171. Machol K, Mendoza-Londono R, Lee B (2006) Cleidocranial dysplasia spectrum disorder [Updated 2017 Nov 16]. *GeneReviews®* [Internet]. University of Washington, Seattle, Seattle, WA.
172. Machuca-Tzili L, Monroy-Jaramillo N, Gonzalez-del Angel A, Kofman-Alfaro S (2002) New mutations in the *CBFA1* gene in two Mexican patients with cleidocranial dysplasia. *Clin Genet* 61 (5):349-353.
173. Manjunath K, Kavitha B, Saraswathi TR, Sivapathasundharam B, Manikandhan R (2008) Cementum analysis in cleidocranial dysostosis. *Indian J Dent Res* 19 (3):253-256.
174. Marchesan JT, Scanlon CS, Soehren S, Matsuo M, Kapila YL (2011) Implications of cultured periodontal ligament cells for the clinical and experimental setting: a review. *Arch Oral Biol* 56 (10):933-943.
175. Matheny CJ, Speck ME, Cushing PR, Zhou Y, Corpora T, Regan M, [...] Speck NA (2007) Disease mutations in *RUNX1* and *RUNX2* create nonfunctional, dominant-negative, or hypomorphic alleles. *EMBO J* 26 (4):1163-1175.
176. Mayahara K, Kobayashi Y, Takimoto K, Suzuki N, Mitsui N, Shimizu N (2007) Aging stimulates cyclooxygenase-2 expression and prostaglandin  $E_2$  production in human periodontal ligament cells after the application of compressive force. *J Periodontol Res* 42 (1):8-14.
177. Mefford HC, Shafer N, Antonacci F, Tsai JM, Park SS, Hing AV, [...] Cunningham ML (2010) Copy number variation analysis in single-suture craniosynostosis: multiple rare variants including *RUNX2* duplication in two cousins with metopic craniosynostosis. *Am J Med Genet A* 152A (9):2203-2210.
178. Merametdjian L, Prud'Homme T, Le Caignec C, Isidor B, Lopez-Cazaux S (2019) Oro-dental phenotype in patients with *RUNX2* duplication. *Eur J Med Genet* 62 (2):85-89.
179. Mirzakouchaki B, Firoozi F, Shahrabaf S (2011) Effect of psychological stress on orthodontic tooth movement in rats. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 16 (2):e285-291.
180. Mitsuhashi M, Yamaguchi M, Kojima T, Nakajima R, Kasai K (2011) Effects of HSP70 on the compression force-induced TNF- $\alpha$  and RANKL expression in human periodontal ligament cells. *Inflamm Res* 60 (2):187-194.
181. Miyazaki T, Kanatani N, Rokutanda S, Yoshida C, Toyosawa S, Nakamura R, [...] Komori T (2008) Inhibition of the terminal differentiation of odontoblasts and their transdifferentiation into osteoblasts in *Runx2* transgenic mice. *Arch Histol Cytol* 71 (2):131-146.
182. Mizuhara M, Kometani-Gunjigake K, Nakao-Kuroishi K, Toyono T, Hitomi S, Morii A, [...] Kawamoto T (2020) Vesicular nucleotide transporter mediates adenosine triphosphate release in compressed human periodontal ligament fibroblast cells and participates in tooth movement-induced nociception in rats. *Arch Oral Biol* 110:104607.
183. Moffatt P, Ben Amor M, Glorieux FH, Roschger P, Klaushofer K, Schwartzentruber JA, [...] Rauch F (2013) Metaphyseal dysplasia with maxillary hypoplasia and brachydactyly is caused by a duplication in *RUNX2*. *Am J Hum Genet* 92 (2):252-258.
184. Moher D, Shamseer L, Clarke M, Ghersi D, Liberati A, Petticrew M, [...] PRISMA-P Group (2015) Preferred reporting items for systematic review and meta-analysis protocols (PRISMA-P) 2015 statement. *Systematic Reviews* 4:1.
185. Montecino M, Stein G, Stein J, Zaidi K, Aguilar R (2015) Multiple levels of epigenetic control for bone biology and pathology. *Bone* 81:733-738.
186. Morikawa T, Matsuzaka K, Nakajima K, Yasumura T, Sueishi K, Inoue T (2016) Dental pulp cells promote the expression of receptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B ligand, prostaglandin  $E_2$  and substance P in mechanically stressed periodontal ligament cells. *Arch Oral Biol* 70:158-164.

