

Regulatorische Effekte von Adipokinen auf die parodontale Wundheilung

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

Sema Tekin geb. Keser

aus Köln

2018

Angefertigt mit der Genehmigung
der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. James Deschner
2. Gutachter: Prof. Dr. med. Werner Götz

Tag der Mündlichen Prüfung: 14.02.2018

Aus der Sektion für Experimentelle Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde des Zentrums für
Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde des Universitätsklinikums Bonn
Leiter: Prof. Dr. James Deschner

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	5
1.1.	Parodontium	5
1.2.	Parodontitis	5
1.3.	Risikofaktoren	7
1.4.	Adipokine	8
1.5.	Die parodontale Wundheilung	11
1.6.	Ziel und Fragestellung der In-vitro-Studie	12
2.	Material und Methoden	13
2.1.	Probengewinnung und Kultivierung	13
2.2.	Zellstimulation	13
2.3.	Genexpression	14
2.4.	In-vitro-Wundheilung	16
2.5.	Osteogene Differenzierung	17
2.6.	Zellzahl	17
2.7.	Statistische Auswertung	18
3.	Ergebnisse	19
3.1.	Genexpressionsanalysen	19
3.1.1.	Expression von Adipokinen in PDL-Zellen unter normalen, regenerativen und entzündlichen Bedingungen	19
3.1.2.	Effekte von Adipokinen auf die Genexpression von Faktoren der parodontalen Wundheilung in PDL-Zellen unter normalen Bedingungen	20
3.1.3.	Effekte von Adipokinen auf die Genexpression von Faktoren der parodontalen Wundheilung in PDL-Zellen unter regenerativen Bedingungen	24
3.1.4.	Effekte von Adipokinen auf die Genexpression von Adipokinen und ihren Rezeptoren in PDL-Zellen (Autoregulation)	28
3.2.	Effekte von Adipokinen auf die Kalziumakkumulation in PDL-Zellen unter normalen und regenerativen Bedingungen	29

3.3.	Effekte von Adipokinen auf die In-vitro-Wundheilung in PDL-Zellen unter normalen und regenerativen Bedingungen	30
3.4.	Effekte von Adipokinen auf die Zellzahl in PDL-Kulturen unter normalen und regenerativen Bedingungen	33
3.5.	Zusammenfassung der wichtigsten Ergebnisse	34
4.	Diskussion	36
4.1.	Ergebnisse	36
4.2.	Material und Methoden	40
5.	Zusammenfassung	43
6.	Literaturverzeichnis	45
7.	Danksagung	56

1. Einleitung

1.1 Parodontium

Das Parodont ist eine komplexe Struktur, die durch ihr Gefüge aus weichgewebigen und mineralisierten Anteilen eine besondere Rolle im Kausystem besitzt. Es dient zur Verankerung des Zahnes in seiner knöchernen Alveole und sorgt für die Anpassung an funktionelle Veränderungen. Das Parodont leitet Schmerz- und Druckreize weiter und stellt zelluläre und humorale Abwehrkomponenten gegen Infektionen bereit. Die Gingiva, der eigentliche Alveolarknochen, das Wurzelzement und das Desmodont bilden die Bestandteile des Parodonts. Die Gingiva und die Alveolarmukosa kleiden die Mundhöhle aus. Den marginalen Anteil stellt ein keratinisiertes Weichgewebe dar, welches durch das Saumeptithel mit der Zahnoberfläche verbunden ist und so eine Barriere bildet. Das Saumeptithel besteht aus zwei Schichten, dem Stratum basale und Stratum suprabasale, und weist eine hohe Umsatzrate auf. Der Alveolarknochen ist mittels Kollagenfasern über das Desmodont mit dem Wurzelzement verbunden und sorgt für die Verankerung des Zahnes in seiner Alveole. Das Desmodont oder parodontale Ligament ist über Kollagenfasern sowohl mit dem Alveolarknochen als auch mit dem Wurzelzement verbunden. Die Kollagenfasern im Desmodont werden je nach funktioneller Belastung ausgerichtet und bilden ein Netzwerk, in dem auch zelluläre Bestandteile enthalten sind. Neben Fibroblasten befinden sich hier auch Osteoblasten, Zementoblasten und Progenitorzellen für das Wurzelzement und den Alveolarknochen. Blut- und Lymphgefäße sowie sensorische und autonome Nervenfasern versorgen dieses Gewebe. Das Wurzelzement bedeckt die Dentinoberfläche ab der Schmelz-Zement-Grenze nach apikal. Es werden fünf verschiedene Zementarten unterschieden, die sich in Lokalisation und Funktion unterscheiden. Dazu gehören das azellulär-afibrilläre Zement, azelluläre Fremdfaserzement, das zelluläre Eigenfaserzement und das zelluläre Gemischtfaserzement.

