

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Institut für Osteologie und Biomechanik

Direktor: Prof. Dr. med. Michael Amling

Die Rolle von c-Fos in der kieferorthopädischen Zahnbewegung – eine in-vivo-Studie im transgenen Mausmodell

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Zahnmedizin
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

vorgelegt von:

Maximilian Georg Decker
aus Dernbach

Hamburg 2019

**Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 08.01.2020**

**Veröffentlicht mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.**

Prüfungsausschuss, der Vorsitzende: Prof. Dr. med. Michael Amling

Prüfungsausschuss, zweite Gutachterin: Prof. Dr. med. dent. Bärbel Kahl-Nieke

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	5
1.1	Arbeitshypothese und Fragestellung	5
1.2	Anatomische Grundlagen	6
1.2.1	Makroskopische Anatomie des murinen Gebisses	6
1.2.2	Mikroskopische Anatomie der dentalen Gewebe	6
1.3	Kieferorthopädische Zahnbewegung	8
1.4	Zelluläre Grundlagen der kieferorthopädischen Zahnbewegung	9
1.4.1	Fibroblasten des parodontalen Ligaments	9
1.4.2	Osteoblasten.....	10
1.4.3	Osteoklasten.....	11
1.5	C-Fos.....	13
2	Material und Methoden	15
2.1	Versuchstiere.....	15
2.2	Genotypisierung	16
2.2.1	Isolierung der DNA.....	16
2.2.2	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	17
2.2.3	Gelelektrophorese.....	18
2.3	Applikation der Apparatur	19
2.4	Micro-Computertomographie.....	21
2.5	Entkalkte Histologie	22
2.5.1	Toluidinblau-Färbung	22
2.5.2	Pikro-Siriusrot-Färbung.....	23
2.5.3	Immunhistochemische Färbung	24

2.5.4	Auswertung der Histologie	25
2.6	Statistik.....	26
3	Ergebnisse	27
3.1	Gewichtsverlauf	27
3.2	Interkoronale Distanz.....	28
3.3	Histologie.....	29
3.3.1	Toluidinblau-Färbung	29
3.3.2	Pikro-Siriusrot-Färbung	34
3.3.3	TRAP-Färbung.....	36
4	Diskussion.....	39
4.1	Die kieferorthopädische Zahnbewegung im Mausmodell	39
4.2	Auswirkungen von c-Fos auf die kieferorthopädische Zahnbewegung	41
4.3	Ausblick.....	45
5	Zusammenfassung.....	46
6	Abstract.....	47
7	Abkürzungsverzeichnis	48
8	Abbildungsverzeichnis	50
9	Literaturverzeichnis	51
10	Danksagung.....	63
11	Lebenslauf	64
12	Eidesstattliche Versicherung.....	65

1 Einleitung

1.1 Arbeitshypothese und Fragestellung

Der Knochen ist ein dynamisches Gewebe, dessen ständiger Auf- und Abbau durch eine Vielzahl genetischer und epigenetischer Faktoren reguliert wird. Zu den wichtigsten epigenetischen Faktoren gehören mechanische Reize, die in der embryonalen und postnatalen Entwicklung die Differenzierung und Aktivität knochenbauender Osteoblasten und knochenabbauender Osteoklasten steuern. Nach Wachstumsabschluss sind mechanische Reize weiterhin von zentraler Bedeutung für den lebenslangen Erhalt des Skelettsystems und ein wichtiger Kofaktor für die Entstehung von Knochenerkrankungen wie Osteoporose oder Osteoarthritis. Wie mechanische Faktoren das Skelettsystem auf genetischer Ebene regulieren, ist daher nicht nur von grundlegendem zellbiologischem Interesse, sondern spielt auch eine Rolle für die Identifizierung mechanobiologisch relevanter genetischer Risikofaktoren in der Orthodontie, Orthopädie und Osteologie.

Die orthodontische Zahnbewegung ist ein anschauliches Beispiel für mechanisch induzierten Knochenumbau. Die Applikation einer Kraft auf einen Zahn führt zu einer Kompression des Zahnhalteapparats auf der sogenannten Druckseite, wodurch der Knochenabbau durch Osteoklasten eingeleitet wird. Auf der gegenüberliegenden Zugseite wird der Zahnhalteapparat gedehnt und Knochen durch Osteoblasten aufgebaut. Während in tierexperimentellen Studien die orthodontische Zahnbewegung ursprünglich in Großtieren und Ratten angewendet wurde, konnte sie in den letzten Jahren auch für genveränderte Mäuse etabliert werden (Braga et al. 2011, Taddei et al. 2012, 2013, Kondo et al. 2013). Hierdurch ist es möglich den Einfluss einzelner Gene auf mechanisch induzierten Knochenumbau *in vivo* zu untersuchen.

Das Gen *c-Fos* ist bei der genetischen Kontrolle der Zahnbewegung von besonderem Interesse, da *c-Fos* eine zentrale Rolle bei der Osteoklastendifferenzierung einnimmt und seine Expression mechanisch induziert wird (Grigoriadis et al. 1994, Sen et al. 2015). Es ist jedoch ungeklärt, ob *c-Fos* auch einen direkten Einfluss auf die Zahnbewegung besitzt. Ziel dieser Arbeit war es daher, eine orthodontische Zahnbewegung bei *c-Fos*-transgenen Mäusen durchzuführen, um den Einfluss von *c-Fos* auf den mechanisch-induzierten Knochenumbau näher zu charakterisieren.

1.2 Anatomische Grundlagen

1.2.1 Makroskopische Anatomie des murinen Gebisses

Die Maus (*Mus musculus*) besitzt postnatal 16 Zähne - pro Quadranten einen Schneidezahn (*Dens incisivus*) und drei Backenzähne (*Dentes molares*) (Abbildung 1). Die Anlagen der Prämolaren (*Dentes praemolares*) haben sich entwicklungsgeschichtlich zurückentwickelt (Luckett 1985, Peterková et al. 1995). Zwischen den Inzisivi und Molares besteht daher ein ausgeprägtes Diastema. Die Maus besitzt zwar prinzipiell wie der Mensch ein Wechselgebiss (Diphiodontie), jedoch werden die Milchzähne (*Dentes decidui*) bereits embryonal durch das permanente Gebiss ersetzt (Peterková et al. 1995, Keränen et al. 1999). Damit besitzt die Maus postnatal nur eine Dentition. Eine Besonderheit des murinen Gebisses sind die lebenslang kontinuierlich nachwachsenden Schneidezähne, die mit Ihren Wurzeln bis unter die Molaren reichen.

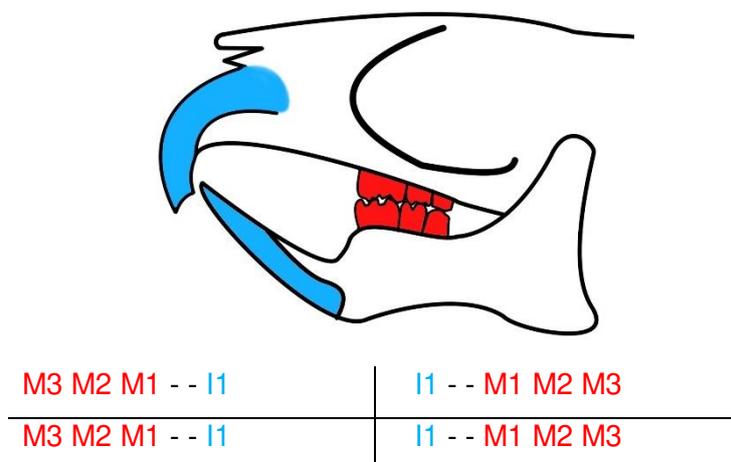


Abbildung 1: Linkslaterale Aufsicht eines schematischen Mausschädels mit dazugehörigem Zahnschema. Die Inzisivi sind blau, die Molares rot eingefärbt.

1.2.2 Mikroskopische Anatomie der dentalen Gewebe

Die murinen Molares ähneln anatomisch den menschlichen Backenzähnen. Die Zahnhartsubstanzen bestehen aus drei unterschiedlichen Geweben: Schmelz (Enamelum), Zahnbein (Dentinum) und Wurzelzement (Cementum).

Das Enamelum umgibt als äußerste Schicht die gesamte Zahnkrone. Durch den hohen anorganischen Anteil (ca. 95 Gewichts%) – vornehmlich Hydroxylapatit – erreicht es

den höchsten Härtegrad der humanen und murinen Gewebe (Radlanski 2011). Es ist vollkommen frei von Zellen oder deren Ausläufern, da die schmelzbildenden Zellen (Ameloblasten) nur während der Schmelzbildung der Zahnkrone aufliegen und im Zuge des Zahndurchbruches verloren gehen. Daher kann der Zahnschmelz im Gegensatz zu den anderen Zahngeweben nicht regeneriert werden.

Unterhalb der Schmelzschicht liegt das Dentin. Es bildet das Grundgerüst des Zahnes und stellt damit dessen Hauptanteil dar. Die dentinbildenden Zellen (Odontoblasten) bilden die äußerste Schicht des Zahnmarks (Pulpa) und reichen mit ihren Fortsätzen (Tomes-Fasern) bis an die Schmelz-Dentin-Grenze. In Kombination mit der daraus resultierenden Porosität und dem geringeren Gewichtsanteil an Hydroxylapatit ergibt sich eine geringere Härte im Vergleich zum Zahnschmelz. Allerdings findet die Bildung des Dentins auch nach abgeschlossener Zahnentwicklung weiter statt. Dies geschieht physiologisch im Alterungsprozess, kann jedoch durch diverse Reize wie beispielsweise Karies auch gesondert stimuliert werden. So lässt sich das Dentin wiederum spezifisch nach Bildungszeit und Grund der Bildung unterteilen und unterscheiden (Radlanski 2011, Schuurs 2013).

Auf Höhe der Zahnwurzel ist das Dentin von einer dünnen Schicht Wurzelzement umgeben, einem ebenfalls mineralisierten Gewebe. Es ist Teil des Zahnhalteapparates (Parodontium) und stellt das Bindeglied zwischen parodontalem Faserapparat und Zahn dar. Gebildet wird es von so genannten Zementoblasten, die im Verlauf der Synthese in das Zement eingeschlossen werden können und daraufhin als Zementozyten bezeichnet werden. Generell lässt sich die Struktur des Zements topografisch unterscheiden. Im Zentrum steht hierbei der Zahnhalteapparat. Im oberen Teil der Wurzel befindet sich zellfreies Zement, in das parodontale Fasern einstrahlen, aber auch zementeigene vorkommen. Im Bereich der Wurzelspitzen und Wurzelfurkationen ist zellreiches Wurzelzement mit eigenen Kollagenfasern aber auch parodontalen Fasern zu finden. Im Gegensatz zum Schmelz kann das Zement auch nach abgeschlossener Zahnentwicklung neu gebildet werden. So entsteht nach dessen Beschädigung ein so genanntes Reparaturzement, das zellreich ist und lediglich eigene Kollagenfasern beherbergt (Schiebler und Korf 2007, Radlanski 2011, Anderhuber et al. 2012).

Die Verbindung von Zahn zu Knochen erfolgt über Kollagenfasern vom Typ I. Diese so genannten „Sharpey-Fasern“ strahlen vom Periost in das Wurzelzement. Neben

ihnen sind zwischen Zahnwurzel und Alveolarknochen Blut-, Nerven- und Lymphgefäße beherbergt. Die Gesamtheit wird als Wurzelhaut (Desmodont oder auch Parodontalligament) bezeichnet. Sie ist für die externe Versorgung des Zements aber auch die Innervation und Versorgung des Zahnfachs (Alveole) verantwortlich. Darüber hinaus dient sie der Umwandlung von Druck- in Zugkraft beziehungsweise der Anpassung an diese Kräfte (Sims 1980, Picton 1988). Physiologisch geschieht das im Rahmen der Belastung durch das Kauen, größere und langwierigere Kräfte treten häufig durch die kieferorthopädische Therapie auf.

1.3 Kieferorthopädische Zahnbewegung

Die kieferorthopädische Zahnbewegung ist ein besonders anschauliches Beispiel für mechanisch-induzierten Knochenumbau. Die Applikation einer externen Kraft auf die Zähne resultiert in einer Kompression des Faserapparates und der Blutgefäße auf der sogenannten Druckseite, während auf der gegenüberliegenden Seite eine Dehnung des Desmodonts stattfindet (Schwarz 1932). Um wieder einen neutralen Zustand zu erreichen und als Anpassung an die neuartige Belastung, findet am Alveolarknochen in Krafrichtung eine Resorption statt und auf der gegenüberliegenden Seite eine Apposition (Abbildung 2). Durch kontrolliertes Aufrechterhalten lässt sich diese Antwort des Körpers so ausnutzen, dass ein Zahn im Knochen bewegt werden kann. Essentiell sind dabei die therapeutischen Kräfte, die je nach Dosierung unterschiedliche Auswirkungen haben.

Die Größe der angewendeten Kraft ist hierbei von entscheidender Bedeutung. So wurde von A. M. Schwarz postuliert, dass auf der Druckseite zwischen vier unterschiedlichen „biologischen Wirkungsgraden“ zu unterscheiden sei. Beim Wirkungsgrad 1 besteht eine unterschwellige Kraft (ca. $0,15 \text{ N/cm}^2$ Wurzeloberfläche), die zu keiner Änderung der Zahnstellung führt. Beim Wirkungsgrad 2 kommt es durch eine geringe Kraft ($0,15$ bis $0,2 \text{ N/cm}^2$) zu einer Bewegung des Zahnes im Zahnfach, ohne aber dabei den Blutfluss in den Kapillaren zu unterbinden. Der kapillare Blutdruck wird erst im dritten Wirkungsgrad ab $0,2 \text{ N/cm}^2$ überschritten. Dabei wird das umliegende Gewebe jedoch nicht vollständig komprimiert. Beim vierten Wirkungsgrad wird die Grenze von $0,5 \text{ N/cm}^2$ überschritten, so dass eine totale Kompression des Desmodonts stattfindet (Kahl-Nieke 2010). Dies spielt ein Zusammenhang in Bezug

auf die Migration von Zellen aus den Blutgefäßen in das betroffene Gewebe (Diapedese) (Cooper und Sims 1989).

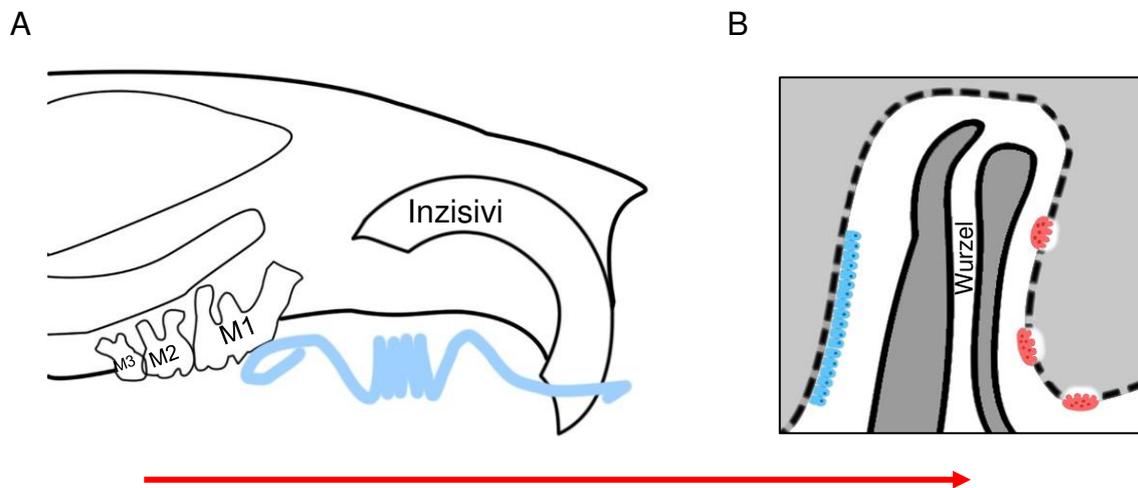


Abbildung 2: Kieferorthopädische Zahnbewegung im Mausmodell. **(A)** Schematische Darstellung des murinen Oberkiefers mit Zugfeder (blau eingefärbt). Die Zugfeder führt zu einer Bewegung des Molarens in Pfeilrichtung (rot). **(B)** Schematische Darstellung der Zahnwurzel. Osteoblasten (blau) differenzieren sich im Bereich der Zugzone und bilden neuen Knochen, während auf der gegenüberliegenden Druckzone Knochenabbau durch Osteoklasten (rot) stattfindet.

1.4 Zelluläre Grundlagen der kieferorthopädischen Zahnbewegung

Bei der kieferorthopädischen Zahnbewegung sind drei verschiedene Zelltypen von besonderer Bedeutung: Fibroblasten, Osteoblasten und Osteoklasten.

1.4.1 Fibroblasten des parodontalen Ligaments

Fibroblasten differenzieren sich aus mesenchymalen Stammzellen und besitzen gewebespezifische Eigenschaften (Chang et al. 2002). Die Fibroblasten des parodontalen Ligaments bilden den zellulären Hauptbestandteil der Wurzelhaut und nehmen eine zentrale Rolle in der Mechanotransduktion des parodontalen Faserapparates ein (Lekic und McCulloch 1996, Brown et al. 1998, Prajapati et al. 2000, Li et al. 2004). Darüber hinaus sind sie für dessen Erhalt und Regeneration zuständig (Yee et al. 1976, Lekic und McCulloch 1996). Es wurde gezeigt, dass eine hohe Turnover-rate des Kollagens im Zahnhalteapparat eine große Bedeutung für den Erhalt eines optimalen Attachments besitzt (Sodek 1977). Um dies zu gewährleisten, besitzt dieser Zelltyp die Fähigkeit, Kollagen I zu synthetisieren und über Phagozytose intrazellulär zu degradieren (Cate et al. 1976, Melcher und Chan 1981).

Eine Besonderheit des Fibroblasten stellt das Zytoskelett dar. Es ist so ausgelegt, dass bereits leichte mechanische Verformungen eine rasche zelluläre Antwort auslösen können. Dabei ist die Intensität der Reaktion abhängig vom Belastungsgrad (Pender und McCulloch 1991). Unter den ersten Genen, die bei mechanischer Belastung aktiviert werden, (engl. immediate early genes) ist insbesondere das Gen *C-FOS* zu finden (Takano-Yamamoto et al. 1994, Sen et al. 2015).

1.4.2 Osteoblasten

Ebenso wie Fibroblasten reagieren auch Osteoblasten mit einer vermehrten Expression bestimmter Gene - unter anderem *C-FOS* - auf einen mechanischen Stimulus (Glantschnig et al. 1996, Pavalko et al. 1998, Yang et al. 2004, Li et al. 2007). Osteoblasten sind vollständig differenzierte Zellen, die aus den mesenchymalen Stammzellen hervorgehen (Aubin und Triffitt 2002) und genetisch den Fibroblasten nahe stehen (Ducy et al. 2000). Bei der kieferorthopädischen Zahnbewegung führt insbesondere eine Dehnung des parodontalen Halteapparates zur Aktivierung von Osteoblasten. Die Knochenbildung erfolgt hierbei zweiphasig. Zunächst wird eine kollagenreiche Matrix sezerniert, das sogenannte Osteoid. Die anschließende Mineralisation der kollagenen Matrix erfolgt nach 10-14 Tagen durch die Ausfällung von Hydroxylapatit.

Ein Teil der Osteoblasten geht danach in die Apoptose über. Ein anderer Teil verbleibt auf der Knochenoberfläche (engl. Bone lining cells) oder differenziert sich weiter zu Osteozyten.

Bone lining cells befinden sich an der Oberfläche des Knochens, dem sie flach anliegen. Auch ihnen wird eine mechanosensitive und knochenbildende Funktion zugeordnet (Miller et al. 1989, Dobnig und Turner 1995, Chow et al. 1998).