187. Mundlos S (1999) Cleidocranial dysplasia: clinical and molecular genetics. *J Med Genet* 36 (3):177-182.
188. Mundlos S, Otto F, Mundlos C, Mulliken JB, Aylsworth AS, Albright S, [...] Olsen BR (1997) Mutations involving the transcription factor CBFA1 cause cleidocranial dysplasia. *Cell* 89 (5):773-779.
189. Nanci A, Bosshardt DD (2006) Structure of periodontal tissues in health and disease. *Periodontol* 2000 40:11-28.
190. Nieminen P (2009) Genetic basis of tooth agenesis. *J Exp Zool B Mol Dev Evol* 312B (4):320-342.
191. Norman AW, Henry HL (2015) *Hormones*. 3rd edn. Elsevier, Amsterdam.
192. Ooë T (1969) Epithelial anlagen of human third dentition and their migrations in the mandible and maxilla. *Okajimas Folia Anat Jpn* 46 (5):243-251.
193. Osta B, Benedetti G, Miossec P (2014) Classical and paradoxical effects of TNF- $\alpha$  on bone homeostasis. *Front Immunol* 5:48.
194. Ott CE, Leschik G, Trotier F, Brueton L, Brunner HG, Brussel W, [...] Klopocki E (2010) Deletions of the RUNX2 gene are present in about 10% of individuals with cleidocranial dysplasia. *Hum Mutat* 31 (8):E1587-1593.
195. Otto F, Kanegane H, Mundlos S (2002) Mutations in the RUNX2 gene in patients with cleidocranial dysplasia. *Hum Mutat* 19 (3):209-216.
196. Otto F, Thornell AP, Crompton T, Denzel A, Gilmour KC, Rosewell IR, [...] Owen MJ (1997) Cbfa1, a candidate gene for cleidocranial dysplasia syndrome, is essential for osteoblast differentiation and bone development. *Cell* 89 (5):765-771.
197. Ozawa H, Imamura K, Abe E, Takahashi N, Hiraide T, Shibasaki Y, [...] Suda T (1990) Effect of a continuously applied compressive pressure on mouse osteoblast-like cells (MC3T3-E1) in vitro. *J Cell Physiol* 142 (1):177-185.
198. Pan CY, Tseng YC, Lan TH, Chang HP (2017) Craniofacial features of cleidocranial dysplasia. *J Dent Sci* 12 (4):313-318.
199. Papadopoulou A, Iliadi A, Eliades T, Kletsas D (2017) Early responses of human periodontal ligament fibroblasts to cyclic and static mechanical stretching. *Eur J Orthod* 39 (3):258-263.
200. Peverali FA, Basdra EK, Papavassiliou AG (2001) Stretch-mediated activation of selective MAPK subtypes and potentiation of AP-1 binding in human osteoblastic cells. *Mol Med* 7 (1):68-78.
201. Pommerenke H, Schmidt C, Durr F, Nebe B, Luthen F, Muller P, Rychly J (2002) The mode of mechanical integrin stressing controls intracellular signaling in osteoblasts. *J Bone Miner Res* 17 (4):603-611.
202. Prader A (1981) Normales Wachstum und Wachstumsstörungen bei Kindern und Jugendlichen. *Klin Wochenschr* 1:977-984.
203. Proff P, Reicheneder C, Faltermeier A, Kubein-Meesenburg D, Römer P (2014) Effects of mechanical and bacterial stressors on cytokine and growth-factor expression in periodontal ligament cells. *J Orofac Orthop* 75 (3):191-202.
204. Proffit WR, Frazier-Bowers SA (2009) Mechanism and control of tooth eruption: overview and clinical implications. *Orthod Craniofac Res* 12 (2):59-66.
205. Pruessner JC, Wolf OT, Hellhammer DH, Buske-Kirschbaum A, von Auer K, Jobst S, [...] Kirschbaum C (1997) Free cortisol levels after awakening: a reliable biological marker for the assessment of adrenocortical activity. *Life Sci* 61 (26):2539-2549.
206. Qin X, Jiang Q, Miyazaki T, Komori T (2019) Runx2 regulates cranial suture closure by inducing hedgehog, Fgf, Wnt and Pthlh signaling pathway gene expressions in suture mesenchymal cells. *Hum Mol Genet* 28 (6):896-911.
207. Qin X, Li Q, Chen W, Bai Y, Baban B, Mao J (2019) The circadian expression of osteogenic factors in periodontal tissue loading mechanical force: new concepts of the personalized orthodontic care. *EPMA J* 10 (1):13-20.
208. Quack I, Vonderstrass B, Stock M, Aylsworth AS, Becker A, Brueton L, [...] Otto F (1999) Mutation analysis of core binding factor A1 in patients with cleidocranial dysplasia. *Am J Hum Genet* 65 (5):1268-1278.
209. Rabie AB, She TT, Hägg U (2003) Functional appliance therapy accelerates and enhances condylar growth. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 123 (1):40-48.
210. Rabie AB, Tsai MJ, Hägg U, Du X, Chou BW (2003) The correlation of replicating cells and osteogenesis in the condyle during stepwise advancement. *Angle Orthod* 73 (4):457-465.
211. Raisz LG, Simmons HA (1985) Effects of parathyroid hormone and cortisol on prostaglandin production by neonatal rat calvaria in vitro. *Endocr Res* 11 (1-2):59-74.
212. Redlich M, Palmon A, Zaks B, Geremi E, Rayzman S, Shoshan S (1998) The effect of centrifugal force on the transcription levels of collagen type I and collagenase in cultured canine gingival fibroblasts. *Arch Oral Biol* 43 (4):313-316.
213. Redlich M, Asher Roos H, Reichenberg E, Zaks B, Mussig D, Baumert U, [...] Palmon A (2004) Expression of tropoelastin in human periodontal ligament fibroblasts after simulation of orthodontic force. *Arch Oral Biol* 49 (2):119-124.
214. Redlich M, Roos H, Reichenberg E, Zaks B, Grosskop A, Bar Kana I, [...] Palmon A (2004) The effect of centrifugal force on mRNA levels of collagenase, collagen type-I, tissue inhibitors of metalloproteinases and  $\beta$ -actin in cultured human periodontal ligament fibroblasts. *J Periodontal Res* 39 (1):27-32.
215. Reitan K (1960) Tissue behavior during orthodontic tooth movement. *Am J Orthod* 46 (12):881-900.
216. Ritzman TB, Banovich N, Buss KP, Guida J, Rubel MA, Pinney J, [...] Stone AC (2017) Facing the facts: The Runx2 gene is associated with variation in facial morphology in primates. *J Hum Evol* 111:139-151.
217. Roberts T, Stephen L, Beighton P (2013) Cleidocranial dysplasia: a review of the dental, historical, and practical implications with an overview of the South African experience. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol* 115 (1):46-55.
218. Roberts WE, Morey ER (1985) Proliferation and differentiation sequence of osteoblast histogenesis under physiological conditions in rat periodontal ligament. *Am J Anat* 174 (2):105-118.
219. Robinson I, Reddy AB (2014) Molecular mechanisms of the circadian clockwork in mammals. *FEBS Lett* 588 (15):2477-2483.
220. Roelofsens J, Klein-Nulend J, Burger EH (1995) Mechanical stimulation by intermittent hydrostatic compression promotes bone-specific gene expression in vitro. *J Biomech* 28 (12):1493-1503.
221. Römer P, Köstler J, Koretsi V, Proff P (2013) Endotoxins potentiate COX-2 and RANKL



