# Die Rolle der Osteoklasten für die Zahnbewegung in *Mus musculus (Linné, 1758)*

# **Inaugural-Dissertation**

Zur Erlangung der Doktorwürde des Departments Biologie, Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften, Universität Hamburg

vorgelegt von
Tilman Jakob Linn

aus Hamburg

Hamburg 2009

Genehmigt vom Department Biologie der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften an der Universität Hamburg auf Antrag von Professor Dr. M. AMLING Weiterer Gutachter der Dissertation: Professor Dr. K. WIESE Tag der Disputation: 11. Dezember 2009

Hamburg, den 27. November 2009

Strat Hamburg

Professor Dr. Jörg Ganzhorn Leiter des Departments Biologie Inhaltsverzeichnis

# Inhaltsverzeichnis

1 ABKÜRZUNGEN	1
2 EINLEITUNG, GRUNDLAGEN UND AUFGABENSTELLUNG	3
2.1 Einleitung	3
2.2 Grundlagen	4
2.2.1 Das Gebiss	
2.2.1.1 Anatomie	
2.2.1.2 Gebiss- und Zahnentwicklung	
2.2.1.3 Bildung der Zähne durch Ameloblasten und Odontoblasten	
2.2.1.4 Odontozyten	
2.2.1.5 Der Zahnhalteapparat	
2.2.1.6 Zahnbewegungen	9
2.2.1.6.1 Zahndurchbruch	9
2.2.1.6.2 Die kieferorthopädische Zahnbewegung	10
2.2.2 Das Skelettsystem	11
2.2.2.1 Bildung von Knochen durch Osteoblasten	11
2.2.2.2 Osteozyten und Belegzellen	11
2.2.2.3 Abbau von Knochenmaterial durch Osteoklasten	12
2.2.2.4 Knochenumbau	14
2.2.2.5 Knochenumbau während der Zahnbewegung	15
2.2.2.6 Die Gaumennahterweiterung	16
2.2.3 Eingeschränkte Resorption von Osteoklasten	18
2.2.3.1 Osteopetrose	18
2.2.3.1.1 Besonderheit der Tcirg1-abhängigen Osteopetrose	18
2.2.3.1.2 Besonderheit der durch die Defizienz von Src hervorgerufenen Osteopetrose	19
2.2.3.2 Bisphosphonate	19
2.3 Aufgabenstellung	20
3 MATERIAL UND METHODEN	22
3.1 Analyse der natürlichen Zahnbewegung	22
3.1.1 Versuchsprinzip	22
3.1.2 Maushaltung	22
3.1.3 Genotypisierung	23
3.1.3.1 Isolierung von Mausschwanz-DNA	23

3.1.3.2 Polymerasekettenreaktion (PCR)	23
3.1.3.3 Agarose-Gelelektrophorese	25
3.1.3.4 Southern-Blotting	26
3.2 Analyse der kieferorthopädischen Zahnbewegung	27
3.2.1 Versuchsprinzip und -protokoll	28
3.2.2 Maushaltung	28
3.2.3 Calceinmarkierung	29
3.3 Radiologische und histologische Auswertungen	29
3.3.1 Radiologische Auswertung	29
3.3.2 Histologie	30
3.3.2.1 Unentkalkte Histologie	30
3.3.2.2 Entkalkte Histologie	31
3.3.3 Histomorphometrie	31
3.3.4 Statistik	33
4 ERGEBNISSE	34
4.1 Natürliche Zahnbewegung	34
4.1.1 Zeitpunkt des Zahndurchbruchs	34
4.1.2 Osteoklastäre Aktivität während des Zahndurchbruchs	36
4.1.3 Zahndurchbruch bei Osteopetrose	37
4.2 Kieferorthopädische Zahnbewegung	40
4.2.1 Versuchsparameter	40
4.2.1.1 Kraft der Apparatur zur murinen Gaumennahterweiterung	40
4.2.1.2 Wirkung der μGNE auf das Verhalten und Wachstum der Mäuse	40
4.2.2 Klinische Untersuchung der Zahnbewegung nach Klammereinsatz	41
4.2.3 Radiologische Untersuchung	42
4.2.4 Histologie der iatrogenen Zahnbewegung	43
4.2.5 Veränderungen der Zahnwurzel	44
4.2.6 Reparatur der Resorptionsdefekte	46
5 DISKUSSION	48
5.1 Der Mechanismus der Zahnbewegung	48
5.1.1 Die natürliche Zahnbewegung	48
5.1.2 Die Mikro-GNE als Modell der mechanisch induzierten Zahnbewegung	
5.1.3 Unterschiede zwischen natürlicher und mechanisch induzierter Zahnbewegung	
5.2 Wurzelresorption	52

Inhaltsverzeichnis III

	5.2.1 Wurzelresorption wird von Osteoklasten verursacht	. 52
	5.2.2 Die Gabe von Bisphosphonaten hemmt die Wurzelresorption	. 53
	5.2.3 Die medikamentöse Inaktivierung von Osteoklasten verhindert gleichzeitig die iatrogene	
	Zahnbewegung	. 54
	5.2.4 Das Periodont besitzt einen rudimentären Mechanismus zur Reparatur von Wurzeldefekter	n 54
5.	3 Ausblick	. 56
6	ZUSAMMENFASSUNG	57
7	LITERATURVERZEICHNIS	58

1 Abkürzungen 1

# 1 Abkürzungen

ATP: MA: Mineralisationsaktivität Adenosintriphosphat BFR: Knochenformationsrate (mineral apposition) (bone formation rate) μGNE: **GNE** im Mausmodell BP: Bisphosphonat Minute min: BSA: Rinderserumalbumin (bo-HMG-CoA: Hydroxy-3-Methylglutarylvine serum albumin) Coenzym-A CIC: Chloridkanal (chlorid NOc/AlvB: Anzahl der Osteoklasten in der Alveole (number of channel) Csf: Kolonie-Stimulierenderosteoclast per alveolar bo-Faktor (colony stimulating ne surface) factor) NOc/OccB: Anzahl der Osteoklasten CT: Computertomographie am okklusalen Kieferkno-DenTh: Dicke der Dentinschicht chen (number of (dentine thickness) osteoclasts per occlusal DMSO: Dimethylsulfoxid bone parameter) DNA: Desoxyribonukleinsäure Anzahl der Osteoklasten NOc/RS: (desoxy ribonucleotid acid) pro bukkale WurzeloberdNTP: fläche (number of osteoclast per root Desoxynukleotidtriphosph surface) at DVT: Digitale Volumentomogra-NR: Wurzelresorptionsrate phie (number of resorption) EDTA: OC: Osteoklast (osteoclast) Ethylendiamintetraacetat ErR: Durchbruchsrate (eruption OccBTh: Dicke des okklusalen Kieferknochens (occlusal borate) ES/TS: Resorbierte bukkale Wurne thickness) zeloberfläche (eroded OPG: Osteoprotegerin surface per tooth surface) PBS: Phosphat gepufferte Salz-**GNE**: Gaumennaht-Erweiterung lösung (phosphate LcDe: Resorptionslakunentiefe buffered saline) (lacunae depth)

1 Abkürzungen 2

PCR: Polymerasekettenreaktion Src: sarcoma (polymerase chain reac-TAE: Tris-Azetat-EDTA-Puffer tion) Tcirg: T cell immune regulator PSA: Panoramaschichtauf-TE: Tris-EDTA TL: Zahnlänge (tooth length) nahme PTH: TMA: Parathormon Titan-Molybdän RANK: Rezeptor-Aktivator vom TRAP: Tartratresistente saure nukleären Faktor κB Phosphatase (tartrate re-RANK-L: RANK-Ligand sistant acid phosphatase) rAK: resorbierter Tris: Tris(hydroxymethyl)amino-Alveolarknochen methan, Puffersubstanz RR: Resorptionsrate ü.N.: über Nacht RT: v/v: Volumen /Volumen (volu-Raumtemperatur RT-PCR: Real Time PCR me/volume) SBlot: Southern Blotting WT: Wildtyp SDS: Natriumdodecylsulfat w/v: Masse/Volumen (sodium dodecyl sulfate), (weight/volume) ZA: Detergens Zahnanlage

# 2 Einleitung, Grundlagen und Aufgabenstellung

## 2.1 Einleitung

Die Fähigkeit der *Vertebrata*, im Körper gezielt mineralisiertes Hartgewebe auszubilden, stellt einen großen evolutionären Schritt dar. Sie gibt diesem Unterstamm der *Chordata* die Möglichkeit, viele adaptive Phänotypen anzunehmen. Das Ausbilden einer festen Körperhülle ermöglicht unter anderem einen effektiven Schutz vor Fressfeinden. Das der Fortbewegung dienende mineralisierte Skelettsystem ist dem Hydrostatischen weit überlegen und das Ausbilden von Zähnen erlaubt eine effizientere Jagd und Nahrungsaufnahme (HICKMANN ET AL., 2008).

In der Gruppe der Mammalia tritt eine aus Mineral bestehende gepanzerte Körperhülle nicht auf. Zu finden sind in allen Arten jedoch mineralisierte Knochen und Zähne. Trotz der unterschiedlichen Funktion dieser beiden Gewebetypen zeigen sie starke Ähnlichkeiten zueinander. So geschieht die Bildung beider Hartgewebe durch eine Einlagerung von Kalziumphosphat in eine zuvor gebildete Proteinmatrix. Des Weiteren können in beiden Hartgeweben drei verschiedene Gruppen von Zelltypen voneinander unterschieden werden: gewebebildende Zellen (Osteoblasten Odontoblasten/Ameloblasten), statische Zellen (Osteozyten und Odontozyten) und resorbierende Zellen (Osteoklasten). Diese drei Zelltyp-Gruppen sind entscheidend für die Bildung und Aufrechterhaltung der gewebespezifischen Funktionen. Außerdem spielen sie eine wichtige Rolle in der Reparatur traumatisch bedingter Defekte und vor allem auch in der fortlaufenden Anpassung der Hartgewebe an wechselnde physiologische Bedingungen.

Solch wechselnde Bedingungen liegen zum Beispiel während der Zahnbewegung vor, in der ein Hartgewebe (Zahn) in Relation zu einem anderen Hartgewebe (Kieferknochen) bewegt wird. Eine Anpassung dieser scheinbar starren Gebilde an diese besonderen Bedingungen ist also notwendig. Doch neben der Anpassung der Hartstrukturen an die natürliche Zahnbewegung des Zahndurchbruchs ist der Körper auch in der Lage, auf die iatrogen hervorgerufene Zahnbewegung der kieferorthopädischen Behandlung zu reagieren. Diese mechanisch induzierte Zahnbewegung zur Korrektur von Zahnfehlstellungen findet in der Klinik seit über 200 Jahren Anwendung. Dennoch ist der genaue zelluläre Prozess, der diese Bewegung ermöglicht,

bisher weitestgehend unbekannt. Unerwünschte Nebenwirkungen, wie irreversible Wurzelresorptionen, sind nicht selten.

Durch die radiologische Bildgebung können apikale Defekte ab einer bestimmten Größe dargestellt werden. Diese Methode ist in der zahnmedizinischen Klinik in der Form der Panoramaschichtaufnahme (PSA) seit 1961 etabliert. Die 1998 in die Kieferorthopädie eingeführte und heutzutage breit eingesetzte digitale Volumentomographie (DVT) ist zum Teil in der Lage, auch laterale Schäden diagnostisch zu erkennen (Korbmacher et al., 2007). Beide Techniken erlauben aber keine Aussagen über die den Defekten zugrunde liegenden zellulären Prozesse.

Da allgemein angenommen wird, dass die Größe der während der kieferorthopädischen Behandlung applizierten Kraft eine Rolle im Auftreten von Wurzelresorption spielt, gibt es theoretische Ansätze, die die Kräfte der Zahnbewegung über die Methode der finiten Elemente (Gomes der Oliveira et al., 2006) zu beschreiben versuchen. Allerdings können auch sie nicht zur Klärung der zellulären Mechanismen beitragen. Einzig die histologische Untersuchung kann präzise Aussagen über die betroffenen Gewebe treffen. Die Entnahme gesunden Gewebes ist aus klinischer und ethischer Sicht jedoch nicht möglich. Außerdem könnte solch eine Entnahme nur Momentaufnahmen der Zahnbewegung erfassen, ohne dabei ein umfassendes Bild darzustellen.

Ziel dieser Arbeit ist daher die Entwicklung eines tierexperimentellen Ansatzes und die auf diesem basierende histologische Aufklärung der zellulären Prozesse während der kieferorthopädischen Zahnbewegung. Hauptaugenmerk soll hierbei den körpereigenen Hartstrukturen der Zähne und der Kieferknochen zukommen.

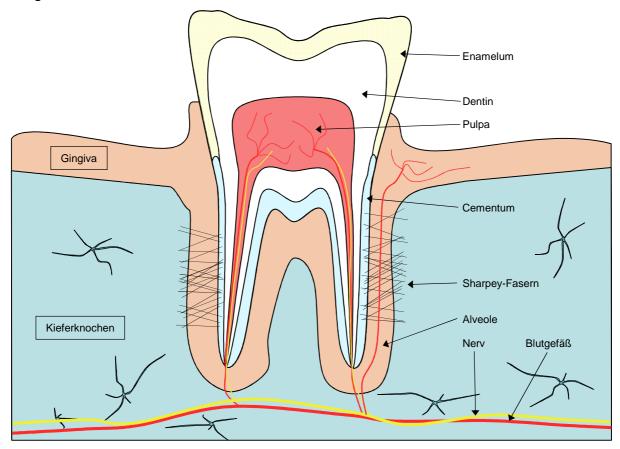
# 2.2 Grundlagen

#### 2.2.1 Das Gebiss

Zähne (lat. *Dens/Dentes*; griech. *Odous/Odontes*; der Zahn/die Zähne) bilden in ihrer Gesamtheit zusammen mit dem Zahnhalteapparat die funktionelle Einheit des Gebisses. Durch die Aufteilung des Gebisses in Ober- und Unterkiefer ergibt sich ein perfektes Werkzeug zur Ergreifung und Zerkleinerung von Nahrung.

## 2.2.1.1 Anatomie

Die Morphologie der Zähne folgt dem Prinzip von Form und Funktion ("form follows function", SULLIVAN, 1896), wonach die Form der Zähne durch die Funktion, die sie bei der Nahrungsaufnahme spielen, definiert wird. Es können im Gebiss der Säugetiere vier verschiedene Zahnformen voneinander unterschieden werden. Die Schneidezähne (Incisivae) dienen dem Abtrennen kleiner Portionen der Nahrung. Sie haben eine schneideartige Struktur. Die Reiß- oder Eckzähne (Canini) dienen primär dem Ergreifen und Festhalten der Nahrung von jagenden Tieren. Sie sind dolchartig geformt und ragen meist deutlich über die Okklusionsebene hervor. Die vorderen Backenzähne (Praemolares) und die hinteren Backenzähne (Molares) sind die eigentlichen Kauwerkzeuge, die die Nahrung wie Mühlsteine zermahlen können. Sie dienen derselben Aufgabe, unterscheiden sich jedoch leicht im Aussehen und der Verankerung im Kiefer.



**Abb. 2.1: Schematische Darstellung eines Zahns.** Zähne sitzen in Alveolen. Über Sharpey-Fasern sind sie elastisch am Kieferknochen fixiert. Sie sind aus verschieden mineralisierten Geweben aufgebaut. Dentin und Cementum wird von Odontoblasten gebildet, Enamelum von Ameloblasten. Die Pulpa ist von Blutgefäßen und Nerven durchdrungen.

Trotz dieser verschiedenen Erscheinungsformen erfolgt der Aufbau aller Zahntypen nach demselben Grundschema. Jeder Zahn besteht aus der Zahnkrone (*Corona dentis*), dem Zahnhals (*Collum dentis*) und der Zahnwurzel (*Radix dentis*) (JUNQUEIRA UND CARNEIRO, 1996). Des Weiteren unterliegen alle demselben Bauplan aus mehreren Schichten (Abb. 2.1). Im Inneren des Zahnes liegt die Pulpa (das Zahnmark). Sie wird von Blutgefäßen und Nerven durchzogen und ist das vitale Zentrum des Zahnes. Um die Pulpa herum liegt das Zahnbein, auch Dentin genannt. Es stellt die Hauptmasse des Zahnes. Das Zahnbein ist ebenso wie die Pulpa schmerzempfindlich. Mechanische, sowie Hitze- oder Kältereize werden von der Zahnoberfläche durch so genannte Tomes sche Fasern an die Nervenendungen der Pulpa weitergeleitet (ANDREW UND MATTHEWS, 2000). Die äußerste Schicht des Zahnes wird an der Zahnkrone vom Zahnschmelz (*Enamelum*) oder im Bereich der Wurzel von Zahnzement (*Cementum*) bedeckt (JUNQUEIRA UND CARNEIRO, 1996).

## 2.2.1.2 Gebiss- und Zahnentwicklung

Beim Menschen ist die Entwicklung der Zähne bereits bei der Geburt weit vorangeschritten (REITEMEIER ET AL., 2006). Durch Proliferation der Basalzellen des bereits 30 bis 40 Tage nach Ovulation gebildeten odontogenen Epithelbandes entstehen in diesem Mesenchym die ersten Zahnkeime, die bis zur 17. Schwangerschaftswoche über die als Knospen- und Kappenstadium bezeichneten Entwicklungsstufen zur Zahnglocke ausgebildet werden (KAHL-NIEKE, 2001). Die Mineralisation der Schneidezähne beginnt in der 17. embryonalen Woche durch Ausbildung des Schmelzorgans, die der Molaren um die 20. Woche. Zum Zeitpunkt der Geburt sind die Kronen der vorderen Zähne fast fertig ausgebildet, die Kronen der Backenzähne etwa zur Hälfte. In derselben Reihenfolge der Zahnentwicklung erfolgt im weiteren Wachstum des Organismus der Durchbruch der Zähne in den Mundraum und damit das Ausbilden des funktionsfähigen Gebisses. Viele Säugetiere führen einen Zahnwechsel durch, in dessen Verlauf das sogenannte Milchgebiss durch das bleibende Gebiss ersetzt wird. Die Entwicklung der Zähne dieses bleibenden Gebisses beginnt zeitversetzt zur Bildung der korrespondieren Zähne des Milchgebisses. Die Dentinbildung der dritten Molaren, der so genannten Weisheitszähne, erfolgt hierbei als letztes im Alter von sieben bis zehn Jahren, der Durchbruch selten vor dem 16. Lebensjahr.

#### 2.2.1.3 Bildung der Zähne durch Ameloblasten und Odontoblasten

Zähne bestehen aus einer mineralisierten kollagenen Matrix, die von speziellen Zelltypen gebildet wird. Man unterscheidet hierbei Ameloblasten, Zementoblasten und Dentinoblasten. Alle drei Zelltypen sezernieren eine Matrix aus kollagenen Fasern, in welche Wasser und Proteine eingelagert werden. Letztere sorgen für eine funktionelle Quervernetzung und daraus resultierende höhere Stabilität. Zeitversetzt wird als Hartsubstanz Hydroxylapatit (kristallines Kalziumphosphat, Ca<sub>5</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>3</sub>(OH)) eingelagert.

Der Zahnschmelz (Enamel) wird von den Ameloblasten gebildet. Diese Zellen stellen eine Besonderheit der hartgewebebildenden Zellen dar, da sie im Gegensatz zu den Zementoblasten und Dentinoblasten, aber auch zu den Osteoblasten des Knochens, nicht mesenchymalen Ursprungs sind, sondern aus der Neuralleiste stammen. Die Bildung des Schmelzes, auch Amelosynthese genannt, initiiert die Zahnbildung.

Die zementbildenden Zementoblasten und dentinbildenden Dentinoblasten werden zu den Odontoblasten zusammengefasst. Die Bildung von Dentin erfolgt erst nach der Amelosynthese. Dentinoblasten lagern sich hierbei initial an die Innenseite des Zahnschmelzes an und wandern im Laufe der Dentinbildung in Richtung Pulpa. Über lange Zellausläufer, den so genannten Tomes'schen Fasern, bilden sie eine Verbindung zwischen Schmelz und Pulpa. Diese Zellausläufer werden mit fortschreitendem Dickenwachstum des Dentins länger. Ihnen werden Rollen in der Reizweiterleitung und Zellsteuerung zugeschrieben (MULLENDER UND HUISKES, 1997; MULLENDER ET AL., 2004). Dentin wird in primäres Dentin und sekundäres Dentin unterteilt. Dentin, welches bis zur Vollendung des Wurzelwachstums gebildet wird, wird primäres Dentin genannt. Später gebildetes Dentin wird als sekundäres Dentin bezeichnet. Diese Einteilung ist jedoch eine rein Zeitliche, da strukturell kein Unterschied auszumachen ist (JUNQUEIRA UND CARNEIRO, 1996).

Unterhalb der Zahnkrone bilden Zementoblasten den Zahnzement. An der Oberfläche der Zahnwurzel strahlen kollagene Fibrillen, sogenannte Sharpey-Fasern, in den Zahnzement ein. Durch diese lokal begrenzte Einlagerung der Fibrillen lässt sich der Zement in einen fibrillären und einen afibrillären Teil unterscheiden (Schröder und Listgarten, 1971).

