

**Einfluss des Adiponektinsystems bei der Interaktion zwischen
Parodontitis und metabolischem Syndrom: eine *in vitro* Studie**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
Bonn

Stephanie Schröer
aus Dorsten
2015

Angefertigt mit Genehmigung
der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. med. dent. H. Stark

2. Gutachter: Prof. Dr. med. W. Götz

Tag der Mündlichen Prüfung: 04.03.2015

Aus der Poliklinik für Zahnärztliche Prothetik, Propädeutik und Werkstoffwissenschaften
Direktor: Professor Dr. med. dent. H. Stark

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	9
1. Einleitung.....	12
1.1 Parodontitis	12
1.1.1 Ursachen der Parodontitis	12
1.1.2 Parodontalpathogene Mikroorganismen	13
1.1.3 Pathogenese.....	15
1.1.4 Klassifikation	17
1.1.4.1 Chronische Parodontitis.....	18
1.1.4.2 Aggressive Parodontitis.....	19
1.2 Diabetes mellitus	19
1.2.1 Diabetes Typen.....	20
1.2.2 Wechselwirkungen zwischen Parodontitis und Diabetes	22
1.2.3 Pathomechanismen.....	23
1.3 Adiponektin und Adiponektinrezeptoren.....	25
1.4 Metabolisches Syndrom, Fettgewebe und Adiponektin	28
1.5 Ziel dieser Arbeit und Fragestellung.....	29
2. Material und Methoden	31
2.1 Zellbiologische, molekularbiologische und histologische Materialien	31
2.1.1 Zellkulturmedien und –zusätze.....	31
2.1.2 Kommerzielle Puffer, Lösungen und Chemikalien	31
2.1.3 Zusammensetzung von sonstigen Puffern und Lösungen.....	33
2.1.4 Verwendete Zelllinien	33
2.1.5 Zellkulturmedien	34
2.1.5.1 Zusammensetzung des Grundmediums für SW-872- bzw. 3T3-L1-Zellen	34
2.1.5.2 Zusammensetzung von Induktionsmedium.....	34
2.1.5.3 Zusammensetzung von Erhaltungsmedium.....	34
2.1.5.4 Zusammensetzung von Keratinozytenwachstumsmedium.....	35
2.1.6 Verwendete kommerzielle Systeme	35
2.1.7 Verwendete Oligostarternukleotide	36

2.1.8	Antikörper.....	37
2.1.8.1	Verwendete Primärantikörper.....	37
2.1.8.2	Verwendete Sekundärantikörper.....	38
2.1.9	Sonstige Verbrauchsmaterialien.....	38
2.1.10	Geräte.....	39
2.1.11	Verwendete Software.....	40
2.2	Gewinnung von humanen Proben.....	40
2.2.1	Auswahl und Gruppierung von Probanden.....	40
2.2.2	Gewinnung von Speichelproben.....	41
2.2.3	Gewinnung von humanen Gewebeproben.....	41
2.3	Zellbiologische Methoden.....	41
2.3.1	Kultivierung, Differenzierung und Stimulation von murinen Fibroblasten.....	42
2.3.1.1	Auftauen von murinen Fibroblasten.....	42
2.3.1.2	Passagieren und Zellzahlbestimmung von murinen Fibroblasten.....	42
2.3.1.3	Differenzierung von murinen Fibroblasten mittels des „7-Tage-Protokolls“.....	43
2.3.1.4	Stimulation differenzierter muriner Fibroblasten mit LPS oder IL-1 β	44
2.3.2	Kultivierung, Differenzierung und Stimulation von humanen Liposarkomzellen.....	45
2.3.3	Kultivierung und Stimulation von gingivalen Epithelzellen.....	46
2.3.3.1	Gewinnung von gingivalen Epithelzellen.....	46
2.3.3.2	Kultivierung von gingivalen Epithelzellen.....	46
2.3.3.3	Stimulation von gingivalen Epithelzellen mit LPS.....	47
2.3.4	Gewinnung von zu analysierenden Proben aus der Zellkultur.....	47
2.3.4.1	Gewinnung von Zellkulturüberständen.....	47
2.3.4.2	Gewinnung von Zellextrakten für die Proteinanalyse.....	47
2.3.4.3	Gewinnung von Zellextrakten für die Genexpressionsanalyse.....	48
2.4	Biologische Analyseverfahren.....	48
2.4.1	Genexpressionsanalyse.....	48
2.4.1.1	Isolation von Gesamtribonukleinsäuren.....	48
2.4.1.2	Synthese von komplementärer Desoxyribonukleinsäure.....	49
2.4.1.3	Quantitative Echtzeit-Polymerase-Ketten-Reaktion.....	51
2.4.2	Analyse von Nukleinsäurefragmenten via Gelelektrophorese nach PCR.....	53

2.4.3	Quantitative Proteinanalyse.....	53
2.4.3.1	Analyse von Adiponektin mittels ELISA	54
2.4.3.2	Analyse von humanem Adiponektin mittels Western Blot.....	55
2.4.4	Histologie	58
2.4.4.1	Fixierung, Konservierung und Schneiden von zu färbenden Proben	58
2.4.4.2	Immunhistochemische Färbungen von Gewebeproben <i>in vivo</i>	58
2.4.4.3	Immunfluoreszenz-Färbung an Zellen <i>in vitro</i>	60
2.4.4.4	Öl-Rot Färbung von Gewebeproben <i>in vivo</i>	61
2.4.5	Statistik	62
3.	Ergebnisse	63
3.1	Expression des Adiponektinsystems in humanen Gingivabiopsien und gingivalen Epithelzellen.....	63
3.1.1	Untersuchung an Gingiva-Schnitten <i>in vivo</i>	63
3.1.2	Untersuchung an gingivalen Epithelzellen <i>in vitro</i>	64
3.2	Adipogenese von murinen und human Zellen und Einfluss auf die Expression des Adiponektinsystems	65
3.2.1	Differenzierung von murinen Fibroblasten zu Adipozyten <i>in vitro</i>	65
3.2.2	Differenzierung von humanen SW-872-Zellen zu Adipozyten-ähnlichen Zellen <i>in vitro</i>	68
3.3	Expression des Adiponektinsystems in humanen und murinen Adipozyten-ähnlichen Zellen.....	70
3.3.1	Adipozyten-ähnliche murine Fibroblasten <i>in vitro</i>	70
3.3.2	Adipozyten-ähnliche humane SW-872-Zellen <i>in vitro</i>	71
3.3.3	Nachweis des Adiponektinsystems in humanen und murinen Proben mittels Gelelektrophorese	71
3.4	Auswirkung von Parodontitis auf die Adiponektinsekretion im Speichel.....	73
3.4.1	Klassifizierung parodontal-erkrankter und gesunder Probanden.....	73
3.4.2	Adiponektinstatus im Speichel parodontal erkrankter und gesunder Patienten.....	74
3.5	Auswirkung von Parodontitis auf die Expression des Adiponektinsystems in Gingiva-Biopsien <i>in vivo</i>	76

3.6	Auswirkung von Inflammation auf die Expression des Adiponektinsystems <i>in vitro</i>	78
3.6.1	Exemplarische Klassifizierung des Entzündungsstatus in GECs	78
3.6.2	Auswirkung von Inflammation auf das Adiponektinsystem in GECs	79
3.6.3	Auswirkung von Inflammation auf das Adiponektinsystem in differenzierten murinen Fibroblasten	80
3.6.4	Auswirkung von Inflammation auf das Adiponektinsystem in differenzierten humanen SW-872-Zellen.....	84
3.6.5	Auswirkung von Inflammation auf die Adiponektin-Proteinsynthese in differenzierten humanen SW-872-Zellen.....	88
4.	Diskussion.....	90
4.1	Nachweis des Adiponektinsystems in oralen Epithelzellen <i>ex vivo</i> und <i>in vitro</i>	91
4.2	Nachweis des Adiponektinsystems in differenzierten bzw. undifferenzierten murinen Fibroblasten	91
4.3	Auswirkung von Parodontitis auf die Adiponektinmenge im Speichel	94
4.4	Nachweis der Auswirkung von Inflammation auf das Adiponektinsystem	95
4.5	Nachweis der Auswirkung von Inflammation auf das Adiponektinsystem an GECs	98
4.6	Nachweis der Auswirkung von Inflammation auf das Adiponektinsystem an murinen Fibroblasten	98
4.7	Nachweis der Auswirkung von Inflammation auf das Adiponektinsystem an humanen SW-872-Zellen.....	100
4.8	Schlussfolgerung	101
5.	Zusammenfassung.....	103
6.	Literaturverzeichnis.....	105
7.	Danksagung	112

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µm	Mikrometer
µM	mikromolar
3T3-L1	murine Fibroblastenzelllinie
Abb.	Abbildung
AdipoR1/2	Adiponektinrezeptor1/2
AGEs	<i>Advanced Glycation Endproducts</i>
AMPK	AMP-aktivierte Proteinkinase
Aqua dest.	destilliertes Wasser
Arcp30	<i>Adiponectin complement-related protein</i> ; Adiponektin
BCL	<i>B-cell Lymphoma</i>
BMI	<i>Body Mass Index</i>
bp	Basenpaare
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>
C.r.	<i>Camphylobacter rectus</i>
C/EBP	<i>CCAAT-enhancer-binding protein</i>
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
cDNA	<i>complementary desoxyribonuklein acid</i>
cGMP	zyklisches Guaninmonophosphat
cm	Zentimeter
CO	Kohlenstoffmonoxid
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CRP	C-reaktives Protein
Ct	<i>Crossing treshold</i>
ctrl	Kontrolle
Cy3	Carbocyanin 3
d	Tag
DAB	Diaminobenzidin
DABCO	1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octan
DAPI	4', 6-Diamin-2-phenylindiol
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMS	Deutsche Mundgesundheitsstudie
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethyldiamintetraessigsäure
ELISA	<i>Enzyme linked immunosorbent assay</i>
ERO1-L α	<i>Endoplasmatic Reticulum Oxidoreductase1-like protein alpha</i>
et al.	und Mitarbeiter
F.n.	<i>Fusobacterium nucleatum</i>
Fe ²⁺	Eisen ²⁺
FKS	Fötales Kälberserum
gAd	globuläres Adiponektin

GECs	Gingivale Epithelzellen
h	Stunde
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HCL	Chlorwasserstoff
HMOX	Hämoxygenase
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>
IBMX	3-Isobutyl-1-methylxanthin
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IRF3	<i>Interferon regulatory factor 3</i>
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
KGM	<i>Keratinocyte Growth Medium</i>
Lsg.	Lösung
LTA	Lipoteichonsäure
m ²	Quadratmeter
mA	Milliampere
mg	Milligramm
min	Minute
miRNA	micro RNA
ml	Milliliter
Mm	Millimeter
mM	millimolar
MMP	Matrixmetalloproteinase
mRNA	<i>messenger RNA</i>
n.s.	nicht signifikant
NCS	<i>Newborn calf serum</i>
NF-κβ	<i>Nuclear factor κβ</i>
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
P.g.	<i>Porphyromonas gingivalis</i>
P.i.	<i>Prevotella intermedium</i>
P38-MAPK	p38-mitogenaktivierte Proteinkinase
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PGE	Prostaglandin
PMN	Polymorphkernige neutrophile Granulozyten
PPaR	Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor
PVDF	Polyvinylidenfluorid
qPCR	<i>Real-Time polymerase chain reaction</i>
RAGE	<i>Receptor for Advanced Glycation Endproducts</i>
RANKL	<i>Receptor Activator of NF-κβ Ligand</i>
RBP	<i>Retinol-binding protein</i>
RIPA	<i>Radioimmunoprecipitation assay</i>
RLT	Lysispuffer zur RNA-Extraktion
RNA	Ribonucleinsäure
rpm	<i>rounds per minute</i>
rRNA	ribosomale RNA
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i> (Natriumdodecylsulfat)

SIRT1	Sirtuin-1
SW-872	humane Liposarkomzelllinie
T.d.	<i>Treponema denticola</i>
T.f.	<i>Tanerella forsythia</i>
Tab.	Tabelle
TBS	<i>Tris buffered saline</i>
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TLR	<i>Toll-like Receptor</i>
TNF- α	Tumornekrosefaktor alpha
tRNA	transfer RNA
UV	ultraviolett
WHO	<i>World Health Organization</i>

1. Einleitung

1.1 Parodontitis

Bei der Parodontitis handelt es sich um eine bakteriell bedingte akute oder chronische Entzündung zunächst der Gingiva, die unbehandelt in eine Entzündung des kompletten Zahnhalteapparates - bestehend aus Zahnfleisch (Gingiva), Wurzelhaut (Desmodont), Wurzelzement sowie dem Alveolarknochen - übergehen kann und mit einem Verlust desselben einhergeht. Dieser entzündlich fortschreitende Prozess zeigt sich klinisch durch erhöhte Sondierungstiefen, Taschenblutung bei Sondierung, schließlich durch Zahnlockerung und in letzter Konsequenz durch den Verlust des betroffenen Zahnes.

1.1.1 Ursachen der Parodontitis

Ursächlich für die Entstehung einer Parodontalerkrankung sind harte und weiche Beläge wie Zahnstein, Konkremente und Plaque, die supra- und subgingival am Zahn haften, und in der Regel von zahlreichen Keimen besiedelt werden. Die in diesem Biofilm enthaltenen pathogenen Keime rufen eine entzündliche Reaktion im Parodont hervor, welche, wenn sie unbehandelt bleibt, fortschreitend zur Zerstörung des Zahnhalteapparates führen kann (Pihlstrom et al., 2005).

Zahnplaque ist ein strukturierter, zäher, dem Zahn anhaftender Biofilm, der aus Kolonien diverser Bakterienspezies, Speichelbestandteilen, bakteriellen Stoffwechselprodukten und Nahrungsresten zusammengesetzt ist. Durch die Organisation in diesem Biofilm sind die Mikroorganismen vor dem Einfluss exogener Einflüsse geschützt, denn die Plaque ist weder durch die Selbstreinigungskräfte der Mundhöhle, noch durch das Benutzen von Wasserspray, sondern lediglich mechanisch entfernbar. Auch die Wirtsabwehr und antimikrobielle Substanzen können die so geschützten Bakterien nur schwerlich erreichen.

Zwar ist das Vorhandensein von pathogenen Mikroorganismen eine notwendige Bedingung für die Entstehung einer Parodontitis, jedoch führt ihre Existenz aber nicht unbedingt bei allen Patienten zur Entstehung und Progression einer Parodontitis. Vielmehr ist die Pathogenese dieser Erkrankung ein multifaktorielles Geschehen, bei dem

verschiedene Risikofaktoren eine wichtige Rolle spielen. Hierzu zählen die genetisch determinierte Immunabwehr, systemische Erkrankungen, Gewohnheiten, wie beispielsweise Rauchen, Ernährung, Medikamenten-einnahme, das soziale Umfeld sowie letztlich sogar psychische Belastung und Stress (Pihlstrom et al., 2005). Diese Risikofaktoren regulieren bzw. beeinflussen die Abwehrreaktionen des Wirts gegen die pathogenen Mikroorganismen und dadurch auch das Ausmaß der Destruktion parodontaler Gewebe.

1.1.2 Parodontalpathogene Mikroorganismen

Von den mehreren hundert in der Mundhöhle vorkommenden Bakterien, sind etwa ein Dutzend mit der Parodontitis unterschiedlich eng assoziiert (Socransky et al., 1998).

Als Antwort auf supragingivale Plaque entsteht frühzeitig sowohl durch Vertiefung des *sulcus gingivae*, als auch durch eine ödematöse Schwellung der Gingiva, ein subgingivaler Bereich, in dem sich leicht subgingivale Plaque an der Zahnoberfläche bilden kann. Für die Kolonisierung bietet der subgingivale Bereich vielen Bakterien sehr günstige Bedingungen, wie zum Beispiel Schutz vor Mundhygienemaßnahmen. Die Mikroorganismen, die diesen Raum kolonialisieren, sind mit wenigen Ausnahmen gram-negative, obligat anaerobe Bakterien (Page et al., 1997). Wie Socransky und Mitarbeiter beschrieben haben, sind die Bakterien, die sich im Subgingivalraum ansiedeln, in verschiedenen Komplexen organisiert (Socransky et al., 1998). Sowohl der räumliche als auch zeitliche Ablauf der Kolonisierung auf der Zahnoberfläche sind in Abbildung 1 dargestellt. Dabei sind die Erstbesiedler des Subgingivalraumes Streptokokken (gelber Komplex), woraufhin Aktinomyzeten und Veilonellen (lila Komplex) folgen. Im orangefarbenen und blauen Komplex folgen dann die sogenannten „Brückenkeime“, die als Verbindung zwischen frühen und späten Besiedlern eine wichtige Rolle spielen (Kolenbrander et al., 1993). Hierzu zählen vor allem *Fusobacterium nucleatum* (F.n.), *Prevotella intermedium* (P.i.) und *Campylobacter rectus* (C.r.). Der rote Komplex zeigt schließlich die Spätbesiedler. Dies sind diejenigen Parodontalpathogene, welche eng mit destruktiver Parodontitis assoziiert sind, insbesondere *Porphyromonas gingivalis* (P.g.), *Tannerella forsythia* (T.f.) und *Treponema denticola* (T.d.). Daneben gibt es einen grünen Komplex, zu dem *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (A.a.) gehört.

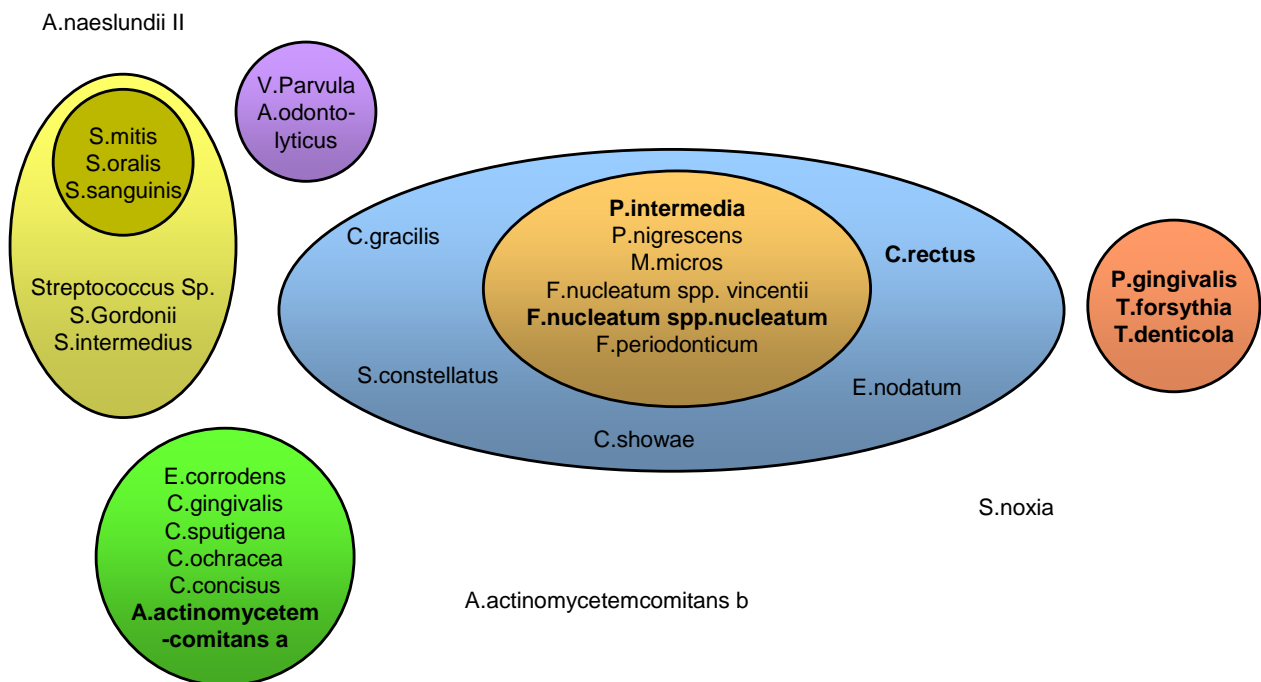


Abb. 1: Schematische Darstellung der Organisation von oralen Mikroorganismen bei der Entstehung von Parodontitis. Nähere Erläuterungen im Text (geändert nach Müller 2006, S.28, nach Socransky et al., 1998).

Entscheidend für die destruktive Potenz der Bakterien ist einerseits ihre Menge im Vergleich zur Gesamtfloora der Mundhöhle, und andererseits ihre Virulenzfaktoren. Um Parodontitis auslösen zu können, müssen sich die Keime beispielsweise nah am Wirtsgewebe etablieren und verhindern, dass Speichel oder Exsudat sie wegspült. Sie müssen passendes Substrat finden, der Abwehr von Wirt und Konkurrenten widerstehen und zur parodontalen Gewebsdestruktion fähig sein (Holt et al., 2005).

So produzieren alle Pathogene des roten Komplexes verschiedenste Proteasentypen, die sie zur Gewebedestruktion befähigen (Holt et al., 2005). *Porphyromonas gingivalis* setzt neben Endotoxinen auch Gingipaine frei, Trypsin-ähnliche Cysteinproteasen, die es dem Keim ermöglichen, sich der wirtseigenen Immunabwehr zu entziehen, indem vom Wirt abgesonderte Zytokine zersetzt werden (Imamura et al., 2003; Stathopoulou et al., 2010). *A.a.* hingegen synthetisiert Leukotoxin, das leukozytenspezifisch toxisch wirkt (Henderson et al., 2003). Es ist eines der potentesten Toxine und kann wichtige Komponenten des menschlichen Abwehrsystems, wie polymorphkernige neutrophile Granulozyten (PMNs), Immunglobuline (Ig) und Komplementaktivierung, direkt ausschalten (Kachlany et al., 2010). Dabei wirkt es bei Granulozyten, Lymphozyten sowie monozytären Zellen des

Wirtes permeabilisierend, wodurch die Immunzellen in die Apoptose getrieben werden (Henderson et al., 2003).

Wie bereits erwähnt sind aber Bakterien allein nicht in der Lage eine destruktive Parodontitis auszulösen, vielmehr hängt die Entstehung einer parodontalen Infektion von verschiedenen Faktoren ab, denn in der Regel werden die oralen Mikroorganismen vom Immunsystem des Wirts in Wachstum und Angriffspotenzial kontrolliert. So spielen diesbezüglich die Anfälligkeit des Wirts, die Abwesenheit nützlicher Mikroorganismen und eine förderliche Ökologie in der Zahnfleischtasche eine ebenso wichtige Rolle, wie die Anwesenheit von Parodontalpathogenen (Pihlstrom et al., 2005).

1.1.3 Pathogenese

Die Entstehung einer Gingivitis und nachfolgend einer chronischen Parodontitis wird in verschiedene Stadien, nämlich die (1) initiale-, (2) frühe-, (3) etablierte- und (4) fortgeschrittene Läsion (Parodontitis), unterteilt, die sich immunpathologisch deutlich voneinander unterscheiden (Smith et al., 2010).

So ist die initiale Läsion ein Zustand, der sich innerhalb von vier Tagen bei ungestörter Plaque-Akkumulation einstellt und vollständig reversibel ist. Die in der Plaque niedergelassenen Mikroorganismen setzen bereits erwähnte bakterielle Enzyme, aber auch Stoffwechselprodukte wie Butyrat, Propionat und das chemotaktische Lipopolysaccharid frei. Dies stimuliert gingivale Epithelzellen zur Produktion und Sezernierung von Entzündungsmediatoren wie den Zytokinen Tumornekrosefaktor alpha (TNF- α), Interleukin-1 beta (IL-1 β), den Bindegewebe-destruierenden Matrixmetalloproteinasen (MMPs), Prostaglandin E2 (PGE2) und dem Chemokin Interleukin-8 (IL-8) (Taylor, 2010). Chemotaktisch, vor allem von IL-8 rekrutiert, wandern zahlreiche PMNs in und durch das Saumepithel bis in den Sulkus, um dort einen Abwehrwall zwischen Plaque und parodontalem Gewebe gegen die Plaquebakterien zu bilden. Dies hat zur Folge, dass der Verbund der Saumepithelzellen eine Auflockerung erfährt, und Bakterien sowie deren Produkte nun auch ins subepitheliale Bindegewebe vordringen können (Smith et al., 2010). Die Aufgabe der PMNs besteht vor allem darin, pathogene Mikroorganismen zu phagozytieren, und sie so daran zu hindern, ins Bindegewebe zu gelangen. Bei Funktionsdefekten der PMNs, wie sie bei systemischen Erkrankungen auftreten können,

kommt es daher zur erhöhten Schweregraden parodontaler Erkrankungen (Nussbaum et al., 2011).

Bei weiterer unbeeinflusster Akkumulation bakterieller Plaque über vier bis sieben Tage, also einem weiteren Bestehen des mikrobiellen Angriffs, entsteht die frühe Läsion, die Ausdruck des Aufbaus einer kompetenten Immunreaktion gegen Plaqueantigene ist (Smith et al., 2010). Sie ist histologisch durch eine erhöhte Anzahl an hauptsächlich Lymphozyten und Makrophagen und der Entwicklung eines perivaskulären entzündlichen Infiltrats, vornehmlich aus T-Lymphozyten, gekennzeichnet (Smith et al., 2010). Aktivierte Makrophagen sezernieren die pro-inflammatorischen Zytokine und Chemokine IL-1 β , IL-6, IL-10, TNF- α , IL-8, PGE2 und Gewebeskollagenasen (Kornman et al., 1997). Die frühe Läsion kann schließlich in eine etablierte Läsion übergehen, bei der es zur Ausbildung einer gingivalen Tasche kommt, da der Epithelansatz am Zahn von der wachsenden Plaque teilweise verdrängt wird. Dominiert wird dieser Zustand von B-Zellen, die zu Antikörper-produzierenden Plasmazellen differenzieren. Auch diese sind in der Lage Immunglobuline (Ig) und Zytokine zu sezernieren. Weiter produzieren aktivierte PMNs und Fibroblasten MMPs, die zur Auflösung von Gewebestrukturen und zur parodontalen Destruktion beitragen (s. Abb. 2). Es kommt zu einer fast vollständigen Auflösung des gingivalen Stützgewebes, während das Saumepithel nach apikal und lateral proliferiert. Die etablierte Läsion kann so über Jahre hinweg bestehen, ohne sich zur Parodontitis (fortgeschrittene Läsion) zu entwickeln, und bei optimaler Mundhygiene scheint dieser Zustand noch vollständig reversibel zu sein (Hellwig 2006, 457-461; Rateitschak 2004, 57-59).

Kommt es letztendlich zur fortgeschrittenen Läsion, einer Parodontitis, so zeigt sich neben den beschriebenen Vorgängen der etablierten Läsion, dass sich der Defekt nun auch auf den Alveolarknochen ausdehnt, nachdem Osteoklasten, induziert durch von aktivierten Fibroblasten sezernierten Zytokinen wie IL-1 β und PGE2, den Knochenabbau eingeleitet haben (Kornman et al., 1997). Die Läsion dehnt sich nun von einer gingivalen Tasche zu einer parodontalen Tasche aus (Page et al., 1997), es kommt zur apikalen Verschiebung des Saumepithels, zu Knochenresorption und Attachmentverlust. Allein durch Mundhygienemaßnahmen kann es jetzt nicht wieder zu einer *restitutio ad integrum* kommen, dieses Stadium ist also nicht reversibel.

Die Pathogenese der chronischen Parodontitis ist letztendlich dadurch gekennzeichnet, dass die körpereigene Abwehr beim Versuch, die parodontale Infektion zu kontrollieren, durch unterschiedliche Abwehrstrategien gegen pathogene Mikroorganismen und deren Stoffwechselprodukte, selbst in hohem Maße an der parodontalen Destruktion beteiligt ist.

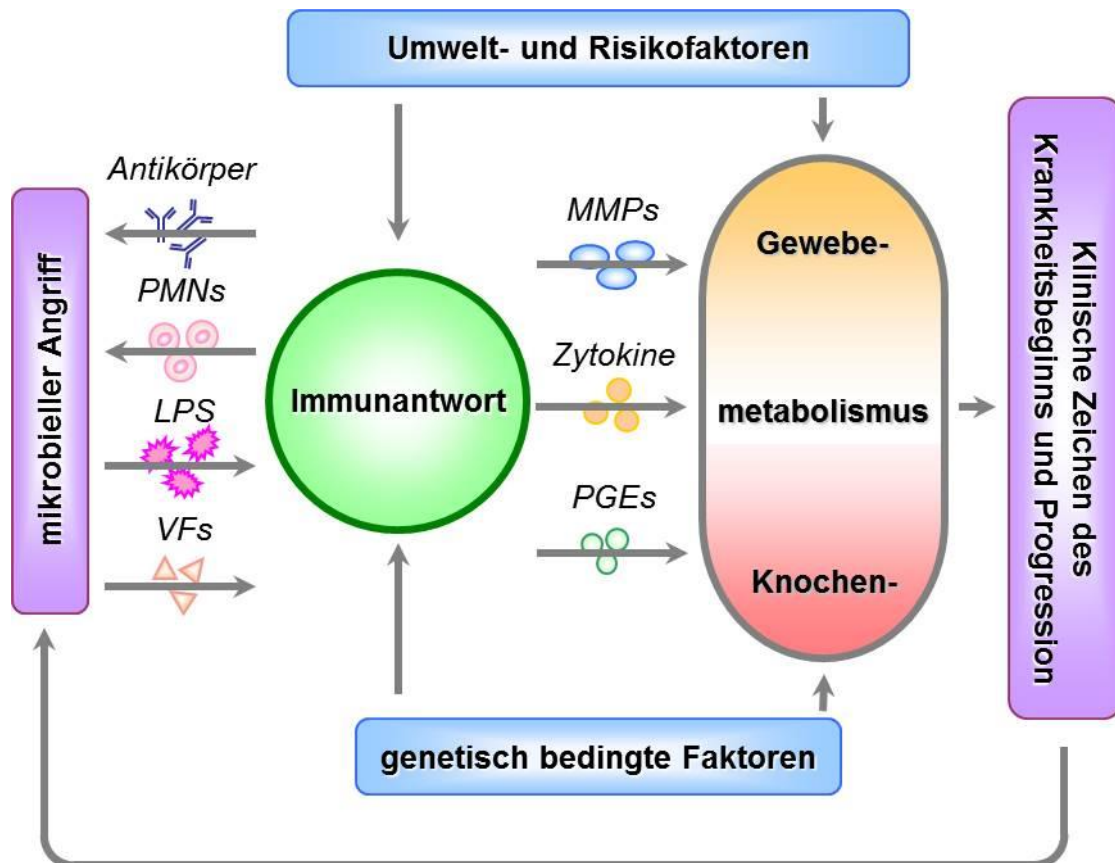


Abb. 2: Schematische Darstellung der Pathogenese der Parodontitis

Nähere Erläuterungen im Text. (PMNs: polymorphkernige neutrophile Granulozyten; LPS: Lipopolysaccharide; MMPs: Matrixmetallo-proteinase; PGEs: Prostaglandine; VFs: Virulenzfaktoren (geändert nach Page und Kornman, 1997).

1.1.4 Klassifikation

Im Jahr 1999 erstellte der „*International Workshop for a Classification of Periodontal Diseases and Conditions*“ eine neue Klassifikation der Parodontalerkrankungen (Armitage, 1999), die im Folgend aufgelistet wird:

1. Gingivopathien
2. Chronische Parodontitis
3. Aggressive Parodontitis
4. Parodontitis als Manifestation systemischer Erkrankungen
5. Nekrotisierende Parodontalerkrankungen
6. Abszesse des Parodonts
7. Parodontitis im Zusammenhang mit endodontalen Läsionen
8. Entwicklungsbedingte oder erworbene Deformitäten und Zustände

In dieser Klassifikation sollten die Schwachstellen, die die alte Klassifikation aus dem Jahre 1989 aufwies behoben und verbessert werden. So beinhaltete diese zum Beispiel keine gingivalen Erkrankungen. Da auch die Klassifizierungen der „*adult*“ und „*early onset*“ Parodontitis sehr ungenau waren, wurden sie durch die chronische und aggressive Parodontitis ersetzt (Armitage, 1999).

1.1.4.1 Chronische Parodontitis

Die chronische Form der Parodontitis ist auch die häufigste. So besagt die Vierte Deutsche Mundgesundheitsstudie (DMS IV) aus dem Jahre 2006, dass unter den Erwachsenen 52,7 % unter einer mittelschweren und 20,5 % unter einer schweren Form der Parodontitis leiden. Bei den Senioren sind 48,0 % von einer mittelschweren und sogar 39,8 % von der schweren Form der Erkrankung betroffen. (DMS IV, 2006)

Sie tritt meistens zwischen dem 30. und 40. Lebensjahr auf und entwickelt sich allmählich aus einer plaque-induzierten Gingivitis. Es handelt sich dabei um eine infektiöse Erkrankung mit progressivem Attachmentverlust und Verlust des Alveolarknochens, der oft schubweise bei langsamem bis mäßigem Voranschreiten zu beobachten ist. Das Ausmaß der Destruktion parodontaler Gewebe steht in direktem Verhältnis zur Menge der subgingivalen Biofilme und den damit assoziierten Mikroorganismen. Die chronische Parodontitis wird gemessen an ihrem Schweregrad, eingeteilt in die (1) lokalisierte- und die (2) generalisierte Form, wobei die lokalisierte Form weniger als 30 % betroffene Zahnflächen aufweist, die chronische hingegen über 30 % (Wiebe et al., 2000).

Die Pathogenese der chronischen Parodontitis ist weitaus besser bekannt, als die der aggressiven Form (Smith et al., 2010). Ihr stadienhafter Verlauf wurde in Kapitel 1.1.3. dargestellt.

1.1.4.2 Aggressive Parodontitis

Die aggressive Parodontitis ist eine spezielle Form der Parodontitis mit deutlichen klinischen Merkmalen, die sie von der chronischen Form abgrenzen.

Die Hauptmerkmale der aggressiven Parodontitis sind ein klinisch gesunder Patient - abgesehen vom Auftreten der Parodontitis - rascher Attachmentverlust und Gewebestruktion sowie familiäre Häufung. Eine Gingivitis oder andere Anzeichen gingivaler Entzündung sind hier nicht, zumindest nicht im Anfangsstadium, zu beobachten (Smith et al., 2010).

Weitere Merkmale, die aber nicht zwingend zu beobachten sein müssen, sind zum einen die Diskrepanz zwischen der Menge an vorhandener Plaque und dem Schweregrad der Gewebsschädigung, zum anderen vermehrtes Vorkommen von *A.a* und in manchen Populationen *P.g.* in der subgingivalen Flora. Außerdem können bei der aggressiven Form ein hyperreaktiver Makrophagentyp mit erhöhter PGE₂- und IL-1 β -Produktion und abnorme Phagozytenfunktionen vorkommen (Lang et al., 1999).

Wie bei der chronischen Parodontitis unterscheidet man auch bei der aggressiven Form (1) ein lokalisiertes- und ein (2) generalisiertes Auftreten. Die lokalisierte Form beginnt etwa während der Pubertät und weist neben Befall des ersten Molaren und der Inzisiven, erhöhte Serumantikörpertiter gegen die auslösenden Pathogene auf. Die generalisierte Form ist gekennzeichnet durch Beginn meist vor dem 30. Lebensjahr, durch phasenweises Voranschreiten der Erkrankung sowie durch generalisierten approximalen Attachmentverlust, wobei mindestens drei Zähne außer den ersten Molaren oder Schneidezähnen betroffen sind. Ein erhöhter Antikörpertiter tritt hier nicht auf (Lang et al., 1999).