1.2 Parodontitis

Parodontitis ist eine entzündlich-destruktive Erkrankung des Zahnhalteapparates, die gekennzeichnet ist durch parodontale Taschen sowie Knochen- und Attachmentverlust (Page und Kornman, 2000). Die letzte deutsche Mundgesundheitsstudie (DMS V) von

2014 zeigte einen deutlichen Rückgang der Anzahl an Menschen mit parodontalen Erkrankungen. Dennoch weisen 43,4 % aller jüngeren Erwachsenen (35 bis 44 jährige) eine moderate und 8,2 % eine schwere Parodontitis auf. 44,8 % aller jüngeren Senioren (65- bis 74-Jährige) sind mit einer moderaten und 19,8 % mit einer schweren Parodontitis behandlungsbedürftig (Institut der deutschen Zahnärzte, Bundeszahnärztekammer). Der Rückgang der Parodontitisfälle geht sicherlich mit einer besseren Aufklärung und effektiveren prophylaktischen Maßnahmen einher. Dennoch ist die Anzahl der Betroffenen sehr hoch und es besteht Behandlungsbedarf.

Parodontale Erkrankungen werden klassifiziert in 1. gingivale Erkrankungen, 2. aggressive Parodontitis, 3. chronische Parodontitis, 4. nekrotisierende parodontale Erkrankungen, 5. Parodontitis als Manifestation einer Systemerkrankung, 6. Abszesse des Parodonts, 7. Parodontitis im Zusammenhang mit endodontischen Läsionen und 8. entwicklungsbedingte oder erworbene Deformationen und Zustände (Armitage, 1999). Die chronische Parodontitis ist die häufigste Form der Parodontitis und kommt vorwiegend in höheren Altersgruppen vor. Entsprechend der Ausdehnung wird sie unterteilt in die lokalisierte (< 30 % befallene Zahnflächen) und die generalisierte Form (> 30 % befallene Zahnflächen). Weiterhin wird die Parodontitis bezüglich des Schweregrads eingeteilt. Bei einem klinischen Attachmentverlust von 1-2 mm spricht man von einer leichten, bei 3-4 mm von einer moderaten und bei > 5 mm von einer schweren Parodontitis. Die aggressive Parodontitis zeichnet sich durch eine schnelle Gewebedestruktion, familiäre Häufung, zumeist genetische Disposition und abnorme Phagozytenfunktionen aus. Sie kann sich lokal oder generalisiert ausprägen. Betroffene sind meistens junge Patienten. Die nekrotisierende ulzerierende Parodontitis (NUP) manifestiert sich durch eine nekrotisierende Zerstörung der Gingiva, des Desmodonts und des Alveolarknochens. Risikofaktoren der Parodontitis sind neben Plaque bzw. parodontalpathogenen Bakterien auch Nikotinabusus und systemische Faktoren, wie z. B. Diabetes mellitus (Buhlin et al., 2003). Nach neueren Studien rücken nun weitere Stoffwechself dispositionen wie das metabolische Syndrom und Adipositas als mögliche Risikofaktoren für Parodontitiden ins Blickfeld (Al-Zahrani et al., 2003).

1.3 Risikofaktoren

Die Anwesenheit parodontalpathogener Mikroorganismen stellt einen anerkannten Risikofaktor für die Entstehung und Progredienz einer Parodontitis dar. Stark mit der Parodontitis assoziierte Bakterien sind v.a. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* und *Tannerella forsythia*. Sie organisieren sich in Biofilmen an natürlichen und iatrogenen Nischen, wie z.B. insuffizienten Füllungsrandern. Virulenzfaktoren wie Leukotoxin, Kollagenasen und Lipopolysaccharide bestimmen ihre Pathogenität (Kraus et al., 2012). Bakterien führen zur Aktivierung von Abwehrzellen, z.B. Makrophagen, welche ihrerseits durch Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokinen die lokale Entzündungsreaktion verstärken können (Curat et al., 2006).

Nikotinabusus ist ebenfalls ein etablierter Risikofaktor (Fang et al., 2005). So sind Raucher häufiger von Parodontitis betroffen als Nichtraucher. Der Grad der Schädigung des Parodonts korreliert mit der Anzahl der gerauchten Zigaretten pro Tag.

Genetische Dispositionen, häufig erkannt an dem familiär gehäuften Auftreten von parodontalen Erkrankungen, stellen ebenfalls einen Risikofaktor dar.

Systemerkrankungen, wie z.B. Diabetes mellitus, können ebenfalls als Risikofaktor zur Parodontitis beitragen. Diabetes mellitus ist eine heterogene Stoffwechselerkrankung mit chronisch erhöhtem Blutzucker, welche in Typ I und II eingeteilt wird. Typ-I-Diabetes tritt vor allem bei meist normalgewichtigen Kindern und Jugendlichen auf und geht mit einer fehlenden oder gestörten Insulinsekretion einher. Typ-II-Diabetes hingegen ist eine Erkrankung des mittleren und höheren Erwachsenenalters. Betroffene leiden unter einer gestörten Insulinsensitivität bzw. -resistenz und sind meistens übergewichtig. Adipositas wird laut der S3-Leitlinie der Deutschen Adipositas Gesellschaft (DAG, 2014) nach dem Body Mass Index (BMI) klassifiziert. Demnach handelt es sich bei einem BMI von 18,5 bis 24,9 um Normalgewichtigkeit, bei einem BMI von 25,0 bis 29,9 um Übergewicht, bei einem BMI von 30 bis 34,9 um Adipositas Grad I, bei einem BMI von 35 bis 39,9 um Adipositas Grad II und bei einem BMI größer 40 um Adipositas Grad III (DAG, 2014). Diabetes mellitus Typ II und Adipositas sind eng mit dem metabolischen Syndrom assoziiert. Die International Diabetes Federation (IDF) definiert das metabolische Syndrom als eine abdominale Adipositas, messbar mit dem Bauchumfang (bei Männern ≥ 94 cm, bei Frauen ≥ 80 cm) in Verbindung mit zwei weiteren Risikofaktoren, wie z.B.:

- Diabetes mellitus (Nüchternblutzuckerwerte > 110 mg/dl)

- Fettstoffwechselstörung (Triglyzeridwerte > 150 mg/dl, HDL-Cholesterin < 40 mg/dl bei Männern, <50 mg/dl bei Frauen)
- Bluthochdruck (ab > 130 systolisch und < 85 diastolisch) (IDF, 2006).

Entscheidend beim metabolischen Syndrom und Adipositas ist nicht das Ausmaß des Übergewichts allein, sondern das Fettverteilungsmuster, denn das intraabdominale Fett bzw. viszerale Fettgewebe ist sehr stoffwechselaktiv und beeinflusst den Fett- und Kohlehydratmetabolismus. Adipositas gilt als wichtiger Risikofaktor für zahlreiche systemische Erkrankungen, z.B. Diabetes mellitus und Herz-Kreislaufkrankungen. So wie die Anzahl der Menschen höheren Alters in Deutschland zunimmt, so steigt auch die Prävalenz der Übergewichtigkeit bzw. Adipositas an. Während 1999 56 % der Männer und 40 % der Frauen als übergewichtig galten, waren es 2009 60 % der Männer und 43 % der Frauen (d.h. 51 % der erwachsenen Bevölkerung) in Deutschland (Statistisches Bundesamt, 2013). Diesen Ergebnissen liegt der BMI (Body Mass Index) zugrunde. Diese immer größer werdende Patientengruppe benötigt die besondere Aufmerksamkeit der Zahnheilkunde, denn Meta-Analysen deuten auf ein erhöhtes Risiko für Parodontitis bei schlecht eingestelltem Diabetes mellitus, Übergewichtigkeit, Adipositas und metabolischem Syndrom hin (D'Aiuto et al., 2008; Dalla Vecchia et al., 2005; Khader et al., 2008). Wenn auch der genaue Zusammenhang zwischen Parodontitis und diesen systemischen Erkrankungen bzw. Zuständen bisher nicht geklärt ist, so kann vermutet werden, dass stoffwechselaktive Mediatoren aus dem Fettgewebe, d.h. Adipokine/Adipozytokine, eine Rolle spielen könnten. Adipokine sind Moleküle, die von Adipozyten (Fettzellen), z.T. aber auch von anderen Zellen, zumeist im Fettgewebe produziert werden.

1.4 Adipokine

Das Fettgewebe dient dem Organismus nicht nur als Energiespeicher und Thermoregulator, sondern auch als endokrines Organ, in dem z.B. Adipokine produziert werden (Booth et al., 2016). Zu diesen Zytokinen gehören neben Entzündungsmediatoren wie Tumornekrosefaktor- α (TNF α), Interleukin-6 (IL-6), C-reaktives Protein, Monozytenchemotaktisches Protein-1 auch Adiponektin, Leptin, Resistin und Visfatin. Sie regulieren das Hunger- und Sättigungsgefühl, die Homöostase des Fettgewebes und den Glukosestoffwechsel, Insulinresistenz und Entzündungs-

sowie Wundheilungsprozesse. Somit ist das Fettgewebe als endokrin aktiv zu bezeichnen. Adipokine könnten den fehlenden Link zwischen Parodontitis und Diabetes mellitus, Adipositas und metabolischem Syndrom darstellen (Deschner et al., 2014). Bei Übergewicht und Adipositas sind die Serumspiegel von proinflammatorischen Adipokinen erhöht und es liegt eine chronische, subklinische, systemische Entzündung vor, die möglicherweise die Entstehung und Progredienz der Parodontitis fördert (Santos-Alvarez et al., 1999).

Adiponektin ist ein Peptidhormon mit zwei Rezeptoren, AdipoR1 und AdipoR2. Die durchschnittliche Plasmakonzentration liegt bei 1-30 µg/ml. Neben Adipozyten produzieren auch Osteoblasten, Synovialfibroblasten, Endothelzellen, kardiale und dermale Fibroblasten Adiponektin (Robinson et al., 2011). Auch in parodontalen Zellen und Geweben, z.B. gingivalen Fibroblasten, sowie in der gingivalen Sulkusflüssigkeit wurde Adiponektin nachgewiesen. Systemisch wirkt Adiponektin als Insulinsensitizer, was eine antidiabetogene Wirkung erzielt (Nokhbehsaim et al., 2014). Die Rolle von Adiponektin im Entzündungsgeschehen ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Ehling et al. (2006), Liao et al. (2009) und Kitahara et al. (2009) zeigen eine proinflammatorische Aktivität von Adiponektin, während Lago et al. (2007) antiinflammatorische Vorzüge des Proteins darstellen. Einige Studien deuten auf verminderte Adiponektin-Serumspiegel bei Adipositas und Parodontitis hin. Uneinigkeit herrscht jedoch in den Adiponektinspiegeln nach einer Parodontitisbehandlung. Bei Iwamoto et al. (2003) blieben die Adiponektinspiegel bei Parodontitispatienten nach einer Behandlung unverändert. In der Studie von Matsumoto et al. (2009) hingegen zeigten Parodontitispatienten, die gleichzeitig an einem Diabetes mellitus Typ II litten, erhöhte Adiponektinserumspiegel nach einer nichtchirurgischen Parodontitisbehandlung mit Antibiotikagabe.