Die drei verschiedenen Hartgewebe des Zahnes lassen sich unter anderem anhand des Mineralisierungsgrades unterscheiden. Hierbei gilt, dass die Härte des Gewebes mit steigendem Mineralisierungsgrad zunimmt. Dentin besteht zu ca. 60 Prozent aus

Hydroxylapatit, Zement zu ca. 70 Prozent. Zahnschmelz hingegen besteht zu ca. 95 Prozent aus Hydroxylapatit und ist damit die härteste bekannte Körpersubstanz. Der hohe anorganische Anteil wird über eine Rückresorption des kollagenen Anteils nach erfolgter Mineralisierung der Matrix erreicht (REITEMEIER ET AL., 2006).

Die genaue Steuerung und der Ablauf der physiologischen Mineralisation werden noch diskutiert. Es ist bisher unklar, ob die Mineralisierung in Hartgeweben ein aktiv herbeigeführter Prozess ist oder ob nicht eher eine ubiquitär auftretende, passive Mineralisierung in anderen Geweben aktiv verhindert wird. Grund für diese Diskussion ist, dass die Menge des im Blut gelösten Kalziums und Phosphats den Wert des Löslichkeitsprodukts um mehrere Zehnerpotenzen überschreitet (NEUMAN, 1980). Die bisherigen Erkenntnisse weisen aber summiert darauf hin, dass die ektopische Mineralisierung in den Weichgeweben aktiv gehemmt wird und im Hartgewebe zusätzliche Mechanismen wiederum dieser vorhandenen Hemmung entgegenwirken und sie negieren, so dass hierdurch eine gesteuerte Mineralisierung erfolgen kann (SCHINKE UND AMLING, 2007).

## 2.2.1.4 Odontozyten

Während der Synthese des Zahnzements und Dentins kommt es zum Einschluss vereinzelter Zementoblasten in die Mineralisierungsfront. Diese Zellen werden fortan als Zementozyten/Odontozyten bezeichnet. Die genaue Aufgabe dieser Zellen ist unbekannt. Es werden allerdings Aufgaben in der Mechanotransduktion und Regulation des Zahnstoffwechsels diskutiert (LARMAS, 2008).

## 2.2.1.5 Der Zahnhalteapparat

Der Zahnhalteapparat, das Parodontium, verankert die Zähne funktionell im Kiefer. Er setzt sich aus der Gingiva (Zahnfleisch), dem Cementum (Zahnzement), der Alveole (Zahnfach) und dem Desmodont (Wurzelhaut) zusammen. Die Befestigung des Zahnes in der Alveole erfolgt über die kollagenen Sharpey-Fasern des fibrillären Zements. Diese Fasern sind in einem engen Netz vom Cementum zur Alveolenoberfläche gespannt und ermöglichen eine straffe, aber bewegliche Aufhängung. Druck auf den Zahn wird über die Sharpey-Fasern in eine multidirektionale Zugbelastung auf den Alveolarknochen umgewandelt. Diese schwingende Aufhän-

gung ist in der Lage, die Wurzel besser vor mechanischer Beschädigung zu schützen, als es eine feste und unnachgiebige Verbindung zwischen Zahn und Kieferknochen vermögen würde. Nach Belastung bewegt der aus den kollagenen Fasern bestehende, elastische Anteil des Zahnhalteapparats die Zähne wieder in die Ausgangslage zurück (PROFFIT, 1993).

#### 2.2.1.6 Zahnbewegungen

Die Orthodontie befasst sich mit der Bewegung von Zähnen, die das Gebiss bleibend modifiziert. Man unterscheidet hierbei zwei Formen der Zahnbewegung. Zum einen die natürliche, vertikale Zahnbewegung während des Zahndurchbruchs und des Zahnwechsels, zum anderen die klinische oder kieferorthopädische Zahnbewegung zur Beseitigung von Zahnfehlstellungen, die je nach Kraftapplikation und -größe kippend, körperlich, drehend oder aufrichtend sein kann (Göz, 2000).

#### 2.2.1.6.1 Zahndurchbruch

Der Zahndurchbruch beschreibt die Bewegung des Zahnes aus dem Kiefer in seine funktionelle Position innerhalb des Gebisses. Er wird in zwei Phasen unterteilt. In der ossären Phase befindet sich der gesamte Zahn im umschließenden Kieferknochen. Sie endet mit der Bewegung der Zahnkrone über die vom Kieferknochen begrenzte Linie und mündet in der gingivalen Phase. Sie beschreibt die Bewegung über diese Linie hinaus durch die Gingiva. Diese Bewegung entlang des Zahnhalteapparats endet meist kurz nach der druckatrophierten Freisetzung der Zähne aus der Gingiva, da sie durch Okklusion mit dem Antagonisten im Gegenkiefer gestoppt wird (KAHL-NIEKE, 2001).

In der Gebissentwicklung des adoleszenten Menschen treten verschiedene Stadien auf. Im Alter von sechs Monaten (+/- 2 Monate) erscheinen die ersten Incisivae und bilden den Beginn der Milchdentition. Es folgen die Canini, die Prämolaren und die Molaren. Die Entwicklungsphase der Milchdentition ist üblicherweise im Alter von zwei bis drei Jahren abgeschlossen, die Nutzungsphase dauert bis zum Beginn des frühen Wechselgebisses im sechsten bis neunten Lebensjahr an. Das späte Wechselgebiss (10. bis 13. Lebensjahr) wird ab dem Durchbruch des letzten bleibenden Zahnes (die dritten Molaren ausgenommen) zum bleibenden Gebiss. Der Durchbruch

der Weisheitszähne erfolgt in der Regel zwischen dem 17. und 22. Lebensjahr (KRARUP ET AL., 2005).

#### 2.2.1.6.2 Die kieferorthopädische Zahnbewegung

Die mechanisch induzierte Zahn- und Kieferbewegung wird von der Kieferorthopädie zur therapeutischen Behebung von Dysgnathien (Zahn- und Kieferfehlstellungen) herangezogen, die eine deutliche Beeinträchtigung der Funktion des Gebisses bedeuten. Dies können Beschwerden bei der Nahrungsaufnahme, fehlender Lippenschluss mit gestörter artikulatorischer Phonetik oder schmerzende und fehlbelastete Kiefergelenke sein (KAHL-NIEKE, 2001).

Dysgnathien treten in verschiedenen Ausprägungen auf. Um die unterschiedlichen Fehlstellungen des Kiefers wirksam therapieren zu können, wurden verschiedene kieferorthopädische Apparaturen entwickelt. Generell wird zwischen festsitzenden und herausnehmbaren Zahnspangen unterschieden, die zusätzlich nach ihrer Lokalisation in intra- und extraorale Apparaturen unterteilt werden können.

Die Verankerung an den Zähnen oder von einzelnen Zähnen erfolgt über Klammern, Ösen oder Bänder, die aus Draht geformt werden. Standardmäßig werden Drähte aus Titan-Molybdän (TMA) verwendet, für Sonderfälle auch Drähte aus Chrom-Kobalt oder Nickel-Titan (Sentalloy™) (YANOSKY UND HOLMES, 2008; DERMAUT UND DEPAUW, 2005). Diese Drähte wurden seit 1980 in die Kieferorthopädie eingeführt, weil sie im Gegensatz zum zuvor meist eingesetzten Stahldraht ein geringen E-Modul (Kennzahl der Elastizität), eine hohe Dehngrenze und Bruchdehnung, sowie eine hohe Biokompatibilität vorweisen (BURSTONE ET AL., 1980; TIPLER UND MOSCA, 2004; SKOULARIKIS ET AL., 2008).

Der Zahnhalteapparat ist Gegenpol für die kieferorthopädische Kraft und somit als Bezugspunkt zu beachten. Die Größe des Parodontiums ist direkt abhängig von der Oberfläche der Zahnwurzel. Diese variiert jedoch stark von ca. 154 mm² der unteren Incisivae bis ca. 433 mm² der oberen Molaren (Kahl-Nieke, 2001). Deswegen unterscheidet Reitan (1969) optimale Kraftgrößen für verschiedene Zahngrößen und Arten der Bewegung. Mit zunehmender Zahngröße und somit größerer Wurzelfläche soll eine stärkere Kraft gewählt werden. Für Kippbewegung gibt er 0,2 bis 0,75 N an, für die körperliche Bewegung 0,4 bis 1,5 N, für die Wurzelbewegung 0,5 bis 1,5 N und

für die Extrusion 0,3 bis 0,5 N. Die maximale Kraft für eine Intrusion soll maximal 0,25 N betragen. Diese Werte werden üblicherweise in der kieferorthopädischen Praxis nicht überschritten. Die natürlichen Kräfte, die durch den Druck der Zunge oder der Lippen/Wangen auf die Zähne wirken, sind in diesem Zusammenhang zu vernachlässigen, da diese Kräften zwischen 0,05 und 0,1 N liegen (PROFFIT, 2000). VAN LEEUWEN UND MALTHA (2000) und REN ET AL. (2003) widersprechen jedoch dem Gedanken, der Kraftgröße eine entscheidende Bedeutung zuzuweisen. Im Gegensatz hierzu gehen sie davon aus, dass eine optimale Zahnbewegung nicht von der Größe der applizierten Kraft abhängig sei, sondern einzig die Kraftrichtung über eine erfolgreiche kieferorthopädische Behandlung entscheidet.

Als wichtiges Kriterium für eine erfolgreiche Behandlung muss aber immer die Abstützung der kieferorthopädisch applizierten Kraft betrachtet werden. Diese sollte eine unerwünschte Zahnbewegung der stützenden Zähne möglichst minimieren (DERMAUT UND DE PAUW, 2005).

## 2.2.2 Das Skelettsystem

# 2.2.2.1 Bildung von Knochen durch Osteoblasten

Im Knochen erfolgt die Synthese der kollagenen Matrix durch Osteoblasten. Diese Zellen sezernieren Kollagen Typ I, welches daraufhin ebenfalls von Proteinen quervernetzt wird und das sogenannte Osteoid bildet. Wichtige Proteine sind hier Osteopontin, Osteonectin, Osteocalcin und verschiedene Proteoglykane. Rund zehn Tage nach der Synthese beginnt die Mineralisation des Osteoids (BARON, 1996). Der mineralisierte Anteil nimmt ca. 55-60 Prozent des fertigen Hartgewebes ein, so dass Knochen und Dentin eine vergleichbare Härte aufweisen (ROBEY UND BOSKEY, 2006). Im Unterschied zu den Odontoblasten treten Osteoblasten nie alleine, sondern stets in Gruppen von mehr als 100 Zellen auf. Diese liegen in großen Feldern auf der Knochenoberfläche und sezernieren gemeinsam die organische Matrix.

# 2.2.2.2 Osteozyten und Belegzellen

Weitere Knochenspezifische Zelltypen sind Osteozyten und Belegzellen ("bone lining cells"). Ähnlich dem Einschluss von Odontozyten werden auch im Laufe der Knochenbildung einige der Osteoblasten von der mineralisierenden Matrix eingeschlos-

sen. Sie wandeln sich in die statischen Osteozyten um. Das Ausbilden langer Zellausläufer führt zu einer komplexen Vernetzung dieser Zellen. Man spricht von Canaliculi. Diese sind den Tomes'schen Fasern des Dentins ähnlich (LU ET AL., 2007). Obwohl mehr als 95 Prozent aller Knochenzellen Osteozyten sind, ist die Aufgabe dieser Zellen bisher nicht abschließend geklärt. Die Oberfläche des von ihnen gebildeten Lakunensystems ist um den Faktor zehn größer als die Oberfläche der Lungenkapillaren. Dies lässt auf wichtige Steuerungsfunktionen des Knochenstoffwechsels und des Knochenumbaus schließen. Vor allem werden aber Aspekte der Reizweiterleitung, speziell der Mechanotransduktion diskutiert (*MULLENDER UND HUISKES, 1997;* LIAN ET AL., 2003; RUBIN UND RUBIN, 2006).

Ebenso unklar ist die genaue Aufgabe der Belegzellen. Diese lang gestreckten Zellen flankieren die Knochenoberfläche. Ihnen wird neben einer regulatorischen und einer sensorischen Funktion noch eine Rolle als Schutzschicht des Knochens zugeschrieben (*Mullender und Huiskes, 1997;* Lian et al., 2003).

#### 2.2.2.3 Abbau von Knochenmaterial durch Osteoklasten

Die Resorption mineralisierten Hartgewebes wird von Osteoklasten durchgeführt. Diese Zellen besiedeln nur ca. 1 Prozent der Knochenoberfläche und sind damit die seltensten Knochenzellen. Sie entstehen aus hämatopoietischen, mononukleären Vorläuferzellen, die zu funktionsfähigen, multinukleären Zellen fusionieren. Ausgereifte Osteoklasten durchmessen bis zu 100 μm und besitzen teilweise mehr als 20 Zellkerne (BOYLE ET AL., 2003).

Die Funktion ausgereifter Osteoklasten ist schematisch in Abbildung 2.2 dargestellt. Einzelne Osteoklasten heften sich über spezielle Adhäsionsmoleküle an die Oberfläche des Hartgewebes. Für diesen Prozess spielen besonders Integrine der Klasse  $\alpha_{\nu}\beta_{3}$  in Wechselwirkung mit Vitronektinen der Zahn- und Knochenmatrix eine wichtige Rolle (Ross, 2006). Diese "sealing zone" genannte Bindung ist für die meisten Proteine und Ionen undurchlässig. Hierdurch ist der Raum unterhalb des Osteoklasten und innerhalb des Actin-Rings effektiv gegen das Knochenmark versiegelt, so dass ein spezieller Reaktionsraum entsteht ("Howship'sche Lakune"). Die Zellmembran faltet sich durch das verschmelzen mit lysosomalen Vesikeln innerhalb dieser Adhäsionszone stark auf und bildet die so genannte "ruffled border". Über diese apikale Exozytose sezerniert der Osteoklast lytische Enzyme, wie Cathepsin K, alkalische

Phosphatase und die Metalloproteasen MMP-3 und -9. Die Sekretion von HCI durch Protonenpumpen (V-ATPasen) und Chloridkanäle (CIC7) führt zu einer Ansäuerung des Milieus auf einen pH-Wert von 4,5 bis 4. Dies wiederum demineralisiert die Knochenmatrix und aktiviert die lytischen Enzyme, die daraufhin die nun zugängliche organische Matrix abbauen. Die für die Ansäuerung benötigten Protonen liefert eine zytoplasmatische Carboanhydrase, die CO<sub>2</sub> und H<sub>2</sub>O in H<sup>+</sup> und HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> umwandelt. Das im Überschuss vorhandene HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> wird über einen membrangebundenen CI<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-Austauscher gegen gleichzeitigen Import von benötigten CI<sup>-</sup>-Ionen aus der Zelle entfernt.

Die Abbauprodukte werden entweder nach Öffnung der "sealing zone" oder via Transzytose freigesetzt (SALO ET AL., 1997).

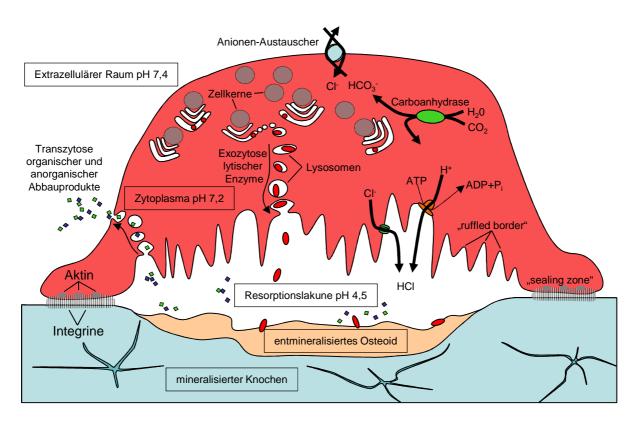


Abb. 2.2: Schematische Darstellung eines Osteoklasten. Diese mehrkernigen Zellen haften sich durch spezielle Integrine, die an einem apikalen Aktin-Ring sitzen, an die Knochenoberfläche und bilden so einen extrazellulären Reaktionsraum unterhalb des Osteoklasten. Die Sekretion von HCl demineralisiert den Knochen, so dass die nunmehr freiliegenden kollagenen Strukturen von sezernierten lytischen Enzymen abgebaut werden können. (Modifiziert nach E. und P. Barret, Medical Physiology, 2005.)

Obwohl der Zelltypus der Osteoklasten traditionell dem Knochengewebe zugeschrieben wird, ist die Resorption von Hartgewebe jedoch nicht nur im Knochen, sondern ebenso an den Zähnen zu finden (PIERCE, 1989). Manche Autoren beschreiben re-

sorbierende Zellen, die spezifisch im Gebiss auftreten, als Odontoklasten (NE ET AL., 1999). Eine präzise physiologische Unterscheidung von Odontoklasten und Osteoklasten ist bisher jedoch nicht erfolgt. Da die Resorption gesunden Zahnmaterials im Gegensatz zur Resorption von Knochen des Weiteren nur als Folge einer pathologischen Einwirkung zu finden ist (VARDIMON ET AL. 1993), ist es fraglich, ob es den speziellen Typus der Odontoklasten überhaupt gibt. Während lediglich eine Arbeit einen deutlichen Unterschied zwischen Osteoklasten und Odontoklasten sieht (LASFARGUES UND SAFFAR, 1993), gehen die meisten Veröffentlichungen von identischen Zelllinien aus (SASAKI ET AL., 1988; BREZNIAK UND WASSERSTEIN, 2002; MEIKLE 2006). Bei den lediglich an der Zahnoberfläche beobachteten Odontoklasten scheint es sich daher vielmehr um Osteoklasten des Periodonts zu handeln.

#### 2.2.2.4 Knochenumbau

Die osteoklastäre Knochenresorption ist in der Regel an eine anschließende Neusynthese geknüpft (Abb. 2.2) und für das funktionsfähige Skelettsystem von vitaler Bedeutung. Dieses so genannte "bone remodeling" ermöglicht das Wachstum und erlaubt dem ausgewachsenen Körper, notwendige Anpassungen des Stützgewebes oder Reparaturen desselben vorzunehmen (RODAN UND MARTIN, 1981). Das Verhältnis von Resorption zu Formation entscheidet hierbei über den Zustand des Skeletts. Im Wachstum überwiegt die Knochenformation. Im gesunden ausgewachsenen Organismus halten sich die Formation und die Resorption die Waage. Im Alter neigt sich das Gleichgewicht häufig in Richtung des Knochenabbaus, Alters-Osteoporose ist die Folge. Trotz der Steifheit und Stabilität kann man beim Knochen also nicht von einem starren Gebilde sprechen. Vielmehr erneuert sich das gesamte Skelett eines Menschen aufgrund dieser "Verjüngungskur" ständig. Man geht von einem durchschnittlichen Wechsel von 25 Prozent des trabekulären und 3 Prozent des kortikalen Knochens pro Jahr aus. In einem Zeitraum von 7 bis 10 Jahren entspricht dies einer Erneuerung der kompletten Skelettmasse (PORRAS, ET AL., 1999; COHEN, JR., 2006). Knochen stellen das größte Reservoir des Körpers für Kalzium und Phosphat dar. Dem Knochenumbau wird dementsprechend auch eine Funktion der Kalziumhomöostase zugeschrieben (HARADA UND RODAN, 2003).

Wichtig für einen funktionierenden Knochenumsatz ist also die gesteuerte Koppelung der Resorption an die funktionelle Neusynthese von Knochenmaterial ("coupling")

(RODAN UND MARTIN, 1981). Diese Koppelung ist ein hochkomplexer und nicht abschließend geklärter Prozess. So besitzt beispielsweise das Parathormon (PTH) sowohl eine stimulierende Wirkung auf die Osteoklastendifferenzierung, aber eine ebensolche auch auf die Differenzierung mesenchymaler Vorläuferzellen in Präosteoblasten. Zusätzlich hemmt PTH die Apoptose bereits ausgereifter Osteoblasten. Diese Funktion von PTH als Stimulans der Resorption, aber auch der Formation von Knochen, weist diesem Hormon eine Schlüsselstelle in der Knochenphysiologie zu. Weitere bedeutende Rollen werden dem systemischen Hormon 1,25(OH)<sub>2</sub>-Vitamin-D<sub>3</sub> und den lokalen Hormonen und Zytokinen Osteoprotegerin (OPG) und Rezeptor-Aktivator vom Nukleären Faktor κB (RANK) zugeschrieben (MUNDY ET AL., 2003).

Auch den skelettalen Belegzellen ("bone lining cells") wird eine Rolle in dieser Koppelung zugeschrieben. Bekannt ist, dass diese Zellen OPG sezernieren und Rezeptoren für RANKL, PTH und 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> besitzen. Denkbar ist deshalb eine Aufgabe in der Steuerung der Osteoklastogenese (LIAN ET AL., 2003).