1.2 Diabetes mellitus

Der Begriff Diabetes mellitus beschreibt eine Gruppe von Stoffwechselkrankheiten, die unterschiedlicher Ätiologie sein können. Charakterisiert werden sie durch einen

gemeinsamen Leitbefund: der chronischen Hyperglykämie mit Störungen des Kohlenhydrat-, Fett- und Proteinstoffwechsels, die aus einer Fehlfunktion des endogenen Insulins, dem Hauptregelungshormon des Zuckerstoffwechsels, resultieren. Gründe hierfür können absoluter Insulinmangel, relativer Insulinmangel oder eine Kombination aus beiden sein (Kerner et al., 2011).

Bei einer Hyperglykämie kommt es zu einer verstärkten Glykierung von Proteinen, also auch des Hämoglobins. Der Anteil des glykierten Hämoglobins am Gesamthämoglobin (HbA1c-Wert) erlaubt eine Aussage über die glykämische Stoffwechseleinstellung des Patienten während der vorausgegangenen zwei bis drei Monate. Die Auswirkungen einer unbehandelten Erkrankung an Diabetes mellitus beinhalten Langzeitschädigung und Dysfunktion von Organen sowie letztendlich ihr komplettes Versagen (American Diabetes Association, 1998). Die Krankheit präsentiert sich durch charakteristische Symptome wie Polydypsie, Polyurie, verschwommenes Sehen und Gewichtsverlust. In schweren Fällen kann Diabetes zur Ketoazidose, zu diabetischem Koma oder zum Tod führen. Patienten mit Diabetes mellitus tragen ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung von Folgeerkrankungen wie beispielsweise Mikro- und Makroangiopathien, Retinopathien und Neuropathien (American Diabetes Association, 1998; WHO 1999).

1.2.1 Diabetes Typen

Seit dem Jahr 1999 werden Diabetes mellitus Erkrankungen auf Grundlage eines Berichtes der WHO in vier Gruppen eingeteilt, von denen hier allerdings nur auf die zwei häufigsten eingegangen wird.

Diabetes Typ 1, früher auch juveniler Diabetes genannt, ist eine Autoimmunerkrankung, die auf eine Destruktion der Insulin-produzierenden β -Zellen des Pankreas zurückzuführen ist, welche zu einem zunehmenden Insulinmangel (absoluter Insulinmangel) führt. Insulin senkt die Glukosekonzentration im Blut, unter anderem durch Verringerung der Glukoneogenese in der Leber sowie durch erhöhte Glukoseaufnahme in die Skelettmuskulatur und ins Fettgewebe.

Ein absoluter Insulinmangel bewirkt, dass die insulinabhängige Aufnahme von Glukose in Gewebe und Zellen nicht mehr stattfinden kann, sie sich somit im Blut ansammelt und den Zellen nicht als Energielieferant zur Verfügung steht. Hierdurch wird die Leber zur

Glukoneogenese angeregt, es wird neugebildete Glukose ins Blut abgegeben, der Blutzuckerspiegel steigt. Durch Freisetzung von Fettsäuren aus den Körperfettdepots, die zu Ketonkörpern umgewandelt werden, kann es im schlimmsten Fall zur lebensgefährlichen Ketoazidose kommen. Nach Überschreiten der Nierenschwelle wird Glukose mit dem Urin ausgeschieden, was über vermehrte Diurese möglich ist. Polyurie und Polydypsie sind die Folge.

Neben der autoimmunen Form des Typ 1 Diabetes, gibt es auch die ideopathische Form: die Ätiologie der Erkrankung ist also unbekannt, Anzeichen einer Autoimmunerkrankung liegen hier nicht vor. Die ideopathische Form ist allerdings eher unter Menschen afrikanischen und asiatischen Ursprungs verbreitet. Die Therapie eines Diabetes Typ 1 sieht eine lebenslange Substitution des fehlenden körpereigenen Insulins durch entsprechende Insulinpräparate vor. Eine Heilung gibt es bislang nicht (Böhm et al., 2011; WHO 1999;).

Diabetes Typ 2 ist mit einem Anteil an 90 % der an Diabetes Erkrankten in Deutschland die deutlich häufigere Form (Hauner et al., 2010). Beim Diabetes Typ 2 liegt die Ursache, anders als beim Typ 1, in einem relativen Insulinmangel. Das heißt, es wird ausreichend Insulin in den β -Zellen des Pankreas produziert, dieses kann aber aufgrund einer Insulinresistenz an seinen Zielzellen nicht richtig wirken. Die Bauchspeicheldrüse versucht dies mit einer vermehrten Insulinproduktion zu kompensieren, die langfristig allerdings nicht aufrechterhalten werden kann. Folglich steigt der Blutzuckerspiegel.

Typ 2-Diabetiker sind meist im mittleren oder höheren Erwachsenenalter und oft übergewichtig, was neben angeborener Insulinresistenz zu den Hauptursachen zählt. Durch Gewichtsreduktion und Bewegung können an Diabetes Typ 2- Erkrankte die Insulinresistenz verringern. Mit Gewichtsabnahme sinkt auch der Blutzuckerspiegel. Zusätzlich stehen zur Therapie orale Antidiabetika wie Biguanide, zur Hemmung der Glukoneogenese und Steigerung der Glukoseaufnahme in Muskelzellen, sowie Sulfonylharnstoffe zur Steigerung der Insulinproduktion bei noch erhaltener β -Zell-Restfunktion, zur Verfügung (Matthaei et al., 2011).

Neben diesen beiden Typen gibt es außerdem den Schwangerschaftsdiabetes sowie andere spezifische Diabetes-Typen, unter anderem Erkrankungen des exokrinen

Pankreas, medikamentös-chemisch induzierte oder andere genetische Defekte (Kerner et al., 2011), auf die hier aber nicht genauer eingegangen werden soll.

1.2.2 Wechselwirkungen zwischen Parodontitis und Diabetes

Die Mechanismen, welche die beiden Zustände Diabetes und Parodontitis miteinander verbinden sind zwar bislang nicht gänzlich geklärt, es ist allerdings bekannt, dass eine wechselseitige Beziehung zwischen beiden Erkrankungen besteht, in der Diabetes das Risiko an Parodontitis zu erkranken erhöht und inflammatorische Prozesse im Parodont den Blutzuckerspiegel negativ beeinflussen (Preshaw et al., 2012).

Studien bestätigen Diabetes als Risikofaktor für die Entstehung von Parodontitis. Dabei ist das Risiko einer Parodontitiserkrankung eines an Diabetes Erkrankten dreimal höher als das eines Gesunden (Mealey et al., 2008).

Die Mehrheit der Untersuchungen, die sich mit diesem Thema befassten, bezieht sich auf Diabetes Typ 2, wahrscheinlich weil sich dieser Typ zwischen dem 40. und 50. Lebensjahr manifestiert, ähnlich wie Parodontalerkrankungen in den meisten Fällen. Nicht zuletzt diese temporäre Übereinstimmung deutet auf einen Zusammenhang beider Krankheitsbilder hin. Nichtsdestotrotz erhöht auch Diabetes Typ 1 das Risiko für Parodontitis. Eine Studie aus dem Jahr 1982 zeigte, dass etwa 10 % der untersuchten Kinder und Jugendlichen unter 18 Jahren mit Diabetes Mellitus Typ 1 einen erhöhten Attachment- und Knochenverlust im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe aufwiesen, obwohl in beiden Gruppen etwa die gleiche Menge an Zahnbelägen zu finden war (Cianciola et al., 1982).

Diabetes kann sich außerdem im Sinne von Begleit- oder Folgekrankheiten wie Xerostomie oder Candida Infektionen auf die orale Gesundheit auswirken. In den frühen 90er Jahren wurde Parodontitis manchmal auch "*the sixth complication of diabetes*", also die sechste Komplikation von Diabetes genannt (Loe et al., 1993).

Nicht nur ist Diabetes ein Risikofaktor für Parodontitis, Parodontitis kann sich umgekehrt auch negativ auf den Blutzuckerspiegel auswirken. Verschiedene Studien zeigen, dass die Prävalenz und der Schweregrad der Folgeerscheinungen von Diabetes wie Retinopathie, Neuropathie, Proteinurie und kardiovaskuläre Komplikationen, mit dem

Ausprägungsgrad der Parodontitis korrelieren (Moore et al., 1999; Thorstensson et al., 1996).

Demmer und Mitarbeiter zeigten außerdem die Bedeutung von Parodontitis auf Änderungen des HbA1c-Wertes an 2973 Nicht-Diabetes-Erkrankten. Über fünf Jahre hinweg konnte gezeigt werden, dass diejenigen, die bereits zu Beginn der Untersuchung an fortgeschrittener Parodontitis litten, einen in etwa fünfmal größeren absoluten Anstieg ihres HbA1c-Wertes aufwiesen als diejenigen Teilnehmer, die am Anfang keine Parodontitis hatten. Dies war die erste Studie, die nachweisen konnte, dass Parodontitis in Zusammenhang mit der Entwicklung des HbA1c-Wertes bei gesunden Personen steht, und es wird weiterhin beobachtet, ob die beschriebenen Änderungen des HbA1c nach zehn Jahren ein erhöhtes Risiko für das Auftreten von Diabetes bedeuten (Demmer et al., 2010).

1.2.3 Pathomechanismen

Bei Parodontitis handelt es sich um eine komplexe, chronisch entzündliche Erkrankung, in der, wie bereits oben ausführlich beschrieben, die inflammatorische Reaktion des parodontalen Stützgewebes bzw. seines Abwehrsystems durch andauernde Präsenz von dentalem Biofilm (Plaque) hervorgerufen wird. Diese Reaktion umfasst unter anderem die vermehrte Sekretion von Mediatoren, die pro-inflammatorisch und Bindegewebedestruierend wirken. Zu nennen wären hier vor allem IL-1 β , IL-6, PGE₂, TNF- α , RANKL (*Receptor Activator of NF- κ B Ligand*) und MMPs (Preshaw et al., 2012).

Gelangen diese Entzündungsmediatoren aus dem Parodontalgewebe in die systemische Zirkulation, so entsteht ein chronischer subklinischer Entzündungszustand, bei dem die Entzündungsmediatoren die Wirkung des Insulins beeinflussen können, nämlich zu einer Insulinresistenz führen können, indem sie unter anderem die Aktivierung des Insulinrezeptors hemmen (Jepsen et al., 2011). Die systemische Inflammation, die mit einer Parodontitiserkrankung einhergeht, könnte also einen bestehenden Diabetes mellitus verstärken (Preshaw et al., 2012).

Diabetes jedenfalls erhöht die Inflammation in parodontalen Geweben. So ist zum Beispiel im Sulkusfluid die Konzentration von PGE₂ und IL-1 β bei Patienten mit Typ 1 Diabetes mit Gingivitis oder Parodontitis im Vergleich zu Gesunden mit einer Parodontalerkrankung

gleichen Schweregrades erhöht. Kommen monozytäre Zellen, wie beispielsweise Makrophagen, von Diabetes Typ 1 Patienten mit LPS in Kontakt, so werden sie dazu angeregt, deutlich größere Mengen an TNF- α , IL-1 β und PGE2 zu produzieren, als Makrophagen von Nicht-Diabetikern (Preshaw et al., 2012).

Weiterhin haben verschiedene Studien übereinstimmend Defizite in der Aktivität von PMNs, einschließlich verminderter Chemotaxis und Phagozytosefähigkeit, bei Patienten mit Diabetes beobachten können, wodurch die Abwehrfunktion der PMNs gegenüber pathogenen Mikroorganismen erheblich eingeschränkt ist, was den Schweregrad einer Parodontitis erhöhen kann (Alba-Loureiro et al., 2007; Graves et al., 2006).

Einen weiteren wichtigen Pathomechanismus im Zusammenspiel von Diabetes und Parodontitis stellen die Endprodukte der fortgeschrittenen Glykierung (*Advanced Glycation Endproducts*, AGEs) dar, die infolge der Hyperglykämie durch irreversible, nichtenzymatische Bindung von Glukose an Proteine entstehen. AGEs führen zur Förderung einer Inflammation und zu einem gestörten Umbau von extrazellulärer Matrix (Jepsen et al., 2011). Binden AGEs an ihren Rezeptor RAGE (*Receptor for Advanced Glycation Endproducts*, RAGE), so resultiert dies in einer vermehrten Produktion von Entzündungsmediatoren, wie IL-1 β , TNF- α und IL-6 (Lalla et al., 2001).

AGEs begünstigen auch die Apoptose von Fibroblasten, vor allem aber von Osteoblasten, was verringerte Kollagenbildung, und somit einen gestörten Gewebeumbau im Zuge der Wundheilung (*remodeling*) zur Folge hat. Weiterhin wird Kollagen über AGEs zusätzlich vernetzt, so dass der Ab- und Umbau sowie die Erneuerung des parodontalen Bindegewebes bei Diabetes erschwert sind (Zizzi et al., 2013), und die Gewebestruktion im Rahmen einer Parodontitis, auf Grund von fehlender Kompensation seitens des Wirtes, wesentlich leichter fortschreiten kann.

Dass ein Zusammenhang zwischen Parodontitis und Diabetes besteht, wird spätestens klar, wenn betrachtet wird, welche Resultate eine effektive Parodontitistherapie auf den HbA1c-Wert von Diabetikern hat. Verschiedene Metaanalysen bestätigen den positiven Effekt, der sich in einer deutlichen Reduktion des HbA1c-Wertes äußert (Preshaw et al., 2012), was nahe legt, dass durch eine effektive Behandlung der parodontalen Infektion die glykämische Einstellung bei parodontal erkrankten Diabetikern verbessert werden kann (Jepsen et al., 2011).

Nun ist Diabetes Typ 2 ist eine häufige Folgeerkrankung von Insulinresistenz. Diese gehört zu den Erkrankungen bzw. Risikofaktoren, welche unter dem Begriff „metabolisches Syndrom“ zusammengefasst werden (Alberti et al., 2009).

Einen Verbindungspunkt zwischen diesen Erkrankungen stellen Adipokine dar - Moleküle, die hauptsächlich von Adipozyten freigesetzt werden und Insulinresistenz sowie Entzündungsprozesse regulieren können. Hierzu gehören unter anderem Adiponektin, Leptin und Resistin, aber auch TNF- α , IL-6 und IL-8 (Proenca et al., 2014).

1.3 Adiponektin und Adiponektinrezeptoren

Adiponektin, auch bekannt als *adipocyte complement-related protein*; Acrp30 (Yamauchi et al., 2003), ist ein aus 247 Aminosäuren bestehendes, 30 kDa-schweres Polypeptid, welches zu den Adipokinen zählt (Berg et al., 2002; Stefan et al., 2002). Adiponektin wird, wie andere Adipokine auch, hauptsächlich von Adipozyten, aber auch von anderen Geweben sezerniert und liegt beim Gesunden in einer vergleichsweise hohen Plasmakonzentration von 1,9-17 $\mu\text{g/ml}$ vor (Yamaguchi et al., 2005), wobei Frauen ein höheres Level an zirkulierendem Adiponektin im Blut aufweisen als Männer (Whitehead et al., 2006).

Adiponektin ist aufgebaut aus einer N-terminalen kollagenähnlichen Domäne und einer C-terminalen globulären Domäne und ähnelt seiner Struktur nach dem C1q-Komplex des Komplementsystems. Es kommt im Plasma entweder als globuläres Adiponektin in Trimerform vor, hauptsächlich aber als *full-length* Adiponektin in drei Hauptformen, als (1) Trimere, (2) Hexamere und (3) 12- bis 18-mere (Kadowaki et al., 2006). Es wird beschrieben, dass die globuläre Form von Adiponektin biologisch weitaus wirksamer ist, als seine Volllänge- (*full-length*) Form (Fruebis et al., 2001; Hulsmans et al., 2012).

Adiponektin ist an der Regulation des Fett-Glukose-Haushaltes beteiligt und spielt eine wichtige Rolle bezüglich Insulinresistenz, Inflammation und dem Fettstoffwechsel. Die Plasma-Konzentration bei Patienten mit Adipositas, Typ 2 Diabetes und dem metabolischen Syndrom ist verringert (Kadowaki et al., 2005; Ukkola et al., 2002; Wolfson et al., 2012). Ferner weist die Konzentration des Adiponektins starke negative Korrelation im Zusammenhang mit Insulinresistenz auf (Whitehead et al., 2006). Adiponektinlevel sind unter inflammatorischen Bedingungen verringert, so konnte ein umgekehrter Zusammenhang zwischen der Konzentration an Adiponektin und dem Entzündungsmarker

C-reaktives Protein (CRP) sowohl im Plasma, als auch im Fettgewebe nachgewiesen werden (Ouchi et al., 2003).

Es wurden bisher zwei verschiedene Adiponektin-Rezeptoren beschrieben: Der Adiponektin-Rezeptor 1 (AdipoR1) wird ubiquitär, jedoch vor allem im Skelettmuskel exprimiert, wohingegen der Adiponektin-Rezeptor 2 (AdipoR2) hauptsächlich in der Leber und weißem Fettgewebe zu finden ist (Kadowaki et al., 2006; Yamauchi et al., 2014). Jüngste Untersuchungen haben ergeben, dass in oralen epithelialen Zellen beide Rezeptoren, sowohl AdipoR1 als auch AdipoR2 exprimiert werden, was vermuten lässt, dass orale Epithelzellen nicht nur eine Ressource, sondern auch Zielgewebe für Adiponektin darstellen (Kraus et al., 2012). Beide Rezeptoren werden außerdem von Makrophagen exprimiert (Chinetti et al., 2004). AdipoR1 und -R2 sind Membranproteine, deren N-terminales Ende sich innerhalb, das C-terminale Ende außerhalb der Zellmembran befindet, also genau umgekehrt wie beispielsweise bei allgegenwärtigen G-Protein-gekoppelten Rezeptoren. Während AdipoR1 als Rezeptor für globuläres Adiponektin fungiert, bindet AdipoR2 das *full-length* Adiponektin (Kadowaki et al., 2005).

Da eine Überexpression der beiden Rezeptoren kaum Effekte auf zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP), zyklisches Guanosinmonophosphat (cGMP) und die intrazelluläre Kalziumkonzentration hat, ist davon auszugehen, dass AdipoR1 und R2 nicht G-Protein gekoppelt arbeiten. Stattdessen aktivieren sie intrazellulär Mediator-moleküle anderer Signalwege wie beispielsweise den durch Peroxisomale Proliferatoren aktivierten Rezeptor alpha (PPAR α), die AMP-aktivierte Proteinkinase (AMPK) und die p38-mitogenaktivierte Proteinkinase (p38 MAPK) (Kadowaki et al., 2006).

Die Expression beider Rezeptoren ist bei Adipositas verringert, was folglich auch die Sensibilität für Adiponektin erniedrigt und wodurch schließlich eine Insulinresistenz entsteht (Kadowaki et al., 2005). AdipoR1 und AdipoR2 weisen außerdem auch unter pro-inflammatorischen Bedingungen ein vermindertes Expressionslevel auf, wie Yamaguchi et al. durch Stimulation von humanen gingivalen Fibroblasten mit TNF- α nachweisen konnten (Yamaguchi et al., 2010).

Studien zeigen, dass Adiponektin an der Modulation von entzündlichen Reaktionen beteiligt ist, indem es die Proliferation von myelomonozytischen Progenitorzellen inhibiert, und zwar indem es durch Regulation von *B-cell-lymphoma 2* (Bcl-2) Apoptose induziert (Fruebis et al., 2001; Yokota et al., 2000). Außerdem inhibiert Adiponektin die Phago-

zytosefähigkeit von Makrophagen und deren LPS-induzierte TNF- α - sowie IL-6-Produktion. Somit scheint Adiponektin ein wirksames anti-inflammatorisches Adipokin zu sein (Folco et al., 2009; Haugen et al., 2007; Yamaguchi et al., 2005).

In dieser Hinsicht spielt der *Nuclear factor- κ B* (NF- κ B) eine wichtige Rolle, da er ein essentieller Transkriptionsfaktor für die Ausbildung eines pro-inflammatorischen Milieus ist (Haugen et al., 2007). Yamaguchi et al. untersuchten an murinen Makrophagen der Linie RAW264, ob globuläres Adiponektin (gAd) eine LPS-induzierte Aktivität von NF- κ B inhibieren würde, und konnten dabei zeigen, dass gAd nicht nur die LPS-induzierte NF- κ B-Aktivität deutlich inhibierte, sondern ebenfalls, wenn sie durch die Liganden der *Toll-Like-Rezeptoren* (TLR) -2 und -9, nämlich Lipoteichonsäure (LTA) und CpG-Oligonukleotide (CpG), hervorgerufen war. Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass dieser Vorgang über AdipoR1 gesteuert wurde (Yamaguchi et al., 2005).

Auch unter Verwendung von humanen Makrophagen konnte bewiesen werden, dass durch Adiponektin die Aktivität von NF- κ B reduziert wird, und außerdem eine Anzahl von Mediatoren, deren anti-inflammatorische Wirkungen bekannt sind, vermehrt exprimiert werden und somit die Reaktion der Makrophagen gegenüber pro-inflammatorischen Stimuli abschwächen. Hierzu zählen unter anderem das Zinkfingerprotein A20, welches die Signalkaskade von NF- κ B und IRF3 (*Interferon regulatory factor 3*) inhibiert und auf diesem Weg TLR- oder TNF- α -induzierte Signale abmildert, sowie das *B-cell lymphoma 3* assoziierte Protein (BCL3), welches mit NF- κ B interagiert, und die LPS-induzierte Expression von TNF- α inhibiert (Folco et al., 2009).

Auch IL-10, ein weiteres wichtiges anti-inflammatorisches Zytokin, wird Adiponektinvermittelt freigesetzt. Seine anti-inflammatorische Wirkung wird über die Induktion von Hämoxygenase 1 (HMOX-1) vermittelt (Mandal et al., 2010). Die HMOX-1 katabolisert die Umwandlung von Häm in Carbonmonoxid (CO), Biliverdin und freies Eisen (Fe²⁺), über welche auch die anti-inflammatorische, anti-apoptotische und anti-proliferative Wirkung zustande kommt (Otterbein et al., 2003).

Andere Untersuchungen hingegen legen nahe, dass gAd die Sekretion von TNF- α und IL-6 in Makrophagen induziert, was einer pro-inflammatorischen Wirkung gleichkommt. Wiederholte Exposition der Makrophagen gegenüber Adiponektin zeigte allerdings, dass die Makrophagen eine Toleranz sowohl gegenüber diesem Effekt als auch gegenüber

entzündlichen Reizen entwickelten, und dem Adiponektin somit dennoch eine anti-inflammatorische Wirkung zugesprochen werden kann (Tsatsanis et al., 2005).

1.4 Metabolisches Syndrom, Fettgewebe und Adiponektin

Der Begriff metabolisches Syndrom umfasst die Risikofaktoren für kardiovaskuläre Erkrankungen und Diabetes mellitus Typ 2 wie arterielle Hypertonie, Insulinresistenz, Dyslipidämie und abdominelle Fettleibigkeit (Kaur, 2014). Das metabolische Syndrom ist weit verbreitet mit weltweit steigender Prävalenz, was hauptsächlich auf zunehmende Adipositas sowie auf einen Lebensstil ohne ausreichende Bewegung, vor allem in westlichen Industrienationen, zurückzuführen ist (Alberti et al., 2009). Patienten die an dem metabolischen Syndrom leiden, haben ein bis zu 4-fach erhöhtes Risiko einen Schlaganfall oder einen Herzinfarkt zu erleiden, das Risiko an diesem Ereignis zu versterben ist bei diesen Patienten doppelt so hoch im Vergleich zu Patienten ohne diese Risikofaktoren (Kaur, 2014).

Bei einer Erkrankung am metabolischen Syndrom, liegt im Körper ein chronischer subklinischer Entzündungsstatus vor, der vor allem mit Fettleibigkeit in Zusammenhang steht (Kaur, 2014), denn Fettleibigkeit ist assoziiert mit chronischer Inflammation, welche sich durch veränderte Produktion von vor allem Adipokinen und der Aktivierung von verschiedenen pro-inflammatorischen Signalkaskaden charakterisieren lässt (Hotamisligil et al., 1999). Fettgewebe wurde lange Zeit nur als Energiespeicher ohne weitere direkte Funktionen deklariert, es konnte jedoch bewiesen werden, dass es sich dabei vielmehr um eine wirksame Quelle von Hormonen und Zytokinen handelt, welche an der Regulation von Nahrungsaufnahme, Glukose- und Fett-Metabolismus sowie des Blutdrucks beteiligt sind (Hajer et al., 2008). So führt die Vergrößerung von Adipozyten zu einem pro-inflammatorischen Status der Zelle, bei dem es unter anderem zu einer vermehrten Sekretion von IL-6, IL-8, IL-1 β , Leptin und TNF- α kommt (Fuentes et al., 2013). Dieses erhöhte Level an pro-inflammatorischen Zytokinen ist dabei im Serum betroffener Personen messbar (Romeo et al., 2012).

Adiponektin hingegen wird in diesem Fall nur vermindert sezerniert, daher ist der Plasma-Adiponektinspiegel negativ assoziiert mit dem prozentualen Anteil an Körperfett, Insulin und Leptin (Ryan et al., 2003). Folglich ist das Level an zirkulierendem Adiponektin bei Patienten mit Adipositas und Insulinresistenz durch Diabetes mellitus Typ 2 vermindert

(Fève et al., 2006), und die Möglichkeit, dass inflammatorische Prozesse durch das Adiponektin mit seinen anti-inflammatorischen Eigenschaften inhibiert werden, ist eingeschränkt.

1.5 Ziel dieser Arbeit und Fragestellung

In der vorliegenden Promotionsarbeit sollten die Mechanismen des Adiponektin-Adiponektinrezeptoren-System nicht nur im Hinblick auf die beteiligten Zelltypen unter gesunden und entzündlichen Bedingungen untersucht werden, es sollte vielmehr der Zusammenhang zwischen dem Adiponektinsystem und inflammatorischen Prozessen betrachtet werden. Die Vermutung ist, dass entzündliche Prozesse, bedingt durch systemische Erkrankungen wie etwa Diabetes oder das Metabolische Syndrom aber auch eine etablierte Parodontitis auf der einen Seite und das Adiponektinsystem auf der

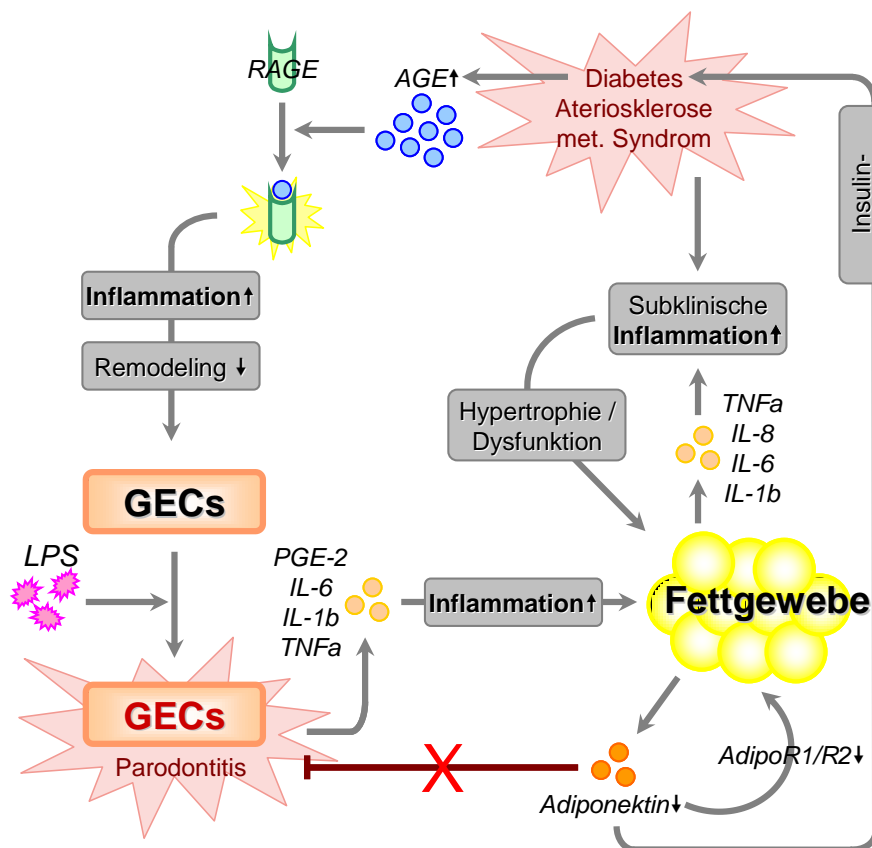


Abb. 3: Schematische Darstellung der Wechselwirkungen zwischen Parodontitis, systemischen Erkrankungen und Adiponektinsystem.

Nähere Erläuterungen im Text. (LPS: Lipopolysaccharide; PGE-2: Prostaglandin E2; IL: Interleukin; TNF- α : Tumornekrosefaktor α ; AGE: *Advanced Glycation Endproducts*; RAGE: *Receptor for Advanced Glycation Endproducts*; AdipoR1/2: Adiponektinrezeptoren 1 und -2; GEC: Gingivale Epithelzelle)

anderen Seite sich wechselseitig beeinflussen und regulieren (s. Abb. 3).

Da das Fettgewebe der Hauptproduzent von Adiponektin im menschlichen Körper ist, sollte das Adiponektin-Adiponektinrezeptoren-System in dieser Arbeit neben gingivalen Epithelzellen auch an Adipozyten untersucht werden.

Da die Kultivierung von Adipozyten aus primärem Fettgewebe verschiedene Nachteile mit sich bringt, wurde bereits ein Adipogeneseprotokoll für murine 3T3-L1-Fibroblasten etabliert (Poulos et al., 2010), in welchem die Zellen durch Zugabe bestimmter Stimulanzen zu Adipozyten differenziert werden (Zebisch et al., 2012). Ein ähnliches Modell wurde auch an Osteosarkomzellen etabliert, welche zu Osteoblasten-ähnlichen Zellen differenziert werden (Clover et al., 1994; Czekanska et al., 2012). Ein Ziel dieser Arbeit war die Übertragung dieses Modells auf humane Liposarkomzellen der Linie SW-872, um dann auch diese Zelllinie als Fettzellmodell nutzen zu können.

2. Material und Methoden

2.1 Zellbiologische, molekularbiologische und histologische Materialien

2.1.1 Zellkulturmedien und –zusätze

1% antibiotisch- und antimykotische Lösung	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe
3-Isobutyl-1-methylxanthin (IBMX)	Calbiochem, Darmstadt
β -Mercaptoethanol	Sigma/Aldrich, Steinheim
Dexamethason	Sigma/Aldrich, Steinheim
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma/Aldrich, Steinheim
<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> (DMEM)	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe
Fötales Kälberserum (FKS)	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe
Indomethazin	Sigma/Aldrich, Steinheim
Insulin	Sigma/Aldrich, Steinheim
Interleukin-1 β , rekombinant, murin und human	R&D Systems, Wiesbaden
Keratinocyte Growth Medium-2 (KGM-2)	Promocell, Heidelberg
Lipopolysaccharid von <i>Porphyromonas gingivalis</i>	Cayla-InvivoGen, Toulouse
<i>Newborn Calf Serum</i> (NCS)	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe
Phosphat gepufferte Salzlösung (PBS)	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe
Trypsin-EDTA, 0,125 % (w/v) 100x	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe
Rosiglitazon	Sigma/Aldrich, Steinheim

2.1.2 Kommerzielle Puffer, Lösungen und Chemikalien

4',6-Diamidin-2-phenylindiol (DAPI)	Sigma/Aldrich, Steinheim
100bp DNA-Leiter	Life-Technologies, Darmstadt
Acrylamidmix	Bio-Rad, München
Ammoniumpersulfat	Bio-Rad, München
Aquatex	Merck, Darmstadt
Bromphenolblau	Roth, Karlsruhe
BSA-Lösung	Sigma/Aldrich, Steinheim

cOmplete Ultra Mini Protease Inhibitor	Roche, Mannheim
DePeX	Sigma/Aldrich, Steinheim
Diaminobenzidin (DAB)	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
Ethanol absolut	Merck, Darmstadt
Formalin	Sigma/Aldrich, Steinheim
Glycerin	Bio-Rad, München
Glycerol	Sigma/Aldrich, Steinheim
Hämalaun	Merck, Darmstadt
Isopropanol-Lösung	Merck, Darmstadt
Magermilchpulver	Bio-Rad, München
Methanol	AppliChem, Darmstadt
Modified Mayer's Hämatoxylin	Microm, Volketswil (CH)
Mowiol/DABCO	Roth, Karlsruhe
Öl-Rot	Merck, Darmstadt
Paraffin	Merck, Darmstadt
Paraformaldehyd	Sigma/Aldrich, Steinheim
Protease Inhibitor	Roche, Mannheim
Proteinmarker Kaleidoscope	Bio-Rad, München
RIPA Buffer	Sigma/Aldrich, Steinheim
RLT Plus-Puffer	Qiagen, Hilden
RNase-freies Wasser	Qiagen, Hilden
20 % SDS (<i>Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide</i>)	Bio-Rad, München
TBS	Bio-Rad, München
Tetramethylbenzidin	Sigma/Aldrich, Steinheim
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Bio-Rad, München
Tris HCL (1 M, pH 6,8)	Bio-Rad, München
Triton X-100	Sigma/Aldrich, Steinheim
Trypan-Blau-Lösung	Sigma/Aldrich, Steinheim
Tween-20	Bio-Rad, München
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂)	Merck, Darmstadt

2.1.3 Zusammensetzung von sonstigen Puffern und Lösungen

Puffer/Lösung	Bestandteile
Laemmli-Puffer (2x)	100 mM Tris-HCl (pH 6,8) 200 mM β -Mercaptoethanol 20 % (v/v) Glycerol 4 % (v/v) SDS 0,2 % Bromphenolblau
Laufpuffer (pH 6,8)	192 mM Glycerin 25 mM Tris 0,1 % (v/v) SDS
Transferpuffer (pH 8,3)	192 mM Glycerin 25 mM Tris 20 % (v/v) Methanol
Blockierungspuffer	5 % (v/v) Milch 0,1 % (v/v) Tween-20

Tabelle 1: Zusammensetzung diverser Puffer

Zusammensetzung von Puffern für die Analyse von Proteinproben mittels Western Blot

2.1.4 Verwendete Zelllinien

Neben den aus Zahnfleischbiopsien isolierten primären gingivalen Epithelzellen (*gingival epithelial cells*, GECs) wurden folgende kommerzielle Zelllinien verwendet:

Zelllinie	Ursprung
3T3-L1 (murine Prä-Adipozyten)	Biocat, ZenBio
SW-872 (humane Liposarkomzellen)	Cell-Line-Service, Eppelheim

Tab. 2: Verwendete Zelllinien

In der vorliegenden Dissertation verwendete, kommerzielle Zelllinien für die Zellkultur

2.1.5 Zellkulturmedien

2.1.5.1 Zusammensetzung des Grundmediums für SW-872- bzw. 3T3-L1-Zellen

Lösung/Zusatz	Anteil im Medium
DMEM (inkl. Glukose und L-Glutamin)	89 % (v/v)
FKS (für SW-872/3T3-L1, differenziert) NCS (für 3T3-L1)	10 % (v/v)
<i>Antibiotic/antimycotic Solution</i>	1 % (v/v)

Tab. 3: Zusammensetzung von Grundmedium

Zusammensetzung von Grundmedium zur generellen Kultivierung der erwähnten Zelllinien

2.1.5.2 Zusammensetzung von Induktionsmedium

Das Induktionsmedium besteht aus Grundmedium und den unten aufgelisteten Zusätzen zur Kultivierung während der Adipogenese von humanen SW-872-Liposarkomzellen und murinen 3T3-L1-Fibroblasten.