- expression in compressed PDL cells. *Clin Oral Investig* 17 (9):2041-2048.
222. Saika M, Ueyama T, Senba E (2000) Expression of immediate early genes, HSP70, and COX-2 mRNAs in rat stomach following ethanol ingestion. *Dig Dis Sci* 45 (12):2455-2462.
  223. Sandy JR, Meghji S, Harris M, Meikle MC, Farndale RW (1992) Internal and external signals from mechanically deformed osteoblasts: a unifying hypothesis. In: Davidovitch Z (ed) *The Biological Mechanisms of Tooth Movement and Craniofacial Adaptation*. The Ohio State University College of Dentistry, Columbus, Ohio, pp 231-239.
  224. Schaffer JL, Rizen M, L'Italien GJ, Benbrahim A, Megerman J, Gerstenfeld LC, Gray ML (1994) Device for the application of a dynamic biaxially uniform and isotropic strain to a flexible cell culture membrane. *J Orthop Res* 12 (5):709-719.
  225. Scheer FA, Buijs RM (1999) Light affects morning salivary cortisol in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 84 (9):3395-3398.
  226. Scheurer PA, Firestone AR, Burgin WB (1996) Perception of pain as a result of orthodontic treatment with fixed appliances. *Eur J Orthod* 18 (4):349-357.
  227. Schmidt-Reinwald A, Pruessner JC, Hellhammer DH, Federenko I, Rohleder N, Schürmeyer TH, Kirschbaum C (1999) The cortisol response to awakening in relation to different challenge tests and a 12-hour cortisol rhythm. *Life Sci* 64 (18):1653-1660.
  228. Schröder A, Bauer K, Spanier G, Proff P, Wolf M, Kirschneck C (2018) Expression kinetics of human periodontal ligament fibroblasts in the early phases of orthodontic tooth movement. *J Orofac Orthop* 79 (5):337-351.
  229. Schroeder TM, Jensen ED, Westendorf JJ (2005) *Runx2*: a master organizer of gene transcription in developing and maturing osteoblasts. *Birth Defects Res C Embryo Today* 75 (3):213-225.
  230. Schwarz AM (1932) Tissue changes incidental to orthodontic tooth movement. *International Journal of Orthodontia, Oral Surgery and Radiography* 18 (4):331-352.
  231. Seo BM, Miura M, Gronthos S, Bartold PM, Batouli S, Brahim J, [...] Shi S (2004) Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *Lancet* 364 (9429):149-155.
  232. Shen T, Qiu L, Chang H, Yang Y, Jian C, Xiong J, [...] Dong S (2014) Cyclic tension promotes osteogenic differentiation in human periodontal ligament stem cells. *Int J Clin Exp Pathol* 7 (11):7872-7880.
  233. Shi C, Qi J, Huang P, Jiang M, Zhou Q, Zhou H, [...] Deng L (2014) MicroRNA-17/20a inhibits glucocorticoid-induced osteoclast differentiation and function through targeting RANKL expression in osteoblast cells. *Bone* 68:67-75.
  234. Shi J, Baumert U, Folwaczny M, Wichelhaus A (2019) Influence of static forces on the expression of selected parameters of inflammation in periodontal ligament cells and alveolar bone cells in a co-culture in vitro model. *Clin Oral Investig* 23 (6):2617-2628.
  235. Shi J, Folwaczny M, Wichelhaus A, Baumert U (2019) Differences in *RUNX2* and *P2RX7* gene expression between mono- and coculture of human periodontal ligament cells and human osteoblasts under compressive force application. *Orthod Craniofac Res* 22 (3):168-176.
  236. Shimizu N, Ozawa Y, Yamaguchi M, Goseki T, Ohzeki K, Abiko Y (1998) Induction of COX-2 expression by mechanical tension force in human periodontal ligament cells. *J Periodontol* 69 (6):670-677.
  237. Singh A, Goswami M, Pradhan G, Han MS, Choi JY, Kapoor S (2015) Cleidocranial dysplasia with normal clavicles: a report of a novel genotype and a review of seven previous cases. *Mol Syndromol* 6 (2):83-86.
  238. Song C, Wang J, Kim B, Lu C, Zhang Z, Liu H, [...] Li F (2018) Insights into the Role of Circadian Rhythms in Bone Metabolism: A Promising Intervention Target? *Biomed Res Int* 2018:9156478.
  239. Soo-Quee Koh D, Choon-Huat Koh G (2007) The use of salivary biomarkers in occupational and environmental medicine. *Occup Environ Med* 64 (3):202-210.
  240. Stanford CM, Stevens JW, Brand RA (1995) Cellular deformation reversibly depresses RT-PCR detectable levels of bone-related mRNA. *J Biomech* 28 (12):1419-1427.
  241. Suda N, Hamada T, Hattori M, Torii C, Kosaki K, Moriyama K (2007) Diversity of supernumerary tooth formation in siblings with cleidocranial dysplasia having identical mutation in *RUNX2*: possible involvement of non-genetic or epigenetic regulation. *Orthod Craniofac Res* 10 (4):222-225.
  242. Suda N, Hattori M, Kosaki K, Banshodani A, Kozai K, Tanimoto K, Moriyama K (2010) Correlation between genotype and supernumerary tooth formation in cleidocranial dysplasia. *Orthod Craniofac Res* 13 (4):197-202.
  243. Suhailiza S, Kannan TP, Sarliza Yasmin S (2019) Genetic basis of supernumerary tooth. *J Biomed Clin Sci* 4 (1):8.
  244. Sun X, Wang X, Zhang C, Liu Y, Yang X, Yan W, [...] Zheng S (2016) *RUNX2* mutation impairs bone remodelling of dental follicle cells and periodontal ligament cells in patients with cleidocranial dysplasia. *Mutagenesis* 31 (6):677-685.
  245. Szklarczyk D, Morris JH, Cook H, Kuhn M, Wyder S, Simonovic M, [...] von Mering C (2017) The STRING database in 2017: quality-controlled protein-protein association networks, made broadly accessible. *Nucleic Acids Res* 45 (D1):D362-d368.
  246. Takai N, Yamaguchi M, Aragaki T, Eto K, Uchihashi K, Nishikawa Y (2004) Effect of psychological stress on the salivary cortisol and amylase levels in healthy young adults. *Arch Oral Biol* 49 (12):963-968.
  247. Takaki N, Mori J, Matsuo S, Osamura T, Michigami T (2020) Cleidocranial dysplasia with growth hormone deficiency: a case report. *BMC Pediatr* 20 (1):19.
  248. Takarada T, Xu C, Ochi H, Nakazato R, Yamada D, Nakamura S, [...] Hinoi E (2017) Bone resorption is regulated by circadian clock in osteoblasts. *J Bone Miner Res* 32 (4):872-881.
  249. Talmage RV, Stinnett SS, Landwehr JT, Vincent LM, McCartney WH (1986) Age-related loss of bone mineral density in non-athletic and athletic women. *Bone Miner* 1 (2):115-125.
  250. Tan SD, Kuijpers-Jagtman AM, Semeins CM, Bronckers AL, Maltha JC, Von den Hoff JW, [...] Klein-Nulend J (2006) Fluid shear stress inhibits TNF $\alpha$ -induced osteocyte apoptosis. *J Dent Res* 85 (10):905-909.
  251. Tang S, Xu Q, Xu X, Du J, Yang X, Jiang Y, [...] Huang T (2007) A novel *RUNX2* missense mutation predicted to disrupt DNA binding causes