Osteozyten findet man eingebettet in Lakunen der Knochenmatrix. Sie repräsentieren etwa 95% der Knochenzellen. Sie sind in der Lage untereinander sowie mit Zellen außerhalb der Knochenmatrix zu kommunizieren. Dies gelingt ihnen über ihre in den Canaliculi befindlichen Zellausläufer und die Fähigkeit Transkriptionsfaktoren der mesenchymalen und hämatopoetischen Linie zu sezernieren (Ajubi et al. 1996, Westbroek et al. 2000, Kurata et al. 2006). Auch bei der Transduktion mechanischer Reize im Rahmen der Zahnbewegung spielen Osteozyten eine entscheidende Rolle (Mikuni-Takagaki et al. 1996, Mikuni-Takagaki 1999, Gluhak-Heinrich et al. 2003,

Klein-Nulend et al. 2013). Dies gelingt ihnen unter anderem durch mechanisch aktivierte Kalziumionenkanäle, die sie an ihren Zellwänden exprimieren (Mikuni-Takagaki 1999). Dabei findet reaktionär wie bei den Osteoblasten eine vermehrte Expression von Genen statt (u.a. C-FOS) (Inaoka et al. 1995, Lean et al. 1996, Mikuni-Takagaki et al. 1996, Kawata und Mikuni-Takagaki 1998, Mikuni-Takagaki 1999, Mason et al. 2009, Klein-Nulend et al. 2013) . Durch die oben beschriebenen Canaliculi und ihre Fähigkeit stimulierende Mediatoren sowohl für Osteoblasten (Mikuni-Takagaki 1999, Gluhak-Heinrich et al. 2003, Nakashima et al. 2011) als auch für Osteoklasten (Nakashima et al. 2011, Xiong et al. 2011) zu sezernieren, nehmen sie eine wichtige Rolle bei der Koordination der Knochenresorption und Knochenapposition (engl. Bone remodeling) ein.

Sowohl Osteoblasten, bone lining cells als auch Osteozyten sind in der Lage, die Differenzierung und Reifung von Osteoklasten zu beeinflussen. Dies gelingt ihnen beispielsweise über die Ausschüttung von Rezeptor Aktivator of Nuklear Factor κ B Ligand (RANKL) und Osteoprotegerin (OPG) (Simonet et al. 1997, Lacey et al. 1998, Kurata et al. 2006, Bonewald 2007, Boyce und Xing 2008, Kreja et al. 2008, Nakashima et al. 2011, Xiong et al. 2011, Bonewald und Wacker 2013) (Abbildung 3).

1.4.3 Osteoklasten

Osteoklasten gehen aus den hämatopoetischen Stammzellen des Knochenmarks hervor (Udagawa et al. 1990), für deren Reifung circa 10 bis 20 Vorläuferzellen fusionieren. Essentiell für die Differenzierung sind hierbei der „Monozytenkolonienstimulierende Faktor“ (M-CSF) und der „Rezeptor Aktivator of Nuklear Factor κ B Ligand“ (RANKL). Beide Proteine werden von spezifischen Zellen wie beispielsweise den Osteoblasten oder den Stromazellen des Knochenmarks produziert. So war anfangs eine Differenzierung von Osteoklasten *in vitro* nur durch Kokulturen mit besagten Zellen möglich (Udagawa et al. 1990). Seit Bekanntwerden der Rollen von M-CSF und RANKL ist allein durch deren Zugabe eine Osteoklastogenese aus den Vorläuferzellen *in vitro* möglich (Lacey et al. 1998).

M-CSF ist dabei für die Entwicklung zur Vorläuferzelle und dessen Überleben essentiell. Zudem wirkt es indirekt auf die Differenzierung in einen mononukleären Osteoklasten - beispielsweise über den Transkriptionsfaktor „Aktivator Protein 1“ (AP-

1) (Wagner und Matsuo 2003) (Abbildung 3). Auch RANKL löst über seinen Rezeptor eine Signalkaskade aus, an deren Ende AP-1 steht (Wagner 2002, Wagner und Matsuo 2003). Zusätzlich wirken die mit RANK assoziierten Mediatoren positiv auf die Fusion (Kim et al. 2005) der mononukleären Osteoklasten und die Aktivierung der polynukleären Osteoklasten (Takayanagi et al. 2002, Boyce und Xing 2008, Nakashima et al. 2011) (Abbildung 3).

Der für RANKL spezifische „Decoy-Rezeptor“ (wörtlich übersetzt: „Köder“-Rezeptor) Osteoprotegerin (OPG) funktioniert im RANK/RANKL-Signalweg als dessen Hauptregulator (Lacey et al. 1998, Teitelbaum 2000, Takayanagi et al. 2002, Boyce und Xing 2008, Vahle et al. 2015). Die Beeinflussung der Expression von RANKL und OPG dient daher als zentraler Mechanismus zur Regulation von Osteoklastenaktivität und -differenzierung (Simonet et al. 1997) (Abbildung 3). Da RANKL und OPG von Osteoblasten sezerniert werden, besteht ein Zusammenhang zwischen Osteoblasten- und Osteoklastenaktivität (engl. coupling). Aktivierte Osteoklasten wiederum fördern die Knochensynthese nahegelegener Osteoblasten.

Aktive Osteoklasten besiedeln etwa ein Prozent der Knochenoberfläche. Damit eine Resorption des Alveolarknochens möglich ist, muss die Zelle zunächst einen geeigneten Reaktionsraum schaffen. Diese so genannte Howship-Lakune entsteht über eine dichte Verbindung mit dem Knochen am Zellrand („sealing zone“) über Integrine und Podosome. Im Zusammenhang mit diesem Anheften steht auch eine Umstrukturierung der Aktinfilamente im Zellinneren, wodurch die dem Knochen zugewandte reaktive Seite des Osteoklastens bürstensaumartig vergrößert wird („ruffled border“). Durch Protonenpumpen erfolgt eine Ansäuerung des Milieus der Howship-Lakune, wodurch der anorganische Anteil des Knochens bei einem pH-Wert von 4 bis 4,5 aufgelöst wird. Zum Abbau der freiliegenden organischen Matrix werden danach mittels Exozytose diverse Verdauungsenzyme (u. a. Cathepsin K) in den Reaktionsraum sezerniert (Teitelbaum 2000, Väänänen und Zhao 2002).

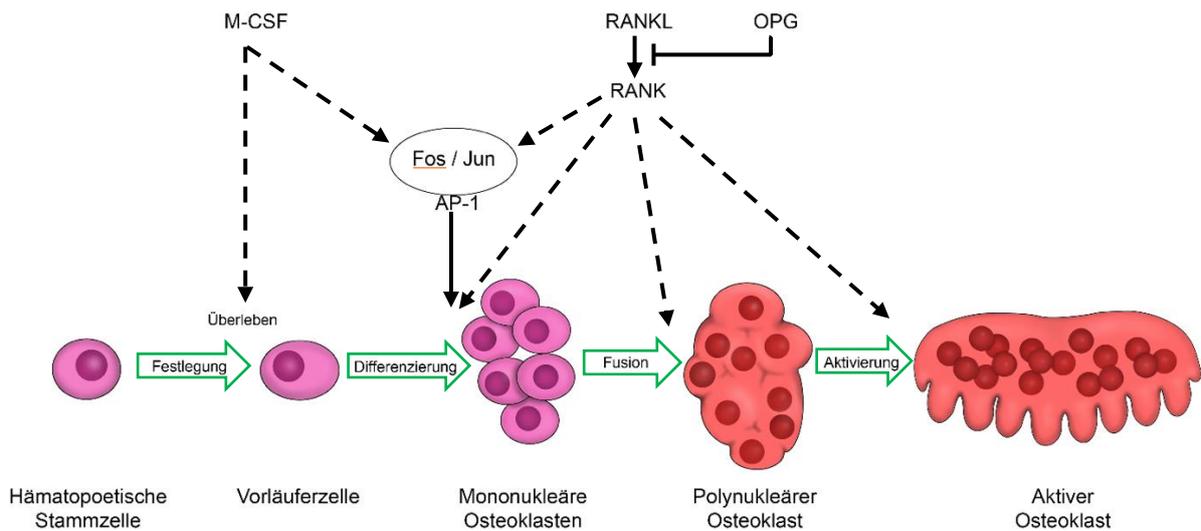


Abbildung 3: Entwicklungsverlauf der Osteoklasten. Durchgängige Linien symbolisieren direkte Auswirkungen, gestrichelte Linien die Wirkung über weitere Mediatoren.

1.5 C-Fos

M-CSF und RANKL lösen beide für die Differenzierung spezifische Signalkaskaden aus, an deren Ende jeweils eine vermehrte Expression von C-FOS steht (Abbildung 3). C-FOS ist ein Protein der Fos-Familie (Milde-Langosch 2005) und bildet mit C-JUN das Heterodimer „Aktivator Protein 1“ (AP-1) (Chiu et al. 1988, Wagner und Matsuo 2003), einen Schlüsselfaktor der Zellproliferation und -differenzierung. Die Expression von C-FOS wurde bereits in der Entwicklung, der Differenzierung und dem Wachstum des zentralen Nervensystems, des Knochens und der Zähne nachgewiesen (Müller et al. 1982, 1985, Dony und Gruss 1987, Morgan et al. 1987, Caubet und Bernaudin 1988, De Togni et al. 1988, Sandberg et al. 1988). Welche physiologische Relevanz c-Fos im Knochenstoffwechsel besitzt, konnte in *in-vivo*-Studien mit genveränderten Mäusen gezeigt werden. So führte die Deletion von *c-Fos* bei Mäusen zu einer Osteopetrose durch die vollständige Blockierung der Osteoklastendifferenzierung (Wang et al. 1992, Grigoriadis et al. 1993, 1994).

Von besonderer Bedeutung für diese Arbeit ist die Tatsache, dass der AP-1 Transkriptionsfaktor C-FOS eine besonders hohe Mechanosensitivität aufweist. So führt die Kompression oder Dehnung von Osteoblasten und Fibroblasten des parodontalen

Ligaments *ex vivo* zu einer Induktion von C-FOS auf RNA- und Proteinebene (Glantschnig et al. 1996, Pavalko et al. 1998, Yang et al. 2004, Li et al. 2007, Sen et al. 2015). In einem Organkultursystem konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass C-FOS nach mechanischer Stimulation sowohl in Phasen der Proliferation als auch Differentiation von Knochenzellen vermehrt gebildet wird (Moalli et al. 2000). Die Expression von C-FOS geht hierbei der Expression von Osteoblastendifferenzierungsmarkern wie Kollagen I und alkalische Phosphatase, welche ebenfalls AP-1 sensitive Genabschnitte aufweisen, voraus (Moalli et al. 2000). Obwohl *in-vitro*-Studien sowohl die Mechanosensitivität als auch die physiologische Relevanz von c-Fos im Knochenstoffwechsel zeigen, bleibt unklar, welchen Einfluss c-Fos auf den mechanisch induzierten Knochenumbau *in vivo* besitzt. Ziel dieser Arbeit war es daher eine kieferorthopädische Zahnbewegung bei *c-Fos*-transgenen Mäusen und Kontrolltieren durchzuführen, um den Einfluss von c-Fos auf mechanisch-induzierten Knochenumbau auf morphologischer, histologischer und zellulärer Ebene *in vivo* zu untersuchen.

2 Material und Methoden

2.1 Versuchstiere

Für die Versuche wurden transgene Mäuse mit ubiquitärer *c-Fos*-Überexpression verwendet (*c-Fos* tg). Die Mauslinie wurde ursprünglich in einer Arbeitsgruppe von Erwin F. Wagner erstellt, um ein geeignetes Mausmodell für Osteosarkome zu entwickeln (Hanahan et al. 2007). Vorbild für diesen Ansatz waren viral bedingte Osteosarkome in Mäusen, verursacht durch die Induktion von *v-Fos* (Curran und Teich 1982). Als dessen „zelluläres Homolog“ konnte *c-Fos* kloniert und sequenziert werden (Curran et al. 1983, van Straaten et al. 1983). Der erste Versuchsansatz fand mit einem Metallothionein-Promoter statt. Mit diesem Promotor gelang eine vermehrte Expression von *c-Fos*, vor allem im angestrebten knöchernen Gewebe. Die Läsionen unterschieden sich jedoch von den *v-Fos*-induzierten Osteosarkomen. Um die Expression des Genes auch in anderen Geweben zu steigern, wurde der ursprüngliche Promotor durch den Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC) Klasse I (H2) ersetzt (Rüther et al. 1987). Dieser lässt sich auch im Verbund mit anderen Genen ubiquitär nachweisen (Morello et al. 1986). Zusätzlich stabilisiert durch eine lange, sich wiederholende DNA-Sequenz (engl. „long terminal repeat“; LTR) findet das in dieser Arbeit verwendete H2-FosLTR-Konstrukt auch heute noch Anwendung (David et al. 2005).

Als Vergleichsgruppe wurden Wildtypen bestehend aus Geschwistertieren der *c-Fos*-transgenen Linie genutzt. Es wurden ausschließlich weibliche Tiere untersucht. Die kieferorthopädische Apparatur wurde den Tieren im Alter von 10 Wochen appliziert. Nach 12-tägiger Behandlung wurden die Tiere mittels CO₂-Intoxikation und anschließender zervikaler Dislokation getötet. Für die weiterführenden Untersuchungen wurden 4 *c-Fos*-transgene Tieren und 4 Wildtypkontrollen verwendet, bei denen die kieferorthopädische Apparatur am Versuchsende noch in situ war. Es wurden die behandelte und die unbehandelte Kieferhälfte des jeweiligen Genotyps ausgewertet. Die Durchführung aller Versuche erfolgte nach Genehmigung der Tierschutzkommission (Behörde für Gesundheit und Verbraucherschutz der Hansestadt Hamburg, Nr. 121/16).

2.2 Genotypisierung

Für die Geotypisierung wurden den Mäusen Biopsien der Schwanzspitze entnommen. Nach Isolierung der DNA wurde eine Polymerase-Kettenreaktion (PCR) durchgeführt, um das Zielgenom zu vervielfältigen. Die Bestimmung fand dann mittels vergleichender Gelelektrophorese statt.

2.2.1 Isolierung der DNA

Zunächst wurden die entnommenen Biopsien jeweils in ein Mikroreaktionsgefäß gegeben und mit 400µl Lysepuffer und 50µl Proteinase K angesetzt. Über Nacht wurden die Proben daraufhin bei 55°C in einem Temperiergerät (Thermomixer comfort, Eppendorf) inkubiert. Am Folgetag wurde zu den nun verdauten Proben 450µl Phenol-Chloroform gegeben und gründlich vermischt. Anschließend erfolgte ein Trennen der Kompartimente bei 16,110g in einer Zentrifuge (Centrifuge 5415 D, Eppendorf). 400µl der sich ergebenden oberen Phase wurden daraufhin in ein neues Mikroreaktionsgefäß mit 400µl Isopropanol überführt. Nach erneutem Zentrifugieren bei gleichen Bedingungen wurde der Überstand vorsichtig abgekippt und der Bodensatz mit 400µl 70%igem Ethanol aufgereinigt und wiederum für 5min bei gleichbleibender Kraft zentrifugiert. Auch hier wurde der Überstand vom Bodensatz durch einfaches, vorsichtiges Abkippen entfernt. Nach 2-minütiger, abschließender Zentrifugation wurde der Überschuss behutsam mit einer Pipette abgenommen und das im Mikroreaktionsgefäß verbliebene DNA-Pellet kurz offenstehend trocknen gelassen. Zum Ende wurde TE-Puffer hinzugegeben.

Reagenzien:

Lyse-Puffer:	50mM	Tris-HCl, pH 8,0
	100mM	EDTA
	100mM	NaCl
	1%	SDS
Proteinase K:	10µg/ml	
TE-Puffer:	10mM	Tris-HCl, pH 7,4
	1mM	EDTA

2.2.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion dient der Amplifikation eines gezielt anvisierten DNA-Abschnitts. Über eine hochtemperierte Denaturierung der DNA-Stränge lösen sich die Wasserstoffbrückenbindungen zueinander. An die so frei gewordenen Basen können sich die Primer anlagern und damit den Startpunkt für die Synthese an beiden Strängen festlegen. Die dafür notwendige DNA-Polymerase wird vom thermophilen Bakterium *Thermus aquaticus* genommen (DreamTaq DNA Polymerases, ThermoFischer scientific), da diese bei den erforderlichen Temperaturen nicht denaturiert. Durch die Wiederholung lässt sich das Zielgen so exponentiell amplifizieren.

Für den Ansatz eines Reagenz einer einzelnen Schwanzbiopsie mit 20µl Gesamtvolumen wurde folgendes benötigt:

H ₂ O	9,7	µl
PCR-Puffer	2	µl
DMSO	0,5	µl
dNTPs	0,5	µl
Primer 1	3	µl
Primer 2	3	µl
DreamTaq	0,3	µl
Genom-DNA	1	µl
Primer 1:	H2cfos up 5'-AGT	
Primer 2:	H2cfos down 5'-G	
PCR-Puffer:	100mM Tris-HCl, pH 8,6	
	500mM KCl	
	10mM MgCl ₂	
Kontrolle:	Jun400TG	

PCR-Programm des Thermocyclers (Mastercycler ep Gradient S, Eppendorf)

Initiation:	94°C	für	4 Min
Denaturation:	94°C	für	30 Sek
Annealing:	52°C	für	40 Sek
Elongation:	72°C	für	1 Sek
Last Elongation:	72°C	für	10 Min
Store:	4°C		

Bei 40 Zyklen ergab sich somit eine Gesamtlaufzeit von 1 Stunde und 55 Minuten.

2.2.3 Gelelektrophorese

Die Ergebnisse der PCR wurden anhand einer Agarose-Gelelektrophorese analysiert. Hierzu wurde zunächst das Gel angefertigt. Dazu wurde 1g Agarose in 100ml 1xTAE-Puffer (1%ig) gegeben und aufgekocht. Zur abkühlenden Agarose wurden dann 5µl Ethidiumbromid gegeben und alles zusammen in die Gelkammern gegossen. Nach 30min Abkühlzeit wurde der Kamm entfernt und das Gel vollständig mit 1xTAE-Puffer als Laufpuffer bedeckt. Bei 100V im elektrischen Feld einer Laufkammer (Model 200, Bio-Rad) erfolgte dann die Auftrennung der Stränge. Als Marker diente ein 1Kb Genruler. Die Dokumentation erfolgte unter UV-Licht (GelDoc, Bio-Rad) und mit der Software „Quantity One“ (Version 4.2.1, Bio-Rad).

TAE-Puffer:	TRIS	40mM
	Acetat	20mM
	EDTA	1mM

2.3 Applikation der Apparatur

Für diesen Versuch wurde eine Kleinstdrehmaschine (Unimat 3, Emco) umgebaut. Verwendet wurde das manuell justierbare Grundgerüst bestehend aus 2 Spindeln und einem damit verbundenen Objekthalter, auf dem ein Operationstisch aus Acrylat montiert wurde. Durch die orthogonale Ausrichtung der zwei Spindeln zueinander wird eine feinjustierbare Bewegung des Lineartisches in zwei Achsen ermöglicht. Unter Narkose wurde die Maus rücklinks auf der beweglichen Ebene an ihren Gliedmaßen vorsichtig fixiert. Für die Anästhesie wurden die Mäuse zunächst gewogen und ihnen dann 10 ml/kg Körpergewicht (KG) Anästhetikum (40 mg/kg KG Ketamin-S, Rompun 2% 16 mg/kg KG, Heparin 40000IE/kg KG in 0,9% NaCl) intraperitoneal appliziert. Um eine Sicht auf die intraoralen Strukturen zu ermöglichen, wurden die Wangen mit einem eigens konstruierten Wagenhalter vorsichtig gespreizt. Um die Mundöffnung zu gewährleisten, wurde zunächst der Oberkiefer über die Oberkieferinzisivi durch eine Schlaufe aus Nahtmaterial (Vicryl, Ethicon Inc) behutsam am Operationstisch fixiert (Abbildung 4A). Die Inzisivi des Unterkiefers wurden danach in die Öse einer kieferorthopädischen Gummikette (Elasto-Force, Dentaforum) eingeführt und spannungsfrei kaudal fixiert. Unter Zuhilfenahme einer Lupenbrille (Zeiss G 2,5 TTL, Carl Zeiss Germany) und einer Stirnlampe (Led Lenser H7R.2, Zweibrüder Optoelectronics GmbH) wurde die so gewonnene Einsicht optimal ausgenutzt. Um einen Verbund von Zahn und Feder zu gewährleisten, wurden die Zahnoberflächen vom ersten linken Molaren und beider Oberkieferinzisivi mit 37% Phosphorsäuregel konditioniert (Abbildung 4B). Nach 30 Sekunden wurde das Gel mit Microbrushes entfernt und simultan eine Reinigung der Zahnflächen mit destilliertem Wasser und anschließend Ethanol vorgenommen. Um die Haftung vom Bonding (Scotchbond, 3m Espe) am Schmelz zu gewährleisten, wurden für die Trocknung der oralen Kavität eigens angefertigte Papierspitzen verwendet. Außerdem kam ein kleiner Blasebalg zum Einsatz, durch dessen milden Luftstrom die Oberflächen zusätzlich achtsam von verbliebener Restfeuchte befreit werden konnten.