Zusätze	Anteil im Medium
Dexamethason (für SW-872 und 3T3-L1)	1 μ M bzw. 0,25 μ M
Indomethazin (nur für SW-872)	0,2 mM
Rosiglitazon (nur für 3T3-L1)	2 μ M
Insulin (für SW-872 und 3T3-L1)	0,01 mg/ml bzw. 1 μ g/ml
3-Isobutyl-1-methylxanthin (IBMX)	0,5 mM

Tab. 4: Zusammensetzung von Induktionsmedium

Zusammensetzung von Induktionsmedium zur Kultivierung der erwähnten Zelllinien während der Adipogenese

2.1.5.3 Zusammensetzung von Erhaltungsmedium

Das Erhaltungsmedium besteht aus Grundmedium welches mit 0,01 mg/ml Insulin (Sigma/Aldrich, Steinheim) supplementiert wurde und diente der Kultivierung während der

Adipogenese von SW-872-Liposarkomzellen, auch während der fortlaufenden Stimulationen.

2.1.5.4 Zusammensetzung von Keratinozytenwachstumsmedium

Das Keratinozytenwachstumsmedium zur Kultivierung von humanen gingivalen Epithelzellen wurde wie folgt angesetzt:

Zusätze	Anteil im Medium
KGM-2 mit Zusätzen	99 % (v/v)
<i>Antibiotic/antimycotic Solution</i>	1 % (v/v)

Tab. 5: Zusammensetzung von Keratinozytenwachstumsmedium

Zusammensetzung von Keratinozytenwachstumsmedium zur Kultivierung von humanen gingivalen Epithelzellen

2.1.6 Verwendete kommerzielle Systeme

Zur Aufreinigung von Ribonukleinsäuren aus kultivierten Zellen und Gewebeproben wurde das *RNeasy Plus Mini Kit* (Qiagen, Hilden) verwendet.

Für die Synthese von komplementären Desoxyribonukleinsäuren via Reverse Transkriptase Reaktion wurde das *iScript™ Select cDNA Synthesis Kit* (Bio-Rad, München) benutzt.

Für die quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion wurde das *iQTM SYBR® Green Supermix Kit* (Bio-Rad, München) verwendet.

Für die Mengenbestimmung von Proteinen in Proben wurde das *Pierce BCA Protein Assay* (Thermo Fisher Scientific, Schwerte) verwendet.

2.1.7 Verwendete Oligostarternukleotide

Folgende Oligostarternukleotide wurden von PD Dr. J. Winter und Dr. med. dent. D. Kraus entworfen und von der Firma Metabion (Martinsried) synthetisiert.

Oligonukleotid	5'- Primersequenz -3'	Anlagerungs- temperatur
human β -Aktin	CATGGATGATGATATCGCCGCG ACATGATCTGGGTCATCTTCTCG	69 °C
human Adiponektin	GCCTCTTCAAGAAGGACAAGGCTATG CAGTTGGTGTGCATGGTAGAGAAG	69 °C
human AdipoR1	ACTGGAGCTGGCCTTTATGCTGC AGAGAAGGGTGTGCATCAGTACAGC	69 °C
human AdipoR2	CCATAGGGCAGATAGGCTGGTTGA CAGTGCATCCTCTTCACTGCAGC	69 °C
human C/EBP α	AGGCCAAGAAGTCGGTGGACAAG GCGGTCATTGTCACTGGTCAGC	66 °C
human C/EBP β	CAACTTCTACTACGAGGCGGACT AGGTACGGGCTGAAGTCGATGG	61 °C
human IL-1 β	ATGGCAGAAGTACCTGAGCTCGC TTAGGAAGACACAAATTGCATGGTG	68 °C
human IL-8	ATGACTTCCAAGCTGGCCGTGG TGAATTCTCAGCCCTCTTCAAAAAC	68 °C
human Leptin	GGACTTCATTCTGGGCTCCAC AGCCTGAAGCTTCCAGGACACC	68 °C
human Perilipin	AGCATTGAGAAGGTGGTGGAGTAC TGTATCGAGAGAGGGTGTGGTCA	66 °C
human PPAR γ	TCCAGCATTCTACTCCACATTACG GAGGGAGTTGGAAGGCTCTTCAT	66 °C
human RBP4	GGCCTCTTTCTGCAGGACAACA GCGCACACGTCCAGTTATTCA	68 °C
human Resistin	AGCCATCAATGAGAGGATCCAG ACTCCAGGCCAATGCTGCTTAT	68 °C
human Visfatin	CTTCTGGTAACTTAGATGGTCTGGAA TGCTCCTATGCCAGCAGTCTCTT	66 °C
murin β -Actin	CATGGATGACGATATCGCTGC CATGTCGTCCAGTTGGTAAC	68 °C
murin Adiponektin	AGACCCGCGTCACTGTTCC GCCAGAGGCCTGGTCCACAT	68 °C
murin AdipoR1	ACCTGAGGGGTGGAGGAGGG TTGCCTTGCCGAGGTGACTG	68 °C
murin AdipoR2	TTTGGGCATTGAGAGGGGGA CCTATGCTGATGCCCCAGG	68 °C

murin C/EBP α	CAAAGCCAAGAAGTCGGTGG GCAGCGTGTCCAGTTCAC	64 °C
murin C/EBP β	GACAAGCTGAGCGACGAGTAC GCTGCTCCACCTTCTTCTGCA	65 °C
murin IL-6	TGCTGGTGACAACCACGGCC TGGTACTCCAGAAGACCAGAGG	68 °C
murin Leptin	TGCAAGGTGCAAGAAGAAGAAGATCCC CTTGCGGATAACCGACTGCGTG	69 °C
murin Perilipin	GGCAGCCTCTCAGGATGAGAG GAGAGTGTTCTGCACGGTGTG	65 °C
murin PPAR γ	GGCCTCCCTGATGAATAAAGATGG CCTGCAGCAGGTTGTCTTGGATG	64 °C
murin RBP4	CCGTCTTCTGAGCAACTGGGAAGTGTGTG GAGGGCCTGCTTTGACAGTAACCATTGTGTTCC	64 °C
murin Resistin	GCTAAGTCCTCTGCCACGTACCCAC AGCTCAAGACTGCTGTGCCTTCTGG	69 °C
murin TNF- α	AGGCTGCCCGACTACGTGC ACCTGCCCGACTCCGCAAA	69 °C
murin Visfatin	CTTCGCAAGAGACTGCTGGCATAG CCGTTATGGTACTGTGCTCTGCTG	66 °C

Tab. 6: Auflistung der verwendeten Oligonukleotide

Auflistung der in der vorliegenden Dissertation verwendeten Oligonukleotide, inklusive Nukleotidsequenz (G: Guanin, C: Cytosin, T: Thymin bzw. A: Adenosin), sowie der zugehörigen Anlagerungstemperaturen.

2.1.8 Antikörper

2.1.8.1 Verwendete Primärantikörper

Spezifität	Isotyp	Verdünnung	Hersteller
anti-Adiponektin	<i>Rabbit IgG</i>	1:75	Santa Cruz Biotech., Heidelberg
anti-Adipo R1	<i>Goat IgG</i>	1:25	Santa Cruz Biotech., Heidelberg
anti-Adipo R2	<i>Goat IgG</i>	1:50	Santa Cruz Biotech., Heidelberg

Tab. 7: Auflistung der verwendeten Primärantikörper

Auflistung der in der vorliegenden Dissertation verwendeten Primärantikörper, gerichtet gegen diverse Antigene, sowie Angabe des Isotypes und der verwendeten Verdünnung des Antikörpers.

2.1.8.2 Verwendete Sekundärantikörper

Spezifität/Isotyp	Konjugat	Verdünnung	Hersteller
anti- <i>Rabbit</i> IgG	HRP	1:500	Dianova, Hamburg
anti- <i>Rabbit</i> IgG	Cy3	1:250	Dianova, Hamburg
anti- <i>Goat</i> IgG	Cy3	1:250	Dianova, Hamburg
anti- <i>Goat</i> IgG	HRP	1:500	Dianova, Hamburg

Tab. 8: Auflistung der verwendeten Sekundärantikörper

Auflistung der in der vorliegenden Dissertation verwendeten Sekundärantikörper, gerichtet gegen diverse Primärantikörper, sowie Angabe des direkt gekoppelten Konjugats und der verwendeten Verdünnung des Antikörpers.

2.1.9 Sonstige Verbrauchsmaterialien

300 µl Spitzen für Multikanalpipette	Eppendorf, Hamburg
Filterpapiere Western Blot	Bio-Rad, München
Glas-Deckgläser, 12 mm	Marienfeld GmbH, Königshofen
Glas-Deckgläser, 15 mm	Marienfeld GmbH, Königshofen
Glasobjektträger, 72 x 25 mm	Marienfeld GmbH, Königshofen
Glaswaren und Gefäße	DURAN, Wertheim
Mikrotiterplatte	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Nitrocellulosemembran	Bio-Rad, München
Parafilm	Pechiney Plastic, Chicago, USA
Pipetten, serologisch	Corning, Corning, USA
Pipetten, <i>StarPet</i>	Starlab, Ahrensburg
Pipettenspitzen	Starlab, Ahrensburg
PVDT-Membran	Merck Millipore, Darmstadt
Reaktionsgefäße 1,5 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Reaktionsgefäße 2 ml	Eppendorf, Hamburg
Reaktionsgefäße 15 ml/50 ml	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Salivetten	Sarstedt, Nümbrecht

SDS-Gel-Spitzen	VWR International, Darmstadt
Zellkulturflaschen 75 cm ²	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Zellkulturmehrlochplatten, 12-, 24-, 96-wells	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Zellkulturschalen, 35mm, 60 mm 100 mm	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Zellkulturschaber	TPP, Trasadingen, CH

2.1.10 Geräte

Analysewaage Sartorius Analytik A 120 S	Sartorius, Göttingen
Autoklav <i>Varioklav 25T</i>	H+P Labortechnik, Oberschleissheim
ChemiDoc XRS™	Bio-Rad, München
Eismaschine <i>Manitowoc Ice Flake</i>	Manitowoc Ice, Manitowoc, USA
Fluoreszenzmikroskop AxioImager A1	Carl Zeiss, Jena
Gefrierschrank -20 °C	Liebherr, Ochsenhausen
Gefrierschrank -80 °C	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
Gießstation für SDS Gele	Bio-Rad, München
Kamera <i>AxioCam MRc</i>	Carl Zeiss, Jena
Kühlschrank +4 °C	Bosch, München
Kühlzentrifuge <i>Centrifuge S415R</i>	Eppendorf, Hamburg
Lichtmikroskop AxioImager A1	Zeiss, Oberkochen
Magnetrührer <i>MR3001</i>	Heidolph Instruments, Schwabach
Mikroplatten-Reader <i>Epoch</i>	Biotek Instr., Bad Friedrichshall
Mikrotom Microm HM 355s	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
Minischüttler <i>MS2 Minishaker</i>	IKA®, Staufen
Multikanalpipette	Eppendorf, Hamburg
pH-Meter	WTW, Weilheim
Pipettierhilfe Easypet	Eppendorf, Hamburg
qPCR-Cycler <i>iCycler iQ detection system</i>	Bio-Rad, München
Schüttler für Western Blot Membran <i>PMR-30</i>	Grant-bio, Hillsborough, USA
SDS-Page Elektrophorese <i>Power Station</i>	Bio-Rad, München
Semidry Blot Gerät <i>Trans-Blot® SD</i>	Bio-Rad, München
Sicherheitswerkbank <i>Clean Air Typ EF/A6E</i>	Clean Air Techniek, Woerden, NL

Spektrophotometer <i>NanoDrop</i> [®] <i>ND-100</i>	NanoDrop Tech., Wilmington
Thermo Cycler <i>MyCycler</i> [™] <i>Thermal Cycler</i>	Bio-Rad, München
Thermomixer <i>compact</i>	Eppendorf, Hamburg
Wasserbad	Julabo, Seelbach
Werkbank	Clean Air Technik, Woerden, NL
Western-Blot-Apparatur	Bio-Rad, München
Zellkulturinkubator <i>ThermoForma Incubator</i>	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
Zentrifuge (1,5/2,0 ml) <i>5415 D</i>	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge (50 ml) <i>Biofuge stratos Heraeus</i>	Thermo Fisher Scientific, Schwerte

2.1.11 Verwendete Software

Axiovision V.4.7 Software	Zeiss, Oberkochen
Graph Pad Prism Version 5	Graph Pad, La Jolla, USA
Microsoft Office (Word, Excel)	Microsoft Inc., Redmond, USA
Quantity One	Bio-Rad, München

2.2 Gewinnung von humanen Proben

2.2.1 Auswahl und Gruppierung von Probanden

Die in dieser Studie verwendeten Speichel- und Gewebeproben wurden unter der Berücksichtigung von Vorgaben und akzeptiertem Ethikantrag (Nr.: 238/14) des Gesetzgebers in den integrierten Studentenkursen der Universitätszahnklinik Bonn von Patienten mit oder ohne auffälliger Anamnese ausgewählt und zwei Gruppen zugeordnet. Dabei bildeten Patienten der Gruppe 1 die Kontrollgruppe, da sie einen gesunden parodontalen Zustand aufwiesen und zudem nicht an sonstigen Allgemeinerkrankungen litten. In Gruppe 2 wurden Patienten mit einer Parodontitis aufgenommen, die aber ebenfalls nicht an sonstigen allgemeinen Erkrankungen litten. An der Untersuchung haben 8 männliche und 11 weibliche Probanden (Alter: 25 – 74 Jahre) teilgenommen. Alle Patienten wurden ausführlich über die Teilnahme an der Studie aufgeklärt, und außerdem gebeten, Fragebögen sowohl zu ihrer Anamnese als auch zu ihren Mund-hygienegewohnheiten auszufüllen.

2.2.2 Gewinnung von Speichelproben

Den Probanden wurde für diese Studie Speichel entnommen. Dazu wurde zuerst sowohl der Zahnstatus als auch ein parodontaler Attachmentstatus der Patienten dokumentiert. Anschließend wurde den Patienten in einer aufrechten Sitzposition eine sterile Watterolle für 4 Minuten unter die Zunge gelegt und so die Speichelprobe gewonnen. Die notwendige Zeit, um eine ausreichende Menge an Speichel zu gewinnen, wurde vorher im Selbstversuch getestet, wobei darauf geachtet wurde, dass die Aufnahmekapazität der Watterolle nicht überschritten wurde. Der in der Watterolle enthaltene Speichel wurde fünf Minuten bei 1000 Umdrehungen pro Minute (rpm.) in einer Salivette abzentrifugiert und die gewonnene Speichelmenge bestimmt. Die Aufbewahrung bis zur Analyse erfolgte in sterilen, DNase- und RNase-freien 1,5 ml Reaktionsgefäßen im Gefrierschrank bei -80 °C.

2.2.3 Gewinnung von humanen Gewebeproben

Die für die histologische Auswertung benötigten humanen Gewebeproben gesunder- sowie parodontal erkrankter Gingiva, wurden sowohl unter der Berücksichtigung von Vorgaben und akzeptiertem Ethikantrag (Nr.: 238/14) des Gesetzgebers, als auch nach Aufklärung der Patienten von der Arbeitsgruppe Prof. Dr. med. W. Götz für diese Studie freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

2.3 Zellbiologische Methoden

Um einen besseren Einblick in diverse Abläufe und Signalwege innerhalb der zu untersuchenden Zelltypen zu bekommen, wurden diverse Zellen *in vitro* kultiviert, durch Zugabe von diversen Stimulantien manipuliert und/oder differenziert und anschließend, nach erfolgter Ernte, mittels biologischer Analyseverfahren genauer untersucht.

Alle zellbiologischen Methoden wurden unter sterilen Bedingungen unter einer Werkbank mit sterilen Geräten und sterilen Materialien durchgeführt.

2.3.1 Kultivierung, Differenzierung und Stimulation von murinen Fibroblasten

Bei einem Blick in die Literatur stellt man fest, dass als Fettzell-Modell am häufigsten murine Fibroblasten, sogenannte 3T3-L1-Fibroblasten wegen ihrer Fähigkeit, von Fibroblasten zu Fettzellen (Adipozyten) bzw. zu Adipozyten-ähnlichen Zellen zu differenzieren (Poulos et al., 2010), verwendet werden (Wang et al., 2004). Diese Zellen zeigen unter Zugabe von Differenzierungs-fördernden Substanzen, die im Folgenden beschrieben werden, eine nahezu vollständige Differenzierung in reife Adipozyten mit der im histologischen Bild typischen Ansammlung von Fettvakuolen als Speicher von Triglyzeriden im Zellinneren (Zebisch et al., 2012).

2.3.1.1 Auftauen von murinen Fibroblasten

Die in flüssigem Stickstoff eingelagerten 3T3-L1-Fibroblasten wurden zunächst aufgetaut. Dafür wurden die in 1,5 ml Einfrierröhrchen gelagerten Zellen aus der Gasphase der Stickstofflagerung entnommen und bei Raumtemperatur langsam erwärmt. Die Zellsuspension wurde, sobald sie vollends aufgetaut war, 2 Minuten bei 800 g zentrifugiert, um die darin befindlichen Zellen vom Einfriermedium und dem darin enthaltenen zelltoxischen Dimethylsulfoxid (DMSO), zu trennen. Nachdem das Einfriermedium verworfen wurde, wurde das Zellpellet in 1 ml Grundmedium (genaue Zusammensetzung, siehe Kapitel 2.1.5.1) aufgenommen und in 75 cm² Zellkulturflaschen in Grundmedium (15 ml) plattiert und bei 37 °C bzw. 5 % CO₂ kultiviert. Bei Erreichen von 70-80 % Konfluenz wurden die Zellen je nach Versuchsplanung direkt in 12-Loch-Platten oder 6 cm Zellkulturschalen ausgesät oder je nach benötigter Zellzahl auf mehrere 75 cm² Zellkulturflaschen verteilt, um eine genügende Zellzahl zur Versuchsaussaat zu gewährleisten.

2.3.1.2 Passagieren und Zellzahlbestimmung von murinen Fibroblasten

Um ein frühzeitiges Differenzieren der 3T3-L1-Fibroblasten durch konfluentes Wachstum in der Zellkultur zu verhindern, wurde besonders auf eine rechtzeitige Passage geachtet.

Hierfür wurde zuerst das Grundmedium von den Zellen abgenommen. Anschließend wurden die adhärennten Zellen mit phosphatgepufferter Salzlösung (*Phosphate Buffered Saline*, PBS, gewaschen und durch Zugabe von 5 ml 0,05/0,02%-igem Trypsin/EDTA in PBS und Inkubation für 5 Minuten bei 37 °C vom Boden der 75 cm² Kulturflasche gelöst. Nach Abstoppen der Trypsinreaktion durch Zugabe von 10 ml Grundmedium wurde die Adhärenz verbleibender Zellen durch vorsichtiges mehrfaches auf- und abpipettieren gelöst, und die Gesamtzellsuspension vereinzelt. Letztlich wurden die Zellen in ein 50 ml Reaktionsgefäß überführt, bei 800 g für 5 min zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet in 1 ml Grundmedium resuspendiert. Daraufhin erfolgte eine Zellzahlbestimmung mittels Zählung der Zellen in einer Neubauerzählkammer. Hierfür wurden die Zellen zuvor mit Trypanblau-Lösung versetzt, um nur die lebenden Zellen (keine blaugefärbten) für die Zellzahlbestimmung zu berücksichtigen. Anschließend erfolgte dann die Ausplattierung der Zellen in der gewünschten Zellzahl in die jeweiligen Zellkulturgefäße.

2.3.1.3 Differenzierung von murinen Fibroblasten mittels des „7-Tage-Protokolls“

Die Zellen wurden für die Stimulationsversuche auf 6 cm-Kulturschalen (Proteinanalyse) bzw. auf 12-Loch-Platten (Genexpressionsanalyse) verteilt. Hierbei wurden auf die 6 cm-Kulturschalen jeweils 1×10^5 Zellen, auf die 12-Loch-Platten pro Loch je 2×10^4 Zellen ausgesät. Nach Erreichen von ca. 100 % Konfluenz wurden die 3T3-L1-Fibroblasten zunächst in dem so genannten „7-Tage Protokoll“ der Adipogenese unterzogen, um Adipozyten-ähnliche Zellen zu generieren, und daraufhin stimuliert. Dazu wurden die Zellen innerhalb des unten schematisch aufgeführten „7 Tage Protokolls“ differenziert, bevor die eigentlichen Versuchsstimulationen mit den Entzündungsmediatoren IL-1 β sowie Lipopolysacchariden (LPS) von *P. gingivalis* beginnen konnten.

Wie bereits in der Literatur beschrieben, können Fibroblasten mit Hilfe des so genannten „Adipozyten Cocktails“, bestehend aus Insulin, Dexamethason, Rosiglitazon oder 3-isobutyl-1-methylxanthin (IBMX), in Adipozyten differenziert werden (Zebisch et al., 2012).

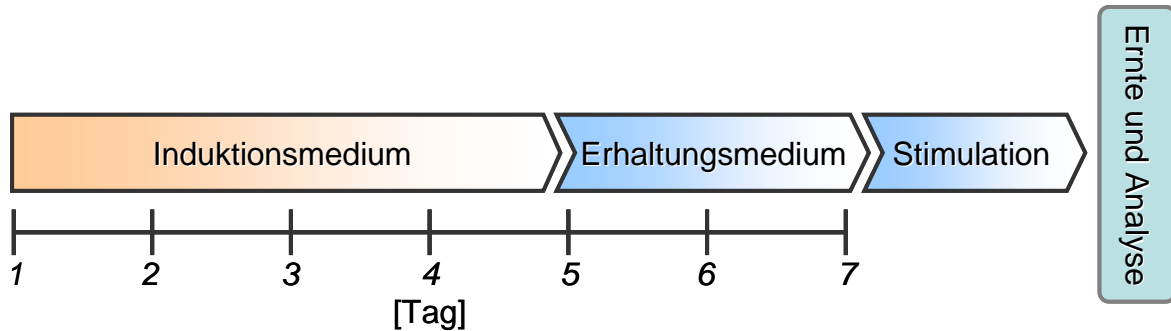


Abb. 4: Schematische Darstellung des Adipogeneseprotokolls

Nach Kultivierung der 3T3-L1-Fibroblasten in Induktionsmedium für 4 Tage wurden die Zellen an Tag 5 für 2 Tage mit Erhaltungsmedium kultiviert bevor letztlich die eigentlichen Stimulationen folgten.

War die gewünschte Konfluenz erreicht, wurde das Grundmedium von den adhären Zellen abgenommen und durch Induktionsmedium (genaue Zusammensetzung, siehe Kapitel 2.1.5.2) ersetzt (Tag 1). Hierbei wurden bei 6 cm Schalen je 5 ml, bei den 12-Loch-Platten je 1 ml Medium verwendet. An Tag 3 wurde ein kompletter Wechsel des Mediums mit erneuter Zugabe von Induktionsmedium für weitere 2 Tage vollzogen. Danach wurden die Zellen nach erfolgter Induktion bzw. Differenzierung weitere 2 Tage in Erhaltungsmedium (genaue Zusammensetzung, siehe Kapitel 2.1.5.3) kultiviert.

2.3.1.4 Stimulation differenzierter muriner Fibroblasten mit LPS oder IL-1 β

P. gingivalis ist ein mit der Parodontitis eng assoziierter pathogener Keim. Um die Wirkung eben dieses Keimes auf die Adiponektinproduktion im Entzündungsfall genauer zu beobachten, wurden den zu Adipozyten differenzierten 3T3-L1-Fibroblasten Lipopolysaccharide (LPS) des Keimes zugeführt. LPS sind Moleküle der äußeren Membran gram-negativer Bakterien, die aus kovalent gebundenen Lipiden und Polysacchariden bestehen, und durch ihre Eigenschaft als Endotoxine das menschliche Immunsystem induzieren.

Neben LPS wurde auch mit dem pro-inflammatorischen Zytokin IL-1 β in verschiedenen Konzentrationen stimuliert. Vor der Stimulation wurde das Erhaltungsmedium von den Zellen abgenommen und durch FKS-freies Erhaltungsmedium ersetzt. Die zuvor angesetzte LPS-Stammlösung (1 mg/ml) wurde in Erhaltungsmedium zu einer Konzentration von 1 μ g/ml bzw. 10 μ g/ml verdünnt. Schließlich wurden die Zellen mit IL-1 β oder LPS-versetztem Erhaltungsmedium bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Dabei wurden parallel Kontrollen, also unstimulierte Zellen mitlaufen gelassen. Nach erfolgter Stimulation wurden die Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten (4-, 8-, 24- und 72 Stunden) geerntet und dem jeweiligen Analyseverfahren zugeführt.

2.3.2 Kultivierung, Differenzierung und Stimulation von humanen Liposarkomzellen

Um ein vergleichbares humanes Zelllinienmodell für weitere Stimulationsexperimente zu etablieren, ohne auf mesenchymale Stammzellen oder primäre Fettzellen zurückgreifen zu müssen, wurden Liposarkomzellen der Linie SW-872 auf ihr Differenzierungsverhalten in Richtung reife Adipozyten untersucht, und nach Differenzierung ihre vergleichbare Reaktion auf Entzündungsmediatoren getestet.

Hierbei waren die Prozeduren (1) des Auftauens, (2) der Passage, (3) der Kultivierung sowie (4) der Stimulation der SW-872-Liposarkomzellen exakt gleich dem Ablauf bei 3T3-L1-Fibroblasten mit Ausnahme der Zusammensetzung des Grundmediums. Hier wurde Fötales Kälberserum (FKS) statt *Newborn Calf Serum* (NCS) und statt Rosiglitazon Indomethazin im Induktionsmedium verwendet. In Vorversuchen wurden mesenchymale Stammzellen, isoliert aus dentaler Pulpa, erfolgreich durch Zugabe von Indomethazin in Adipozyten-ähnliche Zellen differenziert. Dies geschah entsprechend vorhandener Differenzierungsprotokolle für mesenchymale Stammzellen (Styner et al., 2010). In weiteren Vorversuchen zur Differenzierung von SW-872-Liposarkomzellen stellte sich Indomethazin im Vergleich zu Rosiglitazon am vielversprechendsten dar und wurde daher in dieser Arbeit zur Differenzierung verwendet.

2.3.3 Kultivierung und Stimulation von gingivalen Epithelzellen

2.3.3.1 Gewinnung von gingivalen Epithelzellen

Die gingivalen Epithelzellen (GECs) wurden von sechs verschiedenen Patienten entnommen (siehe auch Kapitel 2.2.3), welche allgemeinmedizinisch und parodontal gesund waren. Hierbei wurde ein Stück Gewebe entnommen und dieses wenn möglich direkt weiter verarbeitet. Dazu wurden die einzelnen Gewebeproben zunächst zweimal mit PBS gewaschen, bevor sie weiter mit einer 1 %-igen antibiotischen- und antimykotischen Lösung supplementiert wurden, um Kontaminationen zu vermeiden. Zur Trennung des Epithels vom Bindegewebe wurden die Gewebeproben zunächst mit einer Kollagenase II-Lösung für 2,5 Stunden bei 37 °C schüttelnd angedaut und anschließend mit sterilen Instrumenten mechanisch von der unterliegenden Gewebeschicht getrennt. Um letztlich einzelne Zellen aus dem Gewebeverband zu lösen, wurden die Epithelstücke mit einer mit 0,05 % Trypsin/0,02 % EDTA Lösung für 15 Minuten bei 37° C dissoziiert. Schließlich wurden die einzelnen Zellen in ein 50 ml Reaktionsgefäß überführt, die Trypsinwirkung mittels Zugabe von Trypsin-Inhibitor in einer Konzentration von 0,1 mg/ml gestoppt, abzentrifugiert und zur weiteren Kultivierung in Keratinozytenwachstumsmedium aufgenommen. Die Zellzahlbestimmung erfolgte nach Trypan-Blau-Färbung mit einer Neubauerzählkammer.

2.3.3.2 Kultivierung von gingivalen Epithelzellen

Die in Keratinozytenwachstumsmedium aufgenommenen epithelialen Zellen (siehe Kapitel 2.1.5.4), wurden bis zu einer Konfluenz von ca. 80-90 % in 75 cm²-Flaschen bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert und bei höherer Konfluenz durch Zugabe einer 0,05 % Trypsin/0,02 % EDTA-Lösung passagiert. Anders als bei den Fettzellen wurde die Trypsinwirkung durch Zugabe von Trypsin-Inhibitor gestoppt. Mediumwechsel erfolgte jeden 2. oder 3. Tag. Zellen der dritten bis fünften Passage wurden für Stimulationsversuche auf 12-Loch-Platten (RNA und Überstände) sowie 6 cm Schalen (Proteinanalysen) ausplattiert.

2.3.3.3 Stimulation von gingivalen Epithelzellen mit LPS

Ähnlich wie in Kapitel 2.3.1.3 beschrieben wurden auch die GECs u.a. mit LPS von *P. gingivalis* stimuliert. Dafür wurde LPS in einer Konzentration von 2 µg/ml in das Keratinozytenmedium gegeben und die epithelialen Zellen bis zu 72 Stunden bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Die verwendete LPS Konzentration wurde in Vorversuchen bestimmt und so gewählt, dass eine inflammatorische Reaktion der GECs durch Analyse von IL-1β mRNA gewährleistet war.

Als Kontrollen dienten unstimulierte Zellen. Nach erfolgter Stimulation wurden die Zellen geerntet und dem jeweiligen Analyseverfahren zugeführt.

2.3.4 Gewinnung von zu analysierenden Proben aus der Zellkultur

Um den inflammatorischen Effekt und die Auswirkungen auf das Adiponektin-Adiponektinrezeptoren-System von LPS und IL-1β auf die differenzierten Adipozyten-ähnlichen Zellen bzw. gingivalen Epithelzellen zu analysieren, wurden nach erfolgreicher Stimulation sowohl zytosolische Zellextrakte, als auch der Zellkulturüberstand *per se* isoliert.

2.3.4.1 Gewinnung von Zellkulturüberständen

Direkt nach der Stimulation, wurde der Zellkulturüberstand von den betroffenen Zellen in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt, bei 800 g für 5 Minuten zentrifugiert und schließlich als zellfreier Überstand für eine spätere ELISA Analyse (siehe Kapitel 2.4.3.1) bei -80 °C eingefroren.

2.3.4.2 Gewinnung von Zellextrakten für die Proteinanalyse

Nachdem das Zellkulturmedium von den Zellen abgenommen wurde, wurden die Zellen nach Empfehlung des Herstellers wie folgt mit Radio-Immunoprecipitation Assay (RIPA, inklusive Protease Inhibitor) abgelöst und lysiert. Die Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die noch adhärenen Zellen mit 300 µl RIPA Puffer bedeckt und für 20 Minuten auf Eis schüttelnd inkubiert. Nach der Inkubation wurden

noch nicht lysierte Zellen mit einem Zellkulturschaber vom Untergrund gelöst, die Zellsuspension in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, und 10 Minuten bei 12000 g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde schließlich für folgende Proteinanalysen ebenfalls bei -20 °C eingefroren.

2.3.4.3 Gewinnung von Zellextrakten für die Genexpressionsanalyse

Nachdem das Zellkulturmedium von den Zellen abgenommen wurde, wurden die Zellen nach Empfehlung des Herstellers wie folgt mit Guanidin-Thiocyanat-haltigem RLTplus-Puffer abgelöst und lysiert. Neben dem RNase inhibierenden Guanidin-Thiocyanat wurden dem Puffer noch zusätzlich 1 % β -Mercaptoethanol zugeführt.

Die Zellen wurden zunächst zweimal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die noch adhären Zellen mit 300 μ l RLT-Puffer bedeckt und mit einem Zellkulturschaber vom Untergrund gelöst. Letztlich wurde die Zellsuspension in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, und bis zur weiteren Verarbeitung bei -80 °C eingefroren.

2.4 Biologische Analyseverfahren

2.4.1 Genexpressionsanalyse

Ein Ziel dieser Arbeit war es, die Veränderung von Genexpressionen diverser Zelltypen nach Stimulation durch LPS oder IL-1 β festzustellen. Zum Nachweis der Genexpressionsveränderung wurde dafür (1) die Gesamt-Ribonukleinsäure (*ribonucleic acid*, RNA) der stimulierten Zelltypen gewonnen (siehe Kapitel 2.4.1.1), (2) in die für folgende Analysen notwendige komplementäre Desoxyribonukleinsäureform (*complementary desoxyribonucleic acid*, cDNA, siehe Kapitel 2.4.1.2) umgeschrieben und schließlich (3) mittels der quantitativen Echtzeit-Polymerase-Ketten-Reaktion (*Real-Time polymerase chain reaction*, qPCR, siehe Kapitel 2.4.1.3) ausgewertet.

2.4.1.1 Isolation von Gesamtribonukleinsäuren

Im menschlichen Körper existieren diverse endogene Ribonukleinsäure (*ribonucleic acid*, RNA)-Typen, die zu besserer Unterscheidung anhand ihrer Funktionen klassifiziert

werden. So existiert neben den sog. nicht-kodierenden-RNAs, wie zum Beispiel der transfer-RNA (tRNA), ribosomaler-RNA (rRNA) oder micro-RNA (miRNA), die kodierende Boten-RNA (*messenger* RNA, mRNA). Eben diese mRNA ist für die Genexpression von entscheidender Bedeutung. Durch extra- oder intrazelluläre Signale können auf der DNA liegende Gene von der Zelle abgelesen, und in Form von mRNA zu den Ribosomen transportiert werden, wo diese als Matrize für die Proteinbiosynthese fungiert. Die Reaktion in Form einer differenziellen Genexpression einer Zelle auf einen externen Stimulus kann also durch Gewinnung der exprimierten mRNA bestimmt werden.

Die genauen Schritte der RNA-Isolation wurden mit Hilfe des *RNeasy Plus Mini Kit* nach Empfehlung des Herstellers durchgeführt und sind im entsprechenden Benutzerhandbuch nachzulesen.

Zusammengefasst wurde das Zelllysate mit gleicher Menge 70 %-igem Ethanol vermischt, auf eine Aufreinigungssäule gegeben und nach mehrfachem Waschen mit spezifischen Puffern in insgesamt 60 µl RNase-freiem Wasser eluiert. Beim *RNeasy Plus Mini Kit* ist zur RNA-Aufreinigung eine Entfernung von genomischer DNA der eigentlichen RNA-Isolation vorangeschaltet. Nach der RNA-Isolation erfolgte eine Quantifizierung des RNA-Gehaltes mittels photospektrometrischer Analyse bei einer Wellenlänge von 260 nm.

2.4.1.2 Synthese von komplementärer Desoxyribonukleinsäure

Um die aus den stimulierten Zellen isolierte Gesamt-RNA, und somit auch die mRNA, später mittels der qPCR analysieren zu können, wurde je 1 µg der isolierten Gesamt-RNA mit Hilfe des *iScriptTM Select cDNA Synthesis Kit* in cDNA umgeschrieben. Laut Herstellerangaben ergab sich pro Probe folgende Mastermix-Zusammensetzung:

Komponente	Volumen
5 x <i>iScript Selection Mix</i>	4 µl
odT-Primer	2 µl
iScript Reverse Transkriptase	1 µl
RNA <i>Template</i> (1 µg)	x µl
Nuklease-freies Wasser	add. 20 µl

Tab. 9: Zusammensetzung des cDNA-Synthese Reaktionsansatzes

Auflistung der Komponenten des cDNA-Synthese Reaktionsansatzes, sowie der verwendeten Anteile.

Die eigentliche Reaktion bezeichnet man als Reverse Transkription (RT). Dabei synthetisiert eine bakterielle RNA-abhängige DNA-Polymerase anhand der mRNA-Matrize den komplementären DNA-Strang. Die RT-Reaktion wurde in dem *MyCycler Thermal Cycler* durchgeführt und beinhaltete die unten aufgeführten Temperaturschritte (Tabelle 10). Anschließend wurden die cDNA-Proben bis zur weiteren Analyse bei -20 °C gelagert.