Leptin wurde an Knock-out-Mäusen mit einem Gendefekt im ob-Gen, welches für Leptinprotein kodiert, entdeckt. Diese genetisch adipösen Mäuse mit Verlust der Leptinwirkung weisen Adipositas und eine Insulinresistenz auf. Neben dem Fettgewebe ist Leptin in verschiedenen anderen Zellen und in der gingivalen Sulkusflüssigkeit nachweisbar. Leptin ist stark mit Übergewichtigkeit und Adipositas assoziiert und reguliert das Sättigungs- und Hungergefühl (Zimmet et al., 1996). Leptin regt die Proliferation, Kollagensynthese und Mineralisation in Osteoblasten an und reguliert so

die Knochenhomöostase (Iwamoto et al., 2004). Es stimuliert orale Keratinozyten zur Bildung von Wachstumsfaktoren und führt bei dermalen Fibroblasten über Bildung von extrazellulärer Matrix zur Wundheilung (Gröschl et al., 2005). Dieses Adipokin ist auch an inflammatorischen Prozessen beteiligt (Lago et al., 2008) und könnte parodontale Zellen negativ beeinflussen (Nokhbehsaim et al. 2014). In einigen Studien zeigten Parodontitispatienten niedrigere Leptinspiegel als parodontal gesunde Patienten (Liu et al., 2013). Weitere Studien belegen verminderte Leptinserumspiegel nach einer nicht-chirurgischen Parodontitistherapie (Shimada et al., 2010).

Resistin wird u.a. in Adipozyten und Osteoblasten produziert und regt deren Proliferation an. Gleichzeitig reguliert Resistin die Anzahl von differenzierten Osteoklasten. Mu et al. (2006) zeigten die angiogenetische Wirkung Resistins auf Endothelzellen. Resistin übt starke proinflammatorische Wirkungen aus (Bokarewa et al., 2005). Furugen et al. (2013) berichteten über die Produktion von Resistin in neutrophilen Granulozyten, die mit *Porphyromonas gingivalis*- und *Escherichia coli*-Lipopolysacchariden stimuliert wurden. Hiroshima et al. (2012) bestätigten die Effekte von *Porphyromonas gingivalis* auf Resistin und wiesen dieses Adipokin auch in der gingivalen Sulkusflüssigkeit nach. Eine Steigerung der Resistin-Genexpression durch Lipopolysaccharide (LPS) haben Lu et al. (2002) dargestellt. Studien über die Rolle Resistins in der Parodontitis zeigen, dass der Resistin-Serumspiegel bei parodontaler Destruktion erhöht ist.

Visfatin ist auch als PBEF (pre-B cell colony enhancing factor) oder NAMPT (nicotinamide phosphoribosyltransferase) bekannt. Neben dem viszeralen Fettgewebe wird das Protein auch in peripheren Monozyten und Geweben des Parodonts gebildet (Nogueira et al., 2014; Nokhbehsaim et al., 2013). Visfatin zeigt insulinmimetische Eigenschaften, indem es an den Insulinrezeptor (IR) bindet und diesen aktiviert (Xie et al., 2007). Es induziert die Tyrosinphosphorylierung von IR, IRS-1 und IRS-2. Bei Adipositas und Diabetes mellitus sind erhöhte Visfatin-Serumkonzentrationen zu finden. Neben seiner angiogenetischen Wirkung zeigt dieses Adipokin bei der rheumatoiden Arthritis proinflammatorische Aktivität. Des Weiteren interagiert es mit zahlreichen proinflammatorischen Zytokinen wie IL-6, TNF α und Interleukin-1 β (IL-1 β). Raghavendra et al. (2012) und Pradeep et al. (2011, 2012) beobachteten höhere Visfatinwerte im Serum und in der gingivalen Sulkusflüssigkeit bei Patienten mit chronischer Parodontitis im Vergleich mit parodontal gesunden Probanden. Ferner berichteten sie über

reduzierte Visfatinserum- und -sulkusspiegel nach nichtchirurgischer Parodontitisbehandlung. Die Synthese von Adipokinen und deren Regulation in parodontalen Zellen ist noch weitgehend unbekannt.