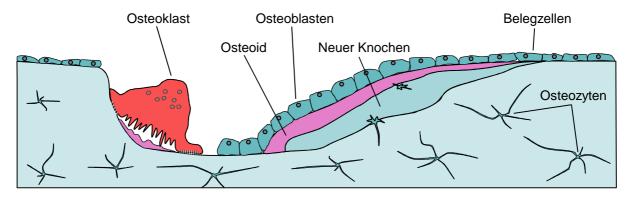


Abb. 2.3: Schema des Knochenumbaus. Der inaktive Knochen ist von flachen Belegzellen bedeckt. Aktive Osteoklasten resorbieren den Knochen und bilden typische Resorptionslakunen. Gruppen von Osteoblasten füllen diese Lakunen mit Osteoid auf, welches nachfolgend mineralisiert. In diesen neuen Knochen werden einige der Osteoblasten eingeschlossen, die daraufhin zu Osteozyten differenzieren.

# 2.2.2.5 Knochenumbau während der Zahnbewegung

Sowohl die natürliche, als auch die iatrogene Zahnbewegung benötigt den zellulären Mechanismus des Knochenumbaus zur Anpassung der Alveolen im Zahnhalteapparat. Die Art des Alveolenumbaus ist hierbei von der Art der Zahnbewegung abhängig. Die Milchzähne des Menschen sind okklusal nicht vom Kieferknochen bedeckt, so dass in der natürlichen Zahnbewegung der Durchbruch durch die Kieferschleimhaut im Zuge einer Druckatrophie erfolgt, die nicht an einen Knochenabbau gebunden ist.

Jedoch muss auch hier die Alveole an die Zahnwurzel angepasst werden, um dem Zahn einen sicheren Halt im Kiefer zu ermöglichen. Im Gegensatz hierzu sind die Zahnanlagen des bleibenden Gebisses völlig von Knochengewebe umschlossen. Sie liegen im Kiefer direkt unterhalb der entsprechenden Zähne des Milchgebisses. Für den Durchbruch dieser Zähne ist also eine osteoklastäre Resorption des bedeckenden Knochens und der Wurzel des Milchzahnes notwendig. Der nachfolgende Zahn schiebt den nunmehr geschwächten Milchzahn aus dem Kiefer und füllt die entstandene Lücke aus.

Die Anpassung der Alveole in der kieferorthopädischen Zahnbewegung folgt demselben Mechanismus. Allerdings ist die Richtung der notwendigen Zahnbewegung und somit die Richtung des Knochenumbaus vom Zustand des Gebisses abhängig. Die rein vertikale Bewegung des Zahndurchbruchs wird hier durch multidirektionale Bewegungen innerhalb des Kiefers ergänzt.

Während der Umbauprozesse der Alveolen können aber auch der Wurzelzement oder oberflächliches Dentin von Odontoklasten/Osteoklasten resorbiert werden. Hierbei spricht man von Wurzelresorption (Oppenheim, 1912; Roberts et al., 2004) und unterscheidet die laterale von der apikalen Wurzelresorption. Eine laterale Resorption tritt vorwiegend in nekrotisierten Desmodontalabschnitten in Form vereinzelter Resorptionslakunen auf. Die apikale Wurzelresorption führt effektiv zu einer verkürzten Zahnwurzel. Sie ist irreversibel und hat eine bedeutende Funktion während des Zahnwechsels. latrogen tritt sie hauptsächlich durch intrudierende Zahnbewegungen auf (Dausch-Neumann, 1987). Der lateralen Wurzelresorption kann in der natürlichen Zahnbewegung keine Funktion zugeordnet werden, allerdings kann sie in geringem Maße durch Auflagerung von Reparaturzement repariert werden (Magloire et al.; 2001).

## 2.2.2.6 Die Gaumennahterweiterung

Die Gaumennahterweiterung (GNE) stellt ein in der Kieferorthopädie etabliertes Verfahren zur skelettalen Erweiterung der Maxilla entlang der Sutura palatina mediana dar. Diese Technik wird bei einem oberen Kieferengstand eingesetzt. Die ursprüngliche Apparatur zur Gaumennahterweiterung von Angell (ANGELL, 1860) wurde von verschiedenen Kieferorthopäden jeweils an den aktuellen Wissensstand angepasst (GODDARD, 1893; SCHÖNHERR, 1955; HAAS, 1961; BIEDERMANN, 1968; HICKS, 1978;

ASANZA ET AL., 1997; MOMMAERTS, 1999; CIAMBOTTI ET AL., 2001). In den Grundzügen ähneln sich diese Apparaturen jedoch alle. Meist handelt es sich um eine festsitzende Zahnklammer, die sich an den Molaren abstützt und so ihre Kraft auf den Kiefer appliziert. Die Adaption der Kraft auf die erfolgte Kieferweitung erfolgt über eine aktivierbare Hyrax-Schraube, die die beiden Klammerhälften miteinander verbindet. Die GNE ist mit einer Dauer von wenigen Monaten eine kurze Therapie, in der jedoch hohe Kräfte auf den Kiefer wirken. Da der erwünschte skelettale Effekt über eine Kraftapplikation auf die Verankerungsmolaren erfolgt, sind dentale Nebenwirkungen eine klinisch unerwünschte Begleiterscheinung. Bukkalkippung und Extrusion (Kahl-Nieke, 2001), aber auch Lockerung oder Veränderungen des Parodontiums (HICKS, 1978; BARBER UND SIMS, 1981; LANGFORD UND SIMS, 1982; ODENRICK ET AL., 1982, 1991) gehören dazu. Auch das Auftreten von Schmerzen im Gaumen und/oder der Nase wird beschrieben (NEEDLEMAN ET AL., 2000). Diese Effekte sind alle reversibel und klinisch akzeptabel. Trotz der genannten, häufigen Nebenwirkungen überwiegen die positiven klinischen Effekte (BIEDERMANN, 1968; HAAS, 1980; MOSSAZ-JOELSON UND MOSSAZ, 1989; ASANZA ET AL., 1997). Sie sind ein starkes Argument für den Einsatz dieser Technik, so dass die Methode der GNE breit und mit Erfolg eingesetzt wird.

Die Gaumennahterweiterung wird zur Untersuchung der kieferorthopädischen Zahnbewegung benutzt, da für diese Methode ein, in kieferorthopädischen Maßstäben, relativ einfaches Apparatur-Design ausreicht. Tierexperimentell wurde die kieferorthopädische GNE bisher für verschiedene Fragestellungen an Hunden, Katzen, Ratten und Kaninchen durchgeführt (Debbane, 1958; Cleall, 1965; Gardner und Kronman, 1971; Brosman et al., 1973; Vardimon et al., 1998; Delaurier et al., 2008). All diese Studien bezogen sich jedoch auf den skelettalen Effekt der Kieferweitung und berücksichtigten nicht die Problematik der dentalen Schädigungen. Lediglich zwei Studien von Vardimon et al. (1993; 2005) weisen auf das Auftreten von Wurzelresorption als Folge der GNE hin. Wegen der geringen Größe des Untersuchungsobjekts gibt es bisher kein Modell der GNE in der Maus.

## 2.2.3 Eingeschränkte Resorption von Osteoklasten

## 2.2.3.1 Osteopetrose

Störungen des Knochenstoffwechsels, die zum pathologischen Bild einer erhöhten Knochenmasse führen, werden als Osteopetrose zusammengefasst. Die Ursache ist hierbei immer ein verminderter Knochenabbau. Dieser kann aus einer Störung der Osteoklastendifferenzierung, die zu einer verminderten Anzahl an resorbierenden Osteoklasten führt, oder aber aus einer Störung der Resorptionsaktivität ausgereifter Osteoklasten resultieren.

So führt beispielsweise die Deletion des Gens für den *colony stimulating factor 1* (Csf-1) zu einer verhinderten Differenzierung der Osteoklasten. Die fehlende Expression des Integrins  $\alpha_{\nu}\beta_{3}$ , welches Bestandteil des Actinrings ist, verhindert eine Anheftung des Osteoklasten an die Knochenoberfläche. Ohne die Tyrosin-Kinase Src, die für die Bildung der "*ruffled border*" wichtig ist, kann der Osteoklast keinen Resorptionsraum ausbilden. Eine Defizienz für die Transmembranproteine *T-cell immune regulator 1* (Tcirg1), Bestandteil der ATP-abhängigen vakuolären Protonenpumpe, oder *chloride channel 7* (ClC7), des hierzu korrespondierenden Chloridkanals, welche gemeinsam die Resorptionslakune ansäuern, verhindert die Demineralisierung der Knochenmatrix. Diese Beispiele zeigen Störungen der Knochenphysiologie, die in einer mittleren bis stark ausgeprägten Osteopetrose münden.

#### 2.2.3.1.1 Besonderheit der Tcirg1-abhängigen Osteopetrose

Knochen von Mäusen der Linie oc/oc weisen alle Charakteristika einer manifesten Osteopetrose auf. Diese Tiere sind für das Protein Tcirg1, eine der dreizehn Untereinheiten der vakuolären ATP-abhängigen Protonenpumpe der Osteoklasten, defizient. Zusätzlich zur stark erhöhten Knochenmasse, Anzahl der Osteoklasten und PTH-Konzentration, ist in der unentkalkten Histologie eine massive Erhöhung nichtmineralisierten Osteoids zu erkennen. Diese ausgeprägte Oberflächen- und Volumenosteoidose, die mit einer stark erniedrigten Kalzium-Konzentration im Serum einhergeht, lässt sich nicht am Phänotyp der Osteoklastenstörung erklären. Unsere Analyse via Northern Blot und RT-PCR zeigt jedoch, dass Tcirg1 nicht, wie vormals beschrieben (Nakamura et al., 1997), nur im Osteoklasten, sondern ebenfalls im Magen exprimiert wird. Auch hier sorgen ATP-abhängige Protonenpumpen in Kom-

bination mit Chloridkanälen für eine starke Ansäuerung des Magensafts. Die Mäuse der Linie *oc/oc* zeigten jedoch alle eine ausgeprägte Hypochlorhydrie. Die Untersuchung von embryonalen und neugeborenen Mäusen, die für Tcirg1 defizient waren, zeigt, dass der Phänotyp der Osteoidose erst nach Ende der plazentären Ernährung durch die heterozygote Mutter auftritt. Versuche zur Löslichkeit von Kalzium lassen erkennen, dass für die Kalzium-Aufnahme die Ansäuerung des Magens essentiell ist. Die Pathologie von für Tcirg1 defizienten Mäusen zeigt also nicht nur eine Osteopetrose, sondern zusätzlich eine rachitische Osteomalazie. Man spricht hier von einer Osteopetrorachitis (SCHINKE ET AL., 2009).

# 2.2.3.1.2 Besonderheit der durch die Defizienz von Src hervorgerufenen Osteopetrose

Auch Mäuse der Linie Src -/- zeigen eine manifeste Osteopetrose. Diesen Tieren fehlt das Gen für die Tyrosin-Kinase c-Src. Obschon dieses Gen ubiquitär im Organismus exprimiert wird, entwickeln Tiere dieser Linie lediglich einen starken Phänotyp des Knochens, sind ansonsten aber unauffällig (MARZIA ET AL., 2000). Histologien dieser Tiere zeigen eine deutlich erhöhte Anzahl an Osteoklasten. Diese unterscheiden sich jedoch strukturell von Osteoklasten gesunder Wildtypmäuse, indem sie meist eine längliche Form aufweisen und keine "ruffled border" ausbilden.

Der genaue Wirkmechanismus dieser Tyrosin-Kinase auf den Osteoklasten ist noch nicht aufgeklärt, allerdings erscheint eine Schlüsselstelle im Signalweg, der für das Ausbilden der "ruffled border" und somit der Resorptionslakune notwendig ist, denkbar (EDWARDS ET AL., 2006).

# 2.2.3.2 Bisphosphonate

Medikamente aus der Gruppe der Bisphosphonate sind potente Hemmer der osteoklastären Resorption und damit in der Lage, die Knochenumsatzrate zu vermindern und im gleichen Zuge die durchschnittliche Knochendichte zu erhöhen. Neben dieser hemmenden Wirkung auf die Knochenresorption werden aber auch positive Auswirkungen auf die Knochenformation beschrieben (IGARASHI ET AL., 1994; 1996; PORRAS, 1999; ARLOT ET AL., 2005). Wegen ihrer strukturellen Ähnlichkeit zu Pyrophosphat binden diese Medikamente an das Hydroxylapatit des Knochens und werden von resorbierenden Osteoklasten mit phagozytiert (COXON ET AL., 2008). Man unterscheidet zwischen stickstofffreien und stickstoffhaltigen Bisphosphonaten. Erstere führen im Osteoklasten zu einer Produktion toxischer ATP-Analogons, die den verfrühten Zelltod herbeiführen. Letztere greifen regulierend in den Zellstoffwechsel ein (HMG-CoA-Reduktase) und vermindern auf diese Weise die Resorptionsaktivität der Osteoklasten (ROGERS ET AL., 1999; RESZKA UND RODAN, 2003; GREEN, 2004).

Bisphosphonate werden heutzutage sehr breit in der Osteoporoseprophylaxe eingesetzt, finden aber auch in der Therapie anderer Krankheiten, die mit einer erniedrigten Knochenmasse einhergehen, Anwendung. Als Beispiel sind hier *Osteogenesis imperfecta* und *Morbus Paget* anzuführen. Vorwiegend werden stickstoffhaltige Bisphosphonate wie Alendronat<sup>™</sup> oder Risedronat<sup>™</sup> eingesetzt.

# 2.3 Aufgabenstellung

Ziel dieser Arbeit ist es, die zellulären Mechanismen der Zahnbewegung zu verdeutlichen. Hierfür soll die natürliche Zahnbewegung des Zahndurchbruchs mit der iatrogenen Zahnbewegung während der kieferorthopädischen Behandlung verglichen werden. Besonderes Augenmerk soll hierbei auf die Osteoklasten gerichtet werden, da sie als einzige Zellen des Körpers in der Lage sind, Wurzelresorption zu verursachen. Als Untersuchungsobjekt soll die Maus (*Mus musculus*) dienen, da sie verschiedene Vorteile besitzt und sich deswegen in den letzten Jahren als geeignetes Tiermodell für verschiedenste Fragestellungen etabliert hat.

So gibt es eine hohe Anzahl an verfügbaren genetischen Modellen, die eine Potenzierung der möglichen Fragestellungen ermöglicht. Zusätzlich unterstützt die bereits sehr gut charakterisierte Knochenphysiologie der Maus jegliche Fragestellungen nach der Zahnbewegung. Auch die Rolle der Osteoklasten, auf denen der Schwerpunkt dieser Arbeit liegt, ist für die Knochenbiologie umfassend beschrieben (BOYLE ET AL., 2003), so dass Rückschlüsse auf die Ergebnisse möglich sind.

Für die Untersuchung der zellulären Mechanismen soll zunächst die Analyse der natürlichen Zahnbewegung an gesunden Mäusen und an osteopetrotischen Mäusen die nötigen Kenntnisse der physiologischen Funktion in der Zahnbewegung liefern. Da Mäuse keinen Zahnwechsel durchführen, können die gewonnenen Ergebnisse

nur zu generellen Aussagen zum Zahndurchbruch herangezogen werden. Auf genauere Aussagen zur Zahnbewegung des Wechselgebisses muss daher verzichtet werden.

Nachfolgend soll eine Variante der GNE im Mausmodell entwickelt und etabliert werden. Mit Hilfe dieser Methode soll dann die Rolle der Osteoklasten in der klinischen Zahnbewegung untersucht werden. Zusätzlich soll hierbei der Einsatz von Bisphosphonaten die Ergebnisse stützen.

#### 3 Material und Methoden

# 3.1 Analyse der natürlichen Zahnbewegung

Die natürliche Zahnbewegung, der Zahndurchbruch, wurde zum einen an jungen gesunden unbehandelten Mäusen untersucht, zum anderen an osteopetrotischen Mäusen der Linien Tcirg1 und Src. Die Mäuse dieser beiden Linien besitzen keine funktionsfähigen Osteoklasten und sind stark osteopetrotisch.

## 3.1.1 Versuchsprinzip

Die Untersuchung der natürlichen Zahnbewegung bei gesunden Mäusen erfolgte an C57/BL6-Wildtyp-Mäusen (Charles River WIGA, Sulzfeld), die in vier Gruppen, bestehend aus jeweils fünf Tieren, entsprechend ihres Alters von 2, 4, 7 und 14 Tagen unterteilt wurden. Die Untersuchung der osteopetrotischen, für Tcirg1-defizienten Mäusen erfolgte wegen des zu erwartenden späteren Zahndurchbruchs im Alter von 2, 7, 14 und 21 Tagen an jeweils drei Tieren je Zeitpunkt. Für die Beobachtung der Langzeiteffekte von Osteopetrose auf die natürliche Zahnbewegung wurden aufgrund der nur kurzen Lebenserwartung der für Tcirg1-defizienten Mäuse jeweils drei Tiere der Linie Src im Alter von 1, 4 und 12 Monaten untersucht.

Alle Mäuse wurden euthanasiert und die Schädel präpariert. Das makroskopische Erscheinen der Zähne wurde beschrieben und der Schädel der radiologischen Analyse zugeführt. Danach wurde der Unterkiefer entfernt und verworfen und der Restschädel für die histologische Analyse vorbereitet. Die Auswertung der dentalen Bewegung erfolgte an unentkalkten, mit Toluidin-Blau gefärbten oder nach VonKossa/VanGieson versilberten Schnitten. Die Auswertung der osteoklastären Interaktion erfolgte an entkalkten, TRAP-gefärbten Schnitten.

# 3.1.2 Maushaltung

Die Tiere wurden den Würfen von Zuchtpaaren im entsprechenden Alter entnommen. Die Zuchtpaare wurden unter standardisierten Bedingungen (Scantainer, Scanbur A/S, Karlslunde, Dänemark) bei einem 12stündigen Tag-Nacht-Rhythmus in der Versuchstierhaltung des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf gehalten. Alle

3 Material und Methoden 23

Wildtyp-Mäuse bekamen normale Zucht-Festnahrung und Wasser ad libitum. Die

osteopetrotischen Mäuse der Linien Src und oc/oc bekamen Flüssignahrung (C0199,

Altromin, Lage) und Wasser ad libitum.

3.1.3 Genotypisierung

Die Genotypisierung der für Tcirg1- und Src-defizienten Mäuse erfolgte mithilfe der

Polymerasekettenreaktion (PCR) oder der Methode des Southern-Blottings. Beiden

Methoden ging eine DNA-Gewinnung aus ca. 1 cm langen Schwanzbiopsien voraus.

3.1.3.1 Isolierung von Mausschwanz-DNA

Die Gewinnung von DNA aus Mausschwanzbiopsien erfolgte über einen Verdau des

Gewebes mit anschließender Präzipitation der gelösten DNA. Hierzu wurden die Bi-

opsien mit 700 µl Lysis-Puffer und 50 µl Proteinase K über Nacht bei 37 ℃ im Ther-

momixer (Thermomixer comfort, Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, Deutschland) ver-

daut. Anschließend erfolgte eine Aufreinigung der DNA durch Phenol/Chloroform und

eine Präzipitation durch Isopropanol und Ethanol. Das DNA-Pellet wurde über Nacht

in 50 µl TE resuspendiert.

Lysis-Puffer:

50 mM Tris-HCl, pH 8.0

100 mM EDTA

100 mM NaCl

**1% SDS** 

Proteinase K:

10 µg/ml

TE-Puffer:

10 mM Tris-HCl, pH 7.4

1 mM EDTA

3.1.3.2 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die PCR ist eine etablierte in vitro-Methode, mit deren Hilfe definierte DNA-

Sequenzen enzymatisch synthetisiert werden können. Hierfür erfolgt eine Hitze-

Denaturierung der Matrize, eine passive Anlagerung spezifischer Oligonukleotid-Primer und mittels einer thermostabilen DNA-Polymerase die Synthese der jeweiligen komplementären DNA-Stränge. Die mehrmalige Wiederholung dieser Schritte führt zu einer exponentiellen Anreicherung des gesuchten DNA-Abschnitts.

Für alle PCR-Anwendungen wurde die thermostabile Taq-DNA-Polymerase (Roche, Mannheim) verwendet. Die Kettenreaktion erfolgte im Thermocycler (iCycler, Biorad, München). Für die Genotypisierung via PCR wurden je 100 ng der DNA in folgendem Standardansatz mit 20 µl Gesamtvolumen eingesetzt.

PCR-Mix: 2 µl PCR-Puffer

3 µl Primer 1

3 µl Primer 2

1 µl 10 mM dNTPs

1 µl DMSO

 $8 \mu I H_2O$ 

0,3 µl Taq-Polymerase

PCR-Puffer: 100 mM Tris-HCl, pH 8,6

500 mM KCI

10 mM M<sub>3</sub>Cl<sub>2</sub>

PCR-Programm und Primer-Sequenzen für die Genotypisierung von für *Tcirg1* defizienten Mäusen:

Schritt 1: 4 Minuten bei 94 ℃

Schritt 2: 1 Minute bei 94 ℃

Schritt 3: 1 Minute bei 59 ℃

Schritt 4: 2 Minuten bei 72 ℃

Schritt 5: 10 Minuten bei 72 ℃

Die Schritte 2 bis 4 wurden 36 x wiederholt.