Temperatur	Zeit
25 °C	5 min
42 °C	90 min
85 °C	5 min
4 °C	Unendlich

Tab. 10: Temperaturzyklen der RT-Reaktion

Auflistung der einzelnen Temperaturschritte der RT-Reaktion unter Angabe der Temperatur, sowie der Zeit pro Temperaturschritt.

2.4.1.3 Quantitative Echtzeit-Polymerase-Ketten-Reaktion

Die quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (*Real-Time Polymerase Chain Reaction*, qPCR) ist ein Analyseverfahren zur Bestimmung des mRNA-Gehalts verschiedener Proben. Dabei wird die vorher in cDNA umgeschriebene mRNA der zu untersuchenden Probe in einer herkömmlichen PCR-Reaktion vervielfältigt. Während der Vervielfältigung wird der im Reaktionsansatz befindliche DNA-interkalierende Fluoreszenzfarbstoff, *SYBR-Green I*, in das Amplifikat eingebaut. Der so entstandene DNA/Fluoreszenzfarbstoff-Komplex absorbiert blaues Licht (Wellenlänge 494 nm) und emittiert dabei grünes Licht (Wellenlänge 521 nm). Je mehr Amplifikate pro PCR-Zyklus in einer solchen Reaktion entstehen, desto höher fällt die Emission des grünen Lichts, also die Fluoreszenz, aus. Ist also in einer Probe mehr mRNA vorhanden als in einer anderen, wird im Laufe der Amplifikation exponentiell mehr Fluoreszenz messbar. Die qPCR-Reaktion wurde in dieser Arbeit nach Angaben des Herstellers strikt nach Protokoll durchgeführt. Dabei ergab sich je cDNA Probe folgende Reaktionsansatz-zusammensetzung:

Komponente	Volumen
<i>iQTM SYBR[®] Green Supermix</i>	12,5 µl
Oligonukleotide-Mischung (250 nM)	0,125 µl
cDNA (50 ng)	1 µl
Nukleasefreies Wasser	ad 25 µl

Tab. 11: Zusammensetzung des qPCR Reaktionsansatzes

Auflistung der Komponenten des qPCR Reaktionsansatzes, sowie der verwendeten Anteile.

In dieser Arbeit wurde die Genexpression der bereits aufgelisteten Oligonukleotide (siehe Kapitel 2.1.7) in einer sog. Dreifachbestimmung untersucht. Dabei wurden pro zu untersuchendem Gen und pro Probe drei Reaktionsansätze pipettiert und in der späteren Analyse gemittelt. In einer Negativkontrolle wurde pro zu untersuchendem Gen statt cDNA, Nuklease-freies Wasser pipettiert. Die qPCR-Reaktion wurde in dem *iCycler*

iQ detection system durchgeführt und beinhaltet unten aufgeführte Temperaturschritte (siehe Tabelle 12).

Dabei wurden die nach der Initialdenaturierung befindlichen Schritte in 50 aufeinanderfolgenden Zyklen wiederholt und nach jedem Zyklus die Fluoreszenzintensität der jeweiligen Probe aufgezeichnet. Am Ende der Amplifikationszyklen schloss sich ein Dissoziations-Programm zur Aufzeichnung der Schmelzkurve an, um die Spezifität der entstandenen PCR Produkte zu überprüfen. Hierbei wird das gebildete PCR-Produkt in 10 Sekunden Intervallen von 55 °C beginnend in 0,5 °C-Schritten bis auf 95 °C erhitzt und gleichzeitig die Fluoreszenzintensität gemessen.

Ereignis	Temperatur	Zeit
Initialdenaturierung	95 °C	5 min
Denaturierung	95 °C	15 sek
Anlagerung	Primer-spezifisch (siehe Tabelle 6)	30 sek
Verlängerung	72 °C	30 sek

Tab. 12: Temperaturzyklen der qPCR-Reaktion.

Auflistung der einzelnen Temperaturschritte der qPCR-Reaktion unter Angabe der Temperatur, sowie der Zeit pro Temperaturschritt. Die dabei fett gedruckten Schritte unterlagen einer Wiederholung von 50 Zyklen.

Die so entstandenen Werte wurden mit Hilfe der bereits beschriebenen relativen Genexpressionanalyse verrechnet (Pfaffl et al., 2001). Die relative Genexpression beschreibt hierbei den Bezug des zu untersuchenden Gens zu einem Referenzgen, beispielweise β -Aktin, welches bestmöglich von der Zelle unter keinem externen Einfluss reguliert wird. Zunächst wird der sog. Zyklus-Grenzbereich-Wert (*crossing threshold value*, Ct-Wert) des zu untersuchenden Gens von dem Ct-Wert des Referenzgens abgezogen ($\Delta Ct = Ct_{\text{Referenzgen}} - Ct_{\text{zu untersuchendes Gen}}$). Der Ct-Wert entspricht exakt der Anzahl an PCR Zyklen, die nötig sind um die Amplifikations-abhängige Fluoreszenz einer Probe erstmalig signifikant über die Hintergrundfluoreszenz, also ein definiertes Fluoreszenzniveau, zu treiben. Schließlich berechnet man die relative Genexpression

durch den Bezug des ΔCt -Wertes des zu messenden Gens auf den ΔCt -Wert der unstimulierten Kontrolle mit der Formel $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ (Paffl et al., 2001).

2.4.2 Analyse von Nukleinsäurefragmenten via Gelelektrophorese nach PCR

Bei der Gelelektrophorese werden unterschiedlich große Nukleinsäure-Stränge Spannungs-abhängig aufgetrennt. Durch die negative Ladung der Nukleinsäuren, wandern diese bei Anlegen einer Spannung an das Agarosegel in Richtung der positiv geladenen Anode. Wie weit und wie schnell die Nukleinsäuren dabei durch die Agarosegelmatrix wandern, hängt von ihrer Größe ab. Kleine Nukleinsäurefragmente wandern vergleichsweise ungehindert am schnellsten in Richtung der positiv geladenen Anode, größere langsamer. Die Nukleinsäurefragmente werden dabei durch Zugabe von Ethidiumbromid, welches in die Nukleinsäurefragmente interkaliert, sichtbar gemacht. Ethidiumbromid reagiert mit Emission von Fluoreszenz auf ultraviolettes Licht, wobei sich die Lichtstärke proportional zur vorliegenden Nukleinsäure-Konzentration verhält.

Hierzu wurde ein 2 %iges Agarosegel in TBE-Puffer durch Erhitzen gelöst, und nach leichtem Abkühlen der Gellösung mit 0,1 % (Endkonzentration) Ethidiumbromid versetzt, bevor es letztlich in einen Gelschlitten überführt wurde und bis zur Aushärtung abgekühlt wurde. Das fertige Agarosegel wurde in eine Laufkammer überführt und mit dem TBE Laufpuffer bedeckt. Anschließend wurden die entsprechenden PCR-Produkte (Doppelbestimmung) mit 3 μl 10-fach Ladepuffer versetzt und in die entstandenen Taschen überführt. Parallel wurde in einer Tasche ein Referenzmarker (DNA-Leiter) aufgetragen. Letztlich wurde das Gel bei 100 Volt und 400 mA für 30 – 45 Minuten laufen gelassen und nach erfolgtem Lauf mittels UV-Licht im Geldokumentationssystem ChemiDoc XRSTM und mit der Software *Quantity One* analysiert bzw. dokumentiert.

2.4.3 Quantitative Proteinanalyse

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es, neben der Veränderung der Genexpression, die Veränderung der Proteinbiosynthese diverser Zelltypen nach Stimulation festzustellen, und somit letztlich eine Bestätigung der Genexpressionsanalysen zu erhalten. Zum Nachweis der Veränderung der Proteinbiosynthese wurde die Gesamtproteinmenge

einzelner Proben normiert und mittels eines quantitativen ELISA oder semiquantitativen sog. Western Blots dargestellt.

2.4.3.1 Analyse von Adiponektin mittels ELISA

Ein Ziel dieser Arbeit war es, festzustellen, ob sich die Menge an Adiponektin im Speichel bei Patienten die an Parodontitis erkrankt sind, von der Menge, die bei gesunden Patienten festzustellen ist, unterscheidet. Zum Nachweis wurde hierfür ein so genannter *Antigen-Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA), oder auch *Sandwich-ELISA* angewandt.

Prinzipiell bezeichnet ELISA ein auf Antikörpern basierendes Nachweisverfahren, welches es ermöglicht, bestimmte Substanzen, Proteine oder andere Bestandteile in Proben nachzuweisen. Hierfür wird ein Antigen-spezifischer Erstantikörper, auch Abfang-Antikörper (*capture*-Antikörper) genannt, auf eine Mikrotiterplatte gebunden. Dabei handelt es sich meist um einen monoklonalen Antikörper, der spezifisch an das Antigen bindet. Neben den zu untersuchenden Proben wird außerdem ein so genannter Standard zur exakten Bestimmung von Konzentrationen in die Löcher der Mikrotiterplatte pipettiert. Dabei beinhaltet der Standard eine definierte Menge an Antigen. Nachdem die in den Proben enthaltenen Antigene vom immobilisierten Antikörper gebunden wurden, wird ein weiterer für das Antigen spezifischer Meerrettichperoxidase (*horseradish-peroxidase*, HRP)-konjugierter Antikörper zugegeben. Nach Abwaschen nicht bindender Antikörper wird eine Substratlösung, bestehend aus hydrogenem Peroxid und Tetramethylbenzidin zugegeben. Durch die Umsetzung des Substrats von der an den Antikörper gebundenen HRP kommt es zu einem Farbumschlag, dessen Intensität mit dem Vorhandensein des jeweiligen Antigens steigt. Je mehr Antigen also im ersten Schritt gebunden wurde, umso stärker stellt sich der Farbumschlag dar. Die Intensität der Färbung ist schließlich fotometrisch messbar und durch Vergleich mit der Standardreihe berechenbar.

Die genauen Schritte des ELISAs wurden nach Empfehlung des Herstellers durchgeführt und sind im entsprechenden Benutzerhandbuch nachzulesen.

2.4.3.2 Analyse von humanem Adiponektin mittels Western Blot

Proteinbestimmung der Gesamtproteine

Die Gesamtproteinkonzentration wurde mittels des *Pierce BCA Protein Assay* bestimmt. Das Grundprinzip dieses kommerziellen Systems ist die Farbveränderung von Bicinchoninsäure (*bicinchoninic acid*, BCA) durch steigende Proteinkonzentration in einer Probe. Dabei wird das im alkalischen Reaktionspuffer enthaltene zweiwertige Kupfer (Cu^{2+}) mit dem in den zugegebenen Proben enthaltenen Protein zu einwertigem Kupfer reduziert (Cu^{1+}) (Biuret-Reaktion). Cu^{1+} reagiert nunmehr mit zwei BCA-Molekülen zu einem Chelat, welches einen Farbumschlag der Reaktionslösung bewirkt. Letztlich folgt eine fotometrische Quantifizierung verschiedener Verdünnungen der zu messenden Proben und eines bekannten Standards, wie in diesem Fall dem Rinderserumalbumin (*bovine serum albumin*, BSA).

Die Bestimmung wurde nach dem Protokoll des Herstellers durchgeführt und ist im entsprechenden Benutzerhandbuch nachzulesen. Kurz zusammengefasst wurden 25 μl der zu messenden Proben und des Standards in einer Verdünnungsreihe in eine 96-Loch-Platte gegeben, mit 200 μl BCA Reagenz (*BCA Working Reagent*) versetzt und bei 37 °C für 30 Minuten inkubiert. Anschließend wurden die Konzentrationen einzelner Löcher der Platte in dem Mikroplatten-Reader *Epoch* vermessen und anhand des Standards exakt bestimmt.

Vorbereitung von Proben für die Proteinanalyse

Die Konzentrationen der einzelnen zu messenden Proteinproben wurden zuerst angeglichen. Anschließend wurden die Proben mit speziellem Laemmli-Puffer (siehe Kapitel 2.1.3) vermischt und bei 95 °C 5 Minuten aufgekocht. In das Sammelgel wurde später pro Probe 7,5 – 15 μg Gesamtprotein aufgetragen.

Auftrennung von Proteinen mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Zunächst wurden die einzelnen Proteine mittels Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (*Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gelelectrophoresis*, SDS-PAGE) aufgetrennt. Dabei ist das im Gel und Puffer enthaltende SDS ein anionisches

Tensid, welches die Eigenladung einzelner Proteine überdeckt und selbigen eine konstante negative Ladung gibt, so dass die Proteine im elektrischen Feld nach ihrer Größe aufgetrennt werden können. Das Gel bildet dabei eine Matrix in dem Proteine größerer Molekülstruktur beim Hindurchwandern in Richtung der positiven Anode eher zurückgehalten werden als solche mit kleinerer Molekülstruktur.

Beim SDS-PAGE unterscheidet man zwei übereinander geschichtete Gele. Das sog. Sammelgel dient zum Laden und Sammeln der Proben in die bzw. an den Boden dieser dafür ausgesparten Taschen, das sog. Trenngel hingegen dient zur eigentlichen Auftrennung der einzelnen Proteine. Folgend wird die Zusammensetzung der einzelnen Gele detailliert und tabellarisch aufgeführt.

SDS-Gel	Lösungsbestandteile	Menge
Sammelgel (Gesamtmenge 5 ml)	H ₂ O dest.	3,4 ml
	30 % Acrylamidmix	0,83 ml
	10 % SDS	0,05 ml
	10 % Ammoniumpersulfat	0,05 ml
	1 M Tris (pH 6,8)	0,63 ml
	TEMED	0,005 ml
Trenngel (Gesamtmenge 10 ml)	H ₂ O dest.	4,0 ml
	30 % Acrylamidmix	3,3 ml
	10 % SDS	0,1 ml
	10 % Ammoniumpersulfat	0,1 ml
	1 M Tris (pH 6,8)	2,5 ml
	TEMED	0,004 ml

Tab. 13: Zusammensetzung von SDS-Gelen

Auflistung der Bestandteile des Sammelgels bzw. des Trenngels zur Durchführung der SDS-PAGE, sowie der verwendeten Mengen.

Die Polymerisation der zunächst flüssig angesetzten Gele geschieht durch Zugabe des Polymerisationskatalysators Tetramethylethylendiamin (TEMED) unmittelbar vor dem Gießen. Es wurde zunächst das Trenngel zwischen zwei dafür vorbereitete Glascheiben gegossen, um anschließend mit destilliertem Wasser überschichtet zu werden. Nach einstündiger Polymerisation wurde das destillierte Wasser abgegossen, das Trenngel mit einer 2 cm dicken Schicht Sammelgel übergossen und mit einem Kamm versehen, der die späteren Aussparungen für die Taschen darstellte. Nach erfolgter Polymerisation des Sammelgels konnte der Kamm entfernt, das Gel in eine dafür

speziell vorgesehene Elektrophorese-Apparatur eingespannt, und die zuvor mit Ladepuffer versetzten Proben in die Taschen geladen werden. Anschließend wurde die Elektrophoreseapparatur vollständig mit Ladepuffer (Zusammensetzung, siehe Kapitel 2.1.3) überdeckt. Neben den Proben wurden Marker mit bekannten Größen, wie der *Kaleidoscope Proteinmarker* oder der *Molecular Weight Standard* geladen, um das nachzuweisende Protein mittels Größenabgleich bestimmen zu können. Letztlich wurde die Elektrophorese-Apparatur mit einer Spannung von 200 V belegt und etwa eine Stunde laufen gelassen. Dabei wurde darauf geachtet, dass die kleinsten Banden der farbigen Proteinmarker nicht aus dem Gel hinausliefen.

Western Blot

Der Western Blot bezeichnet die Übertragung von Proteinen aus einem SDS-Trenngel, welches dem Auftrennen der einzelnen Proteine nach ihrer Größe dient, auf eine Protein-aufnehmende Membran mittels senkrechter Elektrophorese.

In dieser Arbeit wurde das sog. *Semidry-Blot* System verwendet. Dazu wurde die Nitrocellulosemembran zunächst 15 Minuten in Transferpuffer (siehe Kapitel 2.1.3) gewaschen. Bei der Verwendung einer Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran wurde diese zunächst nach Herstellerangaben aktiviert und in Transferpuffer gelagert. Anschließend wurde das Trenngel für ebenfalls 15 Minuten in Transferpuffer equilibriert und mit zugeschnittenen, in Transferpuffer getränkten Filterpapieren umlegt (2 x oben, 2 x unten). Anschließend wurde dieses „Sandwich“ aus Trenngel und Filterpapieren zwischen die Anode und Kathode der Western-Blot-Apparatur gepresst. Das eigentliche *Blotting* geschah innerhalb von ca. 45 min bei 20 Volt. Nach erfolgtem *Blotting* wurde die Membran kurz mit destilliertem Wasser gewaschen und für eine weitere Stunde in Blockierungspuffer aus TBS mit 0,1 % Tween (TBS-T) und 5 % Milchpulver inkubiert, um alle freien Bindungsstellen auf der Membran zu maskieren. Anschließend wurde die Membran dem immunologischen Nachweis mit hochaffinen, Zielprotein-spezifischen Antikörpern zugeführt. Dies geschah bei 4 °C über Nacht. Am nächsten Tag erfolgte dann nach ausführlichem Waschen mit TBST-Puffer eine Inkubation mit einem HRP-gekoppelten Sekundär-Antikörper für eine Stunde bei Raumtemperatur.

Die Visualisierung der Banden erfolgte schließlich durch Zugabe eines Chemiluminiszenz-Substrats. Die Detektion bzw. Quantifizierung der Banden wurde mit

dem ChemiDoc XRS™-Dokumentationssystem und der *Quantity One* Software durchgeführt.

2.4.4 Histologie

2.4.4.1 Fixierung, Konservierung und Schneiden von zu färbenden Proben

Die für diese Arbeit zu untersuchenden Gewebeproben wurden direkt nach der Entnahme 24 Stunden lang in Formalin fixiert und daraufhin in Paraffin eingebettet. Mit einem Mikrotom wurden die Paraffinblöcke anschließend in 2 µm dicke Schnitte geschnitten und auf *Super Frost* Objektträger aufgezogen. Für jegliche Art von Färbung wurden die auf den Objektträgern befindlichen Gewebeschnitte zur Entparaffinierung und Rehydrierung nach folgendem Schema durch eine absteigende Alkoholreihe geführt.

Alkohol	Zeit
Xylol (2 x)	10 min
abs. Alkohol (2 x)	5 min
96 %-iger Alkohol	5 min
70 %-iger Alkohol	5 min
Aqua dest.	5 min

Tab. 14: Absteigende Alkoholreihe

Auflistung der einzelnen Schritte bzw. Alkoholbäder der absteigenden Alkoholreihe zur Entparaffinierung von histologischen Schnitten.

2.4.4.2 Immunhistochemische Färbungen von Gewebeproben *in vivo*

Der Begriff Immunhistochemie bezieht sich auf einen Vorgang bei dem zelluläre Antigene der jeweilig untersuchten Gewebe durch Bindung spezifischer konjugierter Antikörper sichtbar gemacht werden (Ramos-Vara et al., 2005). So kann die Expression und Lokalisation bestimmter Zellkomponenten im histologischen Schnitt beurteilt

werden. In den meisten Fällen wird ein Enzym-gekoppelter Antikörper, wie etwa die bereits erwähnte HRP, verwendet, welche eine lokale Farbumschlags-Reaktion katalysiert.

Man unterscheidet die direkte und die indirekte Methode. Bei der direkten Methode ist der Primärantikörper bereits mit einem Enzym konjugiert. Nachdem der Antikörper an das Antigen gebunden hat, wird Substrat zugegeben, welches unter Bildung eines sichtbaren Farbstoffes mit dem Enzym reagiert. Bei der indirekten Methode hingegen wird nach dem Primärantikörper ein Sekundärantikörper aufgebracht, der sich gegen den erstaufgetragenen Antikörper richtet. Das Enzym liegt diesmal an den Sekundärantikörper gebunden vor. Auch hier wird eine Reaktion ausgelöst, die einen sichtbaren Farbstoff entstehen lässt. Alternativ kann der Sekundärantikörper auch an einen Fluoreszenzmarker gekoppelt sein (siehe Kapitel 2.1.8.2).

Nach Entparaffinieren der Gewebeschnitte wurden die Präparate in TBS-Puffer für zehn Minuten gewaschen. Darauf folgte die Blockierung der endogenen Peroxidase in 70 ml Methanol und 700 µl 30 %-iger Wasserstoffperoxid-Lösung (H_2O_2) für ebenfalls zehn Minuten. Die Inkubation mit dem Primärantikörper erfolgte nach abermaligem Waschen in TBS-Puffer über Nacht in einer mit feuchtem Papier ausgelegten Kunststoffbox bei 4 °C. Hierfür wurden die Primärantikörper gemäß einer vorherigen Austestung in TBS mit 1 % BSA verdünnt. Nach 24 Stunden wurde der Primärantikörper 10 Minuten lang in TBS-Puffer abgespült, der HRP-konjugierte Sekundärantikörper auf das Präparat gegeben und bei Raumtemperatur für eine Stunde inkubiert. Nachdem auch der Sekundärantikörper mit TBS-Puffer abgewaschen wurde, erfolgte die immunhistochemische Färbung mit Diaminobenzidin (DAB) in einer Konzentration von 1:10 für 10 Minuten. Nach abermaligem Waschen in TBS-Puffer konnte die Gegenfärbung mit Mayers saurem Hämalaun im Verhältnis 1:2 erfolgen.

Hämalaun ist ein bei niedrigem pH positiv geladener Farbstoff, und färbt daher negativ geladene basophile Strukturen, wie die DNA des Kernchromatins oder die RNA des endoplasmatischen Retikulums bläulich. Die Farbstofflösung wurde vor Gebrauch filtriert, um die Bildung von Färbeartefakten zu verhindern. Die Gewebeschnitte wurden einige Sekunden in das Hämalaunbad gegeben und anschließend in einer Küvette unter fließendem, lauwarmem Wasser für 4 Minuten gebläut. Nach einer weiteren Minute in einem Bad mit destilliertem Wasser wurden die Schnitte zur Konservierung in der unten

aufgeführten aufsteigenden Alkoholreihe (siehe Tabelle 15) wie folgt rehydriert und mit DePeX eingedeckt. Danach konnten die gefärbten Gewebeschnitte lichtmikroskopisch untersucht werden.

Alkohol	Zeit
abs. Alkohol (2 x)	2 min
Xylol (2 x)	2 min

Tab. 15: Aufsteigende Alkoholreihe

Auflistung der einzelnen Schritte bzw. Alkoholbäder der aufsteigenden Alkoholreihe zur Entwässerung von histologischen Schnitten nach immunhistologischer Färbung.

Um die Spezifität der verwendeten Antikörper zu kontrollieren, wurden bei jeder Färbung Negativkontrollen, also derselbe Ansatz ohne die Inkubation mit dem Primärantikörper, durchgeführt.

2.4.4.3 Immunfluoreszenz-Färbung an Zellen *in vitro*

Das Prinzip der Immunfluoreszenz-Färbung ist dem der Immunhistochemie sehr ähnlich. Der entscheidende Unterschied liegt darin, dass der Sekundärantikörper anstelle eines Farbstoff-umsetzenden Enzyms an einen beliebigen Fluoreszenzmarker gekoppelt ist. Somit ermöglicht die Immunfluoreszenz, auf Grund des möglichen Einsatzes mehrerer Fluorochrome, das Anfärben mehrerer Antigene. Da Fluorochrome nach Anregung mit der Emission bestimmter Fluoreszenzen reagieren, wurden die Färbungen anstatt mit einem Lichtmikroskop unter einem Fluoreszenzmikroskop untersucht.

In dieser Arbeit wurden kultivierte gingivale Epithelzellen und Adipozyten-ähnliche Zellen der Immunfluoreszenz-Färbung unterzogen. Nachdem sie für 15 Minuten in einer 4 %-igen Paraformaldehyd-Lösung (in PBS, pH 7,4) fixiert und mit PBS gewaschen wurden, folgte über 15 Minuten eine Permeabilisation der fixierten Zellen in einer 0,1 %-igen Triton X-100 (in PBS) Lösung. Danach wurden die Zellen gewaschen und die Bindungsstellen mit einer 10 %-igen 5 %-igen BSA-Lösung für eine Stunde bei Raumtemperatur blockiert. Anschließend wurden die Zellen mit dem bereits erwähnten Primärantikörper bei 4 °C über Nacht in einer feuchten Kammer inkubiert. Nachdem dieser mit PBS abgewaschen wurde, folgte über eine Stunde bei Raumtemperatur die

Inkubation mit dem Cyanin 3 (Cy3)-konjugierten Sekundärantikörper. Für die Färbung von Zellkernen wurden die Zellen, nach einem erneuten Waschschrift mit PBS, außerdem mit 4',6-Diamidin-2-phenylindiol (DAPI, 0,1 µg/ml) für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach mehrmaligem, gründlichem Waschen wurden die Zellen mit Mowiol/DABCO eingedeckt, um sie unter dem Fluoreszenzmikroskop untersuchen zu können.

2.4.4.4 Öl-Rot Färbung von Gewebeproben *in vivo*

Der Nachweis differenzierter, lipidhaltiger Zellen erfolgte durch die Öl-Rot-Färbung. Öl-Rot ist stark lipophil und lagert sich somit an zelluläre Fette an.

Die Zellen wurden dazu zunächst in PBS-Lösung gewaschen und anschließend für eine Stunde in 3,7 %-iger Formaldehydlösung fixiert. Für die eigentliche Lipidfärbung wurden die Zellen schließlich nach dem unten aufgeführten Zeitschema mit 0,3%-iger Öl-Rot-Lösung (in 60% Isopropanol-Lösung) gefärbt. Nach Entfernen der Lösung wurden die Zellen zweimal mit Reinstwasser gewaschen und konnten anschließend untersucht werden.

Komponente	Zeit
60% Isopropanol	1 min
Öl-Rot-Lsg.	30 min
Reinstwasser	kurz
Reinstwasser	1 min

Tab. 16: Abfolge der Öl-Rot-Färbung

Auflistung der einzelnen Schritte der Öl-Rot Färbung von histologischen Schnitten zur Anfärbung von Fettvakuolen.

Nach dem letzten Waschschrift mit Reinstwasser konnte die Gegenfärbung mit Mayers saurem Hämalaun im Verhältnis 1:2 erfolgen. Anschließend wurden die Präparate mit Hilfe von Aquatex auf vorbereitete Objektträger fixiert.

2.4.5 Statistik

Alle gezeigten Daten sind als Mittelwert (MW) \pm mittlerer Standardfehler (*standard error of the mean*, SEM) dargestellt und wurden mit Hilfe des Tabellenkalkulationsprogramms *Excel* berechnet. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Statistikprogramm *GraphPad Prism 5*. Signifikante Unterschiede zwischen der Kontrolle und den einzelnen Gruppen wurden mit einer einfaktoriellen Varianzanalyse (*One-way-ANOVA*) und dem *Tukey's multiple comparison test* bestimmt. Unterschiede zwischen zwei Gruppen wurden mit dem *Student's t-Test* berechnet. Als Signifikanzniveau wurde $p < 0,05$ gewählt.

3. Ergebnisse

3.1 Expression des Adiponektinsystems in humanen Gingivabiopsien und gingivalen Epithelzellen

3.1.1 Untersuchung an Gingiva-Schnitten *in vivo*

Um den vermuteten Effekt einer Entzündung auf die Expression des Adiponektinsystems, also von Adiponektin und seinen Rezeptoren, genauer zu untersuchen, wurden zunächst histologische Schnitte von humaner, nicht-parodontal erkrankter Gingiva einer immunhistochemischen Untersuchung unterzogen. Den gesunden Status der Schnitte konnte man dabei an der klaren und definierten Struktur der epithelialen Reteleisten (Abb. 5, schwarze Pfeile), vor allem aber an der Abwesenheit von inflammatorischen Zellen im Gewebe erkennen. Letztlich war die komplette Gewebestruktur gänzlich unauffällig.

Weiter konnten die einzelnen Komponenten des Adiponektinsystems, welche im zentralen Interesse der vorliegenden Arbeit standen, immunhistochemisch nachgewiesen werden. So zeigte die Immunhistochemie von Adiponektin (Abb. 5 B bzw. B'), des Adiponektinrezeptors 1 (AdipoR1, Abb. 5 D und D') bzw. des Adiponektinrezeptors 2 (AdipoR2, Abb. 5 F und F') in besagten nicht-parodontal erkrankten Gingiva-Schnitten eine eindeutige Färbung (DAB, braun) im epithelialen Bereich der Gingiva. Während Adiponektin zytoplasmatisch lokalisiert vorlag, waren die zugehörigen Rezeptoren erwartungsgemäß vermehrt in der Zellmembran lokalisiert.

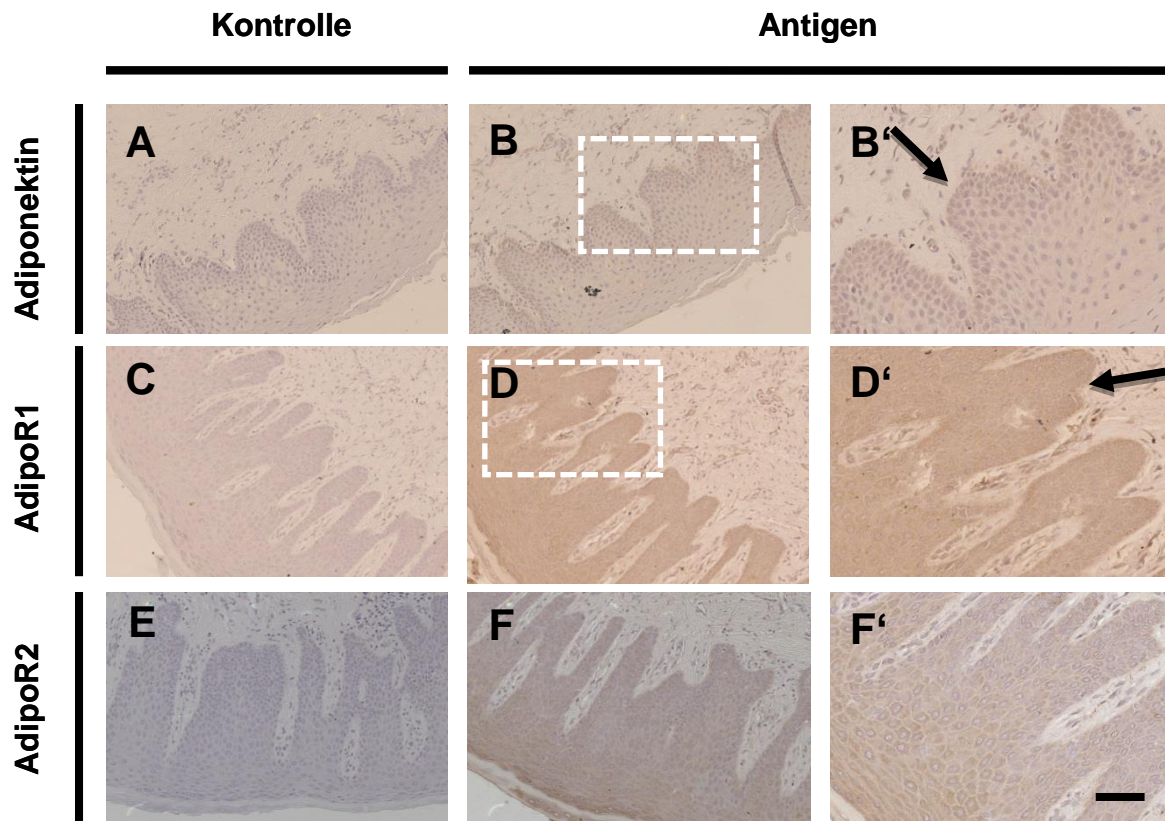


Abb. 5: Immunhistologie von Adiponektin bzw. den zugehörigen Adiponektinrezeptoren 1 und -2 in gesunder Gingiva *in vivo*. Gezeigt sind die immunhistochemischen Nachweise in verschiedenen Vergrößerungen (gestrichelter Kasten in B und D für B' und D') von Adiponektin (B und B', bräunlich), Adiponektinrezeptor 1 (AdipoR1, D und D', bräunlich) sowie Adiponektinrezeptor 2 (AdipoR2, F und F') bzw. die dazugehörigen 1. AK Kontrollen (A, C und E). Pfeile in B', D' und F' zeigen die epitheliale Expression der aufgeführten Marker. Balken für B', D' und F' = 50 µm, für alle anderen Bilder 100 µm.

3.1.2 Untersuchung an gingivalen Epithelzellen *in vitro*

Weiterhin wurde an Kulturen von gingivalen Epithelzellen (*gingival epithelial cells*, GECs) eine immunhistochemische Fluoreszenzfärbung vorgenommen, um eine mögliche Expression von Adiponektin, sowie den zugehörigen AdipoR1 und -2 zunächst auf Einzelzellebene an gesunden, also unstimulierten gingivalen Zellen nachzuweisen.

Die immunhistologische Färbung von Adiponektin (Abb. 6 A), AdipoR1 und -2 (Abb. 6 B bzw. C) zeigte eine deutliche Expression in bzw. auf GECs *in vitro* im Vergleich zu der ungefärbten Kontrolle (Daten nicht gezeigt). Dabei konnte eine zytoplasmatische Lokalisation von Adiponektin gezeigt werden. Weiter deutet die gekörnte Anfärbung

beider Adiponektinrezeptoren auf eine Membranständigkeit hin, welche allerdings Rezeptor-untypisch nicht vor allem konzentriert am Rand der GECs auftrat.

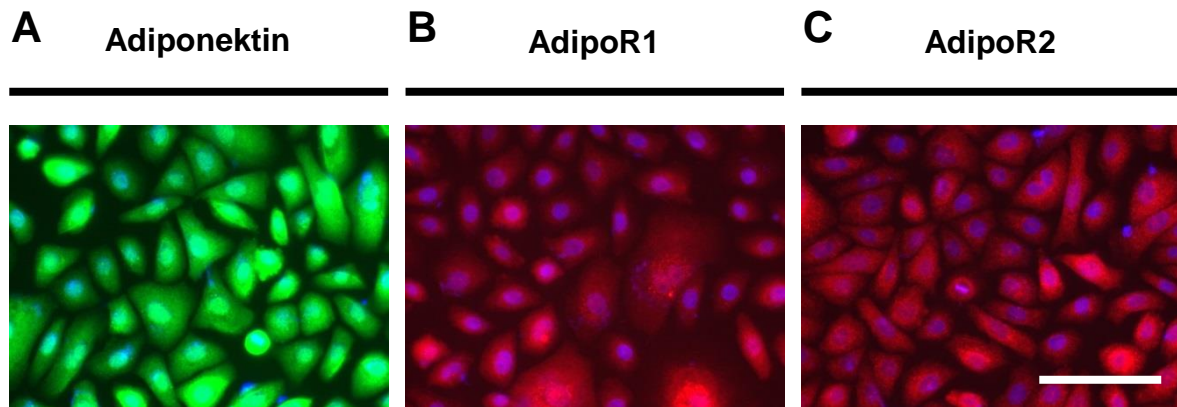


Abb. 6: Immunhistologische Färbung von Adiponektin und den zugehörigen Adiponektinrezeptoren in gingivalen Epithelzellen *in vitro*. Gezeigt sind die immunhistochemischen Nachweise der Expressionen von Adiponektin (A, Alexa488 in Grün), Adiponektinrezeptor 1 (B, AdipoR1, Cy3 in Rot) sowie Adiponektinrezeptor 2 (C, AdipoR2, Cy3 in Rot). Außerdem erkennbar die Kernfärbung mit DAPI (Blau).