Unter der so erreichten relativen Trockenlegung wurde nun das Bonding appliziert und nach einer 20-sekündigen Einwirkzeit photochemisch polymerisiert. Die Feder wurde nun zuerst mit ihrem distalen Ende am ersten Molaren platziert und durch Applikation und Lichthärtung eines dünnflüssigen Komposits (Estelite Flow Quick, Tokuyama Dental Corp.) mit diesem verbunden (Abbildung 4C). Danach erfolgte die Aktivierung

der Feder. Der Operationstisch wurde dafür parallel zur geplanten Krafrichtung über die Spindeln in kleinen Schritten verschoben. Kontrolliert wurde dies über eine Federwaage (Federwaage 25-250g, Dentaurum), die einerseits eine Verbindung mit dem Grundgerüst und andererseits eine Verbindung zum mesialen Ende der Feder im Mund besaß. Bei der gewünschten Kraft von 35 Centinewton (Taddei et al. 2012) wurde unter Erhalt der so erreichten Spannung nun der mesiale Teil der Feder an beiden Oberkieferinzisivi mit Komposit fixiert (Abbildung 4D). Eine erneute Aktivierung war nicht nötig. Nach der Fertigstellung wurden die Mäuse direkt auf eine Wärmematte transferiert und bis zum vollständigen Erwachen aus der Narkose überwacht.

Größere und feste Gegenstände, die durch Nagen zu einem Verlust der Apparatur hätten führen können, wurden prophylaktisch aus den Käfigen entfernt. Die Tiere erhielten Wasser und Weichfutter ad libidum und wurden täglich auf das körperliche Wohlbefinden und Gewicht hin untersucht. Nach zwölf Tagen wurden die Tiere mittels CO₂ abgetötet, präpariert und in Formalin (Formafix 3,5%, Grimm med. Logistik GmbH) für 24 Stunden fixiert. Anschließend wurden die Präparate in 80%iges Ethanol überführt.

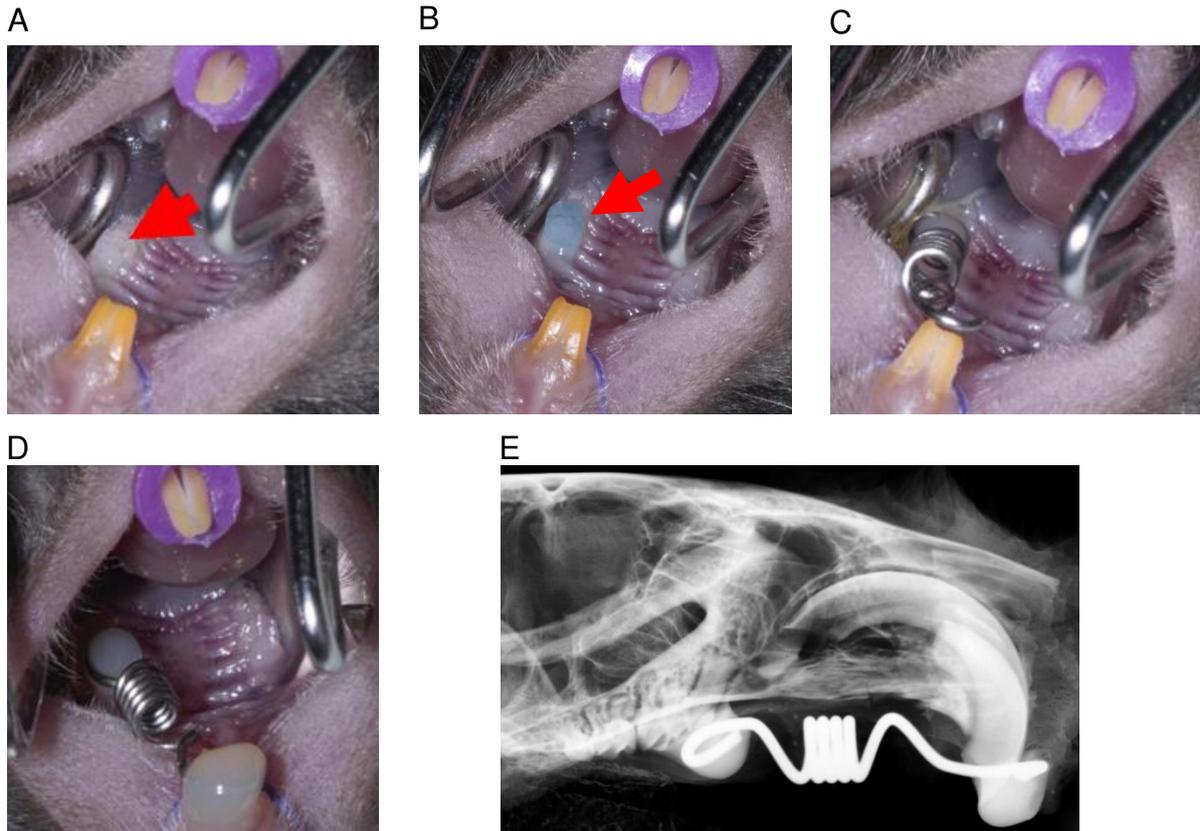


Abbildung 4: Schrittweise Dokumentation der Schritte zur Befestigung der Feder. Die Maus liegt rücklings. **(A)** Intraorale Sicht; der rote Pfeil zeigt auf den ersten Molaren des zweiten Quadranten. **(B)** Konditionierung des ersten Molaren; zu sehen ist das bläuliche Phosphorsäureätzgel. **(C)** Befestigung der Feder mittels Flowkomposit am ersten Molaren; die Inzisivi sind bereits konditioniert. **(D)** Befestigung der Feder mittels Flowkomposit an den Inzisiven. **(E)** Laterale Kontaktröntgenaufnahme einer behandelten Kieferhälfte nach abgeschlossener Behandlung mit Apparatur in situ.

2.4 Micro-Computertomographie

Für die dreidimensionale Analyse der Zahnbewegung wurde das μ CT-40 (Scanco Medical AG) genutzt. Dafür wurden die Schädel der Mäuse zunächst vom Körper getrennt und in ein dafür vorgesehenes Gefäß mit einer Pufferlösung (DPBS, calcium, magnesium, ThermoFischer Scientific) transferiert. Die Apparatur verblieb für den Scan in situ. Die Auflösung lag bei einer Voxelgröße von $15\mu\text{m}$. Rekonstruktion und Auswertung der Datensätze erfolgte durch die Software des Herstellers (Scanco Medical AG). Zur Bestimmung der erfolgten Zahnbewegung wurde die kleinste, senkrecht zur Zahnachse gemessene Distanz zwischen dem ersten und zweiten Molaren ermittelt.

2.5 Entkalkte Histologie

Um die Präparate für die entkalkte Histologie in Paraffin vorzubereiten, wurden zunächst die Unterkiefer vorsichtig entfernt. Der so nun komplett einsehbare Oberkiefer wurde daraufhin von der Apparatur befreit und gründlich von etwaigen Kompositresten gereinigt. Anschließend erfolgte die Trennung der behandelten Kieferhälfte und der Kontrollseite über einen Schnitt in der Mediansagittalen des Schädels.

Die so vorbereiteten Proben wurden danach für 12 Tage in einem Lösungsbad (USEDECALC, Medite GmbH) entkalkt, wobei ein Austausch der Flüssigkeiten am 4. und 8. Tag stattfand. Verlauf und Erfolg wurden radiologisch überprüft. Vor der Einbettung in das Paraffin wurden die Oberkieferhälften zunächst über einen Prozess von zwölf Stunden in zwölf Behältern im Autotechnikon entwässert. Die Tauchbäder erfolgten bei 60°C in dieser Reihenfolge: 2 x 1 Stunde 70% Ethanol, 1 Stunde 80% Ethanol, 2 x 1 Stunde 96% Ethanol, 2 x 1 Stunde Ethanol absolut, 2 x 1 Stunde Xylol, 3 x 1 Stunde Paraffin.

Mittels eines Mikrotoms (Supercut 2050, Reichert-Jung) wurde der Block unter stetiger mikroskopischer Kontrolle und regelmäßiger Kühlung zunächst auf die Zielebene getrimmt. Diese wurde definiert als Ebene, die sich zwischen Längsachse und Zentralfissur des ersten Molaren aufspannt, also parallel zur Bewegungsrichtung liegt, um eine Evaluation aus der Sagittalebene beziehungsweise orthogonal zur Bewegungsrichtung zu ermöglichen. Die Schnitte von Zahn und Alveolarknochen wurden dann mit einer Schichtstärke von 4µm in vestibulo-oraler Richtung angefertigt. Über ein Transferbecken wurden die Objektträger mit den Schnitten beschickt. Im Wärmeschrank erfolgte zum Schluss die Fixierung und Entfernung des residualen Wassers bei 37°C.

2.5.1 Toluidinblau-Färbung

Die Färbung wurde nach Protokoll durchgeführt. Osteoblasten, Osteozyten und Fibroblasten stellen sich hellblau dar, Osteoklasten etwas dunkler. Zellkerne zeichnen sich dunkelblau ab. Dentin erhält eine intensiv dunkelblaue Färbung mit Violettstich und lässt sich gut vom hellen grau-blauen Zement und dessen dunkelblau-violetter Abgrenzung zum Parodontalspalt unterscheiden.

Vorgehensweise:

	Medium im Tauchbad	Verweildauer
1.	Xylol	5 Min (3x)
2.	Ethanol absolut	2 Min (2x)
3.	Ethanol 96%	2 Min
4.	Ethanol 80%	2 Min
5.	Ethanol 70%	2 Min
6.	Ethanol 50%	2 Min
7.	Destilliertes Wasser	kurzes Spülen
8.	Toluidinblau 1%, pH 4,5	30 Min
9.	Destilliertes Wasser	kurzes Spülen
10.	Ethanol 80%	kurzes Spülen
11.	Ethanol 90%	2 Min
12.	Ethanol absolut	2 Min (2x)
13.	Xylol	5 Min (3x)

Die Spüldauer unter den Punkten 9 und 10 sind von der erreichten Intensität der Färbung abhängig. Durch mäßige Verlängerung kann eine zu intensive Färbung schrittweise reduziert werden.

Nach Punkt 13 erfolgte das Eindecken mit Eukitt (ORSAtec GmbH).

2.5.2 Pikro-Siriusrot-Färbung

Die Färbung wurde nach dem Protokoll der Firma Morphisto GmbH (Frankfurt am Main; Version vom 01.09.2009) durchgeführt. Es handelt sich um eine Spezialfärbung für Kollagene der Typen I und III. Unter unpolarisiertem Licht sind die Fasern rot eingefärbt. Bei Polarisation des Lichtes erscheint Kollagen Typ I als rot-gelblich und Kollagen Typ III grünlich.

Vorgehensweise nach Herstellerangaben:

	Medium im Tauchbad	Verweildauer
1.	Xylol	10 Min (2x)
2.	Ethanol 96%	4 Min

3.	Ethanol 80%	4 Min
4.	Ethanol 70%	4 Min
5.	Ethanol 60%	4 Min
6.	Aqua nondest	4 Min
7.	Eisenhämatoxylin nach Weigert	8 Min
8.	Destilliertes Wasser	kurzes Spülen
9.	Aqua nondest	10 Min bläuen (fließend)
10.	Destilliertes Wasser	1 Min
11.	Pikro-Siriusrot	60 Min
12.	Essigsäure 30%	1 Min (2x)
13.	Ethanol 96%	4 Min (2x)
14.	Isopropanol	2 Min
15.	Xylol	10 Min (2x)

Die Spüldauer unter den Punkten 8 und 12 sind von der erreichten Intensität der Färbung beziehungsweise Gegenfärbung abhängig. Durch mäßige Verlängerung kann eine zu intensive Färbung schrittweise reduziert werden.

Nach Punkt 15 erfolgte das Eindecken mit Eukitt (ORSAtec GmbH).

2.5.3 Immunhistochemische Färbung

Es wurde eine Färbung für tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) ohne Gegenfärbung durchgeführt. Osteoklasten werden spezifisch leuchtend rot dargestellt, der Rest des Gewebes erscheint gelblich bis braungelb.

Vorgehensweise:

1. Pufferlösung aus 40mM Natriumacetat (pH 5) und 10mM Natriumtartrat herstellen
2. TRAP-Substrat ansetzen: 5mg Naphtol-AS-MX-Phosphat in 500µl Dimethyl-Formamide lösen
3. TRAP-Substrat und 50ml Pufferlösung miteinander vermischen
4. 30mg Fast Red Violett dazugeben und auflösen

5. Die zu färbenden Schnitte in die Lösung tauchen und für etwa 120 Minuten im Inkubationsschüttler (Innova 4000, New Brunswick) bei 37°C und 40-50rpm inkubieren.
6. Nach Erreichen des gewünschten Färbegrades die Schnitte mit destilliertem Wasser abspülen
7. Wässriges Eindecken der Schnitte mit Aquatex (Merck KGaA)

2.5.4 Auswertung der Histologie

Die Auswertung der histologischen Präparate fand auf möglichst gleicher Ebene mit dem Mikroskop (Axioscope, Carl Zeiss Microscopy GmbH) statt. Simultan wurden die Schnitte fotografiert (AxioCam, Carl Zeiss Microscopy GmbH). Unter Verwendung des Osteomeasure Histomorphometrie-Systems (Osteometrics Inc.) wurden die Parameter ausgewertet.

Die Schnitte mit Toluidinblau-Färbung wurden genutzt, um die laterale Wurzelresorption zu beurteilen. Dafür wurden die resorbierten Flächen mit den Gesamtoberflächen der Wurzeln in Verhältnis gesetzt.

Die Piko-Siriusrot-Färbung diente der Begutachtung des Faserapparats. Dazu wurde zusätzlich ein zirkulärer Polarisationsfilter (Whittaker et al. 1994) verwendet.

Die TRAP-gefärbten Schnitte dienten der numerischen Evaluation der Osteoklasten. Zuvor wurden für jede Wurzel zunächst die Region der Kompression und die Region der Dehnung bestimmt, um die Osteoklasten später diesen Regionen vergleichbar zuordnen zu können. Die distalen Wände der distalen und mesialen Wurzel wurden der Spannungsseite zugeordnet. Die mesialen Wände der distalen und mesialen Wurzel wurden der Kompressionsseite zugeordnet. Da durch den Aufbiss-Effekt der befestigten Feder auch ein intrusiver Kraftvektor entstand, wurden die apikalen und interradikulären Regionen ebenfalls der Kompressionsseite zugerechnet (Abbildung 5C).

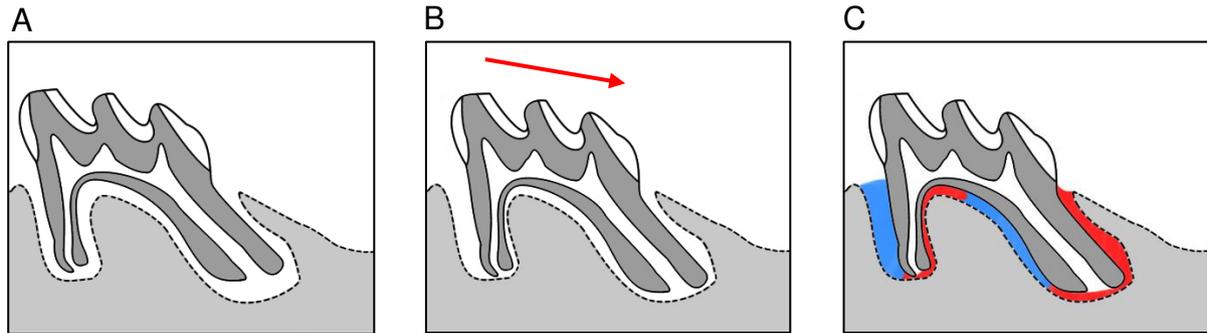


Abbildung 5: Schematische Darstellung des murinen ersten Oberkiefermolaren im Verlauf der Behandlung. Der hellgraue Anteil repräsentiert den Alveolarknochen. Für die vereinfachte Darstellung wurde das Bild um 180° rotiert. **(A)** Unbehandelter Zahn in physiologischer Position. **(B)** Die in Pfeilrichtung (rot) wirkende Kraft führt zu einer Veränderung der Position des Zahnes im Alveolarfach. **(C)** Die daraus resultierenden Zonen der Kompression und Dehnung des Parodontalspaltes sind rot respektive blau hervorgehoben.

2.6 Statistik

Die statistische Analyse der Daten sowie deren graphische Darstellung wurde mit der Software GraphPad PRISM (GraphPad Software, Inc.) durchgeführt. Für die Ermittlung der statistischen Unterschiede wurde jeweils ein Zweistichproben-t-Test für unabhängige Stichproben angewendet.

Wahrscheinlichkeiten von $p < 0,05$ wurden als signifikant gewertet und zusätzlich mit „*“ hervorgehoben. Signifikanzniveaus von $p < 0,01$ wurden mit „**“ und Signifikanzniveaus von $p < 0,001$ mit „***“ gekennzeichnet. Alle Graphen zeigen Mittelwerte mit Standardabweichungen.

3 Ergebnisse

3.1 Gewichtsverlauf

Um das Wohlbefinden der Tiere im Versuchszeitraum zu überprüfen, wurde täglich eine Gewichtskontrolle durchgeführt (Abbildung 6). Da die Apparatur unilateral eingesetzt und die Scherfunktion der Inzisivi erhalten wurde, war nicht mit einer erschwerten Nahrungsaufnahme zu rechnen. Letztere wurde zusätzlich durch die Darreichung von eingeweichem Futter vereinfacht. In den ersten 48 Stunden war bei allen Tieren ein leichter Gewichtsverlust zu beobachten. Ab dem dritten Tag nach dem Eingriff war jedoch wieder eine Stabilisierung bzw. Gewichtszunahme erkennbar. Die Maximaldifferenz zum Ausgangsgewicht lag bei den Wildtypen durchschnittlich bei 3,00% und die der *c-Fos*-transgenen Tiere bei 5,43%, wobei die höchste individuelle Differenz bei 6,74% lag. Generell schien die Kontrollgruppe etwas robuster; zwei der Mäuse übertrafen sogar ihr Ausgangsgewicht. Die *c-Fos*-transgenen Tiere waren über den gesamten Versuchszeitraum erkennbar leichter als die Kontrolltiere. Dieser Gewichtsunterschied war jedoch nicht signifikant ($p=0,085$). Innerhalb der Gruppen war weder bei den Wildtypen noch bei *c-Fos*-transgenen Tieren eine signifikante Veränderung des Gewichtes zu beobachten. Es ist daher davon auszugehen, dass die applizierte Apparatur die Nahrungsaufnahme und das Wohlbefinden der Tiere nicht wesentlich beeinträchtigt hat.