1.5 Die parodontale Wundheilung

Die Parodontitis ist eine chronische entzündliche Erkrankung. Das Ziel der Parodontitistherapie besteht vor allem darin, die bakteriell verursachte Entzündung, welche für die parodontale Destruktion verantwortlich ist, zu reduzieren und die parodontalen Gewebestrukturen idealerweise wiederherzustellen. Nichtchirurgische Maßnahmen, wie z.B. das Entfernen supra- und subgingivaler Konkremente (Scaling/Root Planing) mit bzw. ohne antibiotische Behandlung, können eine parodontale Wundheilung in Gang setzen. Die allgemeingültigen Phasen der Wundheilung mit der Phase der Entzündung, der Proliferation und Migration, der Matrixbildung und der Reifung finden sich auch in den parodontalen Geweben wieder. Die Wundheilung im Parodont ist komplex, da verschiedene Gewebestrukturen beteiligt sind (Sculean et al., 2015). Die epithelialen Anteile proliferieren schneller als das kollagene und knöcherne Gewebe des Parodonts und besetzen die gesäuberte Wurzeloberfläche zuerst (epitheliale Reattachment). Die Folge ist die Ausbildung eines langen Saumepithels im Sinne einer Reparatur. Erst mit chirurgischen Maßnahmen in Kombination mit regenerationsfördernden Substanzen bzw. Materialien kann der Versuch einer vollständigen Wiederherstellung der parodontalen Strukturen im Sinne einer Regeneration unternommen werden. Hierbei kommen z.B. Knochen und Knochenersatzmaterialien, Membranen und/oder Schmelzmatrixproteine zum Einsatz, mit dem erwähnten Ziel, das Epithel auszuschliessen und desmodontale Fasern, Alveolarknochen und Wurzelzement zu regenerieren. Schmelzmatrixproteine (Amelogenine) werden von Zellen der Hertwigschen Epithelscheide während des Wurzelwachstums in der Zahnentwicklung sezerniert. In In-vitro-Versuchen konnten wachstumsfördernde Eigenschaften dieser Proteine gezeigt werden, welche Ähnlichkeiten mit Wachstumsfaktoren wie TGF β (Transforming Growth Factor) und BMP (Bone Morphogenetic Protein) haben. Klinische Studien belegen eine signifikante Reduktion der Sondierungstiefen sowie signifikante Attachment- und Knochengewinne

nach Applikation von Schmelzmatrixproteinen (Bosshardt et al., 2008; Cochran et al., 2000).

1.6 Ziel und Fragestellung der In-vitro-Studie

Ziel dieser In-vitro-Arbeit ist es, die Rolle von Adipokinen im Parodont zu untersuchen. Dabei wurde der Frage nachgegangen, ob parodontale Ligament (PDL)-Zellen Adipokine unter normalen, entzündlichen und regenerativen Bedingungen produzieren. Des Weiteren sollte beurteilt werden, welchen Einfluss diese Adipokine auf die Proliferation, die Produktion von Wachstumsfaktoren und Zytokinen, die Kollagensynthese, die Wundfüllrate und die osteogene Differenzierung von PDL-Zellen unter normalen und regenerativen Bedingungen haben. Es wurde angenommen, dass PDL-Zellen Adipokine und ihre Rezeptoren produzieren. Weiterhin wurde angenommen, dass proinflammatorische Adipokine (Leptin, Resistin und Visfatin) die Funktion der PDL-Zellen negativ beeinflussen und dass antiinflammatorische Adipokine (Adiponektin) die Zellfunktionen positiv stimulieren. Somit könnten proinflammatorisch wirkende Adipokine die parodontale Wundheilung negativ beeinflussen und als prädiktive Größen für das Resultat nach einer Parodontitistherapie fungieren. Diese Arbeit soll dazu beitragen, den Einfluss von Übergewicht und Adipositas auf die parodontale Wundheilung auf molekularer und zellulärer Ebene besser zu verstehen.

2. Material und Methoden

2.1 Probengewinnung und Kultivierung

Die in den In-vitro-Versuchen verwendeten humanen PDL-Zellen stammen von kariesfreien, parodontal gesunden Zähnen, welche im Rahmen kieferorthopädischer Behandlung extrahiert wurden. Die von der Wurzelhaut gewonnenen Zellen wurden in Zellkulturschalen mit Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Invitrogen, Karlsruhe), zusätzlich 10 % Fetale Bovine Serum (FBS, Invitrogen) und 1 % Penicillin/Streptomycin (Invitrogen), bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Konfluente Kulturschalen wurden zum Passagieren mit sterilem 1-fachem Phosphate-Buffered-Saline Waschpuffer (PBS) (Invitrogen) gewaschen und anschließend 5 Minuten im Inkubator bei 37°C und 5 % CO₂ mit der Peptidase Trypsin-EDTA (Invitrogen) inkubiert. Die Reaktion wurde mit DMEM mit 10 %igem FBS gestoppt. Die Zellsuspension wurde gesammelt und 5 Minuten bei 500 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Sediment in 1 ml PBS resuspendiert. Zur weiteren Kultivierung oder zur Durchführung von Versuchen wurden PDL-Zellen in 6-Well-Kulturplatten (Labomedic, Bonn) mit einer Ausgangszellzahl von 50x10³ Zellen/Well ausgesät. Alle Versuche wurden an PDL-Zellen der 3. bis 5. Passage durchgeführt. Mediumwechsel und mikroskopische Kontrollen auf Zellwachstum und Kontamination wurden alle 2 bis 3 Tage durchgeführt. Für die Versuche wurden Zellkulturen bis zu einer Konfluenz von 80 bis 90 % kultiviert und einen Tag vor einem Versuch auf Kulturmedium mit reduziertem Serumanteil von 2 % FBS umgestellt.

