

Aus der Poliklinik für Parodontologie & Zahnerhaltung
der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

**“Effekte von Fusobacterium nucleatum und Apelin auf humane parodontale
Ligamentzellen in vitro”**

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der
Zahnmedizin
der Universitätsmedizin
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Vorgelegt von

Pablo David Cores Ziskoven
aus Duisburg

Mainz, 2023

Wissenschaftlicher Vorstand: Univ.-Prof. Dr. U. Förstermann

1. Gutachter: Univ.-Prof. Dr. med. dent. J. Deschner

2. Gutachter: Priv.-Doz. Dr.med. Dr. med. dent K. Sagheb

Tag der Promotion: 15.04.2024

Inhaltsverzeichnis

1	Abkürzungsverzeichnis	5
2	Abbildungsverzeichnis	7
3	Tabellenverzeichnis	7
4	Einleitung	8
5	Literaturdiskussion	9
5.1	Parodontale Strukturbiologie	9
5.2	Parodontitis	12
5.2.1	Prävalenz	13
5.2.2	Ätiopathogenese	13
5.2.3	Biofilm und Mikrobiom	13
5.2.4	Pathogenese	16
5.2.5	Risikofaktoren	18
5.2.5.1.1	Diabetes	19
5.2.5.1.2	Adipositas	20
5.2.5.1.3	Apelin	23
5.3	Diagnostik	25
5.4	Therapie	26
6	Material und Methoden	26
6.1	Zellkultur und Stimulation	26
6.2	Real-time PCR	28
6.3	ELISA	29
6.4	Auswertung	30
7	Ergebnisse	31
7.1	Genexpression in An- und Abwesenheit von <i>F. nucleatum</i>	31
7.2	Regulation der Expressionen von COX-2, CCL2 und MMP1 durch <i>F. nucleatum</i>	31
7.3	Modulierende Effekte von Apelin auf pro-inflammatorische Aktionen von <i>F. nucleatum</i> ...	32
7.4	Modulierende Effekte von Apelin auf Marker des Hart- und Weichgewebeumbaus	34
7.5	Auswirkungen von <i>F. nucleatum</i> auf Apelin und seinen Rezeptor	35
7.6	Beteiligung intrazellulärer Signalwege an den Effekten von <i>F. nucleatum</i> und/oder Apelin auf die Genexpressionen von CCL2 und MMP1	36

7.7	Regulatorische Effekte von Apelin auf die durch <i>F. nucleatum</i> induzierten Proteine CCL2 und MMP1	37
8	Diskussion.....	38
8.1	Ergebnisdiskussion.....	38
8.2	Methodendiskussion.....	45
9	Zusammenfassung.....	49
10	Danksagung	51
11	Tabellarischer Lebenslauf.....	52
12	Literaturverzeichnis.....	53

1 Abkürzungsverzeichnis

AG – Antigen

AGE – Advanced Glycation Endproducts

AGTRL – Angiotensin like Receptor Ligand

AIDS – Akquiriertes Immun-Defizienz-Syndrom

AK – Alveolarknochen

AMP – Adenosinmonophosphat

APJ – Apelin-Rezeptor

ATP – Adenosintriphosphat

BG – Bindegewebe

BMI – Body-Mass-Index

BMP – Bone Morphogenic Protein

cDNS/A – Komplementäre DNS – complementary DNA

COX-2 – Cyclooxygenase-2

CP – Crossing Point

CRP – C-reaktives Protein

CT – Cyclic Threshold

CCL2 – Chemokine C-C motif ligand 2

CXCL8 – Interleukin-8

DGE – Deutsche Gesellschaft für Ernährung

DMEM – Dulbecco's Modified Eagle Medium

DMT1 – Diabetes Mellitus Typ 1

DMT2 – Diabetes Mellitus Typ 2

DNS/A – Desoxyribonukleinsäure – Deoxyribonucleic Acid

ELAM – Endothelial Cell Leukocyte Adhesion Molecule

eNOS – Endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase

EthD1 – Ethidium Homodimer-1

F.n./ F. nucleatum – Fusobacterium nucleatum

FBS – Fötale Kälberserum

FS – Fettsäure

G – Gingiva
GAPDH – Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GCF – Gingival Crevicular Fluid/gingivale Sulkusflüssigkeit
GLUT-4 – Glucosetransporter Typ 4
HbA1c – Glykiertes Hämoglobin
ICAM – Intercellular Adhesion Molecule
IL-1 β – Interleukin-1 beta
IL-8 – Interleukin-8
LPS – Lipopolysaccharide
MMP – Matrixmetalloproteinase
MOI – Multiplicity of Infection
mRNS/-A – Boten-Ribonukleinsäure – messenger ribonucleic acid
NF- κ B – nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
NO – Stickstoffmonoxid
OE – Orales Epithel
OPG – Osteoprotegerin
OSE – Orales Sulkusepithel
P.g. / P. gingivalis – Porphyromonas Gingivalis
PA – Parodontitis/parodontal
PBS – Phosphate Buffered Saline
PCR – Polymerasekettenreaktion – Polymerase Chain Reaction
PDL – Parodontales Ligament
PMN – Polymorphkernige Granulozyten
RANK – Receptor Activator of Nuclear Factor-kappa B
RANKL – Receptor Activator of Nuclear Factor-kappa B Ligand
RAGE – Receptor for Advanced Glycation End Products
RNS/A – Ribonukleinsäure – Ribonucleic acid
ROS – Reaktive Sauerstoffspezies
RUNX2 – Runt Related Transcription Factor 2
SE – Saumepithel
SEM – Standard Error of the Mean – Standardfehler des Mittelwerts

SKM – Skelettmuskulatur
 TGF-β1 – Transforming Growth Factor Beta 1
 TIMP – Tissue Inhibitor of Metalloproteinase
 TLR – Toll-like Receptor
 TNF-α – Tumornekrosefaktor-alpha
 VEGF – Vascular Endothelial Growth Factor
 WHR – Waist to Hip Ratio
 Z – Zement
 ZNS – Zentrales Nervensystem

2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 - Aufbau des Zahnhalteapparates.....	10
Abbildung 2 - Epithelarten.....	11
Abbildung 3 - Expressionen von COX-2, CCL2 und MMP1 in An- und Abwesenheit verschiedener Konzentrationen von <i>F. nucleatum</i>	31
Abbildung 4 - Effekte von <i>F. nucleatum</i> und/oder Apelin auf die Expression pro- inflammatorischer Mediatoren.....	33
Abbildung 5 - Effekte von <i>F. nucleatum</i> und/oder Apelin auf die Expression von Mediatoren, die am Weich- und Hartgewebeumbau beteiligt sind	34
Abbildung 6 - Expressionen von Apelin und APJ in An- und Abwesenheit verschiedener Konzentrationen von <i>F. nucleatum</i>	35
Abbildung 7 - Proteinspiegel von CCL2 und MMP1 in Überständen von PDL-Zellen.....	36
Abbildung 8 - Beteiligung intrazellulärer Signalwege an den Effekten von <i>F. nucleatum</i> und/oder Apelin auf die Expression von CCL2 und MMP1	37
Abbildung 9 - COX-2-Pathways.....	40

3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 - Phasen der PCR.....	28
Tabelle 2 – 24 h-CT-Werte der dosis- und zeitabhängigen Versuche im Vergleich	48

4 Einleitung

Parodontitis ist eine chronisch-entzündliche Erkrankung des Zahnhalteapparates, die mit der irreversiblen Zerstörung der hart- und weichgewebigen Verankerung der Zähne einhergeht und unbehandelt zu Zahnlockerung und Zahnverlust führen kann. Hauptursache für die Entstehung und Progression der Parodontitis ist eine überschießende, hyperinflammatorische Immunreaktion des Organismus auf unzureichende Plaque-Entfernung und die damit verbundene Akkumulation und dysbiotische Organisation parodontalpathogener Mikroorganismen im dentalen Biofilm. Es ist unumstritten, dass das Auftreten und die Progredienz der Erkrankung durch weitere Risikofaktoren, wie bestimmte genetische und epigenetische Dispositionen, Rauchen, mentaler Stress sowie okklusale Über- bzw. Fehlbelastungen beeinflusst wird. Darüber hinaus stehen andere Allgemeinerkrankungen wie Diabetes mellitus Typ II, kardiovaskuläre Erkrankungen, Adipositas und metabolisches Syndrom möglicherweise in einem bidirektionalen kausalen Verhältnis zur Parodontitis. Bei Individuen, die an Übergewicht bzw. Adipositas leiden, produzieren Zellen des Fettgewebes (z.B. Adipozyten) vermehrt pro-inflammatorische Zytokine. Diese sogenannten Adipokine sind Botenstoffe, welche wiederum in Zielorganen an selektive Rezeptoren binden können und dort vielfältige Effekte ausüben. Die Rolle der Adipokine Resistin, Leptin, Adiponektin und Visfatin im Parodont wurden in den letzten Jahren vermehrt untersucht, wohingegen die Bedeutung des Adipokins Apelin und seines Rezeptors noch weitgehend unbekannt ist. In diversen Studien konnte gezeigt werden, dass diese Botenstoffe auch in oralen Zellen produziert werden, dass deren Synthese durch zahlreiche lokale und systemische Faktoren reguliert wird und dass Adipokine viele Funktionen parodontaler Zellen beeinflussen. Die Rolle von Apelin in der Ätiopathogenese der Parodontitis und der Assoziation zwischen Parodontitis und Systemerkrankungen ist dagegen bisher kaum untersucht worden.

Ziel der Dissertation war es *in vitro* zu untersuchen, ob Apelin und sein Rezeptor in parodontalen Ligament-Zellen exprimiert werden und ob diese Expressionen durch das Parodontitis-assoziierte Bakterium *Fusobacterium nucleatum* moduliert werden. Des Weiteren sollte die Rolle von Apelin selbst auf parodontale Zellen unter mikrobiellen Bedingungen analysiert werden, um dadurch die Bedeutung von Apelin im Parodontium besser zu verstehen und den pathomechanistischen Zusammenhang auf zellulärer sowie molekularer Ebene zwischen Adipositas und Parodontitis zu beleuchten. In verschiedenen *In-vitro*-Versuchen wurden dazu parodontale Ligament (PDL)-Zellen in An- und Abwesenheit unterschiedlicher Konzentrationen von *F. nucleatum* und/oder Apelin für bis zu 48 h kultiviert. Unbehandelte Zellen dienten als Kontrollen. Nachfolgend wurde die Expression verschiedener pro-inflammatorischer Moleküle wie Cyclooxygenase 2 (COX-2), CC-Chemokin-Ligand-2 (CCL2), Interleukin-8 (CXCL8), Tumornekrosefaktor-alpha (TNF- α), des Enzyms Matrix-metalloproteinase 1 (MMP1), des Wachstumsfaktors Transforming Growth Factor Beta 1 (TGF- β 1) und des Osteogenese-assoziierten Transkriptionsfaktor Runt Related Transcription Factor 2 (RUNX2) mittels real-time PCR untersucht. Die Expressionen von Apelin und seinem Rezeptor wurden ebenfalls bestimmt. Komplettiert wurden die Transkriptionsstudien für CCL2 und MMP1 durch Proteinanalysen der Zellüberstände mittels ELISA. Außerdem wurde die Beteiligung der „nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells“ (NF- κ B)- und „mitogen-activated protein kinase“ (MAPK)-Signaltransduktionen durch Präinkubation mit spezifischen Inhibitoren untersucht. Die statistische Auswertung erfolgte mittels parametrischer und non-parametrischer Tests ($p < 0,05$).

5 Literaturdiskussion

5.1 Parodontale Strukturbiologie

Die Mundhöhle ist der einzige Bereich des menschlichen Körpers, bei dem Hartgewebe in direktem Kontakt zur Außenwelt steht (1). Dies bedingt einen physiologischen Locus minoris resistentiae am Grenzbereich zwischen "sterilem" Körperinneren und dem bakterienbesiedelten Cavum Oris, welchem entscheidende Bedeutung bei der Abwehr pathogener Mikroorganismen und anderer Noxen zukommt. Der Zahnhalteapparat dient des Weiteren der dynamischen Verankerung der Zähne und fungiert als Stützgewebe. Das Parodont (peri=herum, dens=Zahn) umfasst unterschiedliche Bereiche des Zahnhalteapparates, zu denen Gingiva (G), Alveolarknochen (AK), Wurzelzement (Z) und das parodontale Ligament (PDL) zählen (Abb. 1). Das PDL inseriert sowohl am Wurzelzement als auch am knöchernen Zahnfach und sorgt über diese Verankerung für eine elastische Aufhängung der Zähne. Die Gingiva umgibt als Teil der mastikatorischen Mukosa die Zähne und den Alveolarknochen und lässt sich in befestigte, keratinisierte („attached“) Gingiva und in freie keratinisierte Gingiva unterteilen, welche durch unterschiedlich ausgerichtete Bindegewebsfasern (BG) und Hemidesmosomen auf dem Knochen und den Zähnen befestigt sind, sodass eine straffe, den Zähnen und Knochen anliegende Bindegewebsmanschette resultiert (1)(Abb.1). Aufgrund der senkrecht zur Oberfläche ausgerichteten inserierenden Bindegewebsfasern ist bei dezemtem Luftstrom das klinische Bild einer physiologischen orangenhautähnlichen Stippelung zu erkennen. Die befestigte Gingiva wird nach coronal durch die freie Gingiva und nach apikal von der nicht-befestigten, dunkelroten Alveolarmukosa begrenzt, an deren Übergang die mukogingivale Grenzlinie gut erkennbar ist. Die keratinisierte Zone der Gingiva stellt in vielerlei Hinsicht einen funktionell wichtigen Bereich dar, da durch ein breites Band befestigter Schleimhaut die Hartgewebe größtenteils vor Plaque und Essensresten geschützt sind. Auch bestimmte zahnärztliche Eingriffe wie Implantationen weisen bessere Prognosen, wenn das Ausmaß dieses Schleimhauttyps üppig ist. In Studien konnte zum Beispiel gezeigt werden, dass die Hygienefähigkeit von Implantaten und Zähnen geringer ist, wenn weniger befestigte Gingiva vorliegt und stattdessen schlaffe Mukosa anliegt (2). Es ist dennoch möglich, gesunde Verhältnisse aufrechtzuerhalten, jedoch ist das Risiko für entzündliche Veränderung bei periimplantärer Mukosa höher als bei natürlich vorkommender Gingiva (3).

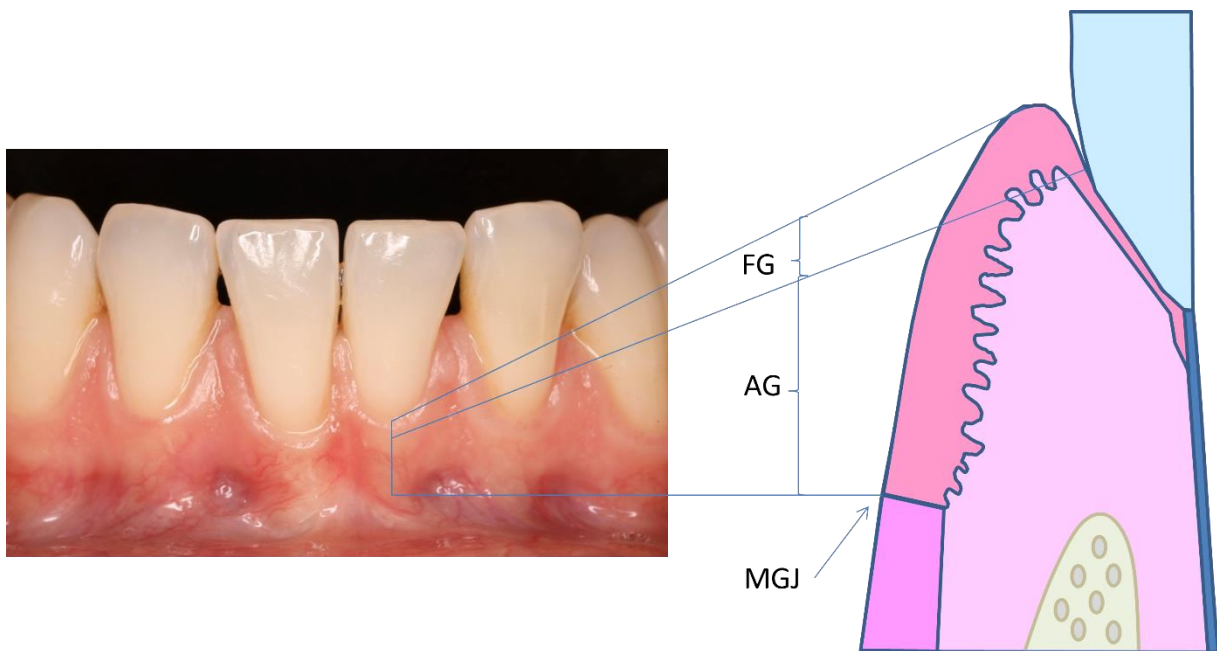


Abbildung 1 - Aufbau des Zahnhalteapparates , FG = Freie Gingiva, AG = befestigte Gingiva, MGJ = Mukogingivale Grenzlinie - Bild modifiziert nach Lindhe und Lang

Histologisch besteht die Gingiva aus drei Epitheltypen (1): dem oralen Gingivapithel, dem oralen Sulkusepithel sowie dem Saumepithel. Die freie Gingiva weist am Übergang zum Zahn eine gewebige Einstülpung auf, die bei gesunden Individuen physiologische Tiefen von 0-3 mm aufweist, welche im entzündeten Zustand jedoch deutlich tiefer werden können. In der schematischen Darstellung (Abb. 2) ist zu erkennen, dass das der Mundhöhle zugewandte orale Gingivapithel (OE) in das orale Sulkusepithel (OSE) und schließlich in das Saumepithel (SE) übergeht. Beim OE handelt es sich nach histologischen Gesichtspunkten um ein verhorntes mehrschichtiges Plattenepithel mit Stratum basale, spinosum, granulosum und corneum, welches am Übergang zum Sulkus in das strukturgleiche OSE mündet. Das OSE wiederum geht in apikaler Richtung kontinuierlich in das Saumepithel über, welches sich dahingehend von OE und SE unterscheidet, dass es direkt dem Zahnschmelz aufliegt, nicht keratinisiert ist, histologisch nur aus Stratum basale und suprabasale besteht und keine Reteleisten zum darunterliegenden BG ausbildet. Von koronal nach apikal wird diese Epithelschicht immer schmäler, bis es schließlich im Bereich der Schmelzzementgrenze in das suprakrestale BG-Attachement ausläuft und somit den zuvor angesprochenen Übergang von extrakorporal zu intrakorporal darstellt.

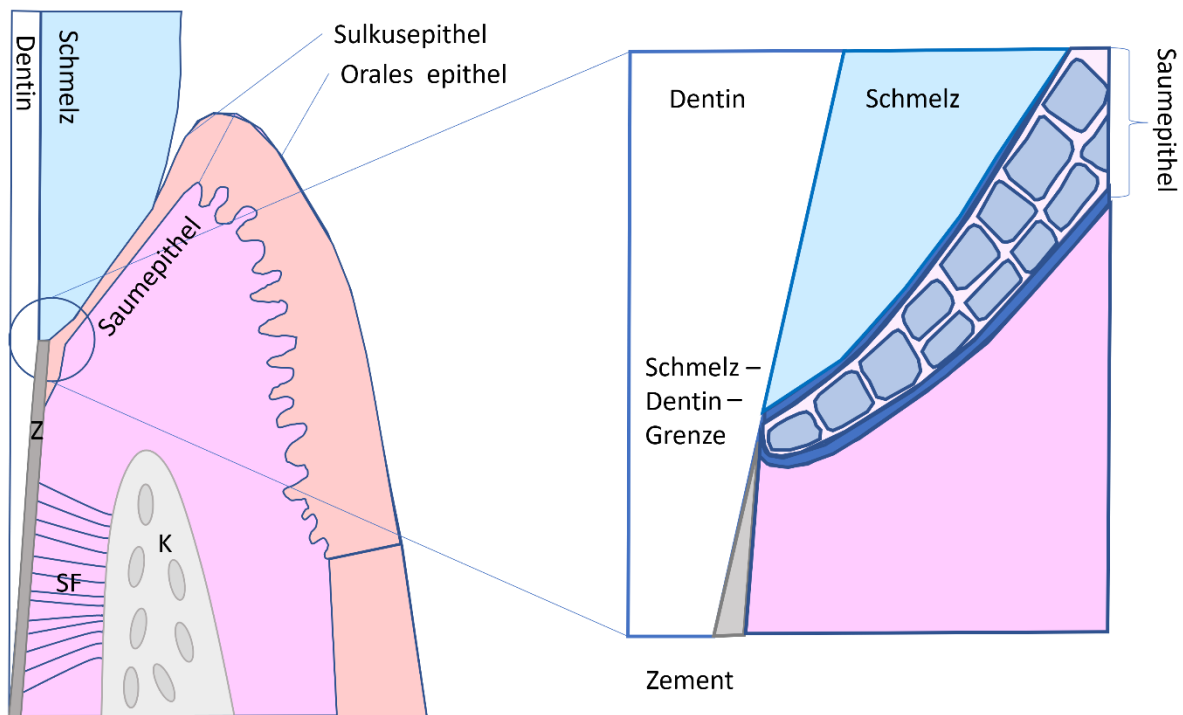


Abbildung 2 - Epithelarten - links: Querschnitt durch das parodontale Ligament; rechts: Saumepithel. Z = Zement, SF = Sharpey-Fasern, K = Knochen

Die oberflächliche Verhornung der keratinisierten Gingiva geht mit einer kontinuierlichen Abschilferung der obersten Epithelschicht einher und stellt einen Abwehrmechanismus kaubelasteter Schleimhäute gegenüber Fremdeinflüssen dar (4). Da das Saumepithel dies nicht aufweist, stellt es einen Locus minoris resistentiae dar. Es sei angemerkt, dass das Saumepithel dem Schmelz nicht einfach aufliegt, sondern über Hemidesmosomen mit diesem verknüpft ist und durch Desmosomen mit dem darunterliegenden BG verbunden ist (5). Da das SE permeabel ist, erlaubt es einen auswärts gerichteten Flüssigkeitsstrom (Sulkusflüssigkeit, GCF), der aus unterschiedlichen Quellen wie dem Blutserum und dem BG entspringt. Es beinhaltet Zytokine, Plasmaproteine, aber auch Abwehrzellen wie neutrophile Granulozyten oder Lymphozyten und kann in seiner Flussrate und Zusammensetzung je nach Entzündungszustand verändert sein (6). Schiött und Löe konnten bereits 1970 zeigen, dass durch das durchlässige Saumepithel ca. 30.000 polymorphkernige Granulozyten (PMN) pro Minute in den Mundraum gelangen (7). Da das Saumepithel vulnerabler ist als die anderen Gewebe, ist die Umsatzrate dieser Region deutlich erhöht (8). Ein intaktes Saumepithel befindet sich demnach keinesfalls in einem statischen Zustand, sondern stets in einem dynamischen Wechselspiel aus zellulären Umbauprozessen, bakteriellen Angriffen, mechanischer Belastung und immuninflammatorischen Reaktionen. Im gesunden Zustand besteht gingivales Gewebe zu ca. 60 % aus BG, zu 35 % aus versorgenden Strukturen sowie aus einem kleinen Teil, der von Zellen wie Fibroblasten, Mastzellen, Makrophagen oder anderen Immunzellen eingenommen wird. Folgt man dem Sulkus- und Saumepithel bildlich weiter nach apikal, wird das PDL erreicht, welches unter anderem für die bindegewebige Aufhängung des Zahnes in der knöchernen Alveole zuständig ist (Abb. 2). Hierbei handelt es sich um gut durchblutetes sowie neural versorgtes BG, das reich an Kollagen und extrazellulärer Matrix (EZM) ist. Die Zellen des PDLs setzen sich überwiegend aus Fibroblasten und Gefäßzellen zusammen und aufgrund der räumlichen Nähe zum Knochen und Zement auch aus Zementoblasten, Osteoblasten, Osteoklasten sowie einer Vielzahl von Abwehrzellen. Sharpey'sche Kollagenfasern inserieren sowohl im Alveolarknochen als auch am Wurzelzement und sind größtenteils in apikokoronarer Richtung ausgerichtet. Das Wurzelzement bedeckt die Zahnwurzel und ist ein spezialisiertes mineralisiertes Gewebe, welches im Gegensatz zu

den übrigen parodontalen Geweben weder neural noch von Blut- oder Lymphgefäßen versorgt wird. Die Hauptfunktion des Wurzelzementes erklärt sich durch die Insertion der Kollagenfasern: Sie stellen die Verbindung zwischen Faserapparat und Zahn dar. Diese weichgewebige Verbindung bedingt die physiologische Zahnbeweglichkeit und hat unter anderem die Aufgabe, physikalische Kräfte abzufangen und umzuleiten. Durch die dehnbaren Fasern werden vertikal/okklusal wirkende Kräfte diagonal/horizontal auf den Alveolarknochen übertragen und somit Druckkraft in Zugkraft umgewandelt. Da das PDL flüssigkeitsreich ist, hat es wie die Bandscheiben der Wirbelsäule, die auf das Abfedern abrupter Impulse ausgelegt sind, eine dämpfende Wirkung. Da das PDL dynamisch auf veränderte Belastung adaptiert, kommt es beispielsweise bei anhaltender mesiodiagonaler Krafteinwirkung zu der Verbreiterung des PDL auf der Lastarmseite und zur Resorption auf der gestauchten Gegenseite. Diese Anpassung ist ein komplexes Geschehen und involviert Entzündungszellen und die Aktivierung diverser Proteasen, Zytokine sowie Osteoblasten und Osteoklasten (9). Daher können Parafunktionen wie Pressen oder Knirschen bei der Parodontitis vorkommende entzündliche Prozesse negativ beeinflussen und die Regeneration des PDL beeinträchtigen (10). Zementoblasten dienen des Weiteren als Resorptionsbarriere gegenüber den Umbauprozessen der Osteoblasten und -klasten des Knochenmetabolismus. Da Dentin und Knochen eine ähnliche anorganische Grundzusammensetzung aufweisen, sind Osteoklasten in der Lage, Dentin gleichermaßen zu resorbieren wie Knochengewebe. Dieses Phänomen lässt sich eindrücklich beim Frontzahntyp der Avulsion beobachten, bei dem es durch lange extrakorporale Lagerung des Zahns in unphysiologischen Medien und durch späte Replantation zu Schäden an der schützenden Zementschicht und nachfolgend zu Ersatzresorptionen kommen kann (11). Da das PDL zum Großteil aus EZM und BG besteht, wurde im experimentellen Teil der Arbeit mit PDL-Zellen gearbeitet. Bei der Parodontitis kommt es aufgrund verschiedener Faktoren zur wirtsinduzierten Degradation von parodontalem Stützgewebe. Zum Ursachenkomplex der Entstehung dieser Krankheit zählt vor allem das plaqueinduziert dysbiotisch veränderte Mikrobiom. Genetische Prädisposition, aber auch systemische Erkrankungen wie Diabetes Mellitus oder Adipositas und Lifestyle Faktoren wie Rauchen können Risikofaktoren für Parodontitis darstellen (12, 13).

5.2 Parodontitis

Parodontitis zählt zu den chronisch entzündlichen Erkrankungen, welche primär durch eine überschießende Immunreaktion des Organismus auf dysbiotisch organisierte parodontalpathogene Mikroorganismen im dentalen Biofilm hervorgerufen wird. Die Ansammlung dieser Mikroorganismen in den Geweben des Zahnhalteapparates wird vornehmlich durch die Akkumulation von dentaler Plaque verursacht, welche vor allem bei inadäquater Mundhygiene entsteht. Dadurch können sich Bakterien dysbiotisch im Biofilm organisieren und führen synergistisch zur wirtsinduzierten Desintegration der angrenzenden Gewebe. Hierbei hat das vermehrte Vorkommen einiger weniger „Keystone“-Organismen eine gewisse Leitfunktion für andere Parodontalpathogene, welche das Auftreten einer Parodontitis wahrscheinlicher machen. Durch hyperinflammatorische Immunantworten des Wirts kann es über vielgliedrige Entzündungskaskaden zur Resorption des Alveolarknochens und letztlich zum vollständigem Zahnverlust kommen (14). Modifizierende und prädisponierende Faktoren können ebenfalls einen verstärkenden Einfluss auf die Erkrankung haben (15). Plaque und Gingivitis sind nötige Voraussetzungen für die Entstehung einer Parodontitis, jedoch geht nicht zwingend bei jedem Individuum eine Gingivitis in eine Parodontitis über. Ob der Transit von einer vorliegenden Gingivitis in eine Parodontitis stattfindet und wie Progression und Schweregrad der Erkrankung ausgeprägt sind, hängt von diversen Faktoren ab (16), auf die im Folgenden eingegangen wird.

5.2.1 Prävalenz

Schon ältere epidemiologische Studien zeigen, dass Parodontitis ein globales Problem darstellt und dass ein Großteil der erwachsenen Bevölkerung ab 35 Jahren von dieser Erkrankung betroffen ist (17). Auch neuere Studien belegen dies. So lag die Zahl der erkrankten US-Bürger laut dem National Health and Nutrition Examination Survey von 2012 bei 46 % (ca. 64,7 Millionen Bürger) (18). In Deutschland lagen die Werte im Jahre 2014 bei ca. 8 % für eine schwere Parodontitis unter den 35-44-Jährigen und bei ca. 19 % bei den 65-74-Jährigen. Eine moderate Ausprägung liegt im Durchschnitt bei 40 % der Erwachsenen vor (19). Demnach lässt sich feststellen, dass ein großer Teil der Bevölkerung als betroffen anzusehen ist (20). Bezüglich der Prävalenz belegt die Parodontitis weltweit Platz 11 der häufigsten chronischen Erkrankungen mit ca. 795 Millionen Fällen in 2017 (21).

In wegweisenden Studien wie von Loe et al. 1986 wurden srilankanische Teeplantagenarbeiter zwischen 14 und 46 Jahren parodontal befundet und nachuntersucht, die sich im Vorfeld und während des Betrachtungszeitraums in keinerlei parodontologischer Betreuung befanden (22). Diese Daten geben daher Auskunft über die natürliche Ausprägung und Verteilung innerhalb einer Population. Es stellte sich heraus, dass drei Progressionsmuster erkennbar waren: Ca. 8 % der Untersuchten litten an einer schnell voranschreitenden "aggressiven" Form, weitere 11 % zeigten keine Progression und ca. 81% der Untersuchten litten an einer moderat ausgeprägt und fortschreitenden Parodontitis. Damit konnte einerseits gezeigt werden, dass eine starke Variabilität bei der Ausprägung und dem Fortschreiten der Parodontitis vorliegt und dass mangelnde Mundhygienemaßnahmen in 100% der Fälle zu einer Gingivitis führten, dies jedoch nicht zwangsläufig zu einer Parodontitis führte. Der Übergang zwischen oberflächlicher Zahnfleischentzündung und irreversiblen Verlust von Stützgewebe scheint also individuell unterschiedlich und von weiteren Risikofaktoren wie der genetischen Prädisposition abhängig zu sein (22). Diese Ergebnisse konnten auch durch andere Studien bestätigt werden. So wird die Zahl der Patienten, die an der rasch fortschreitenden Form leiden, meist mit ca. 10-15 % beziffert. Des Weiteren korreliert die Parodontitis-Prävalenz positiv mit zunehmendem Alter und erhöhten Plaquewerten. Wie im Abschnitt "modifizierende und prädisponierende Faktoren" ausführlicher beschrieben wird, hängen der Ausbruch und die Progression neben dem Alter und der bakteriellen Dysbiose noch von weiteren Faktoren ab.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die „Parodontitislast“ in der Bevölkerung hoch ist. Dabei ist der Großteil der Bevölkerung moderat und ein kleiner Teil stark betroffen (1). Aufgrund der steigenden Lebenserwartung sowie der verringerten Zahnverlustrate ist mit einer steigenden globalen Belastung zu rechnen.