- cleidocranial dysplasia in a large Chinese family with hyperplastic nails. *BMC Med Genet* 8:82.
252. Teitelbaum SL, Ross FP (2003) Genetic regulation of osteoclast development and function. *Nat Rev Genet* 4 (8):638-649.
  253. Tessa A, Salvi S, Casali C, Garavelli L, Digilio MC, Dotti MT, [...] Santorelli FM (2003) Six novel mutations of the RUNX2 gene in Italian patients with cleidocranial dysplasia. *Hum Mutat* 22 (1):104.
  254. Theilig C, Bernd A, Leyhausen G, Kaufmann R, Geurtsen W (2001) Effects of mechanical force on primary human fibroblasts derived from the gingiva and the periodontal ligament. *J Dent Res* 80 (8):1777-1780.
  255. Thesleff I (2003) Epithelial-mesenchymal signalling regulating tooth morphogenesis. *J Cell Sci* 116 (Pt 9):1647-1648.
  256. Thesleff I (2014) Current understanding of the process of tooth formation: transfer from the laboratory to the clinic. *Aust Dent J* 59 Suppl 1:48-54.
  257. Thirunavukkarasu K, Mahajan M, McLarren KW, Stifani S, Karsenty G (1998) Two domains unique to osteoblast-specific transcription factor *Osf2/Cbfa1* contribute to its transactivation function and its inability to heterodimerize with *Cbfbeta*. *Mol Cell Biol* 18 (7):4197-4208.
  258. Tsuji M, Suzuki H, Suzuki S, Moriyama K (2019) Three-dimensional evaluation of morphology and position of impacted supernumerary teeth in cases of cleidocranial dysplasia. *Congenit Anom (Kyoto)*.
  259. Tzortzi C, Proff P, Redlich M, Aframian DJ, Palmon A, Golan I, [...] Baumert U (2009) Cortisol daily rhythm in saliva of healthy school children. *Int Dent J* 59 (1):12-18.
  260. Ueda M, Kuroishi KN, Gunjigake KK, Ikeda E, Kawamoto T (2016) Expression of SOST/sclerostin in compressed periodontal ligament cells. *J Dent Sci* 11 (3):272-278.
  261. Ueda M, Goto T, Kuroishi KN, Gunjigake KK, Ikeda E, Kataoka S, [...] Kawamoto T (2016) Asporin in compressed periodontal ligament cells inhibits bone formation. *Arch Oral Biol* 62:86-92.
  262. Usui K, Tokita M (2018) Creating diversity in mammalian facial morphology: a review of potential developmental mechanisms. *Evodevo* 9:15.
  263. Vandevska-Radunovic V, Murison R (2010) Emotional stress and orthodontic tooth movement: effects on apical root resorption, tooth movement, and dental tissue expression of interleukin-1 alpha and calcitonin gene-related peptide immunoreactive nerve fibres in rats. *Eur J Orthod* 32 (3):329-335.
  264. Vansant L, Cadenas De Llano-Perula M, Verdonck A, Willems G (2018) Expression of biological mediators during orthodontic tooth movement: A systematic review. *Arch Oral Biol* 95:170-186.
  265. Vaughan T, Pasco JA, Kotowicz MA, Nicholson GC, Morrison NA (2002) Alleles of *RUNX2/CBFA1* gene are associated with differences in bone mineral density and risk of fracture. *J Bone Miner Res* 17 (8):1527-1534.
  266. Vautour L, Goltzman D (2019) Regulation of Calcium Homeostasis. In: Bilezikian JP (ed) *Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism*. 9th edn. Wiley, Hoboken, pp 163-172.