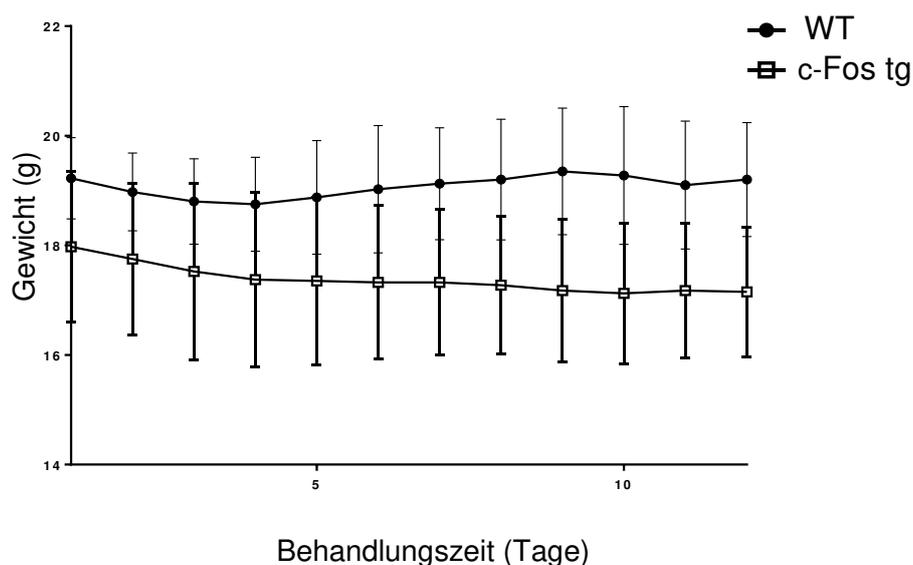


Abbildung 6: Gewichtskurve von Wildtypmäusen (WT) und *c-Fos*-transgenen Mäusen (*c-Fos* tg) im Behandlungsverlauf. Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardabweichung.

3.2 Interkoronale Distanz

Die Apparatur führte bei allen Mäusen zu einer Mesialisierung des ersten Molaren. Die Auswertung der durch die Zahnbewegung erreichten Distanz bei Wildtypen und transgenen Mäusen erfolgte auf der behandelten Seite und der unbehandelten Kontrollseite anhand von μ CT-Schnittbildern (Abbildung 7A). Hierfür wurde die kleinste interkoronale Distanz des ersten und zweiten Molaren senkrecht zur Zahnachse bestimmt. Es stellte sich heraus, dass die *c-Fos*-transgenen Mäuse im Vergleich zu Wildtypmäusen eine rund 62% schnellere Zahnbewegung ($p=0,0201$) aufweisen (Abbildung 7B).

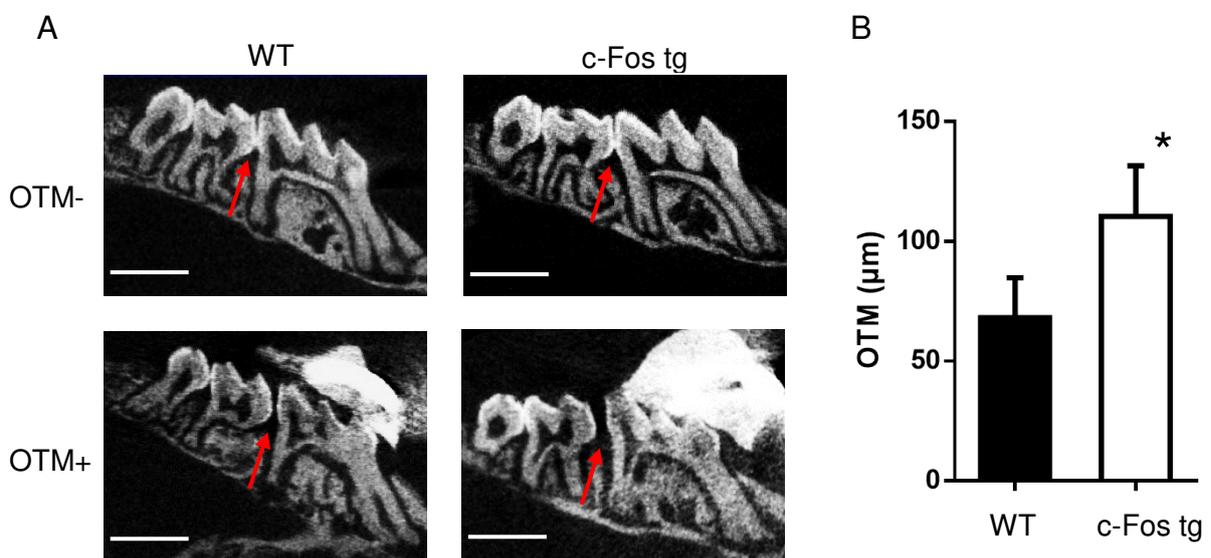


Abbildung 7: Quantifizierung der Zahnbewegung mittels μ CT. **(A)** μ CT-Schnittbilder der Oberkiefermolaren von Wildtyp (WT) und *c-Fos*-transgenen Tieren (*c-Fos tg*). Die oberen Bilder zeigen die unbehandelte Seite ohne Zahnbewegung (engl. orthodontic tooth movement, OTM-). Die unteren Bilder zeigen die behandelte Seite mit Zahnbewegung (OTM+). Die roten Pfeile deuten auf den Approximalkontakt bzw. die vergrößerte interkoronale Distanz zwischen ersten und zweiten Oberkiefermolaren als Indikator der Zahnbewegung. Für die einfachere Darstellung wurden die Bilder um 180° gedreht und in ihrer Ausrichtung angepasst. Maßstabsbalken: 1000 μm **(B)** Quantifizierung der interkoronalen Distanz bei Wildtypen (WT) und transgenen Mäusen (*c-Fos tg*) nach Abschluss der Behandlung ($p=0,0201$) ($n=4$).

3.3 Histologie

3.3.1 Toluidinblau-Färbung

Als nächstes erfolgte die histologische Untersuchung der Zähne mittels toluidinblaugefärbter entkalkter Histologie (Abbildung 8). Auf der unbehandelten Kontrollseite waren histologisch keine Unterschiede zwischen Wildtyp und *c-Fos*-transgenen Tieren erkennbar (Abbildung 8A). *C-Fos*-transgene Tiere zeigten eine normale Zahnmorphologie sowie eine physiologische Dentin- und Zementstruktur. Bei beiden Versuchstiergruppen bestand auf der unbehandelten Seite ein punktförmiger Approximalkontakt zwischen den Zähnen. Auf der behandelten Seite zeigte sich sowohl bei Wildtyp als auch bei *c-Fos*-transgenen Tieren ein deutlicher Spalt zwischen den ersten und zweiten Molaren (Abbildung 8B). Übereinstimmend mit der micro-computertomographischen Auswertung war das Ausmaß dieser interkoronalen Distanz bei *c-Fos*-transgenen Tieren größer als bei Wildtyptieren.

Die histologische Analyse des angrenzenden Alveolarknochens zeigte sowohl bei Wildtyp-Mäusen als auch bei *c-Fos*-transgenen Tieren dem Kraftvektor entsprechende Befunde in Druckzonen und Zugzonen (Abbildung 9). Das Erscheinungsbild der Zugzone ist in beiden Versuchsgruppen durch knochenbildende Osteoblasten geprägt. Ihre kubische Form und ihre Anordnung lassen auf synthetisierende Aktivität schließen. Besonders eindrucksvoll erscheinen die Kittlinien, die die nach mesial neu gebildete Knochensubstanz von dem älteren Alveolarknochen abgrenzt (Abbildung 9A). Im Bereich der Druckzonen waren hingegen vermehrt Osteoklasten zu finden. Der Alveolarknochen der Druckzone verlor die auf der Kontrollseite beobachtete glatte Struktur und war durch Resorptionslakunen gekennzeichnet (Abbildung 9C). Vergleichbare Lakunen konnten ebenso in der angrenzenden Zementschicht beobachtet werden. Interessanterweise zeigte sich jedoch in Abhängigkeit von der Wurzelposition ein unterschiedliches Erscheinungsbild dieser lateralen Wurzelresorptionen. Während an der distalen Wurzel eher flächige Wurzelresorptionen auftraten (Abbildung 10A), war das Resorptionsmuster auf der Wurzeloberfläche der mesialen Wurzel durch vereinzelte, tropfenartige Resorptionslakunen geprägt (Abbildung 10B). Eine Quantifizierung der lateralen Wurzelresorptionen zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen Wildtyp und *c-Fos*-transgenen Tieren (Abbildung 10).

Unabhängig von der Wurzelposition waren bei den Wildtypen zellfreie Areale im Parodontalligament (Hyalinisationen) in den Druckzonen auffindbar (Abbildung 11). In der Toluidinblau-Färbung äußern sie sich als hellblau bis glasig-blau anfärbbare Zonen, die entweder keine (Abbildung 11B) oder partiell (Abbildung 11A) Zellen enthielten. Interessanterweise waren bei *c-Fos*-transgenen Mäusen diese nicht nachweisbar.

In der Druckzone zeigen damit insgesamt sowohl Wildtyp als auch *c-Fos*-transgene Tieren typische, histologische Merkmale einer kieferorthopädischen Zahnbewegung. Auf histologischer Ebene scheinen sich hierbei die mechanisch-induzierten Veränderungen des Zahnhalteapparates zwischen den Genotypen im Hinblick auf die Hyalinisationen zu unterscheiden. Bemerkenswert ist darüber hinaus, dass bei *c-Fos*-transgenen Tieren trotz der erhöhten Zahnbewegung das Ausmaß der Wurzelresorption nicht erhöht ist.

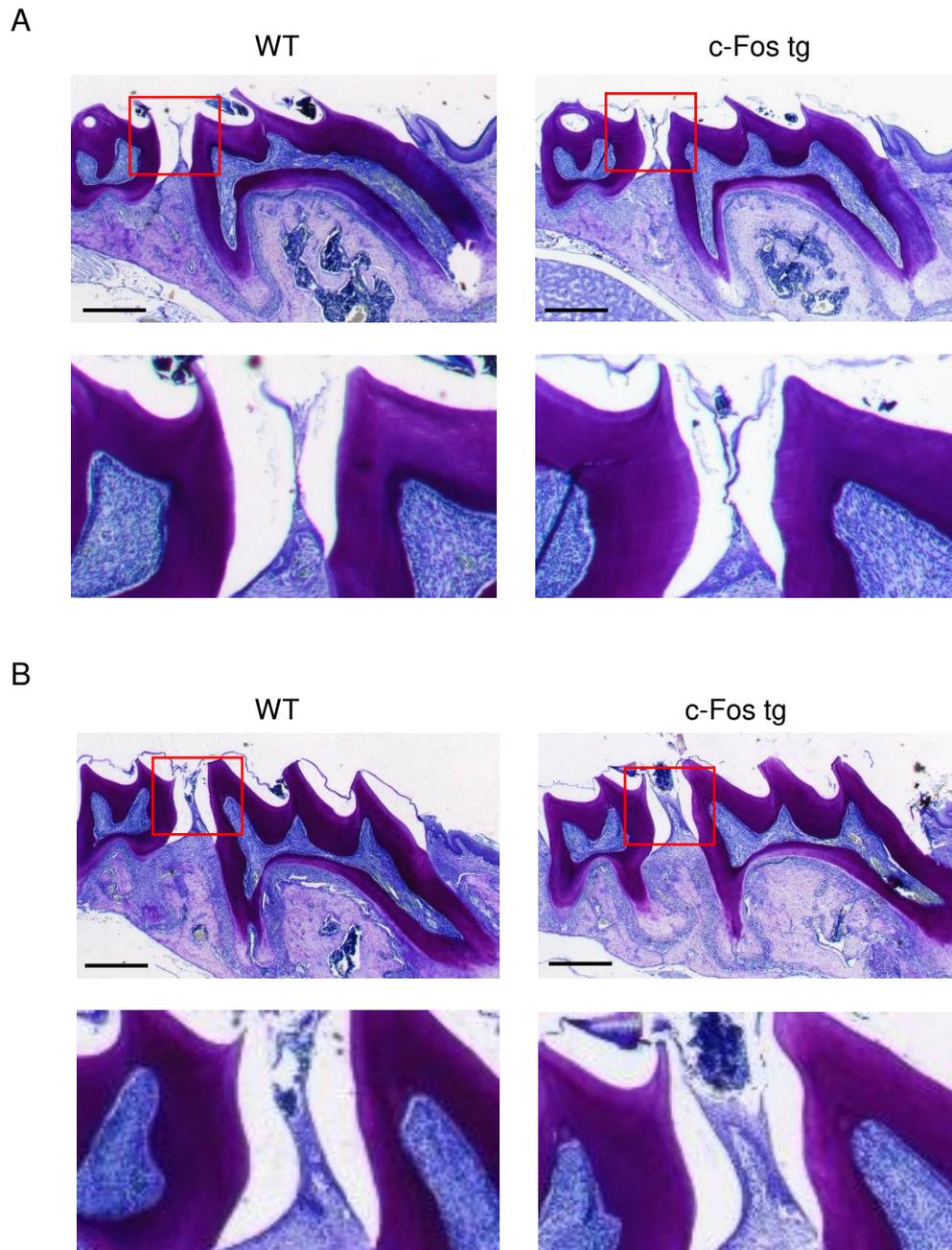


Abbildung 8: Toluidinblau-gefärbte entkalkte Histologie der Oberkiefermolaren. **(A)** Unbehandelte Kontrollseite von Wildtyp (WT) und *c-Fos*-transgenen Tieren (*c-Fos tg*). **(B)** Behandelte Seite von Wildtyp (WT) und *c-Fos*-transgenen Tieren (*c-Fos tg*). Die Approximalräume (rote Rechtecke) sind in den unteren Bildern vergrößert dargestellt. Für die einfachere Darstellung wurden die Bilder um 180° gedreht und in ihrer Ausrichtung angepasst. Maßstabsbalken: 500µm

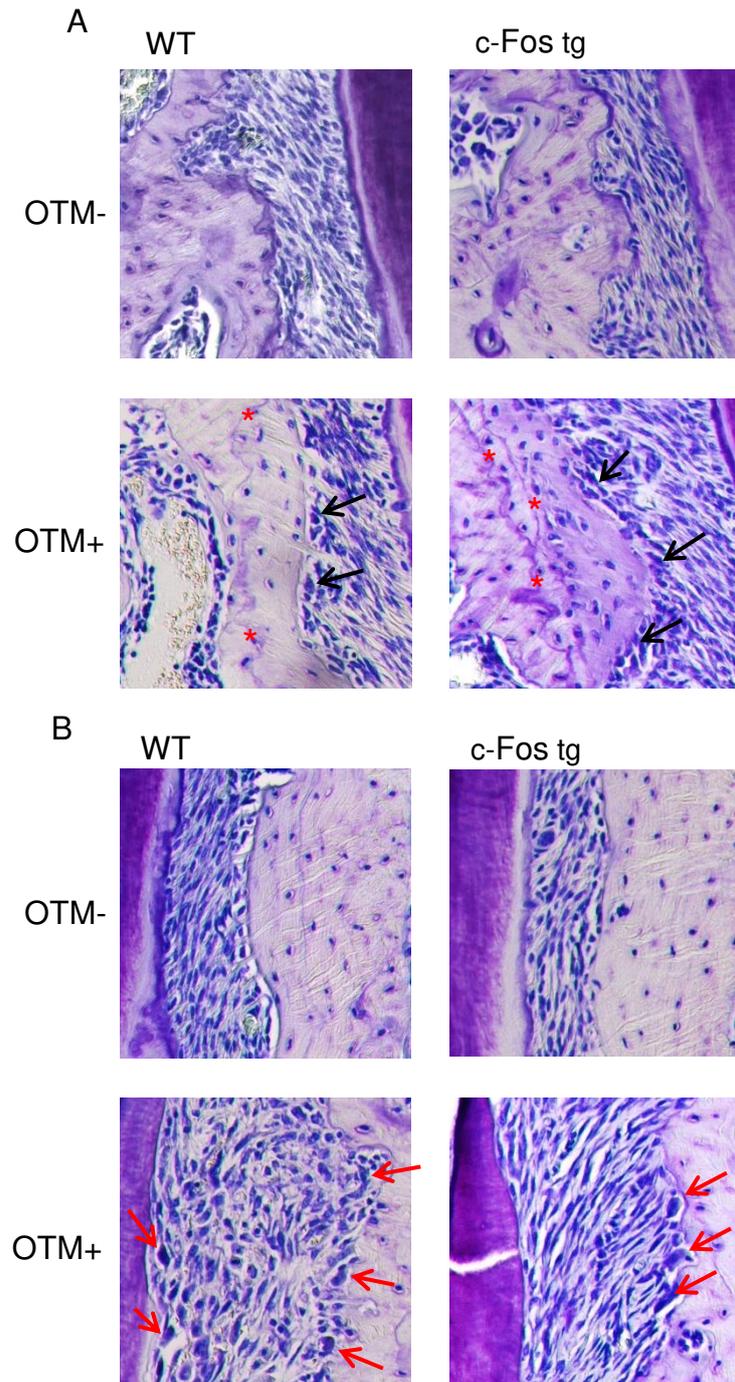


Abbildung 9: Toluidinblau-gefärbte entkalkte Histologie des Parodontiums. Distale Wurzel des ersten Oberkiefermolaren der unbehandelten Kontrollseite ohne Zahnbewegung (OTM-) und der behandelten Seite mit Zahnbewegung (OTM+) von Wildtyp (WT) und *c-Fos*-transgenen Tieren (*c-Fos tg*). **(A)** Die Zugzone ist durch kubische Osteoblasten geprägt (schwarze Pfeile). Erkennbar ist der durch die Zahnbewegung induziert neu gebildete Knochen rechtsseitig der Kittlinie (Sternchen) **(B)** Die Druckzone wird durch Osteoklasten (rote Pfeile) geprägt. Es ist deutlich zu erkennen, wie die glatte, ebene Struktur des Alveolarknochens durch die Resorption aufgelöst wird.

