

Contribution of Orthodontic Load to Inflammation-mediated Periodontal Destruction

Beteiligung von kieferorthopädischer Belastung an der entzündungsvermittelten Destruktion des Parodontiums

Marjan Nokhbehsaim^{1,2}, Birgit Deschner^{1,3}, Jochen Winter², Susanne Reimann⁴, Christoph Bourauel^{1,4}, Søren Jepsen^{1,2}, Andreas Jäger^{1,3}, James Deschner^{1,2}

Abstract

Aim: Orthodontic malpractice as well as hyperocclusal forces can aggravate periodontitis-induced destruction of tooth-supporting tissues, but the underlying mechanisms for the co-destructive effect of biomechanical loading are yet to be elucidated. This in-vitro study was performed to investigate whether biomechanical forces modulate the response of periodontal ligament (PDL) cells to inflammation.

Materials and Methods: PDL cells (from six donors) grown on BioFlex® plates were treated with interleukin (IL) 1 β , which is increased at inflamed periodontal sites, and/or subjected to cyclic tensile strain (CTS) of low (3%) and high (20%) magnitudes for 1 and 6 d. The synthesis of proinflammatory mediators (IL1 β , IL8, COX2), growth factors (IGF1, VEGF, TGF β 1), collagen type 1 (COL1) and osteogenic proteins (ALP, RUNX2) was analyzed by real-time PCR and ELISA. The wound fill rate was examined in an in-vitro wound healing assay. For statistical analyses, Student's t-test and ANOVA were applied ($p < 0.05$).

Results: In general, the IL1 β -induced expression of proinflammatory mediators was significantly enhanced by CTS on day 1 and significantly downregulated on day 6. CTS of high magnitude significantly inhibited the IGF1 synthesis but significantly upregulated VEGF under normal and inflammatory conditions. In general, CTS also downregulated the IL1 β -induced COL1, ALP, and RUNX2 expression. From day 5 on, the lowest wound fill rate was observed in cells which were simultaneously exposed to inflammatory and biomechanical signals.

Conclusion: These findings suggest that orthodontic and occlusal loading may contribute to periodontal destruction in peri-

Zusammenfassung

Hintergrund und Ziel: Unsachgemäß durchgeführte kieferorthopädische Zahnbewegungen wie auch okklusale Überbelastungen können eine parodontitisinduzierte Destruktion des Parodontiums verstärken. Die zugrunde liegenden Mechanismen für den destruktionsverstärkenden Effekt der biomechanischen Belastung sind jedoch noch ungeklärt. In dieser In-vitro-Studie sollte untersucht werden, ob biomechanische Kräfte die Reaktion von parodontalen Ligament-(PDL-)Zellen auf Entzündungsreize modulieren.

Material und Methodik: Auf BioFlex®-Platten kultivierte PDL-Zellen von sechs Patienten wurden mit Interleukin (IL) 1 β , das an entzündeten parodontalen Stellen erhöht ist, inkubiert und/oder einer zyklischen Zugbelastung (CTS) niedriger (3%) und hoher (20%) Stärke für 1 und 6 Tage ausgesetzt. Die Synthese von proinflammatorischen Mediatoren (IL1 β , IL8, COX2), Wachstumsfaktoren (IGF1, VEGF, TGF β 1), Kollagen Typ 1 (COL1) und osteogenen Proteinen (ALP, RUNX2) wurde mittels Real-Time-PCR und ELISA analysiert. Die Rate der Wundauauffüllung wurde mit einem In-vitro-Wundheilungsassay untersucht. Für die statistische Auswertung kamen der Student's t-Test und ANOVA zur Anwendung ($p < 0,05$).

Ergebnisse: Im Allgemeinen wurde die IL1 β -induzierte Expression der proinflammatorischen Mediatoren durch CTS am Tag 1 signifikant verstärkt und am Tag 6 signifikant gehemmt. CTS hoher Stärke reduzierte signifikant die IGF1-Synthese, führte aber zu einer signifikanten Steigerung von VEGF unter normalen und entzündlichen Bedingungen. CTS hemmte im Allgemeinen auch die IL1 β -induzierte Expression von COL1, ALP und RUNX2. Ab dem fünften Tag wurde die geringste Wundheilungsrate in den Kulturen beobachtet, die gleichzeitig entzündlichen und biomechanischen Signalen ausgesetzt waren.

Schlussfolgerung: Diese Ergebnisse legen nahe, dass kieferorthopädische und okklusale Kräfte zur parodontalen Destruktion durch Herunterregulation extrazellulärer Matrixproteine und osteogener

¹Clinical Research Unit 208,

²Department of Periodontology, Operative and Preventive Dentistry,

³Department of Orthodontics,

⁴Oral Technology, Center of Dento-Maxillo-Facial Medicine, University of Bonn, Germany.

Received: August 18, 2010; accepted: October 8, 2010

J Orofac Orthop 2010;71:390–402

DOI 10.1007/s00056-010-1031-7

odontally-diseased patients through downregulation of matrix and osteogenic proteins but not via augmentation of periodontal inflammation.

Key Words: Orthodontic load · Biomechanical forces · Inflammation · Periodontitis · Periodontium · PDL cells · Cytokines

Introduction

Since the number of elderly people is rising as is the prevalence of periodontal diseases in many countries, orthodontists are likely to face an increased number of periodontally-diseased patients who seek orthodontic treatment. Although it is known that orthodontic malpractice as well as hyperocclusal forces may aggravate periodontitis-induced destruction of tooth-supporting tissues, the mechanisms behind the co-destructive effect of biomechanical loading are not yet clear [2, 4, 31]. It has been reported that orthodontic appliances may facilitate plaque accumulation and, thereby, promote the transition of the microbial biofilm to a more aggressive periodontopathogenic flora in subgingival periodontal pockets [27, 30]. In addition, clinical studies have demonstrated that levels of cytokines, such as interleukin (IL) 1 β , IL8, and cyclooxygenase (COX) 2, are increased in gingival crevicular fluid in orthodontic patients during active therapy [25]. Although the enhanced production of proinflammatory cytokines may indeed be due to the additional plaque accumulation caused by orthodontic appliances, a number of in-vitro studies point to the fact that these molecules can also be upregulated by biomechanical forces [28, 32]. Therefore, orthodontic forces in combination with occlusal forces could accelerate periodontal destruction by the enhancement of periodontal inflammation. However, a few in-vitro studies involving different cell types have demonstrated that biomechanical forces also exert anti-inflammatory effects [1, 18, 19]. Interestingly, the relationship between orthodontic treatment and periodontitis seems to be bidirectional because periodontal inflammation may also affect the velocity of orthodontic tooth movement, as it has been suggested in a recent study in mice [20]. In addition to inflammatory mediators, the homeostasis of periodontal tissues is also affected by growth factors, such as insulin-like growth factor (IGF) 1, transforming growth factor (TGF) β 1, and vascular endothelial growth factor (VEGF), which promote cell proliferation, differentiation, migration, and synthesis of extracellular matrix molecules, such as collagen type I (COL1) [6]. Furthermore, osteogenic proteins, such as alkaline phosphatase (ALP) und runt-related transcription factor (RUNX) 2 di-

Differenzierungsmarker, jedoch nicht durch Verstärkung der parodontalen Entzündung bei Parodontitispatienten beitragen könnten.

Schlüsselwörter: Kieferorthopädische Belastung · Biomechanische Kräfte · Entzündung · Parodontitis · Parodont · PDL-Zellen · Zytokine

Einleitung

Mit der steigenden Zahl älterer Menschen nimmt in vielen Ländern auch die Prävalenz parodontaler Erkrankungen zu. Kieferorthopäden sehen sich einer immer größeren Zahl von parodontal erkrankten Patienten gegenüber, die eine kieferorthopädische Behandlung wünschen. Obwohl bekannt ist, dass unsachgemäß durchgeführte kieferorthopädische Zahnbewegungen und starke okklusale Kräfte einen durch Parodontitis induzierten Abbau des Zahnhalteapparates verstärken können, so ist nicht klar, durch welche Mechanismen der zusätzliche destruktive Effekt der biomechanischen Belastung zustande kommt [2, 4, 31]. Es wurde berichtet, dass kieferorthopädische Geräte die Plaqueakkumulation begünstigen und dadurch die Umwandlung des mikrobiellen Biofilms in eine aggressivere, parodontalpathogene Flora in den subgingivalen parodontalen Taschen fördern können [27, 30]. Außerdem haben klinische Studien gezeigt, dass die Konzentration von Entzündungsmolekülen, wie z.B. Interleukin (IL) 1 β , IL8 und Cyclooxygenase (COX) 2 in der gingivalen Sulkusflüssigkeit bei kieferorthopädischen Patienten während der aktiven Therapie erhöht ist [25]. Obwohl die verstärkte Synthese proinflammatorischer Zytokine tatsächlich die Folge einer verstärkten Plaqueakkumulation durch kieferorthopädische Geräte sein könnte, so deuten doch zahlreiche In-vitro-Studien darauf hin, dass die Synthese von Entzündungsmolekülen auch durch biomechanische Kräfte induziert werden kann [28, 32]. Somit könnten kieferorthopädische Kräfte in Verbindung mit okklusalen Belastungen den Abbau des Parodonts durch eine Verstärkung der parodontalen Entzündung beschleunigen. Einige In-vitro-Untersuchungen an verschiedenen Zelltypen haben gezeigt, dass biomechanische Kräfte auch antiinflammatorische Effekte ausüben [1, 18, 19]. Interessanterweise scheint die Beziehung zwischen kieferorthopädischer Zahnbewegung und Parodontitis bidirektional zu sein, da eine Parodontitis auch die Geschwindigkeit der kieferorthopädischen Zahnbewegung beeinflussen kann, wie eine kürzlich veröffentlichte Studie an Mäusen nahelegt [20]. Neben Entzündungsmediatoren wird die Homöostase des Parodonts auch durch Wachstumsfaktoren wie z.B. dem insulinähnlichen Wachstumsfaktor (IGF) 1,

rect formation of the mineralized component of the periodontium [3, 15, 29]. All these factors are critical to normal periodontal homeostasis and their imbalance due to biomechanical load and/or inflammation causes fundamental changes in the periodontium. However, little is known about how orthodontic or occlusal load and inflammation co-regulate these molecules. A better understanding of the complex interactions between inflammatory and biomechanical signals may help optimize current applied orthodontic and periodontal treatment approaches and prevent destruction of periodontal tissues. Therefore, this in-vitro study was performed to analyze whether biomechanical forces affect the response of PDL cells to inflammatory signals.