  267. Viecilli RF, Katona TR, Chen J, Hartsfield JK, Jr., Roberts WE (2009) Orthodontic mechanotransduction and the role of the P2X7 receptor. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 135 (6):694.e691-616; discussion 694-695.
  268. Vining RF, McGinley RA, Maksvytis JJ, Ho KY (1983) Salivary cortisol: a better measure of adrenal cortical function than serum cortisol. *Ann Clin Biochem* 20 (Pt 6):329-335.
  269. Wada S, Kanzaki H, Narimiya T, Nakamura Y (2017) Novel device for application of continuous mechanical tensile strain to mammalian cells. *Biol Open* 6 (4):518-524.
  270. Wang J, Huang X, Lai C, Jiang K (2013) Clinical spectrum of cleidocranial dysplasia in a family with twins. *Pediatr Int* 55 (3):392-395.
  271. Wang Y, Jia L, Zheng Y, Li W (2018) Bone remodeling induced by mechanical forces is regulated by miRNAs. *Biosci Rep* 38 (4):BSR20180448.
  272. Wei F, Liu D, Feng C, Zhang F, Yang S, Hu Y, [...] Wang S (2015) microRNA-21 mediates stretch-induced osteogenic differentiation in human periodontal ligament stem cells. *Stem Cells Dev* 24 (3):312-319.
  273. Weinreb M, Nemcovsky CE (2015) *In vitro* models for evaluation of periodontal wound healing/regeneration. *Periodontol* 2000 68 (1):41-54.
  274. Westermann J, Demir A, Herbst V (2004) Determination of cortisol in saliva and serum by a luminescence-enhanced enzyme immunoassay. *Clin Lab* 50 (1-2):11-24.
  275. White KE, Econs MJ (2019) FGF23 and the Regulation of Phosphorus Metabolism. In: Bilezikian JP (ed) *Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism*. 9th edn. Wiley, Hoboken, pp 187-193.
  276. Wichelhaus A (2013) *Kieferorthopädie - Therapie Band 1*. Thieme, Stuttgart.
  277. Wippert PM, Rector M, Kuhn G, Wuertz-Kozak K (2017) Stress and alterations in bones: an interdisciplinary perspective. *Front Endocrinol (Lausanne)* 8:96.
  278. Wolff J (1892) *Das Gesetz der Transformation der Knochen*. Verlag August Hirschwald, Berlin.
  279. Wu X, Hu J, Li G, Li Y, Li Y, Zhang J, [...] Wang S (2020) Biomechanical stress regulates mammalian tooth replacement via the integrin  $\beta$ 1-RUNX2-Wnt pathway. *EMBO J* 39 (3):e102374.
  280. Xing W, Baylink D, Kesavan C, Hu Y, Kapoor S, Chadwick RB, Mohan S (2005) Global gene expression analysis in the bones reveals involvement of several novel genes and pathways in mediating an anabolic response of mechanical loading in mice. *J Cell Biochem* 96 (5):1049-1060.
  281. Xu C, Ochi H, Fukuda T, Sato S, Sunamura S, Takarada T, [...] Takeda S (2016) Circadian Clock Regulates Bone Resorption in Mice. *J Bone Miner Res* 31 (7):1344-1355.
  282. Xu XY, He XT, Wang J, Li X, Xia Y, Tan YZ, Chen FM (2019) Role of the P2X7 receptor in inflammation-mediated changes in the osteogenesis of periodontal ligament stem cells. *Cell Death Dis* 10 (1):20.
  283. Xuan D, Sun X, Yan Y, Xie B, Xu P, Zhang J (2010) Effect of cleidocranial dysplasia-related novel mutation of RUNX2 on characteristics of dental pulp cells and tooth development. *J Cell Biochem* 111 (6):1473-1481.
  284. Xuan D, Li S, Zhang X, Hu F, Lin L, Wang C, Zhang J (2008) Mutations in the RUNX2 gene in Chinese patients with cleidocranial dysplasia. *Ann Clin Lab Sci* 38 (1):15-24.