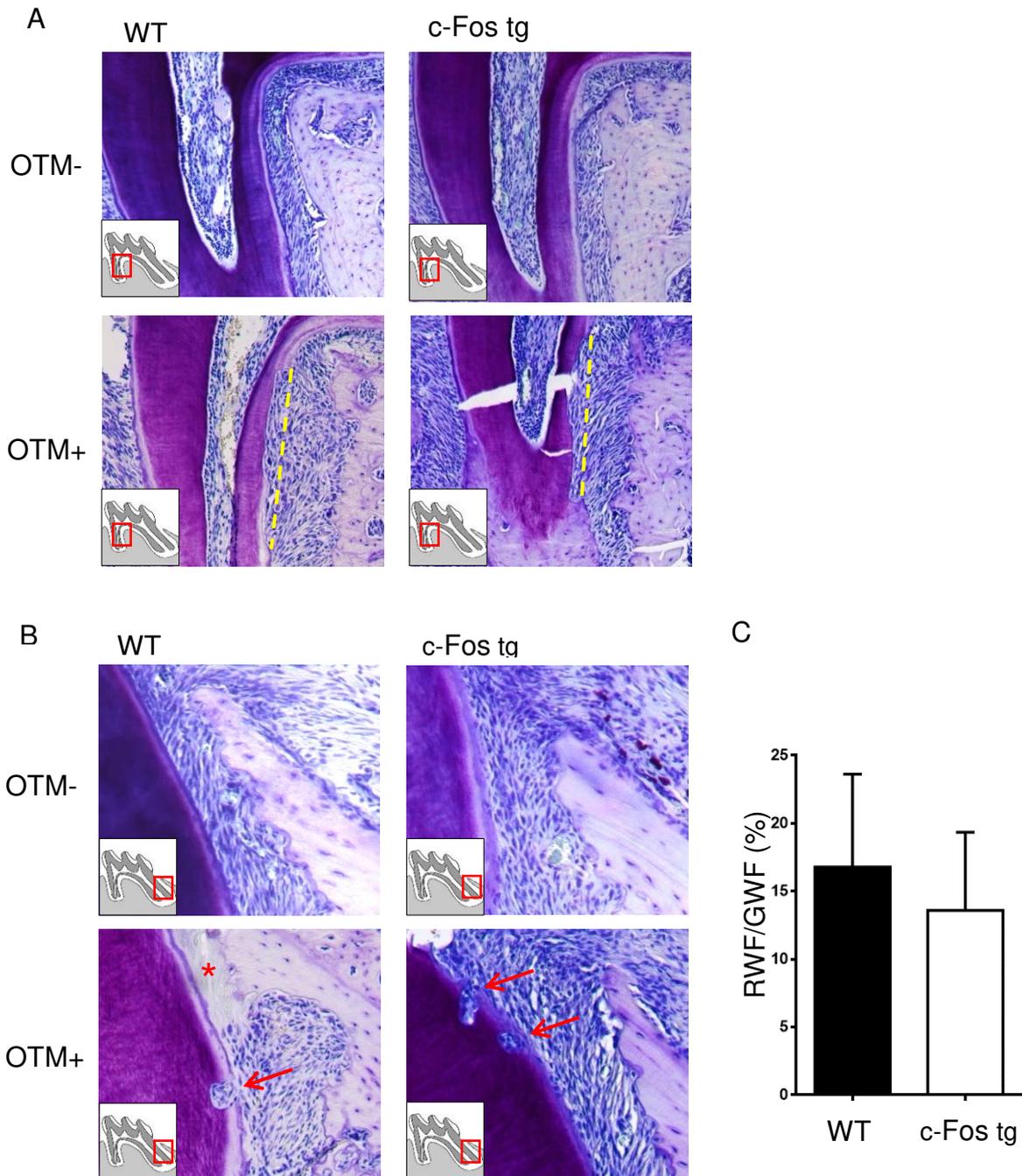


Abbildung 10: Toluidinblau-gefärbte entkalkte Histologie der Zahnwurzeln. **(A,B)** Distale Wurzel (A) und mesiale Wurzel (B) des ersten Oberkiefermolaren der unbehandelten Kontrollseite ohne Zahnbewegung (OTM-) und der behandelten Seite mit Zahnbewegung (OTM+) von Wildtyp (WT) und *c-Fos*-transgenen Tieren (*c-Fos tg*). Der untersuchte Bereich ist im schematisch dargestellten Zahn durch ein rotes Rechteck gekennzeichnet. Die gestrichelte gelbe Linie zeigt den geschätzten ursprünglichen Verlauf der Zementschicht. An der distalen Wurzel sind auf der behandelten Seite ausgeprägte laterale Resorptionen erkennbar. An der mesialen Wurzel sind diese deutlich kleiner (rote Pfeile). Vereinzelt sind hyalinisierte Areale (Sternchen) zu finden. **(C)** Quantifizierung der Wurzelresorptionen der distalen Wurzeln. Die resorbierte Wurzeloberfläche (RWF) wurde in das Verhältnis zur Gesamt-Wurzeloberfläche (GWF) gesetzt. (n=4)

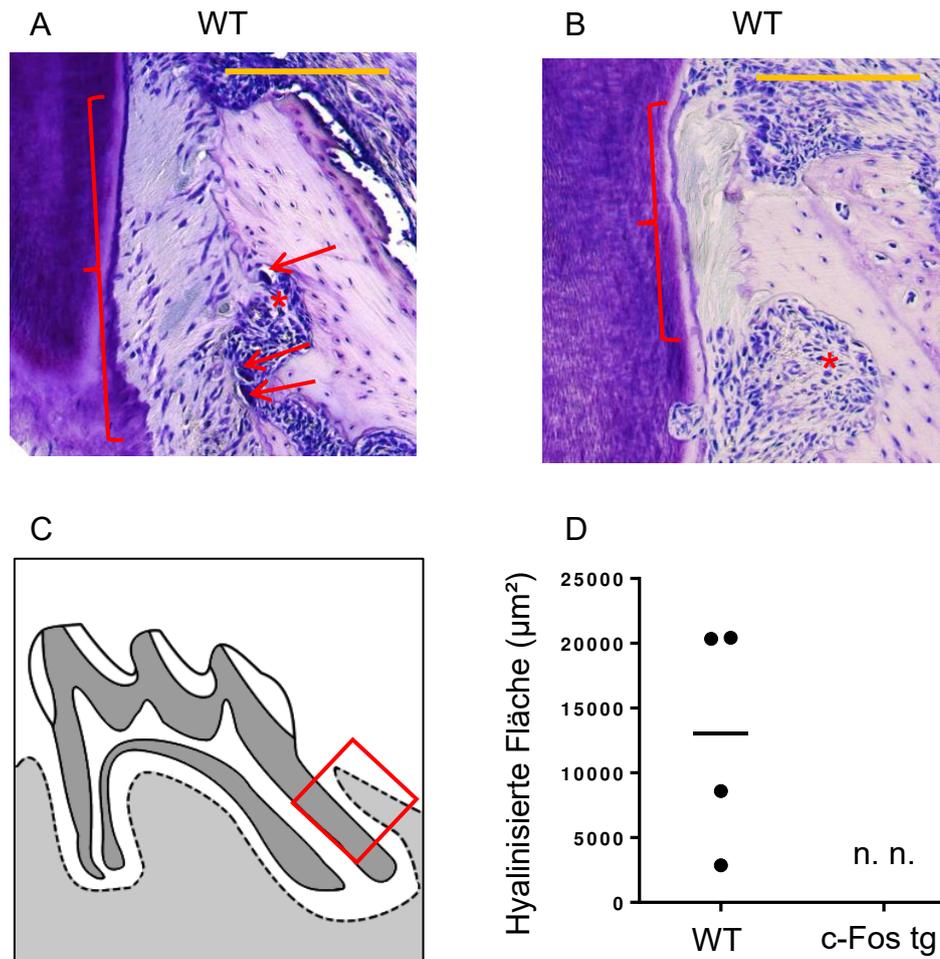


Abbildung 11: Toluidinblau-gefärbte entkalkte Histologie der Hyalinisationen (**A, B**) Darstellung der Hyalinisationen an der mesial gelegenen Wurzel nach erfolgter Zahnbewegung in Wildtypmäusen (WT). Der zelluläre Anteil innerhalb der hyalinen Areale (geschweifte Klammern) variiert, jedoch sind größere, zellfreie Zonen deutlich erkennbar. Den Hyalinisationen direkt anliegender Knochen zeigt ein geringeres Ausmaß an Resorption als Bereiche ohne Hyalinisationen (Sternchen). Die Pfeile heben aktive Osteoklasten hervor. Maßstabbalken: $200\mu\text{m}$ (**C**) Der untersuchte Bereich ist im schematisch dargestellten Zahn durch ein rotes Rechteck gekennzeichnet. (**D**) Quantifizierung der hyalinisierten Flächen im Parodontalspalt von Wildtypmäusen (WT) und transgenen Mäusen (c-Fos tg). Hyalinisierte Areale waren in den c-Fos-transgenen Tieren nicht nachweisbar (n. n.). (n=4)

3.3.2 Picro-Siriusrot-Färbung

Für die Analyse der Fasern des Zahnhalteapparats wurde eine Picro-Siriusrot-Färbung durchgeführt (Abbildung 12), da sich Siriusrot spezifisch den Kollagenfasern anlagert. Durch die Kombination mit einem Polarisationsfilter können die Fasern anschaulich dargestellt werden. Bei der Auswertung wurde sowohl der Verlauf als auch die Menge

der Fasern analysiert. Die erkennbar unterschiedlichen Farben der Kollagenfasern lassen sich auf die Anisotropie des Siriusrots und die unterschiedliche Ausrichtung im Zusammenspiel mit der Polarisierung des Lichts zurückführen. So ließen sich die Farben der Fasern sowohl durch die Änderung der Polarisierung als auch Rotation des Objektträgers ändern. In Abbildung 12A lässt sich der Farbverlauf der Fasern beim Übergang in die Furkation gut nachvollziehen. Auch die Knochenlamellen spiegeln dasselbe Farbspektrum in ihrem Verlauf wieder.

Beide Versuchsgruppen zeigen auf der Kontrollseite eine gleichmäßige Anhäufung der Kollagenfasern. Die Ausrichtung der gegenüberliegenden Fasern ist kongruent und entspricht einer geometrischen Spiegelung entlang der Zahnachse (Abbildung 12). Es ist deutlich zu sehen, wie die Kollagenfasern in Alveolarknochen und Zement inserieren. Der Verbund mit dem Zahnzement lässt sich besonders im apikalen Viertel beobachten, wo eine Zunahme der Dicke des Zements zu verzeichnen ist und die eingelagerten Kollagenfasern dadurch deutlicher hervortreten. Am Knochen inserierende Fasern zeigen einen im Vergleich zum Zement regelmäßigen Abstand und treten gebündelt auf.

Auch auf der behandelten Seite war kein Unterschied zwischen den transgenen Tieren und den Wildtypen erkennbar. Beide Gruppen zeigten auf der Kompressionsseite einen entspannten Zustand der Fasern, vergleichbar mit dem der Kontrollseite. Auffällig war jedoch die Mengenzunahme der Fasern auf der Zugseite (Abbildung 12) und eine Reduzierung der eindeutigen Ausrichtung der Fasern.

Insgesamt konnte durch die Pikro-Siriusrot-Färbung der Faserapparat des Parodontalligaments angemessen dargestellt werden. Die Auswirkung der kieferorthopädischen Zahnbewegung auf den Zahnhalteapparat waren nachvollziehbar, *c-Fos*-transgene Mäuse und Wildtypmäuse weisen jedoch keine erkennbaren Unterschiede auf.

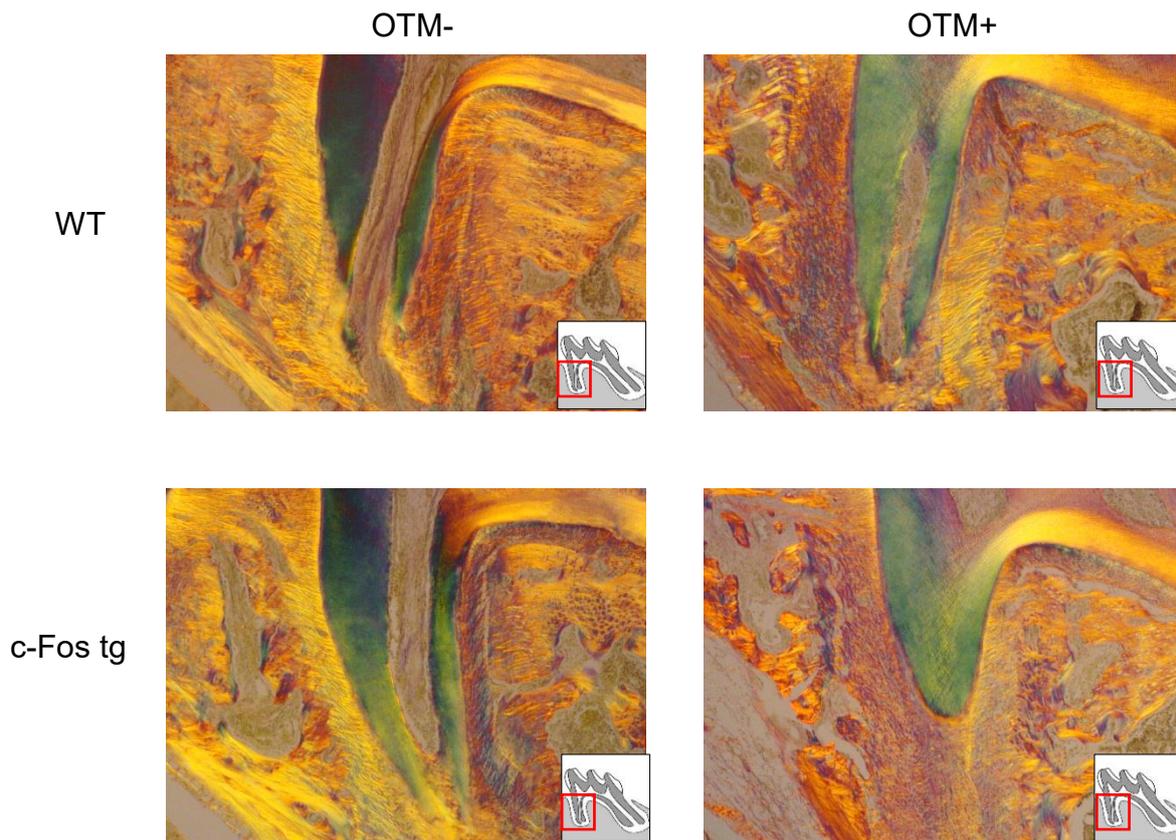


Abbildung 12: Picro-Siriusrot-gefärbte entkalkte Histologie der Zahnwurzeln zur Darstellung der Kollagenfasern. Distale Wurzel des ersten Oberkiefermolaren der unbehandelten Kontrollseite ohne Zahnbewegung (OTM-) und der behandelten Seite mit Zahnbewegung (OTM+) von Wildtyp (WT) und *c-Fos*-transgenen Tieren (*c-Fos tg*). Der untersuchte Bereich ist im schematisch dargestellten Zahn durch ein rotes Rechteck gekennzeichnet. Für die einfachere Darstellung wurden die Bilder in ihrer Ausrichtung angepasst.

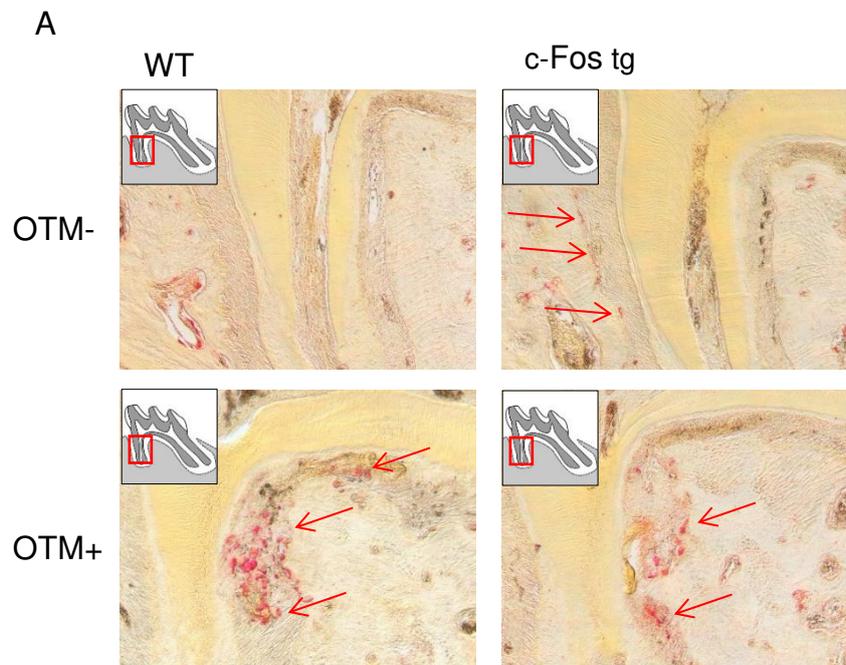
3.3.3 TRAP-Färbung

Für die Darstellung der Osteoklasten wurde eine immunhistochemische Färbung für die Tartrate-Resistant Acid Phosphatase (TRAP) durchgeführt (Abbildung 13). Die TRAP-positiven Zellen wurden in Druck- und Zugzonen (Abbildung 5) separat quantifiziert.

Auf der unbehandelten Kontrollseite zeigte sich eine bereichsunabhängige Verteilung der Osteoklasten im parodontalen Ligament. Bei *c-Fos*-transgenen Tieren war die Osteoklastenzahl auf der Kontrollseite jedoch im Vergleich zum Wildtyp 4-fach höher ($p=0,00148$), was auf eine erhöhte resorptive Grundaktivität bei Tieren mit *c-Fos*-Überexpression hinweist (Abbildung 14A).

Durch die Zahnbewegung war in beiden Gruppen ein klarer Anstieg der Osteoklastenzahl im Bereich der Druckzonen zu verzeichnen (WT: $p < 0,0001$; *c-Fos* tg: $p = 0,00039$; Abbildung 14A). Im Mittelwert war dieser Anstieg der Osteoklastenzahl bei Wildtypen jedoch um 80% höher als bei *c-Fos*-transgenen Tieren ($p = 0,00749$). Nach Behandlungsabschluss zeigte sich bei *c-Fos*-Überexpression also eine geringere zelluläre Antwort auf den mechanischen Stimulus (Abbildung 14).

Insgesamt zeigte die Trap-Färbung bei *c-Fos*-transgenen Tieren eine im Vergleich zum Wildtyp erhöhte Anzahl von Osteoklasten auf der unstimulierten Kontrollseite. Der kieferorthopädisch induzierte Anstieg der Osteoklastogenese war jedoch bei *c-Fos*-transgenen Tieren signifikant geringer.



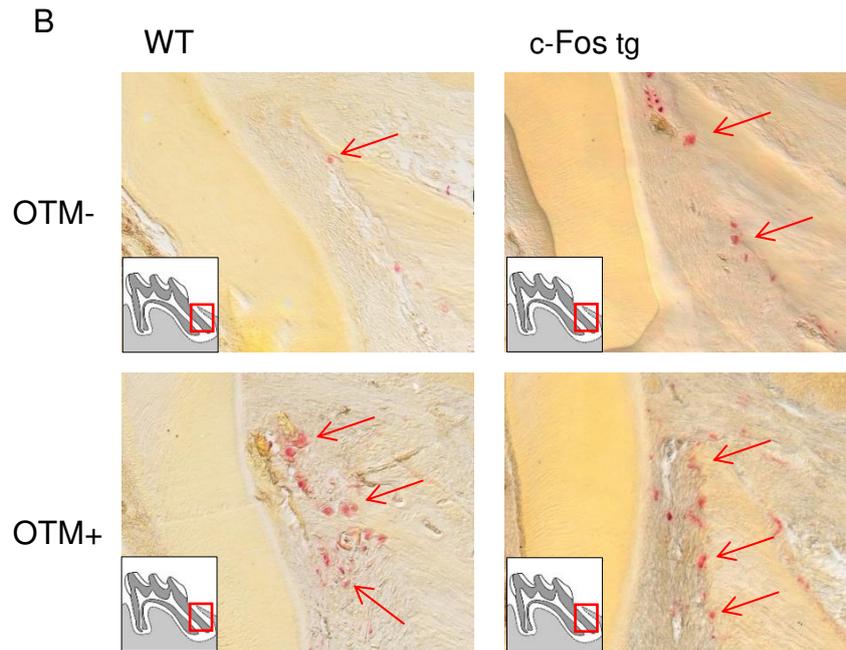


Abbildung 13: Immunhistologisch-gefärbte Schnitte (TRAP-Färbung) der Druckzonen. **(A)** Distale Wurzel und **(B)** Mesiale Wurzel des ersten Oberkiefermolaren der unbehandelten Kontrollseite ohne Zahnbewegung (OTM-) und der behandelten Seite mit Zahnbewegung (OTM+) von Wildtyp (WT) und *c-Fos*-transgenen Tieren (*c-Fos tg*). TRAP-positive Zellen erscheinen rötlich (Pfeil). Der untersuchte Bereich ist im schematisch dargestellten Zahn durch ein rotes Rechteck gekennzeichnet. Für die einfachere Darstellung wurden die Bilder um 180° gedreht und in ihrer Ausrichtung angepasst.