3 Material und Methoden 25

#### Primer-Sequenzen:

Wildtyp-Primer: tcirg3185: 5'-TCT GTT CCC CCT GTT TTG CC-3'

tcirg986: 5´-AAA TCG TAA GGC TGG GTT GTC C-3´

Knock-Out-Primer: tcirg1840: 5'-CAG AGG CAT TTG GTG TCA GTT GTC-3'

tcirg2207: 5'-CCT TTG ATT CCA GCA CTT GAG AGC-3'

PCR-Programm und Primer-Sequenzen für die Genotypisierung *Src-*defizienter Mäusen:

Schritt 1: 4 Minuten bei 94 ℃

Schritt 2: 1 Minute bei 94 ℃

Schritt 3: 1 Minute bei 58 ℃

Schritt 4: 2 Minuten bei 72 ℃

Schritt 5: 10 Minuten bei 72 ℃

Die Schritte 2 bis 4 wurden 38 x wiederholt.

#### Primer-Sequenzen:

Wildtyp-Primer: src1: 5´-AGC AAC AAG AGC AAG CCC AAG GAC-3´

src2: 5´-GTG ACG GTG TCC GAG GAG TTG AAG-3´

Knock-Out-Primer: src1: 5´-AGC AAC AAG AGC AAG CCC AAG GAC-3´

neo: 5'-TCA TAG CCG AAT AGC CTC TCC AC-3'

#### 3.1.3.3 Agarose-Gelelektrophorese

Die Ergebnisse der PCR wurden anhand der Agarose-Gelelektrophorese ausgewertet. Hierzu wurden die PCR-Produkte in Laufpuffer aufgenommen und in 1 %igen Agarosegelen (SeaKem LE Agarose, Cambrex, New Jersey, USA) bei 80 V im elektrischen Feld einer Laufkammer (Sub Cell GT, BIORAD, München) in TAE-Laufpuffer der Größe nach aufgetrennt. Die Gele wurden mit einem Geldokumentationssystem (Gel Doc, Quantity One Vers. 4.2.1, BIORAD, München) fotografiert und ausgewertet.

3 Material und Methoden 26

10 x DNA-Gel-Ladepuffer: 50 % Glyzerin

0,1 % Xylencyanol

0,1 % Bromphenolblau in TE

TAE-Laufpuffer: 0,04 M Tris-Acetat, pH 7,8

1 mM EDTA

#### 3.1.3.4 Southern-Blotting

Für die Genotypisierung mittels Southern-Blotting wurden 8-10 µg der zu untersuchenden DNA mit 1µl RNAse im entsprechenden Puffer über Nacht verdaut und anschließend in einem Agarose-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Das Gel wurde danach für 15 Minuten in 0,25 M HCl inkubiert, mehrfach mit Wasser gespült und dann für weitere 15 Minuten in 0,4 M NaOH equilibriert. Die DNA wurde mit 0,4 M NaOH über Nacht via Kapillartransfer auf eine Membran (Hybond-N<sup>+</sup>, GE-Healthcare, München) übertragen. Nach dem Transfer wurde die Membran für 15 Minuten in 2 x SSC gewaschen und anschließend getrocknet. Für die radioaktive Markierung der DNA wurde jeweils die entsprechende DNA-Sonde mit dem rediprime<sup>TM</sup>II-Kit (Amersham, #1634, GE-Healthcare, München) hergestellt. Zum Blockieren von unspezifischen Bindungsstellen wurde die Membran 30 min bei 68°C in Hybridisierungspuffer vorhybridisiert. Die Hybridisierung mit der denaturierten Sonde erfolgte in einem Rotationsofen (Hybrilinker HL-2000, UVP, Inc., Upland, CA, USA) bei 68℃ über Nacht. Unspezifisch gebundene Sonde wurde durch mehrfaches Waschen mit Waschlösung 1 und 2 entfernt. Die Membranen wurden, je nach Signalstärke, für 2-48 Stunden auf Röntgenfilmen (Kodak X-OMAT AR Film, Eastman Kodak Company, Rochester, New York, USA) exponiert. Die Filme wurden in der Röntgenentwickler-Maschine (OPTIMAX, PROTEC, Oberstenfeld) entwickelt.

20 x SSC: 3 M NaCl

0,3 M Natriumcitrat

pH 7,0, steril autoklaviert

Hybridisierungspuffer: 330 mM Natriumphosphat

6,6 % SDS

100 μg/ml Heringssperma-DNA (Roche, #1467140)

Waschlösung 1: 2 x SSC

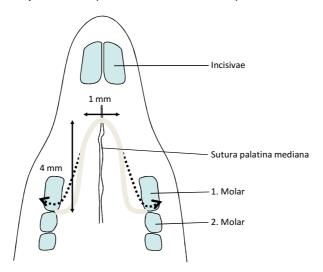
0,1% SDS

Waschlösung 2: 0,2 x SSC

0,1% SDS

# 3.2 Analyse der kieferorthopädischen Zahnbewegung

Die kieferorthopädische Zahnbewegung erfolgte an acht Wochen alten C57BL/6-Mäusen. Für diese künstliche Zahnbewegung musste zuerst eine standardisierte Zahnklammer hergestellt werden, die eine reproduzierbare und konstante Expansionskraft gewährleistet. Modernes kieferorthopädisches Drahtmaterial aus Sentalloy™ (GAC, Bohemia, NY, USA) besitzt ein konstantes Kraftplateau mit einem geringen E-Modul (Yoneyama, 1992). Mit Hilfe einer speziell für diesen Zweck angefertigten Zange wurden identische Zahnklammern aus 0.16 Zoll starkem Sentalloy™ hergestellt. Abbildung 3.1 zeigt eine schematische Skizze der hergestellten GNE-Apparatur. Sie wurde interdental zwischen den ersten und zweiten Molaren verankert, so dass der Draht sich an den distopalatinalen Höckern abstützte und einen nach distal offenen Loop bildete (Korbmacher, 2006).



**Abbildung 3.1:** Schematische Darstellung der murinen GNE-Apparatur. Die Zahnklammer wird interdental zwischen den ersten und zweiten Molaren verankert. (Untersicht auf den Oberkiefer.)

Um die Reproduzierbarkeit zu überprüfen, wurden jeweils zehn Klammern, die im Zeitraum von drei Wochen hergestellt wurden, *in vitro* in einen präparierten Mäuseoberkiefer eingesetzt und die dabei auftretenden Expansionskräfte mit einer CorrexWaage (Haag Streit, Bern, Schweiz) gemessen und mittels t-Test miteinander verglichen.

## 3.2.1 Versuchsprinzip und -protokoll

Die Untersuchung der kieferorthopädischen Zahnbewegung erfolgte an gesunden, acht Wochen alten C57/BL6-Wildtyp-Mäusen (Charles River WIGA, Sulzfeld), die in drei Gruppen unterteilt wurden.

Kontrolle: Diese Mäuse erhielten keine GNE-Apparatur.

**GNE**: Den Mäusen dieser Gruppe wurde für den Zeitraum von 14 Tagen die GNE-Apparatur eingesetzt.

**GNE + BP**: Den Mäusen der dritten Gruppe wurde zusätzlich zur GNE-Apparatur systemisch das Bisphosphonat Alendronat (Merck Research Laboratories, Rahway, NJ, USA) verabreicht.

Den Tieren der Gruppen GNE und GNE + BP wurde die GNE-Apparatur am Tag 0 unter Narkose [1,2 % Ketamin (Gräub AG, Bern, Schweiz), 0,016 %, Rompun (Bayer, Leverkusen), 0,9 % NaCl in Aqua<sub>inj</sub> (Braun, Melsungen)] eingesetzt.

Der dritten Versuchstiergruppe (GNE + BP) wurde systemisch Alendronat sodium gegeben, um die Rolle der Osteoklasten während der kieferorthopädischen Zahnbewegung zu untersuchen. Alendronat sodium wurde in physiologischer Kochsalz-Lösung (Braun, Melsungen) aufgenommen (STABNOV et al, 2002) und den Tieren in einer Konzentration von 100 µg/kg/Tag mittels subkutan implantierter osmotischer Pumpe (Alzet Osmotic Pump 1002, Alzet, DURECT Corporation, Cupertino, CA, USA) verabreicht.

#### 3.2.2 Maushaltung

Die Tiere wurden jeweils zu fünft unter standardisierten Bedingungen (Scantainer, Scanbur A/S, Karlslunde, Dänemark) bei einem 12stündigen Tag-Nacht-Rhythmus in

3 Material und Methoden 29

der Versuchstierhaltung des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf gehalten. Alle

Mäuse bekamen standardisierte Flüssignahrung CO199 (Altromin, Lage) und Wasser

ad libitum. Die Tiere wurden mehrmals täglich beobachtet, um eventuelle Verhal-

tensauffälligkeiten festzustellen. An Tag 0 und Tag 14 wurden die Mäuse gewogen.

Die Tierversuche wurden von der Tierschutzkommission der Behörde für Umwelt und

Gesundheit der Freien und Hansestadt Hamburg genehmigt (Tierversuchsgenehmi-

gungsnummer 81/03).

3.2.3 Calceinmarkierung

Sieben und zwei Tage vor Entnahme der Mäuse wurde den Tieren zur Markierung

neu gebildeter Knochenmatrix 100 µl Calcein-Injektionslösung injiziert (VIGNERY UND

BARON, 1980).

Calcein-Injektionslösung: 0,015 M NaCl

2 % NaHCO<sub>3</sub>

1 % Calcein w/v

Sterilfiltriert

3.3 Radiologische und histologische Auswertungen

3.3.1 Radiologische Auswertung

In beiden Versuchsansätzen erfolgte ein Teil der Auswertung mithilfe der radiologi-

schen Bildgebung. Hierfür wurden die zweidimensionale Kontaktradiographie und die

dreidimensionale hochauflösende Computertomographie (µCT) herangezogen.

3.3.1.1 Kontaktradiographie

Für die Kontaktradiographie wurden die operierten Mäuse oder präparierten Schädel

auf einen Röntgenfilm (Mamoray HDR PQ, AGFA, Köln) gelegt und für 2 Sekunden

mit einer angelegten Spannung von 35 kV bestrahlt. Die Filme wurden anschließend

im Entwickler (Optimax, PROTEC, Oberstenfeld) entwickelt und auf einem Durch-

lichttisch (hama, Monheim) fotografiert. Die Auswertung erfolgte am Computer mit

dem Programm ImageTool 3.00 (UTHSCSA, Texas, USA).

#### 3.3.1.2 µCT

Eine computertomographische Darstellung des Schädels erfolgte anhand des  $\mu$ CT 40 (Scanco Medical, Bassersdorf, Schweiz) bei einer Intensität von 45 keV und 88  $\mu$ A. Die Schichtdicke und Voxelgröße betrug 31  $\mu$ m. Für die Analyse der Datensätze wurde das Evaluationsprogramm V4.4 A (Scanco Medical, Bassersdorf, Schweiz) eingesetzt.

#### 3.3.2 Histologie

Die histologische Auswertung erfolgte anhand von unentkalkten und entkalkten Schnitten. Die präparierten Schädel wurden für 24 Stunden in 3,7%iger Formaldehyd-Lösung fixiert, danach in 80 %igem Ethanol bis zur Weiterverarbeitung gelagert.

Für die Analyse des Zahndurchbruchs wurden die Schädel mit einer Diamantsäge (E310, Exakt, Norderstedt) von Rostral nach Okzipital halbiert. Eine Hälfte wurde für die entkalkte Histologie für vier Tage bei 37 ℃ im Inkubator (Memmert, Schwabach) in 20 % EDTA (Boehringer, Mannheim) belassen und dann im Infiltrationsautomaten (Autotechnikon, Bavimed, Birkenau) in einer aufsteigenden Alkoholreihe innerhalb 24 Stunden entwässert. Die andere Hälfte wurde direkt im Infiltrationsautomaten entwässert.

Für die Analyse der Odontombildung in osteopetrotischen Mäuse der Linie Src wurde der vordere Teil des Oberkiefers sagittal halbiert. Danach wurden die Präparate im Infiltrationsautomaten entwässert.

Für die Analyse der kieferorthopädischen Zahnbewegung wurde mithilfe der Diamantsäge aus jedem Mäuseschädel medial eine ca. 4 mm dicke Scheibe des harten Gaumens herausgeschnitten. Die Scheiben der Hälfte der zu untersuchenden Mäuseschädel wurden für die entkalkte Histologie für vier Tage bei 37 ℃ entkalkt und dann im Infiltrationsautomaten entwässert. Die andere Hälfte wurde für die unentkalkte Histologie ohne Behandlung direkt im Infiltrationsautomaten entwässert.

#### 3.3.2.1 Unentkalkte Histologie

Die entwässerten Präparate wurden mit Infiltrationslösung (Methylmetacrylat (Merck, Darmstadt) mit 0,3 % Benzoylperoxid (Merck, Darmstadt) und 10 % Nonylphenol (Fluka, Buchs, Schweiz)) infiltriert und anschließend in flüssiges Acrylat (Methylmet-

acrylat mit 0,5 % Benzoylperoxid, 10 % Nonylphenol und 0,2 % N,N-Dimethyl-P-Toluidin) gegossen. Nach dem Aushärten der Blöcke wurde aus ihnen 3 µm und 12 µm dicke Schnitte an einem Rotationsmikrotom (Microtec Cut 4060 E, MicroTech, München) angefertigt und auf Objektträger überführt.

Die 3 μm dicken Schnitte wurden zur Hälfte für die Zellanalyse mit Toluidin-Blau (1 % Toluidin-Blau O, Sigma, Taufkirchen) gefärbt. Die andere Hälfte wurde für eine Analyse des Mineralisierungszustands der Knochen nach VonKossa versilbert und nach VanGieson gegengefärbt (Sheehan und Hrapchak, 1980). Die 12 μm dicken Schnitte dienten der dynamischen Histomorphometrie mit Calceinmarkierungen und wurden nicht gefärbt. Anschließend wurden alle Schnitte mit DPX (Fluka, Buchs, Schweiz) eingedeckt.

#### 3.3.2.2 Entkalkte Histologie

Die entwässerten Präparate wurden erst mit Xylol (SDS, Darmstadt), dann für 6 Stunden mit flüssigem Paraffin infiltriert und anschließend in Gießformen zu Paraffinblöcken gegossen. Aus den Blöcken wurden 4 µm dicke Schnitte am Schlittenmikrotom (1208, Reichert & Jung, Heidelberg) angefertigt und auf Objektträger überführt.

Das Anfärben der Osteoklasten erfolgte über eine TRAP (Tartrat-resistente saure Phosphatase) -Färbung (BARTONICEK UND LOJDA, 1964).

Die Auswertung der Schnitte erfolgte mit dem Lichtmikroskop (Axioskop II, Carl Zeiss, Jena). Die nichtgefärbten Calcein-Schnitte wurden unter UV-Licht (AttoArc2 HBO, Carl Zeiss, Jena) ausgewertet. Der Dokumentation und Auswertung diente eine angeschlossene Digitalkamera (AxioCam HR Color, Carl Zeiss, Jena) und das Programm AxioVision 3.1 (Carl Zeiss Vision GmbH, Jena).

#### 3.3.3 Histomorphometrie

Die Histomorphometrie wurde mithilfe des Programms ImageTool 3.00 (UTHSCSA, Texas, USA) nach internationalem Standard der ASBMR (PARFITT et al. 1987) quantitativ ausgewertet.

Folgende Parameter wurden an der Histologie des Kieferknochens und der Zahnwurzel bestimmt:

- Dicke des okklusalen Kieferknochens (occlusal bone thickness; OccBTh in mm): Die durchschnittliche Dicke des Kieferknochens direkt okklusal zur Zahnkrone.
- Länge des Zahnes (tooth length; TL in mm): Die durchschnittliche Länge des mineralisierten Zahnes.
- Dicke der Dentinschicht (dentine thickness; DenTh in mm): Die durchschnittliche Dicke der mineralisierten Zahnmatrix.
- Durchbruchsrate (eruption rate; ErR): Anteil der durchgebrochenen Zähne.
- Anzahl der Osteoklasten am okklusalen Kieferknochen (number of osteoclasts per occlusal bone parameter; NOc/OccB): Dieser Wert gibt die mittlere Anzahl an resorbierenden Osteoklasten pro mm am okklusalen Kieferknochen wider.
- Anzahl der Osteoklasten an der Oberfläche der Alveole (number of osteoclasts per alveolar bone; NOc/AlvB): Die Anzahl der Osteoklasten in der gesamten Alveole abzüglich NOc/OccB.
- Wurzelresorptionsrate (number of resorption; NR in Prozent): Die Wurzelresorptionsrate gibt den Anteil der von Wurzelresorption betroffenen Zähne im Verhältnis zur Gesamtanzahl untersuchter Zähne wieder.
- Resorbierte bukkale Wurzeloberfläche (eroded surface per tooth surface;
   ES/TS in Prozent): Der prozentuale Anteil der resorbierten bukkalen Wurzeloberfläche zur gesamten bukkalen Wurzeloberfläche.
- Anzahl der Osteoklasten pro bukkale Wurzeloberfläche (number of osteoclast per root surface; NOc/RS): Dieser Wert gibt die Anzahl der Osteoklasten pro bukkale Wurzeloberfläche wieder.
- Lakunentiefe (lacunae depth; LcDe): Die durchschnittliche Tiefe der durch Wurzelresorption resorbierten Lakunen.

Die Analyse der dynamischen Histomorphometrie erfolgte an ungefärbten 12 µm dicken Schnitten unter UV-Licht. Folgende Parameter wurden anhand der Sutur und der Zahnwurzel gemessen:

 Mineralisationsaktivität (mineral apposition; MA in Prozent): Dieser Wert zeigt den prozentualen Anteil der calceinmarkierten Resorptionslakunen in Relation zur Gesamtlakunenzahl.

Pro untersuchten Parameter lagen mindestens fünf Mäuse vor. Die dargestellten Werte für Anzahlen geben jeweils den Mittelwert einer Gruppe wieder. Bei Messungen von Gewebestrecken wurde zunächst der Mittelwert für jeden untersuchten Schnitt festgestellt.

## 3.3.4 Statistik

Die Untersuchung nach statistischen Unterschieden der einzelnen Gruppen wurde mit Hilfe des Student's t-Test berechnet. Die Bestimmung der Signifikanz der Wurzelresorptionsrate und der Mineralisiationsaktivität wurde anhand des Chi-Quadrat-Tests durchgeführt. Die Signifikanzgrenzen wurden bei beiden Untersuchungsmethoden auf p  $\leq$  0,05 festgelegt. Zur Graduierung der Signifikanz wurden folgende zusätzliche Einstufungen gewählt: \* p  $\leq$  0,05; \*\* p  $\leq$  0,01; \*\*\* p  $\leq$  0,001. Die Fehlerbalken der Abbildungen geben die jeweilige Standardabweichung wieder.

# 4 Ergebnisse

## 4.1 Natürliche Zahnbewegung

## 4.1.1 Zeitpunkt des Zahndurchbruchs

Da eine osteoklastäre Resorption des Kieferknochens in der natürlichen Zahnbewegung lediglich in der ossären Phase vonnöten ist, definiert der Übertritt in die gingivale Phase den eigentlichen Zeitpunkt des Zahndurchbruchs. Abbildung 4.1 zeigt die Unterteilung dieser beiden Phasen schematisch.

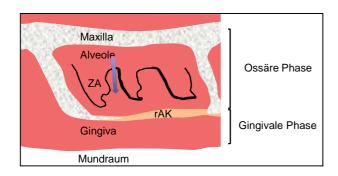
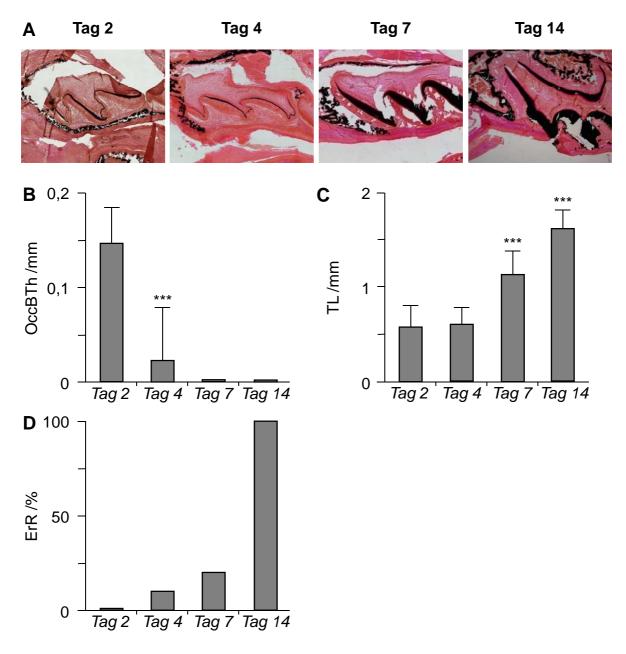


Abbildung 4.1: Schematische Darstellung des Zahndurchbruchs eines Molaren. Der Zahn bewegt sich während seines Wachstums aus der Alveole heraus. Das Austreten des sich entwickelnden Zahns aus der Alveole definiert das Ende der ossären Phase und den Beginn der gingivalen Phase. Der Pfeil zeigt die Bewegung des Zahns. (ZA, Zahnanlage; rAK, resorbierter Alveolarknochen)

Der Zahndurchbruch der murinen Incisivae erfolgt schneller als der der Molaren. Erstere sind makroskopisch bereits ab dem vierten Tag nach der Geburt, spätestens aber nach sieben Tagen sichtbar. Die Molaren erscheinen makroskopisch frühestens ab dem vierzehnten Tag. Histologisch betrachtet zeigt sich, dass der eigentliche Zahndurchbruch der Molaren zwischen dem siebten und dem vierzehnten Tag postnatal stattfindet (Abb. 4.2 A).