Adiponektin ist dabei deutlich in bzw. auf den Einzelzellen (Kernfärbung, Hoechst, blau) zu erkennen. Während Adiponektin eher zytoplasmatisch exprimiert vorliegt, ist die Expression von AdipoR1 und -R2 auf Grund der gekörnten Struktur als tendenziell membranständig zu bewerten. Balken für A - C = 100 μm .

3.2 Adipogenese von murinen und human Zellen und Einfluss auf die Expression des Adiponektinsystems

3.2.1 Differenzierung von murinen Fibroblasten zu Adipozyten *in vitro*

Adiponektin wird hauptsächlich in weißem Fettgewebe produziert und nach Sekretion über den Blutkreislauf ins Zielgewebe transportiert (Smolinska et al., 2014). Daher wurden in dieser Arbeit Fettzellen als Adiponektin-produzierende Zellen untersucht. Hierfür wurden murine und humane Zellen zunächst nach bekannten Protokollen zu reifen Adipozyten differenziert. Folgend werden zunächst die Untersuchungen einer erfolgten Adipogenese dargestellt.

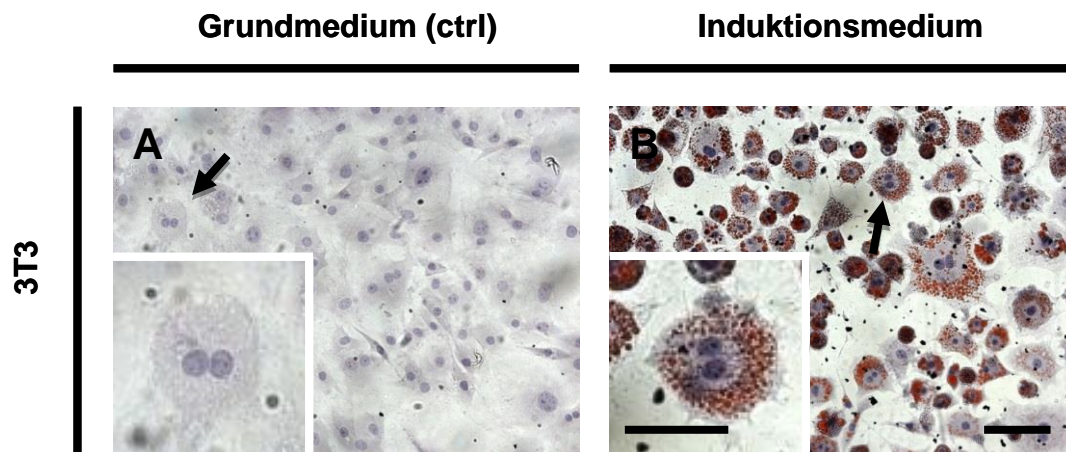


Abb. 7: Öl-Rot-Färbung von undifferenzierten- und differenzierten Adipozyten-ähnlichen murinen 3T3-Fibroblasten. Die Differenzierung mittels Adipogenese-Induktionsmedium (B) ist in den entstandenen Fettvakuolen der einzelnen Zellen (HE-Gegenfärbung, Kerne, violett-blau) im Gegensatz zur Kontrolle mit Grundmedium ohne Zusätze (A) deutlich zu erkennen (Öl-Rot, in Rot). Dabei deuten die schwarzen Pfeile auf proliferative Zellen (zwei Kerne pro Zelle) hin (Vergrößerung in den Insets). Balken für A und B = 50 μ m, für Insets = 25 μ m.

Um eine erfolgreiche Differenzierung zu Adipozyten-ähnlichen Zellen nachzuweisen, wurde zunächst an murinen 3T3-L1-Fibroblasten eine Öl-Rot-Färbung vorgenommen, welche typischerweise genutzt wird, um Fettvakuolen in Zellen darzustellen.

Während die 3T3-L1-Fibroblasten unter Kultur in Grundmedium, also ohne Differenzierungsreiz, keinerlei positive Öl-Rot Färbungen aufwiesen (Abb. 7 A), konnte unter Kultivierung in Induktionsmedium und somit eingeleiteter Differenzierung ein deutlicher Anstieg an charakteristischen Fettvakuolen im Zytoplasma der Zellen beobachtet werden (Abb. 7 B).

Außerdem wurden typische Differenzierungsmarker der Adipogenese mittels quantitativer Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (qPCR) auf ihre relative Genexpression mit und ohne Differenzierung untersucht (Abb. 8). Hierbei zeigte sich eine klare Induktion auf mRNA-Niveau besagter Adipozyten-Differenzierungsmarker nach Differenzierung. Die relative Genexpression des *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma* (PPAR γ , Wert 4,76 \pm SEM 0,42), *CCAAT-enhancer-binding protein alpha* (C/EBP α , 20,59 \pm 2,18), sowie von Perilipin (1094,49 \pm 148,77) stieg deutlich und im Vergleich zur nicht differenzierten Kontrolle (1,00 \pm 0,01) signifikant an. Einzig die Expression von C/EBP β (0,22 \pm 0,02) zeigte im Vergleich zur Kontrolle eine signifikante Herunterregulation (Abb. 8 A).

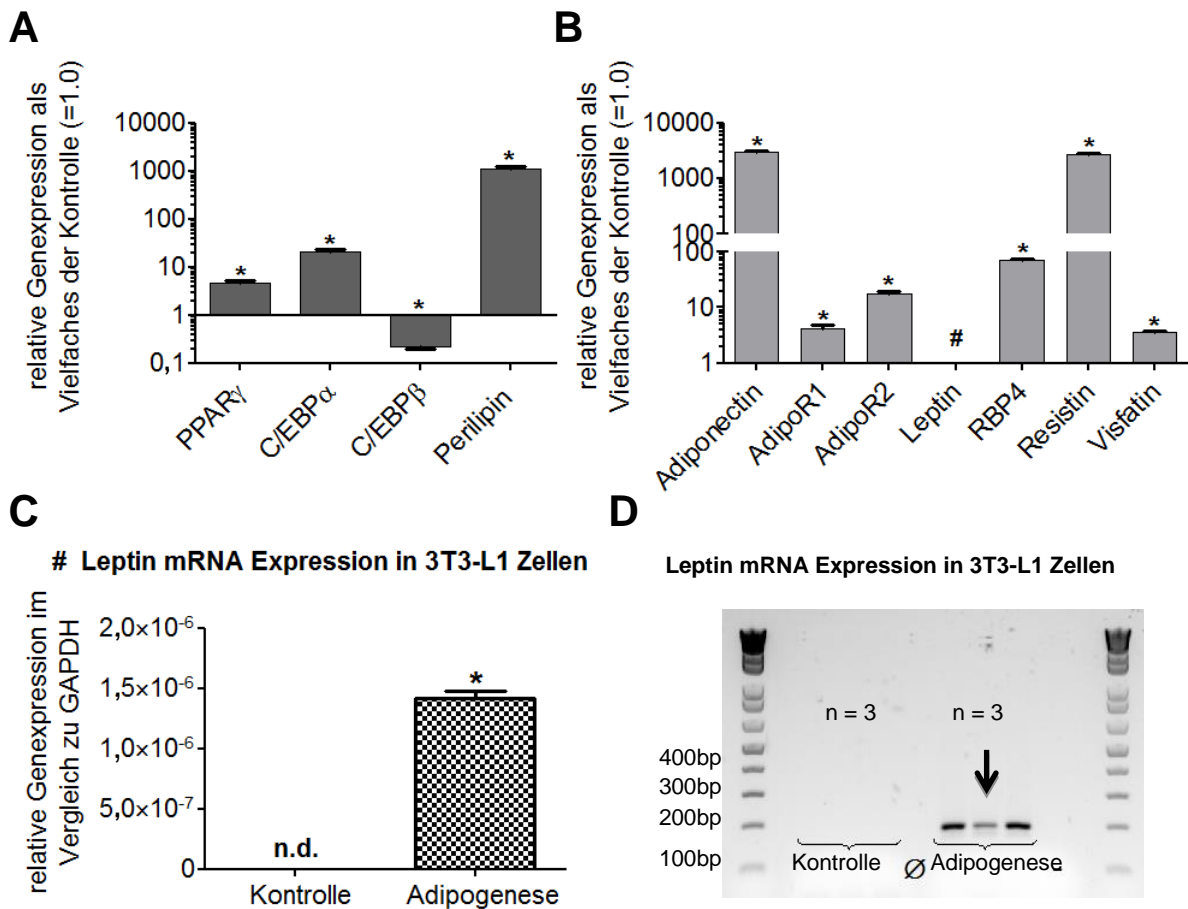


Abb. 8: Relative Genexpressionen von typischen Differenzierungsmarkern der Adipogenese sowie verschiedenen Adipokinen in undifferenzierten und differenzierten, Adipozyten-ähnlichen 3T3-L1-Fibroblasten. Differenzierte, Adipozyten-ähnliche 3T3-L1-Fibroblasten zeigen allgemein einen signifikanten Anstieg der aufgeführten meisten Differenzierungsmarker (A). Ausserdem sind alle aufgeführten Vertreter der Adipokine signifikant induziert (B). (C) Vergrößerte Darstellung (aus B, #) der Leptin mRNA-Genexpression nach gleicher Stimulation. Hierbei auffällig die zwar sehr schwache aber signifikante Heraufregulation der mRNA-Genexpression. (D) Gelelektrophorese der amplifizierten mRNA in einer Dreifachbestimmung. Hierbei ist die während der Adipogenese-Stimulation gebildete Leptin-mRNA deutlicher zu erkennen (schwarzer Pfeil). (A) und (B) normiert auf Kontrolle (undifferenzierte 3T3-L1-Fibroblasten), * $p < 0,05$, Vergleich zur Kontrolle, *Unpaired t-test*.

Die Untersuchung der relativen Genexpression verschiedener Adipokine sowie der beiden Adiponektinrezeptoren nach erfolgter Differenzierung der 3T3-L1-Fibroblasten zu Adipozyten-ähnlichen Zellen zeigte eine deutliche und signifikante Hochregulation von Adiponektin ($2988,26 \pm 174,90$) und Resistin ($2719,69 \pm 153,55$), sowie eine ebenfalls signifikante, jedoch deutlich schwächere Regulation von *Retinol-binding protein 4* (RBP4, $70,46 \pm 3,09$) und Visfatin ($3,59 \pm 0,25$). Die Genexpressionen der beiden Adiponektin-

rezeptoren zeigten ebenfalls signifikante Erhöhungen (AdipoR1: $4,24 \pm 0,52$ bzw. AdipoR2: $17,82 \pm 1,47$) (Abb. 8 B). Interessanterweise konnte in der undifferenzierten Kontrolle keine Leptin-mRNA detektiert werden, diese wurde allerdings durch die Differenzierung induziert (Abb. 8 C). Zur sicheren Bestätigung der Leptin mRNA-Expression in differenzierten 3T3-L1-Fibroblasten wurden die PCR-Amplifikate durch Gelelektrophorese und Ethidiumbromidfärbung sichtbar gemacht. Hier konnte letztlich die Induktion der Leptin-mRNA Genexpression deutlich gezeigt werden (Abb. 8 D).

3.2.2 Differenzierung von humanen SW-872-Zellen zu Adipozyten-ähnlichen Zellen *in vitro*

Neben der Differenzierung von murinen 3T3-L1-Fibroblasten wurden auch humane Zellen der Adipogenese unterzogen. Auch die Öl-Rot-Färbung der humanen SW-872-Liposarkomzellen zeigte nach induzierter Adipogenese, wie schon bei den 3T3-L1-

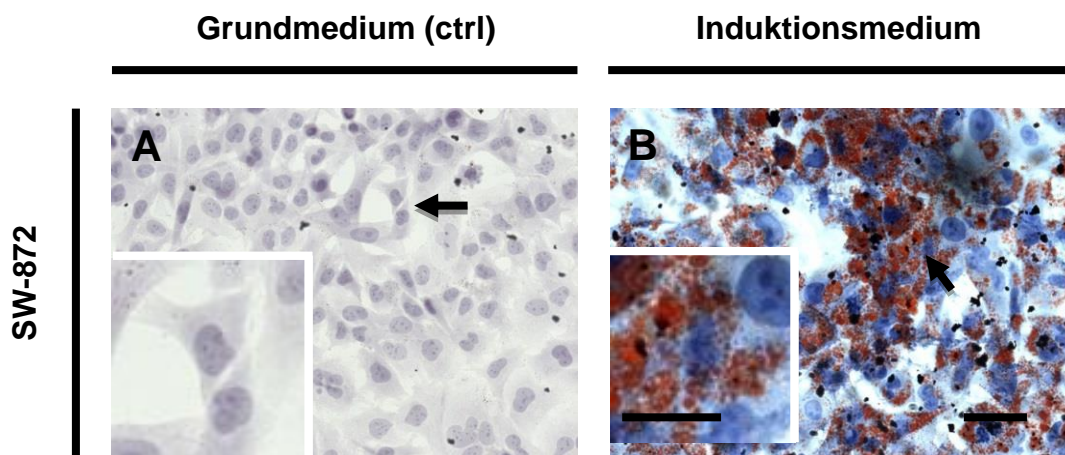


Abb. 9: Öl-Rot-Färbung von undifferenzierten- und differenzierten Adipozyten-ähnlichen humanen SW-872-Liposarkomzellen. Die Differenzierung mittels Adipogenese-Induktionsmedium (B) ist in den entstandenen Fettvakuolen der einzelnen Zellen (Hämalaun-Gegenfärbung, Kerne, violett-blau) im Gegensatz zur Kontrolle mit Grundmedium ohne Zusätze (A) deutlich zu erkennen (Öl-Rot, rot). Dabei deuten die schwarzen Pfeile auf die Vergrößerungen (Insets) hin. Balken für A und B = 50 μm , für Insets = 25 μm .

Fibroblasten, die im Zuge der Differenzierung entstandenen Zytoplasma-ständigen Fettvakuolen (Abb. 9 B), welche im Kontrollbild an undifferenzierten Zellen nicht vorhanden waren (Abb. 9 A).

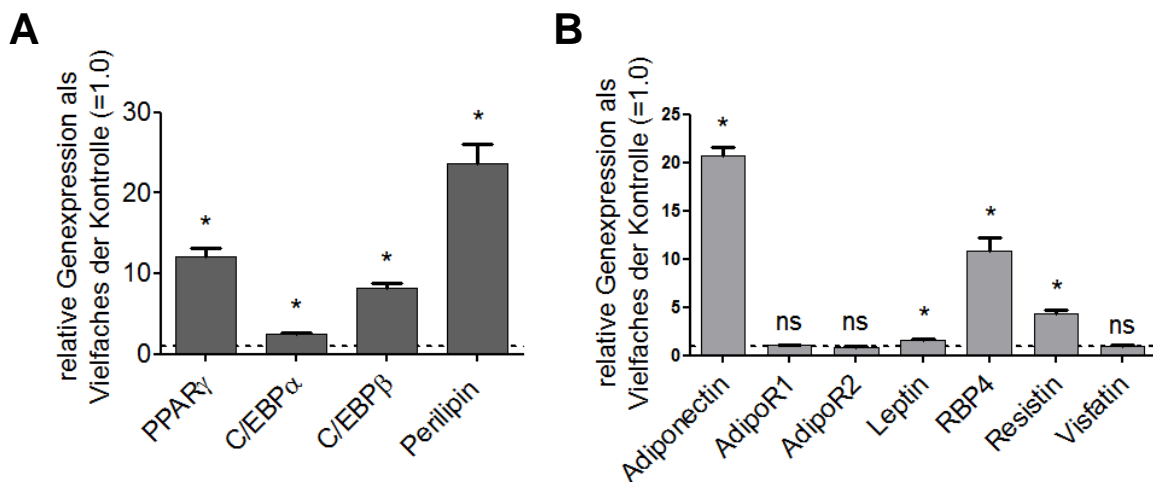


Abb. 10: Relative Genexpressionen von typischen Differenzierungsmarkern der Adipogenese. (A) sowie verschiedenen Adipokinen (B) in differenzierten, Adipozyten-ähnlichen SW-872-Liposarkomzellen in Bezug auf undifferenzierte SW-872-Liposarkomzellen (Kontrolle, Expressionslevel: gestrichelte Linie). Während differenzierte, Adipozyten-ähnliche SW-872-Liposarkomzellen einen signifikanten Anstieg der aufgeführten Differenzierungsmarker zeigen, sind lediglich Adiponectin, RBP4 sowie Resistin als Vertreter der Adipokine signifikant stärker exprimiert. Die Adiponectin-rezeptoren 1 und -2 sind nicht signifikant erhöht (ns). * $p < 0,05$, Vergleich zur Kontrolle, *Unpaired t-test*.

Weiterhin wurden erneut typische Differenzierungsmarker mittels qPCR untersucht. Hierbei zeigte sich eine Regulation von diversen Differenzierungsmarkergenen nach erfolgter Differenzierung. Dabei stieg die relative Genexpression von PPAR γ (Wert $12,03 \pm \text{SEM } 1,07$), Perilipin ($23,62 \pm 2,37$) sowie C/EBP β ($8,25 \pm 0,56$) deutlich und im Vergleich zur Kontrolle ($1,05 \pm 0,16$) signifikant an. Auch C/EBP α ($2,47 \pm 0,12$) zeigte trotz geringerer Erhöhung einen letztlich signifikanten Anstieg seiner relativen Genexpression (Abb. 10 A).

Des Weiteren wurde die relative Genexpression verschiedener Adipokine untersucht (Abb. 10 B). Hierbei zeigte sich nach erfolgter Differenzierung der SW-872-Liposarkomzellen zu Adipozyten-ähnlichen Zellen eine deutliche und signifikante Hochregulation von Adiponectin- ($20,70 \pm 0,93$) und RBP4-mRNA ($10,88 \pm 1,28$), sowie eine ebenfalls signifikante, jedoch deutlich schwächere Regulation der Adipokin-mRNA von Leptin ($1,53 \pm 0,11$) und Resistin ($4,33 \pm 0,32$). Keine, bzw. keine signifikante (*not significant*, ns) Veränderung der Genexpression nach erfolgter Adipogenese zeigte sich bei Visfatin ($0,94 \pm 0,08$) sowie bei AdipoR1 ($1,07 \pm 0,02$) und -2 ($0,86 \pm 0,11$).

3.3 Expression des Adiponektinsystems in humanen und murinen Adipozyten-ähnlichen Zellen

Weiter wurden immunhistochemische Fluoreszenzfärbungen an den bereits aufgeführten Adipozyten-ähnlichen Zellen - differenzierten humanen SW-872-Liposarkomzellen sowie murinen 3T3-L1-Fibroblasten - durchgeführt. Beide Zelllinien wurden zuvor dem Adipogeneseprotokoll unterzogen, um sie zu besagten Adipozyten-ähnlichen Zellen zu differenzieren.

3.3.1 Adipozyten-ähnliche murine Fibroblasten *in vitro*

Zunächst wurde an 3T3-L1-Fibroblasten eine vergleichende immunhistologische Färbung (Fluoreszenzfärbung) sowohl an undifferenzierten als auch an differenzierten Zellen durchgeführt. Hierbei zeigte sich sowohl in undifferenzierten, als auch in differenzierten

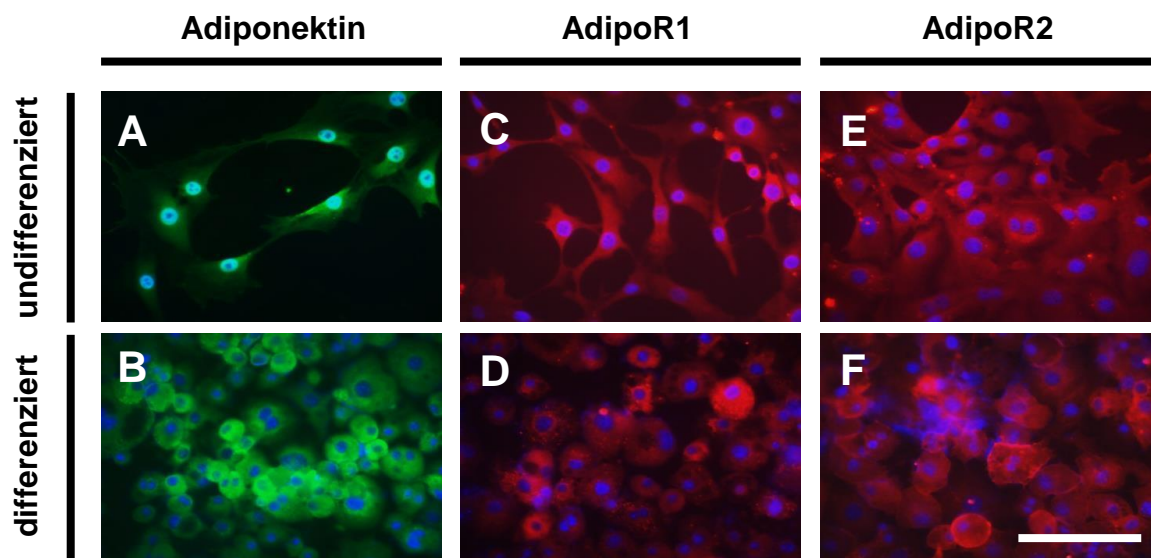


Abb. 11: Immunhistologische Färbung von Adiponektin und den zugehörigen Adiponektinrezeptoren in 3T3-L1-Fibroblasten. Dabei 3T3-L1-Fibroblasten ohne Differenzierung (A, C, E) und nach Durchlaufen der Adipogenese (differenziert, B, D, F). Die Expressionen von Adiponektin (A, B, Alexa488, grün), des Adiponektin-rezeptors 1 (AdipoR1, C, D, Cy3, rot) sowie -2 (AdipoR2, E, F, Cy3, rot) sind deutlich zu erkennen. Während Adiponektin eher zytoplasmatisch exprimiert vorliegt, ist die Expression von AdipoR1 und -2 auf Grund der gekörnten Struktur als membranständig zu deklarieren. Balken für A - F = 100 μ m.

3T3-L1-Fibroblasten eine Expression von Adiponektin (Abb. 11 A und B) und von AdipoR1 (Abb. 11 C und D) und -2 (Abb. 11 E und F) bei gleichzeitig veränderter Morphologie der Zellkulturen. Letztere zeigte prinzipiell eine erhöhte Zellzahl und Ausbleiben einer ausgeprägten fibroblastären Ausdehnung einzelner Zellen *in vitro*.

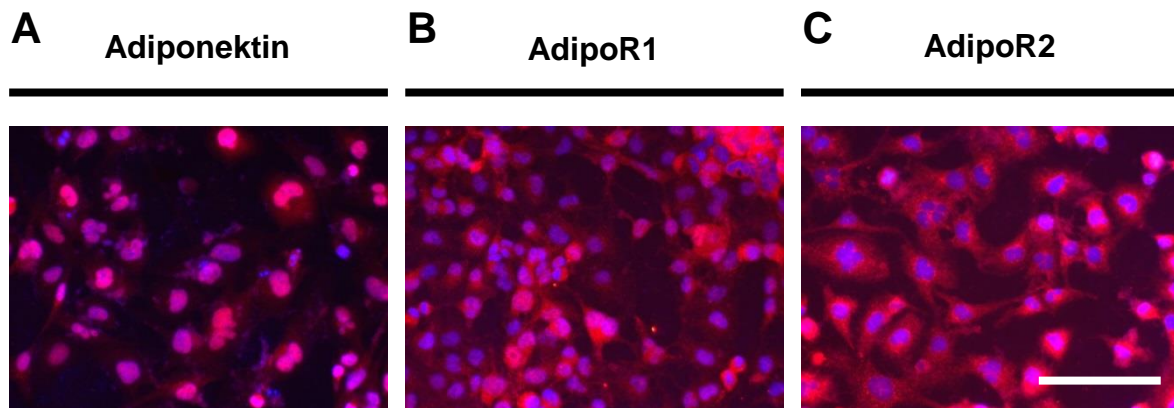


Abb. 12: Immunhistologische Färbung von Adiponektin bzw. den zugehörigen Adiponektinrezeptoren in SW-872-Liposarkomzellen. Dabei SW-872-Liposarkomzellen nach Durchlaufen der Adipogenese. Die Expressionen (alle Cy3, rot) von Adiponektin (A), Adiponektinrezeptor 1 (AdipoR1, B) sowie -2 (AdipoR2, C) sind hierbei im Vergleich zu den zugehörigen Kontrollen (Daten nicht gezeigt) deutlich in bzw. auf den Einzelzellen (Kernfärbung, Hoechst, blau) zu erkennen. Adiponektin liegt hier größtenteils scheinbar kernständig, AdipoR1 und -2 teilweise zytoplasmatisch, meist aber membranständig vor. Balken für A - C = 100 μm .

3.3.2 Adipozyten-ähnliche humane SW-872-Zellen *in vitro*

Die immunhistologische Färbung von Adiponektin (Abb. 12 A), AdipoR1 und -2 (Abb. 12 B bzw. C) zeigte ebenfalls eine deutliche Expression in bzw. auf zu Adipozyten-ähnlichen differenzierten SW-872-Liposarkomzellen. Im Vergleich zu den bereits oben gezeigten 3T3-L1-Fibroblasten (Abb. 11) wurde hier eine vermeintliche Kernlokalisierung des Adiponektinsignals beobachtet. Vergleichbar hingegen zeigte sich eine membranständige Lokalisation beider Adiponektinrezeptoren.

3.3.3 Nachweis des Adiponektinsystems in humanen und murinen Proben mittels Gelelektrophorese

Zum Nachweis einzelner Komponenten des Adiponektinsystems wurde aus allen in der vorliegenden Arbeit verwendeten humanen und murinen Proben Gesamt-RNA *ex vivo*

bzw. *in vitro* isoliert und nach Umschreiben in cDNA deren mRNA Expression via PCR mit nachfolgender Gelelektrophorese und Ethidiumbromidfärbung verifiziert.

Die Adiponektinamplifikate aus zu Adipozyten differenzierten murinen 3T3-L1-Fibroblasten (Abb. 13 C) zeigten die erwartete Größe von etwa 240 Basenpaaren (bp). In zu Adipozyten differenzierten humanen SW-872-Liposarkomzellen zeigte sich eine ebenfalls erwartete Größe der Adiponektinamplifikate von etwa 220 bp (Abb. 13 D). Weiter zeigten die humanen *ex vivo* Kulturen von GECs, sowie die Proben aus humaner Gingiva ebenfalls eine Adiponektinamplifikatgröße von etwa 220 bp (Abb. 13 A und B).

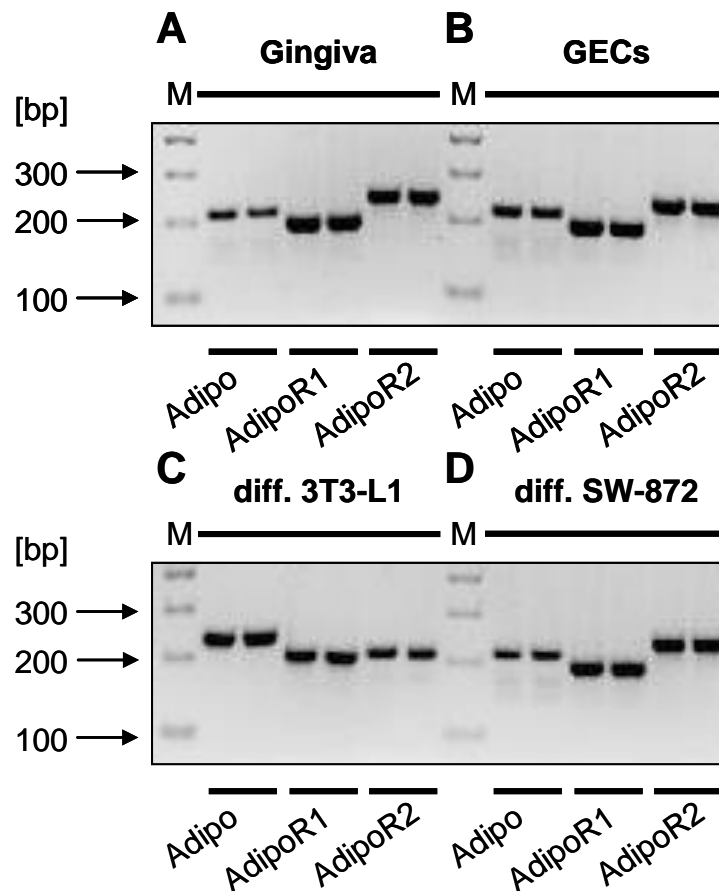


Abb. 13: Nachweis von Adiponektin bzw. den zugehörigen Adiponektinrezeptoren 1 und -2 in humanen und murinen Proben.

Gelelektrophoretischer Nachweis von mRNA (in Basenpaaren, bp) nach Amplifikation via PCR von Adiponektin (murin: 239 bp, human: 214 bp), Adiponektinrezeptor 1 (203 bp, 193 bp) und -2 (213 bp, 239 bp) aus humaner Gingiva (A), humanen GECs (B), murinen differenzierten (diff.) 3T3-L1-Fibroblasten (C) sowie humanen diff. SW-872-Liposarkomzellen (D). (Marker, M, in bp).

Auch die Adiponektinrezeptoren wiesen die erwarteten Größen, nämlich für AdipoR1 etwa 190 bp in allen humanen Proben (Abb. 13 A, B und D) und 200 bp in murinen Proben (Abb. 13 C), sowie für AdipoR2 etwa 240 bp in humanen (Abb. 13 A, B und D) und etwa 210 bp in murinen Proben (Abb. 13 C) auf.

3.4 Auswirkung von Parodontitis auf die Adiponektinsekretion im Speichel

3.4.1 Klassifizierung parodontal-erkrankter und gesunder Probanden

Für die im Folgenden beschriebene Untersuchung wurde acht gesunden, also nicht parodontal erkrankten Probanden, sowie elf an Parodontitis erkrankten Patienten eine Speichelprobe entnommen. Die Patienten wurden zuvor gebeten einen Anamnesebogen auszufüllen, sowie Angaben zu ihrer häuslichen Mundhygiene zu machen.

Einen signifikanten Unterschied zwischen beiden Patientengruppen stellte zunächst das Alter dar. So waren die gesunden Patienten im Durchschnitt 27,3 (\pm 2,6) Jahre alt, die an Parodontitis erkrankten hingegen waren im Mittel 51,4 (\pm 12,6) Jahre alt. Der Anteil an Frauen betrug in der Gruppe der Gesunden 75 %, bei den an Parodontitis erkrankten Patienten lag er bei 45 %. Weiterhin unterschieden sich die Gruppen hinsichtlich des *Body Mass Index* (BMI), welcher bei der parodontal-erkrankten Gruppe im Vergleich zur gesunden Gruppe im Durchschnitt zwar nur leicht aber doch signifikant erhöht vorlag. Hochsignifikante Unterschiede konnten sowohl beim Vergleich von durchschnittlicher Sondierungstiefe als auch beim Blutungsindex festgestellt werden. Bei jedem Patienten wurde ein Parodontalstatus erstellt und der Grad der Sondierungstiefen weiter in die Kategorien (1) größer als 3,5 mm bzw. (2) größer als 5,0 mm festgelegt. Hierbei konnte festgestellt werden, dass nicht erkrankte Patienten keine Zähne mit der Sondierungstiefe der Kategorien 1 und -2 aufwiesen, jedoch 79,1 % (\pm 16,9 %) der Zähne parodontal-erkrankter Patienten die Sondierungstiefe 1 und 71,9 % (\pm 12,7 %) eine Sondierungstiefe 2 aufwiesen (Tabelle 17).

Die mittlere Sondierungstiefe - bestimmt durch die Sondierungstiefen pro Patient bezogen auf die Anzahl der Zahnfleischtaschen - der gesunden Probanden lag bei 1,76 mm (\pm 0,23 mm), bzw. der Blutungsindex bei 5,06 % (\pm 2,88 %), wohingegen die mittlere

Sondierungstiefe der parodontal-erkrankten Patienten deutlich und signifikant erhöht bei 3,47 mm ($\pm 0,54$ mm) bzw. der Blutungsindex bei 32,14 % ($\pm 14,47$ %) lag.

	Keine Erkrankung	Parodontal- erkrankung	Signifikanz
Alter	27,3 \pm 2,6	51,4 \pm 12,6	***
Anteil weiblich [%]	75	45	---
Körpergröße [cm]	175,0 \pm 7,0	173,0 \pm 6,0	ns
Körpergewicht [kg]	73,0 \pm 15,9	81,5 \pm 12,1	ns
<i>Body Mass Index</i> (BMI) [kg/m ²]	23,6 \pm 3,5	27,1 \pm 3,2	*
Zähne mit Sondierungstiefe über 3,5 mm [% von Ges.]	0 \pm 0	79,1 \pm 16,9	***
Zähne mit Sondierungstiefe über 5,0 mm [% von Ges.]	0 \pm 0	71,9 \pm 12,7	***
Mittlere Sondierungstiefe	1,76 \pm 0,23	3,47 \pm 0,54	***
Blutungsindex [%]	5,06 \pm 2,88	32,14 \pm 14,47	***

Tab. 17: Studienrelevante demographische Patientendaten. Vergleichend Patienten ohne – bzw. mit parodontaler Erkrankung. * $p < 0,05$, *Unpaired t-test*, ns = nicht signifikant.

3.4.2 Adiponektinstatus im Speichel parodontal erkrankter und gesunder Patienten

Um das Adiponektinsystem am gesunden- bzw. erkrankten Patienten untersuchen zu können, wurde den im Kapitel zuvor beschriebenen Patienten beider Gruppen eine Speichelprobe entnommen und die Speichelsekretionsrate pro Minute aufgezeichnet. Im Speichel wurde dann mittels *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) die Adiponektinkonzentration bestimmt und aufgrund der unterschiedlichen Speichelsekretionsrate der Patienten die sezernierte Menge an Adiponektin pro Minute errechnet. Dabei konnte bei der nicht-erkrankten Probandengruppe (1,04 \pm 0,36 ng/min) gegenüber der an Parodontitis-erkrankten Probandengruppe (0,52 \pm 0,19) eine tendenziell aber nicht

Adiponektinmenge im Speichel

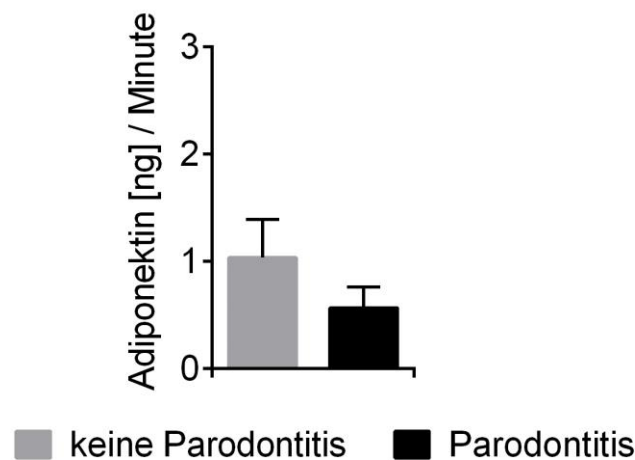


Abb. 14: Adiponektinmenge pro Minute im Speichel. Gezeigt von gesunden (keine Erkrankung, grauer Balken) und parodontal-erkrankten Patienten (Parodontitis, schwarzer Balken) mit tendenziell höherer, aber nicht signifikanter, Menge bei gesunden Patienten.

signifikant erhöhte Menge an Adiponektin im Speichel bestimmt werden (Abb. 14).

Beim Vergleich der Werte von männlichen und weiblichen Probanden zeigte sich, dass die untersuchten Frauen, die nicht an einer parodontalen Erkrankung litten, eine höhere Menge von Adiponektin im Speichel aufweisen ($1,59 \text{ ng} \pm 0,39 \text{ ng/min}$), als Männer der gesunden Gruppe ($0,16 \pm 0,11 \text{ ng/min}$) (Tabelle 18).