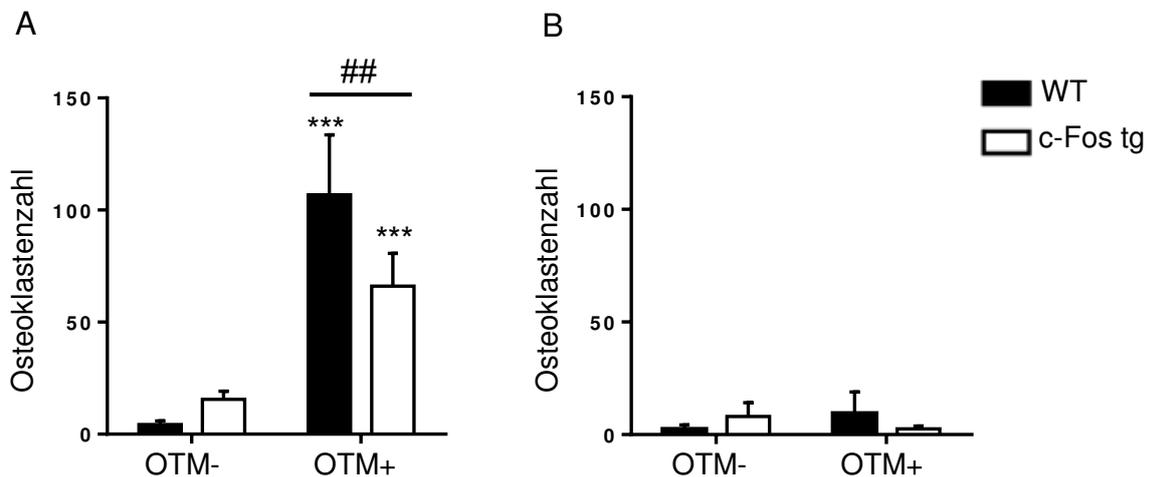


Abbildung 14: Auswertung der Osteoklastenzahl; Numerische Analyse der Osteoklasten in **(A)** Druckzone und **(B)** Zugzone der unbehandelten Kontrollseite ohne Zahnbewegung (OTM-) und der behandelten Seite mit Zahnbewegung (OTM+) von Wildtyp (WT) und *c-Fos*-transgenen Tieren (*c-Fos tg*). Darstellung als Mittelwert mit Standardabweichung. Das Signifikanzniveau ist mit „##“ für $p < 0,01$ und „***“ für $p < 0,001$ markiert. ($n=4$)

4 Diskussion

Diese Studie zeigt, dass c-Fos eine zentrale Bedeutung bei der genetischen Kontrolle der Zahnbewegung *in vivo* besitzt und hebt die essentielle Rolle der Osteoklasten dabei hervor. Durch die Durchführung einer kieferorthopädischen Zahnbewegung bei *c-Fos*-transgenen Mäusen und Kontrolltieren konnte gezeigt werden, dass eine Überexpression von c-Fos zu einer schnelleren Zahnbewegung führt, ohne dass dabei vermehrt Nebenwirkungen wie Wurzelresorptionen auftreten.

Damit zeigt diese Arbeit auch, welches Spektrum an Möglichkeiten transgene Mäuse für die Erforschung kieferorthopädischer Zahnbewegung zur Verfügung stellen.

4.1 Die kieferorthopädische Zahnbewegung im Mausmodell

Während kieferorthopädische Zahnbewegungen bei Großtieren und Ratten vielfach durchgeführt wurden (Schwarz 1932, Rygh 1976, Pilon et al. 1996, Saitoh et al. 2000, Von Böhl et al. 2004, Iino et al. 2007, Madan et al. 2007, Kirschneck et al. 2017), wurde das Modell bei Mäusen bisher nur wenig verwendet (Gluhak-Heinrich et al. 2003, Al-Qawasmi et al. 2006, Okamoto et al. 2009, Braga et al. 2011, Taddei et al. 2012, Kondo et al. 2013, Pal et al. 2017). Genetisch modifizierte Mäuse kommen wiederum deutlich seltener zum Einsatz (Al-Qawasmi et al. 2004, Yoshimatsu et al. 2005, Andrade et al. 2007, 2009, Matsumoto et al. 2013, Taddei et al. 2013, Yabumoto et al. 2013).

Kondo et al., Yabumoto et al. und Pal et al. bedienten sich für die Bewegung der Molares so genannter „Spacer“, kleiner Gummiringe, die in der Kieferorthopädie vielseitig zum Einsatz kommen (Kondo et al. 2013, Yabumoto et al. 2013, Pal et al. 2017). Diese klemmten sie zwischen den ersten und zweiten Oberkiefermolar und bewirkten so eine Mesialbewegung des ersten Molars. Nachteilig wirkt sich hierbei jedoch das nicht kalkulierbare Kräftediagramm aus. Weder die initiale Kraftgröße noch der Kraftverlauf bei Vergrößerung der interdentalen Distanz lassen sich sicher bestimmen. Außerdem lässt diese Methode keinen Vergleich der erreichten Distanzen nach erfolgter Kraftapplikation zwischen den Versuchsgruppen zu.

Al-Qawasmi et al., Yoshimatsu et al. und Matsumoto et al. führten die Zahnbewegung mit Nitinolfedern durch, die sie mittels Drahtligatur an Inzisivi und Molares befestigten (Al-Qawasmi et al. 2004, 2006, Yoshimatsu et al. 2005, Matsumoto et al. 2013). Die Federn besaßen laut Herstellerangaben eine bei Dehnung konstante Kraft von 10g,

die Yoshimatsu et al. jedoch als „ungefähr“ beschreibt, da das Kraftniveau der eingebauten Apparatur nicht experimentell bestimmt wurde. Zudem kann bei der Verwendung einer Drahtligatur nicht ausgeschlossen werden, dass durch die neu geschaffene Schmutznische auch eine Prädilektionsstelle für Parodontopathien iatrogen zustande kommt. Okamoto et al. konnten in der Tat nachweisen, dass eine durch eine Drahtligatur induzierte Parodontitis bei Mäusen in einer reduzierten Zahnbewegung resultiert (Okamoto et al. 2009). Des Weiteren besteht die Gefahr einer Schleimhautverletzung durch das interdentale einfädeln des Drahtes. Schließlich ist bei interdentaler Führung einer Drahtligatur das Auftreten von Röntgenartefakten in analytisch wichtigen Bereichen nicht auszuschließen. Yoshimatsu et al. beschrieb für seine angewandte Methode darüber hinaus die Notwendigkeit einer regelmäßigen Neupositionierung der Drahtligatur an den Inzisiven alle vier Tage.

Die in dieser Arbeit verwendete Vorgehensweise orientierte sich daher an Arbeiten von Taddei et al., Braga et al. und Andrade et al. (Andrade et al. 2007, 2009, Braga et al. 2011, Taddei et al. 2012, 2013). Hierdurch ergaben sich mehrere Vorteile. Erstens reduziert eine okklusal, adhäsiv befestigte Apparatur bei der dreidimensionalen röntgenologischen Analyse die Artefakte auf rein okklusale Bereiche und die diagnostisch relevanten Bereiche, der interdentale Spalt und der Alveolarknochen, bleiben klar ersichtlich (siehe Abbildung 7A). Somit können Daten aus den ROIs störungsfrei erhoben werden. Zweitens kann durch die Nutzung eines Bonding-Einflaschensystems, eines photopolymerisierbaren Komposits und den im Vorfeld individualisierten Federn der Zeitraum zum Einsetzen der Apparatur wesentlich verringert werden. Dies bietet den Vorteil, dass sich die Nebenwirkungen der Narkose, beispielsweise die Senkung der Körpertemperatur, reduzieren lassen. Drittens ist die Invasivität des Eingriffs geringer, da die Wangenhalter und Mikrofaserbürstchen stumpf sind und das Prozedere rein auf die schmelzbedeckten Flächen von Molares und Inzisivi beschränkt ist. Viertens erlaubt die adhäsive Befestigung in Kombination mit der Federwaage eine simple Reproduktion der angewandten Kräfte bei stetiger visueller Kontrolle. Außerdem gestaltete sich auch die Abnahme der Apparatur zur Probenentnahme für die Histologie unkompliziert, da die Befestigung aus Komposit mit einem Instrument simpel entfernt werden kann. Damit haben keine residualen Fremdkörper der Apparatur die Gewinnung histologischer Schnitte gestört.

Der beschriebene Versuchsaufbau schien sich auch vorteilhaft auf die Schmerzsensation der Tiere auszuwirken, da das Kraftniveau der

kieferorthopädischen Apparatur an die Größe der murinen Zähne angepasst wurde. Somit sollten die Symptome mit den Beschwerden einer festen Zahnsperre vergleichbar sein. Hierbei ist die Entstehung des Schmerzes darauf zurückzuführen, dass durch die permanente Stauchung des Desmodonts dort in einigen Arealen ischämische oder sogar nekrotische Bereiche entstehen. Dies hat lokale, sterile Entzündung und eine entsprechender Immunantwort zur Folge (Reitan 1967, Cooper und Sims 1989, Alhashimi et al. 2000, Chan und Darendeliler 2005, Ren et al. 2007, Barbagallo et al. 2008, Kahl-Nieke 2010, Chavarría-Bolaños et al. 2014, Proffit et al. 2019). Initial sollten bei orthodontischen oder orthopädischen Kraftapplikationen am Zahn jedoch keine direkten Schmerzen auftreten. Andernfalls wäre eine therapeutisch vertretbare Belastung überschritten. Erst nach einigen Stunden kommt es zu einer gesteigerten Sensitivität und Druckschmerzen bei der Mastikation. Dieser Zustand hält in der Regel einige Tage an (Proffit et al. 2019). In der Tat zeigten auch die Versuchstiere initial einen Gewichtsverlust einhergehend mit einem ruhigen Erscheinungsbild. Ab dem dritten Versuchstag zeigte sich jedoch jede Maus agil und mit normalisierter Nahrungsaufnahme. Auch ein Ablassen von den natürlichen Trieben wie Nestbau- und Grabeverhalten, was auf eine äußerst starke Belastung hindeuten würde (Arras et al. 2007, Jirkof et al. 2010), konnte nicht beobachtet werden. Die initiale Dämpfung der Agilität kann mit einer Neugewöhnung an die orale Apparatur und den Folgewirkungen einer Anästhesie mit Ketamin erklärt werden.

Die von uns durchgeführte Methode der kieferorthopädischen Zahnbewegung im murinen Modell erwies sich damit als praktikabel und ethisch vertretbar. Die tägliche Gewichtskontrolle zeigte, dass die Tiere keiner schwerwiegenden Belastung ausgesetzt waren. Zuletzt konnte durch die interne, kontralaterale Kontrollprobe die Anzahl der nötigen Versuchstiere im Vergleich zu bilateralen Methoden, wie von Saitoh und Madan für Ratten beschrieben (Saitoh et al. 2000, Madan et al. 2007), auf die Hälfte reduziert werden.

4.2 Auswirkungen von c-Fos auf die kieferorthopädische Zahnbewegung

Viele der hier aufgeführten Autoren führten die kieferorthopädische Zahnbewegung in nichtgenveränderten Wildtypmäusen durch (Gluhak-Heinrich et al. 2003, Al-Qawasmi et al. 2006, Okamoto et al. 2009, Braga et al. 2011, Taddei et al. 2012, Kondo et al. 2013, Pal et al. 2017). Dabei eröffnen genetische veränderte Mäuse die Möglichkeit im Bereich der Grundlagenforschung genetische Effekten auf Remodeling,

kieferorthopädische Zahnbewegung und Wurzelresorptionen *in vivo* zu analysieren. Al-Qawasmi et al., Yoshimatsu et al., Andrade et al., Taddei et al. und Yabumoto et al. konnten in ihren Publikationen bereits erfolgreich aufzeigen, dass Knockout-Mäuse signifikante Unterschiede zu ihren Wildtypkontrollen aufweisen. So konnten sie die Rollen der jeweils defizitär exprimierten Proteine in der kieferorthopädischen Zahnbewegung einordnen (Al-Qawasmi et al. 2004, Yoshimatsu et al. 2005, Andrade et al. 2007, 2009, Taddei et al. 2013, Yabumoto et al. 2013). In dieser Arbeit wurde dagegen in einem transgenen Mausmodell untersucht, welchen Einfluss die Überexpression eines Proteins auf die kieferorthopädische Zahnbewegung besitzt. Im Rahmen der Vorbereitung und Planung des Versuchsmodells, erwies sich *c-Fos* hierbei als attraktives Gen zur Untersuchung in seiner Rolle bei der kieferorthopädischen Zahnbewegung aufgrund seiner Schlüsselposition in der Osteoklastendifferenzierung (Wang et al. 1992, Grigoriadis et al. 1993, 1994) und die Möglichkeit der mechanisch stimulierten Expression (Glantschnig et al. 1996, Pavalko et al. 1998, Yang et al. 2004, Li et al. 2007, Sen et al. 2015). Die Expression von *c-Fos* wurde außerdem bereits in zahnbildenden Geweben nachgewiesen (Caubet und Bernaudin 1988).

Nach der kieferorthopädischen Zahnbewegung konnten klare Unterschiede zwischen den *c-Fos*-transgenen Tieren und den Wildtypkontrollen festgestellt werden. Die Auswertung der erfolgten Zahnbewegung mittels μ CT war eindeutig. Die Mesialisierung der Zähne erfolgte bei einer vermehrter *c-Fos*-Expression im Mittel 62% schneller ($p=0,0201$). Auch mittels entkalkter Histologie konnte nachgewiesen werden, dass *c-Fos* einen Einfluss auf die Zahnbewegung besitzt. In der histologischen Analyse zeigte sich, dass die auf den Zahn ausgeübte Kraft bei *c-fos*-transgenen Tieren und Wildtypen zu einem mechanisch induzierten Knochenumbau geführt hat. In Krafrichtung fand eine Resorption des Knochens statt, was sich durch Resorptionslakunen auf der Knochenoberfläche und einer Häufung von Osteoklasten zeigte. Betrachtet man die TRAP-gefärbten histologischen Präparate, in der Osteoklasten immunhistologisch angefärbt werden, waren auch hier deutliche Unterschiede erkennbar. Bei der Begutachtung der Kontrollseite beider Gruppen äußerte sich die Überexpression von *c-Fos* zunächst durch eine gesteigerte Basisaktivität der Osteoklasten im Vergleich zur Kontrollgruppe ($p=0,00148$). Zwar reagierten beide Gruppen auf die kieferorthopädische Behandlung mit einer Erhöhung der Osteoklastenzahl im Kompressionsbereich (WT: $p<0,0001$; *c-Fos* tg: $p=0,00039$),

die zelluläre Antwort der transgenen Mäuse war jedoch insgesamt geringer im Vergleich zu den Wildtypen.

Die vermehrte Expression von *c-Fos* scheint also dafür verantwortlich zu sein, dass das Gen im Hinblick auf seine mechanische Stimulierbarkeit an Ansprechverhalten einbüßt. Einerseits kann dies daran liegen, dass eine Aktivierbarkeit über das Level der Überexpression nicht möglich ist, andererseits wurde bereits gezeigt, dass *c-Fos* sich selbst durch eine negative Rückkopplung über $\text{INF-}\beta$ hemmen kann (Takayanagi et al. 2002). Dennoch hat eine erfolgreiche Rekrutierung der phagozytierenden Zellen stattgefunden. Dadurch liegt folgende Schlussfolgerung nahe: *C-Fos* bewirkt bei einer Überexpression eine Erhöhung des Grundspiegels der Osteoklastenaktivität beziehungsweise deren Differenzierung. Diese hohe Grundaktivität erlaubt initial ein rasches Adaptieren an die neu auftretende mechanische Dauerbelastung, sodass die resultierende Bewegung des Zahnes zügiger vonstattengehen kann.

Interessanterweise konnten bei Wildtyp und *c-Fos*-transgenen Tieren ebenso laterale Wurzelresorptionen nachgewiesen werden. Hierbei handelt es sich um eine typische Nebenwirkung der kieferorthopädischen Therapie (Killiany 1999). Vergleicht man dazu die posttherapeutisch signifikant geringere Osteoklastenzahl ($p=0,00148$) scheint diese nicht allein für das Maß der Wurzelresorption verantwortlich zu sein. Es ist bereits bekannt, dass der Faserapparat des Parodontiums einem stetigen und raschen Turnover unterliegt und die damit Verknüpfte Phagozytose von den Fibroblasten übernommen wird (Sodek 1977, Melcher und Chan 1981). Zwar besitzen Osteoklasten die Fähigkeit Wurzelzement zu resorbieren (Jones et al. 1984), denkbar ist hier allerdings ein ergänzender pathologischer Mechanismus im Zusammenhang mit mechanisch induzierter Degradierung und den zusätzlich auftretenden steril inflammatorischen Prozessen.

Die Entstehung von Wurzelresorptionen wird dabei klassischerweise im Zusammenhang mit dem Auftreten von Hyalinsationen, nekrotischen Arealen, im Parodontalspalt gesehen. So stellten Brudvik und Rygh fest, dass ein Zusammenhang zwischen der Wurzelresorption und dem Kontakt der betroffenen Areale mit den hyalinisierten Arealen besteht. So fördert der Verbleib von nekrotischem Gewebe auch die Wurzelresorption noch über den Abschluss der Kraftapplikation hinaus (Brudvik und Rygh 1995). Interessanterweise ließen sich diese Hyalinisationen ausschließlich in den Wildtypmäusen beobachten, nicht aber in den *c-Fos*-transgenen Mäusen.

Hieraus lassen sich zwei mögliche Schlussfolgerungen ziehen. Erstens ist möglich, dass die Hyalinisationen in *c-Fos*-transgenen Tieren früher auftraten und zum gewählten Untersuchungszeitpunkt aufgrund eines höheren Gewebeturnovers schon verschwunden waren. Hieraus ließe sich wiederum vermuten, dass die Wurzelresorptionen der Wildtypen zu einem späteren Untersuchungszeitpunkt stärker als bei *c-Fos*-Tieren gewesen wären. Die zweite mögliche Schlussfolgerung wäre jedoch deutlich spannender. Falls es sich auch bei andere Untersuchungszeitpunkten bewahrheiten würde, dass bei *c-Fos*-transgenen Tieren trotz ausgeprägter Wurzelresorptionen keine Hyalinisationen auftreten, würde dies den vermuteten, kausalen Zusammenhang zwischen Hyalinisation und Wurzelresorption in Frage stellen.

Dies ist auch von klinischer Relevanz, da bekannt ist, dass unterschiedliche Individuen bei gleicher Behandlungsart und gleicher angewendeter Kraft unterschiedlich auf eine orthodontische Zahnbewegung reagieren (Pilon et al. 1996). Da es sich also um einen multifaktoriellen Prozess handelt, ist es von bedeutendem Interesse, die kieferorthopädische Behandlung dahingehend zu beeinflussen, die Nebenwirkungen möglichst gering zu halten. Eine Überexpression von *c-Fos* scheint sich dabei auf die Nebenwirkungen der kieferorthopädischen Behandlung auszuwirken. Laterale Wurzelresorptionen lassen sich anscheinend nicht vermeiden, Hyalinisationen ließen sich jedoch bei einer Überexpression von *c-Fos* nicht beobachten. Die im Vergleich zum Wildtyp schnellere Zahnbewegung kann demnach auch auf das Ausbleiben oder zumindest stark reduzierte Auftreten dieser nekrotischen Areale zurückgeführt werden.