2.2 Zellstimulation

Für die Simulation eines regenerativen Milieus in den In-vitro-Versuchen wurden PDL-Zellen mit Schmelzmatrixproteinen (Emdogain[®], Straumann, Freiburg) in einer Konzentration von 100 µg/ml inkubiert. Eine In-vitro-Entzündung wurde durch Kultivierung der PDL-Zellen mit dem proinflammatorischen Zytokin IL-1β in einer Konzentration von 1 ng/ml simuliert. PDL-Zellen wurden mit Adiponektin, Leptin, Resistin und/oder Visfatin mit folgenden Konzentrationen inkubiert: Adiponektin 3 µg/ml (R&D Systems, Wiesbaden), Leptin 0,3 / 3 / 30 ng/ml (R&D Systems), Resistin 10 / 50 / 100 ng/ml (biomol, Hamburg), Visfatin 30 / 100 / 300 ng/ml (biomol). Die Auswahl der

Konzentrationen orientierte sich an In-vitro-Versuchen an ähnlichen Zelllinien (z.B. Osteoblasten oder Fibroblasten) und Nachweisen aus der Sulkusflüssigkeit (Bozkurt et al., 2006; Brentano et al., 2007; Karthikeyan et al., 2007; Luo et al., 2006; Yamaguchi et al., 2007).

2.3 Genexpression in PDL-Zellen

Die Extraktion der Ribonukleinsäure (RNA) erfolgte mit dem RNeasy[®] Protect Mini Kit (Qiagen, Hilden). Die Zellkulturen in einer 6-Well-Platte wurden zweimal mit 500 µl 1-fachem PBS Waschpuffer je Well gewaschen. Anschließend wurde 350 µl je Well RLT-Lysepuffer aus einem vorbereiteten Gemisch aus 990 µl RLT (Qiagen) und 10 µl β-Mercaptoethanol zugegeben und mit Hilfe eines sterilen normierten Instrumentes wurden die Zellen und das Puffer vermengt. Dieses Zell-Puffer-Gemisch wurde in vorbereiteten Eppendorf Tubes aufgefangen und im Verhältnis 1:1 mit Ethanol gemischt. Die Suspension wurde anschließend auf eine RNeasy[®]-Säule pipettiert und für 30 Sekunden bei $13,2 \times 10^3$ rpm zentrifugiert. Der Überstand aus dem Auffangtube wurde dekantiert. Dem Sediment wurde 700 µl RW1 Waschpuffer (Qiagen) zugegeben und für eine Minute bei $13,2 \times 10^3$ rpm zentrifugiert und das Zentrifugat erneut verworfen. Dieser Vorgang wurde zweimal mit je 500 µl RPE Puffer (Qiagen) und einer Zentrifugation für eine Minute bei $13,2 \times 10^3$ rpm wiederholt. Im Weiteren wurde die RNeasy[®]-Säule mit einem leeren Auffangtube für 15 Sekunden bei $13,2 \times 10^3$ rpm zentrifugiert und das Filtrat verworfen. Die Elution der RNA aus der RNeasy[®]-Säule erfolgte mit 30 µl RNase freiem Wasser, welches direkt auf die Silica-Gel-Membran der Säule pipettiert und für 1 Minute bei $13,2 \times 10^3$ rpm zentrifugiert wurde. Das Gesamt-Eluat betrug somit 30 µl. Die Messung der RNA Konzentration erfolgte mit Hilfe des Spektrophotometers ND-1000 (Peqlab, Erlangen). Für die Negativkontrolle wurde RNase freies Wasser gemessen. Für die Probenanalyse wurde 1 µl Probenmenge verwendet.

Die Synthese der komplementären Desoxyribonukleinsäure (cDNA) erfolgte mit dem iScript[™] Select cDNA Synthesis Kit (BioRad, München) nach Angaben des Herstellers. Es wurde ein Mastermix aus 4 µl 5x iScript select reaction mix, 2 µl Oligo(dT) 20 primer und 1 µl iScript Reverse Transcriptase je Probe angesetzt, wobei alle Reagenzien auf Eis gekühlt wurden. Das Probenvolumen von 13 µl setzte sich zusammen aus RNA und RNase freiem Wasser. Somit ergab sich ein Gesamtvolumen von 20 µl. Die Inkubation