5.2.2 Ätiopathogenese

5.2.3 Biofilm und Mikrobiom

Der Körper beherbergt eine Vielzahl von Zellen, von denen ein Großteil residente Mikroorganismen sind, die bestimmte Areale des Körpers besiedeln (23, 24). Dabei stellen die unterschiedlich besiedelten Areale wie zum Beispiel Haut, Darm oder der Mundraum ökologische Lebensräume dar, die bezüglich ihrer mikrobiellen Zusammensetzung dementsprechend divers sind (24). Die Mundhöhle nimmt in diesem Szenario eine besondere Rolle ein: Sie stellt aufgrund der konstanten Temperatur, Feuchte und der regelmäßigen Nahrungszufuhr einen idealen Nährboden für Bakterien, Viren, Pilze

und weitere Mikroorganismen dar (24, 25). Wie im Vorfeld beschrieben, wird bakterielle Besiedlung auf einem exponierten Gewebe im Regelfall u.a. durch Abschilferung der oberen Epithelschichten konstant niedrig gehalten. Da weder Schmelz noch Dentin dazu in der Lage sind und Bakterien auf Hartgeweben adhäreren, können Besiedler bei Abwesenheit von mechanischer Entfernung, längere Zeit am Gewebe anhaften. Der Übergang von Hart- zu Weichgewebe, d.h. das orale Sulkusepithel, stellt demnach eine entscheidende Eintrittspforte zum Körperinneren dar. Wie ausgeprägt die Komplexität des oralen Mikrobioms ist, konnte DeWirst 2010 zeigen: Über 600 Spezies konnten im Mund durch seine Arbeitsgruppe identifiziert und katalogisiert werden (26). Damit beherbergt das Cavum oris nach dem Magen-Darmtrakt die größte Anzahl an besiedelnden Mikroorganismen. Biofilme stellen eine evolutionsbiologische Anpassung und Überlebensstrategie von Mikroorganismen an das sie umgebende Milieu dar, weil sie durch diese Lebensgemeinschaft einen Vorteil gegenüber der Lebensweise als planktonische Einzelgänger aufweisen. Im Biofilm leben Mikroorganismen symbiotisch organisiert und sind geschützt vor externen Angriffen durch antimikrobielle Substanzen wie Antibiotika oder Antiseptika (27). Die Abfolge der Biofilmentstehung verläuft dabei in Grundzügen meist ähnlich. Die einzelnen Stadien der Plaquebildung können in weiterführender Literatur nachgelesen werden, da dies den Rahmen der Einleitung sprengen würde. Zusammenfassend lässt sich jedoch feststellen, dass Zellen im Biofilm einen Selektionsvorteil gegenüber planktonisch vorkommenden Einzellern aufweisen. Sie sind durch die Diffusionsbarriere geschützt und nutzen Metabolite untereinander effizient. Durch Mechanismen wie Effluxpumpen sind Bakterien gegenüber äußeren Noxen deutlich resistenter als freischwimmende Mikroorganismen.

Die komplexen Vernetzungen innerhalb des Mikrobioms lassen sich angesichts der Tatsache erahnen, dass unter Laborbedingungen nur circa 50 % der residenten Mikroorganismen kultiviert werden können (28). Dies zeigt, dass die Lebensformen spezielle Bedingungen zum Wachsen benötigen. Wie eingangs erwähnt, konnte DeWirst mit der Internetpräsenz "The Human Oral Microbiome Database" diese Diversität katalogisieren (26). Innerhalb des Mundes existieren unterschiedliche ökologische Nischen mit unterschiedlichen Besiedlern (29). So stellt die okklusale Kaufläche einen exponierten Lebensraum mit verhältnismäßig wenigen Organismen dar, die vor allem aerob und speichelabhängig sind und Energie aus der durch den Wirt aufgenommenen Nahrung gewinnen (30). Die Zahl der Lebensformen in den geschützteren Approximalräumen oder dem gingivalen Sulkus ist deutlich diverser und verschiebt sich auf die Seite der gram-negativen Anaerobier (31, 32). Durch die intensive Forschung innerhalb des letzten Jahrhunderts wurden diverse Hypothesen über die grundlegende Ursache der Parodontitis aufgestellt. In jeder dieser Hypothesen wurde zweifellos anerkannt, dass Bakterien essenziell für die Entstehung der Erkrankung sind. Weiterhin gilt es als unumstritten, dass die parodontal destruktiven Mechanismen vor allem wirtsinduziert sind und in letzter Konsequenz zum totalen Zahnverlust führen können (1).

Kenntnis über die grundlegenden Prinzipien der Pathogenese versprechen gezielte Angriffspunkte für Diagnostik und Therapie. Dementsprechend groß waren die Bestrebungen in den letzten 100 Jahren, die komplexen Mechanismen und den Verlauf der Krankheit zu entschlüsseln. Seit Ende des 19. Jahrhunderts wurden diverse Hypothesen aufgestellt, welche die Rolle der Bakterien im Rahmen der Parodontitis erklären sollten. Der Übersicht halber wird in dieser Arbeit nur die aktuell gültige Anschauung aufgegriffen.

Die aktuell gültige Annahme, die „Keystone Pathogen-Hypothese“, postuliert von Hajishengallis im Jahre 2012 (33), fasst im Grunde (fast) alle vorhergehenden Hypothesen zusammen. Plaque und Bakterien werden als essenziell für die Entstehung der Parodontitis angesehen, sind jedoch nicht die alleinigen Ursachen, sondern Teil eines multifaktoriellen Geschehens. Im Gegensatz zur von Socransky (34) postulierten Komplextheorie tragen nicht nur einige wenige Bakterien zur Parodontitis bei, sondern es bedarf des Zusammenspiels vieler unterschiedlicher Spezies, von denen einige eine gewisse Leitfunktion übernehmen. Diese agieren im gesunden Zustand im Gleichgewicht als kommensale Lebensgemeinschaft. Unter physiologischen Verhältnissen liegt also eine symbiotisch interagierende mikrobielle Lebensgemeinschaft vor, die im Gleichgewicht zum Wirt steht (33, 35). Liegt dieses Verhältnis ausgeglichen vor, wird von Homöostase gesprochen. Durch Faktoren wie Plaque, Stress, Alter, Rauchen, verringerter Wirtsabwehr und systemische Erkrankungen kann es zum Zusammenbruch der Homöostase kommen und Kommensalen werden zu Pathobionten. Solange die wirtseigene Abwehr gegen die Gleichgewichtsverschiebung ankämpfen kann, wird die Krankheit nicht ausbrechen oder nur subklinisch bemerkbar werden. Wird jedoch ein kritischer Schwellenwert überschritten und die Entzündung fehlgeleitet, entsteht ein Krankheitsbild mit entsprechenden Symptomen. Dabei haben einige wenige Mikroorganismen eine gewisse Leitfunktion, die als „Keystone-Pathogene“ bezeichnet werden. Keystone-Organismen sind Spezies, die trotz geringen Vorkommens unverhältnismäßig großen Einfluss auf Ökosysteme haben. Sie wirken dabei umlenkend und modifizierend. Dieses Phänomen ist in der Ökologie am Beispiel des Bibers bekannt. Sie stehen nicht an der Spitze der Nahrungskette wie andere dominantere Spezies, modifizieren aber durch ihren Dammbau gesamte Ökosysteme. In der Architektur ist der Keystone der zentrale Stein, der einen Rundbogen stabilisiert und ohne den das Konstrukt zusammenbricht und kollabiert. Keystone-Organismen halten Ökosysteme zusammen oder ermöglichen dessen Existenz in der bestehenden Form. Durch immer bessere Techniken und Untersuchungsmethoden lassen sich auch bei der Parodontitis solche Organismen finden. Für *P. gingivalis*, der nach der Komplextheorie dem roten Komplex zugehörig ist, konnten immunsubversive Eigenschaften nachgewiesen werden (36). Dieses Bakterium besitzt die Fähigkeit, die Rekrutierung der Leukozyten, aber auch deren Funktion zu beeinträchtigen, die Phagozytose durch Verringerung der CXCL8-Expression zu hemmen („lokale Chemokin-Paralyse“) sowie über den Antagonismus des Toll-like-Receptors“ (TLR) zur verminderten Antwort des Komplementsystems zu führen (36). Durch diese Immunsuppression können andere Mikroorganismen ungehindert proliferieren und sind weitestgehend vor der körpereigenen Abwehr geschützt (33, 37). Dies erklärt auch das Paradoxon, warum *P. gingivalis* als Keystone-Bakterium angesehen wird, aber allein keine Parodontitis auslösen kann, was eindrucksvoll durch In-vivo-Untersuchungen an Mäusen gezeigt werden konnte: Steril aufgezogene und „normale“ Mäuse wurden geringen Mengen von *P. gingivalis* ausgesetzt, was dazu führte, dass bei den Mäusen mit „normalem“ oralem Mikrobiom nach sechs Wochen eine Parodontitis und Verlust von Alveolarknochen induziert werden konnte. Bei den unter aseptischen Bedingungen gehaltenen Mäusen löste die Inkubation mit *P. gingivalis* keinerlei Entzündung des Zahnhalteapparates und keinen Knochenverlust aus. Dies zeigt einerseits, dass *P. gingivalis* allein keine Parodontitis auslösen kann, aber durch Modifikation des Ökosystems den anderen Organismen den Weg ebnet. Andererseits veranschaulicht dies, dass nur sehr geringe Mengen (<0,01 % der gesamten bakteriellen Last) ausreichen, um einen drastischen Effekt zu erzeugen (38). Das Keystone-Bakterium ist nicht direkt für die Degradation verantwortlich, erlaubt und erhält jedoch ein pathologisches, entzündliches Milieu aufrecht. Dementsprechend manifestiert sich Parodontitis als ein vielschichtiges, dynamisches Geschehen, das auf Dysbiose eines gesamten Systems fußt und nicht nur die Auswirkung einzelner Spezies oder Komplexen ist (1, 33).

5.2.4 Pathogenese

Überwinden Bakterien die Abwehrlinien des Speichels und die der Epithelbarriere, stehen Ihnen diverse Gegenspieler der körpereigenen Abwehr gegenüber. Darunter fallen die angeborene und erworbene humorale Abwehr, angeborene unspezifische zelluläre Abwehr und die erworbene spezifische zelluläre Antwort. Da Zellwandbestandteile und metabolische Produkte z.B. Lipopolysaccharide (LPS) und Peptidoglykane von Erstbesiedlern den "alternativen Weg" des Komplementsystems aktivieren können, ist dies eine der ersten Reaktionen in parodontalen Geweben auf pathogene Mikroorganismen (4). Durch die Faktoren C3a und C5a geben lokale Mastzellen im gingivalen Sulkus vasoaktive Amine ab, was zu erhöhter Permeabilität der Gefäße führt, wodurch wiederum ein lokal begrenztes Ödem entsteht und die Fließrate der Sulkusflüssigkeit gesteigert wird (6, 39). Zellen des Immunsystems übermitteln Informationen über verschiedene Mediatoren wie zum Beispiel Interleukine (IL), Interferone (INF) oder Tumornekrosefaktoren (TNF), welche unterschiedliche Wirkungen an verschiedenen Zielzellen ausüben können. Einer dieser Mediatoren ist TNF- α , das z.B. von Mastzellen durch die Aktivierung von Komplementrezeptoren ausgeschüttet wird. TNF- α führt wiederum zur vermehrten Synthese von endothelialen Adhäsionsmolekülen (ICAMs, ELAMs), deren Funktion das "Anlocken" und die Migration von PMNs, wichtigen Mitspielern der unspezifischen zellulären Immunantwort, ist. Ihre Funktionen sind unter anderem die Phagozytose und die Ausschüttung diverser Zytokine. Weitere Beteiligte sind unterschiedliche mononukleäre Zellen wie dendritische Zellen, Monozyten und Makrophagen. Letztgenannte sind ebenfalls für Phagozytose zuständig und sekretieren bei Aufnahme des Pathogens pro-inflammatorische Mediatoren wie TNF- α und IL-1 und -8, welche die Bildung von Molekülen am Endothel der lokalen Gefäße induzieren, um dort befindliche PMNs zu akquirieren. Dendritische Zellen sind in der Lage, pathogene Noxen mit Ihren neuronartigen Ausläufern zu erkennen und Information an Lymphozyten weiterzuleiten und sind damit wichtige Initiatoren der spezifischen Abwehr. Im frühen Stadium einer Gingivitis ist die vorherrschende Zellart jedoch die der PMNs (39, 40), deren Zahl zunächst proportional zur Entzündung steigt. Dieser Zelltyp sorgt durch die Freisetzung von IL-1, IL-1RA und IL-17 (und indirekt IL-8) zu einer sich selbst verstärkenden positiven Rückkopplung. Durch diese Zytokine, z.B. TNF- α von Makrophagen sowie IL-8 von Epithelzellen, werden weitere Adhäsionsmoleküle wie ICAMs und ELAMs synthetisiert, wodurch es zu einem stetigen Strom an PMNs durch das Gewebe in das Saum- und Sulkusepithel bis in das Cavum oris kommt (4). Wird der pathogene Reiz (dentale Plaque) beispielsweise durch Mundhygienemaßnahmen beseitigt, führen diese Abwehrmechanismen zur Remission der Entzündung. Problematisch wird es dann, wenn Mikroorganismen über längere Zeit uneingeschränkt adhären, proliferieren und sich im Biofilm organisieren können, da es PMNs in diesem fortgeschrittenen Stadium unter Umständen nicht schaffen, die pathogenen Bakterien und deren Metabolite zu phagozytieren und daraufhin die "abortive Phagozytose" einleiten. Bei diesem Vorgang entleeren sie ihre Granula nach extrazellulär, woraufhin es zu Kollagenabbau kommt (41). Da bis zu diesem Zeitpunkt klinisch und histologisch keine Hartgewebsdegradation stattgefunden hat und die Entzündungszeichen durch einfache Interventionen (Plaquentfernung) vollständig umkehrbar sind, wird dieser Teil des Entzündungsprozesses als reversible Gingivitis bezeichnet. Ob die Gingivitis in eine Parodontitis übergeht, hängt von diversen Faktoren ab, wobei dem Ausmaß der Granulozytenaktivierung eine entscheidende Rolle zukommt. Ist deren Aktivierung inadäquat verstärkt oder verringert, die Immunantwort also hyper- oder hypoinflammatorisch, kommt es unter Umständen zu irreversiblen, destruktiven Entzündungsfolgen und folglich zu Knochenresorptionen (4). In diesem Punkt liegt ein wichtiger Schalter für die genetische Prädisposition eines Individuums für Parodontitis, da es durch Mutationen auf den entsprechenden codierenden Genen (ELANE, WAS, LYST, CXCR4, ITGB2) zu Funktionseinbußen der PMNs kommen kann, was bei Aktivierung eine schnellere Progression der Parodontitis nach sich ziehen kann (4, 6). Kommt es zur Persistenz des Biofilms,

verändert sich die Zellkomposition des entzündlichen Milieus und AG-präsentierende Zellen wie dendritischen Zellen aktivieren sukzessive die spezifische, erworbene Immunantwort. Bei Aktivierung der antigenpräsentierenden Zellen durch Toll-like-Rezeptoren bilden diese Zellen nach der Prozessierung des AGs Oberflächenmoleküle wie den „Major Histocompatibility Complex II“ (MHC II) aus, welcher am T-Zell-Rezeptor der T-Helferzelle binden und diesen aktivieren kann. Dieser Prozess findet nicht direkt in der parodontalen Tasche statt, sondern in einem nahe gelegenen Lymphknoten, in dem die Information der AG-präsentierenden Zelle übermittelt wird. Nach erfolgter T-Zellaktivierung begeben sich diese dann zurück an den Ort des Geschehens. So verschiebt sich mit Fortschreiten der Läsion das Verhältnis zwischen PMNs und Lymphozyten auf die Seite der Lymphozyten. Durch die spezifische MHC II-Expression können unterschiedliche Klassen von T-Zellen aktiviert werden: unter anderen die T-Helferzelle 1 (Th1) und T-Helferzelle 2 (Th2) sowie viele weitere Klassen. Die Aufgabe der Th1 ist die Rekrutierung weiterer Makrophagen über IFN- γ , wohingegen die Th2 über IL-4 und IL-10 B-Lymphozyten für die Antikörpersynthese aktiviert. Da T-Zellen Autorezeptoren für das von ihnen selbst exprimierte IL-2 besitzen, kommt es bei Persistenz der Aktivierung zu einem sich verstärkenden Mechanismus. Th2 haben die Fähigkeit, über Zytokine und Bindung an den B-Zellrezeptor (CD40) ruhende B-Zellen zu Effektor-B Zellen (Plasma-Zellen) zu aktivieren, deren Aufgabe ist, spezifische Antikörper zu bilden, welche wiederum die parodontalpathogenen Mikroorganismen eliminieren sollen. Die Haupt-AK-Klassen der parodontalen Läsion sind IgG gefolgt von IgM und IgA. Wie zuvor für die PMNs beschrieben, können auch Antikörper den organisierten Biofilm größtenteils nicht penetrieren, wodurch es zu einer Chronifizierung des Prozesses kommt.

Das von Schröder und Page 1976 vorgestellte Modell mit der zeitlichen Unterteilung der parodontalen Erkrankung in eine initiale, frühe, etablierte und fortgeschrittene Läsion bleibt bis heute in den Grundzügen erhalten (41). Dabei sind die drei erstgenannten Stadien der reversiblen Gingivitis zuzuordnen, da bis zu diesem Zeitpunkt zwar Kollagendegradation stattgefunden, aber noch kein Knochenabbau eingesetzt hat. Der fließende Übergang zu einer T- und Plasma-Zell dominierten Läsion stellt den Übergang zur Parodontitis dar. Bei der fortgeschrittenen Läsion beschränkt sich die Destruktion nicht auf die Gingiva, sondern umfasst mit der Desintegration des Desmodonts, Zements und des Knochens alle übrigen parodontalen Gewebe (42). Es ist bekannt, dass den PMNs auch in den späteren Stadien wichtige Funktionen zukommen, da die Rekrutierung der Granulozyten durch Zytokine aufrechterhalten bleibt. Residente Fibroblasten und Epithelzellen reagieren auf die zunehmende Konzentration pro-inflammatorischer Zytokine wie COX-2, IL-1, IL-6, IL-8 und TNF- α mit vermehrter Freisetzung von MMPs, welche mitverantwortlich für den Abbau von Kollagen sind. Enzyme dieser Klasse sind sowohl am Kollagen- als auch Knochenumsatz beteiligt und kommen daher auch in physiologischen Konzentrationen im Gewebe vor. Bei Überexpression, wie sie im entzündeten Milieu vorliegt, kommt es jedoch zu einem Ungleichgewicht und damit zur vermehrten Degradation dieser Gewebe (43). Erhöht sich das Expressionsniveau pro-inflammatorischer Zytokine im Verlauf der Parodontitis dauerhaft, steigt auch die MMP-Synthese an, da diese unter anderem durch Entzündungsmediatoren wie COX-2, Interleukine oder TNF- α positiv reguliert werden (43). Da MMP-1 und MMP-8 eine tragende Rolle im Rahmen der Parodontitis spielen, gelten erhöhte Level dieser Enzyme als Parodontitis-Marker (44, 45). Klinisch und histologisch verschiebt sich das Saumepithel und das Entzündungsgeschehen durch den fortschreitenden BG-Verlust nach apikal, da die typische Abwehrreaktion des Körpers auf einen chronifizierten Prozess die bindegewebige Abkapselung des erkrankten Bereichs ist. Zwischen Taschenfundus und Alveolarknochen bleibt stets ein Band an abgrenzendem, intaktem BG erhalten. In der fortgeschrittenen Läsion ist die Gewebedegradation im Vergleich zu den vorherigen Stadien nun nicht mehr auf die Weichgewebe beschränkt. Die Knochenumbaurate wird durch die Aktivität von Osteoblasten und -klasten bestimmt. Die Osteoklastendifferenzierung wird durch die Bindung des Moleküls "Receptor Activator of Nuclear Factor-kappa B Ligand" (RANKL) an seinen entsprechenden Rezeptor (RANK) reguliert. Nach der

Anbindung des Liganden an seinen Rezeptor bilden Osteoklasten Hydrolasen und andere Enzyme, die zur Demineralisierung des Knochens beitragen. Verschiedene Zellen können den RANK-Rezeptorantagonisten Osteoprotegerin (OPG) bilden, welcher die Aktivierung der Osteoklasten verhindert. Im gesunden Individuum herrscht ein Gleichgewicht zwischen Knochenab- und aufbau, sodass dessen Dichte und Volumen konstant gehalten wird. Bei der Parodontitis liegt das Gleichgewicht entzündungsbedingt auf Seite der Osteoklasten, sodass es zu verstärkter Knochenresorption kommt. Parodontitispatienten weisen daher erhöhte RANK und verringerte OPG-Werte im Sulkusfluid auf (46). Ein weiterer wichtiger Transkriptionsfaktor ist „RUNX family transcription factor 2“ (RUNX2), der die Osteoblastendifferenzierung aus Progenitorzellen induziert und von TNF- α herunter- und durch „Bone Morphogenic Proteins“ (BMPs) sowie „Transforming Growth Factor Beta 1“ (TGF- β 1) heraufreguliert wird (47). Pro-inflammatorische Zytokine wie IL-1 und TNF- α sind also an der Regulation von RUNX2, RANK und OPG beteiligt. Da es bei Parodontitis zu einem Ungleichgewicht zwischen diesen Molekülen kommt, findet bei persistierendem Reiz Knochenabbau statt.

5.2.5 Risikofaktoren

Wie erwähnt, wurde schon in älteren Studien (22, 40) gezeigt, dass es deutliche Unterschiede in der Ausprägung und dem Auftreten von Gingivitis und Parodontitis gibt. Wovon hängt es nun ab, ob eine Gingivitis oder Parodontitis entsteht, oder ob der Übergang von einem zum anderen Stadium stattfindet oder die Erkrankung stagniert?

Die Voraussetzung für Parodontitis bildet ein multifaktorielles Mosaik aus dysbiotischem Mikrobiom, überschießender Immunantwort des Wirts, genetischer Veranlagung und vielen weiteren Bausteinen. Es existieren diverse Risikofaktoren, die das Auftreten einer Gingivitis oder Parodontitis wahrscheinlicher machen, wovon dauerhaft schlechte Mundhygiene als einer der Hauptrisikofaktoren für die Entstehung einer Parodontitis unumstritten ist (48). Prädisponierende Faktoren sind jene, die die Akkumulation von dentaler Plaque erleichtern bzw. die Hygienefähigkeit einschränken. Diese Risikofaktoren sind meist lokal wie zum Beispiel eng verschachtelt stehende oder rotierte Zähne (49). Zu weiteren lokalen Risikofaktoren gehören subgingival liegende, nicht ausreichend polierte, überhängende Füllgränder (50, 51), anatomische Varianten (52) wie Schmelzperlen (53) und enge Furkationsbereiche bei Molaren in Kombination mit kurzem Wurzelstamm, Mundtrockenheit (54) oder Mundatmung (55). Prothesen (56), kieferorthopädische Geräte (57), Karies (58), Zahnfrakturen (59) und gingivale Rezessionen (60) sind weitere Konditionen, welche die Reinigung beeinträchtigen und die Plaque Akkumulation fördern können. Zuletzt sei noch auf den gingivalen Phänotyp hingewiesen: ein dünner Phänotyp neigt eher zu entzündlichen Reaktion als ein dicker Phänotyp (39, 61). Abzugrenzen sind die lokalen Risikofaktoren von den systemischen, sogenannten modifizierenden Faktoren, bei denen es sich um jene Umstände handelt, welche das Grundgerüst und die Rahmenbedingungen der wirtseigenen Immunabwehr abwandeln, sodass ein Ausbruch der Krankheit wahrscheinlicher wird. Grundsätzlich gilt jede Kondition, die die Gefäßantwort, die zelluläre Antwort oder das Regenerationsvermögen bestimmter Gewebe verändert als modifizierender Faktor (1). Parodontitis ist mit diversen systemischen Erkrankungen assoziiert (62). Die bekanntesten und häufigsten dieser Umstände sind Rauchen (63, 64), Dysstress, genetische Prädisposition, Diabetes (65) und Übergewicht (66). Des Weiteren reihen sich bestimmte Medikamente (67) mit Einfluss auf das Parodont und immunsupprimierende Erkrankungen (68), sowie diverse Syndrome in diese Liste ein.

Von besonderem Interesse für die vorliegende Arbeit zählen Übergewicht und Adipositas. Da diese eng mit Diabetes mellitus Typ II in Verbindung stehen, soll auf diese Umstände genauer eingegangen werden.

5.2.5.1.1 Diabetes

Diabetes mellitus beschreibt eine heterogene Gruppe von chronischen Stoffwechselerkrankungen, deren zentrale Problematik durch erhöhte Blutglukosewerte gekennzeichnet ist, wobei ein Nüchternplasmaglukosewert von dauerhaft über 120 mg/ml hierbei als zu hoch gilt (69). Da dieser Wert über den Tag deutlichen Schwankungen unterliegt, ist er jedoch recht ungenau. Ein besseres Langzeitmaß stellt der glykierte Hämoglobinanteil dar, bei dem Zuckermoleküle ohne Fremdeinwirkung an den roten Blutfarbstoff binden. Dieser sogenannte „Hämoglobin A1c“-Wert (HbA1c), gibt Aufschluss über die Blutglukosewerte des Patienten der letzten 8-12 Wochen (70), was der mittleren Lebensdauer der Erythrozyten entspricht. Der Zielwert liegt zwischen 6,5 % - 7 % (71). Bleiben die Blutzuckerwerte dauerhaft erhöht, entstehen teils drastische Auswirkungen auf den Gesamtorganismus.

Die Prävalenz von Diabetes mellitus Typ 2 (DMT2) ist in Deutschland von 2009 bis 2015 von 8,5 % auf 9,5 % gestiegen, wobei die jährliche Inzidenz von DMT2 circa 500.000/Jahr - Tendenz steigend - beträgt. Damit stellt Diabetes eine Volkskrankheit mit fest verankerten Wurzeln in der in Deutschland lebenden Bevölkerung dar (72). Auch weltweit befindet sich diese Stoffwechselerkrankung in einer Aufwärtsspirale. Lag die globale Prävalenz im Jahre 2000 noch bei ca. 2,8 %, wird sie aufgrund der zugrunde liegenden Daten auf 4,4 % für das Jahr 2030 geschätzt (73). Gründe hierfür sind unter anderem die steigende Lebenserwartung, diätetische Veränderungen, bei denen übermäßig kurzkettige Kohlenhydrate konsumiert werden sowie Bewegungsmangel. Diese Bewegungs- und Ernährungsmuster lassen sich vor allem in Industrienationen und sogenannten „Schwellen- oder Entwicklungsländern“ verzeichnen. Durch Störung der Insulinsekretion oder -wirkung entstehen Probleme im Glukosemetabolismus. Die bekanntesten Typen des Diabetes mellitus sind Typ 1 (DMT1) und Typ 2 (DMT2), wobei der erste Typ durch autoimmune Zerstörung der Beta-Zellen des Pankreas und der deutlichen Verringerung oder dem gesamten Fehlen des Hormons Insulin gekennzeichnet ist. Dieser Typ kommt bereits in jungen Jahren vor und hat genetische und intrinsische Ursachen. Personen, die an Typ 1 Diabetes mellitus leiden, haben in der Regel einen normalen Body-Mass-Index (BMI). Beim DMT2 hingegen liegen meist extrinsische Ursachen vor, sodass Betroffene häufig übergewichtig oder adipös sind, an Bewegungsmangel leiden und eine unausgewogene Ernährung praktizieren. Durch primär ernährungsbedingt dauerhaft erhöhte Blutzuckerwerte werden die Insulinrezeptoren desensibilisiert und deren physiologische Wirkungsweise reduziert. Des Weiteren synthetisieren Adipozyten, aber auch diverse andere Gewebe bei Übergewicht vermehrt pro-inflammatorische Zytokine wie Adipokine (15), die den chronisch manifestierten entzündlichen Zustand sowie die Desensibilisierung des Insulinrezeptors weiterhin verstärken können, sodass die Aufnahme von Plasmaglukose in die Skelettmuskulatur (SKM)-Zellen gestört ist. Aufgrund der verminderten Rezeptorfunktion wird beim DMT2 von Insulinresistenz gesprochen. Zu den häufigsten Begleiterscheinungen des DMT2 zählen erhöhtes Risiko für Wundinfektionen, Makro- und Mikroangiopathien und damit erhöhtes Risiko für Herz-Kreislaufkrankungen, Augenerkrankungen und weitere (74). Auch Diabetes und Parodontitis korrelieren positiv miteinander und stehen in einem kausalen, bidirektionalen Verhältnis zueinander. So kann ein schlecht eingestellter Diabetes ein 3-fach erhöhtes Risiko für Parodontitis darstellen und eine starke Parodontitis die entgleiste Stoffwechsellage

weiter verstärken, aber eine erfolgreiche Parodontaltherapie bei DMT2 den HbA1c im Schnitt um 0,4 % senken (65).

Sowohl DMT1- als auch DMT2-Patienten weisen aufgrund der dauerhaften Hyperglykämie erhöhte Entzündungsmarker wie TNF- α , C-reaktives Protein (CRP), COX-2 und IL-6 (75) auf. Auch bei Parodontitispatienten sind diese Marker sowohl lokal als auch systemisch erhöht, sodass diese Moleküle die Insulin-Signalkaskade negativ beeinflussen und die Wirkung des Rezeptors im Sinne eines Rückkopplungsmechanismus beeinträchtigen (76–79). Einige immuninflammatorische Zellen wie Monozyten, Makrophagen, PMNs und T-Zellen werden in ihrer Funktion beeinträchtigt, sodass Makrophagen bei schlecht eingestellten Diabetikern auf bakterielle Trigger hyperinflammatorisch reagieren und im Vergleich zum Nichtdiabetiker TNF- α , IL-1 β und Prostaglandin E2 (PGE2) in vermehrter Konzentration abgeben (80, 81). Auch PMNs agieren durch verschlechterte Chemotaxis verändert, und da der zelleigene Kontrollmechanismus der Apoptose ebenfalls gestört ist, verbleiben diese Zellen verlängert im parodontalen Gewebe (82), sodass über einen prolongierten Zeitraum matrixdegradierende Substanzen wie MMPs und reaktive Sauerstoffspezies (ROS) abgesondert werden. Zusammenfassend entsteht eine verlängerte immuneigene Überreaktion mit verringerter Abwehrleistung und vermehrter örtlicher Gewebsdestruktion. Durch die Hyperglykämie sammeln sich „Advanced Glycation End Products“ (AGEs) in parodontalen Geweben an, welche ähnlich wie die vorher genannten Zytokine pro-inflammatorisch wirken. Diese AGEs entstehen durch nicht enzymatische, spontane Bindung von Glukose an Proteine vor allem dann, wenn der Plasmaglukosespiegel über lange Zeit erhöht ist. Durch Bindung an den entsprechenden Rezeptor (RAGE) auf Entzündungszellen ist eine Hochregulation der Genexpression von pro-inflammatorischen Mediatoren wie IL-1 β , IL-6 und TNF- α zu verzeichnen (65). Studien konnten zeigen, dass nicht nur die Entzündungsreaktion verstärkt, sondern auch die Kollagenumsatzrate von Fibroblasten und Osteoblasten durch vermehrte Apoptose reduziert wird. Hinzu kommt ein verringertes Regenerationspotential, da Kollagenfasern stärker miteinander verknüpft werden (82, 83).

5.2.5.1.2 Adipositas

Da DMT2 und Übergewicht in direkter Korrelation miteinander stehen (84) und beide Krankheitsbilder auch als Risikofaktor für Parodontitis gelten (85), soll im Folgenden ein Überblick gegeben und die Zusammenhänge beleuchtet werden.