Abschließend ist das Auftreten von Osteosarkomen zu erwähnen, das bei diesem Mausmodell beschrieben wird. Phänotypisch wird für die transgenen Tiere ein gehäuftes Erscheinen von kalzifizierten Arealen beschrieben, die sich als Osteosarkome identifizieren lassen. Diese treten initial vor allem an den Röhrenknochen der Extremitäten auf, sind aber mit zunehmenden Alter – etwa 14 Wochen – auch an den Wirbelkörpern und Rippen nachweisbar (Rüther et al. 1987, 1989, Rauscher et al. 1988, Wang et al. 1995, Wagner und Matsuo 2003, David et al. 2005, Leaner et al. 2009). Bei den Untersuchungen der Schädel mit dem Fokus auf die Kiefer und die Alveolarknochen ließen sich jedoch keine Neoplasien feststellen. Auch hat keine Behinderung der durchgeführten Zahnbewegungen in den transgenen Tieren stattgefunden. Da die in diesem Versuch verwendeten Mäuse das Alter von 12 Wochen nicht überschritten haben, lässt sich die spätere Bildung von Tumoren in

diesem Gebiet nicht vollständig ausschließen. Dennoch erscheint es unwahrscheinlich, betrachtet man die Häufung in den restlichen knöchernen Geweben. Dies hebt erneut hervor, dass der Alveolarknochen als eigenständiger Knochen gesondert vom restlichen Skelett zu betrachten ist.

4.3 Ausblick

Das Versuchsmodell der orthodontischen Zahnbewegung in transgenen Mäusen bietet für die kieferorthopädische Grundlagenforschung einen potenten Ansatzpunkt für die Untersuchung einzelner Gene in ihrer Rolle im mechanisch induzierten Remodeling. Auch für die Untersuchung pathologischer Mechanismen wie die Wurzelresorption scheint dieses Modell geeignet. Denkbar wäre auch, Mäuse mit Phänotypen zu züchten, die eine kieferorthopädische Behandlung erschweren, um hier gezielt Einflussmöglichkeiten durch systemische oder lokale Medikation seitens des Behandlers zu erproben.

Die Beobachtungen dieser Studie unterstreichen, dass die osteoklastäre Differenzierung und Resorption als wichtige Stellgröße in der mechanisch induzierten Knochenmodulation angesehen werden muss. Es konnte gezeigt werden, dass eine Modulation der c-Fos-Expression auch eine Veränderung der zellulären Antwort auf die kieferorthopädische Zahnbewegung also solche bewirkt. Zwar fand die Beeinflussung auf Ebene des Genoms statt, es konnte aber bereits gezeigt werden, dass sich die Expression von c-Fos durch andere Methoden beeinflussen lässt. Li et al. konnten nachweisen, dass die mechanisch induzierte Expression von unter anderem c-Fos und c-Jun von der intrazellulären Kalziumkonzentration abhängig ist und sich diese durch eine Medikation mit Verapamilhydrochlorid, einem Kalziumkanalblocker, negativ beeinflussen lässt (Li et al. 2013). Die gewonnenen Erkenntnisse lassen damit erahnen, welche Möglichkeiten sich in der kieferorthopädischen Therapie daraus ergeben könnten.

5 Zusammenfassung

Der Knochen ist ein dynamisches Gewebe, dessen ständiger Auf- und Abbau durch eine Vielzahl genetischer und epigenetischer Faktoren reguliert wird. Zu letzteren gehören mechanische Reize, die in der embryonalen und postnatalen Entwicklung die Differenzierung und Aktivität knochenaufbauender Osteoblasten und knochenabbauender Osteoklasten steuern. Aus Zellkulturexperimenten und Mausmodellen ist bekannt, dass der mechanosensitive Transkriptionsfaktor *c-Fos* die Differenzierung von Osteoklasten steuert. Es ist jedoch unklar, ob *c-Fos* auch einen Einfluss auf die kieferorthopädische Zahnbewegung besitzt. Ziel dieser Arbeit war es daher, den Einfluss von *c-Fos* auf die Zahnbewegung *in vivo* in einem transgenen Mausmodell mit Überexpression von *c-Fos* zu untersuchen.

Transgenen Mäusen mit einer *c-Fos*-Überexpression und Kontrolltieren (Wildtyp) wurde unter Anästhesie eine kieferorthopädische Apparatur appliziert. Dafür wurde eine Nitinol-Zugfeder zwischen dem linken ersten Oberkiefermolaren und den oberen Inzisiven mittels Flow-Komposit befestigt. Die kontralaterale Seite diente jeweils als interne Kontrolle. Die Kiefer wurden beidseits nach 12 Tagen entnommen und mittels micro-Computertomographie und entkalkter Histologie analysiert. Für die Darstellung der Osteoklasten wurde außerdem eine immunhistologische Färbung mit TRAP (tartrate-resistant acid phosphatase) durchgeführt. Die Behandlung führte bei allen Mäusen zu einer Mesialisierung der ersten Molaren. Die Zahnbewegung war bei *c-Fos*-transgenen Tieren um 62% schneller, was sich durch einen im Vergleich zu Kontrolltieren signifikant erhöhten interkoronalen Abstand zwischen erstem und zweitem Molaren zeigte. In den histologischen Untersuchungen konnte bei beiden Gruppen mechanisch-induzierter Knochenaufbau und Knochenabbau nachgewiesen werden. Die Trap-Färbung zeigte bei *c-Fos*-transgenen Tieren eine im Vergleich zum Wildtyp erhöhte Anzahl von Osteoklasten auf der unstimulierten Kontrollseite. Der kieferorthopädisch induzierte Anstieg der Osteoklastogenese war jedoch bei *c-Fos* transgenen Tieren signifikant geringer.

Die basal erhöhte Osteoklastogenese bei *c-Fos*-Überexpression begünstigt eine schnellere Zahnbewegung, dennoch scheint die Mechanosensibilität verringert. Diese Studie zeigt, dass *c-Fos* eine zentrale Bedeutung bei der genetischen Kontrolle der Zahnbewegung *in vivo* besitzt und welche Möglichkeiten transgene Mäuse für die Erforschung kieferorthopädischer Zahnbewegung zur Verfügung stellen.

6 Abstract

Bone is a dynamic tissue whose constant assembly and disassembly is regulated by a variety of genetic and epigenetic factors. The latter include mechanical stimuli that control the differentiation and activity of bone-building osteoblasts and bone-degrading osteoclasts in embryonic and postnatal development. From cell culture experiments and mouse models it is known that the mechanosensitive transcription factor *c-Fos* controls the differentiation of osteoclasts. However, it is unclear whether *c-Fos* also has an impact on orthodontic tooth movement. The aim of this work was therefore to investigate the influence of *c-Fos* on tooth movement *in vivo* in a transgenic mouse model with overexpression of *c-Fos*.

Transgenic mice with *c-Fos* overexpression and control mice (wild-type) were anesthetized and orthodontic appliances were affixed. For this purpose, a tension spring (nickel-titanium alloy) was attached between the left first maxillary molar and the upper incisors by means of a flow composite. The contralateral side served as an internal control. The jaws were removed on both sides after 12 days and analyzed by micro-computed tomography and decalcified histology. For the imaging of the osteoclasts an immunohistological staining with TRAP (tartrate-resistant acid phosphatase) was also performed. Treatment resulted in mesialization of the first molars in all mice. Tooth movement was 62% faster in *c-Fos* transgenic animals, as demonstrated by a significantly increased intercoronal distance between the first and second molars compared to control animals. In the histological analyses both experimental groups demonstrated mechanically induced bone formation and bone degradation. Trap staining in *c-Fos* transgenic animals showed an increased number of osteoclasts on the unstimulated control side compared to the wild type. However, the orthodontically induced increase in osteoclastogenesis was significantly lower in *c-Fos* transgenic animals. These results suggest that basally increased osteoclastogenesis in *c-Fos* overexpression promotes faster tooth movement, yet mechanosensitivity appears to be reduced.

This study shows that *c-Fos* is of central importance in the genetic control of tooth movement *in vivo* and points out the opportunities transgenic mice provide for the research on orthodontic tooth movement.

7 Abkürzungsverzeichnis

AP-1	: activator protein 1
°C	: Grad Celsius
c-Fos tg	: <i>c-Fos</i> -transgen
cm ²	: Quadratzentimeter
DMSO	: Dimethylsulfoxid
DNA	: desoxyribonucleic acid
dNTPs	: Nukleosidtriphosphate
DPBS	: Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline
EDTA	: Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	: epidermal growth factor
et al.	: et alii / aliae
g	: Gramm
gWf	: gesamte Wurzelfläche
INF-β	: Beta-Interferon
Kb	: Kilo-Basenpaare
KCl	: Kaliumchlorid
Kg	: Kilogramm
KG	: Körpergewicht
LTR	: long terminal repeat
M-CSF (auch CSF-1)	: macrophage colony-stimulating factor
mg	: Milligramm
MHC	: major histocompatibility complex
Min	: Minute
mM	: Millimol
μCT	: Micro-Computertomograph

μl	: Microliter
N	: Newton
NGF	: nerve growth factor
n. n.	: nicht nachweisbar
OPG	: Osteoprotegerin
OTM	: orthodontic tooth movement
PCR	: polymerase chain reaction
pH	: potentia Hydrogenii
PTH-R	: parathyroid hormone receptor
RANK	: receptor activator of nuclear factor κ B
RANKL	: receptor activator of nuclear factor κ B ligand
RNA	: ribonucleic acid
ROI	: Region of Interest
rWf	: resorbierte Wurzelfläche
Sek	: Sekunden
SDS	: sodium dodecyl sulfate Natriumlaurylsulfat
TAE-Puffer	: Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TE-Puffer	: Tris-EDTA-Puffer
TGF-β	: transforming growth factor beta
TNF-α	: Tumornekrosefaktor-alpha
TRAP	: tartrat-resistant acid phosphatase
WT	: Wildtyp

8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Linkslaterale Aufsicht eines schematischen Mausschädels mit dazugehörigem Zahnschema.	6
Abbildung 2: Kieferorthopädischen Zahnbewegung im Mausmodell.	9
Abbildung 3: Entwicklungsverlauf der Osteoklasten.	13
Abbildung 4: Schrittweise Dokumentation der Schritte zur Befestigung der Feder.	21
Abbildung 5: Schematische Darstellung des murinen ersten Oberkiefermolaren im Verlauf der Behandlung.	26
Abbildung 6: Gewichtskurve von Wildtypmäusen (WT) und <i>c-Fos</i> -transgenen Mäusen (<i>c-Fos</i> tg).	27
Abbildung 7: Quantifizierung der Zahnbewegung mittels μ CT.	28
Abbildung 8: Toluidinblau-gefärbte entkalkte Histologie der Oberkiefermolaren. ...	31
Abbildung 9: Toluidinblau-gefärbte entkalkte Histologie des Parodontiums.	32
Abbildung 10: Toluidinblau-gefärbte entkalkte Histologie der Zahnwurzeln.	33
Abbildung 11: Toluidinblau-gefärbte entkalkte Histologie der Hyalinisationen.	34
Abbildung 12: Pikro-Siriusrot-gefärbte entkalkte Histologie der Zahnwurzeln zur Darstellung der Kollagenfasern.	36
Abbildung 13: Auswertung der histologischen Schnitte mit TRAP-Färbung zur Darstellung der Osteoklasten.	38
Abbildung 14: Auswertung der Osteoklastenzahl; Numerische Analyse der Osteoklasten.	38

9 Literaturverzeichnis

- Ajubi NE, Klein-Nulend J, Nijweide PJ, Vrijheid-Lammers T, Alblas MJ, Burger EH (1996) Pulsating Fluid Flow Increases Prostaglandin Production by Cultured Chicken Osteocytes—A Cytoskeleton-Dependent Process. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 225(1): 62–68.
- Al-Qawasmi RA, Hartsfield JK, Everett ET, Weaver MR, Foroud TM, Roberts WE (2004) Root resorption associated with orthodontic force in IL-1B knockout mouse. *Journal of Musculoskeletal Neuronal Interactions*. 4(4): 383–385.
- Al-Qawasmi RA, Hartsfield JK, Everett ET, Weaver MR, Foroud TM, Faust DM, Roberts WE (2006) Root resorption associated with orthodontic force in inbred mice: genetic contributions. *European Journal of Orthodontics*. 28(1): 13–19.
- Alhashimi N, Frithiof L, Brudvik P, Bakhiet M (2000) Orthodontic Movement Induces High Numbers of Cells Expressing IFN-gamma at mRNA and Protein Levels. *Journal of Interferon & Cytokine Research*. 20(1): 7–12.
- Anderhuber F, Pera F, Streicher J (2012) *Waldeyer Anatomie des Menschen*. 19. Auflag. Walter de Gruyter GmbH & Co. KG, Berlin, Boston.
- Andrade I, Silva TA, Silva GAB, Teixeira AL, Teixeira MM (2007) The Role of Tumor Necrosis Factor Receptor Type 1 in Orthodontic Tooth Movement. *Journal of Dental Research*. 86(11): 1089–1094.
- Andrade I, Taddei SRA, Garlet GP, Garlet TP, Teixeira AL, Silva TA, Teixeira MM (2009) CCR5 Down-regulates Osteoclast Function in Orthodontic Tooth Movement. *Journal of Dental Research*. 88(11): 1037–1041.
- Arras M, Rettich A, Cinelli P, Kasermann HP, Burki K (2007) Assessment of post-laparotomy pain in laboratory mice by telemetric recording of heart rate and heart rate variability. *BMC Veterinary Research*. 3(1): 16.
- Aubin JE, Triffitt JT (2002) Mesenchymal Stem Cells and Osteoblast Differentiation. *Principles of Bone Biology*. 59–81.
- Barbagallo LJ, Jones AS, Petocz P, Darendeliler MA (2008) Physical properties of root cementum: Part 10. Comparison of the effects of invisible removable thermoplastic appliances with light and heavy orthodontic forces on premolar cementum. A microcomputed-tomography study. *American Journal of*

- Orthodontics and Dentofacial Orthopedics. 133(2): 218–227.
- Von Böhl M, Maltha JC, Von Den Hoff JW, Kuijpers-Jagtman AM (2004) Focal hyalinization during experimental tooth movement in beagle dogs. *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics*. 125(5): 615–623.
- Bonewald LF (2007) Osteocytes as Dynamic Multifunctional Cells. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1116(1): 281–290.
- Bonewald LF, Wacker MJ (2013) FGF23 production by osteocytes. *Pediatric Nephrology*. 28(4): 563–568.
- Boyce BF, Xing L (2008) Functions of RANKL/RANK/OPG in bone modeling and remodeling. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 473(2): 139–146.
- Braga SMG, De Albuquerque Taddei SR, Andrade I, Queiroz-Junior CM, Garlet GP, Repeke CE, Teixeira MM, Da Silva TA (2011) Effect of diabetes on orthodontic tooth movement in a mouse model. *European Journal of Oral Sciences*. 119(1): 7–14.
- Brown RA, Prajapati R, McGrouther DA, Yannas IV, Eastwood M (1998) Tensional homeostasis in dermal fibroblasts: Mechanical responses to mechanical loading in three-dimensional substrates. *Journal of Cellular Physiology*. 175(3): 323–332.
- Brudvik P, Rygh P (1995) Transition and determinants of orthodontic root resorption--repair sequence. *The European Journal of Orthodontics*. 17(3): 177–188.
- Cate ART, Deporter DA, Freeman E (1976) The role of fibroblasts in the remodeling of periodontal ligament during physiologic tooth movement. *American Journal of Orthodontics*. 69(2): 155–168.
- Caubet J-F, Bernaudin J-F (1988) Expression of the c-fos proto-oncogene in bone, cartilage and tooth forming tissues during mouse development. *Biology of the Cell*. 64(1): 101–104.
- Chan E, Darendeliler MA (2005) Physical properties of root cementum: Part 5. Volumetric analysis of root resorption craters after application of light and heavy orthodontic forces. *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics*. 127(2): 186–195.
- Chang HY, Chi J-T, Dudoit S, Bondre C, van de Rijn M, Botstein D, Brown PO (2002) Diversity, topographic differentiation, and positional memory in human fibroblasts.

- Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 99(20): 12877–82.
- Chavarría-Bolaños D, Martínez-Zumaran A, Lombana N, Flores-Reyes H, Pozos-Guillen A (2014) Expression of substance P, calcitonin gene-related peptide, β -endorphin and methionine-enkephalin in human dental pulp tissue after orthodontic intrusion A pilot study. *Angle Orthodontist*. 84(3): 521–526.
- Chiu R, Boyle WJ, Meek J, Smeal T, Hunter T, Karin M (1988) The c-Fos protein interacts with c-Jun/AP-1 to stimulate transcription of AP-1 responsive genes. *Cell*. 54(4): 541–52.
- Chow JWM, Wilson AJ, Chambers TJ, Fox SW (1998) Mechanical Loading Stimulates Bone Formation by Reactivation of Bone Lining Cells in 13-Week-Old Rats. *Journal of Bone and Mineral Research*. 13(11): 1760–1767.
- Cooper SM, Sims MR (1989) Evidence of acute inflammation in the periodontal ligament subsequent to orthodontic tooth movement in rats. *Australian orthodontic journal*. 11(2): 107–9.
- Curran T, Teich NM (1982) Candidate product of the FBJ murine osteosarcoma virus oncogene: characterization of a 55,000-dalton phosphoprotein. *Journal of virology*. 42(1): 114–22.
- Curran T, MacConnell WP, van Straaten F, Verma IM (1983) Structure of the FBJ murine osteosarcoma virus genome: molecular cloning of its associated helper virus and the cellular homolog of the v-fos gene from mouse and human cells. *Molecular and cellular biology*. 3(5): 914–21.
- David J-P, Mehic D, Bakiri L, Schilling AF, Mandic V, Priemel M, Idarraga MH, Reschke MO, Hoffmann O, Amling M, et al. (2005) Essential role of RSK2 in c-Fos-dependent osteosarcoma development. *The Journal of clinical investigation*. 115(3): 664–72.
- Dobnig H, Turner RT (1995) Evidence that intermittent treatment with parathyroid hormone increases bone formation in adult rats by activation of bone lining cells. *Endocrinology*. 136(8): 3632–3638.
- Dony C, Gruss P (1987) Proto-oncogene c-fos expression in growth regions of fetal bone and mesodermal web tissue. *Nature*. 328(6132): 711–714.