erfolgte im MyCycler[®] (BioRad, München) in 2 Stufen für 90 Minuten bei 42°C und anschließend für 5 Minuten bei 85°C. Die Lagerung der transkribierten cDNA erfolgte bei -20°C. Die Expressionsanalyse der Gene Adiponektin, Leptin, Resistin, Visfatin, AdipoR1 und AdipoR2, IL-6, Interleukin-8 (IL-8), TNF α , COX2 (Cyclooxygenase 2), TGF β , VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), IGF1 (Insulin-like Growth Factor 1), Col1 (Kollagen Typ 1), BMP2, Osteocalcin und Runx2 (Runt-related Transcription Factor 2) wurden mit spezifischen Primern (QuantiTect Primer Assay, Qiagen, Hilden) und mit Hilfe des Polymerase-Kettenreaktion (PCR)-Gerätes iCycler iQ[®] (BioRad, München) durchgeführt. Entsprechend der Anleitung des Analysekits QuantiFast[™] SYBR[®] Green PCR Kit (Qiagen) wurde ein Mastermix aus 12,5 μ l 2x QuantiFast[™] SYBR[®] Green PCR Master Mix, 9 μ l RNase freiem Wasser und 2,5 μ l Primer hergestellt. Diesem Mastermix wurde 1 μ l cDNA Probenmaterial hinzugefügt. Das Gesamtvolumen betrug somit 25 μ l je Well in einer 96-Well-Platte. In 40 Zyklen lief zunächst eine initiale Anwärmung auf 95°C für 5 Minuten zur enzymatischen Aktivierung und anschließend die Denaturierung bei 95°C für 10 Sekunden. Die folgende kombinierte Annealing- und Extension-Phase erfolgte bei 60°C für 30 Sekunden. Als House-Keeping-Gen wurde GAPDH (Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase) verwendet. Die Negativkontrolle zur Kontrolle der Spezifität wurde mit RNase freiem Wasser anstatt der Probe durchgeführt. Die Datenauswertung erfolgte nach der CT Methode (comparative threshold cycle). Die real-time PCR kann absolut oder relativ quantifiziert werden. Für die absolute Quantifizierung wird in einem Vorversuch eine Standardkurve erstellt, an Hand derer man im eigentlichen Versuch die absolute Menge des Zielgens in der Probe ermittelt. Die in dieser Arbeit angewandte relative Quantifizierung trifft eine Aussage über den Unterschied zwischen der Expression des Zielgens in der Probe im Vergleich zur Expression in der Kontrolle. Der Berechnung der Expressionsunterschiede nach Pfaffl (2001) liegen die CT (cycle threshold)- oder CP (crossing point)-Werte der behandelten Probe, der unbehandelten Kontrolle und des House-Keeping-Gens (Referenzgen), in dieser Arbeit GAPDH, zu Grunde. Der CT-Wert wird in der exponentiellen Phase der PCR ermittelt und gibt die Anzahl der Zyklen wieder, die notwendig sind, um ein messbares spezifisches Fluoreszenzsignal zu erhalten und das unspezifische Hintergrundfluoreszenzsignal der Reaktion zu übersteigen. Ein niedriger CT-Wert deutet auf eine hohe Ausgangszahl an DNA in der Probe hin, da bereits nach wenigen Zyklen

ein messbares Fluoreszenzsignal erreicht wird. Zunächst wurde der CP-Wert des House-Keeping-Gens vom CP-Wert des Zielgens subtrahiert, wodurch man einen Delta CP-Wert erhielt ($\Delta\text{CP} = \Delta\text{CP des Zielgens} - \Delta\text{CP des House-Keeping-Gens}$) (Pfaffl, 2001). Mit dieser Normierung (auch Normalisierung genannt) werden Störfaktoren, die im Versuchsansatz die Probe und das Referenzgen gleichermaßen beeinflussen, herausgerechnet. Als nächstes wurde der Delta-Delta-CP-Wert ermittelt, indem der CP-Wert der unbehandelten Kontrolle von dem CP-Wert der Probe subtrahiert wurde ($\Delta\Delta\text{CP} = \Delta\text{CP der behandelten Probe} - \Delta\text{CP der unbehandelten Kontrolle}$). Der auf diese Weise errechnete Wert drückt den relativen Expressionsunterschied zwischen einer behandelten Probe und einer unbehandelten Kontrolle, normiert zum Referenzgen unter idealen Bedingungen, aus ($\text{Ratio} = 2^{(-\Delta\Delta\text{CP})}$).

2.4 In-vitro-Wundheilung

Konfluente Zellkulturen in 6-Well-Kulturplatten wurden mehrfach mit sterilem PBS gewaschen. Der Monolayer wurde mit einem speziellen sterilen Instrument in normierter Breite von 3mm verletzt (Abbildung 1).

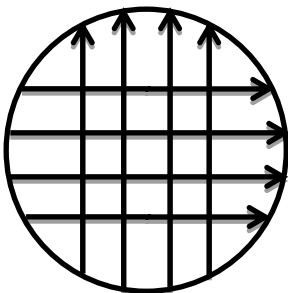


Abb. 1: Verletzungsmuster im In-vitro-Wundheilungsversuch

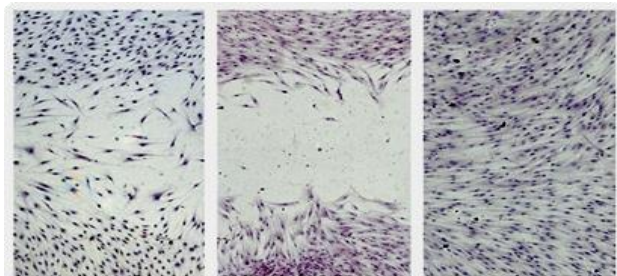


Abb. 2: Annäherung der Wundränder in PDL-Zellmonolayer

Nach einem Waschvorgang mit PBS erfolgte die Inkubation mit den Adipokinen Adiponektin, Leptin, Resistin und Visfatin und simultan mit EMD unter 2 % FBS-haltigem DMEM-Medium. PDL-Zellen ohne Stimulanzen dienten als Kontrollgruppe. Von Tag 0 (Tag der Verletzung) bis zur vollständigen Wundfüllung (Abb. 2) wurden täglich fotografische Dokumentationen mit einer digitalen Kamera (Kodak DC 290, Stuttgart) und einem inversen Mikroskop (Axiovert 25C, Zeiss, Göttingen) angefertigt. Die histomorphometrische Kontrolle der Annäherung der Wundränder erfolgte an 12

definierten Punkten in jedem Well und wurden durch Abstandsmessungen zwischen den Wundrändern bewertet (Alpha Digidoc 1000, Alpha Innotech, San Leandro, CA, USA).