285. Yamada K, Yamaguchi M, Asano M, Fujita S, Kobayashi R, Kasai K (2013) Th17-cells in atopic dermatitis stimulate orthodontic root resorption. *Oral Dis* 19 (7):683-693.
286. Yamaguchi M, Garlet GP (2015) The role of inflammation in defining the type and pattern of tissue response in orthodontic tooth movement. In: Krishnan V, Davidovitch Z (eds) *Biological Mechanisms of Tooth Movement*. 2nd edn. Wiley Blackwell, Chichester, West Sussex, UK, pp 121-137.
287. Yamaguchi N, Chiba M, Mitani H (2002) The induction of c-fos mRNA expression by mechanical stress in human periodontal ligament cells. *Arch Oral Biol* 47 (6):465-471.
288. Yamashiro T, Aberg T, Levanon D, Groner Y, Thesleff I (2002) Expression of Runx1, -2 and -3 during tooth, palate and craniofacial bone development. *Mech Dev* 119 Suppl 1:S107-110.
289. Yang L, Yang Y, Wang S, Li Y, Zhao Z (2015) *In vitro* mechanical loading models for periodontal ligament cells: from two-dimensional to three-dimensional models. *Arch Oral Biol* 60 (3):416-424.
290. Yang N, Meng QJ (2016) Circadian Clocks in Articular Cartilage and Bone: A Compass in the Sea of Matrices. *J Biol Rhythms* 31 (5):415-427.
291. Yang X, Ricciardi BF, Hernandez-Soria A, Shi Y, Pleshko Camacho N, Bostrom MP (2007) Callus mineralization and maturation are delayed during fracture healing in interleukin-6 knockout mice. *Bone* 41 (6):928-936.
292. Yoda S, Suda N, Kitahara Y, Komori T, Ohyama K (2004) Delayed tooth eruption and suppressed osteoclast number in the eruption pathway of heterozygous Runx2/Cbfa1 knockout mice. *Arch Oral Biol* 49 (6):435-442.
293. Yokozeki M, Ohyama K, Tsuji M, Goseki-Sone M, Oida S, Orimo H, [...] Kuroda T (2000) A case of Japanese cleidocranial dysplasia with a CBFA1 frameshift mutation. *J Craniofac Genet Dev Biol* 20 (3):121-126.
294. Yoshida CA, Furuichi T, Fujita T, Fukuyama R, Kanatani N, Kobayashi S, [...] Komori T (2002) Core-binding factor beta interacts with Runx2 and is required for skeletal development. *Nat Genet* 32 (4):633-638.
295. Yoshida T, Kanegane H, Osato M, Yanagida M, Miyawaki T, Ito Y, Shigesada K (2002) Functional analysis of RUNX2 mutations in Japanese patients with cleidocranial dysplasia demonstrates novel genotype-phenotype correlations. *Am J Hum Genet* 71 (4):724-738.
296. Yoshida T, Kanegane H, Osato M, Yanagida M, Miyawaki T, Ito Y, Shigesada K (2003) Functional analysis of RUNX2 mutations in cleidocranial dysplasia: novel insights into genotype-phenotype correlations. *Blood Cells Mol Dis* 30 (2):184-193.
297. Zaidi SK, Dowdy CR, van Wijnen AJ, Lian JB, Raza A, Stein JL, [...] Stein GS (2009) Altered Runx1 subnuclear targeting enhances myeloid cell proliferation and blocks differentiation by activating a miR-24/MKP-7/MAPK network. *Cancer Res* 69 (21):8249-8255.
298. Zelzer E, Olsen BR (2003) The genetic basis for skeletal diseases. *Nature* 423 (6937):343-348.
299. Zeng L, Wei J, Han D, Liu H, Liu Y, Zhao N, [...] Feng H (2017) Functional analysis of novel RUNX2 mutations in cleidocranial dysplasia. *Mutagenesis* 32 (4):437-443.
300. Zhang C, Zheng S, Wang Y, Zhao Y, Zhu J, Ge L (2010) Mutational analysis of RUNX2 gene in Chinese patients with cleidocranial dysplasia. *Mutagenesis* 25 (6):589-594.
301. Zhang CY, Zheng SG, Wang YX, Zhu JX, Zhu X, Zhao YM, Ge LH (2009) Novel RUNX2 mutations in Chinese individuals with cleidocranial dysplasia. *J Dent Res* 88 (9):861-866.
302. Zhang X, Liu Y, Wang X, Sun X, Zhang C, Zheng S (2017) Analysis of novel RUNX2 mutations in Chinese patients with cleidocranial dysplasia. *PLoS One* 12 (7):e0181653.
303. Zhou G, Chen Y, Zhou L, Thirunavukkarasu K, Hecht J, Chitayat D, [...] Lee B (1999) CBFA1 mutation analysis and functional correlation with phenotypic variability in cleidocranial dysplasia. *Hum Mol Genet* 8 (12):2311-2316.
304. Zhou H, Cooper MS, Seibel MJ (2013) Endogenous Glucocorticoids and Bone. *Bone Res* 1 (2):107-119.
305. Ziros PG, Basdra EK, Papavassiliou AG (2008) Runx2: of bone and stretch. *Int J Biochem Cell Biol* 40 (9):1659-1663.
306. Ziros PG, Gil AP, Georgakopoulos T, Habeos I, Kletsas D, Basdra EK, Papavassiliou AG (2002) The bone-specific transcriptional regulator Cbfa1 is a target of mechanical signals in osteoblastic cells. *J Biol Chem* 277 (26):23934-23941.
307. Zogakis IP, Koren E, Gorelik S, Ginsburg I, Shalish M (2018) Effect of fixed orthodontic appliances on nonmicrobial salivary parameters. *Angle Orthod* 88 (6):806-811.
308. Zvonic S, Ptitsyn AA, Kilroy G, Wu X, Conrad SA, Scott LK, [...] Gimble JM (2007) Circadian oscillation of gene expression in murine calvarial bone. *J Bone Miner Res* 22 (3):357-365.