Adipositas und Übergewicht gelten weltweit als Problem und sind vor allem in Industrienationen, aber auch in vielen anderen Staaten auf dem Vormarsch (86–88). Hauptursachen, neben genetischer Prädisposition, sind vor allem Bewegungsmangel und Über- bzw. Fehlernährung, aber auch soziökonomische Aspekte kommen hier zum Tragen (89, 90). Die Kombination aus Nahrungsüberproduktion, Bewegungsmangel, vermehrt verarbeiteten Lebensmitteln, zunehmendem Wohlstand und mangelnder Aufklärung führen weltweit zu mehr Übergewichtigen (91). Gemessen werden Übergewicht und Adipositas meist anhand des Body Mass Index, der aus dem Quotienten aus Körpergewicht (in kg) / Quadrat der Körpergröße (in m) gebildet wird. Ab einem BMI von 25 kg/m² gilt ein Individuum als übergewichtig bzw. prä-adipös, ab einem BMI von 30 kg/m² wird von Fettleibigkeit gesprochen. Der BMI ist ein einfach anzuwendendes Maß, lässt jedoch außer Acht, dass Muskeln schwerer als Fettgewebe sind und dass Menschen unterschiedliche Fettverteilungsmuster aufweisen (92). So kann ein sportlich aktiver Mensch mit viel Muskelmasse einen erhöhten BMI aufweisen, ist aber dennoch nicht erkrankt. Andersherum können Menschen mit normalen BMI ein erhöhtes Risiko für bestimmte Begleiteffekte haben, wenn sie Fettreserven vor allem als abdominelles Stammfett abspeichern und nicht gleichmäßig subkutan (93). Weitere Maße zur Bestimmung des Risikos für

Adipositas-assoziierte Folgeerkrankungen sind deshalb die „Waist-to-Hip-Ratio“ (WHR) oder die Messung des Körperfettanteils (92). Es ist hinreichend belegt, dass Adipositas Effekte auf den gesamten Organismus ausübt und mit erhöhtem Risiko für diverse Erkrankungen wie DMT2, Herz-Kreislauf-Erkrankungen (94, 95), aber auch Parodontitis (15) einhergeht. Eine mögliche Ursache stellt die dysregulierte Expression pro- und anti-inflammatorischer Mediatoren dar. Da das Fettgewebe nicht nur ein reiner Energiespeicher, sondern auch ein aktives metabolisches Organ ist, kommt es bei pathologischer Zunahme des Fettgewebes zu einer Dysbalance von durch Adipozyten gebildeten Botenstoffen. Es besteht Evidenz dafür, dass adipöse Menschen systemisch erhöhte CRP- und IL-6-Werte aufweisen und sich demnach in einem chronisch-entzündlichen Status befinden, der durch bestimmte Mediatoren wie den Adipokinen moduliert werden kann (15, 93). Wie bei der Pathogenese der Parodontitis bereits erörtert wurde, führen unter anderem PA-pathogene Mikroorganismen im Biofilm, aber auch eine gesteigerte, hyperreaktive Wirtsantwort zur vermehrten Ausschüttung pro-inflammatorischer Zytokine und damit gegebenenfalls zur irreversiblen Destruktion parodontaler Gewebe. Diese Mediatoren sind unter anderem IL-1 β , COX-2, TNF- α , aber auch IL-8, CCL2 und MMPs. Aufgrund der Tatsache, dass Fettleibigkeit Auswirkungen auf diverse andere Organe hat und als Risikofaktor für andere systemische Erkrankungen gilt, wurde ab den späten 1970er der Fragestellung nachgegangen, ob Adipositas auch ein Risikofaktor für Parodontitis darstellen kann. Sowohl epidemiologische Studien als auch Tierversuche an Ratten konnten eine positive Korrelation zwischen zunehmender Adipositas und dem Schweregrad der Parodontitis feststellen (96–98).

Ein möglicher Pathomechanismus für die Assoziation zwischen Parodontitis und Adipositas stellt das Prinzip der "Homotoleranz" dar, deren Mechanismus in Grundzügen dem der Insulinresistenz ähnelt. Hierbei kommt es durch wiederholte Exposition von Antigenen oder freien Fettsäuren (FS) zur Verringerung der Empfindlichkeit der entsprechenden Rezeptoren (Toll-like Receptor - TLR2). Diverse wissenschaftliche In-vitro-Arbeiten konnten zeigen, dass Monozyten und Makrophagen, die LPS von PA-pathogenen Mikroorganismen ausgesetzt wurden, bei einer weiteren Konfrontation mit diesen LPS eine verringerte TNF- α -Expressionsrate aufwiesen. Dies bedeutet, dass die Abwehrzellen abgeschwächt oder gedämpft reagierten. Dieses „homotolerante“ Verhalten für LPS und freie FS verstärkt sich gegenseitig. (99–103). Auch in vivo konnte dieses Phänomen an *P. gingivalis* ausgesetzten Ratten nachgewiesen werden (104), indem hierzu der parodontale Gewebsverlust einer übergewichtigen Testgruppe mit der einer normalgewichtigen Kontrollgruppe verglichen wurde. Die Kontrollgruppe zeigte signifikant weniger Alveolarknochenverlust und generell eine geringe bakterielle Kontamination. Im Umkehrschluss zeigte sich, dass die Parodontitis der Testgruppe einen schwereren Verlauf nahm, was veranschaulicht, dass Fettleibigkeit das Risiko für Parodontitis erhöhen oder zumindest die Ausprägung der Krankheit verstärken kann.

Einen weiteren Erklärungsansatz für die Assoziation zwischen Parodontitis und Adipositas stellen Adipokine dar. Dieser Begriff umfasst Mediatoren, die vom Fettgewebe produziert werden (93) und ähnlich wie Hormone Botenstoffe sind, die in einem oder mehreren Zielorganen unterschiedliche Effekte bewirken können. Diese können unter anderen beispielsweise den Glukosemetabolismus regulieren, das Hunger- und /oder Durstempfinden beeinflussen, aber auch pro- oder anti-inflammatorischer Natur sein. Der Name "Adipokin" entstand unter der Annahme, dass diese Mediatoren hauptsächlich von Adipozyten synthetisiert werden können. Mittlerweile ist jedoch bekannt, dass die Signalmoleküle in unterschiedlichsten Geweben exprimiert werden (15, 105). Eines der ersten identifizierten Adipokine war Adipsin (Komplement Faktor D) im Jahr 1987 (106). Es wurden sukzessive weitere Moleküle wie Leptin und Adiponectin isoliert und auf deren Wirkungsweisen und Effekte untersucht. Mittlerweile ist bekannt, dass eine Vielzahl dieser Signalmoleküle existieren und in unterschiedlichsten Geweben gebildet werden können (93, 107), wobei Fettgewebe dennoch einen Großteil der Adipokinproduktion ausmacht. Somit ist Fettgewebe nicht nur reiner Energiespeicher,

sondern ein aktives metabolisches Organ (93), dessen Sekretion dort gebildeter Moleküle bei exzessiver Zunahme dysreguliert ist. Adipokine stellen ein pathomechanistisches Bindeglied zwischen Adipositas und dem erhöhten Risiko für systemische Erkrankungen dar. Da Übergewicht auch positiv mit DMT2 korreliert, entstehen hier mitunter sich verstärkende Mechanismen. Viszerales und subkutanes Fett können dabei unterschiedliche Expressionsraten von Adipokinen aufweisen, da die Anzahl, Volumen und Komposition der Fettzellen verändert sind. Beim normalgewichtigen Individuum besteht Fettgewebe zum Großteil aus Adipozyten, welches von einem Netzwerk aus feinen Blut- und Lymphgefäßen versorgt wird, zwischen denen sich regulär M2-Makrophagen, CD4+ T-Lymphozyten und Fibroblasten befinden. Mit zunehmendem Übergewicht nehmen Adipozyten mehr Triglyceride auf und werden hypertroph. Histologisch gesellen sich zu den CD4+ Zellen auch CD8+ T-Zellen und M1-Makrophagen. Dieses Stadium des Übergewichts äußert sich in dezenter metabolischer Dysfunktion des Gewebes: M1-Makrophagen und CD8+ Zellen sind Zeichen der Immunaktivität und einer unterschwelligen Entzündungsreaktion. In diesem Stadium steigt die Exkretion pro-inflammatorischer Adipokine und die der anti-inflammatorischen sinkt; dennoch kann der Organismus in dieser Phase einen weitestgehend normalen Metabolismus aufrechterhalten.

Bleibt das Übergewicht bestehen oder steigt sogar noch weiter an, kann ein Übergang zu einem dysregulierten Zustand stattfinden, bei dem die Anzahl pro-inflammatorischer Mediatoren wie Leptin, Resistin, Visfatin, TNF- α , IL-6, IL-18 und CCL2 ansteigt. Histologisch lässt sich dieser Zustand durch weitere Hypertrophie der Fettzellen, verringerte Durchblutung, vermehrte Adipozytenzahl, lokale Nekrosen, eine erhöhte Anzahl von M1-Makrophagen und weitere Lymphozyteninfiltration erkennen. Leitbild und Erkennungsmerkmal dieses dysfunktionalen Gewebes sind sogenannte „crown-like-structures“, bei denen es sich um nekrotische Adipozyten handelt, um die sich zirkulär M1-Makrophagen zum Abbau anordnen (108, 109). Fettgewebe kann also in drei Gruppen klassifiziert werden: Fettgewebe mit normaler metabolischer Funktion, hypertrophes Gewebe bei Übergewichtigen mit dezenter metabolischer Dysfunktion und hypertrophes Gewebe mit ausgeprägter metabolischer Dysfunktion (110). Der letztgenannte Typ spielt aufgrund des entzündlichen Zustands und der vermehrten Expression pro-inflammatorischer Zytokine eine wichtige Rolle bei den systemischen Auswirkungen der Fettleibigkeit. Es kann also festgehalten werden, dass mehrere Faktoren Einfluss auf die Pathogenität des Fettgewebes haben: die Quantität, Qualität und die Art des Gewebetyps (viszerales oder subkutanes Fett).

Mittlerweile sind diverse Adipokine bekannt und werden im Zusammenhang mit systemischen Erkrankungen intensiv beforscht. Einige dieser bioaktiven Moleküle sind zum Beispiel Leptin, Visfatin, Adiponectin, Resistin und Apelin. Ihnen wird ein breites Spektrum an Funktionen zugeschrieben, wozu die Regulierung des Insulinmetabolismus, des Durst- und Hungerempfindens, der Angiogenese, des Energiehaushalts, des Knochenstoffwechsels, der Koagulation und der Hämatopoese zählen, aber auch pro- und anti-inflammatorische Effekte sind bekannt (111). Durch eine unregulierte, d.h. vermehrte Sekretion kann es zu Adipositas-induzierten Begleiterscheinungen kommen. Leptin und Visfatin agieren als entzündungsfördernde Botenstoffe und stimulieren die Synthese von Zytokinen und Proteasen nicht nur im Fettgewebe, sondern auch in Makrophagen (112). Des Weiteren können sie die Apoptose von Entzündungszellen inhibieren (15). Dagegen gilt Adiponectin als anti-inflammatorisch und spielt eine Rolle bei der Zellproliferation und -differenzierung (113, 114). Es konnte gezeigt werden, dass Adiponectin die Regeneration in Knochen- und Muskelgewebe unterstützt. Auch bei der regenerativen PA-Therapie mittels Schmelzmatrixproteinen erzielte Adiponectin in vitro einen fördernden, synergistischen Effekt. Umgekehrt führen erhöhte Visfatin- und Leptin-Level zu kompromittierter parodontaler Regeneration (115). Untersuchungen an adipösen Individuen konnten zeigen, dass die Plasmalevel für Leptin und Visfatin erhöht (116, 117) und die für das protektive Adiponectin verringert sind (118). Durch krankhaftes Übergewicht kommt es dementsprechend zu einem Ungleichgewicht zwischen entzündungsfördernden und protektiven Molekülen. Besteht diese

systemische Dysbalance über längere Zeit, kommt es zu einem chronischen, unterschweligen Entzündungsstatus, wodurch Adipokine einen Pathomechanismus darstellen könnten, über den Adipositas seine negativen systemischen Effekte auszuüben vermag. Dieses Phänomen stellt neben der Homotoleranz einen weiteren pathomechanistischen Link zwischen Adipositas und Parodontitis dar. Durch diesen dysregulierten Zustand könnten adipöse Menschen anfälliger für Parodontitis sein, ein verringertes regeneratives Potential aufweisen und schwerwiegendere Krankheitsverläufe durchlaufen. Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass Gewichtsreduktion wieder zur Normalisierung der Adipokinwerte führte (117). Auch der Übergang von einem dysregulierten, hypertrophen Fettphänotyp zu einem normotrophen, regulierten Typ ist durch Gewichtsreduktion möglich (93). Adipokinwerte können nicht nur systemisch verändert sein, sondern auch lokal in der gingivalen Sulkusflüssigkeit ließen sich Adipokine, unabhängig von bestehender Adipositas, bei Gingivitis und Parodontitis nachweisen (119, 120). Nach einer Parodontitis-Therapie normalisierten sich auch hier die Werte, was zeigt, dass Adipokine nicht nur von Adipozyten synthetisiert, sondern auch lokal exprimiert werden. Diverse Studien befassten sich mit der Regulation unterschiedlicher Adipokine in parodontalen Geweben. Sowohl Gingivafibroblasten, Gingivaepithelzellen als auch PDL-Zellen können unabhängig vom Fettgewebe Adipokine synthetisieren. Pathologisch erhöhte bakterielle Kontamination, biomechanische Belastung, Rauchen oder Entzündung scheinen Einfluss auf die Regulation der Adipokine in Geweben des Zahnhalteapparates zu haben (121, 122). Welche Effekte Adipokine auf parodontale Zellen und Gewebe haben, wurde für Leptin, Visfatin und Adiponectin untersucht. So kommt es durch Visfatin zur vermehrten Expression von MMP1, CCL2, durch Leptin zur vermehrten Genexpression von TNF- α . Werden PDL-Zellen PA-pathogenen Mikroorganismen ausgesetzt, steigt die Produktion pro-inflammatorischer Mediatoren wie IL-1 β , IL-6, IL-8, MMP1 und -3 an. Werden die Zellen zusätzlich mit Adiponectin inkubiert, so wird diesem entzündlichen Reiz entgegengewirkt: die Synthese dieser pro-inflammatorischen Moleküle wird reduziert. Im Gegensatz dazu können Leptin und Visfatin die TNF- α Produktion ankurbeln und wirken demnach entzündungsfördernd (123). Solche Effekte wurden auch in gingivalen Fibroblasten beobachtet (124). Die regulatorischen Eigenschaften von Visfatin, Leptin und Adiponectin wurden in den letzten Jahren durch diverse Experimente beleuchtet. Apelin stellt ein weiteres Adipokin dar, zu dem bisher nur sehr wenige Studien in parodontalen Geweben existieren.

5.2.5.1.3 Apelin

Apelin wurde 1998 von Tatemoto et al. zum ersten Mal isoliert und beschrieben (125). Im Vorfeld war bereits 1993 der APJ-Rezeptor in Menschen entdeckt worden (126), jedoch war zu diesem Zeitpunkt der entsprechende Agonist noch nicht bekannt. Es handelt sich dabei um einen G-Protein-gekoppelten Rezeptor, dessen Genlocus auf Chromosom 11 Band q12 verortet ist. Da dieser Rezeptor zum Teil (30% Übereinstimmung) dem Angiotensin2-Rezeptor (AT2) ähnelt, wurde er zunächst als „Angiotensin like Receptor Ligand“ (AGTRL) bezeichnet. Im späteren Verlauf wurde er jedoch zu APJ umbenannt, da sich herausstellte, dass AT2 lediglich unspezifisch an diesen Rezeptor bindet. Das Gen Xq25-q26.3 codiert die Proteinbiosynthese (PBS) für Preproapelin, ein Polypeptid mit 77 Aminosäuren (127), das sich nach fünf Jahren als Gegenstück zum APJ-Rezeptor herausstellte. Aus diesem Vorläufer können mindestens vier aktive Isoformen gebildet werden: Apelin-13, -17, -36 und Pyr(1)-Apelin-13. Der C-Terminus dieser Peptide ist der Agonist zu dem 1993 entdeckten Rezeptor. Der Name Apelin steht für **APJ Endogenous Ligand**. Studien konnten zeigen, dass die Apelin-Varianten im 22-C-Terminus sowohl bei Menschen als auch bei Ratten, Mäusen und Kühen identisch sind. Die pyroglutamatierte Form Pyr(1)-Apelin-13 gilt als aktivste der Subtypen (125) und wird hauptsächlich für Experimente genutzt. Dies liegt auch daran, dass sie widerstandsfähiger gegenüber Peptidasen und demnach einfacher zu handhaben ist als ihre

Schwestervarianten (105). Die Affinität dieses Subtyps zum APJ-Rezeptor ist signifikant höher als die der anderen Peptide (125). Es konnte gezeigt werden, dass hydrophobe Ketten des Moleküls eine entscheidende Rolle für die Rezeptor-Ligand-Interaktion spielen (128). Da Apelin zunächst in Geweben des zentralen Nervensystems (ZNS) isoliert wurde, sprach man dem Molekül eine wesentliche Bedeutung für die zentrale Signalübertragung zu (129). Mit fortschreitender Forschung wurde der Apelin-APJ-Komplex auch in anderen Geweben entdeckt und damit deutlich, dass Apelin eine weite Bandbreite an physiologischen Effekten hat. So greift das Molekül in die Regulierung des Knochenhaushalts ein und beeinflusst die Apoptose, Proliferation und Differenzierung von Osteoblasten im Tiermodell (130–132). Es wurden auch kardioprotektive Eigenschaften des Apelins beschrieben. So fördert es die Angiogenese im Tiermodell nach Myokardinfarkt durch vermehrte Proliferation, Migration und „Vascular Endothelial Growth Factor“ (VEGFR)-Induktion in Endothelzellen (133). Im Lungengewebe fördert Apelin die Alveolenbildung und senkt Entzündungsparameter (134). Es wirkt peripher vasodilatierend (135) und führt somit über die Aktivierung der endothelialen Stickstoffmonoxid-Synthase (eNOS) zur Stickstoff (NO)-Sekretion und daraus resultierend zur Gefäßweitstellung und Blutdruckreduktion. Das Molekül hat jedoch auch metabolische Funktionen: Dass Apelin von Adipozyten sezerniert wird und demnach unter die Definition eines Adipokins fällt, wurde durch die Forschungsgruppe um Valet erstmals bestätigt (129, 136). Durch Apelin wird die Adenosinmonophosphat (AMP)-abhängige Kinase und Stickstoff-Monoxid (NO)-Synthase aktiviert, was zu vermehrter Glukose Aufnahme in die SKM und ins Fettgewebe führt und damit eine Hypoglykämie bedingt (137). Ähnliche Erkenntnisse zeigen auch Studien aus anderen Geweben: in Myokardzellen und im Intestinaltrakt induzierte Apelin den Glucose-Uptake über GLUT4 (138, 139). An Knockout-Mäusen, die das Präproapelin-Gen nicht besitzen, konnte gezeigt werden, dass Apelin den Blutzuckerspiegel senkt, da diese Mäuse durch die fehlende Gensequenz kein Apelin produzierten und erhöhte Insulinwerte sowie verringerte Insulinsensitivität aufwiesen (140). Auch der Fettstoffwechsel wird durch das Adipokin dahingehend beeinflusst, dass Apelin Übergewicht entgegenwirken kann, indem es die Fettsäure-Oxidation in der SKM verstärkt (141). Apelin-überexprimierende Mäuse zeigten eine erhöhte Resistenz gegen Übergewicht bei gleichzeitiger Verbesserung der Vaskularisierung des Fettgewebes. Im Gegensatz dazu kam es bei Apelin-Knockout-Mäusen zu einer übermäßigen Gewichtszunahme (142). An In-vitro- und Tierversuche schlossen sich humane In-vivo-Versuche an, sodass Habchi et al. 2014 Serumapelin-Werte von Gesunden und DMT1/2-Erkrankten verglichen (143). Bei beiden Diabetestypen waren Apelin-Plasmawerte signifikant erhöht und positiv mit den HbA1C-Werten korreliert, was darauf hindeutet, dass eine schlechte glykämische Einstellung mit erhöhten systemischen Apelin-Werten einhergeht. Da Apelin die Eigenschaft aufweist, den Blutglukosespiegel zu senken, schlussfolgerten die Autoren, dass das Molekül einen alternativen Regulationsweg zum Insulin darstellt (143) und es sich demnach um einen Kompensationsmechanismus für die bei Diabetikern häufig vorhandene Insulinresistenz handelt (105). Eine aktuelle Studie befasste sich mit den Apelin-Serumwerten in Verbindung mit der Kombination aus DMT2 und Parodontitis. Wie im Vorfeld bereits erörtert, haben Parodontitis und DMT2 eine bidirektionale, kausale Wechselbeziehung. Des Weiteren können pro- und anti-inflammatorische Adipokine ebenfalls Auswirkungen auf den Verlauf der Parodontitis haben. In besagter Studie wurde überprüft, wie die Plasmawerte von Gesunden, DMT2-Patienten und DMT2-Patienten mit Parodontitis korrelieren. Patienten, die sowohl an DMT2 als auch Parodontitis litten, wiesen dabei die höchsten Apelin-Serumwerte auf, wohingegen bei den gesunden Patienten die geringsten Werte festgestellt werden konnten (120). Diese Werte lassen sich wiederum mit der blutzuckersenkenden Wirkung des Apelins erklären, da hier ebenfalls der zuvor beschriebene Kompensationsmechanismus durch Apelin bei verringerter Insulinsensitivität bei DMT2 greift. Das Polypeptid hat auch modulierende Eigenschaften im Hinblick auf Entzündung. Die kurzzeitige protektive Wirkung des Apelins bei parodontaler Entzündung zeigte sich in einer In-vitro-Studie aus

dem Jahre 2019, bei der parodontale Zellen einem simulierten entzündlichen Milieu durch Inkubation mit TNF- α ausgesetzt wurden (144). Die Zellen reagierten auf die TNF- α -Inkubation erwartungsgemäß mit der Produktion von MMP1, IL-6 und COX-2. Interessanterweise konnte in der besagten Studie eine Reduktion der Genexpression für Apelin bei zunehmender TNF- α -Konzentration festgestellt werden, wohingegen eine artifizielle Überexpression oder Inkubation mit exogenem Apelin zu einer dosisabhängigen Reduktion der Genexpression für die letztgenannten Entzündungsmarker IL-6 und COX-2 führte. Dies bedeutet, dass das Molekül in diesem Szenario in hoher Dosis einen anti-inflammatorischen Effekt auszuüben schien. Des Weiteren wurden in selbiger Studie auch reduzierte Apelinexpressionen in Gingiva-Proben von parodontal erkrankten Patienten festgestellt (144). Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass das Molekül Apelin ein breites Spektrum an physiologischen Funktionen aufweist, welche sich jedoch in verschiedenen Geweben und Zelltypen unterscheiden. Bezogen auf den Glukose-Metabolismus scheint es ähnliche systemische Effekte wie Insulin zu besitzen und fungiert als physiologische Alternative bei Insulinresistenz. Lokal wurden für Apelin, je nach Gewebetyp, protektive und anti-inflammatorische, aber auch entzündungsfördernde Effekte beschrieben. Ziel dieser Arbeit war es, die regulatorischen Effekte von Apelin in An- und Abwesenheit von *F. nucleatum* auf PDL-Zellen zu untersuchen, um so die zugrundeliegenden Pathomechanismen für die Assoziation zwischen Parodontitis und Adipositas besser zu verstehen.

5.3 Diagnostik

Die parodontale Diagnostik erfolgt klinisch und radiologisch. Um den Attachmentverlust festzustellen, wird an 6 Messstellen pro Zahn eine Millimeter-skalierte Sonde in den Sulkus eingeführt und der Messwert visuell ermittelt. Überschreitet die Sonde den Grenzwert von 3,5 mm, liegt mit hoher Wahrscheinlichkeit parodontaler Stützgewebeverlust vor. Das Bluten auf Sondieren ist ein zusätzlicher Indikator für eine vorherrschende Entzündung. An mehrwurzligen Zähnen wird zusätzlich der Furkationsgrad mit einer entsprechenden Sonde, welche 3 mm-Markierungen aufweist und halb rund gebogen ist, um das Einführen in den Furkationsbereich zu erleichtern, bestimmt. Kann die Sonde mehr als 3 mm in die Furkation eingebracht werden, liegt Furkationsgrad II vor. Eine durchgängige Furkation der Wurzel stellt Grad III dar. Lässt sich die Sonde nur bis maximal 3 mm einführen, liegt Furkationsgrad I vor. Des Weiteren werden Lockerungsgrade der Zähne sowie Plaquewerte festgehalten. Alle Messwerte werden als Parodontalstatus auf einem Befundbogen dokumentiert. Auch radiologisch kann Knochenabbau in der vertikalen und horizontalen Dimension mittels Zahnfilmen und einer Panoramaschichtaufnahme beurteilt werden. Mikrobiologische Tests sind nach der aktuellen Auffassung nur in Ausnahmesituation indiziert, da sie meist keine therapeutische Konsequenz haben. Mit Hilfe der anamnestischen, klinischen und radiologischen Befunde kann die Parodontitis nach der 2017 eingeführten Klassifikation in die Stadien eins bis vier eingeteilt werden. Die Progressionsrate der Erkrankung wird unter Berücksichtigung modifizierender Faktoren wie Diabetes Mellitus und Rauchen in die Grade A-C eingestuft. Des Weiteren wird unterschieden, ob die Parodontitis lokal, also an < 30% aller Zähne erhöhte Messerwerte festzustellen sind oder generalisiert vorkommt und ob ein Molaren-Inzisiven-Verteilungsmuster vorliegt (16).

5.4 Therapie

Die Therapie der Parodontitis richtet sich nach dem Schweregrad, der Progression und ggfs. der Ausdehnung der Erkrankung. Der Aufbau der Therapie umfasst mehrere aufeinanderfolgende Phasen, wovon sich die erste Stufe der Behandlungsabfolge vor allem auf die Feststellung der Ätiologie und die Unterweisung und Information des Patienten fokussiert. Der Patient erhält eine umfassende Aufklärung und Beratung sowie die Anleitung zur adäquaten Mundhygiene, um die supragingivale Plaque effizient und nachhaltig auf einem niedrigen Niveau halten zu können. Eine professionelle Zahnreinigung ist in dieser Phase sinnvoll, aber nicht zwingend gefordert. An erster Stelle steht das Verständnis des Patienten für die Ursachen der Erkrankung und die Etablierung einer eigenständigen, nachhaltig guten Mundhygiene. In dieser Phase sollten systemische und lokale Risikofaktoren erkannt und behandelt werden. Im Anschluss erfolgt im zweiten Schritt die „antiinfektiöse“ Therapie. Ziel dieser zweiten Therapiestufe ist die nichtchirurgische Entfernung aller subgingivalen Beläge und damit die Zerstörung des bakteriellen Biofilms. Hierbei stehen Hand-, Ultraschall- und Pulverstrahlgeräte zur Verfügung. Je nach Schweregrad kann eine adjuvante systemische Antibiose erfolgen. Frühestens drei Monate nach subgingivaler Instrumentierung erfolgt ein erneuter ausführlicher Befund. Weist der Patient zum Zeitpunkt der Reevaluation parodontale Taschen von 6 mm oder tiefer auf, kann eine chirurgische Behandlung notwendig werden (dritte Therapiestufe). Hierbei können die Zahnfleischtaschen mittels Zugangslappen unter Sicht gereinigt, resektive Maßnahmen getroffen oder bei entsprechender Indikation im Sinne einer regenerativen Therapie Knochenersatzmaterialien, Membranen und/oder Wachstumsfaktoren appliziert werden. Spätestens nach der dritten Therapiestufe folgt die unterstützende Parodontitistherapie, d.h. die vierte Therapiestufe. Diese besteht aus regelmäßigen Kontrollterminen zur Remotivation und bedarfsweiser Nachbehandlung der Resttaschen, um Rezidiven vorzubeugen. Ziel der Parodontitistherapie ist die Re-Etablierung des eubiotischen Mikrobioms und dessen dauerhafte Stabilisierung, die Abwesenheit von Entzündung und die Stagnation des Knochenabbaus (145).

6 Material und Methoden

6.1 Zellkultur und Stimulation

Für die Zellkultur wurde eine PDL-Zelllinie der Universität Göttingen verwendet. Daher war keine Genehmigung durch die hiesige Ethikkommission notwendig. Um bakterielle Kontamination zu vermeiden, wurden alle Arbeiten, welche die Zellkultur betrafen, unter möglichst aseptischen Bedingungen durchgeführt. Dies implizierte das Arbeiten mit autoklavierten Pipettenspitzen, Eppendorfgefäßen, Petrischalen und sonstigen Gebrauchsgegenständen. Jeglicher Arbeitsschritt wurde unter einer zuvor desinfizierten Sterilbank durchgeführt.

Für die Aussaat der Zellen wurden diese aus dem mit flüssigem Stickstoff gekühlten Behälter entnommen, aufgetaut und in Zellkulturflaschen mit Nährmedium überführt (Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) GLutaMAX (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland), angereichert mit 10% fötalem Kalbsserum (FBS, Invitrogen). Des Weiteren wurden 100 Einheiten Penicillin (Invitrogen) und 100 µg/ml Streptomycin (Invitrogen) hinzugegeben. Die mit Zellen und Medium befüllte Flasche wurde nachfolgend horizontal in einen Zellinkubator gestellt. Die im Inkubator herrschenden Verhältnisse betragen 37°C in einer befeuchteten Atmosphäre aus 5 % CO₂. Um das Wachstum der Zellen zu

überprüfen, wurden diese regelmäßig lichtmikroskopisch begutachtet und bei einer Konfluenz von circa 70-80 % in kleinere 6-Well-Platten überführt (BioFlex® collagen-coated culture plates, Flexcell International, Hillsborough, NC, USA). Zu diesem Zweck wurde zunächst DMEM im Wasserbad angewärmt. Nach gründlicher Desinfektion des Abzugs konnte das alte Medium der Zellkulturflasche verworfen werden, und die Zellen zweimal mittels 5 ml Phosphate-buffered Saline (PBS) gereinigt werden. Um die Zellen vom Flaschenboden zu lösen, wurden anschließend 2 ml Trypsin (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) hinzugegeben. Das Ablösen der Zellen wurde lichtmikroskopisch überprüft. Um die Reaktion zu stoppen, wurden erneut 5 ml DMEM hinzugegeben und diese Suspension anschließend in ein 50 ml Reaktionsgefäß (Thermo Fisher Scientific) überführt. Mittels einer Zentrifuge, die bei 1.300 rpm für fünf Minuten lief, wurde die Suspension aufgereinigt. Am Boden des Gefäßes bildete sich ein Zellpfropf und der Überschuss wurde verworfen. Anschließend wurden 10 ml DMEM vorsichtig hinzu pipettiert. Um die Zellmengen festzustellen, wurden dann 100 µl der Zellsuspension entnommen und mit 100 µl Trypanblau (Lonza Group, Basel, Schweiz) in einem autoklavierten 1,5 ml Eppendorf-Röhrchen (Thermo Fisher Scientific) gründlich durchmischt. Mit dem Zellzählgerät „LUNA“ (Logos Biosystems, Süd-Korea) konnte die Zellzahl bestimmt werden. Mit diesem Wert konnte berechnet werden, wie viel Medium hinzugefügt werden musste, um bei 2 ml Volumen 100.000 Zellen/Well zu erhalten. 24 h vor der Stimulation wurde die FBS-Konzentration auf 1 % reduziert. Das Medium wurde während des Experiments täglich gewechselt und die Zellen mittels optischer Vergrößerung kontrolliert. Um ein entzündliches Milieu in vitro zu simulieren, wurden die PDL-Zellen mit dem inaktivierten Parodontalpathogen *F. nucleatum* ATCC 25586 (optische Dichte 0,025; 0,05; und 0,1) stimuliert. Für die zeitabhängigen Versuche wurde *F. nucleatum* 0,025 verwendet und nach 6 h, 12 h, 24 h und 48 h gesammelt. Dazu wurde der Bakterienstamm 48 h lang in anaerober Atmosphäre auf Schaedler-Agarplatten (Oxoid, Basingstoke, Vereinigtes Königreich) vorkultiviert. Anschließend wurden die Bakterien in PBS ($OD_{660nm} = 1$, entsprechend $1,2 \times 10^9$ Bakterienzellen/ml) suspendiert und zweimal mit Ultraschall (160 W für 15 Minuten) behandelt, was zur vollständigen Abtötung führte. Außerdem wurde Apelin (rekombinantes humanes Apelin-Protein, Abcam, Cambridge, Vereinigtes Königreich) in einer Konzentration von 1 ng/ml für die In-vitro-Stimulation verwendet. Darüber hinaus wurden die Zellen mit PDTC (10 µM, Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA), einem spezifischen Inhibitor von NF-κB, und U0126 (10 µM, Calbiochem, San Diego, CA, USA), einem spezifischen Inhibitor der MEK1/2-Signalübertragung, vor inkubiert. Unbehandelte Zellen dienten als Kontrolle. Zum Sammeln der Zellen wurde das Medium vorsichtig abgesaugt. Die Rückstände wurden mittels PBS zweimalig entfernt. Nach lichtmikroskopischer Kontrolle wurde auch das PBS entfernt, und die Zellen wurden mittels 350 µl β-Mercaptoethanol (BioRad, Hercules, Kalifornien, USA) lysiert. Um die Zellen aus den Petrischalen in Röhrchen zu überführen, wurden die Zellen mit autoklavierten Plastik-Spateln vom Boden des Wells entfernt. Dazu wurden vorsichtig gleichmäßige schabende Bewegungen vom Zentrum des Wells zur Außenwand durchgeführt, sodass die zellreiche Suspension mit einer Pipette aufgesogen werden konnte und anschließend in autoklavierte 1,5 ml Tubes gegeben sowie auf Eis gelegt werden konnte. Anschließend wurden die Tubes bei -80°C tiefgefroren und standen somit für die RNA-Isolation zu einem späteren Zeitpunkt zur Verfügung.