Die Molaren sind anfangs vollkommen von mineralisiertem Kieferknochen eingeschlossen. Dieser ist okklusal jedoch bereits am vierten postnatalen Tag abgebaut, so dass nur noch eine bindegewebige Deckschicht im Zahnfleisch zu erkennen ist. Mit zunehmender Mineralisierung wachsen die Zähne aus der Alveole heraus.



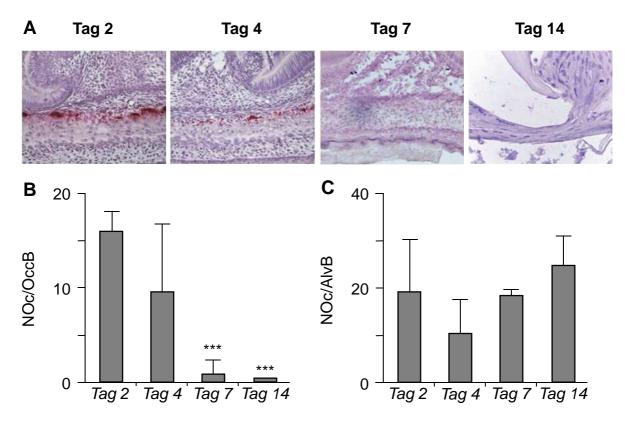
**Abbildung 4.2:** Zahndurchbruch bei gesunden Tieren. **A.** Zeitlicher Ablauf des Zahndurchbruchs beim 1. Molaren. Der Zahndurchbruch passiert zwischen Tag 7 und Tag 14. Ab Tag 7 nimmt die Dicke der mineralisierten Dentinschicht deutlich zu. (Kossa-Färbung, 50-fache Vergrößerung.) **B.** Durchschnittliche Dicke des die Molaren bedeckenden Kieferknochens (OccBTh: Occlusal bone thickness). An Tag 4 wurde nur noch bei 20 % der untersuchten Tiere eine durchgängige Knochenmatrix über dem 1. Molaren gefunden. **C.** Mittlere Länge des 1. Molaren (TL: Tooth Length). Ab Tag 7 deutliche Zunahme und Wurzelbildung (Tag  $2 = 0.6 \pm 0.2$  mm; Tag  $4 = 0.7 \pm 0.1$  mm; Tag  $7 = 1.1 \pm 0.2$  mm; Tag  $14 = 1.6 \pm 0.2$  mm). **D.** Durchbruchsrate (ErR: Eruption Rate). An Tag 7 wiesen 20 % der Tiere bereits durchgebrochene Zähne auf, an Tag 14 alle Tiere.

Messbare, mineralisierte, durchgängige Knochenmatrix war komplett nur bis Tag 2 vorhanden, an Tag 4 wies nur noch ein Tier der Untersuchungsgruppe eine durchgehende Knochenschicht über dem Zahn auf, bei den übrigen Tieren war diese bereits verschwunden. Die Dicke der Knochenschicht betrug am Tag 2 durchschnittlich  $0,14 \pm 0,04$  mm, am Tag 4 im Mittel  $0,02 \pm 0,06$  mm (Abb.4.2 B).

Die Längenzunahme des sich bildenden Zahnes gilt als Maß für den Zahndurchbruch, da sich die Zahnwurzel nur bei ausreichendem Platz bilden kann. Ab Tag 7 kam es zu einer signifikanten Zunahme dieser Länge. Zu diesem Zeitpunkt waren bereits 20 % der untersuchten Zähne durchgebrochen. An Tag 14 waren alle untersuchten Zähne aus dem Kiefer herausgewachsen und zeigten gut ausgebildete Wurzeln (Abb. 4.2 C und 4.2 D).

## 4.1.2 Osteoklastäre Aktivität während des Zahndurchbruchs

Bereits an Tag 2 ist eine relativ hohe Zahl an aktiven Osteoklasten am Alveolardeckel zu erkennen (15,7  $\pm$  2,3), die sich mit fortschreitender Resorption des die Molaren bedeckenden Knochens ab Tag 7 rasch signifikant verringert. An Tag 14 ist direkt okklusal keine osteoklastäre Aktivität mehr zu erkennen (Abb. 4.3 A und B).

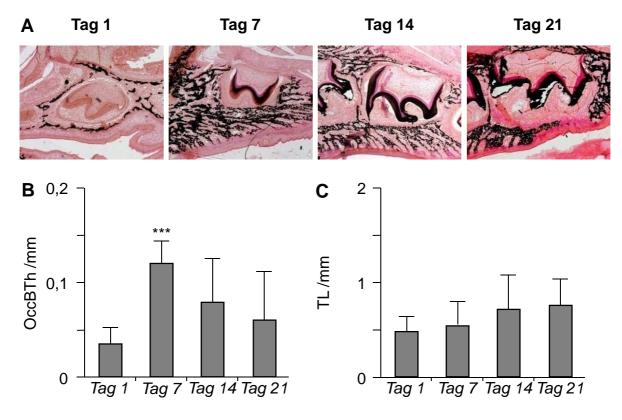


**Abbildung 4.3: A.** Repräsentative Darstellung der osteoklastären Aktivität am okklusalen Kieferknochen. (TRAP-Färbung, 200-fache Vergrößerung) **B.** Anzahl der resorbierenden Osteoklasten am okklusalen Kieferknochen (NOc/OccB: Number of osteoclasts/occlusal bone). Ein signifikanter Unterschied zum vorausgehenden Messpunkt konnte nur an Tag 7 und Tag 14 festgestellt werden. (Tag  $2=15,7\pm2,3$ ; Tag  $4=9\pm7,9$ ; Tag  $7=0,8\pm1,8$ ; Tag  $14=0\pm0$ ; \*\*\* p<0,001 **C.** Anzahl der Osteoklasten im Alveolengrund (NOc/AlvB: Number of osteoclasts/alveolor bone). Die Werte an den vier Zeitpunkten unterscheiden sich nicht signifikant.

Die Aktivität der Osteoklasten beschränkt sich nicht alleine auf die Resorption des Alveolardeckels. In der gesamten Alveole sind aktive Osteoklasten nachweisbar. Setzt man die Zahl der Osteoklasten in der Gesamten Alveole in Relation zur Zahl der Osteoklasten am Alveolardeckel, zeigt sich kein deutlicher Unterschied (Abb. 4.3 C).

## 4.1.3 Zahndurchbruch bei Osteopetrose

Die untersuchten für Tcirg1 defizienten und osteopetrotischen Mäuse zeigten im Untersuchungszeitraum keinen Zahndurchbruch. Allerdings ist das osteopetrotische Symptom der erhöhten Knochenmasse bei diesen Mäusen bereits nach einer Woche am Alveolarknochen zu erkennen, der sich stark vom Kiefer der Wildtyp-Mäuse unterscheidet (Abb. 4.4, vgl. Abb. 4.1).



**Abbildung 4.4:** Verzögerter und gestörter Zahndurchbruch des 1. Molaren bei osteopetrotischen Mäusen. **A.** Die verringerte Resorptionfähigkeit der Osteoklasten Tcirg1-defizienter Mäuse verhindert die Ausbildung des Durchbruchskanals, die Zahnwurzel kann nicht ausgebildet werden. Der Zahndurchbruch wird verhindert. (Kossa-Färbung, 5-fache Vergrößerung.) **B.** Durchschnittliche Dicke des die Molaren bedeckenden Kieferknochens bei osteopetrotischen Mäusen (OccBTh: Occlusal bone thickness). Die Zunahme an Knochendicke ist zwischen Tag 1 und Tag 7 signifikant (p < 0,001). **C.** Mittlere Länge des ersten Molaren (TL: Tooth Length). Es konnte innerhalb des Untersuchungszeitraums keine signifikante Veränderung gemessen werden.

Im Gegensatz zu den Wildtyp-Mäusen nimmt die Dicke des Alveolardeckels bis zum Tag 7 signifikant zu (Abb. 4.4 B). Der Zahndurchbruch wird dadurch so stark verzögert, dass sich die Molaren selbst an Tag 21 noch in der ossären Phase befinden und der Durchbruch nicht vollführt ist (Abb. 4.4 C). Eine erkennbare Zahnwurzel ist ebenfalls nicht ausgebildet. Eine Resorption des okklusalen Kieferknochens kann erst ab Tag 21 beobachtet werden (vgl. Abb. 4.1).

Die Röntgenanalyse von Mäusen, die für Src defizient sind, zeigt eine zunehmende Opazität des Schädels, vor allem im Bereich der Kiefer (Abb. 4.5 A). Die zweidimensionale Darstellung von Datensätzen aus dem µCT zeigt hierbei im Vergleich zu den Kontrolltieren lediglich rudimentäre Zähne, die in massivem Kieferknochen eingeschlossen sind (Abb. 4.5 B).

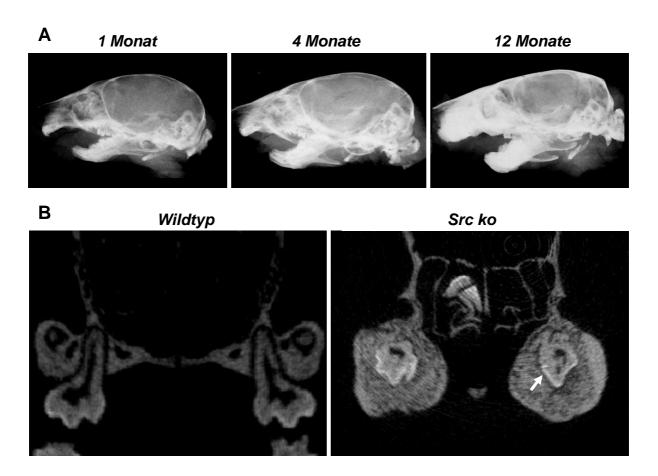
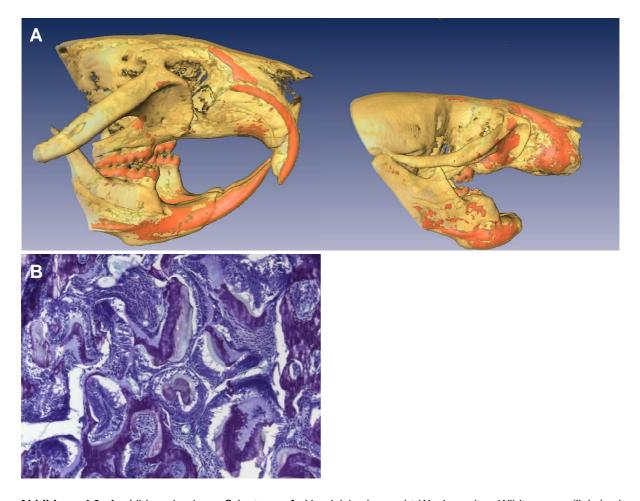


Abbildung 4.5: A. Verlauf der Entwicklung von Osteopetrose im Schädelknochen von Mäusen der Linie Src; Kontaktradiographie. B. Auswirkung der Osteopetrose auf den Zahndurchruch. Links der normale Befund bei einer 12 Monate alten Wildtypmaus mit voll entwickelten Zahnwurzeln, rechts der verhinderte Zahndurchbruch bei einer gleichaltrigen Maus, die für Src defizient ist. Die Zähne (Pfeil) sind gänzlich vom massiven Kieferknochen eingeschlossen und besitzen keine ausgebildete Zahnwurzel. Dargestellt ist jeweils der erste Molar links und rechts in einem transversalen Schnitt durch die Maxillae in einer zweidimensionalen Darstellung eines µCT-Datensatzes.

Auch in der dreidimensionalen Darstellung der Datensätze aus dem μCT zeigen sich durch Osteopetrose bedingte Störungen im Knochenwachstum. Die Darstellung nach verschiedenen Mineralisationsgraden zeigt in den Kontrolltieren eine hohe Mineralisierungsdichte fast nur an den Zähnen. Die osteopetrotischen Tiere zeigen hingegen eine ungeordnete Akkumulation hochdichten Gewebes im gesamten Kiefer, wobei das Zentrum der Mineralisation um die ursprünglichen Wurzelanlagen herum zu liegen scheint (Abb. 4.6 A).

Die nachfolgende histologische Auswertung der Incisivae-Wurzeln dieser acht Wochen alten Mäuse zeigt mehrere Foci primitiver Zahnanlagen. Diese scheinen mit Teilen des odontogenen Epithels verschmolzen. Diese multiplen Zahnanlagen zeigen keinerlei Ausrichtung oder Organisation (Abb. 4.6 B). Man spricht hier von Odontomen.



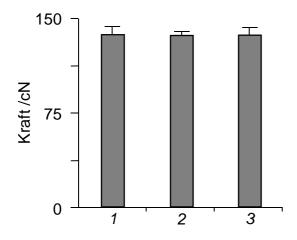
**Abbildung 4.6:** Ausbildung benigner Odontome. **A.** Vergleich einer acht Wochen alten Wildtypmaus (links) mit einer gleichaltrigen Maus, die für Src defizient ist (rechts). Dreidimensionale Darstellung von Datensätzen aus dem μCT. Bereiche hoher Mineralisation sind rot eingefärbt. **B.** Histologie eines Odontoms einer für Src defizienten Maus. Zu erkennen sind multiple Foci ungeordneter Mineralisation (Toluidin-Blau, 10fache Vergrößerung)

## 4.2 Kieferorthopädische Zahnbewegung

## 4.2.1 Versuchsparameter

## 4.2.1.1 Kraft der Apparatur zur murinen Gaumennahterweiterung

Die für die Darstellung der kieferorthopädischen GNE hergestellten Zahnklammern für den murinen Oberkiefer zeigten eine reproduzierbare Kraftentwicklung durch die gesamte Gruppe der getesteten Apparaturen. Die durchschnittliche Kraft der Apparaturen lag bei 133 ± 8 cN (Abb. 4.7). Die exemplarische Analyse von jeweils zehn Klammern von drei verschiedenen Herstellungszeitpunkten zeigte keinen signifikanten Unterschied der entwickelten Expansionskraft. Dies belegt, dass von einer vergleichbaren Kraftapplikation in den Versuchstiergruppen ausgegangen werden kann.



**Abbildung 4.7**: Expansionskräfte der GNE-Apparaturen nach Herstellungszeitpunkt geordnet. Die verschiedenen Expansionskräfte sind zueinander nicht signifikant unterschiedlich (p > 0.05: Zeitpunkt 1: 136  $\pm$  9 cN; Zeitpunkt 2: 132  $\pm$  5 cN; Zeitpunkt 3: 133  $\pm$  8 cN.

## 4.2.1.2 Wirkung der µGNE auf das Verhalten und Wachstum der Mäuse

Sowohl die Tiere der Gruppe GNE, als auch die der Gruppe GNE + BP zeigten über den gesamten Versuchszeitraum normales, den Kontrolltieren entsprechendes Verhalten. Weder die eingesetzte Zahnklammer, noch die implantierte osmotische Pumpe wirkten sich negativ auf das normale Wachstum der Mäuse aus. In beiden Versuchstiergruppen konnte während des Versuchs kein signifikanter Unterschied des Mausgewichts im Vergleich zur Kontrollgruppe festgestellt werden (Abb. 4.8).

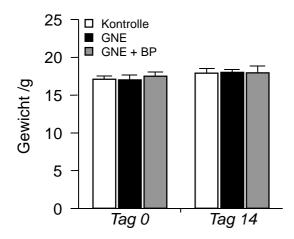
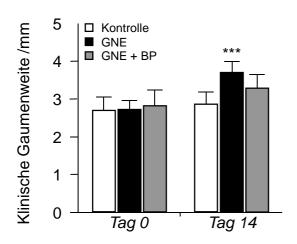


Abbildung 4.8: Gewicht der Mäuse der drei Versuchstiergruppen an den Zeitpunkten Tag 0 und Tag 14. Es konnten keine signifikanten Unterschiede der Gruppen zueinander festgestellt werden.

## 4.2.2 Klinische Untersuchung der Zahnbewegung nach Klammereinsatz

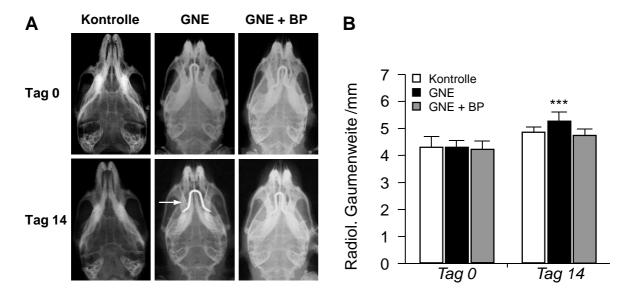
Der Erfolg der kieferorthopädischen Zahnbewegung wurde durch eine *in vivo*-Distanzmessung zwischen den mesiopalatinalen Höckern der ersten Molaren überprüft. Hier zeigte sich in der Gruppe GNE ein um den Faktor 1,3 signifikant (p < 0,001) breiterer Abstand der ersten Molaren zueinander (Tag 0 =  $2.8 \pm 0.2$  mm, Tag 14 =  $3.8 \pm 0.4$  mm). Die Mäuse der Kontrollgruppe und der Gruppe, die zusätzlich Bisphosphonate bekommen haben, zeigten keine signifikante Veränderung im Versuchszeitraum (Abb. 4.9).



**Abbildung 4.9:** Klinisch festgestellte Gaumenweite anhand des Zahnabstandes der ersten Molaren. Es zeigt sich eine signifikante (p < 0,001) Weitenzunahme in der Gruppe GNE nach 14 Tagen Kraftapplikation.

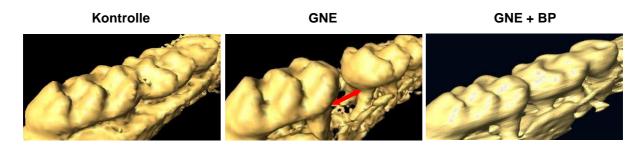
## 4.2.3 Radiologische Untersuchung

Die direkt nach Entnahme der Tiere durchgeführte Kontaktradiographie ermöglichte einen ersten Überblick über den Erfolg der Aufweitung der GNE-Apparatur und der Breitenzunahme des Oberkiefers im Vergleich zum Zustand bei Versuchsbeginn (Abb. 4.10). Während bei den Kontrolltieren keinerlei sichtbare Veränderung zu sehen war, zeigten die Zahnklammern der Gruppe GNE eine deutliche Veränderung. Diese waren geweitet und in der Form der passiven Ausgangskonfiguration sehr ähnlich. Der Abstand der Verankerungszähne zueinander war auch im Röntgenbild deutlich größer, wobei die Zähne nach bukkal gekippt erschienen. Die Wirkung der GNE-Apparatur auf die Sutura palatina mediana war im Röntgenbild nicht zu erkennen. Die Gruppe GNE + BP zeigte ein den Kontrolltieren entsprechendes Bild.



**Abbildung 4.10: A.** Kontaktradiographie. Das Schaubild zeigt eine deutliche Veränderung der GNE-Apparatur mit leichter Bukkalkippung (Pfeil) der 1. Molaren in der Gruppe GNE zum Tag 14. **B.** Radiologisch bestimmte Gaumenweitung mit signifikanter (p < 0,001) Weitenzunahme in der Gruppe GNE.

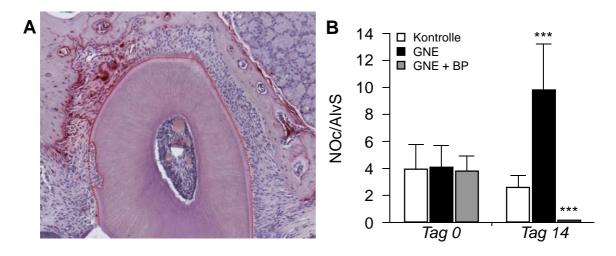
Die Bildgebung via µCT verdeutlicht die beachtliche Verschiebung der Verankerungszähne im Kiefer der Mäuse aus der Gruppe GNE. Die Kraft der Apparatur führte zu einer Bukkalkippung der ersten Molaren und einer deutlichen mesialen Separation der ersten von den zweiten Molaren. In der Gruppe GNE + BP konnte im Vergleich zur Kontrollgruppe kein Unterschied festgestellt werden (Abb. 4.11).