Materials and Methods

Cell Culture

PDL cells were derived from six donors who had to undergo orthodontic treatment involving the extraction of teeth. Approval of the Ethics Committee of the University of Bonn and informed parental consent were obtained. Cells were harvested from the middle third of the tooth roots, cultured in Dulbecco's minimal essential medium (DMEM, Invitrogen, Karlsruhe, Germany) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS, Invitrogen), 100 units penicillin and 100 µg/ml streptomycin (Biochrom®, Berlin, Germany) at 37 °C in a humidified atmosphere of 5% CO₂, seeded between passages 3 and 5 (50,000 cells/well) on BioFlex® collagen-coated culture plates (Flexcell® International, Hillsborough, NC, USA), and grown to 80% confluence. The FBS concentration was reduced to 1% 24 hours prior to experiments. IL1β (1 ng/ml; Calbiochem, San Diego, CA, USA), which is increased at inflamed periodontal sites, was used to simulate an inflammatory environment in vitro [13, 21].

Application of Dynamic Tensile Strain

Cells were subjected to equibiaxial cyclic tensile strain of low (CTSL, 3%) and high (CTSH, 20%) magnitudes at a rate of 0.05 Hz in the presence and absence of IL1β by using a strain device (CESTRA) developed at the University of Bonn. The strain magnitudes applied in the present study have also been used by other investigators [1]. The strain device consisted of a loading platform and a moving table mounted on a translation stage (Physik Instrumente, Karlsruhe, Germany) equipped with a stepping motor (Figure 1). The stretch apparatus was linked via an autonomous stepping motor controller (Physik Instrumente) to a control computer. Specialized software running on the Labview platform (National Instruments, Austin, TX, USA) was designed to drive the apparatus and to program different strain regimens. The loading platform comprised cylindrical posts. BioFlex® plates were placed in such a way that the posts were centered beneath the flexible-bottom wells of the plates. The starting position of the apparatus was adjusted by controlled incremental down-movement of the translation stage until the

dem transformierenden Wachstumsfaktor (TGF) β1 und dem vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor (VEGF) reguliert, welche die Zellproliferation, -differenzierung und -migration sowie die Synthese von Matrixmolekülen wie z.B. Kollagen Typ 1 (COL1) fördern [6]. Des Weiteren steuern osteogene Proteine wie die alkalische Phosphatase (ALP) und der Transkriptionsfaktor RUNX2 die Bildung der mineralisierten Bestandteile des Parodonts [3, 15, 29]. All diese Faktoren sind entscheidend für die normale Homöostase der parodontalen Gewebe, und ein durch biomechanische Kräfte und/oder Entzündungen entstehendes Ungleichgewicht dieser Faktoren führt zu grundlegenden Veränderungen im Parodont. Noch weitgehend unbekannt ist jedoch, inwiefern biomechanische Kräfte und entzündliche Prozesse bezüglich der Synthese dieser Moleküle interagieren. Ein besseres Verständnis der komplexen Wechselwirkungen zwischen proinflammatorischen und biomechanischen Signalen könnte helfen, die aktuellen kieferorthopädischen und parodontalen Behandlungsverfahren zu verbessern und den ungewollten Abbau parodontaler Gewebe zu verhindern. Diese In-vitro-Studie wurde durchgeführt, um zu untersuchen, ob biomechanische Kräfte die Reaktion von PDL-Zellen auf inflammatorische Signale beeinflussen.

Material und Methodik

Zellkultur

Die PDL-Zellen wurden von sechs Spendern gewonnen, bei denen im Rahmen einer kieferorthopädischen Behandlung Zahnextraktionen erforderlich waren. Eine Genehmigung der Ethikkommission der Universität Bonn und die Einverständniserklärung der Eltern wurden eingeholt. Die Zellen wurden von dem mittleren Drittel der Zahnwurzeln entnommen, in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland), ergänzt mit 10% fötalen bovines Serums (FBS, Invitrogen), 100 Einheiten Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin (Biochrom®, Berlin, Deutschland), bei 37 °C in einer feuchten Atmosphäre mit 5% CO₂ kultiviert, zwischen der dritten und fünften Passage (50000 Zellen pro Well) auf kollagenbeschichteten BioFlex®-Kulturplatten (Flexcell® International, Hillsborough, NC, USA) ausgesät und bis zu einer Konfluenz von 80% weiterkultiviert. Die FBS-Konzentration wurde 24 Stunden vor Beginn der Experimente auf 1% gesenkt. IL1β (1 ng/ml; Calbiochem, San Diego, CA, USA), das an entzündeten parodontalen Stellen in erhöhter Konzentration auftritt, wurde verwendet, um entzündliche Bedingungen in vitro zu simulieren [13, 21].

Applikation von dynamischer Zugspannung

Die Zellen wurden geringen (CTSL, 3%) und hohen (CTSH, 20%) äquibiaxialen, zyklischen Dehnungen mit einer Frequenz von 0,05 Hz, in An- und Abwesenheit von IL1β, mittels einer an der Universität Bonn entwickelten Zelldehnungsapparatur (CESTRA) ausgesetzt. Die in dieser Studie



Figure 1. Strain devices used to apply cyclic tensile strain to PDL cells in an incubator.

Abbildung 1. Vorrichtung zur Applikation von zyklischer Zugspannung auf PDL-Zellen im Inkubator.

flexible bottom of each well touched the post surface. This contact point was indicated via sensors. By further downward movement of the moving table of the stretch apparatus, the flexible bottom of each well and, thereby, the cells grown on it were stretched. Depending on the amount of displacement of the moving table, cells were stretched at different magnitudes according to the predefined parameter set of the control software. In previous studies, this system had already been used for the application of static strain [7, 8, 23].

Real-time PCR

RNA was extracted using an RNA extraction kit (Qiagen, Hilden, Germany) and reverse transcribed with the iScript™ Select cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad, Munich, Germany) at 42 °C for 80 min followed by 85 °C for 5 min. Expression of IL1 β , IL8, COX2, IGF1, VEGF, TGF β 1, COL1, ALP, RUNX2, and GAPDH mRNA was analyzed by real-time PCR using the iCycler iQ detection system (Bio-Rad), SYBR Green (Bio-Rad), and specific primers (QuantiTect Primer Assay, Qiagen). One μ l of cDNA was amplified as a

verwendeten Zugspannungen wurden auch von anderen Forschern eingesetzt [1]. Die Zelldehnungsapparatur bestand aus einer Grundplatte und einem beweglichen Rahmen, der auf einen Linearsteltisch (Physik Instrumente, Karlsruhe, Deutschland) montiert und mit einem Schrittmotor verbunden war (Abbildung 1). Die Dehnvorrichtung war über eine unabhängige Schrittmotorsteuerung (Physik Instrumente) mit einem Kontrollcomputer verbunden. Dazu wurde eine spezielle Software entwickelt, die auf einer Labview-Plattform (National Instruments, Austin, TX, USA) ausgeführt wurde, um die Apparatur zu betreiben und verschiedene Dehnungsschemata zu programmieren. Die Grundplatte umfasste zylindrische Stempel. Die BioFlex®-Platten wurden so eingesetzt, dass sich die Stempel mittig unter den mit einem flexiblen Boden ausgestatteten Wells der Zellkulturplatte befanden. Die Ausgangsposition der Apparatur wurde durch eine kontrollierte, schrittweise Abwärtsbewegung des Verschiebetisches eingestellt, bis der flexible Boden der Wells die Oberfläche der Stempel berührte. Dieser Punkt wurde durch Sensoren angezeigt. Bei einer weiteren Abwärtsbewegung des verschiebbaren Tisches der Dehnungsvorrichtung wurden der flexible kollagenbeschichtete Boden der Wells und dadurch die auf dem Boden befindlichen Zellen gedehnt. Je nachdem, wie stark der bewegliche Rahmen abwärts bewegt wurde, erfuhren auch die Zellen, entsprechend dem vorab in der Kontrollsoftware definierten Parametern, eine unterschiedlich starke Dehnung. In früheren Studien wurde ein äquivalentes System bereits für die Ausübung statischer Spannungen verwendet [7, 8, 23].

Real-Time PCR

Die RNA wurde mithilfe eines RNA-Extraktionskits (Qiagen, Hilden, Deutschland) extrahiert und mittels iScript™ Select cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad, München, Deutschland) für 80 min bei 42 °C und anschließend für 5 min bei 85 °C revers transkribiert. Die Expression von IL1 β , IL8, COX2, IGF1, VEGF, TGF β 1, COL1, ALP, RUNX2 und GAPDH mRNA wurde mittels Real-time PCR unter Benutzung von einem iCycler iQ Detection System (Bio-Rad), SYBR Green (Bio-Rad) und spezifischen Primern (QuantiTect Primer Assay, Qiagen) analysiert. 1 μ l cDNA wurde als Template in einem 25- μ l-Reaktionsgemisch mit 12,5 μ l 2 \times QuantiFast SYBR Green PCR Master Mix (Bio-Rad), 2,5 μ l Primern und entionisiertem Wasser amplifiziert. Das Gemisch wurde zuerst für 5 min bei 95 °C erhitzt, gefolgt von 40 Zyklen mit Denaturierung bei 95 °C für 10 s und einem kombinierten Annealing/Extension-Schritt bei 60 °C für 30 s. Die Daten wurden mittels komparativer CT-Methode (Schwellenwertzyklus) analysiert [17].

ELISA

Die Konzentration von IL8 und VEGF in den Zellkulturüberständen wurde mithilfe der im Handel erhältlichen Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) Kits (RayBio-

template in a 25 µl reaction mixture containing 12.5 µl 2× QuantiFast SYBR Green PCR Master Mix (Bio-Rad), 2.5 µl of primers, and deionized water. The mixture was heated initially at 95 °C for 5 min and then followed by 40 cycles with denaturation at 95 °C for 10 s and combined annealing/extension at 60 °C for 30 s. Data were analyzed by the comparative threshold cycle (CT) method [17].

ELISA

Protein levels of IL8 and VEGF in cell supernatants were analyzed by commercially available enzyme-linked immunoassay (ELISA) kits (RayBiotech, Norcross, GA, USA) according to the manufacturer's instructions. The absorbance was determined with a microplate reader (BioTek Instruments, Winooski, VT, USA) at 450 nm. Data were normalized by the cell number.

In-vitro Wound Fill Assay

The wound fill rate in the presence and absence of biomechanical loading under normal and inflammatory conditions was analyzed by an in-vitro wound healing model, which has been well described and successfully utilized by other investigators [9, 12, 14, 16]. Briefly, 3 mm wide "wounds" were created in confluent PDL cell monolayers with a sterile instrument in a standardized manner. The wounded monolayers were then exposed to IL1β and/or biomechanical loading for 7 days. Untreated cells served as control. Every day, wound gaps, i.e. cell-free areas, were documented and analyzed by inverse microscopy (Carl Zeiss, Göttingen, Germany), digital photography (Kodak, Stuttgart, Germany), and the AlphaDigiDoc® 1000 software (Cell Biosciences, Santa Clara, Canada). Gap widths were related to those determined at baseline in order to calculate the percentage of wound fill for each group and day.

Alkaline Phosphatase Assay

Alkaline phosphatase activity was measured by monitoring the conversion of p-nitrophenyl phosphate (pNPP) to p-nitrophenol following 6 days of treatment according to the method by Sabokbar et al. [26]. Briefly, cells were detached with 1% trypsin/EDTA (PAA Laboratories, Pasching, Austria), and centrifuged at 500 g for 8 min, and lysed with 0.5% Triton X-100 (Sigma, Munich, Germany) in double-distilled water on ice. Cell lysates were frozen and thawed three times to disrupt the cell membranes. 50 µl substrate (2 mg/ml pNPP, Sigma) was added to 100 µl aliquots of each cell lysate. The absorbance at 405 nm using a microplate reader (see above) was recorded after 30 min of incubation at 37 °C.

Statistical Analysis

The SPSS® 17.0 software (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) was used for statistical analysis. For quantitative analysis of the mRNA expression, mean values and standard errors of

tech, Norcross, GA, USA) gemäß den Herstellerangaben analysiert. Die Absorption wurde mittels eines Mikroplatten-Readers (BioTek Instruments, Winooski, VT, USA) bei 450 nm bestimmt. Die Proteinsynthese wurde auf die Zellzahl normiert.

In-vitro-Wundheilungsassay

Die Wundheilungsrate mit und ohne biomechanische Belastung, unter normalen und entzündlichen Bedingungen, wurde mittels eines In-vitro-Wundheilungsmodells analysiert, das von anderen Forschern bereits detailliert beschrieben und erfolgreich angewendet wurde [9, 12, 14, 16]. 3 mm breite „Wunden“ wurden mit einem sterilen Instrument und in standardisierter Art und Weise in konfluenten Monolayern von PDL-Zellen erzeugt. Die verwundeten Monolayer wurden sodann für 7 Tage IL1β und/oder biomechanischer Belastung ausgesetzt. Unbehandelte Zellen dienten als Kontrolle. Die Wundflächen, d.h. die zellfreien Bereiche, wurden täglich dokumentiert und mittels Inversmikroskopie (Carl Zeiss, Göttingen, Deutschland), Digitalfotografie (Kodak, Stuttgart, Deutschland), und der AlphaDigiDoc® 1000 Software (Cell Biosciences, Santa Clara, Kanada) analysiert. Die Größe der Wundfläche wurde mit der zu Beginn festgestellten Wundaussparung verglichen, um den prozentualen Fortschritt der Wundheilung für jede Gruppe und jeden Tag zu berechnen.

Alkalische Phosphatase-Assay

Die alkalische Phosphatase-Aktivität wurde mittels Beurteilung der Umsetzung von p-Nitrophenylphosphat (pNPP) in p-Nitrophenol nach 6-tägiger Behandlung entsprechend der Methode von Sabokbar et al. [26] bestimmt. Die Zellen wurden mit 1% Trypsin/EDTA (PAA Laboratories, Pasching, Österreich) abgelöst, für 8 min bei 500 g zentrifugiert und mit 0,5% Triton X-100 (Sigma, München, Deutschland) in bidestilliertem Wasser auf Eis lysiert. Zum weiteren Zellaufschluss wurden die Zelllysate dreimal eingefroren und aufgetaut. 50 µl Substrat (2 mg/ml pNPP, Sigma) wurden zu 100 µl Aliquoten eines jeden Zelllysats gegeben. Die Absorption bei 405 nm wurde mittels eines Mikroplatten-Readers (siehe oben) nach 30 min Inkubation bei 37 °C analysiert.

Statistische Analyse

Für die statistische Auswertung wurde die Software SPSS® 17.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) verwendet. Zur quantitativen Analyse der mRNA-Expression wurden Mittelwerte und Standardfehler (SEM) berechnet. Für die statistische Analyse wurden Student's t-Test, ANOVA und Post-hoc-Tests (Tukey und Dunnett) angewendet (Signifikanzniveau: $p < 0,05$).

Table 1. Regulation of gene expression of inflammatory mediators in PDL cells by IL1 β and/or biomechanical strain of low (CTSL) or high (CTSH) magnitudes after 1 and 6 days. Mean values \pm SEM were calculated (n = 6/group). *: significantly (p < 0.05) different from control; †: significantly (p < 0.05) different from IL1 β -treated unstretched cells; ‡: significantly (p < 0.05) different from cells which were simultaneously exposed to IL1 β and CTSL.

Tabelle 1. Regulation der Genexpression von Entzündungsmediatoren in PDL-Zellen durch IL1 β und/oder niedrige (CTSL) oder hohe (CTSH) biomechanische Kräfte nach 1 und 6 Tagen. Mittelwerte \pm SEM wurden berechnet (n=6/Gruppe). *: signifikanter Unterschied (p < 0,05) zur Kontrolle; †: signifikanter Unterschied (p < 0,05) zu ungedehnten Zellen, die mit IL1 β behandelt wurden; ‡: signifikanter Unterschied (p < 0,05) zu Zellen, die gleichzeitig IL1 β und CTSL ausgesetzt waren.

Target gene	Group	Gene expression (fold of control)	
		1 day	6 days
IL1 β	IL1 β	45.55 \pm 14.54*	1169.34 \pm 316.22*
	CTSL	12.41 \pm 4.00*	3.47 \pm 1.16
	IL1 β + CTSL	44.45 \pm 11.19*	1269.11 \pm 306.34*
	CTSH	9.09 \pm 2.57*	36.16 \pm 9.10*
	IL1 β + CTSH	133.28 \pm 44.01*†‡	702.12 \pm 161.24*
IL8	IL1 β	92.75 \pm 2.12*	1749.91 \pm 350.18*
	CTSL	4.74 \pm 0.63*	17.48 \pm 2.89*
	IL1 β + CTSL	122.68 \pm 4.81*	1192.65 \pm 119.67*
	CTSH	3.28 \pm 0.32*	7.54 \pm 0.87*
	IL1 β + CTSH	183.23 \pm 31.10*†‡	459.66 \pm 50.67*†‡
COX2	IL1 β	6.26 \pm 0.57*	40.67 \pm 4.70*
	CTSL	1.29 \pm 0.13	1.09 \pm 0.15
	IL1 β + CTSL	3.62 \pm 0.27*†	28.80 \pm 3.17*
	CTSH	1.86 \pm 0.17*	3.32 \pm 0.93*
	IL1 β + CTSH	8.79 \pm 0.25*†‡	18.92 \pm 3.90*†

the mean (SEM) were calculated. For statistical analysis, Student's t-test, ANOVA and post-hoc tests (Tukey and Dunnett) were applied (significance level: p<0.05).

Results

Regulation of Inflammatory Mediators by Biomechanical Loading and IL1 β

On day 1, the expression of IL1 β was significantly upregulated by IL1 β itself, CTSL, and CTSH (Table 1). The highest IL1 β levels were observed in cells, which were simultaneously exposed to IL1 β and CTSH. The IL1 β expression in IL1 β -treated cells subjected to CTSH was significantly different from all other groups. On day 6, IL1 β was again significantly upregulated by IL1 β and biomechanical loading. Although the IL1 β -induced upregulation of its own expression was reduced by CTSH, the inhibitory effect was not significant (Table 1).

Similarly to IL1 β , IL8 levels were significantly increased by IL1 β , CTSL, and CTSH, and the IL1 β -stimulated IL8 expression was further upregulated by biomechanical loading in a magnitude-dependent manner on day 1 (Table 1). The stimulatory effect of IL1 β , CTSL and CTSH on the IL8 syn-

Table 2. Protein synthesis of IL8 and VEGF in PDL cells exposed to IL1 β and/or biomechanical strain of low (CTSL) or high (CTSH) magnitudes after 1 day. Mean values \pm SEM were calculated (n=6/group). *: significantly (p<0.05) different from control.

Tabelle 2. Proteinsynthese von IL8 und VEGF in PDL-Zellen, die IL1 β und/oder niedrigen (CTSL) oder hohen (CTSH) biomechanischen Kräften ausgesetzt waren, nach 1 Tag. Mittelwerte \pm SEM wurden berechnet (n=6/Gruppe). *: signifikanter Unterschied (p<0,05) zur Kontrolle.

Group	IL8 (pg/10 ⁵ cells)	VEGF (pg/10 ⁵ cells)
Control	34.08 \pm 0.14	3346.52 \pm 110.08
IL1 β	5342.34 \pm 18.20*	758.82 \pm 40.66*
CTSL	394.16 \pm 0.69*	431.81 \pm 126.24*
IL1 β + CTSL	5129.71 \pm 4.31*	591.29 \pm 109.58*
CTSH	109.47 \pm 0.67*	4669.43 \pm 100.12*
IL1 + CTSH	6178.60 \pm 7.92*	4242.79 \pm 83.68*

Ergebnisse

Regulation von Entzündungsmediatoren durch biomechanische Belastung und IL1 β

Am Tag 1 war die IL1 β -Expression signifikant durch IL1 β selbst, CTSL und CTSH erhöht (Tabelle 1). Die höchsten IL1 β -Werte wurden in Zellen beobachtet, die gleichzeitig IL1 β und CTSH ausgesetzt waren. Die IL1 β -Expression in Zellen, die gleichzeitig mit IL1 β und CTSH behandelt worden waren, unterschied sich signifikant von allen anderen Gruppen. Am Tag 6 war IL1 β erneut signifikant durch IL1 β und biomechanische Belastung erhöht. Obwohl die IL1 β -induzierte Autostimulation durch CTSH verringert wurde, war der inhibitorische Effekt nicht signifikant (Tabelle 1).

Ähnlich wie bei IL1 β wurde IL8 durch IL1 β , CTSL und CTSH signifikant erhöht und die IL1 β -stimulierte IL8-Expression wurde durch biomechanische Belastung in Abhängigkeit von der Dehnungsgröße am Tag 1 weiter hochreguliert (Tabelle 1). Der stimulierende Effekt von IL1 β , CTSL und CTSH auf die IL8-Synthese wurde auch auf Proteinebene mittels ELISA bestätigt. Die höchste IL8-Proteinproduktion wurde beobachtet, wenn Zellen gleichzeitig IL1 β und CTSH ausgesetzt waren (Tabelle 2). Obwohl IL8 auch am Tag 6 durch IL1 β , CTSL und CTSH gesteigert wurde, war die IL1 β -induzierte IL8-Expression durch biomechanische Belastung gehemmt. Zellen, die gleichzeitig IL1 β und CTSH unterworfen waren, exprimierten signifikant weniger IL8 als IL1 β -behandelte Zellen in An- und Abwesenheit von CTSL (Tabelle 1).

Am Tag 1 bewirkte IL1 β auch eine signifikante Hochregulation von COX2, wohingegen der stimulierende Effekt der biomechanischen Belastung nur gering war und sich für CTSH deutlicher zeigte als für CTSL. Interessanterweise wurde die durch IL1 β hochregulierte COX2-mRNA-Expression durch CTSL signifikant reduziert, aber durch CTSH signifikant erhöht (Tabelle 1). Am Tag 6 wurde COX2 durch IL1 β signifikant stimuliert, jedoch durch CTSL nicht und durch CTSH nur

thesis was also confirmed at protein level by ELISA. The highest IL8 protein production was observed when cells were simultaneously subjected to IL1 β and CTSH (Table 2). Although IL8 was also increased by IL1 β , CTSL, and CTSH on day 6, the IL1 β -induced IL8 expression was inhibited by biomechanical loading. Cells, which were simultaneously exposed to IL1 β and CTSH, expressed significantly lower IL8 levels than IL1 β -treated cells in the presence and absence of CTSL (Table 1).

On day 1, IL1 β also caused a significant upregulation of COX2, whereas the stimulatory effect of biomechanical loading was only slight and more pronounced for CTSH, as compared to CTSL. Interestingly, the IL1 β -upregulated COX2 mRNA expression was significantly reduced by CTSL but significantly increased by CTSH (Table 1). On day 6, COX2 was significantly stimulated by IL1 β but not affected by CTSL and only slightly induced by CTSH. Similarly to IL8, the IL1 β -induced COX2 expression was downregulated by biomechanical loading in a magnitude-dependent manner (Table 1).

Taken together, these data show that IL1 β and biomechanical loading can enhance the constitutive expression of proinflammatory mediators. When applied only for a short time, high but not low forces seem to contribute to inflammation. However, in the long-term even high biomechanical forces seem to exert anti-inflammatory effects by downregulation of the expression of inflammatory mediators.

Effect of Biomechanical Loading and Inflammation on Regulation of Growth Factors

On day 1, the expression of IGF1 was significantly reduced by biomechanical loading in a magnitude-dependent manner but not regulated by IL1 β (Table 3). CTSH also downregulated the IGF1 expression under inflammatory conditions, whereas CTSL had no such effect on IL1 β -treated cells (Table 3). Following 6 days of IL1 β -incubation, the IGF1 expression was significantly increased, as compared to the control. While CTSL and CTSH significantly reduced the constitutive expression of IGF1, only CTSH inhibited the IL1 β -induced upregulation of IGF1 (Table 3).

After 1 day, the expression of VEGF was slightly but not significantly reduced by IL1 β and/or CTSL. However, when cells were subjected to CTSH in the presence and absence of IL1 β , VEGF was significantly upregulated as compared to the control (Table 3). The inhibitory effect of IL1 β and/or CTSL on the VEGF synthesis was also observed at the protein level. In accordance with our findings at transcriptional level, the highest VEGF protein production was found in cells, which were subjected to CTSH, either alone or in combination with IL1 β (Table 2). Exposure of cells to IL1 β in the presence and absence of biomechanical loading for 6 days also significantly increased the levels of VEGF. Furthermore, the VEGF expression was significantly augmented by CTSH alone (Table 3).

Table 3. Regulation of gene expression of growth factors in PDL cells by IL1 β and/or biomechanical strain of low (CTSL) or high (CTSH) magnitudes after 1 and 6 days. Mean values \pm SEM were calculated (n=6/group). *: significantly (p<0.05) different from control; †: significantly (p<0.05) different from IL1 β -treated unstretched cells; ‡: significantly (p<0.05) different from cells which were simultaneously exposed to IL1 β and CTSL.

Tabelle 3. Regulation der Genexpression von Wachstumsfaktoren in PDL-Zellen durch IL1 β und/oder niedrige (CTSL) oder hohe (CTSH) biomechanische Kräfte nach 1 und 6 Tagen. Mittelwerte \pm SEM wurden berechnet (n=6/Gruppe). *: signifikanter Unterschied (p<0,05) zur Kontrolle; †: signifikanter Unterschied (p<0,05) zu ungedehnten Zellen, die mit IL1 β behandelt wurden; ‡: signifikanter Unterschied (p<0,05) zu Zellen, die gleichzeitig IL1 β und CTSL ausgesetzt waren.

Target gene	Group	Gene expression (fold of control)	
		day 1	day 6
IGF1	IL1 β	1.04 \pm 0.15	2.33 \pm 0.24*
	CTSL	0.57 \pm 0.03*	0.57 \pm 0.08*
	IL1 β + CTSL	1.05 \pm 0.10	2.34 \pm 0.30*
	CTSH	0.25 \pm 0.02*	0.68 \pm 0.02*
	IL1 β + CTSH	0.57 \pm 0.02*†‡	0.54 \pm 0.05*†‡
VEGF	IL1 β	0.76 \pm 0.05	4.22 \pm 0.58*
	CTSL	0.70 \pm 0.06	1.04 \pm 0.12
	IL1 β + CTSL	0.85 \pm 0.09	2.66 \pm 0.30*†
	CTSH	1.73 \pm 0.22*	2.51 \pm 0.22*
	IL1 β + CTSH	1.74 \pm 0.28*†‡	3.12 \pm 0.46*
TGF β 1	IL1 β	0.71 \pm 0.03	0.94 \pm 0.11
	CTSL	0.58 \pm 0.08*	0.96 \pm 0.19
	IL1 β + CTSL	0.74 \pm 0.07	0.92 \pm 0.13
	CTSH	1.00 \pm 0.15	1.38 \pm 0.31
	IL1 β + CTSH	0.75 \pm 0.03	0.76 \pm 0.07

leicht induziert. Ähnlich wie bei IL8 wurde die IL1 β -induzierte COX2-Expression durch biomechanische Belastung abhängig von der Dehnungsgröße herunterreguliert (Tabelle 1).

Zusammengefasst zeigen diese Daten, dass IL1 β und biomechanische Belastung die konstitutive Expression entzündungsfördernder Mediatoren verstärken können. Bei kurzer Anwendung scheinen starke Kräfte zu einer Entzündung beizutragen, schwache Kräfte hingegen nicht. Bei längerer Applikation hingegen scheinen selbst stärkere biomechanische Kräfte eine antiinflammatorische Wirkung zu entfalten, indem sie die Expression von Entzündungsmediatoren reduzieren.

Effekt von biomechanischer Belastung und Entzündung auf die Regulation von Wachstumsfaktoren

Am Tag 1 wurde die IGF1-Expression durch biomechanische Belastung, abhängig von der Stärke, signifikant reduziert, jedoch nicht durch IL1 β reguliert (Tabelle 3). CTSH verringerte auch die IGF1-Expression unter entzündlichen Bedingungen, wohingegen CTSL keine solche Wirkung auf Zellen, die mit IL1 β behandelt wurden, ausübte (Tabelle 3). Nach 6-tägiger Inkubation mit IL1 β war die IGF1-Expres-

Table 4. Regulation of gene expression of collagen type I and markers of osteogenic differentiation in PDL cells by IL1 β and/or biomechanical strain of low (CTSL) or high (CTSH) magnitudes after 1 and 6 days. Mean values \pm SEM were calculated (n = 6/group). *: significantly (p < 0.05) different from control; †: significantly (p < 0.05) different from IL1 β -treated unstretched cells; ‡: significantly (p < 0.05) different from cells which were simultaneously exposed to IL1 β and CTSL.

Tabelle 4. Regulation der Genexpression von Kollagen Typ I und osteogenen Differenzierungsmarkern in PDL-Zellen durch IL1 β und/oder niedrige (CTSL) oder hohe (CTSH) biomechanische Kräfte nach 1 und 6 Tagen. Mittelwerte \pm SEM wurden berechnet (n = 6/Gruppe). *: signifikanter Unterschied (p < 0,05) zur Kontrolle; †: signifikanter Unterschied (p < 0,05) zu ungedehnten Zellen, die mit IL1 β behandelt wurden; ‡: signifikanter Unterschied (p < 0,05) zu Zellen, die gleichzeitig IL1 β und CTSL ausgesetzt waren.

Target gene	Group	Gene expression (fold of control)	
		day 1	day 6
COL1	IL1 β	0.47 \pm 0.03*	0.10 \pm 0.01*
	CTSL	0.25 \pm 0.03*	0.83 \pm 0.22
	IL1 β + CTSL	0.28 \pm 0.04*†	0.12 \pm 0.02*
	CTSH	0.46 \pm 0.04*	0.30 \pm 0.05*
	IL1 β + CTSH	0.39 \pm 0.01*	0.08 \pm 0.03*
ALP	IL1 β	1.20 \pm 0.09	0.67 \pm 0.08*
	CTSL	1.13 \pm 0.11	0.59 \pm 0.06*
	IL1 β + CTSL	1.19 \pm 0.26	0.71 \pm 0.09*
	CTSH	0.76 \pm 0.10	0.34 \pm 0.03*
	IL1 β + CTSH	0.49 \pm 0.04*†‡	0.36 \pm 0.03*†‡
RUNX2	IL1 β	0.50 \pm 0.07*	1.06 \pm 0.09
	CTSL	0.24 \pm 0.04*	0.75 \pm 0.10
	IL1 β + CTSL	0.26 \pm 0.04*†	0.55 \pm 0.07*†
	CTSH	0.27 \pm 0.04*	0.92 \pm 0.08
	IL1 β + CTSH	0.32 \pm 0.05*†	0.61 \pm 0.04*†

Constitutive levels of TGF β 1 were slightly reduced by IL1 β , CTSL, and biomechanical loading in the presence of IL1 β on day 1 (Table 3). On day 6, TGF β 1 levels were not significantly changed (Table 3).

Taken together, although short-term incubation with IL1 β had little effect on growth factor expression, VEGF and IGF1 expression were strongly upregulated in cells exposed to IL1 β for a longer period of time. High biomechanical forces inhibited the expression of IGF1 but increased the levels of VEGF under normal and inflammatory conditions. As for TGF β 1, the regulatory effects of IL1 β and/or biomechanical loading were in general slight and inhibitory.

Regulation of COL1 Expression by Biomechanical Loading and Inflammation

On day 1, the COL1 expression was significantly inhibited by IL1 β , biomechanical loading and their combinations (Table 4). Similar results were observed on day 6, when the COL1 expression was again significantly reduced by IL1 β in the presence and absence of biomechanical loading and by CTSH alone (Table 4).

sion im Vergleich zur Kontrolle signifikant erhöht. Während CTSL und CTSH die konstitutive Expression von IGF1 signifikant reduzierten, hemmte nur CTSH die IL1 β -induzierte Hochregulation von IGF1 (Tabelle 3).

Nach Tag 1 war die VEGF-Expression durch IL1 β und/oder CTSL leicht, jedoch nicht signifikant reduziert. Wurden jedoch Zellen in An- und Abwesenheit von IL1 β CTSH ausgesetzt, war VEGF im Vergleich zur Kontrolle signifikant erhöht (Tabelle 3). Der inhibitorische Effekt von IL1 β und/oder CTSL auf die VEGF-Synthese wurde auch auf der Proteinebene beobachtet. Gemäß unseren Ergebnissen auf der Transkriptionsebene wurde die höchste VEGF-Proteinproduktion in Zellen gefunden, die CTSH entweder allein oder in Kombination mit IL1 β ausgesetzt waren (Tabelle 2). Eine 6-tägige Behandlung der Zellen mit IL1 β in An- und Abwesenheit von biomechanischer Belastung erhöhte VEGF ebenfalls signifikant. Des Weiteren wurde die VEGF-Expression auch durch CTSH allein signifikant gesteigert (Tabelle 3).

Die konstitutive TGF β 1- mRNA-Expression wurde am Tag 1 durch IL1 β , CTSL und die Kombination aus biomechanischer Belastung und IL1 β leicht gesenkt (Tabelle 3). Am Tag 6 war TGF β 1 nicht signifikant verändert (Tabelle 3).

Zusammengefasst ist festzustellen, dass eine kurzzeitige Inkubation mit IL1 β nur eine geringe Wirkung auf die Expression von Wachstumsfaktoren besaß, wohingegen die Expression von VEGF und IGF1 in Zellen, die für längere Zeit IL1 β ausgesetzt waren, stark hochreguliert wurde. Starke biomechanische Kräfte hemmten die IGF1-Expression, erhöhten jedoch VEGF unter normalen und entzündlichen Bedingungen. Für TGF β 1 war die regulatorische Wirkung von IL1 β und/oder biomechanischer Belastung im Allgemeinen gering und eher inhibitorischer Natur.

Regulation der COL1-Expression durch biomechanische Belastung und Entzündung

Am Tag 1 wurde die COL1-Expression durch IL1 β , biomechanische Belastung und deren Kombinationen signifikant gehemmt (Tabelle 4). Ähnliche Ergebnisse wurden am Tag 6 beobachtet, an dem die COL1-Expression wiederum durch IL1 β , in An- und Abwesenheit von biomechanischer Belastung, sowie durch CTSH allein signifikant reduziert wurde (Tabelle 4).

Effekt von biomechanischer Belastung und Entzündung auf die osteogene Differenzierung

Am Tag 1 wurde keine signifikante Wirkung von IL1 β und/oder CTSL auf die ALP-Expression beobachtet. Zellen, die CTSH ausgesetzt wurden, zeigten jedoch im Vergleich zur Kontrolle reduzierte ALP-Werte. Die durch CTSH reduzierte ALP-Expression wurde durch IL1 β weiter gesenkt (Tabelle 4). Am Tag 6 wurde die ALP-mRNA-Expression durch IL1 β , biomechanische Belastung und deren Kombinationen signifikant verringert (Tabelle 4). Die niedrigsten ALP-Werte wurden in Zellen beobachtet, die CTSH unter

Actions of Biomechanical Loading and Inflammation on Osteogenic Differentiation

On day 1, no significant effect of IL1 β and/or CTSL on ALP expression was observed. However, cells exposed to CTSH, displayed slightly decreased ALP levels as compared to the control. The CTSH-downregulated ALP expression was further reduced by IL1 β (Table 4). On day 6, the ALP mRNA expression was significantly diminished by IL1 β , biomechanical loading and their combinations. The lowest ALP levels were detected in cells subjected to CTSH under normal and inflammatory conditions (Table 4). The inhibitory effect of inflammation and/or CTSL on ALP was also confirmed by an ALP activity assay following 6 days of treatment: The activity of ALP in the control, IL1 β -treated and CTSL-exposed cells was 16.24 ± 1.86 , 4.98 ± 0.36 , and 3.44 ± 0.15 nmol/mg protein/min. In cells, which were simultaneously subjected to IL1 β and CTSL, the ALP activity was 2.40 ± 0.25 nmol/mg protein/min. All groups were significantly different from the control.

Similarly, RUNX2 expression was significantly down-regulated by IL1 β , biomechanical loading and their combinations. The inhibitory effect of biomechanical loading on RUNX2 was neither magnitude-dependent nor modulated by IL1 β on day 1 (Table 4). On day 6, RUNX2 was slightly decreased by CTSL and CTSH. The inhibitory effect of CTSL and CTSH on RUNX2 was enhanced in an inflammatory environment (Table 4).

In summary, these findings indicate that IL1 β and/or biomechanical loading can inhibit the expression of markers of osteogenic differentiation.

Influence of Biomechanical Loading and IL1 β on Wound Fill Rate

Finally, we studied the effect of biomechanical loading on the wound fill rate, which is determined by cell migration and proliferation, in the presence and absence of IL1 β over 7 days. CTSL caused a significant inhibition of the wound closure as compared to the control on days 4 to 7 (Figure 2). Furthermore, IL1 β significantly inhibited wound closure on all days except day 2. From day 5 on, the lowest wound fill rate was observed in wounded cultures, which were simultaneously subjected to biomechanical loading and IL1 β .

Discussion

This in-vitro study has shown that the response of PDL cells to a proinflammatory stimulus is modulated by biomechanical forces. In general, biomechanical forces enhanced the IL1 β -induced inhibition of IGF, COL1, osteogenic proteins, and PDL cell migration. In addition, the IL1 β -stimulated synthesis of proinflammatory mediators was enhanced when cells were exposed to biomechanical loading. However, biomechanical forces applied for a longer period of time antagonized IL1 β actions on inflammatory molecules, suggesting that a possible contribution of orthodontic or oc-

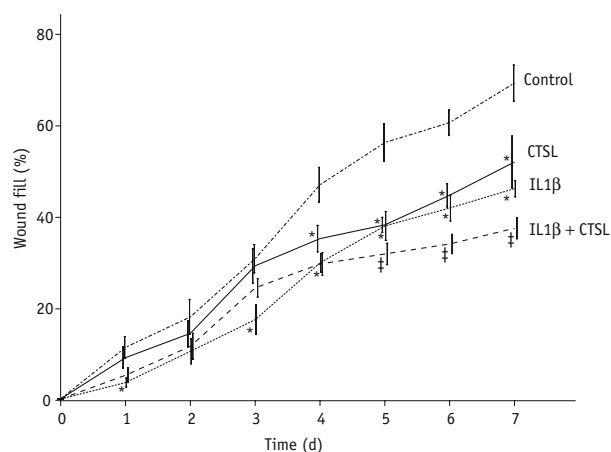


Figure 2. Effect of IL1 β and/or biomechanical loading (CTSL) on wound fill rate. Wound closure, i.e. the percentage of fill of the initially cell free zones created by wounding, were analyzed from day 1 to 7. Wounded monolayers in the absence of IL1 β and CTSL served as controls. Mean values \pm SEM were calculated ($n = 10$ /group and time point). *: significantly ($p < 0.05$) different from control; ‡: significantly ($p < 0.05$) different from cells exposed to CTSL in the absence of IL1 β .

Abbildung 2. Einfluss von IL1 β und/oder biomechanischer Belastung (CTSL) auf die Wundheilungsrate. Der Wundverschluss, d.h. die prozentuale Auffüllung der ursprünglich zellfreien Bereiche, wurde an den Tagen 1 bis 7 untersucht. Verwundete Monolayer ohne Einfluss von IL1 β und CTSL dienten als Kontrolle. Mittelwerte \pm SEM wurden berechnet ($n = 10$ /Gruppe und Zeitpunkt). *: signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) zur Kontrolle; ‡: signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) zu Zellen, die CTSL in Abwesenheit von IL1 β ausgesetzt waren.

Normal- und Entzündungsbedingungen ausgesetzt waren (Tabelle 4). Die inhibitorische Wirkung einer Entzündung und/oder CTSL auf die ALP-Produktion wurde mittels eines ALP-Activity-Assay nach 6-tägiger Behandlung bestätigt: Die ALP-Aktivität in der Kontrolle, in IL1 β -behandelten Zellen und in Zellen, die CTSL ausgesetzt waren, betrug $16,24 \pm 1,86$, $4,98 \pm 0,36$ und $3,44 \pm 0,15$ nmol/mg Protein/min. In Zellen, die gleichzeitig IL1 β und CTSL unterworfen waren, betrug die ALP-Aktivität $2,40 \pm 0,25$ nmol/mg Protein/min. Alle Gruppen unterschieden sich signifikant von der Kontrolle.

Gleichermaßen wurde die RUNX2-Expression durch IL1 β , biomechanische Belastung und deren Kombinationen signifikant herunterreguliert. Die inhibitorische Wirkung biomechanischer Belastung auf RUNX2 war weder abhängig von der Dehnungsgröße noch wurde sie durch IL1 β am Tag 1 verändert (Tabelle 4). Am Tag 6 wurde RUNX2 durch CTSL und CTSH wiederum reduziert. Die inhibitorische Wirkung von CTSL und CTSH auf RUNX2 war in einer entzündlichen Umgebung verstärkt (Tabelle 4).

Insgesamt zeigen diese Ergebnisse, dass biomechanische Belastung die Expression von Markern der osteogenen Differenzierung hemmen kann. Der inhibitorische Effekt ist z.T.

clusal load to periodontal destruction in periodontitis patients is not mediated through enhancement of periodontal inflammation but more likely due to downregulation of matrix and osteogenic proteins.

Our findings on proinflammatory mediators concur in part with studies by Agarwal and co-workers in that biomechanical forces can exert anti-inflammatory effects under inflammatory conditions [1, 18, 19]. They also used low and high strain similar to our study and observed a magnitude-dependent effect. Strain of low magnitude could abrogate the IL1 β -induced stimulation of proinflammatory mediators, whereas high strain was proinflammatory and enhanced the IL1 β -stimulated synthesis of inflammatory molecules. Although we also observed proinflammatory effects of high mechanical forces, an anti-inflammatory effect of low strain was only observed for COX2 on day 1. Nevertheless, anti-inflammatory effects induced by biomechanical forces were mainly found, when cells were subjected to long-term application of biomechanical loading in our experiments. Differences between our studies and those by Agarwal and co-workers [1] could be in part due to differences in strain frequencies and the exposure time to biomechanical loading. However, that biomechanical forces can exert anti-inflammatory effects in the presence of an inflammatory stimulus is an important finding and is supported by our experiments as well as studies by Agarwal and co-workers [1]. In addition, studies performed in chondrocytes have also shown the ability of biomechanical forces to inhibit inflammation [5]. Why biomechanical strain was in general proinflammatory on day 1 but anti-inflammatory on day 6, is not known. Whether cells became more adapted, i.e. less mechanosensitive, or whether anti-inflammatory molecules produced at later time points caused a downregulation as a negative feedback, remains speculative and deserves further investigation.

We also studied the influence of biomechanical forces on growth factors in the presence of IL1 β . IGF1, VEGF, and TGF β 1 were differentially regulated by high biomechanical strain. IGF1, which promotes various PDL cell functions, such as cell proliferation and matrix synthesis, was strongly downregulated by high strain in the presence and absence of IL1 β , suggesting that the IGF system may be involved in detrimental effects of biomechanical forces on tissue homeostasis. By contrast, high strain provoked a strong upregulation of VEGF on day 1. Since VEGF plays an important role in angiogenesis and thereby in inflammation and formation of granulation tissue, high strain is likely to promote recruitment of inflammatory cells.

Cells which were subjected to an inflammatory stimulus, exhibited a reduced COL1 expression, which was further downregulated by biomechanical forces on day 1. When cells were exposed to IL1 β for 6 days, no regulatory effect of biomechanical strain was observed.

Moreover, high biomechanical strain and sometimes even low biomechanical forces inhibited the expression of

von der Dehnungsgröße abhängig und oft in einer entzündlichen Umgebung verstärkt.

Der Einfluss von biomechanischer Belastung und IL1 β auf die Wundheilungsrate

Zuletzt untersuchten wir über 7 Tage die Wirkung von biomechanischer Belastung auf die Wundheilungsrate, die durch die Zellmigration und -proliferation bestimmt wird, in An- und Abwesenheit von IL1 β . CTSL bewirkte an den Tagen 4 bis 7 eine signifikante Hemmung des Wundverschlusses im Vergleich zur Kontrolle (Abbildung 2). Des Weiteren hemmte IL1 β mit Ausnahme des zweiten Tages den Wundverschluss signifikant. Die geringste Wundheilungsrate wurde ab dem fünften Tag in den Kulturen beobachtet, die gleichzeitig biomechanischer Belastung und Entzündung ausgesetzt waren.

Diskussion

Diese In-vitro-Studie zeigt, dass die Reaktion von PDL-Zellen auf einen inflammatorischen Stimulus durch biomechanische Kräfte moduliert wird. Im Allgemeinen verstärkten biomechanische Kräfte die IL1 β -induzierte Inhibition von IGF, COL1, osteogenen Proteinen und der Migration von PDL-Zellen. Weiterhin wurde die durch IL1 β stimulierte Synthese proinflammatorischer Mediatoren gefördert, wenn Zellen einer biomechanischen Belastung ausgesetzt waren. Wurden biomechanische Kräfte jedoch über einen längeren Zeitraum appliziert, so wirkten sie dem IL1 β -induzierten Effekt auf Entzündungsmoleküle entgegen. Dies legt die Vermutung nahe, dass kieferorthopädische und okklusale Kräfte nicht durch eine Verstärkung der parodontalen Entzündung, sondern vor allem durch eine Herunterregulation von Matrixmolekülen und osteogenen Proteinen zur parodontalen Destruktion bei Parodontitispatienten beitragen können.

Unsere Ergebnisse bezüglich proinflammatorischer Mediatoren stimmen mit Studien von Agarwal und Kollegen darin überein, dass biomechanische Kräfte unter Entzündungsbedingungen antiinflammatorische Effekte ausüben können [1, 18, 19]. Auch sie verwendeten niedrige und hohe Belastungen, ähnlich unserer Studie, und beobachteten von der Belastungsgröße abhängige Effekte. Eine geringe Dehnung konnte die IL1 β -induzierte Stimulation proinflammatorischer Mediatoren aufheben, wohingegen eine starke Dehnung entzündungsfördernd war und die IL1 β -stimulierte Synthese von Entzündungsmolekülen verstärkte. Obwohl auch wir proinflammatorische Effekte bei starken mechanischen Kräften fanden, konnte eine entzündungshemmende Wirkung bei geringer Belastung am Tag 1 nur für COX2 beobachtet werden. Antiinflammatorische Effekte durch biomechanische Kräfte konnten vor allem dann in unseren Experimenten nachgewiesen werden, wenn Zellen für eine längere Zeit biomechanischen Kräften ausgesetzt wurden. Die Unterschiede zwischen unseren Untersuchungen und jenen

osteogenic proteins in IL1 β -treated PDL cells. These findings demonstrate that biomechanical signals may, in general, support the IL1 β -induced downregulation of COL1 and osteogenic proteins, which might be another possible mechanism, whereby biomechanical forces enhance inflammation-induced periodontal destruction.

We also examined the effect of biomechanical forces on the wound fill rate as a measure of cell migration and proliferation, which are critical for the turnover of periodontal tissues. From day 5 on, the lowest wound fill rate was observed in cells which were simultaneously exposed to inflammatory and biomechanical signals, again indicating that biomechanical forces have an additional inhibitory effect on critical PDL cell functions.

The exact mechanisms whereby mechanical loading interferes with the actions of IL1 β are yet to be elucidated. It has been reported that biomechanical forces of both low and high magnitudes can modulate IL1 β -induced actions via regulation of the NF κ B signal transduction [1]. Proinflammatory effects of biomechanical strain are mediated by I κ B β degradation and, thereby, NF κ B translocation, whereas anti-inflammatory effects are accomplished by inhibition of NF κ B signaling [1]. Furthermore, it has been reported that the majority of IL1 receptors in fibroblasts is localized at focal adhesions, which are large protein complexes through which the cellular cytoskeleton connects to the extracellular matrix. Interestingly, IL1 β seems to cause alterations at these focal adhesions, which may affect cell-matrix interactions and cellular responses to biomechanical forces [22].

In the present study, cells were exposed to biomechanical forces of low and high magnitudes, which have also been applied to PDL cells in other studies [1, 18, 19]. Since orthodontic forces are usually superimposed by dynamic occlusal forces, cells were exposed to dynamic loading. In order to study the interactions between biomechanical loading and IL1 β , tensile strain was applied. In a clinical setting, cells are subject to complex forces, i.e. tension, compression, and shear. Therefore, future studies should clarify whether compressive and shear forces exert similar effects to those observed for tensile strain in our experiments.

In order to simulate periodontal inflammation in vitro, IL1 β , which is increased at inflamed periodontal sites, was used, as it has been in previous studies [1, 8, 13, 21]. In order to examine the wound fill rate, i.e. the PDL cell migration and proliferation, in the presence of biomechanical loading and/or IL1 β , an in-vitro wound healing model, which has been well described and successfully utilized by other investigators, was applied [9, 12, 14, 16].

In the present study, we sought to analyze the interactions of biomechanical forces and inflammatory signals in PDL cells. The periodontium is not only subjected to complex biomechanical forces during orthodontic treatment but also mastication, dental trauma, and functional dental habits. Our finding, that biomechanical forces can enhance the destructive

von Agarwal et al. [1] könnten zum Teil an unterschiedlichen Dehnungsfrequenzen und der unterschiedlich langen Kraftapplikation liegen. Die Tatsache, dass biomechanische Kräfte entzündungshemmende Effekte in der Gegenwart eines inflammatorischen Stimulus haben können, ist eine wichtige Erkenntnis, die sowohl von unseren Experimenten als auch von Agarwal et al. [1] gestützt wird. Untersuchungen an Chondrozyten belegen ebenfalls, dass biomechanische Kräfte Entzündungsprozesse hemmen können [5]. Warum die biomechanische Belastung am Tag 1 im Allgemeinen proinflammatorisch, am Tag 6 jedoch antiinflammatorisch war, ist nicht bekannt. Ob die Zellen an die veränderten Bedingungen adaptierten, d.h. weniger mechanosensitiv wurden, oder ob entzündungshemmende Moleküle, die zu späteren Zeitpunkten im Sinne eines negativen Feedbacks produziert wurden, eine Herunterregulation bewirkten, bleibt spekulativ und bedarf weitergehender Forschung.

Wir untersuchten auch den Einfluss von biomechanischen Kräften auf Wachstumsfaktoren in Gegenwart von IL1 β . IGF1, VEGF und TGF β wurden durch hohe biomechanische Belastung unterschiedlich reguliert. IGF1, der verschiedene Funktionen von PDL-Zellen begünstigt, wie z.B. Zellproliferation und Matrixsynthese, wurde bei starker Belastung, in An- und Abwesenheit von IL1 β , herunterreguliert, was die Vermutung nahelegt, dass das IGF-System an negativen Effekten von biomechanischen Kräften auf die Gewebemöbiostase beteiligt ist. Eine starke biomechanische Belastung führte hingegen zu einer Erhöhung von VEGF am Tag 1. Da VEGF eine entscheidende Rolle bei der Angiogenese und somit bei Entzündungen und der Bildung von Granulationsgewebe spielt, könnte eine hohe biomechanische Belastung die Rekrutierung von Entzündungszellen fördern.

Zellen, die einem Entzündungsreiz ausgesetzt waren, zeigten eine reduzierte COL1-Expression, die durch biomechanische Kräfte am Tag 1 noch weiter herunterreguliert wurde. Waren die Zellen für 6 Tage IL1 β ausgesetzt, war kein regulatorischer Effekt der biomechanischen Belastung nachweisbar.

Des Weiteren hemmten hohe biomechanische Belastungen und manchmal selbst geringe biomechanische Kräfte die Expression von osteogenen Proteinen in Zellen, die mit IL1 β behandelt wurden. Diese Ergebnisse zeigen, dass biomechanische Signale im Allgemeinen die IL1 β -induzierte Herunterregulation von COL1 und osteogenen Proteinen fördern können. Dies ist möglicherweise ein weiterer Mechanismus, über den biomechanische Kräfte den durch Entzündung induzierten Abbau parodontaler Gewebe fördern können.

Wir untersuchten auch die Wirkung biomechanischer Kräfte auf die Wundheilungsrate, ein Maß für die Zellmigration und -proliferation, die den Um- und Abbau des Parodonts entscheidend bestimmen. Ab Tag 5 wurde die geringste Wundheilungsrate in den Zellen beobachtet, die gleichzeitig inflammatorischen und biomechanischen Signalen ausgesetzt waren, was erneut die zusätzliche inhibitorische Wirkung bio-

effects of inflammation on periodontal tissues, may also provide an explanation, as to how unphysiological occlusal forces can aggravate periodontitis. A more recent study evaluated the relationship between tooth loading and periodontal disease at an individual tooth level and found an association between biomechanical overloading due to untreated occlusal discrepancies and the progression of periodontitis [10, 11]. By contrast, elimination of tooth overloading significantly reduced the progression of the disease over time.

Taken together, our study demonstrates that the response of PDL cells to a proinflammatory stimulus is modulated by biomechanical forces. Although biomechanical loading exhibited anti-inflammatory effects, it also enhanced the inhibitory actions of IL1 β on IGF1, COL1, osteogenic proteins, and PDL cell migration. Within the limitations of this in-vitro study, it might be concluded that orthodontic forces together with occlusal load may contribute to periodontal destruction in periodontitis patients through the downregulation of matrix and osteogenic proteins but not the enhancement of periodontal inflammation.

Acknowledgement

We would like to thank Dr. Sudha Agarwal, Marcel Drolshagen, Katharina Reifenrath, and Imke Beier for their great support. This study was kindly supported by the German Research Foundation (Clinical Research Unit 208/TP4) and the Medical Faculty of the University of Bonn.

References

1. Agarwal S, Long P, Seyedain A, et al. A central role for the nuclear factor-kappaB pathway in anti-inflammatory and proinflammatory actions of mechanical strain. *FASEB J* 2003;17:899–901.
2. Artun J, Urbye KS. The effect of orthodontic treatment on periodontal bone support in patients with advanced loss of marginal periodontium. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 1988;93:143–8.
3. Balcerzak M, Hamade E, Zhang L, et al. The roles of annexins and alkaline phosphatase in mineralization process. *Acta Biochim Pol* 2003;50:1019–38.
4. Boyd RL, Baumrind S. Periodontal considerations in the use of bonds or bands on molars in adolescents and adults. *Angle Orthod* 1992;62:117–26.
5. Chowdhury TT, Akanji OO, Salter DM, et al. Dynamic compression influences interleukin-1beta-induced nitric oxide and prostaglandin E2 release by articular chondrocytes via alterations in iNOS and COX-2 expression. *Biorheology* 2008;45:257–74.
6. Dereka XE, Markopoulou CE, Vrotsos IA. Role of growth factors on periodontal repair. *Growth Factors* 2006;24:260–7.
7. Deschner J, Rath-Deschner B, Reimann S, et al. Cell biological basics of a motion-based therapy in arthritis – an overview. *J Cranio Mand Func* 2009;1:107–23.
8. Deschner J, Rath-Deschner B, Reimann S, et al. Regulatory effects of biophysical strain on rat TMJ discs. *Ann Anat* 2007;189:326–8.
9. Fang Y, Svoboda KK. Nicotine inhibits human gingival fibroblast migration via modulation of Rac signalling pathways. *J Clin Periodontol* 2005;32:1200–7.
10. Harrel SK, Nunn ME, Hallmon WW. Is there an association between occlusion and periodontal destruction?: Yes – occlusal forces can contribute to periodontal destruction. *J Am Dent Assoc* 2006;137:1380,1382,1384 passim.

mechanischer Kräfte auf entscheidende Funktionen der PDL-Zellen belegt.