## 5 Verzeichnis der dieser kumulativen Habilitationsschrift zugrundeliegenden Originalarbeiten

Aus urheberrechtlichen Gründen werden die publizierten Originalarbeiten in der vorliegenden Habilitationsschrift nicht abgedruckt. Die Fundstellen aller Originalarbeiten sind über die PubMed-Id (PMID) und den Document-Object-Identifier (DOI) direkt verlinkt.

### 5.1 **Baumert, Golan, Redlich, Akin, Muessig (2005). Cleidocranial dysplasia: molecular genetic analysis and phenotypic-based description of a Middle European patient group. Am J Med Genet A 139:78-85.**

PMID: [16222673](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16222673/)

DOI: [10.1002/ajmg.a.30927](https://doi.org/10.1002/ajmg.a.30927)

IF(2005): 1,913

### 5.2 **Baumert, Golan, Driemel, Reichert, Reicheneder, Muessig, Rose (2006). Dysostosis cleidocranialis: Beschreibung und Analyse einer Patientengruppe. Mund Kiefer Gesichtschir 10:385-393.**

PMID: [17051365](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17051365/)

DOI: [10.1007/s10006-006-0029-1](https://doi.org/10.1007/s10006-006-0029-1)

IF(2006): not indexed.

### 5.3 **Baumert, Golan, Becker, Hrala, Redlich, Roos, Palmon, Müßig (2004). Pressure simulation of orthodontic force in osteoblasts: a pilot study. Orthod Craniofac Res 7:3-9.**

PMID: [14989748](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14989748/)

DOI: [10.1046/j.1601-6335.2003.00270.x](https://doi.org/10.1046/j.1601-6335.2003.00270.x)

IF(2009): 1,607

**5.4 Shi\*, Baumert\*, Folwaczny, Wichelhaus (2019). Influence of static forces on the expression of selected parameters of inflammation in periodontal ligament cells and alveolar bone cells in a co-culture in vitro model. Clin Oral Invest 23(6):2617-2628.**

\* Geteilte Erstautorenschaft.