Bei den parodontal erkrankten weiblichen Probanden konnte ausserdem eine signifikant erniedrigte Adiponektin-Menge im Speichel ($0,42 \pm 0,04 \text{ ng/min}$) im Vergleich zu den weiblichen Probanden ohne parodontalen Befund festgestellt werden, wohingegen die Menge bei parodontal erkrankten männlichen Probanden ($0,67 \pm 0,27 \text{ ng/min}$) im Vergleich zur gesunden Testgruppe tendenziell höher vorlag (Tabelle 18).

	Keine Erkrankung	Parodontal- erkrankung	Signifikanz
Adiponektinmenge Männer [ng/min]	$0,16 \pm 0,05$	$0,67 \pm 0,27$	ns
Adiponektinmenge Frauen [ng/min]	$1,59 \pm 0,31$	$0,42 \pm 0,04$	*

Tab. 18: Adiponektinmenge im Speichel. Adiponektinmengen in ng/min im Vergleich von männlichen und weiblichen Patienten ohne bzw. mit parodontaler Erkrankung. * $p < 0,05$, *Unpaired t-test*, ns = nicht signifikant.

3.5 Auswirkung von Parodontitis auf die Expression des Adiponektinsystems in Gingiva-Biopsien *in vivo*

Wie bereits zuvor an Schnitten gesunder Gingiva erfolgt, wurden nun auch Schnitte parodontal erkrankter Gingiva hinsichtlich des Adiponektinsystems untersucht. Der entzündliche Status der Proben ist hierbei an der massiven Infiltration von Entzündungszellen (Abb. 15 A und E, schwarze Pfeile), sowie der aufgelösten Struktur der Reteleisten (Abb. 15 E und F', weiße Pfeile) zu erkennen.

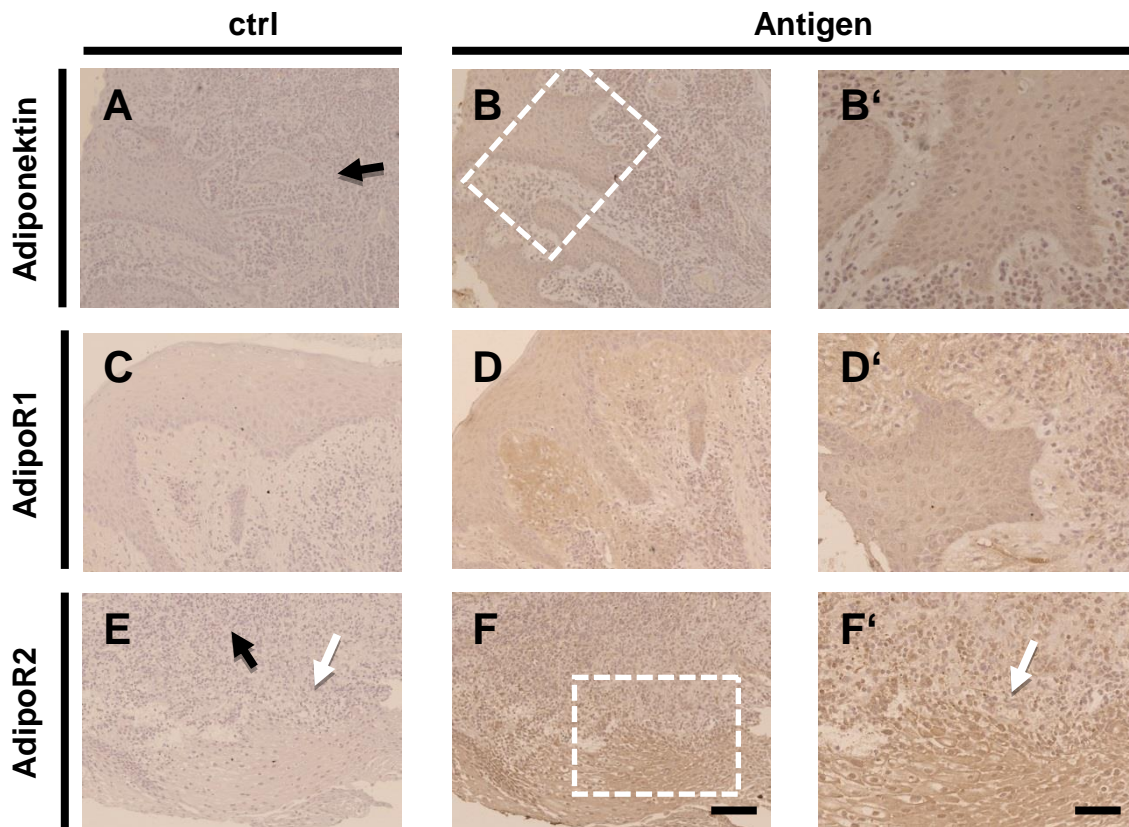


Abb. 15: Immunhistologie von Adiponektin bzw. den zugehörigen Adiponektinrezeptoren in parodontal-erkrankter Gingiva. Gezeigt sind dabei die immunhistochemischen Nachweise in verschiedenen Vergrößerungen (gestrichelter Kasten in B und F für B' und F') von Adiponektin (B und B', bräunlich), Adiponektinrezeptor 1 (AdipoR1, D und D', bräunlich) sowie Adiponektinrezeptor 2 (AdipoR2, F und F', bräunlich) bzw. die dazugehörigen 1. AK Kontrollen (A, C und E). Deutlich zu erkennen ist die Infiltration von Immunzellen (schwarze Pfeile in A und E) sowie die nicht mehr vorhandene Reteleistenstruktur (weiße Pfeile in E und F'). Balken für B', D' und F' = 50 µm, für alle anderen Bilder 100 µm.

Adiponektin (Abb. 15 B bzw. B') und die zugehörigen Adiponektinrezeptoren 1 (AdipoR1, Abb. 15 D bzw. D') und -2 (AdipoR2, Abb. 15 F bzw. F') konnten auch im entzündeten

Gewebe (Abb. 15 A, B und C) nachgewiesen werden. Hier zeigt die immunhistochemische Färbung im Epithel der entsprechenden Gingivaschnitte eine deutlich erkennbare Färbung (DAB, braun).

Allerdings konnte bei der Auswertung verschiedener Präparate ein eher heterogenes Bild beobachtet werden. So wurde in einigen der Proben von an Parodontitis-erkrankten Patienten eine deutliche Färbung von Adiponektin und seiner Rezeptoren nachgewiesen, welche bei anderen Präparaten zum Teil kaum vorhanden war. So zeigt Abb. 16 vergleichend den immunhistologischen Nachweis von Adiponektin an einem Präparat gesunder Gingiva sowie einem Präparat von parodontal erkrankter Gingiva. Abermals ist das erkrankte Präparat an der deutlichen Auflösung der Reteleisten-Struktur sowie an der massiven Infiltration von Entzündungszellen zu erkennen. Am gesunden Präparat ist hier eine deutliche Adiponektin-Färbung des Epithels zu erkennen (Abb. 16 A), wohingegen das Präparat des chronischen erkrankten Parodonts nur eine schwache Färbung aufweist (Abb. 16 B).

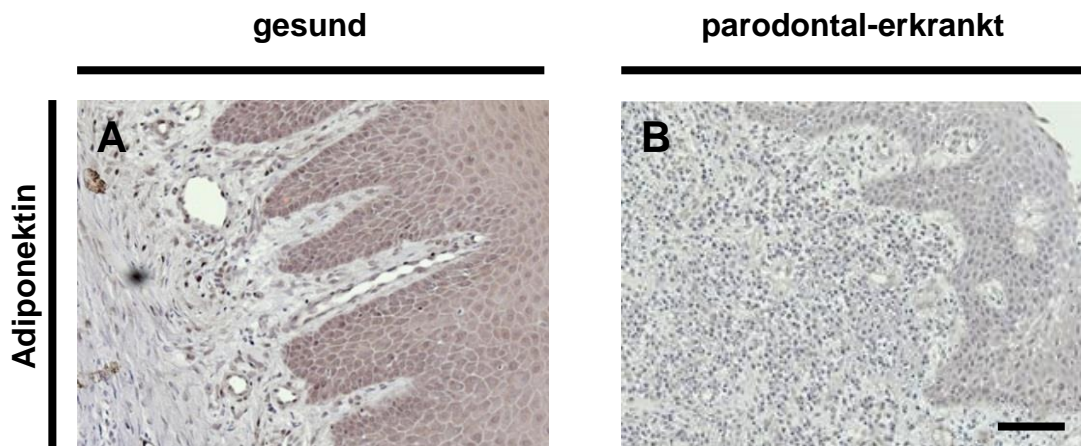


Abb. 16: Immunhistologie von Adiponektin in gesunder sowie parodontal-erkrankter Gingiva. Vergleich von (A) gesundem und (B) erkranktem Gewebe (chronische Parodontitis). Im erkrankten Gewebe sind die Auflösung der Reteleisten sowie die Einwanderung von Entzündungszellen (Infiltrat) deutlich zu erkennen. Dabei Adiponektinexpression beim Präparat des chronisch erkrankten Parodonts deutlich geringer. Balken für A und B= 100 µm.

3.6 Auswirkung von Inflammation auf die Expression des Adiponektinsystems *in vitro*

Nachdem nunmehr die veränderte Expression des Adiponektinsystems unter Berücksichtigung einer Parodontitis-erkrankung im Gewebeschnitten nachgewiesen werden konnte, wurde folgend die genaue Auswirkung von Entzündungen im Zellkulturmodell an beteiligten Zellen genauer untersucht.

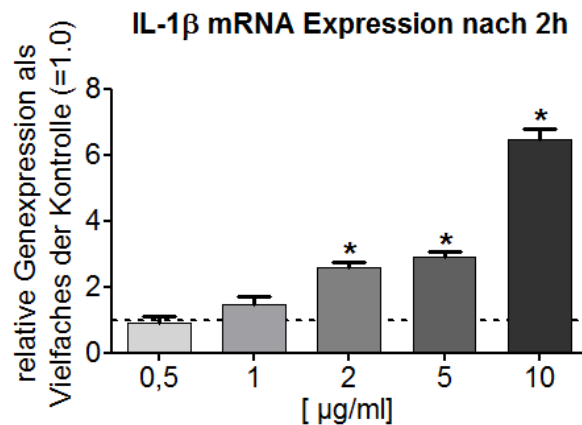


Abb. 17: Relative Genexpression von Interleukin 1 beta (IL-1β) nach Stimulation gingivaler Epithelzellen mit Lipopolysacchariden *in vitro* (LPS-Titrierung). Gezeigt in Bezug auf unstimulierte gingivale Epithelzellen (*gingival epithelial cells*, GECs) (Kontrolle, Expressionslevel: gestrichelte Linie). Die Stimulation mit 2 µg/ml LPS oder mehr (5 µg/ml bzw. 10 µg/ml) zeigt hierbei eine deutlich signifikante Erhöhung der IL-1β Expression.
* $p < 0,05$, Vergleich zur Kontrolle, *One-Way ANOVA*.

3.6.1 Exemplarische Klassifizierung des Entzündungsstatus in GECs

Um festzulegen, wann im *in vitro* Modell vom Vorliegen einer Inflammation gesprochen werden kann, wurde an GECs exemplarisch eine Titrierung mit pro-inflammatorischen Lipopolysacchariden von *P. gingivalis* (LPS) durchgeführt und die IL-1β mRNA Expression als Maß des Entzündungsstatus bestimmt. Die GECs wurden hierzu mit jeweils unterschiedlichen Konzentrationen von LPS stimuliert (0,5 µg/ml, 1 µg/ml, 2 µg/ml, 5 µg/ml und 10 µg/ml).

Ab einer Konzentration von 2 µg/ml LPS zeigte sich eine signifikante Induktion der IL-1β-mRNA-Genexpression im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle (Abb. 17, gestrichelte Linie). Somit war durch die Zugabe dieser Konzentration eine inflammatorische Reaktion gewährleistet, weshalb sie im Folgenden zur Stimulation der gingivalen Epithelzellen

weiterverwendet wurde. Bei den anderen Zellsystemen (SW-872 und 3T3-L1) konnte schon ab der Gabe von 1 µg/ml LPS eine inflammatorische Antwort der Zellen auf mRNA-Niveau gemessen werden, so dass hier mit 1 µg/ml LPS stimuliert werden konnte (Daten nicht gezeigt).

3.6.2 Auswirkung von Inflammation auf das Adiponektinsystem in GECs

Um die inflammatorische Reaktion der GECs hinsichtlich des Adiponektinsystems zu untersuchen, wurden die GECs auf Grund der Vorversuche (Abb. 17) mit 2 µg/ml LPS stimuliert. Es erfolgten daraufhin zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Stimulation (4, 8, 24 und 72 Stunden) Quantifizierungen der mRNA-Expression von Adiponektin, AdipoR1 sowie AdipoR2. Zur Kontrolle wurden unstimulierte GECs zeitgleich untersucht (Abb. 18). Hierbei nahm die relative Genexpression von Adiponektin-mRNA der mit LPS-stimulierten Zellen nach 8 Stunden kontinuierlich ab und erreichte bei der Messung nach 24 Stunden erstmals einen signifikanten Unterschied ($0,666 \pm 0,07$) im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 18 A).

Die Quantifizierung der relativen Genexpression von AdipoR1-mRNA bei stimulierten Zellen ergab einen noch deutlicheren Abfall über 72 Stunden hinweg. Ein signifikanter Unterschied gegenüber den unstimulierten Zellen war auch hier nach 24 Stunden erstmals messbar ($0,60 \pm 0,04$) (Abb. 18 B).

Demgegenüber wurde die Genexpression von AdipoR2-mRNA bei stimulierten Zellen zunächst marginal hochreguliert und erreichte nach 24 Stunden eine signifikant erhöhte Induktion der Genexpression ($1,22 \pm 0,06$). Daraufhin fiel die Expression jedoch bis zur Messung nach 72 Stunden stark und signifikant ab ($0,41 \pm 0,06$) (Abb. 18 C).

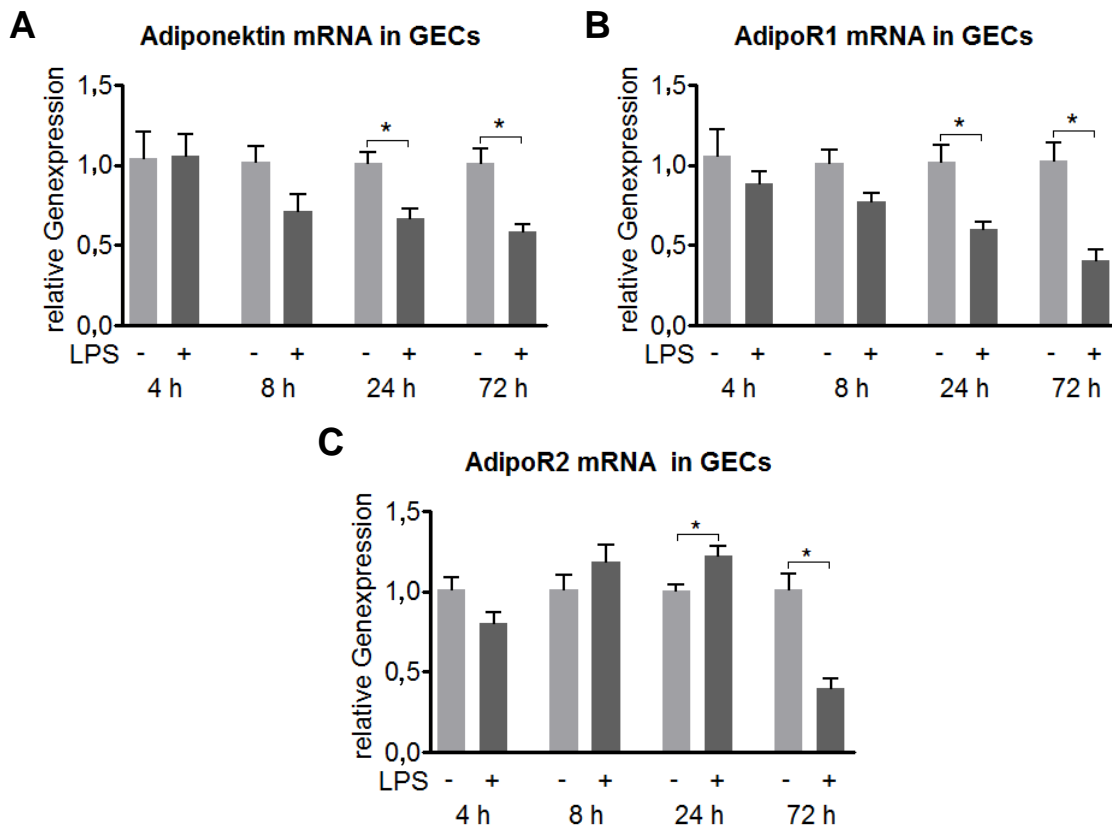


Abb. 18: Relative Genexpression von Adiponektin bzw. Adiponektinrezeptor 1 (AdipoR1) und -2 (AdipoR2). Gezeigt 4, 8, 24 sowie 72 Stunden (h) nach Stimulation gingivaler Epithelzellen (*gingival epithelial cells*, GECs) mit Lipopolysacchariden (LPS +, 2 µg/ml) bzw. unstimulierter GECs (Kontrolle, LPS -). * $p < 0,05$, Vergleich zur Kontrolle, *Unpaired t-test*.

3.6.3 Auswirkung von Inflammation auf das Adiponektinsystem in differenzierten murinen Fibroblasten

Analog zu den GECs wurde auch an murinen Adipozyten-ähnlichen Zellen (aus 3T3-L1-Fibroblasten) der Entzündungsstatus mittels qPCR klassifiziert. Hierfür wurden die zu Adipozyten-ähnlichen Zellen differenzierten 3T3-L1-Fibroblasten stimuliert und zu unterschiedlichen Zeitpunkten (4, 8, 24 und 72 Stunden nach Stimulation) auf ihre inflammatorische Reaktion hin untersucht.

Es wurde mit unterschiedlichen Konzentrationen LPS (1 µg/ml, 10 µg/ml) stimuliert. Da das parodontale Krankheitsbild und die periphere Lokalisation von Adipozyten vermuten lässt, dass Adipozyten *in vivo* allerdings weniger auf orales LPS, als mehr auf im Blut zirkulierendes IL-1 β reagieren, wurde außerdem mit IL-1 β (1 ng/ml, 10 ng/ml) stimuliert. Um hier zunächst klassifizieren zu können, ob ein Entzündungsstatus vorliegt, wurden die

Zellen hinsichtlich der Expression von TNF- α und IL-6 untersucht. Außerdem wurde der Einfluss der Stimulation auch hinsichtlich der Expression des Adiponektinsystems untersucht.

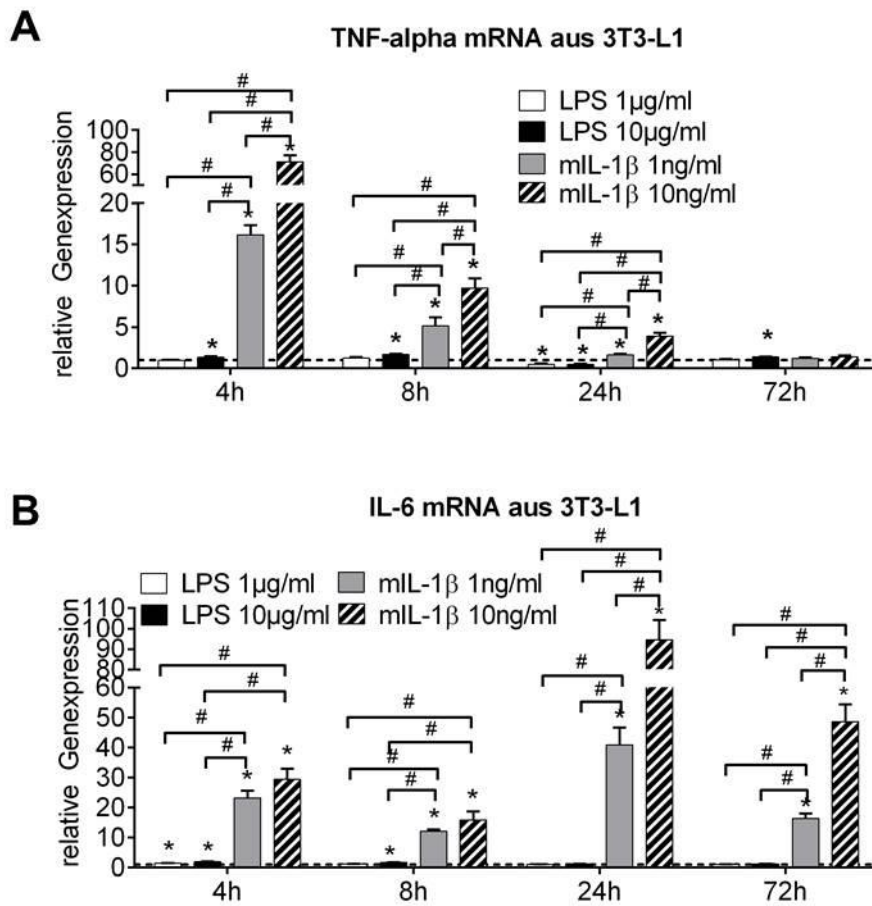


Abb. 19: Relative Genexpression von typischen Entzündungsmarkern in differenzierten 3T3-L1-Fibroblasten nach Stimulation *in vitro*. Relative Genexpression von Tumornekrosefaktor alpha (TNF α , A) und Interleukin 6 (IL-6, B) nach 4, 8, 24 sowie 72 Stunden (h) nach Stimulation von 3T3-L1-Fibroblasten mit Lipopolysacchariden (LPS, 1 μ g bzw. 10 μ g/ml) bzw. mit Interleukin 1 beta (IL-1 β , 1 ng bzw. 10 ng/ml) *in vitro*.

* $p < 0,05$, Vergleich zur Kontrolle, *Unpaired t-test*/# $p < 0,05$, *One-Way ANOVA*.

Generell konnte sowohl eine zur unstimulierten Kontrolle hochsignifikante als auch konzentrationsabhängige Induktion der TNF- α mRNA-Expression gemessen werden (Abb. 19 A). Ausserdem wurde eine signifikante aber nicht vollends konzentrationsabhängige Induktion der IL-6 mRNA-Expression (Abb. 19 B) durch Stimulation mit pro-inflammatorischem IL-1 β , nicht aber durch Stimulation mit LPS, beobachtet.

Während das Maximum der TNF- α mRNA-Expression ($71,17 \pm 6,1$) durch Stimulation mit 10 ng/ml IL-1 β bereits nach 4 Stunden erreicht wurde und stetig bis 24 Stunden nach Stimulation abfiel (hier letztmalig signifikant zur unstimulierten Kontrolle vorlag), konnte 72 Stunden nach Stimulation keine veränderte Expression der TNF- α mRNA nachgewiesen werden. Lediglich die Stimulation mit einer vergleichsweise hohen Konzentration von LPS (10 μ g/ml), nicht aber die Stimulation mit deutlich weniger LPS (1 μ g/ml) konnte eine signifikante Erhöhung der Entzündungsmediatoren bewirken. Hierbei zeigte sich jedoch, dass die LPS-stimulationsbedingte Induktion höchst signifikant schwächer ausfiel als selbige mit IL-1 β . Interessanterweise hielt jedoch im Vergleich zur IL-1 β Stimulation die erhöhte TNF- α mRNA-Expression auch 72 Stunden nach Stimulation mit LPS an (Abb. 19 A).

Das mRNA-Expressionsniveau von IL-6 verhielt sich bei gleichen Stimulationen tendenziell vergleichbar zur TNF- α mRNA-Expression und erreichte die deutlich höchste Induktion (abermals konzentrationsabhängig) 24 Stunden nach Stimulation mit IL-1 β \pm 9,8) (Abb. 19 B).

Die Stimulation mit LPS sowohl der hohen und niedrigen Konzentration sowie die Stimulation mit der höheren Konzentration an IL-1 β führte 4 Stunden nach Stimulation zu einer marginalen, aber signifikanten Induktion der Adiponektin mRNA-Expression ($1,85 \pm 0,18$). Nach 8-, 24- und 72 Stunden Stimulation konnte hingegen eine signifikante Herunterregulation der Adiponektin mRNA-Expression beobachtet werden (Abb. 20 A).

Die Adiponektinrezeptoren 1- und 2 zeigten zu den frühen Zeitpunkten nach Stimulation mit LPS oder IL-1 β eine signifikante Erniedrigung ihrer mRNA-Expression. Für AdipoR1 konnte auch nach 24 Stunden eine Reduktion im Vergleich zur Kontrolle beobachtet werden, während sich das Expressionsniveau für AdipoR2 24 Stunden nach den pro-inflammatorischen Stimuli normalisierte. Auffällig hierbei war für die Stimulation mit 1 ng/ml IL-1 β , dass sogar eine signifikant erhöhte Expression für AdipoR1 und -R2 nach 24 und 72 Stunden verzeichnet werden konnte. 72 Stunden nach Stimulation zeigte sich ein heterogenes Bild der AdipoR1 und -R2 mRNA-Expression mit zum Teil normalisierten, erhöhten, aber auch reduzierten Werten. Einzig die AdipoR2 Expression zeigte 72 Stunden nach Stimulation ein recht einheitliches Expressionsmuster für die jeweiligen Entzündungsgruppen. Hier konnte eine unveränderte Expression unter LPS-Applikation

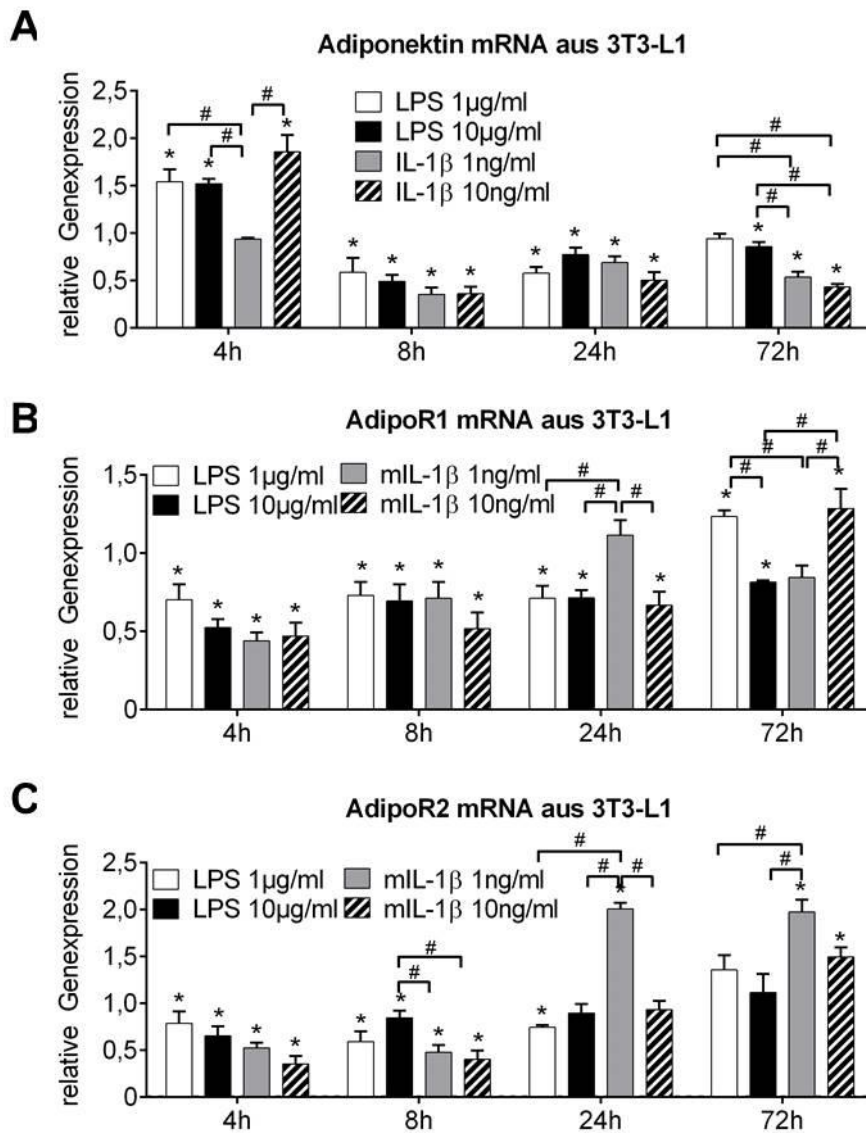


Abb. 20: Relative Genexpression von Adiponektin und den Adiponektinrezeptoren 1 (AdipoR1) und -2 (AdipoR2) in 3T3-L1-Fibroblasten nach Stimulation *in vitro*. Gezeigt nach 4, 8, 24 sowie 72 Stunden (h) nach Stimulation mit Lipopolysacchariden (LPS, 1 µg bzw. 10 µg/ml) sowie mit Interleukin 1 beta (IL-1β, 1 ng bzw. 10 ng/ml) *in vitro*. * $p < 0,05$, Vergleich zur Kontrolle, *Unpaired t-test*/# $p < 0,05$, *One-Way ANOVA*.

im Vergleich zur Kontrolle gezeigt werden, während IL-1β Stimulation zu einer Erhöhung führte (Abb. 20 B und C).

3.6.4 Auswirkung von Inflammation auf das Adiponektinsystem in differenzierten humanen SW-872-Zellen

Wie zuvor bereits bei den GECs und 3T3-L1-Fibroblasten beschrieben, wurden auch differenzierte und undifferenzierte SW-872-Liposarkomzellen stimuliert und zu unterschiedlichen Zeitpunkten (4, 24 und 48 Stunden nach Stimulation, sowie 48 Stunden nach Stimulation mit additiver Zugabe der Stimulanz nach 24 Stunden) zunächst auf ihre inflammatorische Reaktion untersucht. Stimuliert wurden die Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen LPS (1 $\mu\text{g/ml}$, 10 $\mu\text{g/ml}$) oder mit 10 ng/ml IL-1 β . Auch hier wurde abermals IL-1 β als zusätzliches, entzündungsauslösendes Stimulanz gewählt (siehe Kapitel 3.6.3). Um den Entzündungsstatus charakterisieren zu können, wurde zunächst die Expression von IL-1 β und IL-8 gemessen (Abb. 21 A bzw. B).

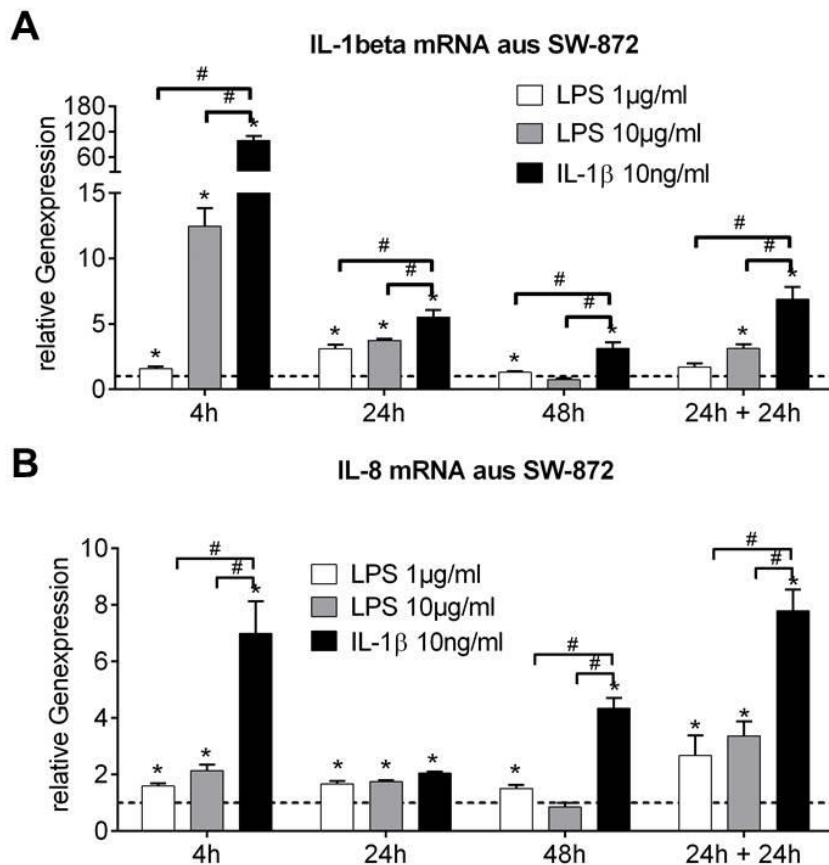


Abb. 21: Relative Genexpression von typischen Entzündungsmarkern in differenzierten SW-872-Liposarkomzellen nach Stimulation *in vitro*. Relative Interleukin 1 beta (IL-1 β) und IL-8 Genexpression nach Stimulation von Liposarkomzellen der Linie SW-872 mit verschiedenen konzentrierten Lipopolysacchariden in Bezug auf unstimulierte SW-872-Liposarkomzellen (Kontrolle, hellgrau) sowie nach Stimulation mit IL-1 β (10 ng/ml) *in vitro*. * $p < 0,05$, Vergleich zur Kontrolle, *Unpaired t-test*/# $p < 0,05$, *One-Way ANOVA*.

Ein signifikanter Anstieg der mRNA-Expression von IL-1 β war nach 4 Stunden als Reaktion der Zellen auf Stimulation mit 10 ng/ml IL-1 β zu verzeichnen ($99,10 \pm 10,49$). Auch durch Stimulation mit 10 μ g/ml LPS zeigte sich eine deutliche Hochregulation der IL-1 β mRNA-Genexpression. Die weiteren Quantifizierungen nach 24 und 48 Stunden ergaben daraufhin zwar ein kontinuierliches Absinken der Expression in den stimulierten Zellen, allerdings weiter signifikant erhöhte Werte im Vergleich zu den unstimulierten Kontrollen, abgesehen von einem leichten Anstieg der mit 1 μ g/ml LPS stimulierten Zellen nach 24 Stunden ($3,09 \pm 0,33$). Die IL-1 β mRNA-Expression nach Stimulation mit 10 ng/ml IL-1 β blieb auch nach 48 Stunden signifikant erhöht ($3,12 \pm 0,44$). Die additive Zugabe beider Stimulanzen nach 24 Stunden für 24 Stunden (24 h + 24 h) erhöhte die IL-1 β mRNA-Expression sowohl durch Zugabe von LPS (1 μ g/ml, nicht signifikant, 10 μ g/ml, signifikant), als auch von 10 ng/ml IL-1 β (Abb. 21 A).

Sehr vergleichbar stellten sich die Messergebnisse der mRNA-Expression von IL-8 dar. Auch hier stieg die Regulation bei allen stimulierten Zellen innerhalb von 4 Stunden an, signifikant und am deutlichsten nach Zugabe von 10 ng/ml IL-1 β ($6,99 \pm 1,13$). Die folgenden Quantifizierungen zeigten zwar eine tendenzielle Herunterregulation vor allem bei den mit IL-1 β stimulierten Zellen ($2,05 \pm 0,06$) nach 24 Stunden im Vergleich zum 4 Stunden Zeitpunkt, allerdings war immer noch eine signifikant höhere mRNA-Genexpression von IL-8 im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle erkennbar. Nach 48 Stunden Stimulation zeigte sich ebenso ein Anstieg der IL-8 mRNA-Genexpression ($4,34 \pm 0,36$) für die mit IL-1 β und mit 1 μ g/ml LPS stimulierten Zellen. Eine zusätzliche Stimulation nach 24 Stunden für 24 Stunden (24 h + 24 h) bewirkte bei allen stimulierten Zellen eine signifikant erhöhte mRNA-Expression von IL-8, ähnlich der Expression nach 4 Stunden (Abb. 21 B).