- Ducy P, Schinke T, Karsenty G (2000) The osteoblast: a sophisticated fibroblast under central surveillance. *Science (New York, N.Y.)*. 289(5484): 1501–4.
- Glantschnig H, Varga F, Rumpler M, Klaushofer K (1996) Prostacyclin (PGI₂): a potential mediator of c-fos expression induced by hydrostatic pressure in osteoblastic cells. *European journal of clinical investigation*. 26(7): 544–8.
- Gluhak-Heinrich J, Ye L, Bonewald LF, Feng JQ, MacDougall M, Harris SE, Pavlin D (2003) Mechanical Loading Stimulates Dentin Matrix Protein 1 (DMP1) Expression in Osteocytes In Vivo. *Journal of Bone and Mineral Research*. 18(5): 807–817.
- Grigoriadis AE, Schellander K, Wang ZQ, Wagner EF (1993) Osteoblasts are target cells for transformation in c-fos transgenic mice. *The Journal of cell biology*. 122(3): 685–701.
- Grigoriadis AE, Wang ZQ, Cecchini MG, Hofstetter W, Felix R, Fleisch HA, Wagner EF (1994) c-Fos: a key regulator of osteoclast-macrophage lineage determination and bone remodeling. *Science (New York, N.Y.)*. 266(5184): 443–8.
- Hanahan D, Wagner EF, Palmiter RD (2007) The origins of oncomice: a history of the first transgenic mice genetically engineered to develop cancer. *Genes & Development*. 21(18): 2258–2270.
- Iino S, Sakoda S, Ito G, Nishimori T, Ikeda T, Miyawaki S (2007) Acceleration of orthodontic tooth movement by alveolar corticotomy in the dog. *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics*. 131(4): 448.e1-448.e8.
- Inaoka T, Lean JM, Bessho T, Chow JWM, Mackay A, Kokubo T, Chambers TJ (1995) Sequential Analysis of Gene Expression after an Osteogenic Stimulus - c-fos Expression Is Induced in Osteocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 217(1): 264–270.
- Jirkof P, Cesarovic N, Rettich A, Nicholls F, Seifert B, Arras M (2010) Burrowing Behavior as an Indicator of Post-Laparotomy Pain in Mice. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*. 4: 165.
- Jones SJ, Boyde A, Ali NN (1984) The resorption of biological and non-biological substrates by cultured avian and mammalian osteoclasts. *Anatomy and Embryology*. 170(3): 247–256.
- Kahl-Nieke B (2010) Einführung in die Kieferorthopädie: Diagnostik,

- Behandlungsplanung, Therapie. 3. Auflage. Deutscher Zahnärzte Verlag, Köln.
- Kawata A, Mikuni-Takagaki Y (1998) Mechanotransduction in Stretched Osteocytes— Temporal Expression of Immediate Early and Other Genes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 246(2): 404–408.
- Keränen SVE, Kettunen P, Åberg T, Thesleff I, Jernvall J (1999) Gene expression patterns associated with suppression of odontogenesis in mouse and vole diastema regions. *Development Genes and Evolution*. 209(8): 495–506.
- Killiany DM (1999) Root Resorption Caused by Orthodontic Treatment: An Evidence-Based Review of Literature. *Seminars in Orthodontics*. 5(2): 128–133.
- Kim MS, Day CJ, Morrison NA (2005) MCP-1 is induced by receptor activator of nuclear factor- κ B ligand, promotes human osteoclast fusion, and rescues granulocyte macrophage colony-stimulating factor suppression of osteoclast formation. *Journal of Biological Chemistry*. 280(16): 16163–16169.
- Kirschneck C, Maurer M, Wolf M, Reicheneder C, Proff P (2017) Regular nicotine intake increased tooth movement velocity, osteoclastogenesis and orthodontically induced dental root resorptions in a rat model. *International Journal of Oral Science*. 9(3): 174–184.
- Klein-Nulend J, Bakker AD, Bacabac RG, Vatsa A, Weinbaum S (2013) Mechanosensation and transduction in osteocytes. *Bone*. 54(2): 182–190.
- Kondo M, Kondo H, Miyazawa K, Goto S, Togari A (2013) Experimental tooth movement-induced osteoclast activation is regulated by sympathetic signaling. *Bone*. 52(1): 39–47.
- Kreja L, Liedert A, Hasni S, Claes L, Ignatius A (2008) Mechanical regulation of osteoclastic genes in human osteoblasts. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 368(3): 582–587.
- Kurata K, Heino TJ, Higaki H, Väänänen HK (2006) Bone Marrow Cell Differentiation Induced by Mechanically Damaged Osteocytes in 3D Gel-Embedded Culture. *Journal of Bone and Mineral Research*. 21(4): 616–625.
- Lacey D., Timms E, Tan H-L, Kelley M., Dunstan C., Burgess T, Elliott R, Colombero A, Elliott G, Scully S, et al. (1998) Osteoprotegerin Ligand Is a Cytokine that Regulates Osteoclast Differentiation and Activation. *Cell*. 93(2): 165–176.

- Lean JM, Mackay AG, Chow JW, Chambers TJ (1996) Osteocytic expression of mRNA for c-fos and IGF-I: an immediate early gene response to an osteogenic stimulus. *The American journal of physiology*. 270(6 Pt 1): E937-45.
- Leaner VD, Chick JF, Donninger H, Linniola I, Mendoza A, Khanna C, Birrer MJ (2009) Inhibition of AP-1 transcriptional activity blocks the migration, invasion, and experimental metastasis of murine osteosarcoma. *American Journal of Pathology*. 174(1): 265–275.
- Lekic P, McCulloch CAG (1996) Periodontal ligament cell populations: The central role of fibroblasts in creating a unique tissue. *The Anatomical Record*. 245(2): 327–341.
- Li J, Chen G, Zheng L, Luo S, Zhao Z (2007) Osteoblast cytoskeletal modulation in response to compressive stress at physiological levels. *Molecular and cellular biochemistry*. 304(1–2): 45–52.
- Li R, Wei M, Shao J (2013) Effects of verapamil on the immediate-early gene expression of bone marrow mesenchymal stem cells stimulated by mechanical strain in vitro. *Medical science monitor basic research*. 19: 68–75.
- Li Z, Yang G, Khan M, Stone D, Woo SL-Y, Wang JH-C (2004) Inflammatory Response of Human Tendon Fibroblasts to Cyclic Mechanical Stretching. *The American Journal of Sports Medicine*. 32(2): 435–440.
- Lockett WP (1985) Superordinal and Intraordinal Affinities of Rodents: Developmental Evidence from the Dentition and Placentation. In: *Evolutionary Relationships among Rodents*. Springer US, Boston, MA, 227–276.
- Madan MS, Liu ZJ, Gu GM, King GJ (2007) Effects of human relaxin on orthodontic tooth movement and periodontal ligaments in rats. *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics*. 131(1): 8.e1-8.e10.
- Mason DJ, Hillam RA, Skerry TM (2009) Constitutive in vivo mRNA expression by osteocytes of β -actin, osteocalcin, connexin-43, IGF-I, c-fos and c-jun, but not TNF- α nor tartrate-resistant acid phosphatase. *Journal of Bone and Mineral Research*. 11(3): 350–357.
- Matsumoto T, Iimura T, Ogura K, Moriyama K, Yamaguchi A (2013) The Role of Osteocytes in Bone Resorption during Orthodontic Tooth Movement. *Journal of*

- Dental Research. 92(4): 340–345.
- Melcher AH, Chan J (1981) Phagocytosis and digestion of collagen by gingival fibroblasts in vivo: A study of serial sections. *Journal of Ultrastructure Research*. 77(1): 1–36.
- Mikuni-Takagaki Y (1999) Mechanical responses and signal transduction pathways in stretched osteocytes. *Journal of Bone and Mineral Metabolism*. 17(1): 57–60.
- Mikuni-Takagaki Y, Suzuki Y, Kawase T, Saito S (1996) Distinct responses of different populations of bone cells to mechanical stress. *Endocrinology*. 137(5): 2028–2035.
- Milde-Langosch K (2005) The Fos family of transcription factors and their role in tumourigenesis. *European Journal of Cancer*. 41(16): 2449–2461.
- Miller SC, de Saint-Georges L, Bowman BM, Jee WS (1989) Bone lining cells: structure and function. *Scanning microscopy*. 3(3): 953–60.
- Moalli MR, Caldwell NJ, Patil P V, Goldstein SA (2000) An in vivo model for investigations of mechanical signal transduction in trabecular bone. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*. 15(7): 1346–53.
- Morello D, Moore G, Salmon AM, Yaniv M, Babinet C (1986) Studies on the expression of an H-2K/human growth hormone fusion gene in giant transgenic mice. *The EMBO Journal*. 5(8): 1877–1883.
- Morgan JI, Cohen DR, Hempstead JL, Curran T (1987) Mapping patterns of c-fos expression in the central nervous system after seizure. *Science (New York, N.Y.)*. 237(4811): 192–7.
- Müller R, Slamon DJ, Tremblay JM, Cline MJ, Verma IM (1982) Differential expression of cellular oncogenes during pre- and postnatal development of the mouse. *Nature*. 299(5884): 640–644.
- Müller R, Curran T, Müller D, Guilbert L (1985) Induction of c-fos during myelomonocytic differentiation and macrophage proliferation. *Nature*. 314(6011): 546–548.
- Nakashima T, Hayashi M, Fukunaga T, Kurata K, Oh-hora M, Feng JQ, Bonewald LF, Kodama T, Wutz A, Wagner EF, et al. (2011) Evidence for osteocyte regulation of

- bone homeostasis through RANKL expression. *Nature Medicine*. 17(10): 1231–1234.
- Okamoto A, Ohnishi T, Bandow K, Kakimoto K, Chiba N, Maeda A, Fukunaga T, Miyawaki S, Matsuguchi T (2009) Reduction of orthodontic tooth movement by experimentally induced periodontal inflammation in mice. *European Journal of Oral Sciences*. 117(3): 238–247.
- Pal A, Chen L, Yang L, Yang F, Meng B, Jheon AH, Ho SP (2017) Micro-anatomical responses in periodontal complexes of mice to calibrated orthodontic forces on the crown. *Orthodontics and Craniofacial Research*. 20(March): 100–105.
- Pavalko FM, Chen NX, Turner CH, Burr DB, Atkinson S, Hsieh YF, Qiu J, Duncan RL (1998) Fluid shear-induced mechanical signaling in MC3T3-E1 osteoblasts requires cytoskeleton-integrin interactions. *The American journal of physiology*. 275(6): C1591-601.
- Pender N, McCulloch CA (1991) Quantitation of actin polymerization in two human fibroblast sub-types responding to mechanical stretching. *Journal of Cell Science*. 100(1): 187–193.
- Peterková R, Peterka M, Vonesch JL, Ruch J V (1995) Contribution of 3-D computer-assisted reconstructions to the study of the initial steps of mouse odontogenesis. *The International journal of developmental biology*. 39(1): 239–47.
- Picton DCA (1988) Distribution of Collagen Fibres in the Periodontal Ligament and Their Role in Tooth Support. In: *Periodontology Today*. S. Karger AG, 24–31.
- Pilon JJGM, Kuijpers-Jagtman AM, Maltha JC (1996) Magnitude of orthodontic forces and rate of bodily tooth movement. An experimental study. *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics*. 110(1): 16–23.
- Prajapati RT, Chavally-Mis B, Herbage D, Eastwood M, Brown RA (2000) Mechanical loading regulates protease production by fibroblasts in three-dimensional collagen substrates. *Wound Repair and Regeneration*. 8(3): 226–237.
- Proffit WR, Fields HW, Larson BE, Sarver DM (2019) *Contemporary Orthodontics*. Sixth Edit. Elsevier, Philadelphia.
- Radlanski RJ (2011) *Orale Struktur- und Entwicklungsbiologie*. 1. Auflage. Quintessenz Verlag, Berlin.

- Rauscher FJ, Voulalas PJ, Franza BR, Curran T (1988) Fos and Jun bind cooperatively to the AP-1 site: reconstitution in vitro. *Genes & development*. 2(12 B): 1687–1699.
- Reitan K (1967) Clinical and histologic observations on tooth movement during and after orthodontic treatment. *American journal of orthodontics*. 53(10): 721–745.
- Ren Y, Hazemeijer H, de Haan B, Qu N, de Vos P (2007) Cytokine Profiles in Crevicular Fluid During Orthodontic Tooth Movement of Short and Long Durations. *Journal of Periodontology*. 78(3): 453–458.
- Rüther U, Garber C, Komitowski D, Müller R, Wagner EF (1987) Deregulated c-fos expression interferes with normal bone development in transgenic mice. *Nature*. 325(6103): 412–416.
- Rüther U, Komitowski D, Schubert FR, Wagner EF (1989) c-fos expression induces bone tumors in transgenic mice. *Oncogene*. 4(7): 861–5.
- Rygh P (1976) Ultrastructural changes in tension zones of rat molar periodontium incident to orthodontic tooth movement. *American Journal of Orthodontics*. 70(3): 269–281.
- Saitoh S, Takahashi I, Mizoguchi I, Sasano Y, Kagayama M, Mitani H (2000) Compressive force promotes chondrogenic differentiation and hypertrophy in midpalatal suture cartilage in growing rats. *The Anatomical Record*. 260(4): 392–401.
- Sandberg M, Vuorio T, Hirvonen H, Alitalo K, Vuorio E (1988) Enhanced expression of TGF-beta and c-fos mRNAs in the growth plates of developing human long bones. *Development*. 102(3): 461–470.
- Schiebler TH, Korf H-W (2007) *Anatomie*. 10. Auflage. Steinkopff-Verlag, Heidelberg.
- Schuurs A (2013) *Pathology of the Hard Dental Tissues*. 1. Auflage. Wiley-Blackwell, Amsterdam.
- Schwarz AM (1932) Tissue changes incidental to orthodontic tooth movement. *International Journal of Orthodontia, Oral Surgery and Radiography*. 18(4): 331–352.
- Sen S, Diercke K, Zingler S, Lux CJ, Erber R (2015) Compression induces Ephrin-A2 in PDL fibroblasts via c-fos. *Journal of Dental Research*. 94(3): 464–472.

- Simonet W., Lacey D., Dunstan C., Kelley M, Chang M-S, Lüthy R, Nguyen H., Wooden S, Bennett L, Boone T, et al. (1997) Osteoprotegerin: A Novel Secreted Protein Involved in the Regulation of Bone Density. *Cell*. 89(2): 309–319.
- Sims MR (1980) Angular changes in collagen cemental attachment during tooth movement. *Journal of Periodontal Research*. 15(6): 638–645.
- Sodek J (1977) A comparison of the rates of synthesis and turnover of collagen and non-collagen proteins in adult rat periodontal tissues and skin using a microassay. *Archives of Oral Biology*. 22(12): 655–665.
- van Straaten F, Müller R, Curran T, Van Beveren C, Verma IM (1983) Complete nucleotide sequence of a human c-onc gene: deduced amino acid sequence of the human c-fos protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 80(11): 3183–7.
- Taddei SR de A, Moura AP, Andrade I, Garlet GP, Garlet TP, Teixeira MM, da Silva TA (2012) Experimental model of tooth movement in mice: A standardized protocol for studying bone remodeling under compression and tensile strains. *Journal of Biomechanics*. 45(16): 2729–2735.
- Taddei SR de A, Queiroz-Junior CM, Moura AP, Andrade I, Garlet GP, Proudfoot AEI, Teixeira MM, da Silva TA (2013) The effect of CCL3 and CCR1 in bone remodeling induced by mechanical loading during orthodontic tooth movement in mice. *Bone*. 52(1): 259–67.
- Takano-Yamamoto T, Takemura T, Kitamura Y, Nomura S (1994) Site-specific expression of mRNAs for osteonectin, osteocalcin, and osteopontin revealed by in situ hybridization in rat periodontal ligament during physiological tooth movement. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. 42(7): 885–896.
- Takayanagi H, Kim S, Matsuo K, Suzuki H, Suzuki T, Sato K, Yokochi T, Oda H, Nakamura K, Ida N, et al. (2002) RANKL maintains bone homeostasis through c-fos-dependent induction of interferon- β . *Nature*. 416(6882): 744–749.
- Teitelbaum SL (2000) Bone resorption by osteoclasts. *Science (New York, N.Y.)*. 289(5484): 1504–8.
- De Togni P, Niman H, Raymond V, Sawchenko P, Verma IM (1988) Detection of fos protein during osteogenesis by monoclonal antibodies. *Molecular and cellular*

biology. 8(5): 2251–6.

- Udagawa N, Takahashi N, Akatsu T, Tanaka H, Sasaki T, Nishihara T, Koga T, Martin TJ, Suda T (1990) Origin of osteoclasts: mature monocytes and macrophages are capable of differentiating into osteoclasts under a suitable microenvironment prepared by bone marrow-derived stromal cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 87(18): 7260–4.
- Väänänen K, Zhao H (2002) Osteoclast Function: Biology and Mechanisms. In: *Principles of Bone Biology*. JP Bilezikian, LG Raisz, und GA Rodan (Hrsg). 1. Auflage, Band 1, Academic Press, London, 127–139.
- Vahle JL, Ma YL, Burr DB (2015) Skeletal Assessments in the Nonhuman Primate. In: *The Nonhuman Primate in Nonclinical Drug Development and Safety Assessment*. J Bluemel, S Korte, E Schenk, und GF Weinbauer (Hrsg). Academic Press, Cambridge, 605–625.
- Wagner E (2002) Functions of AP1 (Fos/Jun) in bone development. *Ann Rheum Dis*. 61(90002): 40ii – 42.
- Wagner EF, Matsuo K (2003) Signalling in osteoclasts and the role of Fos/AP1 proteins. In: *Annals of the Rheumatic Diseases*. Band 62, BMJ Publishing Group Ltd, 83–85.
- Wang Z-Q, Ovitt C, Grigoriadis AE, Möhle-Steinlein U, Rütther U, Wagner EF (1992) Bone and haematopoietic defects in mice lacking c-fos. *Nature*. 360(6406): 741–745.
- Wang ZQ, Liang J, Schellander K, Wagner EF, Grigoriadis AE (1995) c-fos-induced osteosarcoma formation in transgenic mice: cooperativity with c-jun and the role of endogenous c-fos. *Cancer research*. 55(24): 6244–51.
- Westbroek I, Ajubi NE, Alblas MJ, Semeins CM, Klein-Nulend J, Burger EH, Nijweide PJ (2000) Differential Stimulation of Prostaglandin G/H Synthase-2 in Osteocytes and Other Osteogenic Cells by Pulsating Fluid Flow. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 268(2): 414–419.
- Whittaker P, Kloner RA, Boughner DR, Pickering JG (1994) Quantitative assessment of myocardial collagen with picosirius red staining and circularly polarized light. *Basic Research in Cardiology*. 89(5): 397–410.

- Xiong J, Onal M, Jilka RL, Weinstein RS, Manolagas SC, O'Brien CA (2011) Matrix-embedded cells control osteoclast formation. *Nature Medicine*. 17(10): 1235–1241.
- Yabumoto T, Miyazawa K, Tabuchi M, Shoji S, Tanaka M, Kadota M, Yoshizako M, Kawatani M, Osada H, Maeda H, et al. (2013) Stabilization of tooth movement by administration of reveromycin A to osteoprotegerin-deficient knockout mice. *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics*. 144(3): 368–380.
- Yang C-M, Chien C-S, Yao C-C, Hsiao L-D, Huang Y-C, Wu CB (2004) Mechanical strain induces collagenase-3 (MMP-13) expression in MC3T3-E1 osteoblastic cells. *The Journal of biological chemistry*. 279(21): 22158–65.
- Yee JA, Kimmel DB, Jee WSS (1976) Periodontal ligament cell kinetics following orthodontic tooth movement. *Cell Proliferation*. 9(3): 293–302.
- Yoshimatsu M, Shibata Y, Kitaura H, Chang X, Moriishi T, Hashimoto F, Yoshida N, Yamaguchi A (2005) 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*. 24(1): 20–27.

10 Danksagung

Zu guter Letzt möchte ich an dieser Stelle meinen Dank äußern. Er gilt all denjenigen, die mich bei dieser Arbeit begleitet, unterstützt und animiert haben:

Zuerst danke ich meinem Doktorvater Prof. Dr. Michael Amling, der mich bereits vor Antritt der Arbeit auf Herz und Nieren prüfte und den nötigen Ehrgeiz zu wecken wusste.

PD Dr. Dr. Till Köhne gilt mein Dank für die Ausarbeitung dieses spannenden Themas, den Freiraum in der Planung, Konstruktion und Umsetzung der notwendigen Apparaturen und vor allem seine Geduld und Unterstützung; darüber hinaus für die Animation mich weiter mit dem Thema „Forschung“ auseinanderzusetzen und das Ebnen der vielen Wege.

Dr. Jean-Pierre David danke ich für die herzliche Aufnahme in die Arbeitsgruppe. Außerdem für die Expertise und die richtigen Anstöße zur richtigen Zeit, aber vor allem der Offenheit gegenüber den zahnmedizinischen Interessen.

Prof. Dr. Thorsten Schinke bin ich ebenfalls dankbar für die erfrischend unkomplizierte Aufnahme in die Arbeitsgruppe und für die Denkanstöße sowie Ratschläge im Lab-Meeting.

Ein ganz großes „Danke“ richte ich an das gesamte Team des IOBM, aber vor allem Anke, Timur, Julia, Mona, Nele, Stephanie, Olga, Elke und Michael für die tolle Unterstützung und Hilfe, Geduld, guten Ratschläge, netten und witzigen Gespräche und die entspannte, produktive Atmosphäre.

Zuletzt möchte ich natürlich auch meiner Familie für den steten Rückhalt und die Unterstützung danken, besonders meinem Großvater für die notwendige Maschinerie.

Vielen Dank!

11 Lebenslauf

Der Lebenslauf entfällt aus datenschutzrechtlichen Gründen.

12 Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Unterschrift: