

Regulation of macrophage migration and activity by high-mobility group box 1 protein released from periodontal ligament cells during orthodontically induced periodontal repair: an in vitro and in vivo experimental study

PDL-Zellen setzen unter Stress „high mobility group box protein 1“ frei und regulieren die Makrophagenaktivität während der Umbauprozesse bei der kieferorthopädischen Zahnbewegung – experimentelle Nachweise in vitro und in vivo

Michael Wolf¹, Stefan Lossdörfer¹, Rogerio Craveiro², Werner Götz¹, Andreas Jäger¹

Abstract

Objective. Recent studies have shown that periodontal ligament (PDL) cells interact with macrophages from the immune system during orthodontically induced repair of periodontal tissue. Hypothesizing that high-mobility group box 1 (HMGB1) protein is released by mechanically stressed PDL cells into the extracellular space and has a role in mediating the local immune response by acting as an "alarmin", this study was performed to further elucidate these cellular interactions, with a special focus on the impact of proinflammatory mediators secreted by PDL cells on macrophage physiology.

Materials and methods. The study included an in vivo part in which orthodontic stress was induced in rats and their PDL analyzed for expression of HMGB1 by immunohistochemistry after 5 days of tooth movement. In the in vitro part, human PDL cells were subjected to compressive loading, followed by stimulating human macrophages with conditioned supernatants of these stressed PDL cells and analyzing how mediators that had been released by these cells into the medium would impact macrophage physiology. Assays for macrophage migration and osteoclast differentiation were used in addition to immunohistochemistry, enzyme-linked immunosorbent assays, and western blotting.

Zusammenfassung

Zielsetzung. Aktuelle Studien weisen auf eine Interaktion von Zellen des parodontalen Ligaments (PDL) und Makrophagen des Immunsystems im Rahmen der parodontalen Umbauprozesse bei der kieferorthopädischen Zahnbewegung, aber auch bei der Entstehung von Wurzelresorptionen hin. In der vorgestellten Studie sollte der Mechanismus dieser zellulären Interaktion weiter untersucht werden. Dabei gingen wir von der Hypothese aus, dass HMGB1 („high mobility group box protein 1“) von mechanisch belasteten PDL-Zellen in den Extrazellulärraum freigesetzt wird und in seiner Funktion als „Alarmin“ zur Steuerung der lokalen Immunantwort beiträgt.

Material und Methoden. Mechanische Belastung wurde durch 5-tägige kieferorthopädische Zahnbewegung im Rattenmodell induziert und das PDL wurde immunhistochemisch bezüglich der Expression von HMGB1 analysiert. In vitro erfolgte die Induktion von Stress durch Druckbelastung humaner PDL-Zellen. Anschließend wurden humane Makrophagen mit den so konditionierten Zellkulturüberständen stimuliert und der Einfluss von Mediatoren, die PDL-Zellen in das Medium sezerniert haben, auf die Makrophagenphysiologie mittels Immunhistochemie, ELISA, Westernblot, Migrations- und Osteoklastendifferenzierungsassays untersucht.

¹ Department of Orthodontics, University of Bonn, Germany

² Department of Pediatric Hematology and Oncology, University of Bonn, Germany

Received: January 23, 2013; accepted: February 27, 2013;
published online: August 24, 2013

This paper was granted the Arnold Biber Research Award of the German Orthodontic Society for the year 2012.

J Orofac Orthop 2013; 74:420-434
DOI 10.1007/s00056-013-0167-7

Results. Induction of mechanical stress was found to upregulate HMGB1 expression both in vivo and in vitro. At the same time, translocation HMGB1 from nuclei into cytoplasm was observed. Culturing macrophages in conditioned PDL cell medium was associated with enhanced chemotactic migration and osteoclast differentiation. Addition of anti-HMGB1 antibodies to inhibit HMGB1 in the conditioned medium was found to significantly attenuate these effects. A less marked increase of migration and osteoclast differentiation by macrophages was observed after isolated addition of HMGB1, at its observed pathological concentration, to nonconditioned medium.

Conclusion. This study clearly indicates an immunomodulatory potential of human PDL cells via release of mediators, including HMGB1 protein. Our finding that these mediators modify the migration and differentiation of macrophages as a function of periodontal repair during orthodontic treatment broadens the theoretical basis toward developing interventional strategies to avoid orthodontically induced root resorption.

Keywords

Periodontal ligament cells · Orthodontic tooth movement · HMGB1 · Macrophages · Periodontal regeneration

Introduction

Orthodontic tooth movements are routinely induced by applying a mechanical force to the periodontium, which results in mechanical deformation of periodontal tissue structures with a complex distribution of compressive, tensile, and shear forces [11]. As an unavoidable consequence, stress is also induced in periodontal ligament (PDL) cells and in some cases causes cell death. Repair phenomena will ensue during which the damaged tissue components are first removed by immune cells of the macrophage type before repair mechanisms toward the reconstruction of functional periodontium can begin [10]. Mediators in the form of cytokines, including chemokines, are released from stressed PDL cells. They stimulate these macrophages to migrate into the defect area and cause them to actively remove necrotic tissue.

To resorb hard tissue structures (e.g., cementum or alveolar bone), these macrophages differentiate into osteoclasts. Any dysregulation of these mechanisms both slow down or even arrest tooth movement and cause excessive loss of dental tissue, thus leading to the observation of bone defects or root resorption (Figure 1a, b). Severe findings of this type may considerably impact the course of orthodontic treatment and, in extreme case, may even jeopardize the preservation of affected teeth. It is, therefore, vital to develop an understanding of the physiology and pathophysiology associated with these mechanisms during tooth movement, thereby allowing for early detection of dysregulated processes and, ideally, taking appropriate steps to contain them.

Recent studies have found that residual PDL cells in the damaged tissue play a key role both in initiating and controlling the

Ergebnisse. Unter der orthodontischen Kraftapplikation im Tierexperiment kam es zu einer signifikanten Zunahme der Expression von HMGB1 im PDL, insbesondere in Bereichen, die einer Druckbelastung ausgesetzt waren. Die Induktion von mechanischem Stress an humanen PDL-Zellen führte in vitro zur Steigerung der HMGB1-Expression und gleichzeitig zu einer Translokation des Proteins aus dem Kern in das Zytoplasma der Zellen. Die Kultivierung der Makrophagen in Gegenwart des konditionierten Mediums induzierte eine Steigerung der Makrophagenmigration und deren Differenzierung zu Osteoklasten. Die Hemmung von HMGB1 in den Überständen reduzierte diese Effekte signifikant. Im Vergleich zu den konditionierten Überständen resultierte eine isolierte Stimulation mit HMGB1 nur in einer geringen Beeinflussung der Zielparame-ter.

Schlussfolgerungen. Die Daten weisen deutlich auf die immunmodulatorische Funktion von PDL-Zellen durch die Freisetzung von Mediatoren wie z. B. HMGB1 hin, welche dann die Migration und Differenzierung von Makrophagen während der parodontalen Umbauprozesse im Rahmen der kieferorthopädischen Zahnbewegung beeinflussen. Die Befunde erweitern zugleich die theoretische Basis für die Entwicklung therapeutischer Interventionsstrategien zur Vermeidung orthodontisch induzierter Wurzelresorptionen.

Schlüsselwörter

PDL-Zellen · Kieferorthopädische Zahnbewegung · HMGB1 · Makrophagen · Parodontale Regeneration

Einleitung

Die Einleitung einer kieferorthopädischen Zahnbewegung erfolgt in der Regel durch die Applikation einer mechanischen Kraft auf den Zahnhalteapparat, welche dann dessen mechanische Deformation mit komplex verteilter Kompressions-, Dehnungs- und Scherbelastung des Gewebes zur Folge hat [11]. Dies führt unausweichlich auch zum Stress von Zellen des Parodontalligaments (PDL) und zum Teil auch zu deren Untergang. In der Folge werden Umbauvorgänge in Gang gesetzt, bei denen initial die geschädigten Gewebeanteile durch Zellen des Immunsystems, durch Makrophagen, entfernt werden, bevor es zum Remodelingprozess mit Wiederherstellung eines funktionellen Zahnhalteapparates kommen kann [10]. Die Makrophagen werden durch Mediatoren (Zytokine, Chemokine), die von den PDL-Zellen des Zahnhalteapparates unter Stress freigesetzt werden, zur Migration in den Defektbereich angeregt und anschließend für die Beseitigung von nekrotischem Gewebe aktiviert.

Für den Abbau von Hartgeweben, wie Wurzelzement oder Alveolarknochen, differenzieren diese Zellen zu Osteoklasten. Fehlregulationen dieser Mechanismen führen einerseits zur Verlangsamung oder gar Stagnation der Zahnbewegung oder andererseits zum übermäßigen Abbau von dentalem Gewebe, welcher sich in Form von Knochendefekten oder Wurzelresorp-

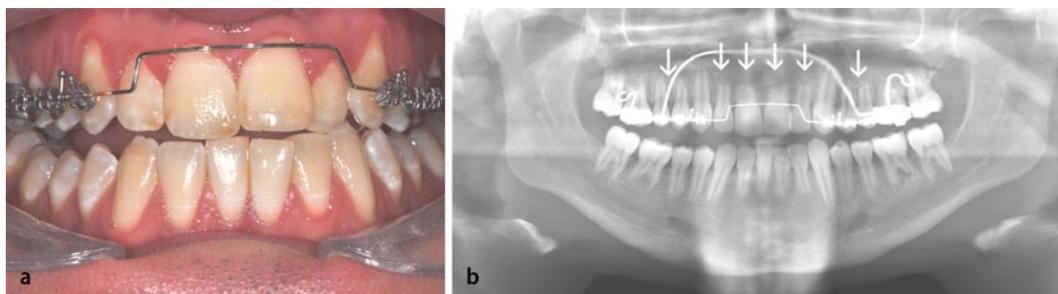


Figure 1. Intraoral view (a) and orthopantomogram (b) of a 22-year-old male patient during presurgical orthodontic treatment following maxillary expansion. After bonding braces for leveling and aligning, a passive stainless steel wire was inserted to avoid subjecting the teeth to additional mechanical forces. The visible root resorption of the four upper incisors (which included demonstrable mobility) was due to previous orthodontic treatment when the patient had still been in his teens. To avoid further resorption, the upper incisors and lower teeth were not incorporated into this presurgical orthodontic appliance

Abbildung 1. Intraorales Foto (a) und Orthopantomogramm (b) eines 22-jährigen Patienten nach chirurgisch unterstützter GNE am Beginn der Multibandbehandlung in der prächirurgischen Phase. Ein passiver Stahlbogen wurde zu intraoralen Stabilisierung eingesetzt. Auf Grund von im Rahmen einer früheren KFO-Therapie aufgetretenen Wurzelresorptionen der Zähne 12 bis 22 mit nachweisbarer Zahnlockerung wurden diese Zähne nicht in die Apparatur einbezogen

ensuing repair mechanisms and in regulating the macrophages taking part in these events [16]. Broadly speaking, PDL cells are a mixed population of heterogeneous cells mainly of the mesenchymal/fibroblastic phenotype. Being capable of forming a number of different periodontal tissue structures, they are physiologically present in periodontium in various stages of differentiation. Indeed, some authors have identified progenitor and stem cells among this mixed population [7, 12, 24, 29]. PDL cells also link the periodontium to the innate immune system. During tooth movement, they release proinflammatory mediators for macrophages to migrate from circulating blood into the newly formed tissue defect and even control the function of these macrophages during the ensuing repair process [6, 25, 30].

A key regulatory mediator that has been identified in this context is high-mobility group box 1 (HMGB1)—a chromatin-binding protein composed of 215 amino acids which initially resides mainly inside the cell nuclei [28]. HMGB1 has a dual function both as a coregulator of gene transcription and as an immunomodulator of sterile and bacterial necrosis by controlling the activity of macrophages [13, 25, 28]. During necrotic cellular processes, it is translocated from its nuclear position through the cytoplasm into the extracellular space, where it regulates the innate immune activity of macrophages by assuming the role of an “alarmin”. Thus HMGB1 initiates both physiological and—in the event of dysregulation—pathophysiological processes, and it launches tissue repair mechanisms [25] via binding to receptor for advanced glycation end products (RAGE) and Toll-like receptors 2 and 4 in the extracellular space [8].

Similar to the RANK/RANKL/OPG system (comprised of receptor activator of nuclear factor kappa-B, its ligand, and osteoprotegerin) described in bone, HMGB1 regulates essential functional parameters in the early phase of tissue remodeling by modulating chemotaxis, proliferation, differentiation, and proinflammatory cytokine expression by its macrophage target cells. Indications have also been supplied both for a chemotactic effect of HMGB1 on osteoclasts and osteoblasts during endo-

tionen manifestiert (Abbildung 1a, b). Derartige Effekte können in Abhängigkeit ihres Ausmaßes die geplante kieferorthopädische Therapie erheblich beeinflussen und in extremen Fällen sogar den Erhalt von betroffenen Zähnen gefährden. Daher sind Kenntnisse über die Physiologie und Pathophysiologie dieser Mechanismen im Rahmen der Zahnbewegung von zentraler Bedeutung, um fehlregulierte Prozesse rechtzeitig erkennen und vielleicht künftig durch geeignete Gegenmaßnahmen begrenzen zu können.

Aktuellen Studien zufolge sind die im geschädigten Gewebe verbleibenden PDL-Zellen für die Initiierung und Steuerung der Umbauprozesse und der damit verbundenen Regulation der Makrophagen von zentraler Bedeutung [16]. Allgemein sind die PDL-Zellen des Zahnhalteapparates eine heterogene Mischpopulation vorwiegend des mesenchymalen/fibroblastären Phänotyps, die physiologischerweise im Parodont in verschiedenen Differenzierungsstufen vorliegen und bei Bedarf die verschiedenen Gewebekomponenten des Zahnhalteapparates formieren können. Innerhalb dieser Mischpopulation beschreiben einige Autoren auch das Vorkommen von Progenitor- und Stammzellen [7, 12, 24, 29].

Weiterhin stellen die PDL-Zellen eine Verbindung des Zahnhalteapparates zum innate Immunsystem dar. Durch das Freisetzen pro-inflammatorischer Mediatoren während der Zahnbewegung induzieren sie das Einwandern von Makrophagen aus dem Blutkreislauf in den entstandenen parodontalen Defekt und steuern darüberhinaus deren Funktion innerhalb der Umbauprozesse [6, 25, 30].

Als einer der zentralen regulatorischen Mediatoren in diesem Zusammenhang ist das „high mobility group box protein 1“ (HMGB1) identifiziert worden. HMGB1 ist ein aus 215 Aminosäuren aufgebautes, chromatinbindendes Protein, das zunächst primär im Zellkern lokalisiert ist [28] und eine duale Funktion hat. Neben einer Beteiligung an der Regulation der Gentranskription wurde für HMGB1 eine immunmodulatorische Bedeutung im Rahmen der sterilen und bakteriellen Nekrose im Sinne einer

chondral ossification and for activity on other immune cells [6, 30]. Yet little has been known about the role of HMGB1 in oral tissue and, specifically, in the regulation of periodontal repair. Kim et al. [13] recently showed that basal HMGB1 expression is present in PDL cells and can be stimulated with traditional proinflammatory cytokines (IL-1 β , IL-6, IL-17, RANKL).

Furthermore, investigators have found HMGB1 to be upregulated in crevicular fluid of periodontally diseased patients compared to healthy individuals, suggesting that this protein is a marker for ongoing periodontal repair, which might be useful in monitoring the progression of tissue loss during periodontitis [20]. An ongoing discussion relating to the above-mentioned RANK/RANKL/OPG system has been that HMGB1 may be needed for RANKL-induced osteoclast differentiation of macrophages [30], which would indicate the existence of a close relationship between both of these key proteins as a function of periodontal repair during orthodontic tooth movement.

Our goal in conducting the present study was to collect more information about regulatory functions exerted by mediators released from PDL cells during orthodontic tooth movement. We did so by analyzing the effect of these mediators on macrophage migration from blood into the defect area to initiate tissue repair. Part of this question was to analyze differentiation of these migrated macrophages into osteoclasts capable of resorbing hard tissue structures in order to shed light on the phenomenon of root resorption and bone defects during orthodontic treatment. More specifically, our goal was to elucidate the immunomodulatory role of HMGB1 in regulating these repair events to support the quest for an interventional treatment modality enabling us to actively control repair mechanisms during tooth movement, as to prevent progressive root resorption when dysregulation occurs, hypothesizing that HMGB1 is a key player by regulating macrophage physiology along with other mediators released by PDL cells.

Materials and methods

All experiments performed in this study were reviewed and approved by the University of Bonn institutional ethics and animal welfare commissions.

Rat model of orthodontic tooth movement in vivo

Waldo's model of orthodontic tooth movement was used to analyze HMGB1 protein expression in an in vivo environment during orthodontic tooth movement (Figure 2a, [19, 27]). Orthodontic forces were applied to the first molars of 3-month-old Wistar rats (n=5) for 5 days, which resulted in noticeable mesial movement of the first molars as a result of force application. Untreated animals were used as controls (n=5). The specimens were collected, embedded in paraffin, and prepared for immunohistochemistry. HMGB1 expression was immunohistochemically demonstrated using the peroxidase-anti-peroxidase (PAP) method at a pre-established antibody concentration of 1:200 (anti-HMGB1 s-2399, Epitomics, USA) followed by microscopic analysis. The specificity of the immune

Steuerung der Aktivität der Makrophagen nachgewiesen [13, 25, 28]. Im Verlauf von nekrotischen Zellprozessen wird HMGB1 aus seiner nuklearen Position in das Zytoplasma und weiter in den Extrazellulärraum transloziert und reguliert dort in der Funktion eines „Alarmins“ die innate Immunaktivität der Makrophagen. Somit ist HMGB1 für die Einleitung von physiologischen aber auch, bei Fehlregulation, für die Entstehung von pathophysiologischen Prozessen verantwortlich. Im Extrazellulärraum bindet HMGB1 an den „receptor for advanced glycation end products“ (RAGE) und die Toll-like-Rezeptoren 2 und 4 [8] und initiiert damit die Umbauprozesse im Gewebe [25].

Ähnlich zu dem im Knochen beschriebenen RANK/RANKL/OPG-System reguliert HMGB1 essenzielle funktionelle Parameter innerhalb der frühen Umbauprozesse über Veränderungen der Chemotaxis, Proliferation, Differenzierung und der Expression von proinflammatorischen Zytokinen in den Zielzellen, den Makrophagen. Es gibt zudem Hinweise, dass HMGB1 chemotaktisch auf Osteoklasten und Osteoblasten während der enchondralen Ossifikation und darüber hinaus auf andere Immunzellen wirkt [6, 30]. Für den Bereich der oralen Gewebe ist allerdings bisher nur wenig über die Rolle von HMGB1 in der Regulation von Umbauvorgängen im Zahnhalteapparat bekannt. Kürzlich wurde von Kim et al. [13] eine basale HMGB1-Expression in PDL-Zellen nachgewiesen, die sich nach Stimulation mit den klassischen pro-inflammatorischen Zytokinen IL-1 β , IL-6, IL-17 und RANKL steigern ließ.

Auch in der Sulkusflüssigkeit von parodontal erkrankten Personen konnte eine erhöhte Menge an HMGB1-Protein im Vergleich zu gesunden Probanden nachgewiesen werden [20]. Diese Autoren weisen HMGB1 als einen Marker für im Zahnhalteapparat ablaufende Umbauprozesse aus, welcher auch als Parameter einer Progression von parodontalem Gewebeuntergang im Rahmen einer Parodontitis interpretiert wird [20]. Im Zusammenhang mit dem bereits genannten RANK/RANKL/OPG System wird die Notwendigkeit von HMGB1 für die RANKL induzierte osteoklastische Differenzierung von Makrophagen diskutiert [30]. Dies weist auf einen zentralen Zusammenhang dieser beiden Schlüsselproteine im Rahmen der parodontalen Umbauprozesse während der kieferorthopädischen Zahnbewegung hin.

Das Ziel der vorliegenden Studie war es, weitere Informationen über den regulatorischen Einfluss von Mediatoren zu erlangen, die von den PDL-Zellen des Zahnhalteapparates während der kieferorthopädischen Zahnbewegung freigesetzt werden. Dabei sollte der Einfluss dieser Mediatoren auf die Migration von Makrophagen aus dem Blut in den Defektbereich für die Initiierung der erforderlichen Umbauprozesse analysiert werden. Innerhalb dieser Fragestellung sollte auch die Differenzierung von Makrophagen zu Osteoklasten zum Abbau von Hartsubstanzen in die Untersuchung einbezogen werden, um Rückschlüsse auf das Auftreten von Wurzelresorptionen und Knochendefekten im Rahmen von kieferorthopädischen Behandlungen ziehen zu können. Hier wurde speziell der immunmodulatorische Einfluss von HMGB1 auf die Regulation dieser Umbauprozesse analysiert, um Information für eine mögliche therapeutische Intervention zur aktiven Steuerung von Umbau-

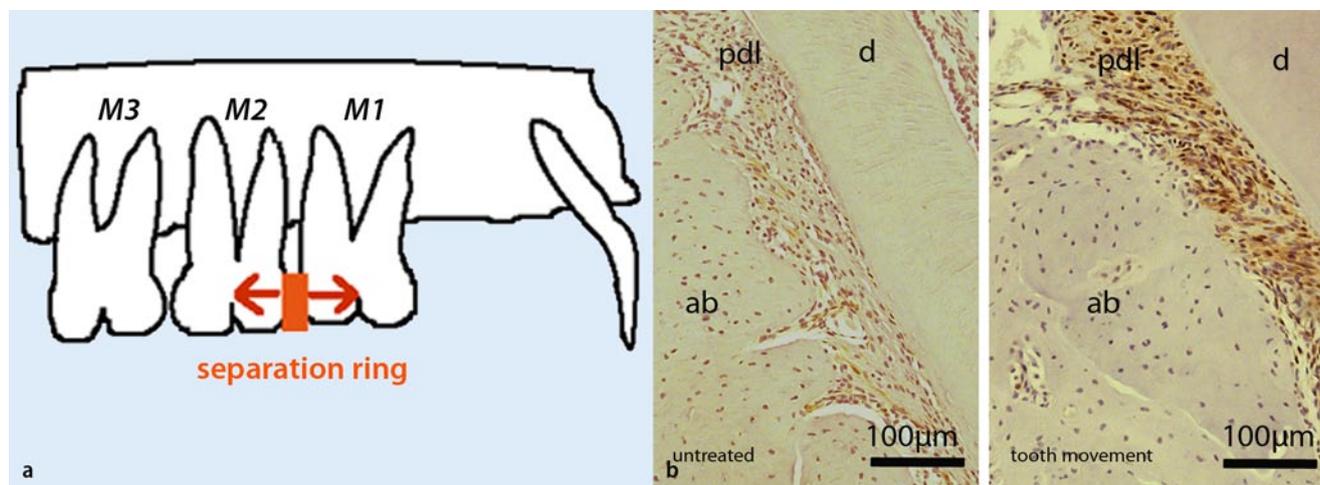


Figure 2. a Illustration of the model used to induce orthodontic tooth movement in the rat according to the method of Waldo et al. [27]. **b** Following orthodontic treatment for 5 days, in compression sides HMGB1 protein was translocated from its nuclear position into the cytoplasm and further to the extracellular space in the treated groups (ab alveolar bone, d dentin, pdl periodontal ligament, DAB staining; magnification 200:1).

Abbildung 2. a Die kieferorthopädische Zahnbewegung im Tiermodell nach der Methode von Waldo et al. [27] führte zu einer verstärkten Expression von HMGB1 durch die PDL-Zellen im Zahnhalteapparat. **b** Die Expression war vor allem in den Bereichen der Druckzone sichtbar. Nach 5-tägiger Kraftapplikation zeigte sich im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe eine Freisetzung des im Zellkern befindlichen HMGB1-Proteins in den Extrazellularraum. Immunhistochemischer Nachweis von HMGB1 im Zahnhalteapparat bei Vergr. 200:1 (ab Alveolarknochen, d Dentin, pdl Parodontalligament, DAB-Färbung)

reactions was verified by including negative controls with (1) omission of the primary antibody, (2) replacement of both the primary and secondary antibodies with TBS/BSA, and (3) substitution of a nonspecific immunoglobulin (1:10 dilution) for the antibodies. Tissue sections which included a significant amount of the antigen to be investigated served as positive controls.

In addition to these in vivo experiments, three different in vitro approaches were pursued to investigate effects of HMGB1 and other mediators released from stressed human PDL cells on macrophage physiology. To this end, macrophages were stimulated with different compositions of cell medium, including (1) conditioned medium of stressed PDL cells (see below); (2) conditioned medium with addition of anti-HMGB1 antibodies at an excess amount of 500 ng/ml to effectively inhibit HMGB1 activity; and (3) nonconditioned medium with addition of HMGB1 protein at the same concentration of 11 ng/ml that was also measured in the conditioned medium of stressed PDL cells.

Collection of human PDL cells

PDL cells were derived by isolating cells from the middle root third of human premolars exhibiting no signs of periodontitis, which had been extracted in two patients 12 and 14 years of age as part of orthodontic treatment after written consent had been obtained along with approval for experimental use from their parents. PDL cells thus collected were cultured in DMEM (Dulbecco's modified Eagle's media) cell medium with 10% fetal bovine serum and 0.5% antibiotics (penicillin and streptomycin 5000 U/ml each; Biochrom, Berlin, Germany) using a 5% CO₂ atmosphere with 100% relative humidity at 37°C. Ex-

prozessen im Rahmen der Zahnbewegung, wie z. B. der Prävention von fortschreitenden Resorptionen der Zahnwurzel bei Fehlregulation, zu erlangen.

Wir gingen dabei von der Hypothese aus, dass HMGB1 in diesem Prozess einen zentralen Faktor darstellt, der im Zusammenhang mit anderen von PDL-Zellen freigesetzten Mediatoren die Physiologie der Makrophagen reguliert.

Material und Methoden

Alle experimentellen Abläufe wurden von der Ethikkommission und der Tierschutzkommission der Universität Bonn geprüft und genehmigt.

Orthodontische Zahnbewegung in vivo am Rattenmodell

Zur Analyse der HMGB1-Proteinexpression in einer In-vivo-Umgebung während der kieferorthopädischen Zahnbewegung wurde das von Waldo etablierte Modell der orthodontischen Zahnbewegung verwendet (Abbildung 2a, [19, 27]). Die Zahnbewegung erfolgte für einen Zeitraum von 5 Tagen am ersten Molaren im Oberkiefer von 3 Monate alten Wistar-Ratten (n=5). Als Folge der Krafteinwirkung zeigte sich eine erkennbare Mesialbewegung des ersten Molaren. Unbehandelte Tiere (n=5) dienten der Kontrolle. Anschließend erfolgte die Einbettung der Proben in Paraffin sowie die Vorbereitung für die Immunhistochemie. Der immunhistochemische Nachweis der HMGB1-Expression erfolgte nach der PAP-Methode bei einer zuvor etablierten Antikörperkonzentration von 1:200 (anti-HMGB1 s-2399, Eptomics, USA) mit anschließender mikroskopischer Analyse [19]. Zur Sicherstellung der Spezifität der

periments were preceded by characterizing the PDL cells following a previously reported protocol [18].

In vitro experiments and compressive stressing

Fifth-passage human PDL cells were placed in 6-well plates on cover glasses in RPMI (Roswell Park Memorial Institute medium) 1640 cell medium with addition of 10% fetal calf serum and were cultured until confluence. Before induction of compressive mechanical stress, cells were cultured under serum-free conditions for 8 h. Then they were stressed by application of a cover glass with appropriate weights of 4 g/cm² for a period of 24 h, in accordance with the protocol reported by Nakajima et al. [21]. Next the supernatants that contained the mediators released from the PDL cells (here referred to as "conditioned medium") were collected. Supernatants of untreated PDL cells served as controls.

Immunocytochemistry

To demonstrate basal HMGB1 expression of PDL cells and translocation of the protein from nucleus to cytoplasm following compressive insult, its presence was demonstrated by immunocytochemical analysis of PDL cells cultured on cell carriers with subsequent visualization of the immune reaction by fluorescence microscopy using the above primary antibody (anti-HMGB1 s-2399; Epitomics; 1:200) combined with a secondary fluorescent antibody (Invitrogen, Germany).

Western blot analysis

The specificity of the anti-HMGB1 antibody was verified by western blot analysis of the conditioned supernatants, using a previously reported standard protocol with an antibody dilution of 1:10,000 [6].

Enzyme-linked immunosorbent assay

To quantify HMGB1 protein expression of PDL cells both under standard culture and under compressive loading conditions, a commercially acquired enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit was used in accordance with manufacturer's recommendations (Chondrex, USA).

Macrophage culture

Monocytes derived from two healthy donors were isolated from the University of Bonn Medical School blood bank and converted to macrophages via an established 7-day differentiation protocol using RPMI 1640 cell medium with addition of 10% fetal calf serum and 100 ng/ml granulocyte/macrophage colony stimulating factor (GM-CSF; Berlex Laboratories, USA) [15].

Inhibition of HMGB1

To analyze its specific effect in the conditioned supernatants, the HMGB1 protein was blocked by a specific anti-HMGB1 antibody (see above) at a saturating dose of 500 ng/ml. To ensure complete inhibition, the antibody was added to the supernatants in accordance with an established protocol 8 h before

Immunreaktionen wurden Negativkontrollen unter Weglassen 1) des primären Antikörpers, 2), des primären und sekundären Antikörpers und Verwendung von TBS/BSA stattdessen, 3) sowie die Substitution der Antikörper mit einem unspezifischen Immunglobulin in 1:10 Verdünnung mitgeführt. Gewebeschnitte, die eine signifikante Menge von dem zu untersuchenden Antigen beinhaltenen, dienten als Positivkontrolle.

Neben diesem In-vivo-Experiment wurden drei verschiedene In-vitro-Ansätze verfolgt, um den Einfluss von HMGB1 und anderen Mediatoren, die durch humane PDL-Zellen unter Stress freigesetzt werden, auf die Physiologie von Makrophagen zu untersuchen.

Hierfür erfolgten Stimulationen der Makrophagen mit Zellmedium unterschiedlicher Zusammensetzung:

1) konditioniertes Zellmedium von gestressten PDL-Zellen (s. unten); 2) Hemmung der HMGB1-Wirkung in dem konditionierten Zellmedium durch Applikation von 500 ng/ml HMGB1-Antikörper; 3) Supplementierung des Zellkulturmediums mit einer HMGB1-Protein in einer Konzentration von 11 ng/ml. Diese wurde zuvor nach mechanischer Belastung von PDL-Zellkulturen im Überstand gemessen.

Gewinnung der PDL-Zellen

Humane PDL-Zellen wurden durch Isolation der Zellen von den Wurzeln extrahierter Prämolaren von zwei jugendlichen Patienten im Alter von 12 und 14 Jahren gewonnen. Die Zähne wiesen keinerlei Zeichen einer Parodontitis auf. PDL-Zellen wurden jeweils aus dem mittleren Wurzeltrittel isoliert. Die Extraktionen der Spenderzähne erfolgten im Rahmen einer orthodontischen Therapie mit dem schriftlichen Einverständnis der Erziehungsberechtigten und der Genehmigung zur Verwendung für Studienzwecke. Die Kultivierung der gewonnenen PDL-Zellen erfolgte in DMEM-Zellmedium unter Zusatz von 10% fetalem Kälberserum (FCS) und 0,5% Antibiotika (5000 U/ml Penicillin und 5000 U/ml Streptomycin; Biochrom, Berlin, Deutschland) bei 37°C und 100% Luftfeuchtigkeit mit 5% CO₂. Vor der experimentellen Verwendung fand eine Charakterisierung der PDL-Zellen nach einem bereits beschriebenen Protokoll statt [18].

In-vitro-Experimente, Induktion von kompressivem mechanischen Stress

PDL-Zellen der fünften Passage wurden in 6-Well-Platten auf Deckgläsern in RPMI1640 Zellmedium mit 10% FCS versetzt und bis zur Konfluenz kultiviert. Vor Induktion von kompressivem mechanischem Stress wurden die Zellen für 8 h unter Serum-freien Bedingungen kultiviert. Anschließend wurden die Zellen durch Applikation eines Deckglases und entsprechenden Gewichten von 4 g/cm² für einen Zeitraum von 24 h nach Protokoll von Nakajima et al. [21] gestresst. Im Anschluss wurden die Zellkulturüberstände, die die von den PDL-Zellen freigesetzten Mediatoren enthielten („konditioniertes Medium“), gesammelt. Der Überstand von unbehandelten PDL-Zellen diente jeweils der Kontrolle.

the macrophage experiments were started [26]. Preliminary experiments were performed to test application of the antibody, which was found to be effective and not to cause any changes to relevant parameters by itself.

Migration assay

A commercially acquired transwell migration assay (Corning, USA) was used to investigate the chemotactic influence of HMGB1 and other mediators on macrophage migration. The lower chamber of the transwell system was filled either with regular culture medium (control group) or with the aforementioned conditioned media. Macrophages were introduced into the upper chamber. After 24 h, it was determined how many of the macrophages had migrated into the lower chamber [14].

Osteoclast differentiation

To analyze the effect of HMGB1 and other mediators released by PDL cells on osteoclast differentiation of macrophages, the latter were cultured either with addition of 100 ng/ml macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) as controls or in combination with the test media described (1–3) on cell carriers for a period of 8 days. This was followed by tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) staining to visualize osteoclast differentiation and quantitation by area measurements of TRAP-positive cell areas using Axiovision software (Zeiss, Germany) [5, 31].

Statistical analysis

Each of the graphs illustrating the results of various cell culture experiments show mean values \pm SEM based on a total of six independent samples per group. Statistical significance was determined by analysis of variance and Bonferroni's post-test. Differences were considered significant at $p \leq 0.05$.

Results

HMGB1 expression in vivo after orthodontic tooth movement in rats

To demonstrate that HMGB1 has a role in the regulation of tooth movement, an established rat model was used to analyze basal HMGB1 expression and the way this expression would have changed after 5 days of orthodontic force application for tooth movement. Analysis of HMGB1 in periodontium by immunohistochemistry revealed both a marked increase in HMGB1 expression by PDL cells and release of HMGB1 protein into the extracellular space after force application compared to untreated controls (Figure 2b).

HMGB1 expression in vitro after mechanical compression of human PDL cells

A previously established cell culture model of compressive loading was used to further examine the changed pattern of HMGB1 expression by PDL cells as observed in the rat model. Human PDL cells were stimulated by compressive load application to release inflammatory mediators, thus, inducing stress

Immunocytochemie

Zur Dokumentation der basalen HMGB1-Expression von PDL-Zellen und dem Nachweis der Translokation des Proteins aus seiner nukleären Position in das Zytoplasma in Folge von kompressivem mechanischem Stress erfolgte der immunzytochemische Proteinnachweis von HMGB1 anhand von auf Zellträgern kultivierten PDL-Zellen mit anschließender fluoreszenzmikroskopischer Visualisierung der Immunreaktion. Dabei kamen der bereits zuvor beschriebene Primärantikörper (anti-HMGB1 s-2399, Epitomics, USA, 1:200) in Kombination mit einem sekundären Fluoreszenzantikörper (Invitrogen, Deutschland) zur Anwendung.

Westernblot

Die Spezifität des HMGB1-Antikörpers wurde durch Westernblot-Analyse der konditionierten Überstände nach einem zuvor beschriebenen Standardprotokoll bei einer Antikörperverdünnung von 1:10.000 verifiziert [6].

HMGB1-ELISA

Zur Quantifizierung der HMGB1-Proteinexpression von PDL-Zellen unter Standardkulturbedingungen sowie kompressiver mechanischer Belastung wurde ein kommerziell erworbenes ELISA („enzyme-linked immunosorbent assay“-Kit nach Herstellerangaben angewandt (Chondrex, USA).

Makrophagenkultur

Monozyten zweier gesunder Spender wurden aus Blutkonserven der Blutbank des Universitätsklinikums Bonn isoliert und anschließend durch Anwendung eines etablierten Differenzierungsprotokolls in RPMI1640-Zellmedium, das mit 10% FCS und 100 ng/ml GM-CSF (Berlex Laboratories, USA) versetzt war, über 7 Tage zu Makrophagen differenziert [15].

Hemmung des HMGB1-Proteins

Um den spezifischen Effekt von HMGB1 in den konditionierten Überständen zu analysieren, wurde dieses Protein durch einen spezifischen Antikörper (s. oben) in einer sättigenden Dosis von 500 ng/ml blockiert. Um eine vollständige Hemmung des HMGB1-Proteins zu gewährleisten, wurde der HMGB1-Antikörper gemäß einem etablierten Protokoll jeweils 8 h vor Beginn der Makrophagenversuche zu den Überständen gegeben [26]. Die Wirksamkeit wurde in Vorversuchen bestätigt. Die Antikörperapplikation allein führte zu keiner Veränderung der untersuchten Parameter.

Migrationsassay

Um den chemotaktischen Einfluss von HMGB1 und anderen Mediatoren auf die Zellmigration von Makrophagen zu untersuchen, wurde ein kommerziell erworbener Transwell-Migrations-Assay genutzt (Corning, USA). Dafür wurde jeweils die untere Kammer des Transwell-Systems mit regulärem Zellkultur-Medium zur Kontrolle oder mit den bereits beschriebenen konditionierten Medien gefüllt. In die obere Kammer wurden Makrophagen eingebracht. Nach 24 h wurde mittels Mikro-

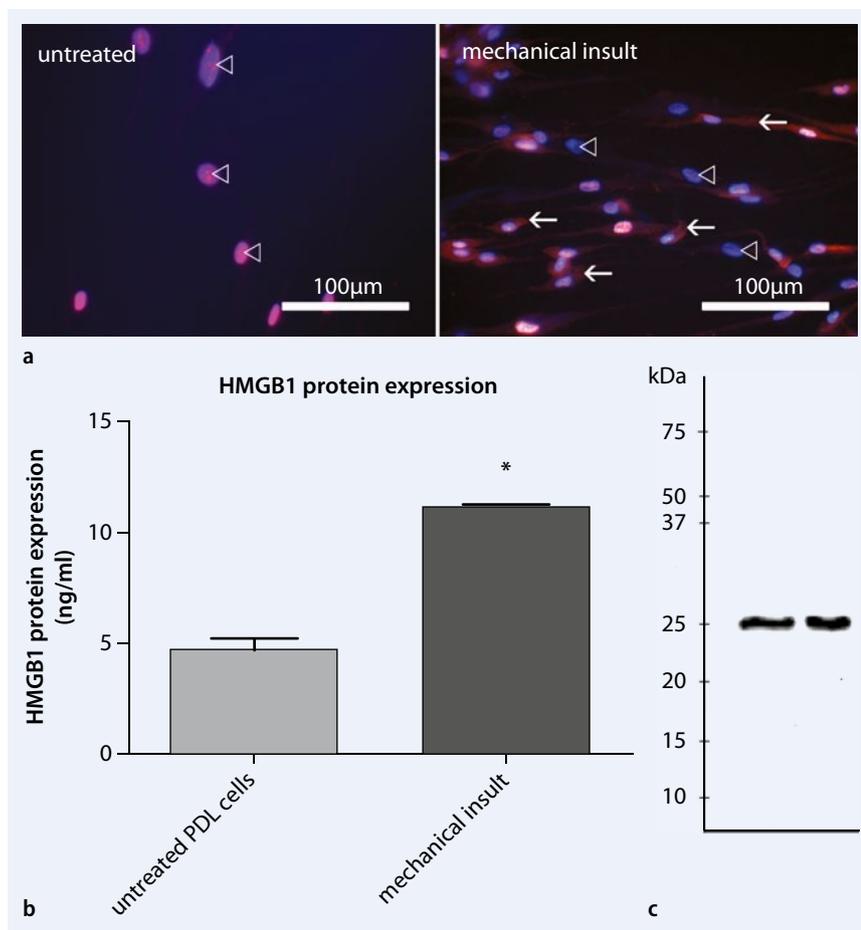


Figure 3. a Immunohistochemical in vitro staining showing the translocation of HMGB1 protein from its nuclei position (*open arrow*) through cytoplasm (*arrow*) into the extracellular space of PDL cells induced by compressive force application (magnification 400:1). **b** Quantification of HMGB1 released into the supernatant of cultured human PDL cells by ELISA showed a basal expression of the protein under physiological conditions (control medium) that was significantly increased following mechanical insult. The bar graph shows the mean \pm SEM of 6 independent cultures. * $p < 0.05$, experimental group vs. untreated cell cultures (control medium). **c** Antibody specificity was proven by western blot analysis yielding the characteristic 25 kDa band

Abbildung 3. a Immunohistochemischer In-vitro-Nachweis der Translokation von HMGB1-Protein vom Zellkern (*offener Pfeil*) in das Zytoplasma (*Pfeil*) und weiter in den Extrazellularraum unter mechanischem PDL-Zellstress (Vergr. 400:1). **b** Die Freisetzung von HMGB1 aus der Zelle in den Extrazellularraum wurde anhand der Proteinmenge im Zellkulturüberstand quantifiziert. Unter Stress kommt es zu einer signifikanten Steigerung der HMGB1-Expression im Vergleich zu den unbehandelten PDL-Zellen. Der Graph zeigt die Mittelwerte \pm SEM von 6 unabhängigen Zellkulturen. * $p < 0,05$, experimentelle Gruppe vs. unbehandelte Kontrolle. **c** Die Spezifität des HMGB1-Antikörpers wurde durch Westernblot-Analyse der konditionierten Überstände verifiziert. Das Ergebnis zeigt die erwartete Bande bei 25 kDa

in the cells similar to orthodontically induced stress in periodontium. Analysis by fluorescent immunocytochemical labeling of PDL cells revealed translocation of HMGB1 protein from nucleus to cytoplasm (Figure 3a). By evaluating protein concentrations in the cell supernatants, it became clear that HMGB1 was also released into the extracellular space. HMGB1 expression was significantly upregulated in stressed versus non-stressed PDL cells. While HMGB1 concentrations of 4.67 ± 1.08 ng/ml were measured in nonconditioned standard media, induction of stress entailed a significant increase to 11.15 ± 0.28 ng/ml (Figure 3b). Western blot analysis of cell supernatants, performed with the same antibody, yielded the expected typical band at 25 kDa (Figure 3c).

Effects of HMGB1 released by human PDL cells on macrophage migration

The effect of mediator release on macrophage migration toward PDL cells stressed by simulated tooth movement was studied in transwell migration assays. Compared to the controls, distinctly more macrophages were observed to migrate into medium conditioned by stressed PDL cells than into non-conditioned control medium (Figure 4a, b). To assess the specific impact of HMGB1 on the interaction between PDL cells

skopie die Menge der in die untere Kammer migrierten Makrophagen bestimmt [14].

Osteoklastendifferenzierung

Zur Analyse des Einflusses von HMGB1 und anderen von PDL-Zellen freigesetzten Mediatoren auf die osteoklastäre Differenzierung von Makrophagen wurden Makrophagen in einem Standarddifferenzierungsmedium, versetzt mit 100 ng/ml GM-CSF, als Kontrolle oder in Kombination mit den beschriebenen Versuchsmedien (1–3) für einen Zeitraum von 8 Tagen auf Zellträgern kultiviert. Anschließend erfolgte zur Visualisierung der Osteoklastendifferenzierung eine Färbung der Tartrat-resistenten sauren Phosphatase (TRAP) und die Quantifizierung anhand von Flächenmessungen von TRAP positiven Zellarealen unter Verwendung der Software Axiovision (Zeiss, Deutschland; [5, 31]).

Statistische Analyse

Bei der statistischen Analyse der Zellkulturexperimente repräsentiert jeder Graph den Mittelwert \pm SEM von insgesamt 6 unabhängigen Proben pro Gruppe ($n=6$). Die statistische Signifikanz wurde durch die Anwendung des ANOVA und den

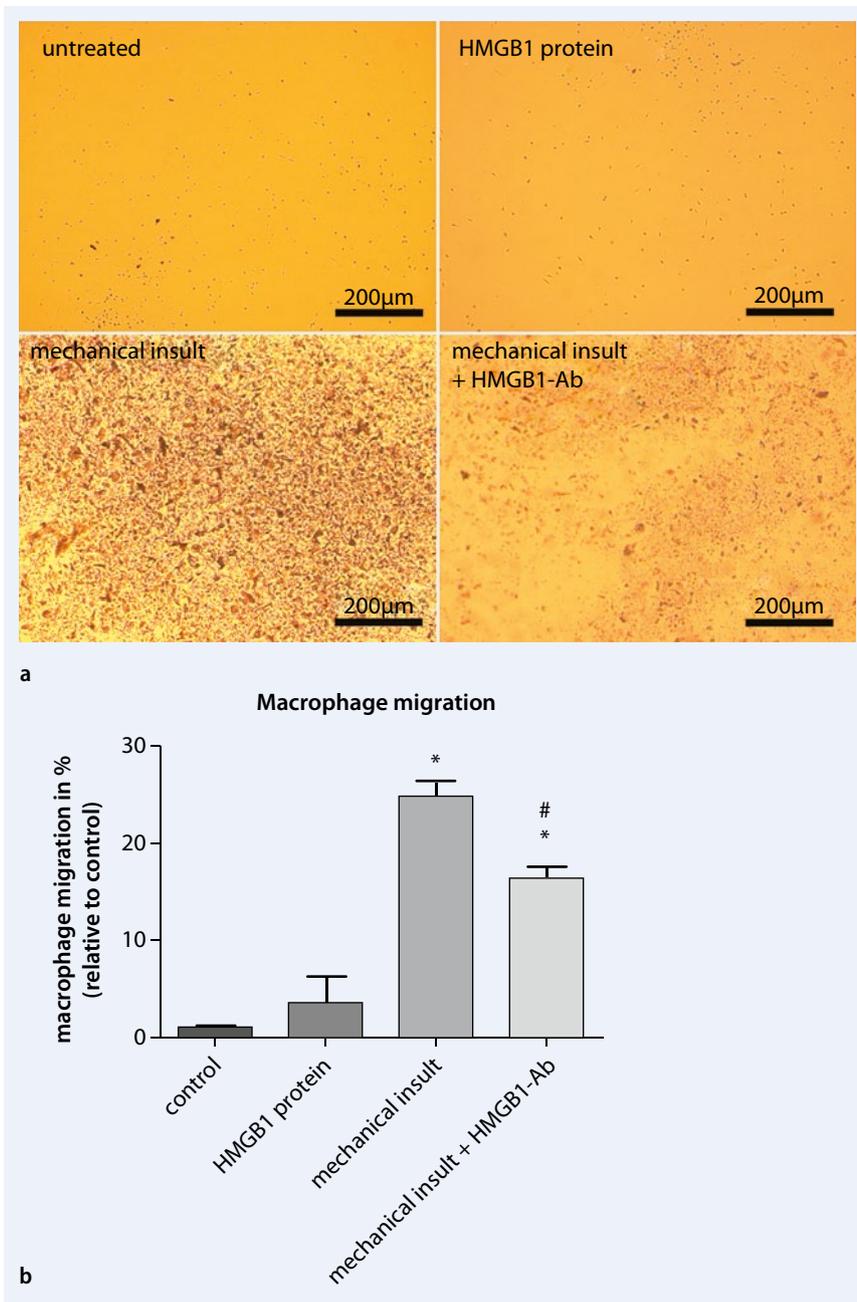


Figure 4. a Transwell assays were performed to investigate chemotactic cell migration of macrophages. The upper chamber was filled with macrophages. The lower chamber was filled with different conditioned cell culture supernatants. After 24 h of incubation, migrated cells were visualized microscopically. **b** Histomorphometric quantification of migrated macrophages. The bar graph shows the mean \pm SEM of 6 independent cultures. * $p < 0.05$, experimental group vs. untreated control; # $p < 0.05$, experimental group vs. conditioned medium from mechanically stressed specimens

Abbildung 4. a Zum Nachweis des chemotaktischen Einflusses der freigesetzten Mediatoren auf die Migration von Makrophagen wurden Migrationsassays durchgeführt. In die obere Zellkammer des Transwell-Systems wurden Makrophagen appliziert, die untere wurde mit den verschiedenen konditionierten Zellkulturüberständen befüllt. Nach 24 h erfolgte anhand fluoreszenzmikroskopischer Aufnahmen die Quantifizierung der migrierten Makrophagen in die untere Zellkammer. **b** Histomorphometrische Quantifizierung der migrierten Makrophagen. Der Graph zeigt die Mittelwerte \pm SEM von 6 unabhängigen Zellkulturexperimenten. * $p < 0,05$, experimentelle Gruppe vs. unbehandelte Kontrolle; # $p < 0,05$, experimentelle Gruppe vs. Makrophagen, die mit dem konditionierten Medium von mechanisch gestressten PDL-Zellen kultiviert wurden

and macrophages, the HMGB1 in the supernatants of stressed PDL cells was blocked by adding an excess of anti-HMGB1 antibodies. As a result, migration of macrophages was attenuated but not eliminated (Figure 4a, b). To assess the effect of HMGB1 on macrophages in the absence of any unknown co-mediators of inflammation, the HMGB1 concentration of 11 ng/ml found to be released by stressed PDL cells was applied to nonconditioned medium in isolation. As a result, considerably less migration of macrophages was noted than with the same HMGB1 concentration in conditioned medium (Figure 4a, b).

Posttest nach Bonferoni ermittelt. Ein p-Wert $< 0,05$ wurde als signifikant angesehen.

Ergebnisse

In-vivo-Nachweis von HMGB1 nach orthodontischer Zahnbewegung

Zum Nachweis der Beteiligung von HMGB1 an der Regulation der Zahnbewegung wurde die basale Expression des Proteins und deren Veränderung im Rahmen der kieferorthopädischen Zahnbewegung in einem etablierten Tiermodell nach 5

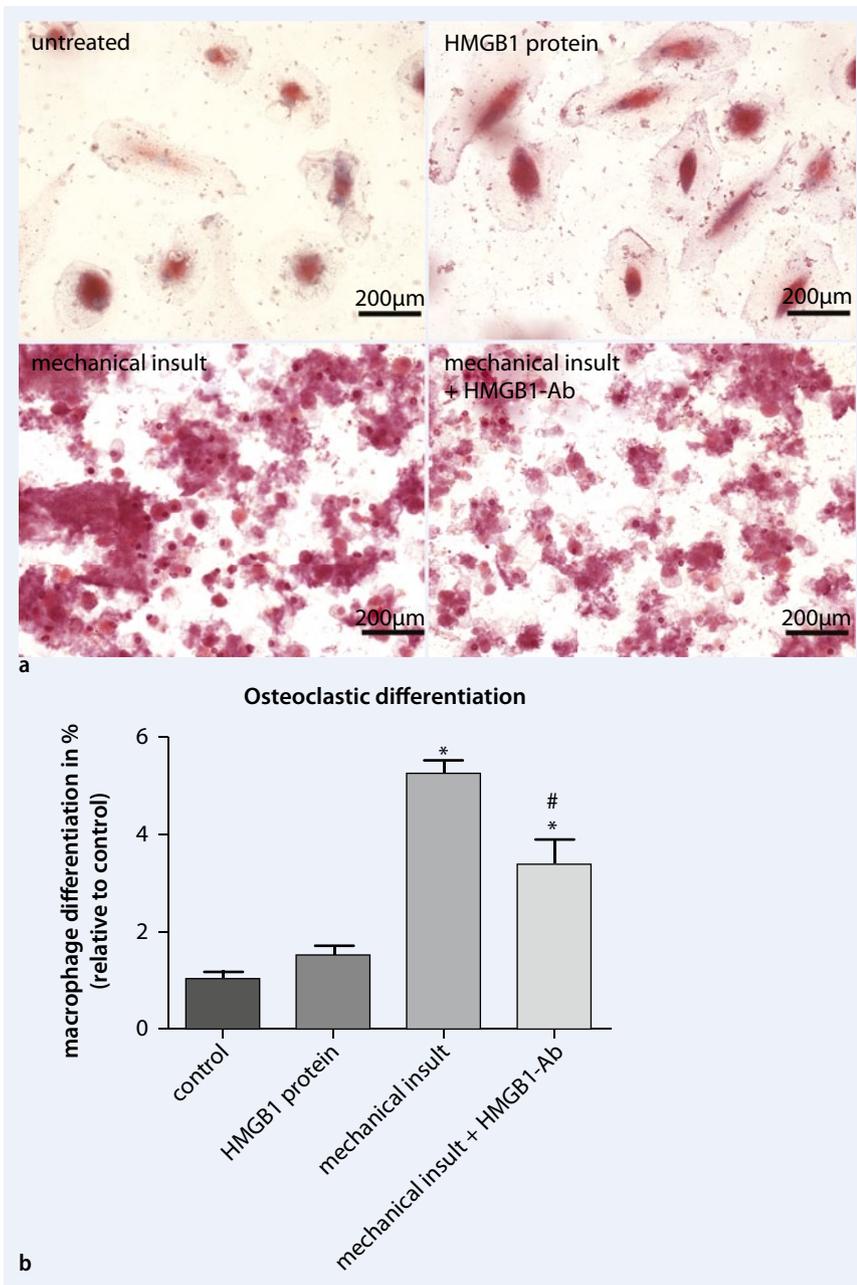


Figure 5. a Results obtained by TRAP staining for osteoclast differentiation of macrophages induced by stimulation with different conditioned cell culture supernatants from human PDL cells (magnification 200:1). **b** Histomorphometric quantification of TRAP-positive area. The bar graph shows the mean \pm SEM of 6 independent cultures. * $p < 0.05$, experimental group vs. untreated control; # $p < 0.05$, experimental group vs. conditioned medium from mechanically insulted specimens

Abbildung 5. a Anhand von TRAP-Färbungen (Vergr. 200:1) wurde die Differenzierung der Makrophagen zu Osteoklasten nach Stimulation mit den verschiedenen konditionierten Zellkulturüberständen von PDL-Zellen analysiert. **b** Histomorphometrische Quantifizierung der TRAP-positiven Areale. Der Graph zeigt jeweils die Mittelwerte \pm SEM von 6 unabhängigen Zellkulturexperimenten. * $p < 0,05$, experimentelle Gruppe vs. unbehandelte Kontrolle; # $p < 0,05$, experimentelle Gruppe vs. Makrophagen, die mit dem konditionierten Medium von mechanisch belasteten PDL-Zellen kultiviert wurden

Effects of HMGB1 released by human PDL cells on osteoclast differentiation

To analyze macrophage differentiation into osteoclasts capable of resorbing hard tissue, macrophages were cultured in medium conditioned by stressed PDL cells. After 8 days, the osteoclasts which had formed were quantitated by TRAP staining. Compared to the nonconditioned control medium, significantly increased formation of osteoclasts was noted in the conditioned medium. Blockade of HMGB1 by an excess amount of anti-HMGB1 antibodies significantly reduced the number of newly formed osteoclasts, and application of HMGB1 alone

Tagen Krafteinwirkung analysiert. Durch den immunhistochemischen Nachweis der HMGB1-Proteinexpression im Parodontium konnte gezeigt werden, dass es nach erfolgter Krafteinwirkung im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle zu einer deutlichen Expressionssteigerung und Proteinfreisetzung von HMGB1 durch PDL-Zellen in den Extrazellularraum kam (Abbildung 2b).

Nachweis der HMGB1-Expression auf zellulärer Ebene

Um das im Tiermodell beobachtete, veränderte HMGB1-Expressionsverhalten der PDL-Zellen in vitro weiter zu untersu-

to nonconditioned medium at 11 ng/ml was associated with considerably less extensive osteoclast differentiation than the equivalent HMGB1 concentrations present in conditioned medium (Figure 5a, b).

Discussion

Our results clearly show that mediators released from PDL cells during orthodontic tooth movement are capable of exerting immunomodulatory effects on macrophages and of influencing macrophage behavior in connection with periodontal repair. Cases of marked root resorption during orthodontic movement are an example of the PDL macrophage system being dysregulated, with migration and subsequent osteoclast differentiation of macrophages eventually resulting in loss of hard tissue. Numerous studies have shown that these remodeling mechanisms are regulated by mediators which are released inside the periodontium during tooth movement [1, 2, 4, 22].

This is the first study to demonstrate enhanced HMGB1 expression after orthodontic tooth movement in an animal model, thus, providing evidence that this protein has a role in periodontal repair mechanisms of this type. This demonstration was also an appropriate departure point for the *in vitro* experiments that followed and allowed us to show the translocation of HMGB1 protein from nucleus to cytoplasm in human PDL cells under conditions of mechanical compression. Similar translocation of the HMGB1 protein has been reported previously for other cell systems [23]. In addition, a recent study on human fibroblasts from gingiva revealed comparable amounts of HMGB1 secretion into culture medium following cell necrosis induced by heat treatment, and the same investigators also succeeded in triggering similar levels of HMGB1 secretion by stimulation with lipopolysaccharide [9].

In summary, the available results about macrophage migration and differentiation show that the factors released by stressed PDL cells are capable of modulating the behavior of macrophages. It is therefore reasonable to assume that the mechanisms involved in periodontal repair and regeneration are controlled by these mediators. In addition, the finding that mediators released by PDL cells induce differentiation of macrophages into osteoclasts demonstrates that these factors are capable of interacting with the immune system toward the causation of hard tissue resorption during periodontal repair, which ultimately, via remodeling of the alveolar bone, prepares the ground for teeth moving to a new position during orthodontic therapy.

It is documented that periodontal cells are exposed to compressive and tensile forces during tooth movement and that some areas may fall prey to necrosis [11]. Older co-culture experiments had already shown that PDL cells were capable of modifying the behavior of macrophages after stimulation with proinflammatory cytokines [15]. One of the most extensively documented factors responsible for osteoclast differentiation of macrophages is the RANKL protein [17]. In contrast to RANKL with its direct effect of osteoclast differentiation, HMGB1 is considered an indirect differentiation factor for osteoclasts [3].

chen, wurde ein bereits etabliertes Zellkulturmodell der kompressiven mechanischen Belastung gewählt. Dabei wurden die PDL-Zellen durch Druckbelastung, welche die Zellen vergleichbar zu der Situation im Zahnhalteapparat bei kieferorthopädischer Zahnbewegung mechanisch stresst, zur Freisetzung von inflammatorischen Mediatoren angeregt. Anhand der immunzytochemischen Fluoreszenzanalyse konnte bei den behandelten PDL-Zellen eine Translokation des HMGB1-Proteins aus dem Kern in das Zytoplasma dokumentiert werden (Abbildung 3a). Weiterhin wurde die Freisetzung von HMGB1 aus der Zelle in den Extrazellularraum anhand der Bestimmung der Proteinmenge im Zellüberstand nachgewiesen. Unter Stress kam es zu einer signifikanten Steigerung der HMGB1-Expression gegenüber den unbehandelten PDL-Zellen. Unter Standardkulturbedingungen betrug der HMGB1-Gehalt im Medium von unbehandelten Zellen $4,67 \pm 1,08$ ng/ml, nach induziertem Zellstress kam es zu einem signifikanten Anstieg des HMGB1 auf $11,15 \pm 0,28$ ng/ml (Abbildung 3b). Ein mit dem gleichen Antikörper durchgeführter Westernblot der Zellüberstände zeigte die erwartete Bande bei 25 kDa (Abbildung 3c).

Effekt auf die Makrophagenmigration

Um den Einfluss der freigesetzten Mediatoren auf das Migrationsverhalten von Makrophagen in Richtung der gestressten PDL-Zellen bei der Zahnbewegung zu untersuchen, wurden Transwell-Migrationsassays durchgeführt. Hier konnte nach 24 h eine deutliche Steigerung der Migration von Makrophagen in den Bereich des mit Mediatoren angereicherten Mediums im Vergleich zur Kontrollgruppe nachgewiesen werden (Abbildung 4a, b). Um den spezifischen Einfluss von HMGB1 während der Interaktion von PDL-Zellen und Makrophagen zu untersuchen, wurde das von PDL-Zellen freigesetzte HMGB1 in den Überständen durch eine im Überschuss applizierte Menge an HMGB1-Antikörper blockiert. Diese Blockierung resultierte in einer verminderten, aber nicht vollständigen Aufhebung der Migration der Makrophagen (Abbildung 4a, b). Zur Analyse der Wirkung von HMGB1 auf die Makrophagen ohne das Vorhandensein von anderen ebenfalls freigesetzten unbekanntem Entzündungsmediatoren wurde die unter Stressbedingungen freigesetzte Menge HMGB1 Protein von 11 ng/ml isoliert appliziert. HMGB1 allein übte in dieser Konzentration einen deutlich geringeren Einfluss auf die Migration von Makrophagen im Vergleich zu den konditionierten Zellüberständen aus (Abbildung 4a, b).

Einfluss auf die Osteoklastendifferenzierung

Zur Analyse des Einflusses dieser Mediatoren auf die Differenzierung von Makrophagen zu hartgewebeabbauenden Osteoklasten wurden die Makrophagen in Anwesenheit des konditionierten Zellmediums kultiviert. Nach 8 Tagen erfolgte die Quantifizierung der gebildeten Osteoklasten anhand von TRAP-Färbungen. Das konditionierte Medium führte zu einer signifikant gesteigerten Bildung von Osteoklasten gegenüber der Kontrollgruppe. Die Blockierung von HMGB1 durch eine im Überschuss applizierte Menge an HMGB1-Antikörper re-

We believe that extracellular secretion of HMGB1 causes macrophages to secrete RANKL, thus, contributing indirectly to the formation of osteoclasts. In this way, HMGB1 would seem to be a co-factor in the differentiation process. We were able to confirm this hypothesis by our finding that stimulation of macrophages with the entire cell-culture supernatant would greatly outperform stimulation with HMGB1 alone in terms of resultant osteoclast differentiation. Other investigations support this role of HMGB1 protein as a co-factor by demonstrating that its addition would stimulate macrophages to secrete the cytokines TNF- α , IL-6, IL-8, and IL-10 [3].

To further analyze the macrophage-regulating role of HMGB1 in our experiments, we neutralized its activity by adding an excess amount of anti-HMGB1 antibodies to the cell supernatant, which significantly attenuated its effects. No significant change was observed, by contrast, when HMGB1 was added by itself such that any unknown co-mediators were excluded. These results suggest that HMGB1 does have a regulatory role in the macrophage-related immune response associated with tooth movement, although its effects are linked to the activity of other proinflammatory cytokines, thus, being an indirect co-mediator. Both the migration and the osteoclast differentiation experiments show that macrophages would migrate and differentiate into osteoclasts considerable less when HMGB1 was specifically blocked. Compared to the supernatant which presumably contained multiple proinflammatory mediators, considerably less migration and osteoclast differentiation was found in nonconditioned media to which HMGB1 had been added exclusively. In a study on synovial fibroblasts, Wahamaa et al. [26] reported that HMGB1 caused distinctly less cytokine expression of TNF- α , IL-6, IL-8, and IL-10 when applied in isolation rather than in conjunction with other cytokines.

To our knowledge, this is the first study to analyze the role of HMGB1 protein in periodontal repair after cell stress induced by orthodontic situations. Its findings do disclose a key role of PDL cells and the mediators they release, in addition to revealing the specific role of HMGB1 as a co-regulator which, among other proinflammatory cytokines, has a significant regulatory effect on macrophage physiology and behavior during periodontal repair. In this way, the present study adds new insights into the physiology and pathophysiology of interactions between periodontal cells and immune cells of the macrophage type during orthodontic tooth movement. It would appear plausible—based on established concepts like arthritis therapy in orthopedics—to develop local forms of intervention with neutralizing drugs aimed at regulating HMGB1 to avoid progression of hard tissue damage in cases of diagnosed root resorption. Naturally, however, more research will be needed for such applications to materialize.

Acknowledgments

We wish to thank Inka Bay and Jana Marciniak for their technical support in carrying out the experiments. This study was

sultierte in einer signifikanten Reduktion der Anzahl der neu gebildeten Osteoklasten. HMGB1 allein führte in der gewählten Konzentration zu einer deutlich geringeren Differenzierung von Osteoklasten als unter dem Einfluss von konditioniertem PDL-Zellkulturüberstand (Abbildung 5a, b).

Diskussion

Die vorgestellte Studie macht deutlich, dass Mediatoren, die von PDL-Zellen im Rahmen der kieferorthopädischen Zahnbewegung freigesetzt werden, in der Lage sind, immunmodulatorisch auf Makrophagen zu wirken und deren Verhalten im Rahmen der parodontalen Umbauprozesse zu beeinflussen. Das Auftreten von ausgeprägten Wurzelresorptionen im Rahmen einer kieferorthopädischen Zahnbewegung ist ein Beispiel für eine Fehlregulation des PDL-Makrophagensystems, was mit übermäßiger Migration von Makrophagen und letztendlich Differenzierung zu Osteoklasten einhergeht und schließlich zu dem Abbau von Zahnhartsubstanz an der Zahnwurzel führt. Zahlreiche Studien [1, 2, 4, 22] haben gezeigt, dass diese Umbauprozesse durch Mediatoren, die innerhalb der Zahnbewegung im Zahnhalteapparat freigesetzt werden, reguliert werden.

Der erstmalige Nachweis einer gesteigerten HMGB1-Expression nach orthodontischer Zahnbewegung im Tiermodell belegt dessen vermutliche Beteiligung an den induzierten Umbauprozessen im Parodontium und ermöglicht die Überleitung zu dem im Rahmen dieser Arbeit verwendeten *in vitro* Modell. Unter Stressbedingungen, ausgelöst durch mechanische Druckbelastung, konnte erstmalig für humane PDL-Zellen die Translokation des im Zellkern befindlichen HMGB1-Proteins in das Zytoplasma gezeigt werden. Analog zu den eigenen Befunden an PDL-Zellen wurde diese Translokation des HMGB1-Proteins im Rahmen einer Zellnekrose bereits für andere Zellsysteme beschrieben [23]. Eine aktuelle Studie an humanen Fibroblasten der Gingiva konnte zudem eine zu unserer Studie mengenmäßig vergleichbare Ausschüttung von HMGB1 in das Zellkulturmedium nach induzierter Zellnekrose durch Hitzebehandlung nachweisen [9].

In der zitierten Untersuchung konnte auch durch Stimulation mit Lipopolysaccharid eine vergleichbare HMGB1-Sekretion ausgelöst werden. Zusammenfassend zeigen die vorliegenden Ergebnisse über die Migration und Differenzierung der Makrophagen, dass die von gestressten PDL-Zellen freigesetzten Faktoren in der Lage sind, das Verhalten von Makrophagen modulierend zu beeinflussen. Somit ist die Steuerung der parodontalen Umbau- und Regenerationsprozesse durch diese Mediatoren der PDL-Zellen anzunehmen. Weiterhin zeigt auch die Differenzierung der Makrophagen zu Osteoklasten durch die freigesetzten Mediatoren, dass diese Faktoren in der Lage sind, mit dem Immunsystem zu interagieren und so den Abbau von Hartgewebe innerhalb des Gewebeumbaus zu induzieren. Dies ermöglicht letztendlich durch den Umbau des Alveolarknochens die Bewegung des Zahnes in eine neue Position im Rahmen der kieferorthopädischen Therapie.

supported by the German Research Foundation (DFG, KFO 208; LO-1181/2-2) and the University of Bonn Medical School.

Conflict of interest

On behalf of all authors, the corresponding author states that there are no conflicts of interest.

References

1. Alhashimi N, Frithiof L, Brudvik P et al (1999) Chemokines are upregulated during orthodontic tooth movement. *J Interferon Cytokine Res* 19:1047–1052
2. Alhashimi N, Frithiof L, Brudvik P et al (2001) Orthodontic tooth movement and de novo synthesis of proinflammatory cytokines. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 119:307–312
3. Andersson U, Wang H, Palmblad K et al (2000) High mobility group 1 protein (HMG-1) stimulates proinflammatory cytokine synthesis in human monocytes. *J Exp Med* 192:565–570
4. Baba S, Kuroda N, Arai C et al (2011) Immunocompetent cells and cytokine expression in the rat periodontal ligament at the initial stage of orthodontic tooth movement. *Arch Oral Biol* 56:466–473
5. Barka T, Anderson P (1962) Histochemical methods for acid phosphatase using hexazonium as a coupler. *J Histochem Cytochem* 10:741–753
6. Charoonpatrong K, Shah R, Robling AG et al (2006) HMGB1 expression and release by bone cells. *J Cell Physiol* 207:480–490
7. Chen SC, Marino V, Gronthos S et al (2006) Location of putative stem cells in human periodontal ligament. *J Periodontol Res* 41:547–553
8. Dumitriu IE, Baruah P, Valentinis B et al (2005) Release of high mobility group box 1 by dendritic cells controls T cell activation via the receptor for advanced glycation end products. *J Immunol* 174:7506–7515
9. Feghali K, Iwasaki K, Tanaka K et al (2009) Human gingival fibroblasts release high-mobility group box-1 protein through active and passive pathways. *Oral Microbiol Immunol* 24:292–298
10. Jager A, Radlanski RJ, Gotz W (1993) Demonstration of cells of the mononuclear phagocyte lineage in the periodontium following experimental tooth movement in the rat. An immunohistochemical study using monoclonal antibodies ED1 and ED2 on paraffin-embedded tissues. *Histochemistry* 100:161–166
11. Jager A, Zhang D, Kawarizadeh A et al (2005) Soluble cytokine receptor treatment in experimental orthodontic tooth movement in the rat. *Eur J Orthod* 27:1–11

Es ist dokumentiert, dass die Zellen im Zahnhalteapparat im Rahmen der Zahnbewegung einer Druck- und Zugbelastung ausgesetzt werden und es teilweise zur Ausbildung von nekrotischen Arealen kommen kann [11]. Auch in älteren Kokulturerperimenten konnte bereits gezeigt werden, dass PDL-Zellen nach vorheriger Stimulation mit proinflammatorischen Zytokinen in der Lage sind, das Verhalten von Makrophagen zu modifizieren [15]. Einer der bekanntesten Faktoren, welcher für die Differenzierung von Osteoklasten aus Makrophagen verantwortlich ist, ist das vielfach beschriebene Protein RANKL [17]. Im Gegensatz zu RANKL, das unmittelbar für die osteoklastäre Differenzierung verantwortlich ist, gilt HMGB1 als ein indirekter Differenzierungsfaktor für Osteoklasten [3]. Die Autoren gehen davon aus, dass extrazellulär sezerniertes HMGB1 die Makrophagen zur Sezernierung von RANKL anregt und somit indirekt zur Bildung von Osteoklasten beiträgt. Hierbei scheint HMGB1 die Funktion eines Kofaktors in dem Differenzierungsprozess einzunehmen. In der hier vorgestellten Studie konnten wir diese Ergebnisse bestätigen. Verdeutlicht wird dies durch die Beobachtung, dass durch Stimulation der Makrophagen mit dem gesamten Zellkulturüberstand eine deutlich verstärkte Differenzierung zu Osteoklasten induziert wurde als durch HMGB1 allein. Andere Studien stützen die Bedeutung von HMGB1 als einen Kofaktor durch den Nachweis, dass Makrophagen nach Stimulation mit HMGB1 zur Sezernierung der Zytokine TNF- α , IL-6, IL-8 und IL-10 angeregt wurden [3].

Um die spezifische, Makrophagen-regulierende Rolle von HMGB1 in den eigenen Experimenten weiter zu untersuchen, wurde die HMGB1-Proteinwirkung mit einem im Überschuss verabreichten Antikörper im Zellüberstand neutralisiert. Die Blockierung von HMGB1 in dem Medium führte zu einer signifikanten Reduktion der untersuchten Parameter. Die Applikation von HMGB1 allein hingegen führte zu keiner deutlichen Veränderung. Folglich erlauben diese Ergebnisse die Interpretation, dass HMGB1 zwar eine regulatorische Rolle auf die Makrophagen-bezogene Immunantwort nach Zahnbewegung ausübt, diese aber von indirektem Charakter in Form eines Komediatoreffekts mit anderen proinflammatorischen Zytokinen zu sein scheint. Sowohl die Daten der Migrations- und als auch der Osteoklastendifferenzierungsexperimente zeigen, dass durch die Neutralisierung von HMGB1 die Makrophagenmigration und die Differenzierung zu Osteoklasten deutlich reduziert werden. Im Vergleich zu dem mit vermutlich multiplen proinflammatorischen Mediatoren versetzten Überstand führte die Applikation von HMGB1 allein zu einer deutlich geringeren Migration und weniger stark ausgebildeten Differenzierung von Osteoklasten. Wahamaa et al. [26] beschrieben in ihrer Studie an synovialen Fibroblasten, dass HMGB1 allein eine deutlich geringere Zytokinexpression von TNF- α , IL-6, IL-8 und IL-10 verursachte, als wenn es mit anderen Zytokinen zusammen appliziert wurde.

Nach unserem Wissen analysiert die vorliegende Studie erstmals die Rolle von HMGB1 im Rahmen der parodontalen Umbauprozesse nach orthodontisch induziertem Zellstress und verdeutlicht hierbei zudem eine zentrale Rolle von PDL-Zellen und den durch diese freigesetzten Mediatoren. In unserer Studie

12. Jo YY, Lee HJ, Kook SY et al (2007) Isolation and characterization of postnatal stem cells from human dental tissues. *Tissue Eng* 13:767–773
13. Kim YS, Lee YM, Park JS et al (2010) SIRT1 modulates high-mobility group box 1-induced osteoclastogenic cytokines in human periodontal ligament cells. *J Cell Biochem* 111:1310–1320
14. Konermann A, Beyer M, Deschner J et al (2012) Human periodontal ligament cells facilitate leukocyte recruitment and are influenced in their immunomodulatory function by Th17 cytokine release. *Cell Immunol* 272:137–143
15. Konermann A, Stabenow D, Knolle PA et al (2012) Regulatory role of periodontal ligament fibroblasts for innate immune cell function and differentiation. *Innate Immun* 18:745–752
16. Lang H, Schuler N, Nolden R (1998) Attachment formation following replantation of cultured cells into periodontal defects—a study in minipigs. *J Dent Res* 77:393–405
17. Lossdorfer S, Gotz W, Jager A (2011) PTH(1-34)-induced changes in RANKL and OPG expression by human PDL cells modify osteoclast biology in a co-culture model with RAW 264.7 cells. *Clin Oral Investig* 15:941–952
18. Lossdorfer S, Kraus D, Abuduwali N et al (2011) Intermittent PTH(1-34) regulates the osteoblastic differentiation of human periodontal ligament cells via protein kinase C- and protein kinase A-dependent pathways in vitro. *J Periodontol Res* 46:318–326
19. Lossdorfer S, Yildiz F, Gotz W et al (2010) Anabolic effect of intermittent PTH(1-34) on the local microenvironment during the late phase of periodontal repair in a rat model of tooth root resorption. *Clin Oral Investig* 14:89–98
20. Morimoto Y, Kawahara KI, Tanchaen S et al (2008) Tumor necrosis factor- α stimulates gingival epithelial cells to release high mobility-group box 1. *J Periodontol Res* 43:76–83
21. Nakajima R, Yamaguchi M, Kojima T et al (2008) Effects of compression force on fibroblast growth factor-2 and receptor activator of nuclear factor kappa B ligand production by periodontal ligament cells in vitro. *J Periodontol Res* 43:168–173
22. Nixon C, King G (1985) Macrophage chemotaxis in experimental tooth movement in the rat. *Arch Oral Biol* 30:739–743
23. Scaffidi P, Misteli T, Bianchi ME (2002) Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation. *Nature* 418:191–195
24. Seo BM, Miura M, Gronthos S et al (2004) Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *Lancet* 364:149–155
25. Ulloa L, Messmer D (2006) High-mobility group box 1 (HMGB1) protein: friend and foe. *Cytokine Growth Factor Rev* 17:189–201
26. Wahamaa H, Schierbeck H, Hreggvidsdottir HS et al (2011) High mobility group box protein 1 in complex with lipopolysaccharide or IL-1 promotes an increased inflammatory phenotype in synovial fibroblasts. *Arthritis Res Ther* 13:R136
27. Waldo CM, Rothblatt JM (1954) Histologic response to tooth movement in the laboratory rat; procedure and preliminary observations. *J Dent Res* 33:481–486
28. Wang H, Bloom O, Zhang M et al (1999) HMG-1 as a late mediator of endotoxin lethality in mice. *Science* 285:248–251
29. Wolf M, Lossdorfer S, Abuduwali N et al (2012) Effect of intermittent PTH(1-34) on human periodontal ligament cells transplanted into immunocompromised mice. *Tissue Eng Part A* 18:1849–1856
30. Yang J, Shah R, Robling AG et al (2008) HMGB1 is a bone-active cytokine. *J Cell Physiol* 214:730–739
31. Zhou Z, Han JY, Xi CX et al (2008) HMGB1 regulates RANKL-induced osteoclastogenesis in a manner dependent on RAGE. *J Bone Miner Res* 23:1084–1096

konnten wir die spezifische Rolle von HMGB1 als einem potenziellen Koregulator in Zusammenhang mit anderen proinflammatorischen Zytokinen aufzeigen, der einen signifikanten, regulatorischen Einfluss auf die Physiologie und das Verhalten von Makrophagen im parodontalen Umbauprozess einnimmt. Die vorgestellte Studie liefert somit einen Beitrag zur Erweiterung des Verständnisses über die Physiologie und Pathophysiologie innerhalb der Interaktion von PDL-Zellen des Zahnhalteapparates und den Makrophagen des Immunsystems bei der kieferorthopädischen Zahnbewegung.

In Anlehnung an bereits etablierte Therapiekonzepte, z. B. in der Orthopädie zur Arthritistherapie, wäre bei diagnostizierten Wurzelresorptionen eine lokale therapeutische Intervention mit Regulation von HMGB1 durch neutralisierende Medikamente denkbar, um das weitere Fortschreiten von Hartsubstanzschäden zu verhindern. Selbstverständlich bedürfen solche Ausblicke zunächst weiterer wissenschaftlicher Untermauerung.

Danksagung

Die Autoren danken Inka Bay und Jana Marciniak für ihre Unterstützung bei der technischen Durchführung der Untersuchungen. Diese Studie wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG, KFO 208; LO-1181/2-2) und der medizinischen Fakultät der Universität Bonn unterstützt.

Interessenkonflikt

Der korrespondierende Autor gibt für sich und seine Koautoren an, dass kein Interessenkonflikt besteht.

Address for correspondence

Dr. med. dent. Michael Wolf
Department of Orthodontics
Rhenish Friedrich-Wilhelm University
Welschnonnenstrasse 17
53111 Bonn, Germany
michael.wolf@ukb.uni-bonn.de

Hier steht eine Anzeige.