Die exakten Mechanismen, über die biomechanische Belastungen in die Wirkung von IL1 β eingreifen, müssen noch entschlüsselt werden. Es wurde berichtet, dass sowohl hohe als auch niedrige biomechanische Kräfte IL1 β -induzierte Effekte durch Beeinflussung der NF κ B-Signaltransduktion regulieren können [1]. Die proinflammatorische Wirkung biomechanischer Belastung wird durch den Abbau von I κ B β und die dadurch bedingte NF κ B-Translokation vermittelt, wohingegen entzündungshemmende Wirkungen durch eine Inhibition des NF κ B-Signalwegs erreicht werden [1]. Darüber hinaus wurde berichtet, dass die Mehrzahl der IL1-Rezeptoren in Fibroblasten an fokalen Adhäsionen lokalisiert ist. Dabei handelt es sich um große Proteinkomplexe, die das Zytoskelett der Zelle mit der extrazellulären Matrix verbinden. Interessanterweise scheint IL1 β Veränderungen an den fokalen Adhäsionen hervorzurufen, welche die Zell-Matrix-Interaktionen und Reaktionen der Zelle auf biomechanische Kräfte beeinträchtigen könnten [22].

In der vorliegenden Studie wurden Zellen hohen und niedrigen biomechanischen Kräften ausgesetzt, die auch in anderen Untersuchungen an PDL-Zellen angewandt wurden [1, 18, 19]. Da kieferorthopädische Kräfte meist durch dynamische okklusale Kräfte überlagert werden, wurden die Zellen einer dynamischen Belastung ausgesetzt. Um die Interaktionen zwischen biomechanischer Belastung und IL1 β zu untersuchen, wurden Zugkräfte eingesetzt. In einer klinischen Situation sind Zellen komplexen Kräften unterworfen, d.h. Zug-, Kompressions- und Scherkräften. Aus diesem Grund sollten zukünftige Studien klären, ob Kompressions- und Scherkräfte ähnliche Auswirkungen zeigen wie jene, die in unseren Experimenten für Zugkräfte beobachtet wurden.

Um eine parodontale Entzündung in vitro zu simulieren, wurde IL1 β verwendet, welches an entzündeten parodontalen Stellen erhöht ist und daher bereits in früheren Studien benutzt wurde [1, 8, 13, 21]. Um die Wundheilungsrate, d.h. die Migration und Proliferation von PDL-Zellen, in An- und Abwesenheit von biomechanischer Belastung und/oder IL1 β zu untersuchen, wurde ein In-vitro-Wundheilungsmodell angewandt, das bereits von anderen Forschern detailliert beschrieben und erfolgreich eingesetzt wurde [9, 12, 14, 16].

Die vorliegende Studie hatte zum Ziel, die Interaktionen zwischen biomechanischen Kräften und Entzündungsreizen in PDL-Zellen zu analysieren. Das Parodont ist nicht nur während einer kieferorthopädischen Behandlung, sondern auch während des Kauens, bei einem okklusalen Trauma und Parafunktionen komplexen biomechanischen Kräften ausgesetzt. Unser Ergebnis, dass biomechanische Kräfte die negativen Auswirkungen einer Entzündung auf parodontale Gewebe möglicherweise verstärken, könnte auch eine Erklärung dafür liefern, wie unphysiologische okklusale Kräfte eine Parodontitis aggravieren. Eine neuere Studie hat sich dem Zusammenhang zwischen Zahnbelastung und parodontaler Er-

11. Harrel SK, Nunn ME. The effect of occlusal discrepancies on periodontitis. II. Relationship of occlusal treatment to the progression of periodontal disease. *J Periodontol* 2001;72:495–505.
12. Hoang AM, Oates TW, Cochran DL. In vitro wound healing responses to enamel matrix derivative. *J Periodontol* 2000;71:1270–7.
13. Hou L, Liu C, Chang W. Increased interleukin-1 beta levels in gingival crevicular fluid of Chinese periodontal patients. *J Formos Med Assoc* 1994;93:99–103.
14. Katz RW, Teng SY, Thomas S, et al. Paracrine activation of extracellular signal-regulated kinase in a simple in vitro model of wounded osteoblasts. *Bone* 2002;31:288–95.
15. Komori T. Regulation of bone development and extracellular matrix protein genes by RUNX2. *Cell Tissue Res* 2010;339:189–95.
16. Lackler KP, Cochran DL, Hoang AM, et al. Development of an in vitro wound healing model for periodontal cells. *J Periodontol* 2000;71:226–37.
17. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-delta C(T)) method. *Methods* 2001;25:402–8.
18. Long P, Hu J, Piesco N, et al. Low magnitude of tensile strain inhibits IL-1beta-dependent induction of pro-inflammatory cytokines and induces synthesis of IL-10 in human periodontal ligament cells in vitro. *J Dent Res* 2001;80:1416–20.
19. Long P, Liu F, Piesco NP, et al. Signaling by mechanical strain involves transcriptional regulation of proinflammatory genes in human periodontal ligament cells in vitro. *Bone* 2002;30:547–52.
20. Okamoto A, Ohnishi T, Bandow K, et al. Reduction of orthodontic tooth movement by experimentally induced periodontal inflammation in mice. *Eur J Oral Sci* 2009;117:238–47.
21. Preiss D, Meyle J. Interleukin-1 beta concentration of gingival crevicular fluid. *J Periodontol* 1994;65:423–8.
22. Qwarnström EE, MacFarlane SA, Page RC, et al. Interleukin 1 beta induces rapid phosphorylation and redistribution of talin: a possible mechanism for modulation of fibroblast focal adhesion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991;88:1232–6.
23. Rath-Deschner B, Deschner J, Reimann S, et al. Regulatory effects of biomechanical strain on the IGF system in human periodontal cells. *J Biomech* 2009;42:2584–9.
24. Ren Y, Hazemeijer H, de Haan B, et al. Cytokine profiles in crevicular fluid during orthodontic tooth movement of short and long durations. *J Periodontol* 2007;78:453–8.
25. Ren Y, Vissink A. Cytokines in crevicular fluid and orthodontic tooth movement. *Eur J Oral Sci* 2008;116:89–97.
26. Sabokbar A, Millett PJ, Myer B, et al. A rapid, quantitative assay for measuring alkaline phosphatase activity in osteoblastic cells in vitro. *Bone Miner* 1994;27:57–67.
27. Sallum EJ, Nouer DF, Klein MI, et al. Clinical and microbiologic changes after removal of orthodontic appliances. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2004;126:363–6.
28. Shimizu N, Yamaguchi M, Goseki T, et al. Cyclic-tension force stimulates interleukin-1 beta production by human periodontal ligament cells. *J Periodontol Res* 1994;29:328–33.
29. Sodek J, McKee MD. Molecular and cellular biology of alveolar bone. *Periodontol* 2000 2000;24:99–126.
30. van Gastel J, Quirynen M, Teughels W, et al. Longitudinal changes in microbiology and clinical periodontal variables after placement of fixed orthodontic appliances. *J Periodontol* 2008;79:2078–86.
31. Wennström JL, Stokland BL, Nyman S, et al. Periodontal tissue response to orthodontic movement of teeth with infrabony pockets. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 1993;103:313–9.
32. Yamamoto T, Kita M, Kimura I, et al. Mechanical stress induces expression of cytokines in human periodontal ligament cells. *Oral Dis* 2006;12:171–5.

krankung auf Einzelzahnebene gewidmet und fand eine Assoziation zwischen biomechanischer Überbelastung aufgrund unbehandelter okklusaler Störungen und der Parodontitisprogression [10, 11]. Durch die Beseitigung der okklusalen Überbelastungen wurde dagegen das Fortschreiten der Erkrankung signifikant reduziert.

Insgesamt zeigt unsere Studie, dass die Reaktion von PDL-Zellen auf einen inflammatorischen Stimulus durch biomechanische Kräfte moduliert wird. Obwohl von biomechanischen Belastungen auch antiinflammatorische Effekte ausgingen, förderten sie die inhibitorische Wirkung von IL1 β auf IGF1, COL1, osteogene Proteine und die Migration von PDL-Zellen. Im Rahmen der von uns durchgeführten In-vitro-Studie kann geschlossen werden, dass kieferorthopädische Kräfte in Kombination mit okklusalen Belastungen zur parodontalen Destruktion durch eine Herunterregulation der extrazellulären Matrix und osteogener Proteine, jedoch nicht durch eine Verstärkung der parodontalen Entzündung bei Parodontitispatienten beitragen könnten.

Danksagung

Wir bedanken uns bei Dr. Sudha Agarwal, Marcel Drolshagen, Katharina Reifenrath und Imke Beier für ihre große Unterstützung. Diese Studie wurde mit freundlicher Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft (Klinische Forschergruppe 208/TP4) und der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn durchgeführt.

Correspondence Address

Prof. Dr. med. dent. James Deschner
 Clinical Research Unit 208
 Department of Periodontology, Operative and Preventive
 Dentistry
 Center of Dento-Maxillo-Facial Medicine
 University of Bonn
 Welschnonnenstraße 17
 53111 Bonn
 Germany
 Phone: (+49/228) 287 22-650, Fax -081
 e-mail: james.deschner@uni-bonn.de