**Abbildung 4.11:** Darstellung der Klammerwirkung an Mikro-CT-Datensätzen. Neben der gewünschten Weitenzunahme des Gaumens kommt es zu einer deutlichen Separation zwischen erstem und zweitem Molaren in der Gruppe GNE (roter Pfeil). In der Gruppe GNE + BP ist keine Separation zu erkennen.

## 4.2.4 Histologie der iatrogenen Zahnbewegung

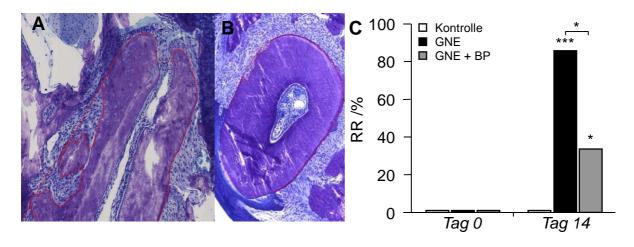
Abb. 4.12 A zeigt exemplarisch die zelluläre Antwort der Alveole auf die iatrogene Zahnbewegung. Die Lokalisation der rot angefärbten Osteoklasten in der Alveole findet sich ausschließlich auf der bukkalen Seite des Periodonts. Nach dem Start der Kraftapplikation kommt es zu einer Erhöhung der intraalveolären Osteoklasten-Anzahl (Tag  $0 = 4.1 \pm 1.7$ ; Tag 14 Kontrolle =  $2.8 \pm 0.7$ ; GNE =  $9.9 \pm 3.5$ ; GNE + BP =  $0.0 \pm 0$ ). Die Veränderungen in den beiden Versuchstiergruppen waren mit p < 0.001 signifikant (Abb. 4.12 B).



**Abbildung 4.12: A.** Osteoklastäre Aktivität in der Alveole. Repräsentative Darstellung einer Zahnwurzel aus der Gruppe GNE am Tag 14. Die Rotfärbung zeigt die Aktivität resorbierender Osteoklasten, die orange gestrichelte Linie stellt die ursprüngliche Wurzeloberfläche dar (TRAP-Färbung, 100-fache Vergrößerung). **B.** Anzahl der Osteoklasten in der Alveole (NOc/AlvS: Number of osteoclasts/alveolar surface). Innerhalb des Versuchszeitraums kam es zu einem signifikanten (p < 0,001) Anstieg in der Gruppe GNE.

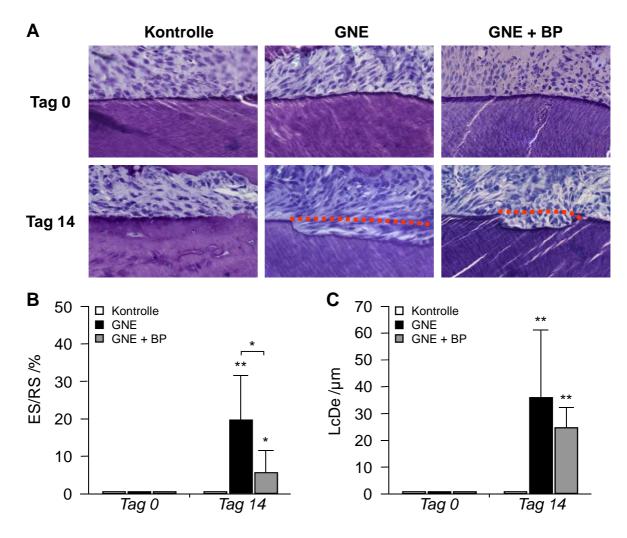
## 4.2.5 Veränderungen der Zahnwurzel

Die kieferorthopädische Zahnbewegung führte bei einem Großteil der behandelten Tiere zu massiven Schädigungen der Zahnwurzel. Defekte in Form flächiger Resorptionslakunen wurden häufig gefunden. Diese traten in beiden Versuchstiergruppen (GNE = 85,7 %, GNE + BP = 33,3 %, Abb. 4.13 C) und ausschließlich auf der bukkalen Seite der Verankerungsmolaren auf, jedoch nicht in der Kontrollgruppe (Abb. 4.13 A und B, vgl. Abb. 4.14 A).



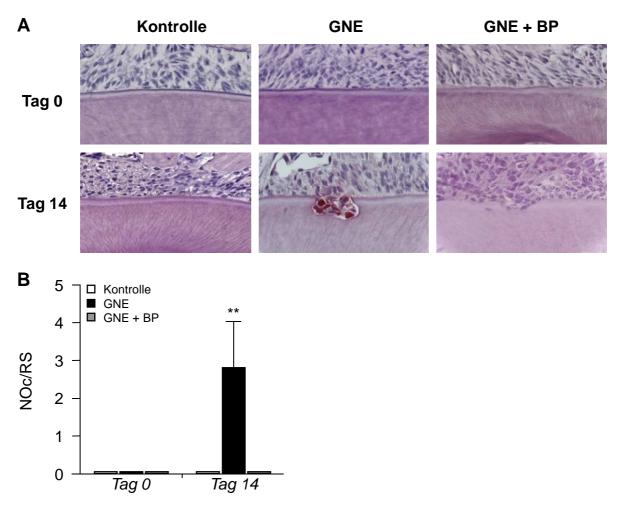
**Abbildung 4.13:** Wurzelresorption als Resultat kieferorthopädischer Zahnbewegung. **A.** und **B.** Resorptionslakunen an der bukkalen Wurzeloberfläche des 1. Molaren in verschiedenen Schnittebenen. Die in Orange dargestellte Linie stellt die ehemalige Begrenzung der Wurzeloberfläche dar (Touidin-Blau, 100-fache Vergrößerung). **C.** Anteil resorbierter Zahnwurzeln der untersuchten Zähne (RR: Rate of resorption). In der Gruppe GNE wurden dreimal so viel Resorptionslakunen wie in der Gruppe GNE + BP gezählt.

Der Anteil der resorbierten Fläche an der gesamten bukkalen Wurzeloberfläche dient als Maß der Schädigung. Dies unterschied sich in beiden Versuchstiergruppen signifikant von der Kontrollgruppe, wobei die massivsten Schäden in der Gruppe GNE auftraten. Diese Schäden traten hier jedoch mit hoher Variabilität (0 % bis 40 % resorbierte Oberfläche) auf. Der gemessene Durchschnittswert von 19,28 % ist dabei um den Faktor 4 signifikant größer als in der Gruppe GNE + BP, bei der die Wurzel durchschnittlich zu 5 % geschädigt war (Abb. 4.14 B). Kein deutlicher Unterschied zeigte sich jedoch in der mittleren Tiefe der Resorptionslakunen (Abb. 4.14 C).



**Abbildung 4.14:** Quantifizierung der Wurzelresorption. **A.** Repräsentative Auschnittsdarstellung der bukkalen Wurzeloberfläche. Die rote Linie stellt die ehemalige Begrenzung der Wurzeloberfläche dar (Toluidin-Blau, 400-fache Vergrößerung). **B.** Anteil der resorbierten Oberfläche an der gesamten bukkalen Wurzeloberfläche (ES/RS: Eroded surface/root surface; keine Resorption in der Kontrollgruppe, 19,28 % in der Gruppe GNE, 5 % in der Gruppe GNE + BP. **C.** Mittlere Lakunentiefe der resorbierten Wurzelareale (LcDe: Lacunae depth; GNE = 35,8 ± 25,6; GNE + BP 25,2 ± 5,5).

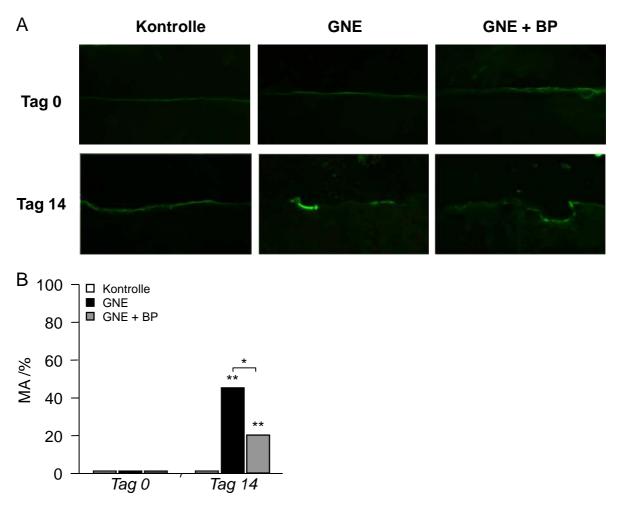
In der Gruppe GNE konnten mehrere resorbierende Osteoklasten an der Wurzeloberfläche nachgewiesen werden. Hier lag die Zahl bei durchschnittlich 3,8 Osteoklasten je untersuchten Zahn. In der Gruppe GNE + BP konnten am Untersuchungszeitpunkt keine aktiven Osteoklasten nachgewiesen werden (Abb. 4.15).



**Abbildung 4.15: A.** Repräsentative Ausschnittsdarstellung der Wurzeloberfläche. Deutliche Resorptionslakune mit resorbierenden Osteoklasten in der Gruppe GNE an Tag 14 (TRAP-Färbung, 400fache Vergrößerung). **B.** Anzahl der Osteoklasten pro bukkaler Wurzeloberfläche (NOc/RS: Number of osteoclasts/root surface). Es zeigt sich ein signifikanter (p < 0,01) Anstieg der Osteoklastenzahl in der Gruppe GNE an Tag 14.

## 4.2.6 Reparatur der Resorptionsdefekte

Die Untersuchung von mit Calcein markierten Mäusen zeigte teilweise verstärkte Calceinablagerungen in kleinen Abschnitten der resorbierten Zahnoberflächen. Dies dokumentiert die Ablagerung von neu mineralisierter Zahnmatrix. Diese klar markierten Bereiche (Abb. 4.16) stellten sich in der Toluidin-Färbung als basophilangefärbter Saum dar, auf dem teilweise Odontoblasten lagen (vgl. Abb. 4.14). Die Werte der Wurzelformation waren in der Gruppe GNE mit durchschnittlich 45,5 % signifikant höher als die Werte der Gruppe GNE + BP von durchschnittlich 20,5 %.



**Abbildung 3.16: A.** Repräsentative Ausschnittsdarstellung der Wurzeloberfläche (Calcein-Doppelmarkierung mit 5 Tagen Abstand, 400fache Vergrößerung). **B.** Reparatur der Wurzeldefekte (MA: Mineral apposition). Deutliche Calceineinlagerungen in den Resorptionslakunen deuten auf Apposition neuen Zahnzements hin.

## 5 Diskussion

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass Osteoklasten eine essentielle Rolle in der Zahnbewegung spielen. Ohne die Fähigkeit, die Alveole in ihrer Eigenschaft als Teil des Zahnhalteapparats an neue Ansprüche anzupassen, kann eine gesunde Zahnbewegung nicht funktionieren. Dass diese Anpassung über den Mechanismus des "bone remodeling", geschehen muss, der ohne osteoklastäre Resorption nicht abläuft (Boyle, 2003), zeigen die Ergebnisse der Untersuchungen von osteopetrotischen Mäuse der Linien Src und Tcirg1, bei denen der Zahndurchbruch gestört ist. Die Osteoklasten müssen initiativ den Pfad der Zahnbewegung vorzeichnen, an dem sich die Zähne orientieren. Doch auch in der iatrogenen Zahnbewegung der Kieferorthopädie zeigen die mit Alendronat behandelten Mäuse eine Störung dieser Bewegung. Hier können die Osteoklasten im Parodont nicht auf die mechanischen Reize der Zahnbewegung reagieren, um die Bewegung zu ermöglichen.

## 5.1 Der Mechanismus der Zahnbewegung

## 5.1.1 Die natürliche Zahnbewegung

Unsere Ergebnisse zeigen, dass die Auflösung des die Zähne bedeckenden Kieferknochens der eigentlichen Zahnbewegung vorausgeht. Der inzisale Kieferknochen der untersuchten Mäuse besitzt bereits bei der Geburt eine hohe Zahl an resorbierenden Osteoklasten, welche nach Abbau des Alveolardeckels zurückgeht. Die Anzahl an Osteoklasten in der übrigen Alveole ändert sich über den Versuchszeitraum nicht. Vielmehr muss die osteoklastäre Aktivität in der übrigen Alveole auf Umbauprozesse zurückgeführt werden, die dem Halt der sich ausbildenden Zahnwurzel dienen. Diese Beobachtungen stützen die Theorie der zeitlichen Bestimmung des Zahndurchbruchs durch das Ausbilden des Eruptions-Kanals. Nach dieser Theorie bestimmen Osteoklasten im Zahndurchbruch die Richtung und Geschwindigkeit der Bewegung, indem sie durch gezielte Resorption des okklusalen Kieferknochens die Alveole vergrößern und letztlich öffnen (GORSKI, 1988) und somit die Richtung der Zahnbewegung ("eruption pathway") bestimmen (MARKS & SCHROEDER, 1996).

In der Literatur existieren verschiedene Theorien, die die Bewegung der Zähne in die Mundhöhle zu erklären versuchen. So konnten CAHILL UND MARKS (1980; 1984) zei-

gen, dass das Ausbilden der Zahnwurzel den Zahn nicht, wie vorher angenommen, aktiv aus dem Kiefer schiebt. MOXHAM (1979) diskutierte die Rolle des hydrostatischen Drucks im Zahnfollikel als treibende Kraft. Diese Theorie wurde jedoch mehrfach widerlegt (CRADDOCK UND YOUNGSON, 2004; MARKS UND SCHROEDER 1996). Des Weiteren stellten TEN CATE ET AL. (1976) die Theorie auf, dass die Fibroblasten des Periodonts durch Kontraktion den Zahn aus dem Kiefer ziehen und somit Platz für die Zahnwurzel schaffen. WISE ET AL. (2007) sagen jedoch, dass das Periodont erst nach Abschluss des Zahndurchbruchs eine stabile Verbindung von Zahn und Kieferknochen aufbaut und dieser Antrieb der Zahnbewegung somit nicht denkbar sei. Doch unabhängig vom Antrieb der Zahnbewegung wird Platz für den bewegten Zahn benötigt. All diese Theorien untermauern somit die Notwendigkeit des Eruptions-Kanals als Stellgröße, die die Bewegungsrichtung, den Zeitpunkt und die Geschwindigkeit vorgibt (WISE UND LIN, 1995). Eine Störung der Osteoklastenaktivität muss also unweigerlich zu einem gestörten Zahndurchbruch führen. Des Weiteren wird momentan diskutiert, ob nicht der sich neu bildende Knochen in der Alveole, der der Zahnwurzel später als Verankerungspunkt dienen wird, den Zahn aus dem Kiefer heraus schiebt (WISE UND KING, 2008).

Die wichtige Rolle des Eruptionskanals ist gut im Verlauf des Zahndurchbruchs der für Src defizienten Mäuse zu erkennen. Hier resultiert die geringe Anzahl funktionsfähiger Osteoklasten in einem Fehlen dieses Kanals.

Zahnlosigkeit als Begleiterscheinung einer ausgeprägten Osteopetrose, wie sie die für Src defizienten Mäuse aufweisen, wurde bereits von HELFRICH (2005) beschrieben. In diesem Krankheitsbild steht dem heranreifenden Zahn durch die erhöhte Knochendichte nicht genügend Platz für das Ausbilden der Zahnwurzel zur Verfügung. Ohne Regeneration der osteoklastären Funktion bleibt die Molaren-Entwicklung in diesem Stadium stehen. Die Zähne brechen nicht durch und werden vollständig vom Kieferknochen eingeschlossen.

Hierbei stellt sich in unseren Versuchen die Situation der murinen Incisivae als noch problematischer dar. Die höhere Durchbruchsgeschwindigkeit und das fortwährende Wachstum dieser Nagezähne führt zur Ausbildung von massiven Odontomen in der Alveole. Diese Beobachtungen bestätigen die Ergebnisse von TIFFEE ET AL. (1999) und AMLING ET AL. (2000). Obwohl Odontome zu den gutartigen Tumoren gezählt werden, führen sie in Mäusen der Linie Src letztendlich zum Tode, da die Luftwege aufgrund der großvolumigen Wucherungen nicht mehr durchlässig sind.

Die pathologische Störung der Osteoklasten kann auch medikamentös hergestellt werden. Die Behandlung von neugeborenen Ratten mit Bisphosphonaten führt zu einem vergleichbaren Effekt. In Versuchen konnte gezeigt werden, dass der Zeitpunkt des Zahndurchbruchs durch gezielte Medikation mit Bisphosphonaten stark verzögert oder gar verhindert werden kann. In den Versuchen von Grier und Wise (1998) wurde der Normalzustand in den Tieren nach Beendigung der Medikation und folgender Regeneration der Osteoklastenpopulation wieder hergestellt. Bei den Versuchen von Bradaschia-Correz et al. (2007) führte die langfristige Gabe von Bisphosphonaten zur Ausbildung von massiven Odontomen. Im Umkehrschluss konnte in eigentlich zahnlosen Ratten der Linie tl/tl ("toothless"), die defizient für Csf-1 sind und so eine stark verminderte Anzahl an Osteoklasten mit manifester Osteopetrose aufweisen, durch Regeneration der Osteoklastenpopulation der Zahndurchbruch im Alter von drei Wochen wiederhergestellt werden (MARKS ET AL., 1992). Dies geschah in dieser speziellen Mutationslinie durch eine Gabe von Csf-1. Mäuse hingegen, die für Src defizient sind, können mit einer Knochenmarkstransplantation befähigt werden, ein funktionsfähiges Gebiss auszubilden. Diese Therapie muss jedoch frühzeitig erfolgen, bevor es zur Ausbildung von Odontomen kommt (TIFFEE ET AL., 1998). Diese sind nicht reversibel und treten in Mäusen dieser Linie bereits im Alter von drei Wochen auf (AMLING ET AL., 2000).

# 5.1.2 Die Mikro-GNE als Modell der mechanisch induzierten Zahnbewegung

Das Apparat-Design der für diese Arbeit entwickelten Mikro-GNE ermöglicht eine reproduzierbare Kraftapplikation auf den Mäuseoberkiefer. Die erreichten Zahnbewegungen waren deutlich und gerichtet. Die Histologie zeigt einen Knochenumbau an den Alveolen, deren bukkale Seiten deutliche resorbierte Zonen mit einer hohen Dichte an Osteoklasten aufweisen. Zusätzlich zeigen die behandelten Tiere deutliche Wurzelresorptionen. Die konzentrierte Lokalisation der Wurzeldefekte einzig auf der bukkalen Seite der Wurzeloberfläche korrespondiert mit dem Bild des Knochenabbaus und entspricht ebenfalls dem Bild der in der Klinik auftretenden Schädigungen (LANGFORD UND SIMS, 1982; MEIKLE 2006). Die Bildgebung via µCT zeigt des Weiteren, dass die Kraftapplikation neben dentalen auch skelettale Effekte hervorruft, die

mit denen der humanen GNE vergleichbar sind (Daten nicht gezeigt) (ERVERDI ET AL., 1994; VARDIMON ET AL., 1998a; 1998b; GARIB ET AL., 2006).

Hieraus ist erkennbar, dass die neuentwickelte Methode der Mikro-GNE iatrogene Bewegungen der Zähne und des Kiefers im Mausmodell simuliert. Die Entwicklung dieser Technik für die murine Gaumennahterweiterung erlaubt somit eine präzise Darstellung zellulärer Reaktionen. Dies gibt der Wissenschaft die Möglichkeit, spezifische Knockout-Tiere mit der Mikro-GNE zu behandeln und zu untersuchen und eröffnet neue Möglichkeiten, an Fragestellungen heranzugehen. Die kurze Generationszeit der Mäuse ermöglicht es außerdem, kieferorthopädische Methoden in kurzer Zeit zu untersuchen. Die geringe Größe des Untersuchungsobjekts ermöglicht es weiterhin, moderne Techniken, wie beispielsweise die Bildgebung via µCT, die auf kleine Volumina begrenzt ist, zu nutzen (FANG ET AL., 2004; KAWARIZADEH ET AL., 2004, YOSHIMATSU ET AL., 2006).

# 5.1.3 Unterschiede zwischen natürlicher und mechanisch induzierter Zahnbewegung

Im Zahndurchbruch erfolgt eine Bewegung eines nicht ausgereiften Zahnes. Die Initiation dieser Bewegung geschieht durch einen osteoklastären Knochenabbau. Durch die Bewegung des Zahnes aus der Alveole wird erst der Platz geschaffen, der für die endgültige Reifung des Zahnes vonnöten ist. Mit dem Ausbilden der Zahnwurzel geht ein Knochenumbau im basalen Teil der Alveole einher, der das Periodont an die neugebildete Zahnwurzel anpasst.