Nachdem diese Messergebnisse von IL-8 und IL-1 β einen Entzündungsstatus der stimulierten Zellen vermuten ließen, wurden auch die relativen Genexpressionen von Adiponektin und seinen beiden Rezeptoren untersucht (Abb. 22 A – C).

Die Adiponektin mRNA-Expression stieg innerhalb von 4 Stunden bei allen stimulierten Zellen, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle, an. Die stärkste und signifikanteste Hochregulation der Adiponektin mRNA-Expression im Vergleich zur Kontrolle zeigte sich nach Stimulation mit 10 μ g/ml LPS ($4,39 \pm 0,49$). Nur wenig geringer, aber ebenfalls signifikant erhöht war die Adiponektin mRNA-Expression nach Stimulation mit IL-1 β ($4,24$

$\pm 0,76$). Eine Stimulation mit lediglich 1 $\mu\text{g/ml}$ LPS resultierte zwar in eine geringere, aber auch signifikante Induktion der gemessenen mRNA-Expression von Adiponektin. Nach 24 Stunden Inkubation verminderte sich die Adiponektin mRNA-Expression bei allen stimulierten Zellen signifikant (IL-1 β : $0,32 \pm 0,07$). Die Messung nach 48 Stunden Inkubation zeigte eine verstärkte Adiponektin mRNA-Expression bei den mit 1 $\mu\text{g/ml}$ LPS stimulierten Zellen, Stimulation mit 10 $\mu\text{g/ml}$ LPS und 10 $\mu\text{g/ml}$ IL-1 β führte weiter zu einer Herunterregulation der Adiponektin mRNA-Expression. Eine additive Zugabe der besagten Stimulanzen nach 24 Stunden Kultur führte zu einem normalisierten Expressionsniveau der Adiponektin-mRNA unabhängig der LPS-Konzentration, jedoch zu einer signifikanten Reduktion bei der Stimulation mit IL-1 β (Abb. 22 A).

Weiterhin wurde die Expression des Adiponektinrezeptors 1 (AdipoR1) untersucht. Die stärkste Induktion nach 4 Stunden wurde durch Stimulation mit 10 $\mu\text{g/ml}$ LPS gemessen ($3,62 \pm 0,49$). Auch die Stimulation mit IL-1 β und mit 1 $\mu\text{g/ml}$ LPS führte zu einer signifikanten Erhöhung selbiger Genexpression (IL-1 β : $2,16 \pm 0,28$). Auch nach 24 Stunden Stimulation konnte nur eine leicht erhöhte mRNA-Expression für AdipoR1 in den LPS-Stimulationsgruppen detektiert werden, während für IL-1 β -Stimulation keine veränderte Expression im Vergleich zur Kontrolle gemessen werden konnte. Die Quantifizierung nach weiteren 24 Stunden ergab einen fortlaufenden signifikanten Abfall der Expression bei den mit LPS stimulierten Zellen. Die zusätzliche Stimulation nach 24 Stunden für 24 Stunden (24 h + 24 h) wies keine Veränderung des Expressionsniveaus von AdipoR1 im Vergleich zur Kontrolle auf (Abb. 22 B). Zuletzt wurde nun auch die Regulation der mRNA-Expression des Adiponektinrezeptors 2 (AdipoR2) untersucht. Hier stieg die AdipoR2 mRNA-Expression am deutlichsten und signifikant nach Stimulation mit 10 $\mu\text{g/ml}$ LPS nach 4 Stunden an ($3,00 \pm 0,62$). Auch die Zugabe von 10 ng/ml IL-1 β führte zu einer tendenziellen Induktion der Expression, vergleichbar mit der Expression der AdipoR1 mRNA-Expression. Die Stimulation mit 1 $\mu\text{g/ml}$ LPS hingegen führte zu einer initial, signifikanten Herunterregulation, welche an den folgenden Zeitpunkten nicht mehr beobachtet werden konnte. Letztlich zeigte die Quantifizierung der Genexpression nach 48 Stunden einen Abfall der AdipoR2-mRNA-Expression bei allen stimulierten Zellen, welcher für die mit 10 $\mu\text{g/ml}$ LPS stimulierten Zellen signifikant war. Durch eine

zusätzliche Gabe der Stimulanz nach 24 Stunden für 24 Stunden (24 h + 24 h) konnte keine Änderung zur Kontrolle festgestellt werden (Abb. 22 C).

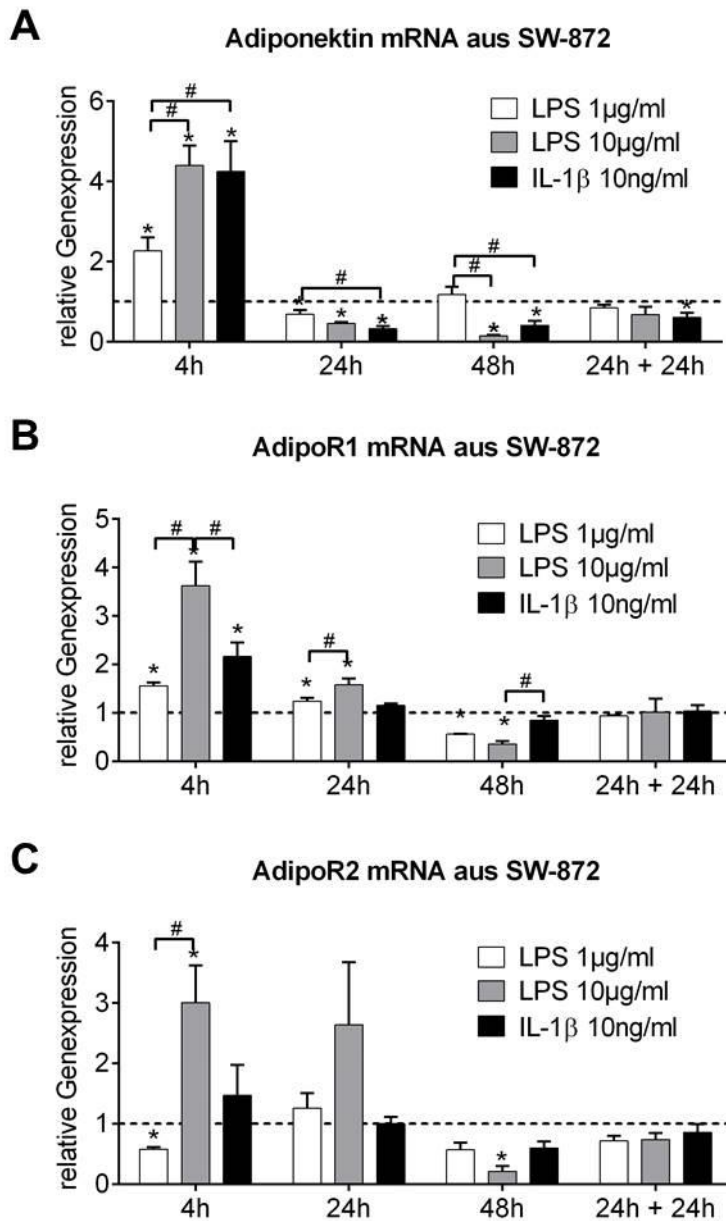


Abb. 22: Relative Genexpression von Adiponektin und den Adiponektinrezeptoren 1 (AdipoR1) und -2 (AdipoR2) in SW-872-Liposarkomzellen nach Stimulation *in vitro*. Relative Genexpression von Adiponektin (A), AdipoR1 (B) und AdipoR2 (C) nach 4, 24 sowie 48 Stunden (h) Stimulation von Liposarkomzellen der Linie SW-872 mit Lipopolysacchariden (LPS, 1 µg bzw. 10 µg/ml) sowie Stimulation mit Interleukin 1 beta (IL-1β, 10 ng/ml) bzw. unstimulierter Liposarkomzellen (gestrichelte Linie). * $p < 0,05$, Vergleich zur Kontrolle, *Unpaired t-test*/# $p < 0,05$, *One-Way ANOVA*.

3.6.5 Auswirkung von Inflammation auf die Adiponektin-Proteinsynthese in differenzierten humanen SW-872-Zellen

Letztendlich sollten neben Veränderungen durch Stimulation der Genexpression auf mRNA-Ebene selbige auch auf Proteinebene untersucht werden. Um den entzündlichen Umstand einer chronischen Parodontitis zu simulieren, wurden SW-872-Liposarkomzellen für 48 Stunden mit unterschiedlichen Konzentrationen von LPS (1 µg/ml bzw. 10 µg/ml) oder mit 10 ng/ml IL-1β stimuliert, Gesamtprotein aus Zellysat sowie aus ankonzentrierten Zellkulturüberständen gewonnen, und die Zielproteine mittels Western-Blot Analyse analysiert.

Untersucht wurde die Adiponektin Proteinkonzentration in Zellkulturüberständen von stimulierten bzw. unstimulierten SW-872-Liposarkomzellen. Da die Menge an Adiponektin im Zellkulturüberstand stets sehr gering war, wurde selbiger zunächst ankonzentriert, um einen Nachweis von Adiponektin erbringen zu können. Adiponektin konnte nach besagter Ankonzentration nachgewiesen werden und wies in den Zellkulturen der SW-872-Liposarkomzellen ohne Stimulation eine stärkere Expression als unter proinflammatorischer Stimulation mit LPS oder IL-1β auf. Die Qualität der Inflammation bewirkte hierbei keine erkennbar unterschiedliche Reduktion der Adiponektinexpression, jedoch zeigte die höchste verwendete LPS Konzentration sowie die IL-1β Gabe den deutlichsten Effekt (Abb. 23).

Die Adiponektinmenge im Zellysat, gewonnen nach 48 Stunden ohne Stimulation, fiel abermals und diesmal deutlich höher im Vergleich zum Zellysat aus SW-872-Liposarkomzellen nach 48h inflammatorischer Stimulation aus. Hierbei konnte wiederum die verstärkte Reduktion durch die Applikation der 10-fachen Menge LPS, aber auch durch IL-1β beobachtet werden (Abb. 23).

Zusätzlich wurde das Enzym Sirtuin (SIRT1) sowie das *ERO1-like protein alpha* (ERO1-Lα) untersucht, da es sich bei diesen um Proteine handelt, welche an der Bildung und Sekretion von Adiponektin beteiligt sind (Qiang et al., 2007). Hierbei ließ sich eine deutlich geringere Konzentration von SIRT1 nach inflammatorischer Stimulation im Vergleich zur Kontrolle nachweisen, während die Konzentration von ERO1-Lα nach Stimulation mit 10 µg/ml LPS bzw. mit 10 ng/ml IL-1β im Vergleich zur Kontrolle deutlich verstärkt war (Abb.

23). Weiterhin wurde auch die Expression von β -Aktin als Ladekontrolle dargestellt. Hierbei handelt es sich um ein Protein, welches typischerweise in allen Zellen des Organismus, sowohl unter normalen als auch unter pathophysiologischen Bedingungen konstant gebildet wird (Eisenberg et al., 2003). Die gleiche Bandenstärke in allen Gruppen zeigt somit eine gleiche Proteinbeladung der Geltaschen an (Abb. 23).

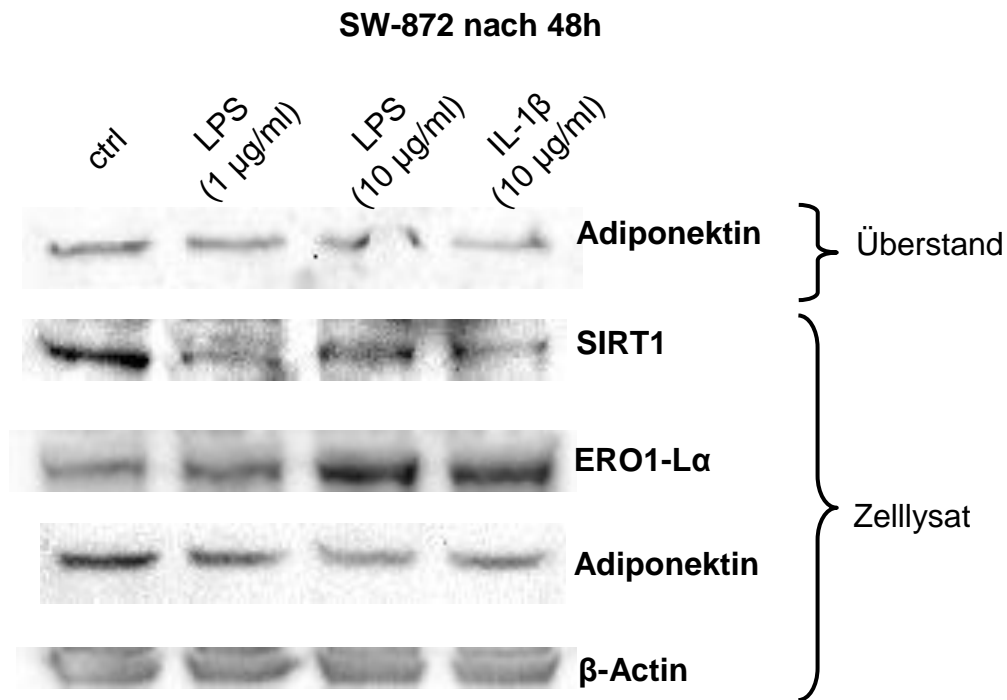


Abb. 23: Repräsentative Western Blots (WB) von adipozytär differenzierten SW-872-Liposarkomzellen nach Stimulation mit LPS und IL-1 β für 48 Stunden (h). Western Blots wurden durchgeführt zum einen an ankonzentrierten Zellkulturüberständen sowie an Zelllysaten. ctrl: unstimulierte Kontrolle.

4. Diskussion

Ziel der vorliegenden Arbeit war unter anderem die Untersuchung des Adiponektin-Adiponektinrezeptoren-Systems unter Berücksichtigung der parodontalen Erkrankung an gingivalen Gewebeschnitten *in vivo* sowie unter Parodontitis-ähnlichen, inflammatorischen Bedingungen zunächst in gingivalen Epithelzellen (GECs) *in vitro*. Hierbei sollte untersucht werden, ob die Aktivität des Adiponektinsystems, wie bereits nachgewiesen werden konnte, unter entzündlichen Bedingungen sinkt (Guerre-Millo, 2008; Ouchi et al., 2003), und somit die anti-inflammatorischen Eigenschaften des Adiponektins einer an Parodontitis erkrankten Person nicht zugute kommen. Weiterhin sollte auch die Regulation des Adiponektinsystems in Adipozyten, den Hauptproduzenten des Adiponektins, unter pro-inflammatorischen Bedingungen *in vitro* näher untersucht werden. Hierfür wurden neben den bereits als Modell etablierten murinen 3T3-L1-Fibroblasten auch humane SW-872-Liposarkomzellen durch ein Adipogeneseprotokoll zu Adipozyten-ähnlichen Zellen differenziert und im stimulierten sowie im unstimulierten Zustand genauer untersucht.

Den Hauptproduzenten von Adiponektin stellt im menschlichen Körper das Fettgewebe dar (Yamaguchi et al., 2005). Weiter konnte bereits nachgewiesen werden, dass Adiponektin ebenso von anderen Zellen, wie zum Beispiel GECs synthetisiert wird, und dass auf deren Oberfläche auch die beiden Zielrezeptoren von Adiponektin, die Adiponektinrezeptoren 1 und -2 (AdipoR1 bzw. -R2) exprimiert werden (Kraus et al., 2012). Die Autoren postulierten, dass das Adiponektinsystem einen Gegenspieler der LPS-induzierten Inflammation in der Parodontitis durch die anti-inflammatorische Wirkung von Adiponektin darstellt. Dass Adiponektin in enger Beziehung zu verschiedenen Erkrankungen bzw. Risikofaktoren, zusammengefasst unter dem Begriff des metabolischen Syndroms, steht, ist bereits bekannt (Kaur, 2014). Die Untersuchungen dieser Arbeit sollen am Ende die Schlussfolgerung zulassen, welchen Effekt chronische Inflammation und diese damit in Zusammenhang stehende Erkrankungen wiederum auf das Adiponektinsystem haben.

4.1 Nachweis des Adiponektinsystems in oralen Epithelzellen *ex vivo* und *in vitro*

Hinsichtlich einer Parodontitiserkrankung sind GECs diejenigen Zellen, welche zuerst mit den parodontal-pathogenen Erregern in Berührung kommen (Kinane et al., 2008). Daher sollte zu Beginn untersucht werden, ob das Adiponektinsystem in gesundem gingivalen Gewebe prinzipiell nachgewiesen werden kann.

Die Untersuchung der Gewebeschnitte von parodontal gesunden Patienten nach immunhistochemischer Färbung zeigt deutlich die Expression sowohl von Adiponektin, als auch der beiden Rezeptoren AdipoR1 und AdipoR2 in gingivalen Epithelzellen, und bestätigt die Vorarbeiten von Kraus et al. (Kraus et al., 2012). Da durch immunhistologische Färbung im Gewebeverband die Lokalisation des Adiponektinsystems auf GECs nur auf Grund der morphologischen Grundkenntnisse festgestellt werden konnten, wurden außerdem isolierte Kulturen selbiger Zellen angelegt, um abermals die Expression des Adiponektinsystems zu untersuchen. Auch hierbei konnte dargestellt werden, dass GECs das Adiponektinsystem, also sowohl Adiponektin als Mediator, als auch die zugehörigen Rezeptoren, im unstimulierten Zustand exprimieren können. Die Aktivität des Adiponektinsystems sinkt nachweislich unter einem chronischen Entzündungszustand, also erwartungsgemäß auch im Krankheitsbild der Parodontitis, ab (Guerre-Millo, 2008; Ouchi et al., 2003).

4.2 Nachweis des Adiponektinsystems in differenzierten bzw. un-differenzierten murinen Fibroblasten

Zur Untersuchung von Adipozyten *in vitro* wurden mehrere Modelle präsentiert. So diente in der Vergangenheit vor allem die *ex vivo* Kultivierung von exzidierten Fettgewebstücken als Modell zur Untersuchung von humanen Adipozyten *in vitro*. Der Nachteil hierbei ist, dass jeweils eine Exzision nötig ist, und bei Entnahme von verschiedenen Patienten keine Vergleichbarkeit gegeben ist. Weiter setzen *in vitro* Versuche an Adipozyten eine gewisse konsistente Qualität der Zellen voraus, was durch Exzision und Kultivierung von primären Adipozyten nicht zwingend gegeben ist (Novakowski, 2004). Außerdem verändern die primären Adipozyten *in vitro* recht schnell ihre Eigenschaften und sind somit nicht vollends mit ihrem *in vivo* Zustand zu vergleichen. Somit stellt in dieser Hinsicht die Etablierung eines Zellmodells die bessere Alternative dar.

Es ist bekannt, dass zur Untersuchung von Adipozyten murine 3T3-L1-Fibroblasten genutzt werden können, die zuvor einem Adipogenese-Protokoll unterzogen werden (Zebisch et al., 2012). Innerhalb von sieben Tagen differenzieren diese Fibroblasten unter Zugabe von bestimmten Stimulanzen zu Adipozyten (Zebisch et al., 2012). Auch in dieser Arbeit wurden zunächst 3T3-L1-Fibroblasten zu Adipozyten differenziert. Die erfolgreiche Differenzierung wurde unter anderem mittels Öl-Rot-Färbung kontrolliert, welche die im Zuge der Adipogenese entstandenen und für Adipozyten charakteristischen Fettvakuolen deutlich erkennen lässt. Zur weiteren Kontrolle wurden mittels qPCR die Expressionsniveaus von einigen Adipozyten-spezifischen Genen gemessen. Hierzu gehörten der Peroxisom-Proliferator-aktivierte Rezeptor γ (PPAR γ) und die CCAAT/Enhancer-Binding-Proteine α und β (C/EBP α und C/EBP β). Alle drei Transkriptionsfaktoren spielen eine wichtige Rolle während der adipozytären Differenzierung (Gregoire et al., 1998; Doi et al., 2005). Während PPAR γ und C/EBP α wie erwartet nach erfolgter Adipogenese induziert vorlagen, konnte zumindest für C/EBP β keine Induktion gemessen werden, da dieses Protein bekanntlich in der frühen Phase der Differenzierung hochreguliert wird, sein Level aber gegen Ende der Adipogenese deutlich absinkt, wohingegen C/EBP α erst gegen Ende der Differenzierung hochreguliert wird (Cao et al., 1991). Auch die Genexpression von Perilipin, einem Protein, welches an der Regulation der Lipolyse beteiligt ist und sich auf der Oberfläche von Fettvakuolen findet (Brasaemle et al., 2007) wurde gemessen. Die Expression der Perilipin- mRNA stieg signifikant an, was für eine erfolgreiche Adipogenese spricht, da Perilipin -wie schon gezeigt werden konnte- in zu Adipozyten-ähnlichen Zellen differenzierten 3T3-L1-Fibroblasten vorkommt, jedoch nicht in 3T3-Präadipozyten (Greenberg et al., 1991). Letztlich ergab die Untersuchung der Adipokine Adiponektin, Leptin, *Retinol binding protein 4* (RBP4), Resistin und Visfatin, sowie der beiden Adiponektinrezeptoren 1 und -2 einen signifikanten Anstieg der Genexpression. Diese Proteine werden von Adipozyten produziert und sezerniert (Park et al., 2013; Romacho et al., 2014), somit spricht auch dieses Ergebnis für eine erfolgreiche Differenzierung der 3T3-Präadipozyten. Um die Lokalisation des Adiponektinsystems ebenfalls auf undifferenzierten 3T3-L1-Fibroblasten sowie auf zu Adipozyten-ähnlichen Zellen differenzierten 3T3-L1-Fibroblasten einordnen zu können, wurden beide Zelltypen immunhistologisch auf die Expression des Adiponektinsystems untersucht. Dabei konnte dargestellt werden, dass sowohl undifferenzierte 3T3-L1-Fibroblasten, wie bereits für

humane gingivale Fibroblasten beschrieben (Iwayama et al., 2012) als auch 3T3-Adipozyten-ähnliche Zellen das Adiponektinsystem exprimieren. Hierbei zeigte sich eine deutliche Expressionsinduktion in differenzierten 3T3-L1-Fibroblasten.

4.3 Etablierung eines Modells zur Untersuchung des Adiponektinsystems an humanen Adipozyten-ähnlichen Zellen (SW-872-Liposarkomzellen)

Zur Untersuchung des Adiponektin-Adiponektinrezeptoren-Systems sollte in der vorliegenden Arbeit ein Modell entwickelt werden, in dem nun keine murinen- (3T3-L1-Fibroblasten), sondern humane Zellen – in diesem Fall SW-872-Liposarkomzellen - zu Adipozyten-ähnlichen Zellen differenziert werden. Die Verwendung von Sarkomzellen als Modell wurde bereits für humane Osteosarkomzellen, die zu Osteoblasten-ähnlichen Zellen differenziert werden, etabliert (Czekanska et al., 2012). Die Differenzierung der SW-872-Liposarkomzellen verlief ähnlich wie selbige der bereits beschriebenen 3T3-L1-Fibroblasten, mit dem Unterschied, dass hier Indomethazin anstelle von Rosiglitazon im Induktionsmedium verwendet wurde. Eine erfolgte Differenzierung von SW-872-Liposarkomzellen wurde mittels Öl-Rot-Färbung kontrolliert und bewies durch den Nachweis der zahlreichen charakteristischen Fettvakuolen zunächst eine erfolgte Adipogenese. Auch hier wurden typische Differenzierungsmarker der Adipogenese untersucht. Es zeigte sich, vergleichbar mit den 3T3-L1-Fibroblasten, ein signifikanter Anstieg des Expressionslevels bei den Transkriptionsfaktoren PPAR γ , C/EBP α , und Perilipin. Lediglich die Induktion von C/EBP β in differenzierten SW-872-Liposarkomzellen konnte in differenzierten 3T3-L1-Fibroblasten nicht festgestellt werden. Eine mögliche Erklärung dafür könnte der unterschiedliche Differenzierungsgrad beider Zelllinien nach 7-tägiger Adipogeneseinduktion sein. Die Expression von C/EBP β wird früh in der Differenzierung hochreguliert, um gegen Ende der Differenzierung wieder abzusinken. Das Expressionslevel von C/EBP α hingegen steigt erst in der späten Differenzierungsphase an (Cao et al., 1991). So befanden sich die 3T3-L1-Fibroblasten also zum Messzeitpunkt möglicherweise in einer späten Phase der Differenzierung, während die SW-872-Liposarkomzellen noch nicht das gleiche Differenzierungslevel erreicht hatten. Hierfür könnte getestet werden, ob SW-872-Liposarkomzellen länger differenziert werden müssen, um das gleiche Differenzierungslevel wie bei den 3T3-L1-Fibroblasten nachweisen zu können. Ein Problem stellt hierbei allerdings das schnelle Wachstum der SW-872-Liposarkomzellen dar, weshalb

sich die Zellen nach gewisser Zeit von der Zellkulturschale ablösen. Denkbar für nachfolgende Untersuchungen an humanen Adipozyten-ähnlichen Zellen wäre daher die Etablierung einer neuen Zelllinie oder eines angepassten Differenzierungsprotokolls. Ähnliches trifft auf die Messergebnisse der Adipokine zu. Anders als bei den 3T3-L1-Fibroblasten wiesen Visfatin und die beiden Adiponektinrezeptoren 1 und -2 keinen Anstieg des Expressionslevels auf. Möglicherweise kann auch dieser Unterschied der Messergebnisse am ungleichen Fortschritt in der Adipogenese zum Zeitpunkt der Messung erklärt werden, hierfür müssen aber noch weiterführende Untersuchungen vorgenommen werden. Entgegen der Literatur, welche postuliert, dass Resistin bei Menschen von Makrophagen und nicht von Adipozyten exprimiert wird (Park et al., 2013), konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass Resistin in humanen Zellen nach Adipogenese zumindest auf mRNA-Ebene exprimiert wird. Dies beinhaltet aufgrund der posttranskriptionellen Regulations-möglichkeiten der Zelle aber nicht, dass Resistin auch als Protein von der Zelle produziert wird. Übereinstimmend mit der vorhandenen Literatur konnte aber die vorliegende Arbeit demonstrieren, dass Resistin-mRNA von murenen, murinen Adipozyten exprimiert wird (Barnes et al., 2009; Park et al., 2013).

Auch auf den zu Adipozyten-ähnlichen Zellen differenzierten SW-872-Liposarkomzellen konnte die Expression des Adiponektinsystems immunhistologisch nachgewiesen werden. Adiponektin wies hier die stärkste Veränderung auf, allerdings war die Adiponektin-Expression im Vergleich zu den differenzierten 3T3-L1-Fibroblasten ungefähr 100-fach geringer.

4.4 Auswirkung von Parodontitis auf die Adiponektinmenge im Speichel

Bis hier konnte in der vorliegenden Arbeit also gezeigt werden, dass in der gesunden Gingiva *in vivo*, GECs sowie in Adipozyten-ähnlichen Zellen *in vitro* Adiponektin und seine Rezeptoren 1 und -2 exprimiert werden. Nun sollte weiter untersucht werden, welchen Einfluss eine entzündliche Reaktion, hier speziell die Parodontitis, auf das Adiponektinsystem hat.

Studien konnten bereits nachweisen, dass die Genexpression von Adiponektin unter entzündlichen Bedingungen herunterreguliert wird (Guerre-Millo, 2008). Vielmehr noch wurde beobachtet, dass die Plasma-Werte des C-reaktiven Proteins (CRP), einem

anerkannten Entzündungsmarker, und Adiponektin sich antiproportional zueinander verhalten (Ouchi et al., 2003). Da es sich bei Speichel um ein Ultrafiltrat von Blut handelt, sollte nun untersucht werden, ob sich diese Beobachtungen auch auf Messungen im Speichel übertragen lassen, sowohl unter gesunden als auch parodontal erkrankten Verhältnissen.

Es konnte nachgewiesen werden, dass sich bei nicht an Parodontitis-erkrankten Patienten (Kontrolle) eine tendenziell höhere Menge an Adiponektin im Speichel nachweisen ließ, als bei an Parodontitis erkrankten Probanden. Das stimmt mit der Vermutung überein, dass eine chronische Entzündung den Adiponektinwert nicht nur im Blut sondern auch im Speichel sinken lässt. Kritisch betrachtet hat an dieser Pilotstudie allerdings eine zu geringe Probandenzahl teilgenommen, um hier von einem vollends repräsentativen Ergebnis sprechen zu können. Weiterhin ist der Altersunterschied zwischen gesunder und erkrankter Gruppe recht groß und der Anteil der Frauen in der gesunden Gruppe deutlich höher. Interessant wären weiterführende Untersuchungen mit deutlich erhöhter Probandenzahl, welche Vergleiche zwischen Adiponektinmenge in Blut und Speichel bei Parodontitispatienten zulassen.

Nichtsdestotrotz lässt der Vergleich zwischen Männern und Frauen vermuten, dass die hier gezeigten Ergebnisse grundsätzlich in die richtige Richtung weisen, da die Gruppe der gesunden Frauen eine deutlich höhere Menge an Adiponektin im Speichel aufweist, als die Gruppe der gesunden Männer. Das stimmt mit der seit längerem bekannten Beobachtung überein, dass Frauen ein höheres Level an zirkulierendem Adiponektin im Blut aufweisen als Männer (Whitehead et al., 2005). Dies beinhaltet, dass eine Parodontitis bei Frauen stärkere Auswirkungen auf das Adiponektinsystem haben müsste, als bei Männern, da gesunde Frauen laut den Ergebnissen dieser Arbeit signifikant mehr Adiponektin produzieren als an Parodontitis erkrankte Frauen. Bei Männern hingegen wird die schon bei Gesunden niedrige Konzentration an Adiponektin im Speichel durch Entzündung nur wenig bis gar nicht beeinflusst.

4.5 Nachweis der Auswirkung von Inflammation auf das Adiponektinsystem

Wie zuvor an Präparaten von gesunder Gingiva wurden nun auch Präparate von parodontal erkrankter Gingiva einer immunhistologischen Färbung unterzogen, um auch hier den Status der Expression bzw. der Beteiligung des Adiponektinsystems zu erörtern.

Im histologischen Bild stellen sich die Präparate als vermutlich durch Immunzellen infiltriert dar. Ob es sich hierbei tatsächlich um Immunzellen, wie Granulozyten und Makrophagen handelte, müsste durch weitere Immunzell-spezifische Färbungen bewiesen werden. Auch die Struktur der Reteleisten stellt sich hier nicht klar abgegrenzt dar, wie es bei den Präparaten gesunder Gingiva der Fall war. Demzufolge kann bei den vorliegenden Biopsien von parodontal erkrankter Gingiva gesprochen werden.

Letztendlich waren hier alle drei Komponenten des Adiponektinsystems immunhistochemisch im Epithel auf Proteinebene in der Immunhistologie nachweisbar.

Allerdings muss im Verlauf einer Parodontitis unterschieden werden zwischen akutem Entzündungsgeschehen und chronischen Phasen, denn bei einer Parodontitis kommt es zu Zyklen der akuten Inflammation und Destruktion sowie zu darauf folgenden Phasen des chronischen Verlaufs (Genco, 1990; Umeda et al., 1996).

So ist es denkbar, dass die in Abb. 15 gezeigten Bilder Präparate zeigen, welche während einer akuten Phase der Parodontitis entnommen wurden. Abb. 16 zeigt ebenfalls ein Präparat von parodontal erkrankter Gingiva, allerdings ist bei der immunhistologischen Untersuchung von Adiponektin hier nur eine schwache Färbung zu erkennen. Dementsprechend ist es möglich, dass diese Probe während einer chronischen Phase der Parodontitis entnommen wurde. Dies unterstützt die Vermutung, dass Adiponektin im Zuge einer akuten Entzündung als Gegenregulation vermehrt produziert und sezerniert wird, seine Expression und Sekretion jedoch bei einem chronischen Entzündungsgeschehen vermindert werden. Diese Annahme wird weiter durch Untersuchung der Genexpression von Adiponektin der verschiedenen Zelltypen unter pro-inflammatorischen Bedingungen via qPCR unterstützt.

Zur genaueren Untersuchung des Einflusses von Entzündung auf das Adiponektinsystem wurden die drei Zelltypen (GECs und zu Adipozyten-ähnlichen Zellen differenzierte 3T3-L1-Fibroblasten sowie SW-872-Liposarkomzellen) *in vitro* im Folgenden mit Lipopolysacchariden (LPS) von *Porphyromonas gingivalis* (*P.g*), einem typischen Erreger der Parodontitis (Socransky et al., 1998) bzw. mit pro-inflammatorischem IL-1 β in unterschiedlichen Konzentrationen stimuliert und daraufhin die Genexpressionen von Adiponektin, AdipoR1 und AdipoR2 zu bestimmten Zeitpunkten gemessen. Um sicherzustellen, dass durch die Stimulation eine inflammatorische Reaktion hervorgerufen

wird, wurde zuvor eine Titrierung mit unterschiedlichen Konzentrationen von LPS von *P.g.* exemplarisch an GECs durchgeführt. Bei einer Konzentration von 2 µg/ml LPS stieg die Genexpression von IL-1β - hier dem Marker für eine Inflammation in der Zellkultur - im Vergleich zur Kontrolle signifikant an. Demzufolge wurde die Konzentration von LPS bei den folgenden Stimulationen bei GECs ab 2 µg/ml gewählt, da in diesem Fall von einer Entzündungs-ähnlichen Reaktion der betroffenen GECs gesprochen werden konnte. IL-1β ist ein wirksamer Entzündungsmediator, und spielt eine wichtige Rolle bei Abwehrreaktionen des Körpers (Dinarello, 2013; Ozkurede et al., 2012), somit auch in der Abwehrkaskade bei einer Parodontitis (Kornman et al., 1997). So stimuliert IL-1β zum Beispiel direkt Knochenabbau. Durch die von IL-1β hervorgerufene Ausschüttung von Prostaglandin E2 (PGE2) stimuliert es auch die Freisetzung von Matrixmetalloproteinasen (MMP), welche wiederum zur Auflösung von Gewebestrukturen und zur parodontalen Destruktion beitragen (Grigoriadou et al., 2010). Verschiedene Studien konnten bereits nachweisen, dass die IL-1β-Konzentration sowohl in gingivalen Biopsien von Patienten, die an Parodontitis erkrankt sind, als auch sogar im Sulkusfluid, im Vergleich zu gesunden Individuen, erhöht vorliegt (Gilowski et al., 2014; Grigoriadou et al., 2010). Durch eine systematische Parodontitistherapie und die Wiederherstellung gesunden parodontalen Gewebes lässt sich die IL-1β-Proteinmenge in eben diesem Gewebe wieder signifikant verringern (Iacopino, 2001).

IL-1β spielt auch hinsichtlich des metabolischen Syndroms eine wichtige Rolle, da hierbei im Körper ein chronischer subklinischer Entzündungszustand, vergleichbar mit einer chronischen Parodontitis, vorliegt (Kaur, 2014). Diese subklinische Inflammation wird hauptsächlich hervorgerufen durch Fettleibigkeit, bei welcher Adipozyten sich in einen pro-inflammatorischen Phänotyp umwandeln. Das Sekretionsprofil verändert sich hin zu einer vermehrt pro-inflammatorischen Sekretion mit verminderter Freisetzung von anti-inflammatorischem Adiponektin und erhöhter Freisetzung von pro-inflammatorischen Zytokinen, unter anderem IL-1β (Romacho et al., 2014). Dies wiederum führt zu einer vermehrten Insulinresistenz und somit insgesamt zu einer Verschlechterung des metabolischen Zustandes.

Interessant wären daher weiterführende Untersuchungen zur systemischen Rolle der im parodontalen Gewebe gebildeten Entzündungsmediatoren, insbesondere IL-1β, auf die adipozytäre Adiponektinbildung.