6.2 Real-time PCR

Die RNA-Isolation wurde mittels RNEasy Minikit (Qiagen, Hilden, Deutschland) durchgeführt. Die zuvor tiefgefrorene RNA wurde zum schonenden Auftauen auf Eis gelegt. Nach gründlicher Desinfektion wurde unter separatem RNA-Abzug (Captair Bio 320, Erlab, Val-de-Reuil, Frankreich) 350 µl 70 % Ethanol zu jeder Probe hinzugegeben. Dieses Gemisch wurde in ein neues rosafarbenes Eppendorf-Röhrchen pipettiert (RNeasy Mini Spin Column 74104). Im Anschluss wurden 700 µl Puffer (RW1) hinzugegeben und es wurde 1 min zentrifugiert. Der Überstand blieb erhalten und die Flüssigkeit wurde verworfen. Danach wurden 500 µl Puffer (RPE) in jede Probe transferiert. Dieser Puffer musste im Vorfeld mit 650 µl Ethanol angemischt werden. Durch erneute Zentrifugation und erneutes Waschen mit demselben Puffer wurde die RNA aufgereinigt. Die RNA sammelte sich dadurch im Filter der RNeasy Mini Spin Column. Im letzten Schritt wurde der Filter in ein neues Eppendorf-Tube überführt und die Säule mit 10 µl RNase freiem Wasser (Invitrogen) beträufelt sowie für 1 min zentrifugiert. Um die Menge an RNA in der Suspension zu bestimmen, wurde mittels Spektrometer (Nanodrop; Thermo-Fischer Scientific) die optische Dichte bestimmt. Die auf Eis gelagerten Proben wurden im Anschluss entweder bei -80°C eingefroren oder direkt in komplementäre DNA (cDNA) konvertiert.

Um RNA in cDNA zu konvertieren, bedarf es des „Oligo(dT) Primers“, welcher an den Poly-A-Schwanz der RNA binden kann. In einem zweiten Schritt bindet das Enzym „reverse Transkriptase“ an diesen Primer und sorgt für die Synthetisierung eines komplementären DNA-Strangs. In den hier beschriebenen Versuchen wurde das „iScript cDNA Synthesis Kit“ (BioRad) verwendet. Das Gemisch aus RNA, iScript, Oligo(dT) Primer und RNase freiem Wasser wurde in einen Thermocycler (Flex Cycler, BioRad) gestellt. Die reverse Transkriptase umfasste die folgenden Phasen:

Annealing	5 min 25°C
Reverse Transkription	20 min 46°C
Inaktivierung der Reversen Transkriptase	1 min 95°C

Tabelle 1 - Phasen der PCR

Nach Beendigung der Konvertierung wurde 40 µl RNase freies Wasser hinzugegeben, und die cDNA-Proben bei -80°C eingelagert.

Für die Real-time PCR stehen grundsätzlich zwei Methoden der Quantifizierung zur Verfügung: die absolute und die relative. Bei der absoluten Quantifizierung wird die tatsächlich vorkommende Menge an Transkriptionsendprodukten bestimmt. Der Nachteil dieser Methode besteht in der hohen Techniksensitivität. Während der Verarbeitungskette können sich Fehler aufsummieren, sodass falsche Ergebnisse resultieren. Schon kleine Differenzen wie unterschiedliche Lagerung oder Raumtemperatur führen zu unterschiedlichen Ergebnissen der PCR. Es ist nicht möglich die Lagerungs- und Versuchsbedingungen zu 100 % identisch zu gestalten (146). Dies führt zu unterschiedlichen Mengen der zu Beginn der PCR vorliegenden RNA und damit auch zu unterschiedlichen Endsummen. Die relative Quantifizierung basiert auf der Vervielfältigungsrate eines Zielgens in Relation zu einem Kontrollgen. Das Kontrollgen ist hierbei ein Gen, welches für ein ubiquitär vorkommendes Molekül codiert. Dieses Molekül kann ein Protein sein, welches zum Beispiel an essenziellen Zellfunktionen beteiligt ist. Die Vervielfältigung des Zielgens wird auf die des Kontrollgens normalisiert. In dieser Arbeit wurde als sogenanntes „Housekeeping Gene“ Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) verwendet. Dieses Enzym ist an der Glykolyse beteiligt und katalysiert die Spaltung von Glycerin-2-Phosphat zu 1,3-Bisphosphoglycerat. Bei dieser Reaktion entsteht energiereiches Adenosintriphosphat (ATP). Damit ist dieses Enzym essenziell für den Energiestoffwechsel jeglicher Zellen und erfüllt dementsprechend die Voraussetzungen eines Normalisierungsgens. Der Vorteil der

relativen Quantifizierung liegt darin, dass sich mögliche Störeinflüsse auf die Zellkultur auch auf die GAPDH-Expression auswirken. Bei der absoluten Quantifizierung würde sich dies in erhöhten oder verminderten Expressionsergebnissen widerspiegeln. Da es hier keine Referenz gibt, kann nicht ausgemacht werden, wie hoch der Anteil der durch Störfaktoren verursachten tatsächlichen Expression ist. Durch Normalisierung auf ein Housekeeping-Gen bei der relativen Quantifizierung werden diese Fehlerquellen durch die Bildung eines Verhältnisses einbezogen und dadurch relativiert. Die Genauigkeit der Methode steigt. (147)

Für die (quantitative) Real-time PCR wurden die zuvor gewonnenen cDNA-Proben aufgetaut. Wie auch bei der RNA-Isolation und reversen Transkription wurde unter einem speziellen UV-geschützten Abzug gearbeitet (Captair Bio 320, Erlab). Im Vorfeld wurde ein „Mastermix“, bestehend aus sterilem Wasser, Primer und Sybr Green II (Thermo Fisher Scientific), angemischt. Primer wurden entsprechend der zu untersuchenden Substanz hinzugegeben (GAPDH, COX-2, Apelin, APJ, etc.). Bei mehreren Primern wurden entsprechend mehrere Mastermixe hergestellt. Sybr Green bindet an die cDNA, die als Einzelstrang vorliegt. Da es bei Bestrahlung mit bestimmten Wellenlängen fluoresziert, kann es vom Thermocycler erkannt werden und somit die RNA-Menge im Gefäß ermittelt werden.

Bei der PCR wurden Proben in 96-Well-Platten (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland) in Triplikaten angeordnet, um Fehlmessungen zu erkennen. Im ersten Schritt wurde hierzu der entsprechende Mastermix vorgelegt und darauffolgend kontrolliert die cDNA hinzugegeben, versiegelt, zentrifugiert und die Röhrchen in den Thermocycler gestellt. Um zu untersuchen, ob *F. nucleatum* einen dosis- oder zeitabhängigen Einfluss auf die Genexpression der Moleküle GAPDH, COX-2, CCL2, MMP1, Apelin und APJ in PDL-Zellen hat, wurden die Zellen zu unterschiedlichen Zeitpunkten geerntet und mit verschiedenen Bakterien-Konzentrationen inkubiert. Die benutzten Konzentrationen entsprachen der optischen Dichte von 0,025 OD (*F.n.* 1), 0,050 OD (*F.n.* 2) und 0,100 OD (*F.n.* 3). Die optische Dichte wurde mittels Photometer (Nanodrop; Thermo-Fischer Scientific) bestimmt. Für die zeitabhängige Messung wurde auf die Dichte 0,025 zurückgegriffen und zu den Zeitpunkten 6 h, 12 h, 24 h und 48 h geerntet. Die entsprechenden Rohdaten konnten nach Beendigung der PCR exportiert und in ein Programm zur statistischen Auswertung eingepflegt werden. In der vorliegenden Arbeit wurden mittels PCR die GAPDH-, COX-2-, CCL2-, MMP1, Apelin- und APJ-Genexpressionen bei Stimulation mit *F. nucleatum* ermittelt. Des Weiteren wurden auch Kombinationsversuche durchgeführt. Hierzu wurden Zellen *F. nucleatum* (OD 0,025) und/oder Apelin ausgesetzt. Unstimulierte Zellen dienten der Kontrolle. Die Genexpressionen von GAPDH, COX-2, CCL2, CXCL-8, TNF- α , MMP1, TGF- β 1 und RUNX2 wurden nach 24 und 48 h quantifiziert. Um Informationen über die zugrundeliegenden intrazellulären Signalwege zu erhalten, wurden Inhibitionsversuche durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden die Zellen mit spezifischen Inhibitoren für die NF- κ B- oder MEK1/2-Signaltransduktion vorinkubiert und anschließend mit *F. nucleatum* und/oder Apelin stimuliert. Die Zeit-, Dosis-, Kombinations- und Inhibitionsexperimente wurden dreimal wiederholt.

6.3 ELISA

Die Proteinspiegel von CCL2 und MMP1 in den Zellüberständen wurden mit handelsüblichen ELISA-Kits (DuoSet, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) gemäß den Anweisungen des Herstellers gemessen. Die optische Dichte wurde mit einem auf 450 nm eingestellten Mikroplattenlesegerät (BioTek Instruments, Winooski, VT, USA) bestimmt. Die Messwerte bei 450 nm wurden von den Messwerten bei 540 nm subtrahiert, um eine optische Korrektur gemäß den Empfehlungen des Herstellers vorzunehmen. Die Zellzahlen wurden überprüft und unterschieden sich nicht signifikant zwischen den Gruppen.

6.4 Auswertung

Die Werte wurden nach Aggregation zunächst analytisch und graphisch auf Normalverteilung mittels Shapiro-Wilk-Test und QQ-Plot getestet. Das Signifikanzniveau bzw. Testniveau betrug $\alpha=0,05$. Wurde ein Datensatz als normalverteilt identifiziert, konnten weiterführend parametrische Tests angewandt werden. War dies nicht der Fall, wurde mit nichtparametrischen Tests weitergearbeitet. Um zu überprüfen, ob sich die Mittelwerte normalverteilter Gruppen signifikant unterschieden, wurde die Varianzanalyse (einfache ANOVA) genutzt. Bei nicht normalverteilten Werten wurde hingegen Gebrauch vom Kruskal-Wallis Test gemacht. Wurden Daten als normalverteilt identifiziert und folgend als signifikant variant herausgestellt, konnten mittels Post-Hoc Tests (Dunnett) die signifikanten Unterschiede genauer lokalisiert werden. Bei Datensätzen, welche nicht normalverteilt vorlagen, wurde dementsprechend mit nichtparametrischen Post-Hoc Tests gearbeitet (Dunn). Auch einzelne Vergleiche wurden abhängig von der Normalverteilung gewählt (parametrisch: t-test, nichtparametrisch: Mann-Whitney U-Test).

Da bei der relativen Quantifizierung mittels Normalisierung über ein Housekeeping-Gen gearbeitet wird, wurde ein Datenblatt entworfen, in dem die Formeln für die Berechnung der einzelnen Werte hinterlegt sind. Die Rohdaten der PCR konnten in dieses Datenblatt übertragen werden, und das ausgerechnete Verhältnis für die weitere Auswertung mittels Graphpad Prism (GraphPad Software, Kalifornien, US) verwendet werden. Um das Verhältnis der Vervielfältigung zu berechnen, ist der CT- oder CP-Wert ausschlaggebend. Dieser als „Cyclic Threshold“ oder „Crossing Point“ betitelte Wert gibt an, nach wie vielen PCR-Zyklen des Thermocyclers ein reproduzierbares Signal des fluoreszierenden Sybr Green gemessen werden konnte. Dies bedeutet, dass bei geringerer Anzahl der nötigen Durchläufe die relative Menge der Startkopien hoch ist und umgekehrt. Um die Expression des Zielgens bezogen auf das Housekeeping-Gen zu beurteilen, wurde die $\Delta\Delta\text{CT}$ -Methode verwendet. Hierzu wurde zunächst der CT-Wert des Testgens von dem CT-Wert des Kontrollgens abgezogen.

$$\Delta\text{CT} = \text{CT}_{\text{Testgen}} - \text{CT}_{\text{Kontrollgen}}$$

Da für den CT des Kontrollgens jeweils Triplets vorlagen, wurde mit den entsprechenden Mittelwerten gerechnet. Als nächstes wurde vom ΔCT der Testgruppe der ΔCT der Kontrollgruppe subtrahiert.

$$\Delta\Delta\text{CT} = \Delta\text{CT}_{\text{Testgen}} - \Delta\text{CT}_{\text{Kontrollgen}}$$

Der relative Expressionsunterschied zwischen zwei Proben kalibriert auf einen Standard ergibt sich aus der Formel:

$$\text{Ratio} = 2^{-\Delta\Delta\text{CP}}$$

Die so ermittelten Werte wurden mit dem Statistikprogramm Graphpad Prism (GraphPad Software) ausgewertet.

7 Ergebnisse

7.1 Genexpression in An- und Abwesenheit von *F. nucleatum*

7.2 Regulation der Expressionen von COX-2, CCL2 und MMP1 durch *F. nucleatum*

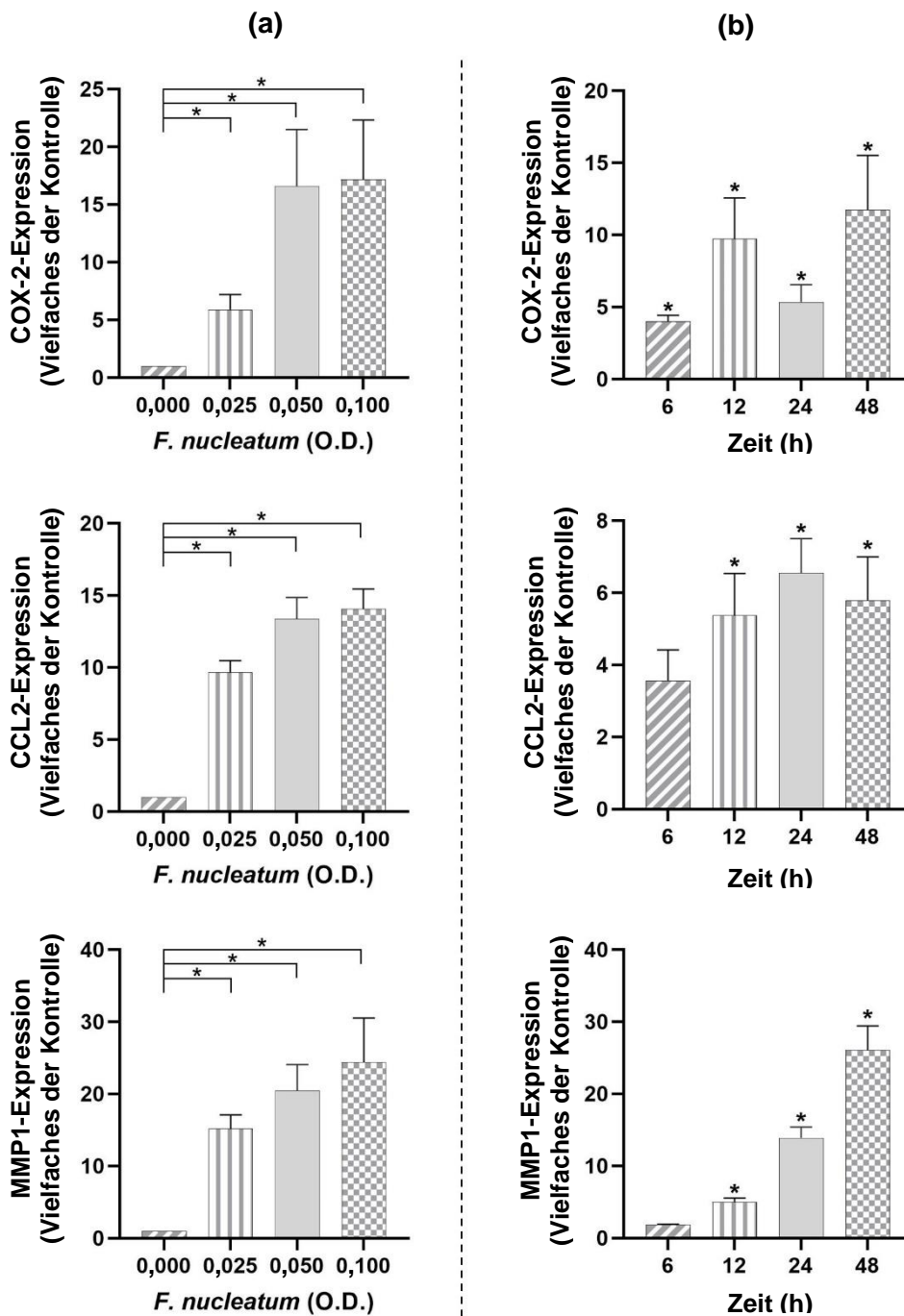


Abbildung 3 - (a) Expressionen von COX-2, CCL2 und MMP1 in An- und Abwesenheit verschiedener Konzentrationen von *F. nucleatum* (OD_{660} : 0,000; 0,025; 0,050; 0,100) in PDL-Zellen nach 24 Stunden. (b) Expressionen von COX-2, CCL2 und MMP1 in Anwesenheit und Abwesenheit von *F. nucleatum* (OD_{660} : 0,025) in PDL-Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten (6 h, 12 h, 24 h und 48 h). * signifikanter ($p < 0,05$) Unterschied zwischen den Gruppen.

Wie in Abbildung 3 dargestellt, verursachte *F. nucleatum* eine signifikante ($p < 0,05$) dosisabhängige Hochregulierung der pro-inflammatorischen, chemotaktischen oder proteolytischen Moleküle COX-2, CCL2 und MMP1 nach 24 h, mit den stärksten Expressionen bei den höchsten Bakterienkonzentrationen. In allen drei Gruppen führte bereits die geringste Bakterienkonzentration (OD: 0,025) zu einer signifikanten ($p < 0,05$) Expressionssteigerung aller drei Gene. Darüber hinaus war die stimulierende Wirkung von *F. nucleatum* auf diese Gene auch zeitabhängig: PDL-Zellen exprimierten nach 6 h signifikant ($p < 0,05$) mehr COX-2 als im Vergleich zur Kontrollgruppe. Im weiteren Verlauf stieg das Expressionsniveau von COX-2 wellenförmig an, mit den höchsten Werten nach 12 h und 48 h. Die CCL2-Expression war nach 12 h im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant ($p < 0,05$) erhöht und hatte mit 24 h ihren Zenit erreicht. Nach 48 h flachte diese wieder dezent ab, blieb aber signifikant ($p < 0,05$) erhöht. Das Expressionsmuster für MMP1 erinnert an eine exponentielle Steigung, mit dem Maximum bei 48 h. Der erste signifikante ($p < 0,05$) Unterschied zur Kontrollgruppe war nach 12 h nachweisbar.

7.3 Modulierende Effekte von Apelin auf pro-inflammatorische Aktionen von *F. nucleatum*

Weiterführend wurde untersucht, ob Apelin die stimulierenden Effekte von *F. nucleatum* auf die Expression von pro-inflammatorischen Markern zu modulieren vermochte (Abb. 4). Wie die real-time PCR-Analyse zeigte, erhöhte Apelin die durch *F. nucleatum* stimulierte Expressionssteigerung von CCL2 nach 24 h signifikant ($p < 0,05$). Für COX-2, CXCL8 und TNF- α wurde zu diesem Zeitpunkt kein signifikanter Effekt von Apelin auf die durch *F. nucleatum* induzierten Expressionen beobachtet. *F. nucleatum* führte nach 24 h in allen Gruppen zu einer erhöhten Genexpression im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die alleinige Stimulation mit Apelin führte in allen Gruppen zu keiner nennenswerten Veränderung der konstitutiven Genexpressionen. Ein ähnliches Muster ergab sich nach 48 h für die alleinige Stimulation mit *F. nucleatum* bzw. Apelin. Es konnte jedoch beobachtet werden, dass Apelin zu einer weiteren signifikanten ($p < 0,05$) Erhöhung der durch *F. nucleatum* ausgelösten Expressionssteigerung von COX-2, CCL2, CXCL8 und TNF- α führte.

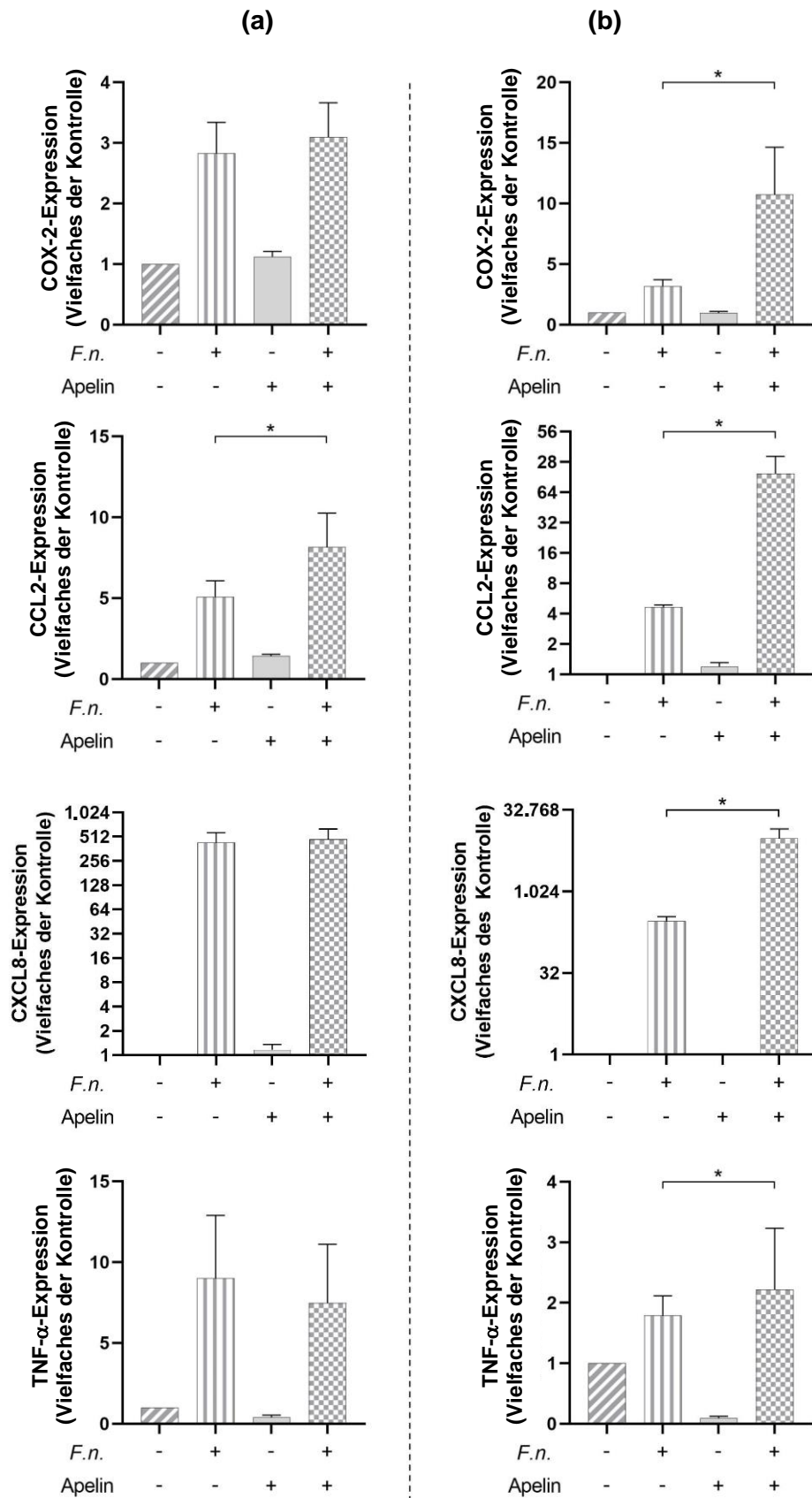


Abbildung 4 - Effekte von *F. nucleatum* (OD_{660} : 0,025) und/oder Apelin auf die Expressionen pro-inflammatorischer Mediatoren (COX-2, CCL2, CXCL8 und TNF- α) nach 24 h (a) und 48 h (b).
* signifikanter ($p < 0,05$) Unterschied zwischen den Gruppen.

7.4 Modulierende Effekte von Apelin auf Marker des Hart- und Weichgewebeumbaus

Weiterhin wurden die Effekte von Apelin auf die durch *F. nucleatum* induzierten Genexpressionen von MMP1, TGF- β 1 und RUNX2 untersucht (Abb. 5). *F. nucleatum* erhöhte die Expression von MMP1 nach 24 und 48 h. Diese Hochregulierung wurde durch Apelin zu beiden Zeitpunkten signifikant ($p < 0,05$) verstärkt. Für TGF- β 1 und RUNX2 wurde nach 24 und 48 h keine Hochregulierungen durch *F. nucleatum* beobachtet. Hier kam es zu nichtsignifikanten Expressionsenkungen durch das Bakterium. Apelin hatte nach 24 und 48 h keinen signifikanten Einfluss auf die *F. nucleatum*-induzierten Genexpressionen

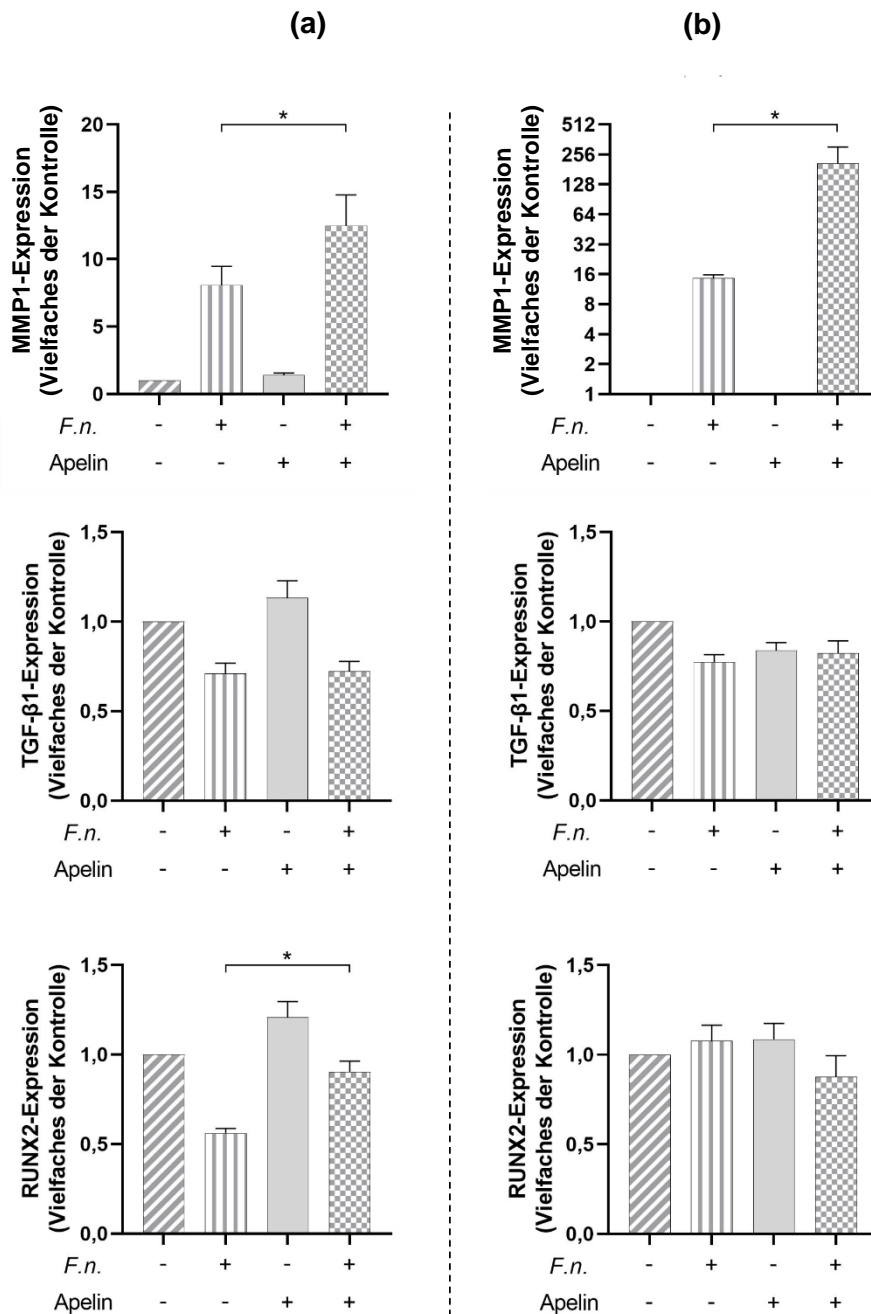


Abbildung 5 - Effekte von *F. nucleatum* (OD_{660} : 0,025) und/oder Apelin auf die Expression von Mediatoren, die am Weich- und Hartgewebeumsatz beteiligt sind (MMP1, TGF- β 1 und RUNX), nach 24 h (a) und 48 h (b). * signifikanter ($p < 0,05$) Unterschied zwischen den Gruppen.

von TGFβ-1 und RUNX2. Lediglich für RUNX2 konnte ein signifikanter ($p < 0,05$) inhibitorischer Effekt von Apelin auf die durch *F. nucleatum* induzierte Expressionssenkung nach 24 h nachgewiesen werden.

7.5 Auswirkungen von *F. nucleatum* auf Apelin und seinen Rezeptor

Es wurde auch untersucht, ob Apelin und sein Rezeptor in PDL-Zellen exprimiert werden und wenn ja, ob dieses Adipokin und sein Rezeptor durch *F. nucleatum* reguliert werden (Abb. 6). Das Parodontalpathogen führte zur dosisabhängigen Expressionsminderung von Apelin und APJ. Dabei kam es sowohl für Apelin als auch dessen Rezeptor bereits bei der geringsten Konzentration von *F. nucleatum* (OD: 0,025) zu einer signifikanten ($p < 0,05$) Senkung der Genexpression. Es wurde auch eine Zeitabhängigkeit beobachtet. Inkubation der PDL-Zellen mit *F. nucleatum* führte bei Apelin und APJ zur signifikanten ($p < 0,05$) Expressionsverringering nach 6 h, 12 h und 24 h. Die Werte näherten sich nach 48 h wieder dem Ausgangsniveau an.

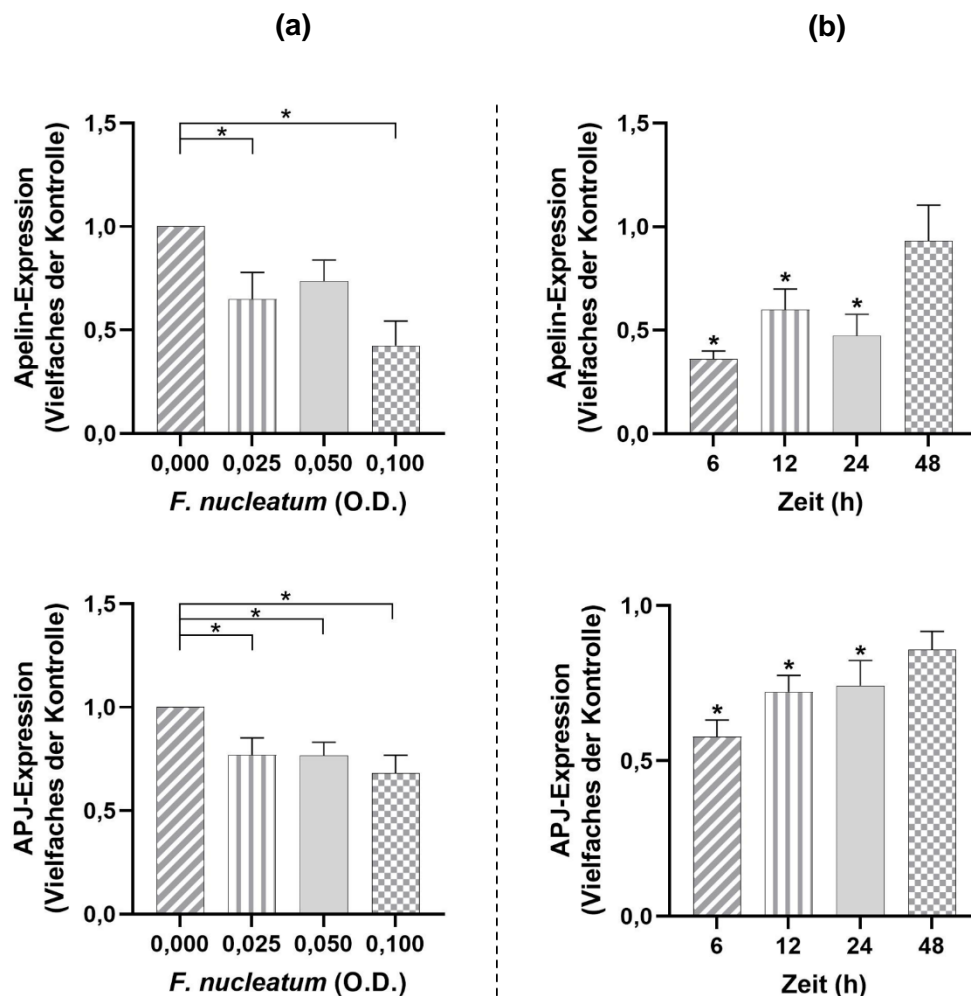


Abbildung 6 - a) Expressionen von Apelin und APJ in An- und Abwesenheit verschiedener Konzentrationen von *F. nucleatum* (OD₆₆₀: 0,000; 0,025; 0,050; 0,100) in PDL-Zellen nach 24 h. b) Expressionen von Apelin und APJ in An- und Abwesenheit von *F. nucleatum* (OD₆₆₀: 0,025) in PDL-Zellen nach verschiedenen Zeitpunkten (6 h, 12 h, 24 h und 48 h). * signifikanter ($p < 0,05$) Unterschied zwischen den Gruppen.

7.6 Regulatorische Effekte von Apelin auf die durch *F. nucleatum* induzierten Proteine CCL2 und MMP1

Mittels ELISA konnte nachgewiesen werden, dass *F. nucleatum* auch zu einem Anstieg der Proteinkonzentrationen von CCL2 und MMP1 in den Zellüberständen nach 24 h und 48 h führte (Abbildung 7). Die Inkubation von *F. nucleatum* stimulierten Zellen mit Apelin führte zu einem weiteren signifikanten ($p < 0,05$) Anstieg der Proteinkonzentrationen von CCL2 nach 48 h und von MMP1 nach 24 h und 48 h. Die Ergebnisse auf Proteinebene bestätigten damit die mittels Real-time PCR ermittelten Transkriptionsdaten.

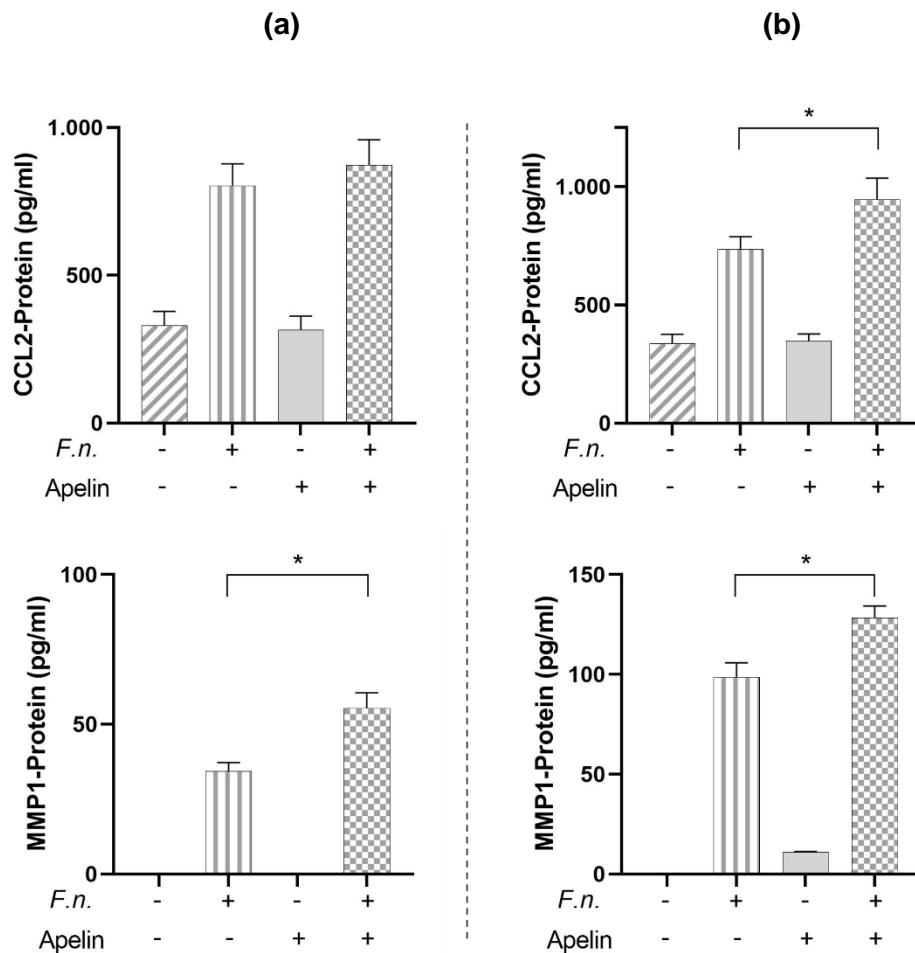


Abbildung 7 - Proteinspiegel von CCL2 und MMP1 in Überständen von PDL-Zellen, die mit *F. nucleatum* (OD_{660} : 0,025) und/oder Apelin (1 ng/ml) nach 24 h (a) und 48 h (b) stimuliert wurden. * signifikanter ($p < 0,05$) Unterschied zwischen den Gruppen.

7.7 Beteiligung intrazellulärer Signalwege an den Effekten von *F. nucleatum* und/oder Apelin auf die Genexpressionen von CCL2 und MMP1

Ferner wurde untersucht, welche intrazellulären Signalwege bei den Effekten von *F. nucleatum* auf die CCL2- und MMP1-Expression beteiligt sind (Abb. 8). Zu diesem Zweck wurden Zellen mit spezifischen Inhibitoren der NF- κ B- bzw. MEK1/2-Signalübertragung inkubiert und anschließend mit *F. nucleatum* und/oder Apelin stimuliert. Die Inkubation der Zellen mit dem NF- κ B-Inhibitor führte zu einer signifikanten ($p < 0,05$) Senkung der CCL2-Expression nach 24 h in den Zellen, die entweder mit *F. nucleatum* allein oder in Kombination mit Apelin behandelt wurden. Im Gegensatz dazu wurden die durch *F. nucleatum* und/oder Apelin induzierten Expressionen von CCL2 und MMP1 nach 24 Stunden durch den MEK1/2-Inhibitor immer signifikant ($p < 0,05$) gehemmt.

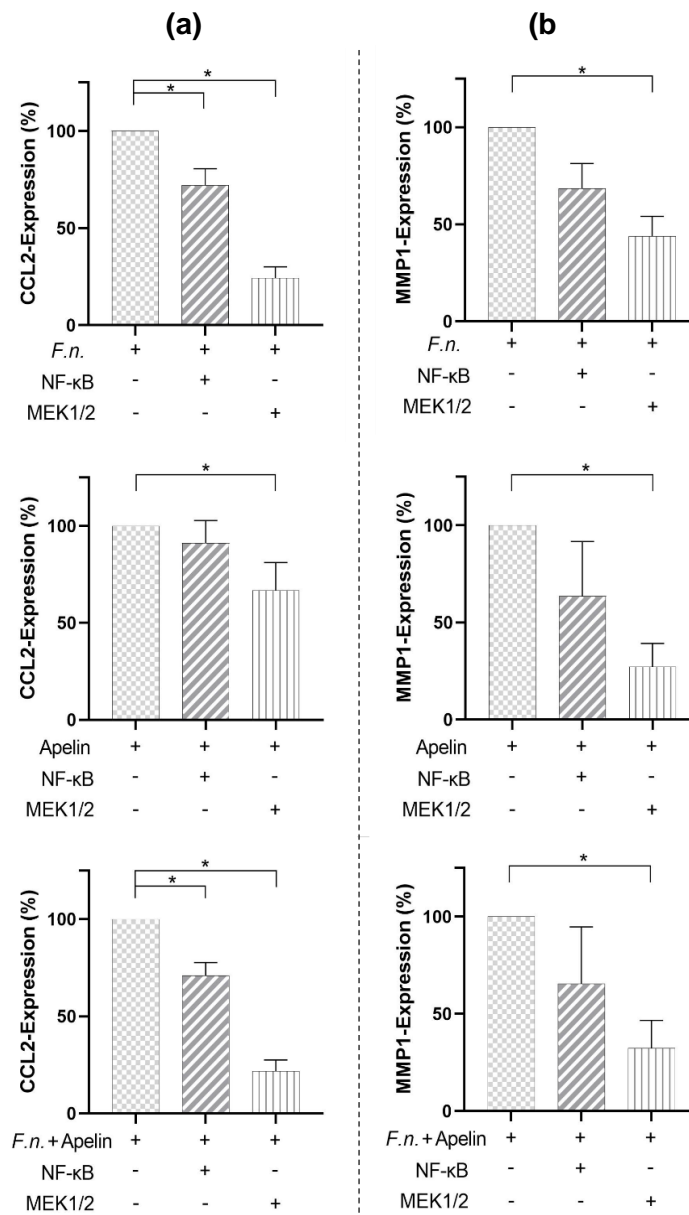


Abbildung 8 - Beteiligung intrazellulärer Signalwege an den Effekten von *F. nucleatum* (OD_{660} : 0,025) und/oder Apelin auf die Expressionen von CCL2 (a) und MMP1 (b) in PDL-Zellen nach 24 h. Die Zellen wurden mit spezifischen Inhibitoren für NF- κ B (PDTC, 10 μ M) und MEK1/2 (U0126, 10 μ M) inkubiert. * signifikanter ($p < 0,05$) Unterschied zwischen den Gruppen.

8 Diskussion

8.1 Ergebnisdiskussion

Ziel dieser Studie war es zu klären, ob Apelin modulierende Effekte auf die Synthese pro-inflammatorischer und proteolytischer Moleküle unter mikrobiellen Bedingungen ausübt und, ob das Adipokin Apelin lokal in parodontalen Zellen produziert und gegebenenfalls auch reguliert wird. Die vorliegende Dissertationsarbeit konnte zeigen, dass Apelin und sein Rezeptor in PDL-Zellen produziert und deren Genexpression durch das Parodontalpathogen *F. nucleatum*, zumindest initial, herunterreguliert werden. Dies könnte auf eine regulatorische Rolle dieses Adipokins im Rahmen der Ätiopathogenese der Parodontitis hindeuten. Interessanterweise führte die Kombination von *F. nucleatum* mit Apelin nach einer gewissen Zeit zu den höchsten Expressionsleveln einiger pro-inflammatorischer und proteolytischer Moleküle, sodass Apelin die parodontale Entzündung und Destruktion klinisch verstärken könnte. Apelin, dessen Serumspiegel bei Adipositas erhöht ist, könnte daher ein pathomechanistisches Bindeglied darstellen, über welches Adipositas die Entstehung und Progression der Parodontitis fördert.

Es gibt deutliche Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen Parodontitis und Adipositas (15, 148). Dass Adipokine ein mögliches pathomechanistisches Bindeglied darstellen, das dem Zusammenhang zwischen Parodontitis und Adipositas zugrunde liegt, wurde in mehreren Studien unserer Arbeitsgruppe gezeigt (115, 149–154). Leptin, Visfatin und Resistin üben pro-inflammatorische Effekte auf parodontale Zellen und Gewebe aus, während Adiponectin vornehmlich protektive Eigenschaften auf parodontale Zellen besitzt (15). Im Hinblick auf den Zahnhalteapparat ist jedoch wenig über die Produktion, Regulation und Wirkung von Apelin bekannt, einem weiteren Adipokin, dessen Serumspiegel bei Adipositas verändert ist (136). Kürzlich untersuchten Hirani et al. die Serumspiegel von Apelin bei parodontal und systemisch gesunden Personen sowie bei Parodontitispatienten mit und ohne Typ-2-Diabetes (120). Die Studie zeigte, dass die Apelinkonzentrationen in der Parodontitisgruppe signifikant höher waren als in der gesunden Kontrollgruppe. Bei Patienten, die gleichzeitig an Parodontitis und Adipositas litten, waren die Apelinkonzentrationen am höchsten. Die Autoren kamen zu dem Schluss, dass die erhöhte Expression von Apelin bei Patienten mit Parodontitis und Typ-2-Diabetes auf eine mögliche Rolle dieses Adipokins bei der Entzündung und der Glukoseregulierung hinweisen könnte. Sarhat et al. untersuchten die Apelinkonzentrationen im Speichel von parodontal erkrankten Diabetikern sowie von parodontal und systemisch gesunden Individuen (155). Auch sie fanden die höchsten Apelinkonzentrationen bei Parodontitispatienten mit Adipositas. In unserer Studie führte Apelin zu einer zeit- und dosisabhängigen Hochregulation der *F. nucleatum* induzierten Genexpression von pro-inflammatorischen und proteolytischen Molekülen, sodass unsere Untersuchungsergebnisse die oben genannten Studien unterstützen. Lee et al. untersuchten ebenfalls den Zusammenhang zwischen Apelin und Parodontitis und beobachteten jedoch eine Abnahme der Apelin-Expression in gingivalen Geweben von Parodontitis-Patienten, was somit im Gegensatz zu den vorgenannten Studien steht (144). Unsere In-vitro-Experimente mit PDL-Zellen zeigten, dass sowohl Apelin als auch dessen Rezeptor in diesen Zellen konstitutiv produziert werden. Insofern könnten PDL-Zellen, aber möglicherweise auch andere parodontale bzw. orale Zellen zu den Apelinspiegeln in der Sulkusflüssigkeit, im Speichel und Serum beitragen. Zukünftige Studien sollten sich auch mit dem Apelin-APJ-System in anderen Zellen des Parodontiums befassen, z.B. in den Epithelzellen der Gingiva und in Osteoblasten. Weitere Studien könnten klären, ob die Apelinkonzentrationen in der Gingiva, Sulkusflüssigkeit, im Speichel und Serum bei Gingivitis und Parodontitis tatsächlich und vor allem in welcher Richtung verändert sind. Weiterhin wäre von Interesse, ob die lokale, d.h. parodontale Produktion von Apelin systemische Effekte ausübt. Schließlich sollte ebenfalls untersucht werden, ob eine Parodontistherapie zu Veränderungen dieser

Apelinspiegel führt. Interessanterweise induzierte Apelin eine Steigerung der durch *F. nucleatum* stimulierten Expression verschiedener pro-inflammatorischer und proteolytischer Moleküle, was auf eine kritische Rolle dieses Moleküls bei der Assoziation zwischen Adipositas und Parodontitis hinweisen könnte. Unsere In-vitro-Daten stehen im Einklang mit einer Studie, in welcher die Überexpression von Apelin oder die Behandlung mit exogenem Apelin die TNF- α -stimulierte Genexpression von MMP1, IL-6 und COX-2 in PDL-Zellen moduliert (144). In der Studie von Lee et al. führte die Inkubation von PDL-Zellen und gingivalen Fibroblasten mit dem Entzündungsmediator TNF- α ebenfalls zu einer Herunterregulation der Apelinexpression (144). Daher deuten sowohl diese als auch unsere Studie darauf hin, dass das Apelin-APJ-System während einer parodontalen mikrobiellen Dysbiose und der damit verbundenen Entzündung zumindest anfänglich herunterreguliert wird. Da unsere Ergebnisse zeigten, dass Apelin eher entzündungsfördernde Effekte ausübte, könnte die anfängliche Herunterregulation von Apelin und seinem Rezeptor einen zeitlich begrenzten, protektiven Kompensationsmechanismus des Wirts darstellen, um die Entzündung und die damit verbundene Gewebeerstörung zu begrenzen. Unsere Experimente zeigten jedoch auch, dass diese möglicherweise protektive Hemmung von Apelin und seinem Rezeptor nach 48 h nicht mehr vorhanden war, sodass das Apelin-APJ-System bei einer länger anhaltenden parodontalen Entzündung von kritischer Bedeutung bei der Pathogenese der Parodontitis sein könnte. Unsere Studie offenbarte, dass Apelin pro-inflammatorische Effekte ausüben und somit parodontale Entzündungsprozesse verstärken kann. Obwohl es diverse Veröffentlichungen über entzündungshemmende und damit protektive Effekte von Apelin in anderen Geweben gibt (156, 157), wurden auch Studien publiziert, die pro-inflammatorische Effekte von Apelin nachgewiesen haben (158). In der vorliegenden Arbeit konnte repräsentativ anhand des Chemokins CCL2 und der Protease MMP1 gezeigt werden, dass Apelin die *F. nucleatum* induzierte Expressionssteigerung pro-inflammatorischer Moleküle nicht nur auf Transkriptions-, sondern auch auf Proteinebene verstärken kann. Unsere Analysen zu intrazellulären Signaltransduktionen legen nahe, dass pro-inflammatorische Effekte von *F. nucleatum* und/oder Apelin zumindest teilweise über MEK1/2 und NF- κ B realisiert werden. Weitere Studien sollten klären, welche anderen intrazellulären Signalwege für die modulierenden Effekte des Apelins genutzt werden. Unsere Ergebnisse stehen damit im Einklang mit Studien, die ebenfalls nachgewiesen haben, dass Apelin MEK1/2- und NF- κ B-Signalwege für seine Effekte nutzt (159, 160). Im Folgenden soll auf die einzelnen Marker und Mediatoren, die in dieser Dissertationsarbeit untersucht worden sind, eingegangen werden.

Das Enzym COX liegt im menschlichen Körper in den Isoformen COX-1 und COX-2 vor. Beide Enzyme weisen eine Reihe physiologischer Funktionen auf, z.B. Mucin-Bildung zum Schutz der Magenmukosa oder Beteiligung an der Blutkoagulation (161–163). COX-1 kommt in nahezu allen gesunden Geweben vor und wird konstitutiv exprimiert, wohingegen die COX-2-Expression induzierbar ist und nicht permanent abläuft (164). COX-2, das die Spaltung von Arachidonsäure zu Prostaglandin E2 katalysiert, kommt vor allem in entzündetem Gewebe vor und ist sonst nur geringgradig detektierbar.

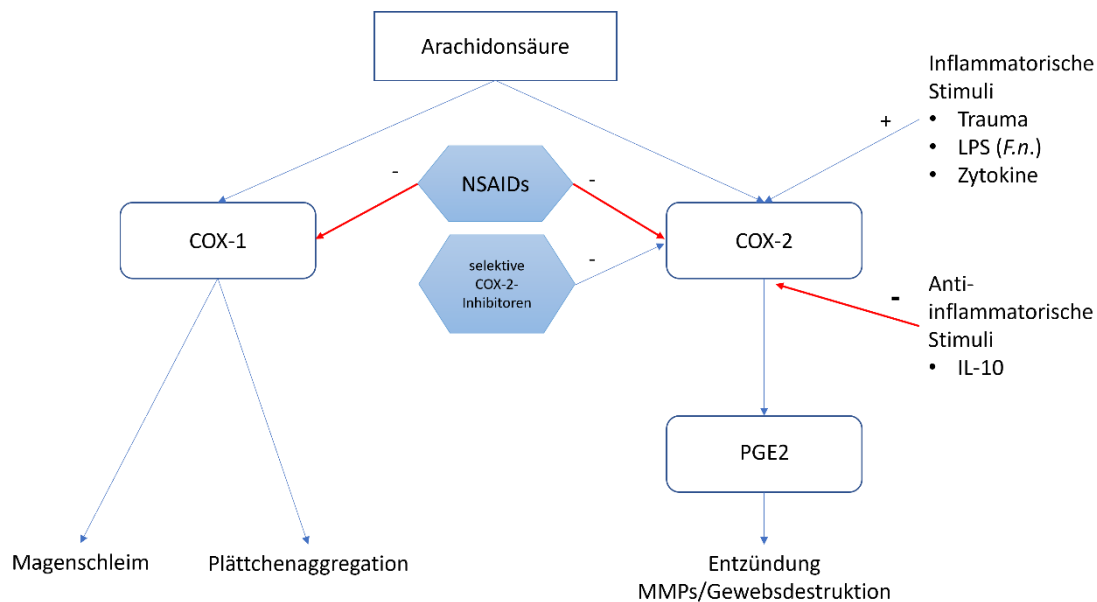


Abbildung 9- COX-Pathways – Abb. vereinfacht und modifiziert nach Huub J L van der Heide Schreurs (2007)

Dieses Molekül ist prominent am Entzündungsgeschehen beteiligt: Es sorgt für gesteigerte Vasodilatation und erhöhte Gefäßpermeabilität, was sich als klinische Entzündungssymptome in Form von Rubor und Ödem zeigt (165, 166). Da die Gingivitis und Parodontitis ebenfalls entzündlich bedingt sind, treten auch hier diese klassischen Entzündungssymptome auf. Daher verwundert es nicht, dass in entzündeten parodontalen Geweben und in der Sulkusflüssigkeit (167) erhöhte PGE2-Werte gemessen wurden (168), was darauf hindeutet, dass sowohl Gingiva-, als auch PDL-Zellen aktiv am Entzündungsgeschehen beteiligt sind. PDL-Zellen exprimieren auf adäquate Reize Enzyme wie Phospholipase 2, COX-2 sowie direkt und indirekt chemotaktische und pro-inflammatorische Zytokine. Unsere Versuche konnten ebenfalls zeigen, dass PDL-Fibroblasten bei Stimulation mit den inaktivierten Zellbestandteilen des Bakteriums *F. nucleatum* COX-2 exprimierten. Die dosisabhängige Reaktion fand dabei in Korrelation zum Reiz statt: Je höher die Konzentration von *F. nucleatum*, desto stärker fiel auch die Zellantwort aus. Schon bei der geringsten *F. nucleatum*-Konzentration (OD=0,025) konnte ein statistisch signifikanter Anstieg der COX-2 Expression beobachtet werden. Interessanterweise führte die Stimulation durch höhere Konzentrationen von *F. nucleatum*-Lysat (OD=0,1) nicht mehr zu ähnlich drastischen Anstiegen wie von OD=0 auf OD=0,025 und von OD=0,025 auf OD=0,05. Die Expressionsrate schien hier ein Plateau erreicht zu haben und es kam zu keiner weiteren nennenswerten COX-2-Expressionssteigerung. Betrachtet man den gesamten Zeitverlauf, so stieg die Synthese des Enzyms COX-2 mit der Zeit insgesamt signifikant an. Je länger also die Fibroblasten mit den Bakterienbestandteilen konfrontiert waren, umso mehr COX-2 wurde exprimiert. Wie bei den Dosis-Versuchen ist also auch die Einwirkdauer positiv mit pro-inflammatorischer Aktivität verknüpft. Interessanterweise kam es innerhalb der ersten 12 h zu einem starken Anstieg, woraufhin die Expressionsrate nach 24 h wieder leicht rückläufig war, um nach 48 h wieder auf einen neuen Maximalwert zu steigen. Dieses 24 h-Tal war in allen Versuchen reproduzierbar festzustellen. Da ab

dem Startzeitpunkt des Versuchs kein Mediumwechsel mehr stattfand, kann dies als Ursache für den wellenartigen Verlauf ausgeschlossen werden. Es scheint sich demnach um eine biphasische Antwort zu handeln, die möglicherweise durch nach 12 h auftretende sekundäre Effekte erklärbar sein könnte, wie z.B. die Ausschüttung anderer Zytokine, die ihrerseits wiederum synergistisch agieren und den Peak der zweiten Expressionswelle verursachen. Ein weiterer Erklärungsansatz könnte sein, dass nach 12 h die stimulierenden Moleküle abgebaut worden sind oder zelleigene Abwehrmechanismen in Kraft treten, sodass sich die pro-inflammatorische Aktivität wieder verringerte. Da mittels PCR nur einzelne Marker zu bestimmten Zeitpunkten analysiert werden konnten, geben die Ergebnisse eine Momentaufnahme des komplexen Wechselspiels wieder. Es ist bekannt, dass PDL Zellen auf LPS von fakultativ pathogenen Bakterien wie *F. nucleatum* mit vermehrter IL-10-Expression reagieren (169). Der wellenartige Anstieg bei unseren Zeitabhängigkeitsexperimenten könnte durch einen Desensibilisierungsmechanismus der TLRs für *F. nucleatum* erklärbar sein: Zunächst reagierten die Rezeptoren stark und führten zu der gesteigerten COX-2-Expression, aufgrund der einsetzenden Empfindlichkeitsreduktion des Rezeptors sank die Genexpression für den Entzündungsmarker dann jedoch möglicherweise sukzessive ab. Wie unsere Versuche zeigen, wurden jedoch durch *F. nucleatum* auch andere Moleküle wie zum Beispiel TNF- α induziert, dessen Induktion Zeit bedarf. So kann die zweite Phase der COX-2-Expression durch das Auftreten anderer Mediatoren wie TNF- α getriggert worden sein. Es ist auch denkbar, dass der Abfall der COX-2-Expression nach der ersten Phase durch die Bildung antagonistischer Moleküle der PDL-Zellen verursacht wurde, was einer negativen Feedback-Reaktion entspräche. Dementsprechend könnte der 24 h-Wert als Kompensationsversuch der PDL-Zellen auf den bakteriellen Reiz gedeutet werden, der jedoch durch beispielsweise TNF- α schließlich scheitert. Es wird deutlich, dass es weiterer Versuche bedarf, um die zellulären Regulationen von PDL-Zellen durch *F. nucleatum* besser zu verstehen.

Durch den ersten Versuchsteil konnte mittels Dosis- und Zeitversuchen eine Auswirkung von *F. nucleatum* auf die COX-2-Expression aufgezeigt werden. Interessanterweise zeigte sich in den Kombinationsversuchen (Abb. 4), dass Apelin allein keinen signifikanten Einfluss auf die COX-2-Expression hatte. Apelin konnte jedoch die *F. nucleatum*-induzierte COX-2-Expression steigern. Im Kombinationsversuch war also ein synergistischer Effekt von Apelin und *F. nucleatum* erkennbar. Unsere Ergebnisse sind teilweise konträr zu einer anderen Studie mit PDL- und Gingivafibroblasten (144), in der Apelin allein und in Anwesenheit mit IL-1 β und TNF- α zu einer Senkung der COX-2-Expression führte. Aber auch diese Studie konnte belegen, wenn auch in anderer Richtung, dass Apelin modulierende Effekte auf die Aktionen von pro-inflammatorischen Stimulanzen ausübt. In der besagten Studie von Lee et al. lag der Betrachtungszeitraum bei weniger als 48 h. Da die synergistischen Effekte jedoch in unseren Experimenten erst nach 48 h zu beobachten waren, sind die Studien nur eingeschränkt vergleichbar.

Unsere Versuche haben auch offengelegt, dass *F. nucleatum* dosis- und zeitabhängige hemmende Effekt auf die Apelin- und APJ-Expressionen ausübte (Abb. 6). Möglicherweise wird dadurch einer zu starken Entzündungsreaktion im Sinne eines initialen Schutzmechanismus entgegengewirkt, da Apelin pro-inflammatorische Effekte in PDL-Zellen vermitteln kann (Abb.4). Wie im zeitabhängigen Versuch zu erkennen ist, konnte die Apelin Expressionsminderung aber nicht dauerhaft aufrechterhalten werden, sodass nach 48 h die basale, konstitutive Expression wieder erreicht war. Dies bedeutet, dass nach Ende der initialen Hemmung des Apelin/APJ-Systems die *F. nucleatum*-Effekte in Anwesenheit von Apelin verstärkt zum Tragen kamen, was sich in der synergistischen Expressionssteigerung von pro-inflammatorischen Mediatoren durch *F. nucleatum* und Apelin vor allem nach 48 h zeigte. Interessanterweise führte die Inhibition von Apelin in anderen Geweben zu deutlich verringerten COX-2-Expressionswerten, was ebenfalls auf pro-inflammatorische Effekte von Apelin hinweist (158).

Rath-Deschner et al. konnten zeigen, dass das chemotaktische Zytokin CCL2 in PDL-Zellen synthetisiert wird und in parodontal entzündetem Gewebe vermehrt vorkommt (170). Dies lässt sich durch dessen wichtige Funktion bei der Rekrutierung von Abwehrzellen wie Monozyten, Makrophagen und Lymphozyten erklären. Die Arbeitsgruppe konnte weiterhin zeigen, dass biomechanischer Stress die Expression des Chemokins drastisch reduzierte, woraus geschlossen wurde, dass starke biomechanische Belastung, wie sie zum Beispiel beim okklusalen Trauma auftritt, die Progression der Parodontitis verstärken könnte. Dies könnte unter anderem durch die kompromittierte Rekrutierung der Immunzellen erklärt werden. In unseren Kombinationsversuchen führte *F. nucleatum* ebenfalls zu einer erhöhten CCL2-Expression, wohingegen Apelin allein keinen Effekt hatte. Die Kombination von *F. nucleatum* mit Apelin führte jedoch zu den höchsten CCL2-Expressionswerten, was also zeigte, dass Apelin die *F. nucleatum*-induzierte CCL2-Expression steigern und somit zu einer verstärkten Rekrutierung von immunoinflammatorischen Zellen beitragen könnte. Der synergische Effekt von *F. nucleatum* und Apelin auf die CCL2-Expression war sowohl nach 24 h als auch nach 48 h nachweisbar. Für die Chemokine CXCL1 und CCL5 existiert Evidenz, dass diese nicht nur die Migration von Abwehrzellen regulieren, sondern auch von Fibroblasten (171), was jedoch für CCL2 an parodontalen Fibroblasten noch nicht nachgewiesen werden konnte. Zukünftige In-vitro-Experimente könnten und sollten sich dieser Thematik widmen. Weiterhin bemerkenswert erscheint, dass CCL2 in Endothelzellen mit der Angiogenese und Regeneration in Verbindung gebracht werden kann. Hong et al. konnten 2005 zeigen, dass CCL2 diese positiven Effekte über VEGF vermittelt (172). Dies wäre ebenfalls ein interessanter Ansatzpunkt für weiterführende In-vitro- und In-vivo Studien. Die in unseren Studien gewonnenen Transkriptionsdaten zu den CCL2-Regulationen durch *F. nucleatum* und/oder Apelin konnten auch auf Proteinebene bestätigt werden.

Matrixmetalloproteinasen sind matrixdegradierende Enzyme, die aufgrund Ihrer katabolen Eigenschaften eine tragende Rolle im Entzündungsgeschehen einnehmen. Bei der Parodontitis sind unter anderen die Kollagenasen MMP1 und MMP8 interessant (173), da sie durch ihre kollagenolytischen Eigenschaften maßgeblich zur Gewebsdestruktion und damit zur Progression dieser entzündlichen Erkrankung beitragen. Es ist bekannt, dass MMP-Level bei Gingivitis- und Parodontitis-Patienten in der Sulkusflüssigkeit, aber auch im Gewebe erhöht sind (174). MMPs werden von verschiedenen Zelltypen, z.B. Makrophagen, PMNs und Lymphozyten, aber auch GFs oder PDL-Zellen synthetisiert (175) und sind unter anderem PGE₂-, IL-1 β - und TNF- α -abhängig (176). Durch *F. nucleatum* konnte eine dosis- und zeitabhängige Steigerung der MMP1-Expression in PDL-Fibroblasten beobachtet werden (Abb. 3). Während die Dosisabhängigkeit einen annähernd linearen Verlauf zeigte, ergab sich für die Zeitabhängigkeit ein eher exponentielles Verhältnis. Apelin konnte die *F. nucleatum*-induzierte MMP1-Expression nach 24 h und 48 h signifikant steigern, wohingegen dieses Adipokin allein keinen Effekt aufwies (Abb. 4). Interessant wäre, ob Apelin auch einen modulatorischen Einfluss auf die Effekte von IL-1 β ausüben kann, da dieses Molekül selbst wiederum die MMP1-Synthese induzieren kann. Die Arbeitsgruppe um Lee et al. konnte zeigen, dass Apelin in PDL- und Gingivafibroblasten, die durch IL-1 β und TNF- α stimuliert wurden, die MMP1-Expression stark reduzierte, d.h. anti-inflammatorische Effekte ausübte (144). Diese Beobachtungen stehen im Kontrast zu unseren Ergebnissen, in denen Apelin in Kombination mit einem bakteriellen Trigger vor allem pro-inflammatorische Eigenschaften aufwies. In Chondrozyten konnte Apelin erhöhte MMP1- und IL-1 β -Werte induzieren, sodass die Autoren schlussfolgerten, dass Apelin eine katabole Wirkung auf Knorpelgewebe besitzt und somit die Osteoarthritis fördern könnte (177). Diese Beobachtung stützt daher unsere Resultate, die nahelegen, dass Apelin, zumindest in der Kombination, einen entzündungsfördernden- und gewebschädigenden Effekt ausüben kann. MMPs sind jedoch nicht nur mit Entzündung, sondern auch mit Wundheilungsprozessen assoziiert. Bei der Wundheilung werden erhöhte MMP-Level beobachtet, da für das Remodelling der Gewebe Kollagen ab- bzw.

umgebaut werden muss. Daher sind weitere Studien notwendig, um den Einfluss von Apelin Einfluss auf diese Prozesse zu untersuchen.

CXCL8 ist ebenfalls ein chemotaktisches Zytokin, welches in Geweben von an Parodontitis erkrankten Individuen vermehrt nachgewiesen werden kann (178). Es spielt neben TNF- α eine wichtige Rolle in der Pathogenese der Parodontitis, da es, ähnlich wie der Komplementfaktor C5a, die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten fördert. In unseren Versuchen konnte durch Apelin allein keine nennenswerte Regulation dieses Chemokins festgestellt werden. Auch für CXCL8 war eine Steigerung der *F. nucleatum*-induzierten Genexpression durch Apelin nachweisbar, jedoch erst nach 48 h (Abb.4). Lim et al. konnten an primären Amnionzellen eine Apelin-induzierte CXCL8 Expressionssteigerung aufzeigen (179), wohingegen Pan et al. eine Expressionsenkung von Plasma-CXCL8 durch Apelin im Tiermodell nachweisen konnten (180). Die kritische Rolle von CXCL8 bei der parodontalen Entzündung und Destruktion ist in der Literatur gut beschrieben (181). Dementsprechend verwundert es nicht, dass *F. nucleatum* zu einer deutlichen Expressionssteigerung in PDL-Zellen führte. In der Literatur wurde nach unserem Wissen bis dato jedoch nicht der kombinierte Effekt von Apelin mit *F. nucleatum* beschrieben. Dass dieser Effekt, ähnlich wie bei COX-2 und TNF- α , erst nach 48 h beobachtbar war, könnte möglicherweise auch an der initialen Hemmung des Apelin/APJ-Systems durch *F. nucleatum* liegen, wobei dies erst durch weitere Studien verifiziert werden muss (Abb. 6).

TNF- α hat ein breites Spektrum an Funktionen, zum Beispiel die Regulation der Zellmigration, des Gewebeumbaus, aber auch der Apoptose (182). Es ist eines der ersten Zytokine, das bei einer Entzündungsreaktion verstärkt nachweisbar ist und wird auch von den lokalen Strukturzellen (z.B. Fibroblasten), d.h. akzessorischen Entzündungszellen produziert (175). Die Synthese dieses Zytokins wird u.a. durch LPS über Anbindung an TLRs und nachfolgende Aktivierung des NF- κ B-Signalwegs getriggert. TNF- α fördert die Anbindung von immunoinflammatorischen Zellen an die Gefäßinnenwände und dadurch auch die Rekrutierung dieser Zellen in entzündetes Gewebe. Da dieses Zytokin auch die Synthese von zahlreichen Chemokinen und MMPs stimuliert, wird die Rekrutierung von immunoinflammatorischen Zellen auch sekundär gefördert (183, 184). Durch die verstärkte Produktion proteolytischer Enzyme und osteoklastenaktivierender Moleküle (z.B. RANKL) nach TNF- α -Stimulation wird zudem die Degradation des Weichgewebes und auch die Resorption des Knochens verstärkt. Unsere Versuche zeigten, dass es durch die Stimulation der PDL-Zellen mit *F. nucleatum* zu einer Erhöhung der TNF- α -Expression kam (Abb. 4), d.h., dass die PDL-Zellen auf den bakteriellen Stimulus mit einem pro-inflammatorischen Effekt reagierten. Daher deckt sich unsere Beobachtung mit der bisherigen Literatur (169). Die *F. nucleatum*-induzierte Steigerung der TNF- α Expression konnte sowohl nach 24 h, aber auch nach 48 h festgestellt werden. Die Kombination aus *F. nucleatum* und Apelin führte nach 48 h zu den höchsten TNF- α -Expressionswerten, was wiederum die modulierende Wirkung von Apelin unterstreicht. Die Arbeitsgruppe von Lee et al. (144) zeigte, dass TNF- α die Expression von Apelin und seinem Rezeptor reduzieren kann. Im Umkehrschluss führte die adenoviral induzierte Überexpression von Apelin zur Unterdrückung der TNF- α Expression in vitro, was eine inhibitorische Wirkung von Apelin nahelegt. Da wir unsere Versuche jedoch mit einem bakteriellen Stimulus durchgeführt haben (LPS), sind diese Ergebnisse mit unseren nur bedingt vergleichbar. In einer Studie an Fettzellen wurde gezeigt, dass TNF- α die Apelin-Expression in Adipozyten steigerte (185), was auf einen möglichen pro-inflammatorischen Effekt hindeuten könnte und sich mit unseren Beobachtungen in den Kombinationsversuchen deckt. Da TNF- α selbst wiederum die Produktion von pro-inflammatorischen (z.B. COX-2, CXCL8, CCL2) und proteolytischen Molekülen (z.B. MMP1) induziert (186), könnte die durch *F. nucleatum*-induzierte Freisetzung von TNF- α zusätzlich zu den Steigerungen dieser Moleküle in unseren Versuchen beigetragen haben, d.h., dass die beobachteten Effekte von *F. nucleatum* und/oder Apelin auf diese Moleküle möglicherweise nicht nur direkte, sondern auch Indirekte waren (41, 182, 187).

Der Transkriptionsfaktor RUNX2 stellt einen wichtigen Regulator der Osteogenese dar, der dafür verantwortlich ist, dass sich Progenitorzellen zu knochenbildenden Zellen differenzieren und proliferieren (47, 188). Es konnte gezeigt werden, dass PDL-Zellen RUNX2 und andere Osteogenese-assoziierte Transkriptionsfaktoren exprimieren und damit aktiv am Knochenmetabolismus beteiligt sind (189). Sie können über diese Transkriptionsfaktoren nicht nur andere Zellen regulieren, sondern auch selbst zu Osteoblasten oder Zementoblasten differenzieren (190, 191). Da es bei der Parodontitis zu einer irreversiblen Knochenresorption kommt, ist die Regulation osteogener Transkriptionsfaktoren wie RUNX2 von großem Interesse. Andererseits spielt dieser Transkriptionsfaktor auch eine Schlüsselrolle bei der parodontalen Regeneration, weshalb wir in den dieser Dissertationsschrift zugrundeliegenden Experimenten auch die Expression von RUNX2 unter verschiedenen Bedingungen untersucht haben. Unsere Versuche zeigten, dass die RUNX2-Expression nach 24 h durch *F. nucleatum* gehemmt wurde, wohingegen bei Inkubation mit Apelin allein keine wesentliche Expressionsveränderung auftrat. Interessanterweise konnte Apelin aber die *F. nucleatum*-induzierte Hemmung der RUNX2-Expression wieder aufheben, sodass kein Unterschied zur konstitutiven RUNX2-Expression in den PDL-Zellen nachweisbar war. Nach 48 h war keine signifikante Regulation der RUNX2-Expressionen durch *F. nucleatum* und/oder Apelin feststellbar. Mehrere Autoren konnten zeigen, dass TNF- α die Expression von RUNX2 hemmt (47, 192). Da dieses pro-inflammatorische Zytokin durch *F. nucleatum* hochreguliert wird, könnte dies ein Pathomechanismus sein, über den das Bakterium die RUNX2-Hemmung induziert. Andererseits ist auch denkbar, dass *F. nucleatum* über die Hemmung der Expressionen von Wachstums- und Differenzierungsfaktoren, z.B. TGF- β 1 und BMPs, zu einer Senkung der RUNX2-Expression beiträgt. Um die zugrundeliegenden regulatorischen Mechanismen von Apelin besser zu verstehen, sollten die Effekte von Apelin auf solche Wachstums- und Differenzierungsfaktoren in zukünftigen Studien weiter analysiert werden. In weiterführenden Experimenten sollte auch mittels Alizarin-Rot- und Von-Kossa-Färbung die Kalziumablagerung in PDL-Zellkulturen in An- und Abwesenheit von *F. nucleatum* und/oder Apelin analysiert werden.

TGF- β 1 ist ein wichtiger Modulator des Bindegewebeumbaus, der im dynamischen Gleichgewicht zwischen Ab- und Aufbau bei der Parodontitis eine überwiegend anabole Funktion einnimmt. Durch die Stimulation von parodontalen Zellen zur Synthese von Matrixproteinen wie Kollagen und Fibronectin sowie die Produktion von Proteinase-Inhibitoren (TIMPs) sorgt dieser Wachstumsfaktor für eine positive Bilanz im Gewebeumbau (193). In unseren Experimenten konnten eine geringgradige Hemmung der TGF- β 1-Expression durch *F. nucleatum* nach 24 h beobachtet werden. Apelin führte dagegen zu einer dezenten Steigerung der TGF- β 1-Expression, hatte aber keinen Einfluss auf die *F. nucleatum*-induzierte Expression von TGF- β 1 nach 24 h. Nach 48 Stunden waren die Regulationen von TGF- β 1 durch *F. nucleatum* und/oder Apelin nur noch marginal.

Bei der Inkubation von PDL-Zellen mit *F. nucleatum* kam es zu reduzierten Expressionsraten für das Adipokin Apelin, wobei die Reduktion negativ mit der Konzentration des Bakterienlysats, aber auch der mRNA-Expression von COX-2, CCL2 und MMP1 korrelierte. Für die entzündungsmodulierenden Eigenschaften des Moleküls Apelin ist die Datenlage sehr heterogen. So konnte gezeigt werden, dass Apelin in Hepatozyten und synovialen Fibroblasten positiv mit Entzündung assoziiert ist (194, 195), wogegen anti-inflammatorische Effekte an Pankreaszellen (196), Pneumozyten (156), Kardiozyten (197) und weiteren Zelltypen gezeigt werden konnten. Die Effekte von Apelin auf parodontale Zellen wurde in vitro von Lee et al. 2019 untersucht (144). Hierbei waren kurzfristige protektive Eigenschaften von Apelin in gingivalen und parodontalen Zellen nachweisbar. In der Studie von Lee et al. sank die Apelinexpression nach Stimulation mit TNF- α , einem Entzündungsmediator, der bei der Parodontitis von immunoinflammatorischen Zellen sowie Strukturzellen des Parodonts, z.B. gingivalen Fibroblasten und PDL-Zellen, exprimiert wird (175, 182). Das in unserer Studie genutzte *F. nucleatum*-Lysat aktiviert zwar ebenfalls intrazelluläre Signalkaskaden, die von TNF- α genutzt werden, andererseits ist aber auch

anzunehmen, dass zusätzlich andere Signalwege getriggert werden. Dies könnte ebenfalls erklären, warum die Beobachtungen von Lee et al. nur bedingt mit unserer Arbeit vergleichbar und übereinstimmend sind. Jedoch deuten sowohl die Ergebnisse von Lee et al. als auch unsere darauf hin, dass die Apelin-Expression, zumindest initial, nach Stimulation mit einem pro-inflammatorischen bzw. bakteriellen Stimulus in parodontalen Zellen gehemmt werden konnte. Unsere Experimente belegen, dass PDL-Zellen Apelin synthetisieren können und dass die Apelinsynthese in Anwesenheit des Parodontalpathogens *F. nucleatum* zumindest kurzzeitig lokal sinkt. Kumar et al. konnten jedoch beobachten, dass Serumwerte von Apelin bei Parodontitispatienten höher lagen (120). Bei Patienten, die zusätzlich an DMT2 erkrankt waren, wurden die höchsten Apelinspiegel im Serum gemessen. Die Autoren schlussfolgerten daher, dass Apelin bei DMT2 als physiologischer Ausgleichsmechanismus wirkt, da es den Glucose-Uptake positiv beeinflusst (120).

Für den Apelinrezeptor ergab sich ein ähnliches Bild wie für Apelin selbst. Zunächst sank die Expressionsrate analog ab, um dann allmählich wieder anzusteigen (Abb. 6b). Da Apelin unter mikrobiellen Bedingungen (z.B. in Anwesenheit von *F. nucleatum*) pro-inflammatorische Eigenschaften aufweist, wie unsere Experimente nahelegen, könnte die initiale Hemmung der Expressionen von Apelin und seinem Rezeptor einen Schutzmechanismus der Zellen darstellen, der allerdings über die Zeit verloren geht. Nach 48 h waren die Expressionsniveaus von Apelin und seinem Rezeptor unter mikrobiellen Bedingungen wieder denen der konstitutiven Expressionsniveaus nahe. Auch die Dosisabhängigkeit der Apelinrezeptorexpression ähnelt stark jener, die für Apelin beobachtet wurde. Der inhibitorische Effekt von *F. nucleatum* auf den Rezeptor stieg mit zunehmender Konzentration des Bakterienlysats an. Insgesamt laufen damit die Regulationen von Apelin und seinem Rezeptor durch *F. nucleatum* sehr ähnlich und in gleicher Richtung ab. Dadurch wird der hemmende Effekt von *F. nucleatum* sogar verstärkt, weil nicht nur der Ligand, sondern auch sein Rezeptor nur noch vermindert zur Verfügung stehen, bis dann schließlich sowohl der Ligand als auch der Rezeptor wieder normal exprimiert und synthetisiert werden. Bisher sind uns keine weiteren Studien bekannt, die sich mit der Expressionsregulation des APJ-Rezeptors bei Parodontitis befassen. Interessant wären weitere Studien, die beleuchten, ob auch andere Entzündungsmediatoren zu verringerter APJ-Rezeptordichte führen. Zukünftige Studien sollten klären, ob auch andere Bakterien sowie deren Kombinationen regulatorische Effekte auf das Apelin-APJ-System ausüben können.

8.2 Methodendiskussion

Wie in der Literaturdiskussion besprochen stellt Parodontitis ein multifaktorielles Geschehen dar, dessen multiple Einflüsse sowohl auf Seiten des Wirts, der Umgebung als auch auf bakterieller Ebene unter Laborbedingungen nicht in vollem Umfang nachgebildet werden können. Es ist zum Beispiel bis heute unmöglich, die Gesamtheit aller in subgingivaler Plaque vorkommenden anaeroben parodontalpathogenen Mikroorganismen im mikrobiologischen Labor zu kultivieren und zu analysieren (198). Die Rahmenbedingungen der vorgestellten Experimente werden demnach als Modell betrachtet und können keinen Anspruch auf die Vollständigkeit der tatsächlich vorkommenden komplexen Abläufe erheben. Aus der Literatur ist bekannt, dass Parodontitis, Diabetes und Adipositas in einem bidirektionalen Verhältnis stehen und sich gegenseitig beeinflussen (83, 97). Als eine mögliche pathomechanische Erklärung gelten Adipokine, die unter anderem von Adipozyten ausgestoßen werden und Einfluss auf diverse Körperfunktionen haben. Sie modulieren beispielsweise den Fett- und Glukosestoffwechsel, haben aber auch anti- oder pro-inflammatorische Eigenschaften. Ist ein Patient an Adipositas erkrankt, weist dieser pathogene Mengen an Fettgewebe auf, sodass das Ausmaß des

Ausstoßes dieser Botenstoffe ein Ungleichgewicht erfährt. In den letzten Jahren wurden immer mehr Adipokine entdeckt und beforscht (93). Es stellte sich heraus, dass auch PDL-Zellen Adipokine synthetisieren und Rezeptoren für diese bilden können (15), welche demnach dazu in der Lage sind lokal modulierend und regulativ in das Entzündungsgeschehen einzugreifen. Auch im Zusammenhang mit Parodontitis konnten für diverse Adipokine regulierende Eigenschaften nachgewiesen werden. So konnte die anti-entzündliche Wirkung des Adiponectins und die pro-inflammatorischen Eigenschaften von Leptin und Visfatin belegt werden (150, 151). Zum Zeitpunkt dieser Arbeit lag jedoch nur eine weitere Zellstudie vor, die sich mit dem Zusammenhängen zwischen Apelin und dessen regulierender Effekte an PDL-Zellen im entzündlichen Milieu befasste. In besagter Studie wurden die Zellen im Gegensatz zu unserer Arbeit nicht mit Bakterienbestandteilen, sondern direkt mittels der Entzündungsmediatoren TNF- α und IL-1 β behandelt. Für Apelin konnte hierbei ein protektiver Charakter im Zusammenhang mit TNF- α beobachtet werden (144), was jedoch in unseren Experimenten nur bedingt nach 24 h festgestellt werden konnte. Nach 48 h war hier sogar für fast alle analysierten Zielparameter der gegenteilige Effekt beobachtbar, was womöglich daran lag, dass die Inkubation mit Zellwandbestandteilen des Bakteriums *F. nucleatum* an einer anderen und/oder zusätzlichen Schnittstelle in der Entzündungskaskade eingreift und daher nur bedingt mit der reinen Stimulation mit TNF- α und IL-1 β vergleichbar ist. Die vorliegende Arbeit kann also als Ergänzung der bereits vorhandenen Information gesehen werden und stellt ein Puzzlestück der vielen unterschiedlichen Funktionen des Apelins dar. *F. nucleatum* führte zu einer erhöhten Expression pro-inflammatorischer und proteolytischer Moleküle, was die besondere Rolle dieses Bakteriums im Rahmen parodontaler Entzündung und Zerstörung unterstreicht. Wie in anderen Studien unserer Arbeitsgruppe wurde *F. nucleatum* als Lysat verwendet, sodass mehrere Faktoren für die beobachteten stimulierenden Effekte von *F. nucleatum* verantwortlich gewesen sein könnten. Zukünftige Studien mit lebenden Mikroorganismen oder sogar Biofilmen, die aus einer Vielzahl verschiedener Bakterien bestehen, sollten durchgeführt werden, um die Ergebnisse dieser Studie zu bestätigen. Die Entwicklungen der Forschung im Bereich der Parodontitisätiologie legen nahe, dass neben vielen anderen Faktoren auch mehr als ein Bakterium für Entstehung der Parodontitis notwendig ist (175). Viele Mikroorganismen, die beim gesunden Individuum als kommensales orales Mikrobiom vorliegen, haben beim Erkrankten eine Gleichgewichtsverschiebung erfahren. Diese dysbiotische Lebensgemeinschaft führt zur Aktivierung des menschlichen Immunsystems und damit zur wirtsinduzierten Desintegration des Zahnhalteapparats (175). In dieser Arbeit wurde ein Parodontitis-assoziiertes Bakterium von vielen als Stimulanz verwendet, daher kann das entzündliche Milieu nur in modellhafter Form imitiert werden, womit sich diese Arbeit daher auf dem Gebiet der Grundlagenforschung bewegt. *F. nucleatum* wurde ausgewählt, weil es im Rahmen der Pathogenese der Parodontitis als architektonisches „Brückenbakterium“ für Früh- und Spätbesiedler fungiert (199). Es ist mit Gingivitis und Parodontitis assoziiert und deckt somit ein breiteres ätiopathogenetisches Spektrum ab als ein Bakterium, das erst in der Spätphase der Parodontitis auftritt (169, 200). Es zählt des Weiteren zu den Parodontalpathogenen, die quantitativ am häufigsten in Plaquekulturen subgingivaler Biofilme detektiert werden können (201). In einer aktuellen Arbeit von Marsh et al. werden unterschiedliche parodontal pathobiontische Organismen aufgrund ihres pathologischen Potentials mit Hilfe eines „Dysbiose-Index“ klassifiziert und in „Gesundheits-assoziiert“ und „Parodontitis-assoziiert“ eingeteilt. *F. nucleatum* wird hier eindeutig als „Parodontitis-assoziiert“ eingestuft (202). Für den Mikroorganismus werden pro-inflammatorische und auch immunsubversive Eigenschaften in der Literatur beschrieben, was an die Eigenschaften eines Keystone-Mikroorganismus erinnert (169). Aus der Literatur ist bekannt, dass *F. nucleatum* Epithelzellen, Fibroblasten und im speziellen auch PDL-Zellen invadieren kann (186, 203–205). Da beschrieben ist, dass *F. nucleatum*

unter anderem dazu führt, dass TNF- α ausgeschüttet wird, wäre es auch möglich gewesen, TNF- α direkt als Stimulanz zu verwenden. Hierdurch würde jedoch ein Großteil der *F. nucleatum* vermittelten Signalkaskade übersprungen werden. Die Schwierigkeit ergibt sich dadurch, dass die vielen potenziell pathogenen parodontalen Mikroorganismen nicht zwangsläufig pathologische Auswirkungen haben müssen. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die meisten fakultativ parodontal pathogenen Bakterien auch beim Gesunden vorliegen (206). So muss *F. nucleatum* nicht direkt zytotoxisch oder virulent sein, sondern kann durch immunsubversive Eigenschaften, Ausschüttung von Chemokinen und Regulation der Zellfunktionen (usw.) die Progression der Entzündung beschleunigen oder erst ermöglichen. Dies wurde anhand von *P. gingivalis* als Keystone-Pathogen in der Literaturvorstellung bereits erörtert (33). Auch für *F. nucleatum* liegen Studien vor, welche zeigen konnten, dass es die Invasion anderer Mikroorganismen in Epithel- und Endothelzellen unterstützt (207). Die optische Dichte des *F. nucleatum* wurde durch die ersten dosisabhängigen Versuche festgelegt, da bei der geringsten Konzentration bereits starke, signifikante Unterschiede festgestellt werden konnten. Um eine verfälschte Überregulation durch erhöhte *F. nucleatum* Konzentrationen zu vermeiden, wurde die geringste Konzentration gewählt, welche eine signifikante Regulationsänderung hervorrief. Für Apelin wurde die Konzentration 1 ng/ml ausgewählt, weil es den physiologischen Serumwerten entspricht (208).

Die relative Quantifizierung der Genexpression mittels RT-PCR stellt ein genaueres Verfahren als die absolute Quantifizierung dar. Dies liegt daran, dass externe und interne Störeinflüsse mittels Normalisierung über ein Housekeeping Gen relativiert werden können, da diese auch auf das Referenzgen wirken. Durch die Ermittlung eines Verhältnisses anstelle einer absoluten Anzahl an Kopien verringert sich die Varianz der Ergebnisse. GAPDH ist in der Mikrobiologie für die Normalisierung eines der am häufigsten verwendeten Moleküle (209, 210), da es ubiquitär vorkommt und für grundlegende Zellfunktionen nötig ist (211). Obwohl es bis heute kein Referenzgen gibt, das in der Wissenschaft als Goldstandard verwendet wird und die Wahl des Housekeeping Genes vom entsprechenden Gewebe abhängt (212), konnte GAPDH in diversen Studien als stabiles Referenzgen ermittelt werden (213). Setiawann et al. konnten jedoch zeigen, dass auch für GAPDH gewisse Schwankungen festzustellen sind (214). Es sollten weitere Studien durchgeführt werden, um das optimale Housekeepinggen speziell für parodontale Gewebe zu identifizieren. In dieser Arbeit wurde das Housekeepinggen GAPDH als einzige Referenz verwendet. Es gäbe jedoch auch die Möglichkeit, mehrere Referenzgene zu nutzen und einen Index zu bilden, wodurch die Genauigkeit der Ergebnisse weiter steigen und die Gefahr der Fehlmessung durch Varianz sinken würde (147, 215). Generell ist festzuhalten, dass die PCR aufgrund der zahlreichen Teilschritte und der leicht denaturierbaren RNS techniksensitiv ist.

Für die statistische Auswertung wurde in dieser Arbeit der Standardfehler genutzt, da dieser Wert für In-vitro Versuche vorgesehen ist, bei denen ein sehr geregelter Aufbau vorliegt und Unterschiede in den Messungen durch veränderte Variablen entstehen und nicht biologisch bedingt sind. Da die Zelllinie genetisch identisch ist, können Genexpressionsunterschiede auf die zugeführte Stimulanz, Zeit oder sonstige künstlich geänderte Parameter sowie die Methodik zurückgeführt werden. Dass die Unterschiede auf biologischer Varianz des Probenmaterials basieren, ist nicht anzunehmen. Da in dieser Arbeit recht geringe Stichprobenzahlen zur Verfügung standen und die Standardabweichung des Mittelwerts bei großen Stichproben geringer verfälscht wird, ist die Gefahr der Verzerrung reduziert. Da es sich also um eine verhältnismäßig kleine Stichprobe einer sehr großen Population an vermeintlich identischen Zellen handelt, ist es üblich, die theoretische Streuung bei unendlich vielen Stichproben anzugeben (216). Von Interesse ist in diesem Szenario eher, wie sicher die Mittelwerte im Vergleich zum Umfang der tatsächlichen Streuung einzuschätzen sind. In der vorliegenden Arbeit wurde auf eine Zelllinie zurückgegriffen, wodurch sich weniger Varianzen im Probenmaterial ergeben,

als es bei Spenderzellen der Fall ist, da die etablierten Zellpopulationen einheitlicher und reproduzierbarer sind. Des Weiteren wurde kein Ethikantrag benötigt, da kein direkter Spender notwendig war.

Da die Dosis Versuche zum Zeitpunkt von 24 h durchgeführt wurden, konnten sie im Sinne einer internen Kontrolle mit dem 24 h-Wert der zeitabhängigen Versuche verglichen werden. Die Werte stimmen mit einer Varianz von 0,2 überein (Tab. 2), weshalb die Wahrscheinlichkeit, dass ein methodischer Fehler vorlag, gering ist.

Gen	Dosis	Zeit
COX-2	5,5	5,3
Apelin	0,6	0,5
APJ	0,7	0,7

Tabelle 2 – 24 h-CT Werte der dosis- und zeitabhängigen Versuche im Vergleich

Mit den aufgeführten Methoden und deren Limitationen konnte gezeigt werden, dass der durch *F. nucleatum* vermittelte entzündliche Stimulus die Genexpression von Apelin und dessen Rezeptor kurzfristig hemmte. In den Kombinationsversuchen wurde deutlich, dass Apelin im mikrobiellen Milieu teils synergistisch die Expression von pro-inflammatorischen Zytokinen wie COX-2, CXCL8, und CCL2 und proteolytischen Enzymen wie MMP1 verstärkte. Auf den Transkriptionsfaktor RUNX2 und den Wachstumsfaktor TGF- β 1 schien Apelin einen positiven regulativen Einfluss zu haben. Dies legt nahe, dass Apelin unterschiedliche modulative Eigenschaften aufweist.

9 Zusammenfassung

Parodontitis ist eine chronische, entzündliche Erkrankung des Zahnhalteapparates, die durch irreversiblen Knochen- und Attachmentverlust gekennzeichnet ist. Unbehandelt kann Parodontitis zu Zahnverlust, einer eingeschränkten Lebensqualität sowie negativen Auswirkungen auf den Gesamtorganismus führen. Parodontitis wird durch eine mikrobielle Dysbiose verursacht, die wiederum mit einer inadäquaten Entzündungs- und Immunreaktion assoziiert ist. Weitere Risikofaktoren wie Rauchen, genetische und epigenetische Disposition, mentaler Stress sowie okklusale Über- bzw. Fehlbelastungen können zur Entstehung und Progression der Parodontitis beitragen. Zudem konnte gezeigt werden, dass auch verschiedene Allgemeinerkrankungen und/oder Zustände wie Diabetes mellitus, Adipositas und metabolisches Syndrom Risikofaktoren für Parodontitis darstellen. Andererseits kann Parodontitis auch die Entstehung und Progression dieser Erkrankungen und Zustände fördern, d.h., dass es nicht nur signifikante Assoziationen zwischen parodontalen und zahlreichen systemischen Erkrankungen gibt, sondern dass diese Assoziationen zumindest teilweise auch kausaler und/oder bidirektionaler Natur sind. Verschiedene mögliche Pathomechanismen wurden beschrieben, wobei Adipokine eine zentrale Rolle bei der Assoziation zwischen Parodontitis und metabolischen Erkrankungen spielen könnten. Bei adipösen Individuen produzieren die Zellen des viszeralen Fettgewebes (z.B. Adipozyten) vermehrt pro-inflammatorische Adipo-Zytokine. Diese sogenannten Adipokine sind Botenstoffe, die in verschiedenen Zielorganen an ihre spezifischen Rezeptoren binden können, um dort vielfältige Effekte auszuüben. Interessanterweise werden solche Adipokine nicht nur im Fettgewebe, sondern auch in anderen Geweben, so z.B. im Parodont, produziert. In den letzten Jahren wurde verstärkt die Rolle von Visfatin, Resistin, Leptin und Adiponektin im Parodont untersucht, wohingegen die Bedeutung des Adipokins Apelin und seines Rezeptors noch weitgehend unbekannt ist. Ziel dieser Dissertation war es daher *in vitro* zu untersuchen, ob Apelin und sein Rezeptor in parodontalen Zellen exprimiert werden und, wenn dies der Fall wäre, ob diese Expressionen durch das mit Parodontitis-assoziierte Bakterium *Fusobacterium nucleatum* reguliert werden. Weiterhin sollte die Rolle von Apelin selbst auf parodontale Zellen unter normalen und mikrobiellen Bedingungen analysiert werden. Diese Versuche sollten helfen, die Rolle von Apelin und seinem Rezeptor bei der Ätiopathogenese der Parodontitis besser zu verstehen. Außerdem sollte durch die Versuche auf zellulärer und molekularer Ebene geklärt werden, ob Apelin und sein Rezeptor einen Pathomechanismus darstellen könnten, über welchen parodontale und metabolische Erkrankungen assoziiert sind.

In verschiedenen *In-vitro*-Versuchen wurden parodontale Ligament (PDL)-Zellen in An- und Abwesenheit unterschiedlicher Konzentrationen von *F. nucleatum* und/oder Apelin für bis zu 48 h kultiviert. Unbehandelte Zellen dienten als Kontrollen. Nachfolgend wurde die Expression verschiedener pro-inflammatorischer Moleküle wie Cyclooxygenase 2 (COX-2), CC-Chemokin-Ligand-2 (CCL2), Interleukin-8 (CXCL8) und Tumornekrosefaktor-alpha (TNF- α), des Enzyms Matrixmetalloproteinase 1 (MMP1), des Wachstumsfaktors Transforming Growth Factor Beta 1 (TGF- β 1) und des Osteogenese-assoziierten Transkriptionsfaktors Runt Related Transcription Factor 2 (RUNX2) mittels real-time PCR untersucht. Die Expressionen von Apelin und seinem Rezeptor wurden ebenfalls bestimmt. Komplettiert wurden die Transkriptionsstudien für CCL2 und MMP1 durch Proteinanalysen der Zellüberstände mittels ELISA. Außerdem wurde die Beteiligung der „nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells“ (NF- κ B)- und „mitogen-activated protein kinase“ (MAPK)-

Signaltransduktionen durch Präinkubation mit spezifischen Inhibitoren untersucht. Die statistische Auswertung erfolgte mittels parametrischer und non-parametrischer Tests ($p < 0,05$).

Die In-vitro-Experimente offenbarten, dass Apelin und sein Rezeptor in PDL-Zellen konstitutiv exprimiert werden. *F. nucleatum* führte zu einer dosis- und zeitabhängigen Hemmung der Expressionen von Apelin und seinem Rezeptor. Der inhibitorische Effekt war am stärksten bei hohen Bakterienkonzentrationen und nach kurzer Inkubationszeit. In weiteren Versuchen wurde der regulatorische Effekt von Apelin auf die *F. nucleatum*-induzierten Expressionen verschiedener pro-inflammatorischer und proteolytischer Moleküle sowie TGF- β 1 und RUNX2 untersucht. *F. nucleatum* allein führte zu einer Steigerung der konstitutiven Expressionen von COX-2, CCL2, CXCL8 und TNF- α sowie MMP1, aber nicht von TGF- β 1 und RUNX2. In zusätzlichen Experimenten konnte gezeigt werden, dass der stimulative Effekt von *F. nucleatum* auf COX-2, CCL2 und MMP1 ebenfalls dosis- und zeitabhängig war, wobei die stärksten Effekte im Allgemeinen bei hoher Bakterienkonzentration und längerer Inkubationszeit beobachtet werden konnten. Apelin allein hatte keinen wesentlichen Effekt auf die Expressionen der obengenannten Zielmoleküle. Allerdings führte Apelin zu einer weiteren Steigerung der *F. nucleatum*-induzierten Expressionen von CCL2 und MMP1 nach 24 h sowie von COX-2, CCL2, CXCL8, TNF- α und MMP1 nach 48 h. Ferner vermochte Apelin die *F. nucleatum*-induzierte Hemmung der RUNX2-Expression nach 24 h wieder signifikant zu steigern. Mittels ELISA konnte für CCL2 und MMP1 gezeigt werden, dass Apelin auch zu einer Erhöhung der *F. nucleatum*-induzierten Proteinlevel in den Überständen führte. Die pro-inflammatorischen Effekte von *F. nucleatum* und/oder Apelin wurden zumindest teilweise über MEK1/2 und NF- κ B realisiert.

Die dieser Dissertationsarbeit zugrundeliegenden Versuche legen nahe, dass Apelin und sein Rezeptor im Parodont exprimiert werden, dass Apelin pro-inflammatorische und proteolytische Effekte verstärken und somit parodontale Entzündungsprozesse bei der Parodontitis fördern kann und dass über Apelin, dessen Serumspiegel bei metabolischen Erkrankungen erhöht ist, Erkrankungen des Gesamtorganismus zur Entstehung und Progression der Parodontitis beitragen können. Andererseits könnte Apelin, das von parodontalen Zellen produziert wird, auch Einfluss auf metabolische Erkrankungen ausüben.

10 Danksagung

Außerordentlicher Dank gilt Prof. Dr. J. Deschner, der mir ermöglichte, im Bereich der Zellforschung wissenschaftlich zu arbeiten und mir so die Tür zu einem bis dato unbekanntem Terrain öffnete. Ich freue mich auf weitere Studien und bin dankbar für die geschaffene, fruchtbare Perspektive. Ohne ihn und seine konstruktive Förderung wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Besonderer Dank geht auch an PhD Dr. AVB Nogueira für ihre nachhaltige und außerordentliche Betreuung sowie für ihre Geduld und wertvolle, unvoreingenommene Hilfe zu jeder Frage. Sie behielt trotz der Langwierigkeit der Arbeit immer den übergeordneten Blick und leitete sicher zum Ziel. Ihre weitsichtige Unterstützung hat diese Arbeit möglich gemacht.

Großer Dank gilt all denjenigen, die ihre Zeit aufgeopfert haben, um die Fehler dieser Schrift zu finden und zu korrigieren, allen voran Dorothea und meinen Eltern.

„ An Apple a day keeps the Doctor away “

– In Anbetracht der Zeit, die diese Arbeit in Anspruch genommen hat, hätte ich wohl weniger Äpfel essen sollen.

11 Tabellarischer Lebenslauf

12 Literaturverzeichnis

Literatur

1. Lang NP, Hrsg. *Clinical Periodontology and Implant Dentistry*. 7. Aufl. Hoboken: John Wiley & Sons, Inc; 2022. Verfügbar unter: <https://ebookcentral.proquest.com/lib/kxp/detail.action?docID=6686985>.
2. Gobbato L, Avila-Ortiz G, Sohrabi K, Wang C-W, Karimbux N. The effect of keratinized mucosa width on peri-implant health: a systematic review. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2013; 28(6):1536–45. doi: 10.11607/jomi.3244.
3. Toljanic JA, Ward CB, Gewerth ME, Banakis ML. A Longitudinal Clinical Comparison Plaque-Induced Inflammation Between Gingival and Peri-Implant Soft Tissues in the Maxilla. *Journal of Periodontology* 2001; 72(9):1139–45. doi: 10.1902/jop.2000.72.9.1139.
4. Conrads G. Zutritt verboten – Wie im Mund die Invasion von Mikroben verhindert wird: Themenschwerpunkt: Orale Medizin und Immunkompetenz. *Quintessenz Zahnmedizin* 2020; 71(12):1408-1416.
5. Schroeder HE, Listgarten MA. The gingival tissues: the architecture of periodontal protection. *Periodontol* 2000 1997; 13(1):91–120. doi: 10.1111/j.1600-0757.1997.tb00097.x.
6. Moutsopoulos NM, Konkel JE. Tissue-Specific Immunity at the Oral Mucosal Barrier. *Trends Immunol* 2018; 39(4):276–87. doi: 10.1016/j.it.2017.08.005.
7. Schiött CR, Loe H. The origin and variation in number of leukocytes in the human saliva. *Journal of Periodontal Research* 1970; 5(1):36–41. doi: 10.1111/j.1600-0765.1970.tb01835.x.
8. Skougaard M. Turnover of the gingival epithelium in marmosets. *Acta Odontologica Scandinavica* 1965; 23(6):623–43. doi: 10.3109/00016356509041116.
9. Husari A, Jung BA. Die Biologie der orthodontischen Zahnbewegung – Status quo der Forschung. *ZWR* 2020; 129(04):120–5. doi: 10.1055/a-1084-1346.

10. Nogueira AVB, Nokhbehshaim M, Eick S, Bourauel C, Jäger A, Jepsen S et al. Biomechanical loading modulates proinflammatory and bone resorptive mediators in bacterial-stimulated PDL cells. *Mediators of Inflammation* 2014; 2014:425421. doi: 10.1155/2014/425421.
11. Pontius O. Pathologische Wurzelresorptionen. *Endodontie* 2021; 30(3):247–61.
12. Knight ET, Liu J, Seymour GJ, Faggion CM, Cullinan MP. Risk factors that may modify the innate and adaptive immune responses in periodontal diseases. *Periodontol 2000* 2016; 71(1):22–51. doi: 10.1111/prd.12110.
13. Schaefer AS. Genetics of periodontitis: Discovery, biology, and clinical impact. *Periodontol 2000* 2018; 78(1):162–73. doi: 10.1111/prd.12232.
14. Helal O, Göstemeyer G, Krois J, Fawzy El Sayed K, Graetz C, Schwendicke F. Predictors for tooth loss in periodontitis patients: Systematic review and meta-analysis. *J Clin Periodontol* 2019; 46(7):699–712. doi: 10.1111/jcpe.13118.
15. Deschner J, Eick S, Damanaki A, Nokhbehshaim M. The role of adipokines in periodontal infection and healing. *Mol Oral Microbiol* 2014; 29(6):258–69. doi: 10.1111/omi.12070.
16. Caton JG, Armitage G, Berglundh T, Chapple ILC, Jepsen S, Kornman KS et al. A new classification scheme for periodontal and peri-implant diseases and conditions - Introduction and key changes from the 1999 classification. *J Clin Periodontol* 2018; 45 Suppl 20:S1-S8. doi: 10.1111/jcpe.12935.
17. Sheiham A. The epidemiology of dental caries and periodontal disease. *J Clin Periodontol* 1979; 6(7):7–15. doi: 10.1111/j.1600-051x.1979.tb02113.x.
18. Eke PI, Dye BA, Wei L, Slade GD, Thornton-Evans GO, Borgnakke WS et al. Update on Prevalence of Periodontitis in Adults in the United States: NHANES 2009 to 2012. *Journal of Periodontology* 2015; 86(5):611–22. doi: 10.1902/jop.2015.140520.
19. Jordan, A. R., Micheelis, W. Fünfte Deutsche Mundgesundheitsstudie-(DMS V). Köln: Deutscher Zahnärzte Verlag DÄV; 2016.
20. Dommisch H, Jepsen K. Parodontitis und Periimplantitis. *DFZ* 2013; 58(1):50–9. doi: 10.1007/s12614-013-1771-z.
21. Bernabe, E., et al. GBD 2017 oral disorders collaborators. global, regional, and national levels and trends in burden of oral conditions from 1990 to 2017: a systematic analysis for the global burden of disease 2017 study. *J Dental Res* 2020; (99):362–73.
22. Loe H, Anerud A, Boysen H, Morrison E. Natural history of periodontal disease in man. Rapid, moderate and no loss of attachment in Sri Lankan laborers 14 to 46 years of age. *J Clin Periodontol* 1986; 13(5):431–45. doi: 10.1111/j.1600-051x.1986.tb01487.x.
23. SANDERS WE. Modification of normal flora by antibiotics : effects on individuals and the environment. *New dimensions in antimicrobial chemotherapy* 1984. Verfügbar unter: <https://ci.nii.ac.jp/naid/10018764418/>.
24. Wilson M. *Microbial Inhabitants of Humans: Their ecology and role in health and disease*. Cambridge, GBR: Cambridge University Press; 2004.
25. Marsh PD, Martin MV, Lewis MAO, Williams D. *Oral Microbiology*. 5th ed. London: Elsevier Health Sciences UK; 2014.
26. Dewhirst FE, Chen T, Izard J, Paster BJ, Tanner ACR, Yu W-H et al. The human oral microbiome. *J Bacteriol* 2010; 192(19):5002–17. doi: 10.1128/JB.00542-10.

27. Donné J, Dewilde S. The Challenging World of Biofilm Physiology. *Adv Microb Physiol* 2015; 67:235–92. doi: 10.1016/bs.ampbs.2015.09.003.
28. Harper-Owen R, Dymock D, Booth V, Weightman AJ, Wade WG. Detection of unculturable bacteria in periodontal health and disease by PCR. *Journal of Clinical Microbiology* 1999; 37(5):1469–73. Verfügbar unter: <https://jcm.asm.org/content/37/5/1469.short>.
29. Aas JA, Paster BJ, Stokes LN, Olsen I, Dewhirst FE. Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. *Journal of Clinical Microbiology* 2005; 43(11):5721–32. doi: 10.1128/JCM.43.11.5721-5732.2005.
30. Strassler HE, Minah GE, Kula KS. Microbiological and microhardness evaluation of artificial enamel fissures worn intraorally by humans. *Journal of Clinical Microbiology* 1986; 23(1):6–10. Verfügbar unter: <https://jcm.asm.org/content/23/1/6.short>.
31. Bowden GH, Hardie JM, Slack GL. Microbial variations in approximal dental plaque. *CRE* 1975; 9(4):253–77. doi: 10.1159/000260162.
32. Slots J. Microflora in the healthy gingival sulcus in man. *Scand J Dent Res* 1977; 85(4):247–54. doi: 10.1111/j.1600-0722.1977.tb00560.x.
33. Hajishengallis G, Darveau RP, Curtis MA. The keystone-pathogen hypothesis. *Nat Rev Microbiol* 2012; 10(10):717–25. doi: 10.1038/nrmicro2873.
34. Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent RL. Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol* 1998; 25(2):134–44. doi: 10.1111/j.1600-051x.1998.tb02419.x.
35. Marsh PD. Microbial ecology of dental plaque and its significance in health and disease. *Adv Dent Res*. 1994; 8(2):263–71. doi: 10.1177/08959374940080022001.
36. Darveau RP, Belton CM, Reife RA, Lamont RJ. Local chemokine paralysis, a novel pathogenic mechanism for *Porphyromonas gingivalis*. *Infection and Immunity* 1998; 66(4):1660–5. Verfügbar unter: <https://iai.asm.org/content/66/4/1660/>.
37. Hajishengallis G, Korostoff JM. Revisiting the Page & Schroeder model: the good, the bad and the unknowns in the periodontal host response 40 years later. *Periodontol* 2000 2017; 75(1):116–51. doi: 10.1111/prd.12181.
38. Hajishengallis G, Liang S, Payne MA, Hashim A, Jotwani R, Eskin MA et al. Low-abundance biofilm species orchestrates inflammatory periodontal disease through the commensal microbiota and complement. *Cell Host & Microbe* 2011; 10(5):497–506. Verfügbar unter: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S193131281100299X>.
39. Trombelli L, Farina R, Manfrini R, Tatakis DN. Modulation of clinical expression of plaque-induced gingivitis: effect of incisor crown form. *J Dent Res* 2004; 83(9):728–31. doi: 10.1177/154405910408300914.
40. Loe H, THEILADE E, JENSEN SB. Experimental Gingivitis in Man_Loe1965. *J Periodontol* 1965; 36(3):177–87. doi: 10.1902/jop.1965.36.3.177.
41. Page RC, Schroeder HE. Pathogenesis of inflammatory periodontal disease. A summary of current work. *Lab Invest* 1976; 34(3):235–49.
42. Mackler BF, Frostad KB, Robertson PB, Levy BM. Immunoglobulin bearing lymphocytes and plasma cells in human periodontal disease. *Journal of Periodontal Research* 1977; 12(1):37–45. doi: 10.1111/j.1600-0765.1977.tb00107.x.

43. Domeij H, Yucel-Lindberg T, Modéer T. Signal pathways involved in the production of MMP-1 and MMP-3 in human gingival fibroblasts. *Eur J Oral Sci* 2002; 110(4):302–6. doi: 10.1034/j.1600-0722.2002.21247.x.
44. Balli U, Cetinkaya BO, Keles GC, Keles ZP, Guler S, Sogut MU et al. Assessment of MMP-1, MMP-8 and TIMP-2 in experimental periodontitis treated with kaempferol. *J Periodontal Implant Sci* 2016; 46(2):84–95. Verfügbar unter: <https://synapse.koreamed.org/articles/1082539>.
45. Tüter G, Kurtiş B, Serdar M. Effects of phase I periodontal treatment on gingival crevicular fluid levels of matrix metalloproteinase-1 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1. *Journal of Periodontology* 2002; 73(5):487–93. doi: 10.1902/jop.2002.73.5.487.
46. Mogi M, Ootogoto J, Ota N, Togari A. Differential expression of RANKL and osteoprotegerin in gingival crevicular fluid of patients with periodontitis. *J Dent Res* 2004; 83(2):166–9. doi: 10.1177/154405910408300216.
47. Komori T. Runx2, a multifunctional transcription factor in skeletal development. *Journal of Cellular Biochemistry* 2002; 87(1):1–8. doi: 10.1002/jcb.10276.
48. Bakdash B. Oral Hygiene and Compliance as Risk Factors in Periodontitis. *Journal of Periodontology* 1994; 65(5s):539–44. doi: 10.1902/jop.1994.65.5s.539.
49. Chung CH, Vanarsdall RL, Cavalcanti EA, Baldinger JS, Lai CH. Comparison of microbial composition in the subgingival plaque of adult crowded versus non-crowded dental regions. *Int J Adult Orthodon Orthognath Surg* 2000; 15(4):321–30.
50. Lang NP, Kiel RA, Anderhalden K. Clinical and microbiological effects of subgingival restorations with overhanging or clinically perfect margins. *J Clin Periodontol* 1983; 10(6):563–78. doi: 10.1111/j.1600-051X.1983.tb01295.x.
51. Rodriguez-Ferrer HJ, Strahan JD, Newman HN. Effect of gingival health of removing overhanging margins of interproximal subgingival amalgam restorations. *J Clin Periodontol* 1980; 7(6):457–62. doi: 10.1111/j.1600-051X.1980.tb02152.x.
52. Hou GL, Tsai CC. Relationship between palato-radicular grooves and localized periodontitis. *J Clin Periodontol* 1993; 20(9):678–82. doi: 10.1111/j.1600-051X.1993.tb00715.x.
53. Goldstein AR. Enamel pearls as contributing factor in periodontal breakdown. *The Journal of the American Dental Association* 1979; 99(2):210–1. doi: 10.14219/jada.archive.1979.0258.
54. Chapple ILC, Mealey BL, van Dyke TE, Bartold PM, Dommisch H, Eickholz P et al. Periodontal health and gingival diseases and conditions on an intact and a reduced periodontium: Consensus report of workgroup 1 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. *Journal of Periodontology* 2018; 89 Suppl 1:S74-S84. Verfügbar unter: <https://aap.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/JPER.17-0719>.
55. Gulati MS. A comparative study of effects of mouth breathing and normal breathing on gingival health in children. *Indian Soc Pedod Prev Dent*. 1998; 16(3):72–83. Verfügbar unter: <https://europepmc.org/article/med/10635129>.
56. Yeung AL, Lo EC, Chow TW, Clark RK. Oral health status of patients 5-6 years after placement of cobalt-chromium removable partial dentures. *Journal of Oral Rehabilitation* 2000; 27(3):183–9. doi: 10.1046/j.1365-2842.2000.00512.x.
57. Boyd RL, Baumrind S. Periodontal considerations in the use of bonds or bands on molars in adolescents and adults. *Angle Orthod* 1992; 62(2):117–26. doi: 10.1043/0003-3219(1992)062<0117:PCITUO>2.0.CO;2.

58. Albandar JM, Buischi YA, Axelsson P. Caries lesions and dental restorations as predisposing factors in the progression of periodontal diseases in adolescents. A 3-year longitudinal study. *J Periodontol* 1995; 66(4):249–54. doi: 10.1902/jop.1995.66.4.249.
59. Polson AM. Periodontal Destruction Associated with Vertical Root Fracture: Report of Four Cases. *Journal of Periodontology* 1977; 48(1):27–32. doi: 10.1902/jop.1977.48.1.27.
60. Goutoudi P, Koidis PT, Konstantinidis A. Gingival recession: a cross-sectional clinical investigation. *Eur J Prosthodont Restor Dent* 1997; 5(2):57–61.
61. Vlachodimou E, Fragkioudakis I, Vouros I. Is There an Association between the Gingival Phenotype and the Width of Keratinized Gingiva? A Systematic Review. *Dentistry Journal* 2021; 9(3):34. Verfügbar unter: <https://www.mdpi.com/2304-6767/9/3/34>.
62. Seymour GJ, Ford PJ, Cullinan MP, Leishman S, Yamazaki K. Relationship between periodontal infections and systemic disease. *Clin Microbiol Infect* 2007; 13 Suppl 4:3–10. Verfügbar unter: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1469-0691.2007.01798.x>.
63. Haber J. Smoking is a major risk factor for periodontitis. *Curr Opin Periodontol* 1994:12–8.
64. Lee J, Taneja V, Vassallo R. Cigarette smoking and inflammation: cellular and molecular mechanisms. *J Dent Res* 2012; 91(2):142–9. doi: 10.1177/0022034511421200.
65. Preshaw PM, Alba AL, Herrera D, Jepsen S, Konstantinidis A, Makrilakis K et al. Periodontitis and diabetes: a two-way relationship. *Diabetologia* 2012; 55(1):21–31. doi: 10.1007/s00125-011-2342-y.
66. Nascimento GG, Leite FRM, Conceição DA, Ferrúa CP, Singh A, Demarco FF. Is there a relationship between obesity and tooth loss and edentulism? A systematic review and meta-analysis. *Obes Rev* 2016; 17(7):587–98. doi: 10.1111/obr.12418.
67. SEYMOUR RA. Drug-induced gingival overgrowth. *Adverse drug reactions and toxicological reviews* 1993; 12(4):215-232UR - <https://pascal-francis.inist.fr/vibad/index.php?action=getRecordDetail&idt=3897635>.
68. Glick M, Pliskin ME, Weiss RC. The clinical and histologic appearance of HIV-associated gingivitis. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology* 1990; 69(3):395–8. doi: 10.1016/0030-4220(90)90309-G.
69. Nauck M, Gerdes C, Petersmann A, Müller-Wieland D, Müller UA, Freckmann G et al. Definition, Klassifikation und Diagnostik des Diabetes mellitus: Update 2020. *Diabetologie und Stoffwechsel* 2020; 15(S 01):S9-S17. doi: 10.1055/a-1193-3185.
70. Bennett CM, Guo M, Dharmage SC. HbA(1c) as a screening tool for detection of Type 2 diabetes: a systematic review. *Diabet Med* 2007; 24(4):333–43. doi: 10.1111/j.1464-5491.2007.02106.x.
71. Naujokat H, Kunzendorf B, Wiltfang J. Dental implants and diabetes mellitus-a systematic review. *Int J Implant Dent* 2016; 2(1):5. doi: 10.1186/s40729-016-0038-2.
72. Goffrier B, Schulz Mandy, Bätzing-Feigenbaum J. Administrative Prävalenzen und Inzidenzen des Diabetes mellitus von 2009 bis 2015; 2017.
73. Yu M, Zhan X, Yang Z, Huang Y. Measuring the global, regional, and national burden of type 2 diabetes and the attributable risk factors in all 194 countries. *J Diabetes* 2021; 13(8):613–39. doi: 10.1111/1753-0407.13159.
74. Icks A, Roden M. Diabetes mellitus in Deutschland. *Public Health Forum* 2010; 18(1):4–6. doi: 10.1016/j.phf.2009.12.003.

75. Dandona P, Aljada A, Bandyopadhyay A. Inflammation: the link between insulin resistance, obesity and diabetes. *Trends Immunol* 2004; 25(1):4–7. Verfügbar unter: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1471490603003363>.
76. Hotamisligil GS. Molecular mechanisms of insulin resistance and the role of the adipocyte. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2000; 24 Suppl 4(4):S23-7. doi: 10.1038/sj.ijo.0801497.
77. Loos BG. Systemic Markers of Inflammation in Periodontitis. *Journal of Periodontology* 2005; 76(11-s):2106–15. doi: 10.1902/jop.2005.76.11-S.2106.
78. Paraskevas S, Huizinga JD, Loos BG. A systematic review and meta-analyses on C-reactive protein in relation to periodontitis. *J Clin Periodontol* 2008; 35(4):277–90. doi: 10.1111/j.1600-051X.2007.01173.x.
79. Rotter V, Nagaev I, Smith U. Interleukin-6 (IL-6) induces insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes and is, like IL-8 and tumor necrosis factor-alpha, overexpressed in human fat cells from insulin-resistant subjects. *Journal of Biological Chemistry* 2003; 278(46):45777–84. Verfügbar unter: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021925820823412>.
80. Salvi GE, Collins JG, Yalda B, Arnold RR, Lang NP, Offenbacher S. Monocytic TNF alpha secretion patterns in IDDM patients with periodontal diseases. *J Clin Periodontol* 1997; 24(1):8–16. doi: 10.1111/j.1600-051x.1997.tb01178.x.
81. Salvi GE, Yalda B, Collins JG, Jones BH, Smith FW, Arnold RR et al. Inflammatory mediator response as a potential risk marker for periodontal diseases in insulin-dependent diabetes mellitus patients. *J Periodontol* 1997; 68(2):127–35. doi: 10.1902/jop.1997.68.2.127.
82. Graves DT, Liu R, Alikhani M, Al-Mashat H, Trackman PC. Diabetes-enhanced inflammation and apoptosis--impact on periodontal pathology. *J Dent Res* 2006; 85(1):15–21. doi: 10.1177/154405910608500103.
83. Deschner J, Haak T, Jepsen S, Kocher T, Mehnert H, Meyle J et al. Diabetes mellitus und Parodontitis. Wechselbeziehung und klinische Implikationen. Ein Konsensuspapier. *Internist* 2011; 52(4):466–77. doi: 10.1007/s00108-011-2835-2.
84. Patel SA, Ali MK, Alam D, Yan LL, Levitt NS, Bernabe-Ortiz A et al. Obesity and its Relation with Diabetes and Hypertension: A Cross-Sectional Study Across 4 Geographical Regions. *Glob Heart* 2016; 11(1):71-79.e4. doi: 10.1016/j.gheart.2016.01.003.
85. Levine RS. Obesity, diabetes and periodontitis--a triangular relationship? *Br Dent J* 2013; 215(1):35–9. doi: 10.1038/sj.bdj.2013.627.
86. James PT, Leach R, Kalamara E, Shayeghi M. The worldwide obesity epidemic. *Obesity Research* 2001; 9 Suppl 4(S11):228S-233S. Verfügbar unter: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1038/oby.2001.123>.
87. Nguyen DM, El-Serag HB. The epidemiology of obesity. *Gastroenterol Clin North Am* 2010; 39(1):1–7. doi: 10.1016/j.gtc.2009.12.014.
88. Stevens GA. Global Burden of Metabolic Risk Factors of Chronic Diseases Collaborating Group (Body Mass Index). National, regional, and global trends in adult overweight and obesity prevalences. *Population Health Metrics* 2012; 10(1):1–16. Verfügbar unter: https://scholar.google.de/citations?user=7bhxn_4aaaaj&hl=de&oi=sra.
89. Jebb S. Obesity: causes and consequences. *Women's Health Medicine* 2004; 1(1):38–41. Verfügbar unter: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1744187006000102>.

90. Robinson E, Boyland E, Chisholm A, Harrold J, Maloney NG, Marty L et al. Obesity, eating behavior and physical activity during COVID-19 lockdown: A study of UK adults. *Appetite* 2021; 156:104853. Verfügbar unter: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0195666320310060>.
91. Lifshitz F, Lifshitz JZ. Globesity: the root causes of the obesity epidemic in the USA and now worldwide. *Pediatr Endocrinol Rev* 2014; 12(1):17–34.
92. Goebel R, Schulz M. Definition von Übergewicht und Adipositas. *Pharm Unserer Zeit* 2006; 35(6):478–83. doi: 10.1002/pauz.200600192.
93. Ouchi N, Parker JL, Lugus JJ, Walsh K. Adipokines in inflammation and metabolic disease. *Nat Rev Immunol* 2011; 11(2):85–97. doi: 10.1038/nri2921.
94. Abdullah A, Peeters A, Courten M de, Stoelwinder J. The magnitude of association between overweight and obesity and the risk of diabetes: a meta-analysis of prospective cohort studies. *Diabetes Research and Clinical Practice* 2010; 89(3):309–19. Verfügbar unter: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168822710001944>.
95. Schienkiewitz A, Mensink GBM, Scheidt-Nave C. Comorbidity of overweight and obesity in a nationally representative sample of German adults aged 18-79 years. *BMC Public Health* 2012; 12(1):658. doi: 10.1186/1471-2458-12-658.
96. Perlstein MI, Bissada NF. Influence of obesity and hypertension on the severity of periodontitis in rats. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology* 1977; 43(5):707–19. Verfügbar unter: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/003042207790055X>.
97. Saito T, Shimazaki Y, Sakamoto M. Obesity and periodontitis. *N Engl J Med* 1998; 339(7):482–3. doi: 10.1056/NEJM199808133390717.
98. Nishida N, Tanaka M, Hayashi N, Nagata H, Takeshita T, Nakayama K et al. Determination of smoking and obesity as periodontitis risks using the classification and regression tree method. *J Periodontol* 2005; 76(6):923–8. doi: 10.1902/jop.2005.76.6.923.
99. Amar S, Leeman S. Periodontal innate immune mechanisms relevant to obesity. *Mol Oral Microbiol* 2013; 28(5):331–41. doi: 10.1111/omi.12035.
100. Dobrovolskaia MA, Medvedev AE, Thomas KE, Cuesta N, Toshchakov V, Ren T et al. Induction of in vitro reprogramming by Toll-like receptor (TLR)2 and TLR4 agonists in murine macrophages: effects of TLR "homotolerance" versus "heterotolerance" on NF-kappa B signaling pathway components. *J Immunol* 2003; 170(1):508–19. Verfügbar unter: <https://www.jimmunol.org/content/170/1/508.short>.
101. Tanabe S-I, Grenier D. Macrophage tolerance response to *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* lipopolysaccharide induces differential regulation of tumor necrosis factor-alpha, interleukin-1 beta and matrix metalloproteinase 9 secretion. *Journal of Periodontal Research* 2008; 43(3):372–7. doi: 10.1111/j.1600-0765.2007.01049.x.
102. Muthukuru M, Jotwani R, Cutler CW. Oral mucosal endotoxin tolerance induction in chronic periodontitis. *Infection and Immunity* 2005; 73(2):687–94. Verfügbar unter: <https://iai.asm.org/content/73/2/687.short>.
103. Zelkha SA, Freilich RW, Amar S. Periodontal innate immune mechanisms relevant to atherosclerosis and obesity. *Periodontol* 2000 2010; 54(1):207–21. doi: 10.1111/j.1600-0757.2010.00358.x.

104. Amar S, Zhou Q, Shaik-Dasthagirisahab Y, Leeman S. Diet-induced obesity in mice causes changes in immune responses and bone loss manifested by bacterial challenge. *PNAS* 2007; 104(51):20466–71. Verfügbar unter: <https://www.pnas.org/content/104/51/20466.short>.
105. Fève B, Bastard C, Fellahi S, Bastard J-P, Capeau J. New adipokines. *Ann Endocrinol (Paris)* 2016; 77(1):49–56. doi: 10.1016/j.ando.2016.01.001.
106. Cook KS, Min HY, Johnson D, Chaplinsky RJ, Flier JS, Hunt CR et al. Adipsin: a circulating serine protease homolog secreted by adipose tissue and sciatic nerve. *Science* 1987; 237(4813):402–5. doi: 10.1126/science.3299705.
107. Park KH, Kim D-K, Huh YH, Lee G, Lee S-H, Hong Y et al. NAMPT enzyme activity regulates catabolic gene expression in gingival fibroblasts during periodontitis. *Exp Mol Med* 2017; 49(8):368-368. doi: 10.1038/emmm.2017.116.
108. Cinti S, Mitchell G, Barbatelli G, Murano I, Ceresi E, Faloia E et al. Adipocyte death defines macrophage localization and function in adipose tissue of obese mice and humans. *Journal of Lipid Research* 2005; 46(11):2347–55. Verfügbar unter: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S002227520328728>.
109. Murano I, Barbatelli G, Parisani V, Latini C, Muzzonigro G, Castellucci M et al. Dead adipocytes, detected as crown-like structures, are prevalent in visceral fat depots of genetically obese mice. *Journal of Lipid Research* 2008; 49(7):1562–8. Verfügbar unter: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S002227520347271>.
110. Kim J-Y, van de Wall E, Laplante M, Azzara A, Trujillo ME, Hofmann SM et al. Obesity-associated improvements in metabolic profile through expansion of adipose tissue. *J Clin Invest* 2007; 117(9):2621–37. Verfügbar unter: <https://www.jci.org/articles/view/31021>.
111. Krysiak R, Handzlik-Orlik G, Okopien B. The role of adipokines in connective tissue diseases. *Eur J Nutr* 2012; 51(5):513–28. doi: 10.1007/s00394-012-0370-0.
112. Moschen AR, Gerner RR, Tilg H. Pre-B cell colony enhancing factor/NAMPT/visfatin in inflammation and obesity-related disorders. *Curr Pharm Des* 2010; 16(17):1913–20. doi: 10.2174/138161210791208947.
113. Carbone F, La Rocca C, Matarese G. Immunological functions of leptin and adiponectin. *Biochimie* 2012; 94(10):2082–8. Verfügbar unter: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0300908412002064>.
114. Kraus D, Winter J, Jepsen S, Jäger A, Meyer R, Deschner J. Interactions of adiponectin and lipopolysaccharide from *Porphyromonas gingivalis* on human oral epithelial cells. *PLoS One* 2012; 7(2):e30716. doi: 10.1371/journal.pone.0030716.
115. Nokhbehshaim M, Keser S, Nogueira AVB, Jäger A, Jepsen S, Cirelli JA et al. Leptin effects on the regenerative capacity of human periodontal cells. *Int J Endocrinol* 2014; 2014. doi: 10.1155/2014/180304.
116. Chang Y-H, Chang D-M, Lin K-C, Shin S-J, Lee Y-J. Visfatin in overweight/obesity, type 2 diabetes mellitus, insulin resistance, metabolic syndrome and cardiovascular diseases: a meta-analysis and systemic review. *Diabetes/Metabolism Research and Reviews* 2011; 27(6):515–27. doi: 10.1002/dmrr.1201.
117. Considine RV, Sinha MK, Heiman ML, Kriauciunas A, Stephens TW, Nyce MR et al. Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans. *N Engl J Med* 1996; 334(5):292–5. doi: 10.1056/NEJM199602013340503.

118. Weyer C, Funahashi T, Tanaka S, Hotta K, Matsuzawa Y, Pratley RE et al. Hypoadiponectinemia in obesity and type 2 diabetes: close association with insulin resistance and hyperinsulinemia. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86(5):1930–5. Verfügbar unter: <https://academic.oup.com/jcem/article/86/5/1930/2848024?login=true>.
119. Pradeep AR, Raghavendra NM, Prasad MVR, Kathariya R, Patel SP, Sharma A. Gingival crevicular fluid and serum visfatin concentration: their relationship in periodontal health and disease. *Journal of Periodontology* 2011; 82(9):1314–9. doi: 10.1902/jop.2011.100690.
120. Hirani T, Kumar S, Patel V, Hirani S, Mohammed I, Shishoo D. Expression of apelin among the individuals of chronic periodontitis, with and without type ii diabetes mellitus: A study using enzyme-linked immunosorbent assay. *Adv Hum Biol* 2020; 10(3):182. doi: 10.4103/AIHB.AIHB_84_20.
121. Johnson RB, Serio FG. Leptin within healthy and diseased human gingiva. *J Periodontol* 2001; 72(9):1254–7. doi: 10.1902/jop.2000.72.9.1254.
122. Karthikeyan BV, Pradeep AR. Gingival crevicular fluid and serum leptin: their relationship to periodontal health and disease. *J Clin Periodontol* 2007; 34(6):467–72. doi: 10.1111/j.1600-051X.2007.01078.x.
123. Kim S-J. Leptin potentiates *Prevotella intermedia* lipopolysaccharide-induced production of TNF- α in monocyte-derived macrophages. *J Periodontal Implant Sci* 2010; 40(3):119–24. doi: 10.5051/jpis.2010.40.3.119.
124. Iwayama T, Yanagita M, Mori K, Sawada K, Ozasa M, Kubota M et al. Adiponectin regulates functions of gingival fibroblasts and periodontal ligament cells. *Journal of Periodontal Research* 2012; 47(5):563–71. doi: 10.1111/j.1600-0765.2012.01467.x.
125. Tatemoto K, Hosoya M, Habata Y, Fujii R, Kakegawa T, Zou MX et al. Isolation and characterization of a novel endogenous peptide ligand for the human APJ receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 251(2):471–6. doi: 10.1006/bbrc.1998.9489.
126. O'Dowd BF, Heiber M, Chan A, Heng HH, Tsui L-C, Kennedy JL et al. A human gene that shows identity with the gene encoding the angiotensin receptor is located on chromosome 11. *Gene* 1993; 136(1-2):355–60. doi: 10.1016/0378-1119(93)90495-O.
127. Lee DK, Cheng R, Nguyen T, Fan T, Kariyawasam AP, Liu Y et al. Characterization of apelin, the ligand for the APJ receptor. *J Neurochem* 2000; 74(1):34–41. doi: 10.1046/j.1471-4159.2000.0740034.x.
128. Fan X, Zhou N, Zhang X, Mukhtar M, Lu Z, Fang J et al. Structural and functional study of the apelin-13 peptide, an endogenous ligand of the HIV-1 coreceptor, APJ. *Biochemistry* 2003; 42(34):10163–8. doi: 10.1021/bi030049s.
129. Castan-Laurell I, Dray C, Attané C, Duparc T, Knauf C, Valet P. Apelin, diabetes, and obesity. *Endocrine* 2011; 40(1):1–9. doi: 10.1007/s12020-011-9507-9.
130. Wattanachanya L, Lu W-D, Kundu RK, Wang L, Abbott MJ, O'Carroll D et al. Increased bone mass in mice lacking the adipokine apelin. *Endocrinology* 2013; 154(6):2069–80. doi: 10.1210/en.2012-2034.
131. Xie H, Tang S, Cui R, Huang J, Ren X, Yuan L et al. Apelin and its receptor are expressed in human osteoblasts. *Regulatory Peptides* 2006; 134(2-3):118–25. Verfügbar unter: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167011506000292>.

132. Xie H, Yuan L, Luo X, Huang J, Cui R, Guo L-J et al. Apelin suppresses apoptosis of human osteoblasts. *Apoptosis* 2007; 12(1):247–54. doi: 10.1007/s10495-006-0489-7.
133. Zhang B-H, Guo C-X, Wang H-X, Lu L-Q, Wang Y-J, Zhang L-K et al. Cardioprotective effects of adipokine apelin on myocardial infarction. *Heart Vessels* 2014; 29(5):679–89. doi: 10.1007/s00380-013-0425-z.
134. Visser YP de, Walther FJ, Laghmani EH, van der Laarse A, Wagenaar GTM. Apelin attenuates hyperoxic lung and heart injury in neonatal rats. *Am J Respir Crit Care Med* 2010; 182(10):1239–50. doi: 10.1164/rccm.200909-1361OC.
135. Japp AG, Cruden NL, Amer DAB, Li VKY, Goudie EB, Johnston NR et al. Vascular effects of apelin in vivo in man. *J Am Coll Cardiol* 2008; 52(11):908–13. doi: 10.1016/j.jacc.2008.06.013.
136. Boucher J, Masri B, Daviaud D, Gesta S, Guigné C, Mazzucotelli A et al. Apelin, a newly identified adipokine up-regulated by insulin and obesity. *Endocrinology* 2005; 146(4):1764–71. doi: 10.1210/en.2004-1427.
137. Dray C, Knauf C, Daviaud D, Waget A, Boucher J, Buléon M et al. Apelin stimulates glucose utilization in normal and obese insulin-resistant mice. *Cell Metab* 2008; 8(5):437–45. doi: 10.1016/j.cmet.2008.10.003.
138. Xu S, Han P, Huang M, Wu JC, Chang C, Tsao PS et al. In vivo, ex vivo, and in vitro studies on apelin's effect on myocardial glucose uptake. *Peptides* 2012; 37(2):320–6. Verfügbar unter: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0196978112003543>.
139. Dray C, Sakar Y, Vinel C, Daviaud D, Masri B, Garrigues L et al. The intestinal glucose-apelin cycle controls carbohydrate absorption in mice. *Gastroenterology* 2013; 144(4):771–80. Verfügbar unter: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0016508513000085>.
140. Yue P, Jin H, Aillaud M, Deng AC, Azuma J, Asagami T et al. Apelin is necessary for the maintenance of insulin sensitivity. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2010; 298(1):E59–67. doi: 10.1152/ajpendo.00385.2009.
141. Attané C, Foussal C, Le Gonidec S, Benani A, Daviaud D, Wanecq E et al. Apelin treatment increases complete Fatty Acid oxidation, mitochondrial oxidative capacity, and biogenesis in muscle of insulin-resistant mice. *Diabetes* 2012; 61(2):310–20. doi: 10.2337/db11-0100.
142. Sawane M, Kajiya K, Kidoya H, Takagi M, Muramatsu F, Takakura N. Apelin inhibits diet-induced obesity by enhancing lymphatic and blood vessel integrity. *Diabetes* 2013; 62(6):1970–80. Verfügbar unter: <https://diabetes.diabetesjournals.org/content/62/6/1970.short>.
143. Habchi M, Duvillard L, Cottet V, Brindisi M-C, Bouillet B, Beacco M et al. Circulating apelin is increased in patients with type 1 or type 2 diabetes and is associated with better glycaemic control. *Clinical Endocrinology* 2014; 81(5):696–701. doi: 10.1111/cen.12404.
144. Lee G, Song W-H, Kim S-J, Kim Y-G, Ryu J-H. Apelin-APJ axis inhibits TNF-alpha-mediated expression of genes involved in the inflammatory response in periodontal ligament cells. *Intern. J. Oral Biol.* 2019; 44(4):182–90. doi: 10.11620/IJOB.2019.44.4.182.
145. Sanz M, Herrera D, Kebschull M, Chapple I, Jepsen S, Beglundh T et al. Treatment of stage I-III periodontitis-The EFP S3 level clinical practice guideline. *J Clin Periodontol* 2020; 47 Suppl 22(Suppl 22):4–60. doi: 10.1111/jcpe.13290.
146. Holodniy M. Effects of Collection, Processing, and Storage on RNA Detection and Quantification. In: *Quantitative PCR Protocols* Humana Press 1999. S. 43–60.

147. Pfaffl MW. Real-time RT-PCR: Neue Ansätze zur exakten mRNA Quantifizierung. *BIOspektrum* 2001; 4(1):92–5.
148. Jepsen S, Suvan J, Deschner J. The association of periodontal diseases with metabolic syndrome and obesity. *Periodontol 2000* 2020; 83(1):125–53. doi: 10.1111/prd.12326.
149. Nogueira AVB, Nokhbehshaim M, Tekin S, Molon RS de, Spolidorio LC, Memmert S et al. Resistin Is Increased in Periodontal Cells and Tissues: In Vitro and In Vivo Studies. *Mediators of Inflammation* 2020; 2020:9817095. Verfügbar unter: <https://www.hindawi.com/journals/mi/2020/9817095/>.
150. Nogueira AVB, Nokhbehshaim M, Eick S, Bourauel C, Jäger A, Jepsen S et al. Regulation of visfatin by microbial and biomechanical signals in PDL cells. *Clin Oral Invest* 2014; 18(1):171–8. doi: 10.1007/s00784-013-0935-1.
151. Nokhbehshaim M, Keser S, Nogueira AVB, Cirelli JA, Jepsen S, Jäger A et al. Beneficial effects of adiponectin on periodontal ligament cells under normal and regenerative conditions. *J Diabetes Res* 2014; 2014. doi: 10.1155/2014/796565.
152. Damanaki A, Nokhbehshaim M, Eick S, Götz W, Winter J, Wahl G et al. Regulation of NAMPT in human gingival fibroblasts and biopsies. *Mediators of Inflammation* 2014; 2014:912821. Verfügbar unter: <https://www.hindawi.com/journals/mi/2014/912821/>.
153. Nokhbehshaim M, Eick S, Nogueira AVB, Hoffmann P, Herms S, Fröhlich H et al. Stimulation of MMP-1 and CCL2 by NAMPT in PDL cells. *Mediators of Inflammation* 2013; 2013:437123. Verfügbar unter: <https://www.hindawi.com/journals/mi/2013/437123/>.
154. Nogueira AVB, Nokhbehshaim M, Damanaki A, Eick S, Kirschneck C, Schröder A et al. Filifactor alocis and Tumor Necrosis Factor-Alpha Stimulate Synthesis of Visfatin by Human Macrophages. *International Journal of Molecular Sciences* 2021; 22(3):1235. Verfügbar unter: <https://www.mdpi.com/975596>.
155. Sarhat ER, Rmaid ZJ, Jabir TH. Changes of Salivary Interleukine-17, Apelin, Omentin and Vaspin Levels in Normal Subjects and Diabetic Patients with Chronic periodontitis. *ATMPH* 2020; 23(01):135–41. doi: 10.36295/ASRO.2020.23118.
156. Zhang H, Chen S, Zeng M, Lin D, Wang Y, Wen X et al. Apelin-13 Administration Protects Against LPS-Induced Acute Lung Injury by Inhibiting NF- κ B Pathway and NLRP3 Inflammasome Activation. *Cell Physiol Biochem* 2018; 49(5):1918–32. doi: 10.1159/000493653.
157. Zhu J, Dou S, Jiang Y, Bai B, Chen J, Wang C et al. Apelin-36 exerts the cytoprotective effect against MPP⁺-induced cytotoxicity in SH-SY5Y cells through PI3K/Akt/mTOR autophagy pathway. *Life Sci* 2019; 224:95–108. doi: 10.1016/j.lfs.2019.03.047.
158. Chen L, Tao Y, Jiang Y. Apelin activates the expression of inflammatory cytokines in microglial BV2 cells via PI-3K/Akt and MEK/Erk pathways. *Sci. China Life Sci.* 2015; 58(6):531–40. Verfügbar unter: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11427-015-4861-0>.
159. Li C, Cheng H, Adhikari BK, Wang S, Yang N, Liu W et al. The Role of Apelin-APJ System in Diabetes and Obesity. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2022; 13:820002. doi: 10.3389/fendo.2022.820002.
160. Dagamajalu S, Rex DAB, Philem PD, Rainey JK, Keshava Prasad TS. A network map of apelin-mediated signaling. *J. Cell Commun. Signal.* 2022; 16(1):137–43. Verfügbar unter: <https://link.springer.com/article/10.1007/s12079-021-00614-6>.

161. Moncada S, Gryglewski R, Bunting S, Vane JR. An enzyme isolated from arteries transforms prostaglandin endoperoxides to an unstable substance that inhibits platelet aggregation. *Nature* 1976; 263(5579):663–5. Verfügbar unter: <https://www.nature.com/articles/263663a0>.
162. Whittle BJ, Higgs GA, Eakins KE, Moncada S, Vane JR. Selective inhibition of prostaglandin production in inflammatory exudates and gastric mucosa. *Nature* 1980; 284(5753):271–3. Verfügbar unter: https://idp.nature.com/authorize/casa?redirect_uri=https://www.nature.com/articles/284271a0&casa_token=1vyv4blnctqaaaa:avewbc--s5m7ospd68mbxnpzlwz7vcbsi68tc92c0eui4ezgg2gttxl3ciuil83qdvjvf-uaned7lwk.
163. Davies P, Bailey PJ, Goldenberg MM, Ford-Hutchinson AW. The role of arachidonic acid oxygenation products in pain and inflammation. *Annu. Rev. Immunol.* 1984; 2(1):335–57. doi: 10.1146/annurev.iy.02.040184.002003.
164. LJ Crofford. COX-1 and COX-2 tissue expression: implications and predictions. *The Journal of Rheumatology* 1997; (49):15–9. Verfügbar unter: <https://europepmc.org/article/med/9249646>.
165. FERREIRA SH, Vane JR. Prostaglandins: their disappearance from and release into the circulation. *Nature* 1967; 216(5118):868–73. Verfügbar unter: https://idp.nature.com/authorize/casa?redirect_uri=https://www.nature.com/articles/216868a0&casa_token=xozsuwou80caaaaa:9h5xamundwpark3aqmspx_lokxke_lb-hgbh-prwwwkrrkg2qd-hg50qfvqnr56kaikrvm7zuwdife9n.
166. Ikeda K, Tanaka K, Katori M. Potentiation of bradykinin-induced vascular permeability increase by prostaglandin E2 and arachidonic acid in rabbit skin. *Prostaglandins* 1975; 10(6):747–58. doi: 10.1016/s0090-6980(75)80024-4.
167. Preshaw PM, Heasman PA. Prostaglandin E2 concentrations in gingival crevicular fluid: observations in untreated chronic periodontitis. *J Clin Periodontol* 2002; 29(1):15–20. Verfügbar unter: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1034/j.1600-051x.2002.290103.x?casa_token=oz1EfUKrKxEAAAAA%3AzYHaGVSZAW9AoWOZ3YowDa0dt_ycXWAvG-I16ohUE6RnnTsT3AtylfZ_rknn60SBzSei4Ptxc75Ax3Q.
168. Proff P, Reicheneder C, Faltermeier A, Kubein-Meesenburg D, Römer P. Effects of mechanical and bacterial stressors on cytokine and growth-factor expression in periodontal ligament cells. *J Orofac Orthop* 2014; 75(3):191–202. Verfügbar unter: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00056-014-0212-1>.
169. Signat B, Roques C, Poulet P, Duffaut D. *Fusobacterium nucleatum* in Periodontal Health and Disease. *Current Issues in Molecular Biology* 2011; 13(2):25–36. Verfügbar unter: <https://www.mdpi.com/1467-3045/13/2/00025>.
170. Rath-Deschner B, Memmert S, Damanaki A, Nokhbehshaim M, Eick S, Cirelli JA et al. CXCL1, CCL2, and CCL5 modulation by microbial and biomechanical signals in periodontal cells and tissues-in vitro and in vivo studies. *Clin Oral Invest* 2020; 24(10):3661–70. Verfügbar unter: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00784-020-03244-1>.
171. Buskermolen JK, Roffel S, Gibbs S. Stimulation of oral fibroblast chemokine receptors identifies CCR3 and CCR4 as potential wound healing targets. *Journal of Cellular Physiology* 2017; 232(11):2996–3005. doi: 10.1002/jcp.25946.
172. Hong KH, Ryu J, Han KH. Monocyte chemoattractant protein-1-induced angiogenesis is mediated by vascular endothelial growth factor-A. *Blood* 2005; 105(4):1405–7. doi: 10.1182/blood-2004-08-3178.

173. Ingman T, Tervahartiala T, Ding Y, Tschesche H, Haerian A, Kinane DF et al. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in gingival crevicular fluid and saliva of periodontitis patients. *J Clin Periodontol* 1996; 23(12):1127–32. doi: 10.1111/j.1600-051X.1996.tb01814.x.
174. Kiili M, Cox SW, Chen HY, Wahlgren J, Maisi P, Eley BM et al. Collagenase-2 (MMP-8) and collagenase-3 (MMP-13) in adult periodontitis: molecular forms and levels in gingival crevicular fluid and immunolocalisation in gingival tissue. *J Clin Periodontol* 2002; 29(3):224–32. doi: 10.1034/j.1600-051x.2002.290308.x.
175. Kornman KS, Page RC, Tonetti MS. The host response to the microbial challenge in periodontitis: assembling the players. *Periodontol* 2000 1997; 14:33–53. doi: 10.1111/j.1600-0757.1997.tb00191.x.
176. Ries C, Petrides PE. Cytokine regulation of matrix metalloproteinase activity and its regulatory dysfunction in disease. *Biol Chem Hoppe Seyler* 1995; 376(6):345–55.
177. Wu. Apelin plays a catabolic role on articular cartilage: In vivo and in vitro studies. *Int J Mol Med* 2010; 26(3):357–63. Verfügbar unter: https://www.spandidos-publications.com/10.3892/ijmm_00000473.
178. Noh MK, Jung M, Kim SH, Lee SR, Park KH, Kim DH et al. Assessment of IL-6, IL-8 and TNF- α levels in the gingival tissue of patients with periodontitis. *Exp Ther Med* 2013; 6(3):847–51. doi: 10.3892/etm.2013.1222.
179. Lim R, Barker G, Riley C, Lappas M. Apelin is decreased with human preterm and term labor and regulates prolabor mediators in human primary amnion cells. *Reprod. Sci.* 2013; 20(8):957–67. Verfügbar unter: <https://link.springer.com/article/10.1177/1933719112472741>.
180. Pan C-S, Teng X, Zhang J, Cai Y, Zhao J, Wu W et al. Apelin antagonizes myocardial impairment in sepsis. *Journal of Cardiac Failure* 2010; 16(7):609–17. doi: 10.1016/j.cardfail.2010.02.002.
181. Bickel M. The role of interleukin-8 in inflammation and mechanisms of regulation. *Journal of Periodontology* 1993; 64(5 Suppl):456–60.
182. Wajant H, Pfizenmaier K, Scheurich P. Tumor necrosis factor signaling. *Cell Death Differ* 2003; 10(1):45–65. Verfügbar unter: <https://www.nature.com/articles/4401189>.
183. Tessier PA, Naccache PH, Clark-Lewis I, Gladue RP, Neote KS, McColl SR. Chemokine networks in vivo: involvement of C-X-C and C-C chemokines in neutrophil extravasation in vivo in response to TNF- α . *J Immunol* 1997; 159(7):3595–602. Verfügbar unter: https://www.jimmunol.org/content/159/7/3595.short?casa_token=ovktsoq_ckyaaaaa:gh0-bragnvk2xmknzyozuq-yc57kwhzic0k8dvlbdfemzbuvd9krbwe8c-jflwntk0uquxe159rvr2a.
184. Lehmann W. Tumor necrosis factor alpha (TNF- α) coordinately regulates the expression of specific matrix metalloproteinases (MMPS) and angiogenic factors during fracture healing. *Bone* 2005; 36(2):300–10. Verfügbar unter: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S8756328204004247?casa_token=mpdnkggwzngaaaaa:ibg0ed5-8v_mnos7cravdauwjesrdv2oo4p1zqx3nv28sdgza57qqczjoaueeswmx12itldkdw.
185. Daviaud D, Boucher J, Gesta S, Dray C, Guigne C, Quilliot D et al. TNF α up-regulates apelin expression in human and mouse adipose tissue. *The FASEB Journal* 2006; 20(9):1528–30. doi: 10.1096/fj.05-5243fje.

186. Ji S, Shin JE, Kim YS, Oh J-E, Min B-M, Choi Y. Toll-like receptor 2 and NALP2 mediate induction of human beta-defensins by fusobacterium nucleatum in gingival epithelial cells. *Infection and Immunity* 2009; 77(3):1044–52. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19103770/>.
187. Morton RS, Dongari-Bagtzoglou AI. Cyclooxygenase-2 is upregulated in inflamed gingival tissues. *Journal of Periodontology* 2001; 72(4):461–9. doi: 10.1902/jop.2001.72.4.461.
188. Camilleri S, McDonald F. Runx2 and dental development. *Eur J Oral Sci* 2006; 114(5):361–73. doi: 10.1111/j.1600-0722.2006.00399.x.
189. Saito Y, Yoshizawa T, Takizawa F, Ikegame M, Ishibashi O, Okuda K et al. A cell line with characteristics of the periodontal ligament fibroblasts is negatively regulated for mineralization and Runx2/Cbfa1/Osf2 activity, part of which can be overcome by bone morphogenetic protein-2. *Journal of cell science* 2002; 115(Pt 21):4191–200. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12356921/>.
190. McCulloch CA, Melcher AH. Cell density and cell generation in the periodontal ligament of mice. *Am J Anat* 1983; 167(1):43–58. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6869309/>.
191. Roberts WE, Mozsary PG, Klingler E. Nuclear size as a cell-kinetic marker for osteoblast differentiation. *Am J Anat* 1982; 165(4):373–84. doi: 10.1002/aja.1001650403.
192. Gilbert L, He X, Farmer P, Rubin J, Drissi H, van Wijnen AJ et al. Expression of the osteoblast differentiation factor RUNX2 (Cbfa1/AML3/Pebp2alpha A) is inhibited by tumor necrosis factor-alpha. *Journal of Biological Chemistry* 2002; 277(4):2695–701. doi: 10.1074/jbc.m106339200.
193. Sodek J, Overall CM. Matrix metalloproteinases in periodontal tissue remodelling. *Matrix Suppl* 1992; 1:352–62.
194. Lv X, Kong J, Chen W-D, Wang Y-D. The Role of the Apelin/APJ System in the Regulation of Liver Disease. *Front Pharmacol* 2017; 8:221–8. doi: 10.3389/fphar.2017.00221.
195. Chang T-K, Wang Y-H, Kuo S-J, Wang S-W, Tsai C-H, Fong Y-C et al. Apelin enhances IL-1 β expression in human synovial fibroblasts by inhibiting miR-144-3p through the PI3K and ERK pathways. *Aging (Albany NY)* 2020; 12(10):9224–39. doi: 10.18632/aging.103195.
196. Han S, Englander EW, Gomez GA, Greeley GH. Apelin Regulates Nuclear Factor- κ B's Involvement in the Inflammatory Response of Pancreatitis. *Pancreas* 2017; 46(1):64–70. Verfügbar unter: https://journals.lww.com/pancreasjournal/fulltext/2017/01000/apelin_regulates_nuclear_factor__b_s_involvement.10.aspx?casa_token=dbf2h3kldw8aaaaa:woas33wx8cfpm7yy9f-v2du5z15kzbul7lnx7lg--vhqllzl8eau9ytqal_dyundt8uwqhquafn34gwbzjekl3ccbbovzi7p9_.
197. Yu X-H, Tang Z-B, Liu L-J, Qian H, Tang S-L, Zhang D-W et al. Apelin and its receptor APJ in cardiovascular diseases. *Clin Chim Acta* 2014; 428:1–8. doi: 10.1016/j.cca.2013.09.001.
198. Zijng V, van Leeuwen MBM, Degener JE, Abbas F, Thurnheer T, Gmür R et al. Oral biofilm architecture on natural teeth. *PLOS ONE* 2010; 5(2):e9321. Verfügbar unter: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0009321>.
199. Signat B, Roques C, Poulet P, Duffaut D. Fusobacterium nucleatum in Periodontal Health and Disease. *Current Issues in Molecular Biology* 2011; 13(2):25–36. Verfügbar unter: <https://www.mdpi.com/1467-3045/13/2/25>.
200. He J, Huang W, Pan Z, Cui H, Qi G, Zhou X et al. Quantitative analysis of microbiota in saliva, supragingival, and subgingival plaque of Chinese adults with chronic periodontitis. *Clin Oral Invest* 2012; 16(6):1579–88. Verfügbar unter: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00784-011-0654-4>.

201. DZINK JL, SHEENAN MT, Socransky SS. Proposal of Three Subspecies of *Fusobacterium nucleatum* Knorr 1922: *Fusobacterium nucleatum* subsp. *nucleatum* subsp. nov., comb. nov.; *Fusobacterium nucleatum* subsp. *polymorphum* subsp. nov., nom. rev., comb. nov.; and *Fusobacterium nucleatum* subsp. *vincentii* subsp. nov., nom. rev., comb. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* 1990; 40(1):74–8. Verfügbar unter: <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/10.1099/00207713-40-1-74>.
202. Chen T, Marsh PD, Al-Hebshi NN. SMDI: An Index for Measuring Subgingival Microbial Dysbiosis. *J Dent Res* 2022; 101(3):331–8. doi: 10.1177/00220345211035775.
203. Dabija-Wolter G, Cimpan M-R, Costea DE, Johannessen AC, Sørnes S, Neppelberg E et al. *Fusobacterium nucleatum* enters normal human oral fibroblasts in vitro. *Journal of Periodontology* 2009; 80(7):1174–83. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19563299/>.
204. Han YW, Shi W, Huang GT, Kinder Haake S, Park NH, Kuramitsu H et al. Interactions between periodontal bacteria and human oral epithelial cells: *Fusobacterium nucleatum* adheres to and invades epithelial cells. *Infection and Immunity* 2000; 68(6):3140–6. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10816455/>.
205. Bolstad AI, Jensen HB, Bakken V. Taxonomy, biology, and periodontal aspects of *Fusobacterium nucleatum*. *Clin Microbiol Rev* 1996; 9(1):55–71. doi: 10.1128/CMR.9.1.55.
206. Meng S. Prevalence of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in Chinese chronic periodontitis patients and periodontally healthy adults 2009; 40(1). Verfügbar unter: http://www.quintpub.com/userhome/qi/qi_40_1_meng_7.pdf.
207. Saito A, Inagaki S, Kimizuka R, Okuda K, Hosaka Y, Nakagawa T et al. *Fusobacterium nucleatum* enhances invasion of human gingival epithelial and aortic endothelial cells by *Porphyromonas gingivalis*. *FEMS immunology and medical microbiology* 2008; 54(3):349–55. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19049647/>.
208. Ma W-Y, Yu T-Y, Wei J-N, Hung C-S, Lin M-S, Liao Y-J et al. Plasma apelin: A novel biomarker for predicting diabetes. *Clinica Chimica Acta* 2014; 435:18–23. doi: 10.1016/j.cca.2014.03.030.
209. Li C, Li Z, Zhang Y, Fathy AH, Zhou M. The role of the Wnt/ β -catenin signaling pathway in the proliferation of gold nanoparticle-treated human periodontal ligament stem cells. *Stem Cell Res Ther* 2018; 9(1):214. Verfügbar unter: <https://stemcellres.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13287-018-0954-6>.
210. Suzuki T, Higgins PJ, Crawford DR. Control selection for RNA quantitation. *BioTechniques* 2000; 29(2):332–7. doi: 10.2144/00292rv02.
211. Jonge HJM de, Fehrmann RSN, Bont ESJM de, Hofstra RMW, Gerbens F, Kamps WA et al. Evidence based selection of housekeeping genes. *PLOS ONE* 2007; 2(9):e898. Verfügbar unter: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0000898>.
212. Vandesompele J, Preter K de, Pattyn F, Poppe B, van Roy N, Paepe A de et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* 2002; 3(7):1-12. Verfügbar unter: <https://genomebiology.biomedcentral.com/articles/10.1186/gb-2002-3-7-research0034>.
213. Liu X, Xie J, Liu Z, Gong Q, Tian R, Su G. Identification and validation of reference genes for quantitative RT-PCR analysis of retinal pigment epithelium cells under hypoxia and/or hyperglycemia. *Gene* 2016; 580(1):41–6. doi: 10.1016/j.gene.2016.01.001.

214. Setiawan M, Jäger A, Konermann A. The stability of different housekeeping genes in human periodontal ligament cells under inflammatory conditions. *Ann Anat* 2019; 224:81–7. doi: 10.1016/j.aanat.2019.04.001.
215. Thellin O, Zorzi W, Lakaye B, Borman B de, Coumans B, Hennen G et al. Housekeeping genes as internal standards: use and limits. *Journal of Biotechnology* 1999; 75(2-3):291–5. doi: 10.1016/s0168-1656(99)00163-7.
216. Koschack J. Standardabweichung und Standardfehler: der kleine, aber feine Unterschied. *Z Allg Med* 2008; 84(6):258–60. doi: 10.1055/s-2008-1073146.