Im Gegensatz dazu werden bei der therapeutischen Zahnbewegung voll ausgebildete Zähne verlagert. Die Osteoklasten übernehmen hier keine initiierende, sondern eine ganz klar reaktive Rolle (MULLENDER ET AL., 1998). Im Desmodont werden durch die angelegte Kraft verschiedene Zug- und Druckzonen geschaffen (MEIKLE, 2006), in denen es zu Knochenapposition, bzw. Knochenresorption kommt (MASELLA UND MEISTER, 2006). Der von uns gemachte konzentrierte Fund von Osteoklasten auf der bukkalen Seite des Desmodonts zeigt sehr deutlich, wie durch die Resorption des Hartgewebes diesem Druck entgegengewirkt wird. Die Kieferorthopädie unterscheidet hierbei die direkte Resorption von der indirekten Resorption (Kahl-Nieke, 2001). Direkte Resorption tritt unter geringem Druck auf, bei dem die Blutzirkulation nicht behindert wird und die Zellaktivität erhalten bleibt. Eine vermehrte Zellproliferation

kann hier bereits nach zwölf Stunden beobachtet werden, nach 24 Stunden treten im Druckzonenbereich Osteoklasten, nach 36 Stunden im Zugzonenbereich Osteoblasten auf. Erste Osteoidapposition wird nach zwei bis vier Tagen beobachtet. Diese Resorptionsart tritt vor allem bei physiologischer Kraftapplikation durch die Zunge oder die Lippen, oder aber auch bei sanfter kieferorthopädischer Behandlung auf.

Indirekte Resorption tritt bei unphysiologischer Kraftapplikation auf. Im Bereich der nicht mehr durchbluteten Druckzonenmaxima kommt es bereits nach zwei Stunden zu irreversiblen desmodontalen Nekrosen. Die Resorption des Alveolarknochens geht hierbei von den Knochenmarkräumen der benachbarten Spongiosa aus, in denen die Zellaktivität erhalten geblieben ist. Man spricht hierbei auch von einer unterminierenden Resorption.

Die Ergebnisse dieser Arbeit erlauben keine Unterscheidung nach diesen zwei Resorptionstypen. Für die Beantwortung dieser Frage wäre es notwendig, den Verlauf des Kieferumbaus in kürzeren Zeitintervallen zu beobachten.

## **5.2 Wurzelresorption**

## 5.2.1 Wurzelresorption wird von Osteoklasten verursacht

Die Histologien dieser Arbeit zeigen ein deutliches Auftreten von Wurzelresorption bei kieferorthopädischer Zahnbewegung. In den Resorptionslakunen und dem umliegenden Periodont konnten multinukleäre Riesenzellen beobachtet werden, die durch eine TRAP-Färbung als resorbierende Osteoklasten identifiziert werden konnten. Die hohe Prävalenz der Wurzelresorption in der Mikro-GNE übertrifft die aus der Klinik stammenden Erwartungen. Zu beachten ist hierbei aber, dass die Kräfte der murinen Zahnklammer von durchschnittlich 133 cN zwar deutlich unter den Empfehlungen der humanen Kieferorthopädie liegen, dort die Kräfte aber von einer größeren Fläche aufgefangen werden. Für die humane Therapie konnten JIMENEZ-PELLEGRIN UND ARANA-CHAVEZ (2004) zeigen, dass es ab einer Kraftapplikation von 5 N zu Wurzelresorptionen kommt. Nicht berücksichtigt ist hierbei allerdings, dass Wurzeldefekte zuverlässig nur durch histologische oder computertomographische Bildgebung festgestellt werden können. Die Histologie wird in der Humantherapie verständlicherweise nur für die pathologische Diagnose herangezogen, die Bildgebung durch den Com-

putertomographen wird höchstens im Verbund mit einer kieferchirurgischen Therapie durchgeführt (ERICSON UND KUROL, 2000; FUSS ET AL., 2003; HEIMISDOTTIR ET AL., 2005; GARIB ET AL., 2006). Aus diesem Grund muss davon ausgegangen werden, dass die von uns gefundene starke Ausprägung der Wurzelresorption nicht nur auf die sehr hohe Kraft der Apparatur, sondern auch auf die Präzision der Detektion zurückgeführt werden kann. Unsere Ergebnisse weisen deswegen darauf hin, dass Wurzelresorption somit eine zwingende Begleiterscheinung der iatrogenen Zahnbewegung zu sein scheint (JIMENEZ-PELLEGRIN UND ARANA-CHAVEZ 2004). Interessanterweise ist diese Resorption jedoch nicht auf die Verankerungszähne begrenzt. In Versuchen an Katzen konnten VARDIMON ET AL. (2005) zeigen, dass auch eine passive Bewegung von Zähnen, die nicht als Verankerungspunkt der kieferorthopädischen Kraft dienten, einer Kieferweitung nachfolgend Wurzelresorptionen hervorrufen kann.

## 5.2.2 Die Gabe von Bisphosphonaten hemmt die Wurzelresorption

Die subkutane Gabe von Alendronat führte in diesem Versuch zu einem völligen Verschwinden von nachweisbaren Osteoklasten und einem deutlichen Rückgang der Wurzelresorption um 64 Prozent. Trotz inaktivierter Osteoklasten konnten aber bei einem Drittel der behandelten Mäuse noch resorptive Wurzeldefekte nachgewiesen werden. Dies ist auf die Chronologie des Versuchsaufbaus zurückzuführen. Alendronat wird sehr gut vom Gewebe aufgenommen und nicht vom Körper abgebaut (PORRAS ET AL., 1999). In der vorliegenden Studie erfolgte die Gabe von Alendronat über subkutane, osmotische Pumpen. Nicht berücksichtigt wurde dabei, dass die Medikation zum einen erst nach Einstellen eines Fließgleichgewichts ihre volle Wirkung erreichen kann und zum anderen, dass die Bisphosphonate wiederum erst nach der Aufnahme von resorbierenden Osteoklasten auf diese wirken können. Die Beobachtung der hohen Prävalenz resorptiver Wurzeldefekte auch bei diesen mit Alendronat behandelten Mäusen bedeutet aber auch, dass die Wurzelresorption in einem gestressten Gewebe nicht erst als langsame Anpassung des Gewebes auf Stressstimuli zu sehen ist, sondern auch als schnelle Reaktion auf diese auftreten kann. Auch der Rückgang der Resorptionshäufigkeit und des durchschnittlichen Anteils resorbierter Bereiche pro Wurzeloberfläche bei gleichbleibender Resorptionstiefe spricht für diesen Mechanismus.

Eine totale Verhinderung von Wurzelresorption wäre somit nur möglich, wenn man die Bisphosphonate vor Beginn der Zahnbewegung mit einer ausreichend langen Vorlaufzeit von ein bis zwei Tagen verabreichen würde. Zu untersuchen wäre auch, ob eine einmalige hochdosierte Medikation zu einem vergleichbaren Ergebnis führt.

# 5.2.3 Die medikamentöse Inaktivierung von Osteoklasten verhindert gleichzeitig die iatrogene Zahnbewegung

Die Ergebnisse zur Kieferweitung unter Einfluss von Alendronat zeigen im Gegensatz zur Weitung ohne Bisphosphonate keinen deutlichen Platzgewinn im kieferorthopädischen Sinn. Die geringe Gaumenweitung lässt außerdem vermuten, dass sie auf einer Neuausrichtung des Zahnes in der Alveole basiert, die keinen skelettalen Umbau der Maxillae beinhaltet. Sie kann in einem limitierten Rahmen über eine Anpassung des nichtknöchernen und nichtdentalen Anteils des Periodonts erfolgen. Ohne osteoklastäre Resorption ermöglicht die Begrenzung der Alveole allerdings eine nur geringe transversale Zahnbewegung, da dem Organismus die notwendige Anpassung der Alveole über den Mechanismus des Knochenumbaus genommen wird (YOSHIMATSU ET AL., 2006).

Der eigentlich positive Effekt der Bisphosphonat-Therapie auf die Verhinderung von Wurzelresorptionen wird durch die hemmende Wirkung auf die eigentliche Zahnbewegung nivelliert. Für die klinische Fragestellung bedeutet dies, dass es der kieferorthopädischen Praxis nicht möglich ist, durch die Gabe von Bisphosphonaten die unerwünschte Nebenwirkung der Wurzelresorption zu umgehen, ohne gleichzeitig auch die gewünschte Gebisskorrektur zu verhindern.

# 5.2.4 Das Periodont besitzt einen rudimentären Mechanismus zur Reparatur von Wurzeldefekten

Die Literatur kennt keine Umbauprozesse des Zahnes, bei denen eine Resorption gesunden Zahngewebes einer Neusynthese voran geht, wie wir es etwa vom "bone remodeling" kennen. Die Wurzelresorption muss deswegen immer als "maligne" Störung betrachtet werden. Jedoch gibt es einige Hinweise auf einen Mechanismus, der es dem Körper ermöglicht, Wurzeldefekte in geringem Umfang zu reparieren. Unsere Beobachtungen an calceinmarkierten Präparaten zeigen dies ganz klar. Hier kommt

es in den Resorptionslakunen zur Apposition einer basophilen Matrix. Laut MAGLOIRE ET AL. (2001) besteht diese Matrix aus zellulärem Zement (Zementoid), welcher später von zellulär-fibrillärem Zement bedeckt wird. Diese neugebildete Zahnmatrix wird, in Anlehnung an das primäre und sekundäre Dentin der Zahnbildung, als tertiäres Dentin beschrieben (LARMAS, 2008). Es gilt als Antwort auf Defekte, die bis hinunter zur Pulpa reichen (MURRAY ET AL., 2003).

MAGLOIRE ET AL. (2001) sagen, dass diese Reparaturen erst ca. zwei bis drei Monate nach Abschluss der iatrogenen Zahnbewegung erfolgen. Hiermit widersprechen sie den älteren Ergebnissen von Owman-Moll und Kurol (1998), nach denen diese Reparaturen bereits zwei Wochen nach Ende der Kraftapplikation einsetzen. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen auch Brudvik und Rygh (1995) und Heimisdottir et al. (2005). Unsere Histologien weisen nun jedoch darauf hin, dass dieser Mechanismus deutlich schneller einsetzt. Bereits nach einigen Tagen und bei noch aktiver Kraftapplikation sind erste Ablagerungen tertiären Dentins zu erkennen.

Die Geschwindigkeit der Reparatur hängt jedoch auch von der Schwere der Schädigung ab. Bei leichten und moderaten Defekten wird dieses tertiäre Dentin von überlebenden Odontoblasten der Pulpa über die Tomes'schen Kanäle gebildet (SMITH ET AL., 1994). Diesen speziellen Zahnstrukturen wird hier eindeutig eine Funktion als Sensor der Defektgröße zugeschrieben (SMITH ET AL., 1995). Bei qualitativ schwereren Defekten, die mit einer Nekrose der Pulpa und Zerstörung der betroffenen Odontoblasten einhergehen, müssen erst andere Zellen der Pulpa zu Odontoblasten differenzieren (GRONTHOS ET AL., 2002). Erst dann kann auch hier eine Eindämmung der Schäden erfolgen (LESOT ET AL., 1994).

Die im Versuch beobachteten Defektgrößen zeigen teilweise eine Resorption bis nahe des Wurzelkanals (vgl. Abb. 4.16). Obschon diese Defekte durchweg als schwer einzustufen sind, zeigen die vorhandenen Reparaturen, dass noch funktionsfähige Odontoblasten zur Verfügung stehen. Es kann also nach den beschriebenen Mechanismen der reaktionären Dentinbildung nicht von nekrotischen Odontoblastenpopulationen ausgegangen werden.

Die Auswirkungen der Bisphosphonat-Therapie auf die Reparaturmechanismen kann nicht beantwortet werden. Die geringere Zahl reparierter Dentinbereiche in der Gruppe GNE + BP kann auch durch das geringere Schadensbild erklärt werden.

## 5.3 Ausblick

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass der Mechanismus der osteoklastären Resorption als wichtigste Stellgröße für die Zahnbewegung angesehen werden muss. Sowohl in der natürlichen, als auch in der mechanisch induzierten Zahnbewegung führt ein Ausbleiben der Resorption zu einer Verhinderung der Zahnbewegung.

Unsere Beobachtungen unterstreichen die Rolle der Osteoklasten für einen erfolgreichen Zahndurchbruch. Vor allem charakterisieren sie die Osteoklasten als initiale Stellgröße dieser Bewegung. Diese Erkenntnisse können als Grundlage der Therapieentwicklung bei osteopetrotisch bedingter Zahnlosigkeit herangezogen werden.

Die von uns entwickelte Methode der Mikro-GNE zeigt wiederum die zellulären Abhängigkeiten während der kieferorthopädischen Zahnbewegung sehr deutlich. Sie eignet sich deshalb als optimale Methode zur weiteren Untersuchung dieser Problematik und sollte zur weiteren Analyse der Fragestellung herangezogen werden. Eine genauere Analyse der rein skelettalen Effekte an der Sutura palatina mediana könnte hier zu noch präziseren Aussagen der zellulären Abhängigkeiten führen.

Es sollten in Zukunft weitere Versuche unternommen werden, die unerwünschten Nebenwirkungen der kieferorthopädischen Behandlung zu verhindern. Es gibt momentan keine weiteren Ansätze, die Wurzelresorption über eine Medikation zu hemmen. Denkbar ist jedoch, dass eine genauere Betrachtung der angelegten kieferorthopädischen Kraft deren Rolle für die Aktivität der Osteoklasten und die Lokalisation der Resorption erklären kann. Eine Verhinderung von Wurzelresorption über die präzise Steuerung dieser Kräfte ist denkbar.

# 6 Zusammenfassung

Die mechanisch induzierte Zahnbewegung zur Korrektur von Zahnfehlstellungen findet in der Klinik seit über 200 Jahren Anwendung. Dennoch ist der genaue zelluläre Prozess, der diese Bewegung ermöglicht, bisher weitestgehend unbekannt. Unerwünschte Nebenwirkungen, wie irreversible Wurzelresorptionen, sind nicht selten.

Ziel dieser Arbeit ist es, die zellulären Mechanismen der Zahnbewegung zu verdeutlichen. Hierfür wurde die natürliche Zahnbewegung des Zahndurchbruchs und die iatrogenen Zahnbewegung während der kieferorthopädischen Behandlung untersucht. Besonderes Augenmerk lag hierbei auf dem Zelltypus der Osteoklasten, da sie als einzige Zellen des Körpers in der Lage sind, Wurzelresorption zu verursachen. Der erste Teil dieser Arbeit soll zeigen, welche zellulären Prozesse im Kieferknochen während der natürlichen Zahnbewegung, dem Zahndurchbruch, ablaufen. Hierfür wurden die Oberkiefer von gesunden und stark osteopetrotischen Mäusen der Linien *Src* und *Tcirg1* histomorphometrisch analysiert und dieses Wissen im zweiten Teil auf die iatrogene Zahnbewegung übertragen. Es wurde ein tierexperimenteller Ansatz entwickelt, der eine kieferorthopädische Zahnbewegung im Mäusekiefer ermöglicht. Das Augenmerk der Untersuchung wurde durch eine medikamentöse Hemmung der Osteoklasten auf diese Zellen gelegt.

Die summierten Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass Osteoklasten eine essentielle Rolle in der Zahnbewegung spielen, da sie durch den Mechanismus des "bone remodeling" die notwendigen Anpassungen an den Kieferknochen erst ermöglichen. Bei unzureichender oder fehlender Resorptionsfähigkeit der Osteoklasten wird der Zahndurchbruch verzögert oder ganz verhindert. Häufig kommt es hierbei zur Ausbildung von benignen Zahntumoren, sogenannten Odontomen. Die Aktivität der Osteoklasten kann somit als die Stellgröße für den Zeitpunkt und den Erfolg des Zahndurchbruchs angesehen werden.

Die für diese Arbeit entwickelten Zahnklammern für den Mäusekiefer zeigen im Ergebnis der Behandlung ein der Klinik vergleichbares Bild. Es kommt zu einer deutlichen und gerichteten Zahnbewegung und zum Auftreten von Wurzelresorption. Die Hemmung der osteoklastären Resorption führt hierbei zu einem deutlichen Rückgang von Wurzelresorption. Gleichzeitig verhindert die fehlende Aktivität der Osteoklasten die notwendigen Kieferumbauprozesse und führt somit zu einer verhinderten Zahnbewegung.

# 7 Literaturverzeichnis

Amling, M; Neff, L; Priemel, M; Schilling, AF; Rüger, JM; Baron, R:

Progressive increase on bone mass and development of odontomas in aging osteopetrotic Src-deficient mice. Bone, 2000, 27(5): 603-610.

#### Andrew, D; Matthews, B:

Displacement of the contents of dentinal tubules and sensory transduction in intradental nerves of the cat. Journal of Physiology, 2000, 529(3): 791-802.

Arlot, M; Meunier, PJ; Boivin, G; Haddock, L; Tamayo, J; Correa-Rotter, R; Jasqui, S; Donley, DW; Dalsky, GP; San Martin, J; Fink Eriksen, E:

Differential effects of Teripatide and Alendronate on bone remodelling in postmenopausal women assessed by histomorphometric parameters. Journal of Bone and Mineral Research, 2005, 20(7): 1244-1253.

## Asanza, S; Cisneros, GJ; Nieberg, LG:

Comparison of Hyrax and bonded expansion appliances. The Angle Orthodontist, 1997, 67(1): 15-22.

## Barber, AF; Sims, MR:

Rapid maxillary expansion and external root resorption in man: a scanning electron microscope study. American Journal of Orthodontics, 1981, 79(6): 630-652.

#### Baron, R:

Anatomy and Ultrastructure of Bone. In: Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism, third edition. ASBMR, USA, 1996: 3-10.

#### Bartonicek, V; Lojda, Z:

Topochemistry of enzymes of chloroid plexus and ependyma of four animal species. I. Hydrolytic enzymes. Acta Histochemica, 1964, 19(5): 357-368.

## Biedermann, W:

A hygienic appliance for rapid expansion. The Journal of Practical Orthodontics, 1968, 2(2): 67-70.

## Boyle, WJ; Simonet, WS; Lacey, DL:

Osteoclast differentiation and activation. Nature, 2003, 423(6937): 337-342.

## Bradaschia-Correa, V; Massa, LF; Arana-Chavez, VE:

Effects of alendronate on tooth eruption and molar root formation in young growing rats. Cell Tissue Research, 2007, 330(3): 475-485.

## Brezniak, N; Wasserstein, A:

Orthodontically induced inflammatory root resorption. Part I: The basic science aspects. The Angle Orthodontist, 2002, 72(2): 175-179.

## Brown, MB; Jüppner, H:

Parathyroid hormone: Synthesis, secretion, and action. In: Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism, sixth edition. ASBMR, USA, 2006: 90-99.

#### Brudvik, P; Rygh, P:

The repair of orthodontic root resorption: an ultrastructural study. European Journal of Orthodontics, 1995, 17(3): 189-198.

#### Burstone, CJ, Goldberg, AJ:

Beta-titanium – a new orthodontic alloy. American Journal of Orthodontics 1980, 77(2): 121-32.

#### Cahill, DR; Marks, SC:

Tooth eruption: evidence for the central role of the dental follicle. Journal of Oral Pathology, 1980, 9(4): 189-200.

## Cahill, DR; Marks, SC:

Experimental study in the dog of the non-active role of the tooth in the eruptive process. Archives of Oral Biology, 1984, 29(4): 311-322.

## Ciambotti, C; Ngan, P; Durkee, M; Kohli, K; Kim, H:

A comparison of dental and dentoalveolar changes between rapid palatal expansion and nickel-titanium palatal expansion appliances. American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics, 2001, 119(1): 11-20.

## Cleall, JF; Bayne, DI; Posen, JM; Subtelny, JD:

Expansion of the midpalatal suture in the monkey. The Angle Orthodontist, 1965, 35(1): 23-35.

## Craddock, HL; Youngson, CC:

Eruptive tooth movement – the current state of knowledge. British Dental Journal, 2004, 197(7): 385-391.

#### Cohen, MM Jr.:

The new bone biology: pathologic, molecular and clinical correlates. American Journal of Medical Genetics. Part A, 2006, 140(23): 2646-2706.

#### Coxon, FP; Thompson, K; Roelofs, AJ; Ebetino, FH; Rogers, MJ:

Visualizing mineral binding and uptake of Bisphosphonate by osteoclasts an non-resorbting cells. Bone, 2008, 42(5): 848-860.

## Dausch-Neumann, D:

Kieferorthopädie. In: Zahn-Mund-Kiefer-Heilkunde, Bd. 5, Thieme Verlag, Stuttgart, 1987: 1-21.

## Debbane, EF:

A cephalometric and histologic study on the effect of orthodontic expansion of the midpalatal suture of the cat. American Journal of Orthodontics, 1958, 44(3): 187-219.

## Delaurier, A; Boyde, A; Jackson, B; Horton, MA; Price, JS:

Identifying early osteoclastic resorptive lesions in feline teeth: a model for understanding the origin of multiple idiopathic root resorption. Journal of Periodontal Research, 2008. [Online-Publikation.]

## Dermaut, LR: De Pauw, G:

Orthodontics: interface between biology and biomechanics. Verhandelingen - Koninklijke Academie voor Geneeskunde van Belgie, 2005, 67(3): 139-150.

## Ericson, S; Kurol, PJ:

Resorption of incisors after ectopic eruption of maxillary canines: a CT study. The Angle Orthodontist, 2000, 70(6): 415-423.