4.6 Nachweis der Auswirkung von Inflammation auf das Adiponektinsystem an GECs

Yamaguchi et al. konnten nachweisen, dass die Expression beider Adiponektinrezeptoren im parodontalen Gewebe bei einer Parodontitiserkrankung geringer ist als im Vergleich zu gesunden Patienten (Yamaguchi et al., 2010). Sie postulierten daher, dass das Adiponektinsystem unter einer parodontalen Erkrankung nicht effizient arbeitet, da die Anzahl der Adiponektinrezeptoren 1 und -2 reduziert ist, was zu einer Verschlechterung des Krankheitsbildes führen könnte, da der anti-inflammatorische Effekt des Adiponektins somit ausbleibt (Yamaguchi et al., 2010).

Die Ergebnisse dieser Arbeit unterstützen diese Beobachtung, da hier nachgewiesen werden konnte, dass in mit LPS stimulierten GECs das mRNA-Expressionslevel sowohl von Adiponektin, als auch seiner beiden Rezeptoren im Vergleich zu unstimulierten Zellen langfristig herunterreguliert wird. Im Gegensatz zu den Versuchen, die Yamaguchi et al. durchführten, wurden hier jedoch GECs anstelle von humanen gingivalen Fibroblasten untersucht, welche im Mund den am direktesten betroffenen Zelltyp nach Kontakt mit Erregern darstellen. Des Weiteren nutzten Yamaguchi et al. den Entzündungsmediator TNF- α um einen entzündlichen Zustand zu simulieren (Yamaguchi et al., 2010), wohingegen in dieser Arbeit ein dem Krankheitsbild zu Grunde liegender Virulenzfaktor (LPS von *P.g.*) verwendet wurde.

Wie unlängst erwähnt, wurde die Mitbeteiligung von peripher lokalisierten Adipozyten im Krankheitsbild der Parodontitis als Mediator der anti-inflammatorischen Antwort auf eine durch Erreger im Mund hervorgerufene Entzündung postuliert. Weiterhin wurden daher (1) differenzierte murine 3T3-L1-Fibroblasten und (2) differenzierte humane SW-872-Zellen auf ihre Reaktion unter entzündlichen Bedingungen *in vitro* untersucht.

4.7 Nachweis der Auswirkung von Inflammation auf das Adiponektinsystem an murinen Fibroblasten

Die Untersuchung der differenzierten 3T3-L1-Fibroblasten ergab eine zeitversetzte Hochregulation der mRNA der Entzündungsmediatoren TNF- α und IL-6 durch LPS, vor allem aber durch IL-1 β -Stimulation, was mit der Feststellung übereinstimmt, dass TNF- α die Synthese von IL-6 induziert (Akira et al., 1990), da das Expressionslevel von TNF- α hier lange vor dem von IL-6 anstieg. Hierbei konnte also die Induktion einer Entzündungs-

kaskade in Adipozyten-ähnlichen 3T3-L1-Fibroblasten durch LPS und IL-1 β nachgewiesen werden. Weiter konnte an Adipozyten-ähnlichen 3T3-L1-Fibroblasten durch selbige Stimulationen eine chronologisch aufeinanderfolgende Dynamik der beiden proinflammatorischen Zytokine TNF- α und IL-6 erkannt werden. Zwar reagierten die differenzierten 3T3-L1-Fibroblasten auf die Zugabe von beiden Stimulanzen (LPS und IL-1 β) mit einer inflammatorischen Reaktion, jedoch deutlich stärker auf die Stimulation mit IL-1 β . Dies könnte dadurch erklärt werden, dass die differenzierten 3T3-L1-Fibroblasten als Fettzellmodell dienen. Adipozyten sind vermehrt in der Peripherie des Körpers angesiedelt, kommen also nicht direkt mit dem bakteriellen Insult (LPS) an sich, sondern mit den auf den Reiz hin exprimierten Entzündungsmediatoren wie zum Beispiel IL-1 β in Kontakt, und reagieren letztendlich auf diese. Die Expression des Adiponektinsystems verhielt sich hinsichtlich der Expression der Adiponektin-mRNA erwartungsgemäß, indem es nach einem kurzen initialen Anstieg zu einem dauerhaften Abfall selbiger kam, passend zu der Vermutung, dass Adiponektin unter einer akuten Entzündung vermehrt produziert wird, das Adiponektinsystem unter einem chronischen Entzündungszustand jedoch eine verminderte Aktivität aufweist, bzw. vermindert vorliegt. Die Expression beider Rezeptoren stieg nach 24 Stunden an, was allerdings nicht im Widerspruch zu dieser Vermutung steht. Eine Erhöhung der Expression der Rezeptoren bedeutet nicht automatisch eine höhere Aktivität des Adiponektinsystems, da die Rezeptoren Liganden-gesteuert fungieren. Um dies zu überprüfen, könnte weiterhin untersucht werden, ob die Signalkaskade der beiden Rezeptoren hierbei aktiv ist, also ob für AdipoR1 beispielsweise die AMP-aktivierte Proteinkinase (AMPK) phosphoryliert vorliegt, bzw. für AdipoR2 ob der Peroxisom-Proliferator-aktivierte Rezeptor (PPAR α) aktiv ist. Des Weiteren handelt es sich hier um eine Untersuchung auf mRNA-Ebene, welche nicht die posttranskriptionellen Modifikationsmöglichkeiten der betroffenen Zelle beinhaltet. Die Expression von mRNA bedeutet folglich also nicht, dass posttranskriptionell auch das entsprechende Protein, hier also der Rezeptor, vorhanden ist. Letztlich könnte die vermehrte Expression auch eine Art Gegenregulation der Zelle gegen die inflammatorischen Reize darstellen.

Weitere Untersuchungen mittels ELISA (Daten nicht gezeigt) konnten außerdem beweisen, dass Adiponektin im Überstand von differenzierten 3T3-L1-Fibroblasten, welche vier Stunden stimuliert wurden, in deutlichen Mengen vorhanden ist.

4.8 Nachweis der Auswirkung von Inflammation auf das Adiponektinsystem an humanen SW-872-Zellen

Ähnliche Beobachtungen wie bei den 3T3-L1-Fibroblasten konnten auch bei den differenzierten, stimulierten humanen SW-872-Liposarkomzellen gemacht werden. Auch hier führte die Stimulation mit LPS, vor allem aber mit IL-1 β zur Expression der Zytokine IL-1 β und IL-8. Die Erklärung dafür, warum IL-1 β , wie bei den 3T3-L1-Fibroblasten einen stärkeren Effekt hat, könnte auch hier darin begründet liegen, dass es sich ebenfalls um ein Fettzellmodell handelt. Die periphere Verteilung von Adipozyten im Körper könnte auch in diesem Fall der Grund dafür sein, dass sie auf Entzündungsmediatoren wie IL-1 β eine stärkere inflammatorische Reaktion zeigen, als auf primäre bakterielle Insulte. Eine Inflammation (hier indirekt durch LPS bzw. direkt durch IL-1 β) führt bei Adipozyten dazu, dass einerseits die Expression und Sekretion von pro-inflammatorischen Adipokinen ansteigt, andererseits aber die Expression des anti-inflammatorischen Adiponektins sinkt (Romacho et al., 2014). Analog zu dieser Aussage sank die Expression von Adiponektin und seinen beiden Rezeptoren nach initialer Steigerung langfristig ab.

Die Expression von Adiponektin von stimulierten SW-872-Liposarkomzellen wurde weiterhin mittels Western Blot auf Proteinebene untersucht.

Wie schon die Ergebnisse der Untersuchungen mittels qPCR zeigten, wird Adiponektin bei einer akuten Entzündung offenbar vermehrt produziert. Hier nicht gezeigte Daten weisen nach, dass dies mit einer vermehrten Bildung von SIRT1 und ERO1-L α einhergeht. Ein chronischer Entzündungszustand hingegen lässt die Adiponektin-Expression auf mRNA-Ebene deutlich absinken. Analog dazu wurde auch auf Proteinebene nach 48-stündiger Stimulation deutlich weniger Adiponektin detektiert als in der Kontrolle, einhergehend mit einer Reduktion der intrazellulären SIRT1-Konzentration.

Bei SIRT1 und ERO1-L α handelt es sich um Proteine welche an der Bildung und Sekretion von Adiponektin beteiligt sind (Qiang et al., 2007). Die hier gezeigten Daten legen die Vermutung nahe, dass die verminderte Bildung von Adiponektin unter chronisch entzündlichen Bedingungen über SIRT1 reguliert werden könnte. Der genaue Wirkmechanismus muss daher in weiterführenden Untersuchungen noch genauer dargestellt werden.

4.9 Schlussfolgerung

Aus den Ergebnissen dieser Arbeit lässt sich schlussfolgern, dass die Expression und Sekretion von Adiponektin unter einer akuten Entzündung als Gegenregulation erhöht vorliegt, um mit seinen anti-inflammatorischen Eigenschaften der Inflammation entgegenzuwirken. Eine längere Stimulationsdauer, im Sinne eines chronischen entzündlichen Geschehens, hat eine Reduktion der Expression und Sekretion von Adiponektin zur Folge. Diese Beobachtungen treffen sowohl für beide Fettzellmodelle, als Beispiel peripher beteiligter Zellen, als auch für oral direkt von Parodontitis betroffene gingivale Epithelzellen zu.

Weiterführend sollte geklärt werden, ob sich dieser Effekt mit dem Protein SIRT1 in Zusammenhang bringen lässt.

In einer Pilotstudie konnte in dieser Arbeit auch im Speichel von parodontal-erkrankten Patienten im Vergleich zu gesunden Patienten eine verminderte Menge an Adiponektin nachgewiesen werden. Hierbei zeigte sich zudem ein signifikanter Unterschied der Adiponektinkonzentration zwischen parodontal-erkrankten und gesunden Frauen, wobei die gesunden Frauen eine höhere Konzentration aufwiesen. Obwohl man bei der hierfür durchgeführten Studie aufgrund der bereits aufgeführten Kritikpunkte nicht von repräsentativen Ergebnissen sprechen kann, sollten diesbezüglich weitere Untersuchungen durchgeführt werden, insbesondere hinsichtlich eines Vergleichs von Adiponektinkonzentration in Speichel und Blut bei an Parodontitis-erkrankten Probanden. Sollten die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigt werden, würde dies bedeuten, dass gerade parodontal-erkrankte Frauen von einer systematischen Parodontistherapie profitieren würden, da bei ihnen die Adiponektinsekretion unter einer chronischen Entzündung stärker absinkt als bei Männern, und damit auch die anti-inflammatorische Wirkung des Adiponektins vermehrt fehlt.

Des Weiteren lassen die Ergebnisse dieser Arbeit schlussfolgern, dass Patienten, die an Diabetes oder dem metabolischen Syndrom erkrankt sind, sich ebenfalls engmaschigen Kontrollen der parodontalen Verhältnisse unterziehen sollten, da hier gezeigt werden konnte, dass eine chronische Entzündung im Sinne einer parodontalen Erkrankung in Wechselwirkung zur systemischen metabolischen Funktion steht. Die chronische Entzündung führt zu subklinisch inflammatorischen Bedingungen im Organismus, welche sich auf das Sekretionsprofil der Adipozyten in Richtung eines pro-inflammatorischen

Typs auswirkt. Dies beinhaltet, dass vermehrt Entzündungsmediatoren sezerniert werden, gleichzeitig aber auch weniger Adiponektin ausgeschüttet wird. Dies führt einerseits dazu, dass Adiponektin an seinen Zielgeweben nicht anti-inflammatorisch wirken kann, andererseits begünstigt und fördert es Insulinresistenz, was wiederum zu Diabetes führt. Diabetes schließlich begünstigt das Fortschreiten parodontaler Entzündung und Destruktion, was, und hier schließt sich der Kreis, zu vermehrter Ausschüttung von Entzündungsmediatoren führt (siehe Abb. 3).

Bezüglich der Etablierung der SW-872-Liposarkomzellen als Fettzellmodell lässt sich abschließend sagen, dass beide Modelle (3T3-L1 und SW-872) zwar prinzipiell vergleichbar sind, allerdings unterscheiden sie sich hinsichtlich der Adiponektin-Produktion auf Proteinebene. Bei den differenzierten 3T3-L1-Fibroblasten konnte im Überstand eine hohe Menge an Adiponektin nachgewiesen werden, wohingegen im Überstand der SW-872-Liposarkomzellen kein oder nur eine geringe Menge an Adiponektin mittels ELISA nachgewiesen werden konnte. Erst nach Konzentrierung der Überstände konnte Adiponektin mittels Western Blot detektiert und der Einfluss von Entzündung auf die Bildung und Sekretion von Adiponektin analysiert werden. Daher sind die SW-872-Liposarkomzellen momentan nicht, bzw. nur eingeschränkt als Fettzellmodell nutzbar, allerdings könnte durch Optimierung des Adipogeneseprotokolls für diese Zelllinie eventuell eine bessere Vergleichbarkeit erreicht werden.

5. Zusammenfassung

Parodontale Erkrankungen haben laut der Vierten Deutschen Mundgesundheitsstudie (DMS IV) in den letzten Jahren deutlich zugenommen. Gleichzeitig lässt sich auch bei der Prävalenz des metabolischen Syndroms eine stetige Steigerung beobachten. Ferner steht das Krankheitsbild der Parodontitis mit unterschiedlichen Komponenten des metabolischen Syndroms, insbesondere der Adipositas und dem Diabetes in Zusammenhang. Einen wichtigen Verknüpfungspunkt stellt in diesem Zusammenhang Adiponektin dar. Adiponektin ist ein Hormon, dem anti-inflammatorische Eigenschaften zugesprochen werden und welches hauptsächlich von Adipozyten, in geringeren Mengen aber auch von anderen Geweben produziert und sezerniert wird.

Ziel der vorliegenden Promotionsarbeit war es, die Auswirkungen eines chronischen Entzündungszustandes, analog zu einer chronischen Parodontitis, auf Adipozyten zu untersuchen. Dies geschah mit besonderem Augenmerk auf das Adiponektinsystem. Analog zum bereits bekannten murinen Fettzellmodell, welches an 3T3-L1-Fibroblasten bereits etabliert ist, wurde in dieser Arbeit ein weiteres Fettzellmodell an humanen SW-872-Liposarkomzellen getestet.

Zu diesem Zweck wurden sowohl murine 3T3-L1-Fibroblasten als auch humane SW-872-Liposarkomzellen Adipogeneseprotokollen unterzogen, um sie zu Adipozyten-ähnlichen Zellen zu differenzieren. Mittels quantitativer Echtzeit-Polymerase-Ketten-Reaktion (qPCR) wurde anschließend die Vergleichbarkeit beider Modelle über typische Adipogenesemarker untersucht. Die Simulation eines chronischen Entzündungszustandes wurde durch die gezielte Stimulation mit typischen Entzündungsmediatoren *in vitro* durchgeführt. Mittels qPCR sowie Western Blot wurden Befunde auf mRNA- und Proteinebene in Hinblick auf das Adiponektinsystem an gingivalen Epithelzellen (GECs) und an den zu Adipozyten-ähnlichen Zellen differenzierten 3T3-L1 sowie SW-872-Liposarkomzellen erhoben. In einer Pilotstudie wurde außerdem an gesunden bzw. parodontal-erkrankten Probanden mittels *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) die Adiponektinmenge im Speichel bestimmt und verglichen.

Die Befunde der *in vitro*-Stimulationen zeigten, dass Adiponektin unter einer akuten Entzündung (kurzer Stimulationszeitraum) als Gegenregulation vermehrt produziert und sezerniert wird, während eine chronische Entzündung (langer Stimulationszeitraum) eine verminderte Produktion und Sekretion von Adiponektin zur Folge hat. Additiv wies eine Untersuchung im Speichel von parodontal-erkrankten Patienten im Vergleich zu gesunden Patienten eine verminderte Menge an Adiponektin nach. Letztendlich konnte die Regulation des Adiponektinsystems in humanen und murinen Adipozyten-ähnlichen Zellen unter Simulation einer chronischen Entzündung *in vitro* nachgewiesen werden.

Die erhobenen Befunde der vorliegenden Arbeit führten zum besseren Verständnis des regulatorischen Einflusses des Adiponektinsystems in sowohl akuten als auch chronischen Entzündungsreaktionen im Krankheitsbild der Parodontitis. Weiter lassen die Befunde eine wechselseitige Beeinflussung von peripheren Adipozyten und Parodontitis vermuten. Aufbauend auf diesen grundlegenden Erkenntnissen können weitere Untersuchungen folgen um einen wirksamen klinischen Ansatzpunkt für die Parodontitis-therapie und -prävention zu erlangen.

6. Literaturverzeichnis

Akira S, Hirano T, Taga T, Kishimoto T. Biology of multifunctional cytokines: IL 6 and related molecules (IL 1 and TNF). *FASEB J* 1990; 4: 2860-2867

Alba-Loureiro TC, Munhoz CD, Martins JO, Cerchiaro GA, Scavone C, Curi R, Sannomiya P. Neutrophil function and metabolism in individuals with diabetes mellitus. *Braz J Med Biol Res* 2007; 40: 1037-1044

Alberti KG, Eckel RH, Grundy SM, Zimmet PZ, Cleeman JI, Donato KA, Fruchart JC, James WP, Loria CM, Smith SC, Jr., International Diabetes Federation Task Force on E, Prevention, National Heart L, Blood I, American Heart A, World Heart F, International Atherosclerosis S, International Association for the Study of O. Harmonizing the metabolic syndrome: a joint interim statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity. *Circulation* 2009; 120: 1640-1645

Armitage GC. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Ann Periodontol* 1999; 4: 1-6

Barnes KM, Miner JL. Role of resistin in insulin sensitivity in rodents and humans. *Curr Protein Pept Sci* 2009; 10: 96-107

Berg AH, Combs TP, Scherer PE. ACRP30/adiponectin: an adipokine regulating glucose and lipid metabolism. *Trends Endocrinol Metab* 2002; 13: 84-89

Brasaemle DL. Thematic review series: adipocyte biology. The perilipin family of structural lipid droplet proteins: stabilization of lipid droplets and control of lipolysis. *J Lipid Res* 2007; 48: 2547-2559

Cao Z, Umek RM, McKnight SL. Regulated expression of three C/EBP isoforms during adipose conversion of 3T3-L1 cells. *Genes Dev* 1991; 5: 1538-1552

Caprio M, Feve B, Claes A, Viengchareun S, Lombes M, Zennaro MC. Pivotal role of the mineralocorticoid receptor in corticosteroid-induced adipogenesis. *FASEB J* 2007; 21: 2185-2194

Chinetti G, Zawadzki C, Fruchart JC, Staels B. Expression of adiponectin receptors in human macrophages and regulation by agonists of the nuclear receptors PPARalpha, PPARgamma, and LXR. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 314: 151-158

Cianciola LJ, Park BH, Bruck E, Mosovich L, Genco RJ. Prevalence of periodontal disease in insulin-dependent diabetes mellitus (juvenile diabetes). *J Am Dent Assoc* 1982; 104: 653-660

- Clover J, Gowen M. Are MG-63 and HOS TE85 human osteosarcoma cell lines representative models of the osteoblastic phenotype? *Bone* 1994; 15: 585-591
- Czekanska EM, Stoddart MJ, Richards RG, Hayes JS. In search of an osteoblast cell model for in vitro research. *Eur Cell Mater* 2012; 24: 1-17
- Demmer RT, Desvarieux M, Holtfreter B, Jacobs DR, Jr., Wallaschofski H, Nauck M, Volzke H, Kocher T. Periodontal status and A1C change: longitudinal results from the study of health in Pomerania (SHIP). *Diabetes Care* 2010; 33: 1037-1043
- Dinarelli CA. Overview of the interleukin-1 family of ligands and receptors. *Semin Immunol* 2013; 25: 389-393
- Doi H, Masaki N, Takahashi H, Komatsu H, Fujimori K, Satomi S. A new preadipocyte cell line, AP-18, established from adult mouse adipose tissue. *Tohoku J Exp Med* 2005; 207: 209-216
- Eisenberg E, Levanon EY. Human housekeeping genes are compact. *Trends Genet* 2003; 19: 362-365
- Fève B, Bastard JP, Vidal H. [Relationship between obesity, inflammation and insulin resistance: new concepts]. *C R Biol* 2006; 329: 587-597; discussion 653-585
- Folco EJ, Rocha VZ, Lopez-Illasaca M, Libby P. Adiponectin inhibits pro-inflammatory signaling in human macrophages independent of interleukin-10. *J Biol Chem* 2009; 284: 25569-25575
- Fruebis J, Tsao TS, Javorschi S, Ebbets-Reed D, Erickson MR, Yen FT, Bihain BE, Lodish HF. Proteolytic cleavage product of 30-kDa adipocyte complement-related protein increases fatty acid oxidation in muscle and causes weight loss in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98: 2005-2010
- Fuentes E, Fuentes F, Vilahur G, Badimon L, Palomo I. Mechanisms of chronic state of inflammation as mediators that link obese adipose tissue and metabolic syndrome. *Mediators Inflamm* 2013; 2013: 136584
- Gilowski L, Wiench R, Plocica I, Krzeminski TF. Amount of interleukin-1beta and interleukin-1 receptor antagonist in periodontitis and healthy patients. *Arch Oral Biol* 2014; 59: 729-734
- 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: 15-21
- Greenberg AS, Egan JJ, Wek SA, Garty NB, Blanchette-Mackie EJ, Londos C. Perilipin, a major hormonally regulated adipocyte-specific phosphoprotein associated with the periphery of lipid storage droplets. *J Biol Chem* 1991; 266: 11341-11346

- Gregoire FM, Smas CM, Sul HS. Understanding adipocyte differentiation. *Physiol Rev* 1998; 78: 783-809
- Grigoriadou ME, Koutayas SO, Madianos PN, Strub JR. Interleukin-1 as a genetic marker for periodontitis: review of the literature. *Quintessence Int* 2010; 41: 517-525
- Guerre-Millo M. Adiponectin: an update. *Diabetes Metab* 2008; 34: 12-18
- Hajer GR, van Haeften TW, Visseren FL. Adipose tissue dysfunction in obesity, diabetes, and vascular diseases. *Eur Heart J* 2008; 29: 2959-2971
- Haugen F, Drevon CA. Activation of nuclear factor-kappaB by high molecular weight and globular adiponectin. *Endocrinology* 2007; 148: 5478-5486
- Henderson B, Nair SP, Ward JM, Wilson M. Molecular pathogenicity of the oral opportunistic pathogen *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Annu Rev Microbiol* 2003; 57: 29-55
- Holt SC, Ebersole JL. *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, and *Tannerella forsythia*: the "red complex", a prototype polybacterial pathogenic consortium in periodontitis. *Periodontol* 2000 2005; 38: 72-122
- Hotamisligil GS. The role of TNF α and TNF receptors in obesity and insulin resistance. *J Intern Med* 1999; 245: 621-625
- Hulsmans M, Van Dooren E, Mathieu C, Holvoet P. Decrease of miR-146b-5p in monocytes during obesity is associated with loss of the anti-inflammatory but not insulin signaling action of adiponectin. *PLoS One* 2012; 7: e32794
- Iacopino AM. Periodontitis and diabetes interrelationships: role of inflammation. *Ann Periodontol* 2001; 6: 125-137
- Imamura T. The role of gingipains in the pathogenesis of periodontal disease. *J Periodontol* 2003; 74: 111-118
- Iwayama T, Yanagita M, Mori K, Sawada K, Ozasa M, Kubota M, Miki K, Kojima Y, Takedachi M, Kitamura M, Shimabukuro Y, Hashikawa T, Murakami S. Adiponectin regulates functions of gingival fibroblasts and periodontal ligament cells. *J Periodontal Res* 2012; 47: 563-571
- Jepsen S, Kerschull M, Deschner J. [Relationship between periodontitis and systemic diseases]. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz* 2011; 54: 1089-1096
- Kachlany SC. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* leukotoxin: from threat to therapy. *J Dent Res* 2010; 89: 561-570

Kadowaki T, Yamauchi T. Adiponectin and adiponectin receptors. *Endocr Rev* 2005; 26: 439-451

Kadowaki T, Yamauchi T, Kubota N, Hara K, Ueki K, Tobe K. Adiponectin and adiponectin receptors in insulin resistance, diabetes, and the metabolic syndrome. *J Clin Invest* 2006; 116: 1784-1792

Kaur J. A Comprehensive Review on Metabolic Syndrome. *Cardiol Res Pract* 2014; 2014: 943162

Kinane D, Bouchard P, Group EoEWoP. Periodontal diseases and health: Consensus Report of the Sixth European Workshop on Periodontology. *J Clin Periodontol* 2008; 35: 333-337

Kolenbrander PE, London J. Adhere today, here tomorrow: oral bacterial adherence. *J Bacteriol* 1993; 175: 3247-3252

Kornman KS, Page RC, Tonetti MS. The host response to the microbial challenge in periodontitis: assembling the players. *Periodontol 2000* 1997; 14: 33-53

Kraus D, Winter J, Jepsen S, Jager A, Meyer R, Deschner J. Interactions of adiponectin and lipopolysaccharide from *Porphyromonas gingivalis* on human oral epithelial cells. *PLoS One* 2012; 7: e30716

Lalla E, Lamster IB, Stern DM, Schmidt AM. Receptor for advanced glycation end products, inflammation, and accelerated periodontal disease in diabetes: mechanisms and insights into therapeutic modalities. *Ann Periodontol* 2001; 6: 113-118

Loe H. Periodontal disease. The sixth complication of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 1993; 16: 329-334

Mandal P, Park PH, McMullen MR, Pratt BT, Nagy LE. The anti-inflammatory effects of adiponectin are mediated via a heme oxygenase-1-dependent pathway in rat Kupffer cells. *Hepatology* 2010; 51: 1420-1429

Mealey BL, Rose LF. Diabetes mellitus and inflammatory periodontal diseases. *Compend Contin Educ Dent* 2008; 29: 402-408, 410, 412-403

Moore PA, Weyant RJ, Mongelluzzo MB, Myers DE, Rossie K, Guggenheimer J, Block HM, Huber H, Orchard T. Type 1 diabetes mellitus and oral health: assessment of periodontal disease. *J Periodontol* 1999; 70: 409-417

Novakofski J. Adipogenesis: usefulness of in vitro and in vivo experimental models. *J Anim Sci* 2004; 82: 905-915

Nussbaum G, Shapira L. How has neutrophil research improved our understanding of periodontal pathogenesis? *J Clin Periodontol* 2011; 38 Suppl 11: 49-59

Otterbein LE, Soares MP, Yamashita K, Bach FH. Heme oxygenase-1: unleashing the protective properties of heme. *Trends Immunol* 2003; 24: 449-455

Ouchi N, Kihara S, Funahashi T, Nakamura T, Nishida M, Kumada M, Okamoto Y, Ohashi K, Nagaretani H, Kishida K, Nishizawa H, Maeda N, Kobayashi H, Hiraoka H, Matsuzawa Y. Reciprocal association of C-reactive protein with adiponectin in blood stream and adipose tissue. *Circulation* 2003; 107: 671-674

Ozkurede VU, Franchi L. Immunology in clinic review series; focus on autoinflammatory diseases: role of inflammasomes in autoinflammatory syndromes. *Clin Exp Immunol* 2012; 167: 382-390

Page RC, Kornman KS. The pathogenesis of human periodontitis: an introduction. *Periodontol* 2000 1997; 14: 9-11

Page RC, Offenbacher S, Schroeder HE, Seymour GJ, Kornman KS. Advances in the pathogenesis of periodontitis: summary of developments, clinical implications and future directions. *Periodontol* 2000 1997; 14: 216-248

Park HK, Ahima RS. Resistin in rodents and humans. *Diabetes Metab J* 2013; 37: 404-414

Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 2001; 29: e45

Pihlstrom BL, Michalowicz BS, Johnson NW. Periodontal diseases. *Lancet* 2005; 366: 1809-1820

Poulos SP, Dodson MV, Hausman GJ. Cell line models for differentiation: preadipocytes and adipocytes. *Exp Biol Med (Maywood)* 2010; 235: 1185-1193

Preshaw PM, Alba AL, Herrera D, Jepsen S, Konstantinidis A, Makrilakis K, Taylor R. Periodontitis and diabetes: a two-way relationship. *Diabetologia* 2012; 55: 21-31

Proenca AR, Sertie RA, Oliveira AC, Campaaa AB, Caminhotto RO, Chimin P, Lima FB. New concepts in white adipose tissue physiology. *Braz J Med Biol Res* 2014; 47: 192-205

Qiang L, Wang H, Farmer SR. Adiponectin secretion is regulated by SIRT1 and the endoplasmic reticulum oxidoreductase Ero1-L alpha. *Mol Cell Biol* 2007; 27: 4698-4707

Ramos-Vara JA. Technical aspects of immunohistochemistry. *Vet Pathol* 2005; 42: 405-426

Romacho T, Elsen M, Rohrborn D, Eckel J. Adipose tissue and its role in organ crosstalk. *Acta Physiol (Oxf)* 2014; 210: 733-753

Romeo GR, Lee J, Shoelson SE. Metabolic syndrome, insulin resistance, and roles of inflammation--mechanisms and therapeutic targets. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2012; 32: 1771-1776

Ryan AS, Berman DM, Nicklas BJ, Sinha M, Gingerich RL, Meneilly GS, Egan JM, Elahi D. Plasma adiponectin and leptin levels, body composition, and glucose utilization in adult women with wide ranges of age and obesity. *Diabetes Care* 2003; 26: 2383-2388

Smith M, Seymour GJ, Cullinan MP. Histopathological features of chronic and aggressive periodontitis. *Periodontol* 2000 2010; 53: 45-54

Smolinska N, Dobrzyn K, Maleszka A, Kiezun M, Szeszko K, Kaminski T. Expression of adiponectin and adiponectin receptors 1 (AdipoR1) and 2 (AdipoR2) in the porcine uterus during the oestrous cycle. *Anim Reprod Sci* 2014; 146: 42-54

Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent RL, Jr. Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol* 1998; 25: 134-144

Stathopoulou PG, Benakanakere MR, Galicia JC, Kinane DF. Epithelial cell pro-inflammatory cytokine response differs across dental plaque bacterial species. *J Clin Periodontol* 2010; 37: 24-29

Stefan N, Stumvoll M. Adiponectin--its role in metabolism and beyond. *Horm Metab Res* 2002; 34: 469-474

Styner M, Sen B, Xie Z, Case N, Rubin J. Indomethacin promotes adipogenesis of mesenchymal stem cells through a cyclooxygenase independent mechanism. *J Cell Biochem* 2010; 111: 1042-1050

Taylor JJ. Cytokine regulation of immune responses to *Porphyromonas gingivalis*. *Periodontol* 2000 2010; 54: 160-194

Thorstensson H, Kuylenstierna J, Hugoson A. Medical status and complications in relation to periodontal disease experience in insulin-dependent diabetics. *J Clin Periodontol* 1996; 23: 194-202

Tsatsanis C, Zacharioudaki V, Androulidaki A, Dermitzaki E, Charalampopoulos I, Minas V, Gravanis A, Margioris AN. Adiponectin induces TNF-alpha and IL-6 in macrophages and promotes tolerance to itself and other pro-inflammatory stimuli. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 335: 1254-1263

Ukkola O, Santaniemi M. Adiponectin: a link between excess adiposity and associated comorbidities? *J Mol Med (Berl)* 2002; 80: 696-702

Umeda M, Tominaga Y, He T, Yano K, Watanabe H, Ishikawa I. Microbial flora in the acute phase of periodontitis and the effect of local administration of minocycline. *J Periodontol* 1996; 67: 422-427

Wang P, Mariman E, Keijer J, Bouwman F, Noben JP, Robben J, Renes J. Profiling of the secreted proteins during 3T3-L1 adipocyte differentiation leads to the identification of novel adipokines. *Cell Mol Life Sci* 2004; 61: 2405-2417

Whitehead JP, Richards AA, Hickman IJ, Macdonald GA, Prins JB. Adiponectin--a key adipokine in the metabolic syndrome. *Diabetes Obes Metab* 2006; 8: 264-280

Wiebe CB, Putnins EE. The periodontal disease classification system of the American Academy of Periodontology--an update. *J Can Dent Assoc* 2000; 66: 594-597

Wolfson N, Gavish D, Matas Z, Boaz M, Shargorodsky M. Relation of adiponectin to glucose tolerance status, adiposity, and cardiovascular risk factor load. *Exp Diabetes Res* 2012; 2012: 250621

Yamaguchi N, Argueta JG, Masuhiro Y, Kagishita M, Nonaka K, Saito T, Hanazawa S, Yamashita Y. Adiponectin inhibits Toll-like receptor family-induced signaling. *FEBS Lett* 2005; 579: 6821-6826

Yamaguchi N, Hamachi T, Kamio N, Akifusa S, Masuda K, Nakamura Y, Nonaka K, Maeda K, Hanazawa S, Yamashita Y. Expression levels of adiponectin receptors and periodontitis. *J Periodontal Res* 2010; 45: 296-300

Yamauchi T, Iwabu M, Okada-Iwabu M, Kadowaki T. Adiponectin receptors: a review of their structure, function and how they work. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2014; 28: 15-23

Yamauchi T, Kamon J, Ito Y, Tsuchida A, Yokomizo T, Kita S, Sugiyama T, Miyagishi M, Hara K, Tsunoda M, Murakami K, Ohteki T, Uchida S, Takekawa S, Waki H, Tsuno NH, Shibata Y, Terauchi Y, Froguel P, Tobe K, Koyasu S, Taira K, Kitamura T, Shimizu T, Nagai R, Kadowaki T. Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects. *Nature* 2003; 423: 762-769

Yokota T, Oritani K, Takahashi I, Ishikawa J, Matsuyama A, Ouchi N, Kihara S, Funahashi T, Tenner AJ, Tomiyama Y, Matsuzawa Y. Adiponectin, a new member of the family of soluble defense collagens, negatively regulates the growth of myelomonocytic progenitors and the functions of macrophages. *Blood* 2000; 96: 1723-1732

Zebisch K, Voigt V, Wabitsch M, Brandsch M. Protocol for effective differentiation of 3T3-L1 cells to adipocytes. *Anal Biochem* 2012; 425: 88-90

Zizzi A, Tirabassi G, Aspriello SD, Piemontese M, Rubini C, Lucarini G. Gingival advanced glycation end-products in diabetes mellitus-associated chronic periodontitis: an immunohistochemical study. *J Periodontal Res* 2013; 48: 293-301

7. Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. dent. Helmut Stark für die Überlassung des Themas sowie der Bereitstellung der finanziellen Mittel zum Durchführen der Versuchsreihen bedanken.

Ganz herzlich möchte ich mich bei Dr. med. dent. Dominik Kraus bedanken, der mich ausgezeichnet betreute und tatkräftig unterstützte. Ohne ihn wäre die Anfertigung dieser Dissertation unmöglich gewesen.

Auch seine Mitarbeiter waren mir jederzeit eine freundliche Unterstützung.

Auch bei Herrn Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Rainer Probstmeier aus der Klinik- und Poliklinik für Nuklearmedizin des Universitätsklinikums Bonn möchte ich mich für die Unterstützung im Rahmen der BONFOR-Nachwuchsgruppenförderung von Dr. Kraus bedanken. Ebenso bedanke ich mich bei Herrn Priv. Doz. Dr. rer. nat. Jochen Winter aus der Poliklinik für Parodontologie, Zahnerhaltung und Präventive Zahnheilkunde für die Hilfestellungen bei den real-time PCR Analysen.

Mein größter Dank gilt meinen Eltern, die mir, trotz eines Umweges, ein sorgenfreies Studium und diese Dissertation ermöglicht und mich in jeder Lebenslage unterstützt haben.

Zum Schluss danke ich ganz besonders Jan - für Rückhalt und Motivation in jeder Phase des Studiums und der Dissertation, für fachliche Hilfe und Ablenkung. Einfach für Alles.