PMID: [30324573](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30324573/)

DOI: [10.1007/s00784-018-2697-2](https://doi.org/10.1007/s00784-018-2697-2)

IF(2018): 2,453

**5.5 Shi, Folwaczny, Wichelhaus, Baumert (2019). Differences in RUNX2 and P2RX7 gene expression between mono- and coculture of human periodontal ligament cells and human osteoblasts under compressive force application. Orthod Craniofac Res 22(3):168-176.**

PMID: [30828948](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30828948/)

DOI: [10.1111/ocr.12307](https://doi.org/10.1111/ocr.12307)

IF(2018): 0,946

**5.6 Janjic, Docheva, Trickovic Janjic, Wichelhaus, Baumert (2018). In vitro weight-loaded cell models for understanding mechanodependent molecular pathways involved in orthodontic tooth movement: a systematic review. Stem Cells Int. 2018: 3208285.**

PMID: [30154862](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30154862/)

DOI: [10.1155/2018/3208285](https://doi.org/10.1155/2018/3208285)

IF(2018): 3,902

**5.7 Janjic Rankovic, Docheva, Wichelhaus, Baumert (2020). Effect of static compressive force on in vitro cultured PDL fibroblasts: monitoring of viability and gene expression over 6 days. Clin Oral Invest 24(7): 2497-2511.**

PMID: [31728735](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31728735/)

DOI: [10.1007/s00784-019-03113-6](https://doi.org/10.1007/s00784-019-03113-6)

IF(2019): 2,812

**5.8 Tzortzi, Proff, Redlich, Aframian, Palmon, Golan, Wichelhaus, Muessig, Baumert (2009). Cortisol daily rhythm in saliva of healthy school children. Int Dent J 59:12-18.**

PMID: [19323306](#)

DOI: [10.1922/IDJ\\_1943Baumert07](#)

IF(2009): 0,632

## 6 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denjenigen bedanken, die mir die Erstellung meiner Habilitationsarbeit ermöglicht und erleichtert haben.

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Andrea Wichelhaus, Direktorin der Poliklinik für Kieferorthopädie der Ludwigs-Maximilians-Universität München. Für die Möglichkeit und fortwährende Unterstützung bei der Durchführung meiner wissenschaftlichen Arbeiten möchte ich mich herzlich bedanken. Mein besonderer Dank gilt auch Herrn Professor Dr. Daniel Edelhoff, Direktor der Poliklinik für Zahnärztliche Prothetik, und Herrn Prof. Dr. Dennis Nowak, Direktor des Instituts und der Poliklinik für Arbeits-, Sozial- und Umweltmedizin, die gemeinsam mit Frau Prof. Dr. Andrea Wichelhaus das Fachmentorat meiner Habilitation übernommen haben.

Ohne die tatkräftige Unterstützung meines Münchener Labor-Teams wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen. Daher möchte ich mich an dieser Stelle nochmals ganz herzlich bei Frau Christine Schreindorfer, Frau Lisa Reuther (geb. Müller) und Frau Jony Laure Leuya Tchuidjio für Ihre langjährige Mitarbeit bedanken. Mein Dank gilt ebenfalls meinen Doktorandinnen und PhD-Kandidatinnen Dr. Jianwei Shi, Dr. Mila Janjic Rankovic (Ph.D.) und Fr. Changyun Sun.

Mein Dank gilt auch Prof. Dr. Hickel für die gute Zusammenarbeit mit seiner Klinik. Herrn Prof. Dr. Dr. Matthias Folwaczny und seinen Mitarbeiterinnen Frau Dr. Julia Diegelmann und Frau Brigitte Hackl ebenfalls herzlichen Dank für die tolle Unterstützung und dafür, dass wir in ihrem Labor mitarbeiten dürfen.

Herrn Prof. Dr. Dr. Michael Ehrenfeld und seinen Mitarbeitern herzlichen Dank für die Generierung von patientenspezifischem Zellmaterial.

Mein Dank gilt auch meinen langjährigen Kollegen aus Regensburg, Herrn Prof. Dr. Dieter Müßig und Herrn PD Dr. Ilan Golan, für die spannenden und vielseitigen Jahre. Frau Bernadette Fürnstein als meiner Regensburger Labormitarbeiterin sei an dieser Stelle nochmals gedankt. Ebenso meinen Dank an die Kollegen aus dem BioPark, Regensburg, und unsere gemeinsame Zeit im Labor.

Mein ganz besonderer Dank gilt meiner Mutter für ihre fortwährende Unterstützung, Förderung und Geduld während des Studiums in Münster und meinem Umzug „südlich des Weißwurstäquators“.

Meinen Studienkollegen und Weggefährten aus Münster möchte ich an dieser Stelle ebenfalls herzlich danken: PD Dr. Markus Preising, Dr. Peter Nacke, Dr. Antje Kronenberg und Dr. Henrike Schmidtberg.