## Erverdi, N; Okar, I; Kücükkeles, N; Arbak, S:

A comparison of two different rapid palatal expansion techniques from the point of root resorption. American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics, 1994, 106(1): 47-51.

Fang, TD; Nacamuli, RP; Song, HM; Fong, KD; Warren, SM; Salim, A; Carano, RA; Filvaroff, EH; Longaker, MT:

Creation and characterization of a mouse model of mandibular distraction osteogenesis. Bone, 2004, 34(6): 1004-1012.

#### Fuss, Z; Tsesis, I; Lin, S:

Root resorption – diagnosis, classification and treatment choices based on stimulation factor. Dental Traumatology, 2003, 19(4): 175-182.

#### Gardner, GE; Kronman, JH:

Cranioskeletal displacements caused by rapid palatal expansion in the rhesus monkey. American Journal of Orthodontics, 1971, 59(2): 146-155.

Garib, DG; Henriques, JF; Janson, G; de Freitas, MR; Fernandes, AY:

Periodontal effects of rapid maxillary expansion with tooth-tissue-borne and tooth-borne expanders: a computed tomography evaluation. American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics, 2006, 129(6): 749-758.

## Goddard, DL:

Separation of the superior maxilla at the symphysis. Dental Cosmos, 1893, 35(9): 880-884.

Gomes de Oliveira, S; Seraidarian, PI; Landre, J Jr.; Oliveira, DD; Cavalcanti, BN: Tooth displacement due to occlusal contacts: a three-dimensional finite element study. Journal of Oral Rehabilitation, 2006, 33(12): 874-880.

## Gorski, JP; Marks, SC Jr; Cahill, DR; Wise, GE:

Developmental changes in the extracellular matrix of the dental follicle during tooth eruption. Connect Tissue Research, 1988, 18(3): 175-190.

#### Göz, G:

Zahnbewegung. In: Kieferorthopädie II: Therapie, Vierte Auflage, Verlag Urban & Fischer, 2000: 28-45.

#### Green, JR:

Bisphosphonates: Preclinical review. Oncologist 2004, 9(Suppl. 4): 3-13.

#### Grier, RL; Wise, GE:

Inhibition of tooth eruption in the rat by a Bisphosphonate. Journal of Dental Research, 1998, 77(1): 8-15.

Gronthos, S; Brahim, J; Li, W; Fisher, LW; Cherman, N; Boyde, A:

Stem cell properties of human dental pulp stem cells. Journal of Dental Research, 2002, 81(8): 531-535.

## Haas, AJ:

Rapid expansion of the maxillary dental arch and nasal cavity by opening the midpalatal suture. The Angle Orthodontist, 1961, 31(2): 73-90.

## Haas, AJ:

Long-term posttreatment evaluation of rapid palatal expansion. The Angle Orthodontist, 1980, 50(3): 189-217.

## Harada, S; Rodan, GA:

Control of osteoblast function and regulation of bone mass. Nature, 2003, 423(6937): 349-355.

## Heimisdottir, K; Bosshardt, D; Ruf, S:

Can the severity of root resorption be accurately judged by means of radiographs? A case report with histology. American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics, 2005, 128(1): 106-109.

#### Helfrich, MH:

Osteoclast diseases and dental abnormalities. Archives of Oral Biology, 2005, 50(2): 115-122.

#### Hicks, EP:

Slow maxillary expansion: a clinical study of the skeletal versus dental response to low-magnitude force. American Journal of Orthodontics, 1978, 73(2): 121-141.

## Hofbauer, LC; Khosla, S; Dunstan, CR; Lacey, DL; Boyle, WJ; Riggs, BL:

The roles of osteoprotegerin and osteoprotegerin ligand in the paracrine regulation of bone resorption. Journal of Bone and Mineral Research 2000, 15(1): 2-12.

## Igarashi, K; Mitani, H; Adachi, H; Shinoda, H:

Anchorage and retentive effects of a bisphosphonate (AHBuBP) on tooth movements in rats. American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics, 1994, 106(3): 279-289.

## Igarashi, K; Adachi, H; Mitani, H; Shinoda, H:

Inhibitory effect of the topical administration of a bisphosphonate (risedronate) on root resorption incident to orthodontic tooth movement in rats. Journal of Dental Research, 1996, 75(9): 1644-1649.

## Jimenez-Pellegrin, C; Arana-Chavez, VE:

Root resorption in human mandibular first premolars after rotation as detected by scanning electron microscopy. American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics, 2004, 126(2): 178-184.

#### Junqueria, LC; Carneiro, J:

Zähne. In: Histologie, 4. Aulage, Springer Verlag, 1996: 470-481.

## Kahl-Nieke, B:

Einführung in die Kieferorthopädie, 2. Auflage. Urban & Fischer Verlag, 2001.

## Kawarizadeh, A; Bourauel, C; Zhang, D, Götz, W; Jäger, A:

Correlation for stress and strain profiles and the distribution of osteoclastic cells induced by orthodontic loading in rat. European Journal of Oral Science, 2004, 112(2): 140-147.

#### Korbmacher, H:

Strukturelle und zelluläre Charakteristika der Sutura palatina mediana. 3-D-Analyse der Sutura palatina mediana an humanen Präparaten und tierexperimentelle *in vivo* Untersuchung zur Gaumennahterweiterung. Habilitation, Universität Hamburg, 2006.

#### Korbmacher, H; Kahl-Nieke, B; Schöllchen, M; Heiland, M:

Value of Two Cone-beam Computed Tomography Systems from an Orthodontic Point of View. Journal of Orofacial Orthopedics, 2007, 68(4): 278-289.

#### Krarup, S; Darvann, TA; Larsen, P; Marsh, JL; Kreiborg, S:

Three-dimensional analysis of mandibular growth and tooth eruption. Journal of Anatomy, 2005, 207(5): 669-682.

## Langford, SR; Sims, MR:

Root surface resorption, repair and periodontal attachment following rapid maxillary expansion in man. American Journal of Orthodontics, 1982, 81(2): 108-115.

## Larmas, M:

Pre-odontoblasts, Odontoblasts or "Odontocytes". Journal of Dental Research, 2008, 87(3): 198-199.

## Lasfargues, JJ; Saffar, JL:

Inhibition of prostaniod synthesis depresses alveolar bone resorption but enhances root resorption in the rat. The Anatomical Record, 1993, 237(4): 458-465.

## Lian, JB; Stein, GS; Aubin, JE:

Bone formation: Maturarion an functional activities of osteoblast lineage cells. In: Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism, fifth edition. ASBMR, USA, 2003: 13-28.

Lu, Y; Xie, Y; Zhang, S; Dusevich, V; Bonewlad, LF; Feng, JQ:

Dmp1 targeted Cre expression in odontoblasts and oseocytes. Journal of Dental Research 2007, 86(4): 320-325.

Magloire, H; Romeas, A; Melin, M; Couble, ML; Bleicher, F; Farges, JC:

Molecular regulation of odontoblast activity under dentin injury. Advances in Dental Research, 2001, 15(1): 46-50.

Marks, SC; Wojtowicz, A; Szperl, M; Urbanowska, E; Mackay, CA; Wiktor-Jedrzejczak, W; Stanley, ER; Aukerman, SL:

Administration of colony stimulating factor-1 corrects some macrophage, dental, and skeletal defects in an osteopetrotic mutation (toothless, *tl*) in the rat. Bone, 1992, 13(1): 89-93.

#### Marks, SC; Schröder, HE:

Tooth eruption: theories and facts. Anatomical Records, 1996, 245(2): 374-393.

Marzia, M; Sims, NA; Voit, S; Migliaccio, S; Taranta, A; Bernardini, S; Faraggiana, T; Yoneda, T; Mundy, GR; Boyce, BR; Baron, R, Teti, A:

Decreased Src expression enhances osteoclast differentiation and bone formation. The Journal of Cell Biology, 2000, 151(2): 311-320.

## Masella, RS; Meister, M:

Current concepts in the biology of orthodontic tooth movement. American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics, 2006, 129(4): 458-468.

## Meikle, MC:

The tissue, cellular and molecular regulation of orthodontic tooth movement: 100 years after Carl Sandstedt. European Journal of Orthodontics, 2006, 28(3): 221-240.

## Mommaerts, MY:

Transpalatal distraction as a method of maxillary expansion. British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, 1999, 37(4): 268-272.

#### Mossaz-Joelson, K; Mossaz, CF:

Slow maxillary expansion: a comparision between banded and bonded appliances. European Journal of Orthodontics, 1989, 11(1): 67-76.

## Moxham, BJ:

The effects of some vaso-active drugs on the eruption of the rabbit mandibular incisor. Archives of Oral Biology, 1979, 24(9): 681-688.

## Mullender, MG; Huiskes, R:

Osteocytes and bone lining cells: Which are the best candidates for mechanosensors in cancellous bone? Bone, 1997, 20(6): 527-532.

#### Mullender, M; van Rietbergen, B; Ruegsegger, P; Huiskes, R:

Effect of mechanical control set point of bone cells in mechanical control of trabecular bone architecture. Bone, 1998, 22(2): 125-131.

## Mundy, GR; Chen, D; Oyajobi, BO:

Bone remodelling. In: Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism, fifth edition. ASBMR, USA, 2003: 46-58.

Murray, PE; About, I; Lumley, PJ; Franquin, JC; Windsor, LJ; Smith, AJ:
Odontoblast morphology and dental repair. Journal of Dentistry, 2003, 31(1): 75-82.

Nakamura, I; Takashi, N; Udagawa, N; Moriyama, Y; Kurokawa, T; Jimi, E; Sasaki, T; Suda, T:

Lack of vacuolar proton ATPase association with the cytoskeleton in osteoclasts of osteosclerotic (oc/oc) mice. FEBS Letters, 1997, 401(2-3): 207-212.

Ne, RF; Witherspoon, DE; Gutmann, JL:

Tooth Resorption. Quintessence International, 1999, 30(1): 9-25.

Needleman, HL; Hoang, CD; Allred, E; Hertzberg, J; Berde, C:

Reports of pain by children undergoing rapid palatal expansion. Pediatric Dentistry, 2000, 22(3): 221-226.

#### Neuman, WF:

In: Fundamental and clinical bone physiology, Lippincott Co., Philadelphia, USA, 1980: 83-107.

#### Odenrick, L; Lilja, E; Lindback, KF:

Root surface resorption on two cases of rapid maxillary expansion. British Journal of Orthodontics, 1982, 9(1): 37-40.

Odenrick, L; Karlander, EL; Pierce, A; Kretschmar, U:

Surface resorption following two forms of rapid maxillary expansion. European Journal of Orthodontics, 1991, 13(4): 264-270.

#### Oppenheim, A:

Tissue changes, particularly of the bone, incident to tooth movement. American Journal of Orthodontics, 1911-12, 3: 57-113.

## Owman-Moll, P; Kurol, J:

The early reparative process of orthodontically induced root resorption in adolescents – location and type of tissue. European Journal of Orthodontics, 1998, 20(6): 727-732.

Parfitt, AM; Drezner, MK; Glorieux, FH; Kanis, JA; Malluche, H; Meunier, PJ; Ott, SM; Recker, RR:

Bone histomorphometry: standardization of nomenclature, symbols and units. Report of the ASBMR Histomorphometriy Nomenclature Committee. Journal of Bone and Mineral Research, 1987, 2(6): 595-610.

## Pierce, AM:

Experimental basis for the management of dental resorption. Endodontics and Dental Traumatology, 1989, 5(6): 255-265

## Porras, AG; Holland, AD; Gertz, BJ:

Pharmacokinetics of Alendronate. Clinical Pharmacokinetics, 1999, 36(5): 315-328.

#### Proffit, WR:

In: Contemporary orthodontics, second edition. Mosby Inc., USA, 1993: 266-315.

#### Reitan, K:

Principles of retention and avoidance of posttreatment relapse. American Journal of Orhtodontics, 1969, 55(6): 776-790.

## Reitemeier, B; Schwenzer, N; Ehrenfeld, M:

Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde: Einführung in die Zahnmedizin. Thieme Verlag, Stuttgart, 2006: 13-41.

## Ren, Y; Maltha, JC; Kuijpers-Jagtmann, AM:

Optimum force magnitude for orthodontic tooth movement: a systematic literature review. The Angle Orthodontist, 2003, 73(1): 86-92.

## Reszka, AA; Rodan, GA:

Bisphosphonate mechanism of action. Current Rheumatology Reports, 2003, 5(1): 65-74.

## Roberts, WE; Huja, S; Roberts, JA:

Bone remodeling: biomechanics, molecular mechanism, and clinical perspectives. Seminars in Orthodontics, 2004, 10(2): 123-161.

## Robey, PG; Boskey, AL:

Extracellular matrix an biomineralization of bone. In: Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism, sixth edition. ASBMR, USA, 2006: 12-19.

## Rodan, GA; Martin TJ:

Role of osteoblasts in hormonal control of bone resorption – a hypothesis. Calcified Tissue International, 1981, 33(4): 349-351.

Rogers, MJ; Frith, JC; Luckman, SP; Coxon, FP; Benford, HL; Monkkonen, J; Auriola, S; Chilton, KM; Russel, RG:

Molecular mechanisms of action of bisphosphonates. Bone 1999, 24(5 Suppl.): 73S-79S.

## Ross, FP:

Osteoclast biology and bone resorption. In: Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism, sixth edition. ASBMR, USA, 2006: 30-35.

## Ren, Y; Maltha, JC; Kuijpers-Jagtman, AM.

Optimum force magnitude for orthodontic tooth movement: a systematic literature review. The Angle Orthodontist 2003, 73(1): 86-92.

#### Rubin, C; Rubin, J:

Biomechanics and mechanobiology of bone. In: Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism, sixth edition. ASBMR, USA, 2006: 36-42.

Salo, J; Lehenkari, P; Mulari, M; Metsikko, K; Vaananen, HK:

Removal of osteoclast bone resorption products by transcytosis. Science, 1997, 276(5310): 270-273.

Sasaki, T; Moteqi, N; Suzuki, H; Watanabe, C; Tadokoro, K; Yanagisawa, T; Higashi, S:

Dentin resorption mediated by odontoclasts in physiological root resorption of human deciduous teeth. American Journal of Anatomy, 1988, 183(4): 303-315.

## Schinke, T; Amling, M:

Mineralization of bone: an active or passive process. In: Handbook of Mineralization. Wiley-VCH Verlag, Deutschland, 2007: 3-14.

Schinke, T; Schilling, AF; Baranowsky, A; Seitz, S; Marshall, RP; Linn, T; Bläker, M; Hübner, AK; Schulz, A; Simon, R; Gebauer, M; Priemel, M; Kornak, U; Perkovic, S; Barvencik, F; Beil, TF; Del Fattore, A; Frattini, A; Streichert, T; Püschel, K; Villa, A; Debatin, KM; Rueger, JM; Teti, A; Zustin, J; Sauter, G; Amling, M:

Impaired gastric acidification negatively affects both calcium homeostasis and bone mass. Nature medicine, 2009, 15(6): 674-681.

## Schönherr, E:

Gaumennahterweiterung mit abnehmbaren Behelfen. Fortschritte der Kieferorthopädie, 1955, 16(1): 177-182.

#### Schröder, HE; Listgarten, MA\_

Fine structure of the developing epithelial attachment of human teeth. Monographs in Developmental Biology, 1971, 2(1): 1-134.

#### Sheehan, D; Hrapchak, B:

In: Theory and Practice of Histotechnology, second edition, Battelle Press, Ohio, USA, 1980: 226-227.

## Smith, AJ; Lesot, H:

Induction and regulation of crown dentinogenesis: embryonic events as a template for dental tissue repair? Critical Reviews in Oral Biology an Medicine, 2001, 12(5): 425-437.

## Sullivan, LH:

The tall office building artistically considered. Lippincott's Magazine, Philadelphia, 1896.

## Ten Cate, AR: Deporter, DA; Freeman, E:

The role of fibroblasts in the remodeling of periodontal ligament during physiological tooth movement. American Journal of Orthodontics, 1976, 69(2): 155-168.

## Tiffee, JC; Xing, L; Nilsson, S; Boyce, BF:

Dental abnormalities associated with failure of tooth eruption in src knockout and op/op mice. Calcified Tissue International, 1999, 65(1): 53-58.

#### Tipler, PA; Mosca, G:

In: Physik für Wissenschaftler und Ingenieure, 1. Auflage, Spektrum Verlag, Heidelberg, 2004: 341-363.

#### Van Leeuwen, EJ; Maltha, JC:

Myth of optimal pressure. Nederlands Tijdschrift voor Tandheelkunde, 2000, 107(4): 135-137.

## Vardimon, AD; Graber, TM; Pitaru, S:

Repair process of external root resorption subsequent to palatal expansion treatment. American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics, 1993, 103(2): 120-130.

#### Vardimon, AD, Brosh, T; Spielgler, A; Lieverman, M; Pitaru, S:

Rapid palatal expansion: Part 1. Mineralization pattern of the midpalatal suture in cats. American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics, 1998, 113(4): 371-378.

## Vardimon, AD, Brosh, T; Spielgler, A; Lieverman, M; Pitaru, S:

Rapid palatal expansion: Part 2. Dentoskeletal changes in cats with patent versus synostosed midpalatal suture. American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics, 1998, 113(5): 488-497.

## Vardimon, AD; Levy, T; Weinreb, M:

Maxillary incisor root resorption after rapid palatal expansion in Felis catus. European Journal of Oral Sciences, 2005, 113(1): 41-46.

## Vignery, A; Baron, R:

Dynamic histomorphometry of alveolar bone remodeling in the adult rat. Anatomical Records, 1980, 196(2): 191-200.

## Wise, GE; Lin, F:

The molecular biology of initiation of tooth eruption. Journal of Dental Research, 1995, 74(1): 303-306.

#### Wise, GE; Yao, S; Henk, WG:

Bone formation as a potential motive force of tooth eruption in the rat molar. Clinical Anatomy, 2007, 20(6): 632-639.

#### Wise, GE; King GJ:

Mechanisms of tooth eruption and orthodontic tooth movement. Journal of Dental Research, 2008, 87(5): 414-434.

## Hickmann, CP; Roberts, LS; Larson, A; Anson, HL; Eisenhour, DJ:

Chordata – Allgemeine Merkmale, Protochordaten und der Ursprung der frühen Vertebraten. In: Zoologie, 13. Auflage. Verlag Addison-Wesley, München, 2008: 727-755.

#### Yanosky, MR; Holmes, JD:

Mini-implant temporary anchorage devices: orthodontic applications. Compendium of Continuing Education in Dentistry, 2008, 29(1): 12-20.

Yoshimatsu, M; Shibata, Y; Kitaura, H; Chang, X; Moriishi, T; Hashimoto, F; Yoshida, N; Yamaguchi, A:

Experimental model of tooth movement by orthodontic force in mice and its application to tumor necrosis factor receptor-deficient mice. Journal of Bone and Mineral Metabolism, 2006, 24(1): 20-27.

# **Danksagung**

Hiermit möchte ich allen danken, die mich auf meinem bisherigen beruflichen Weg begleitet und unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. med. Michael Amling, der mich sehr freundlich in seine nette Arbeitsgruppe aufgenommen hat und mir die Gelegenheit gab, diese Arbeit anzufertigen. Seine Fähigkeit, Leute zu begeistern und Mitarbeiter zu einem Team zusammenzuschweißen, ist unübertroffen.

Großen Dank verdient auch PD Dr. med. dent. Heike Korbmacher, die den Anstoß zu diesem interdisziplinären Thema gab und den Brückenschlag in die Kieferorthopädie ermöglichte. Ihr Wille zur Habilitation ermöglichte mir diese Dissertation.

Natürlich möchte ich mich auch bei Prof. Dr. med. Arndt Schilling und PD Dr. rer. nat. Thorsten Schinke bedanken. Beide haben mit ihrer fachlichen Kompetenz und ihrem Willen, Wissen weiterzugeben, entscheidend zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen. Hervorheben ist hier speziell Arndts Geduld mit mir. Seine unprätentiöse Menschlichkeit hat mich tief beeindruckt und muss lobend erwähnt werden

Ebenso gilt mein Dank Prof. Dr. med. Dr. med. dent. Max Heiland als Ansprechpartner aus der Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie, der beim Klammereinsatz häufig mit Rat und Tat zur Seite stand.

Nicht zu vergessen ist auch Prof. Dr. med. dent. Bärbel Kahl-Nieke, deren interdisziplinäres Verständnis von Forschung meine forschende Tätigkeit überhaupt erst ermöglichte.

Außerdem danke ich allen Mitarbeitern der Experimentellen Unfallchirurgie für das freundliche Arbeitsklima. Hervorzuheben sind hier Antje Hübner, Cordula Erdmann und Sandra Rieke für ihre Freundschaft und aufmunternde Art. Besonders Antje, meiner Zimmerkollegin, möchte ich dafür danken, dass sie immer auch für weniger wissenschaftliche Themen als geduldiger Ansprechpartner zur Verfügung stand und mir so den Laboralltag versüßte. Allen anderen sei für den Kuchen, die Kekse und die allgemein nette und hilfsbereite Atmosphäre gedankt.

Vielen, vielen Dank!