2.5 Osteogene Differenzierung

Zur Bestimmung der Kalziumakkumulation wurden PDL-Zellen in 24-Well-Platten bis zu einer Konfluenz von 60 % kultiviert und anschließend für 24 Stunden mit 1 %igem FBS Medium inkubiert. An Tag 1 erfolgte mit einem Mediumwechsel auch die erste Inkubation mit EMD (100 µg/ml) und/oder Adiponektin (3 µg/ml), Leptin (3ng/ml), Resistin (100 ng/ml) oder Visfatin (100 ng/ml). Das Auffrischen des Kulturmediums und die Inkubation erfolgten fünf Mal im Abstand von drei Tagen. Es wurden zwei Kontrollgruppen geführt, wobei eine Gruppe nicht stimuliert wurde und die andere Gruppe mit Osteoblasten-Differenzierungsmedium (ODM), bestehend aus DMEM-Medium mit 10 % FBS, 10 mM β -Glycerolphosphat, 100 nM Dexamethason und 50 µg/ml Ascorbinsäure, stimuliert wurde. Am 14. Versuchstag wurden in jeder Versuchsgruppe die Zellzahl bestimmt und die Alizarinrot S-Färbung (Merck, Darmstadt) durchgeführt. Jedes Well der 24-Well-Platte wurde hierfür zunächst mit PBS-Waschpuffer gewaschen und anschließend mit auf 37°C temperiertem 4 %igem Paraformaldehyd für 10 Minuten bei Raumtemperatur fixiert. Nach einem weiteren Waschvorgang wurden die Zellen mit 40 mM Alizarinrot S (pH 4.2) für 15 Minuten bei Raumtemperatur unter Bewegung gefärbt. Nach fünfmaligem Waschen mit destilliertem Wasser wurde die überschüssige Farbe entfernt. Zur Extraktion und Messung der von den PDL-Zellen aufgenommenen Farbe wurden die Zellen zunächst mit 10 %igem CPC (Cetylpyridinium Chloride) (Sigma, Dahlkirchen), das in 10 mM Natriumphosphat mit einem pH-Wert von 7.0 angesetzt wurde, für 15 Minuten inkubiert. Anschließend wurde das Gemisch jeder Kavität in Eppendorf-Tubes aufgefangen und bei 20.000 rpm für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde in 96-Well-Platten übergeführt, um mittels eines Mikroplate Readers (PowerWave x, BioTek Instruments, Winooski, VT, USA) bei einer Wellenlänge von 562 nm die Absorption der Färbung zu messen. Für die Auswertung wurde eine lineare Standardreihe mit Kalziumchlorid (CaCl_2) erstellt.

2.6 Bestimmung der Zellzahl

Zur Bestimmung der Zellzahl wurden die Zellkulturen wie oben beschrieben trypsinisiert

und die PDL-Zellen anschließend in einem Falcon-Röhrchen aufgefangen. Diese Zellsuspension wurde bei 500 g für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Sediment wurde mit 1 ml PBS Waschpuffer resuspendiert. Nach gründlichem Mischen wurden 40 µl dieser Zellsuspension in 10 ml Celluton-Lösung (Mölab, Hilden) gemischt. Die Messung der Zellzahl erfolgte mit Hilfe eines elektronischen Zellzählers (Mölab), wobei die Messung der Celluton-Lösung ohne Zellen die Kontrolle (Celluton Blank) bildete.

2.7 Statistische Auswertung

Die in den Experimenten ermittelten Daten wurden zunächst gemäß der beschreibenden oder auch deskriptiven Statistik geordnet und zusammengefasst. Hierbei wurden Mittelwerte und Standardfehler (SEM) errechnet. Für die statistische Auswertung der Ergebnisse wurde die Software SPSS der Version 17.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) angewandt. Des Weiteren wurde der nichtparametrische Mann-Whitney-U-Test durchgeführt und als Signifikanzschwelle $p < 0,05$ festgelegt.

3. Ergebnisse

3.1 Genexpressionanalysen

3.1.1 Expression von Adipokinen in PDL-Zellen unter regenerativen und entzündlichen Bedingungen

Humane PDL-Zellen von 6 Donoren wurden zur Simulation regenerativer Bedingungen mit dem Schmelzmatrixprotein EMD (100 µg/ml) und zur Simulation entzündlicher Bedingungen mit dem proinflammatorischen Zytokin IL-1β (1 ng/ml) für 24 h inkubiert. Der Einfluss dieser Inkubation auf die Genexpression von Adipokinen wie Adiponektin, Leptin, Resistin und Visfatin und ihrer Rezeptoren AdipoR1, AdipoR2 und LEPRb (Leptinrezeptor b) wurden analysiert.

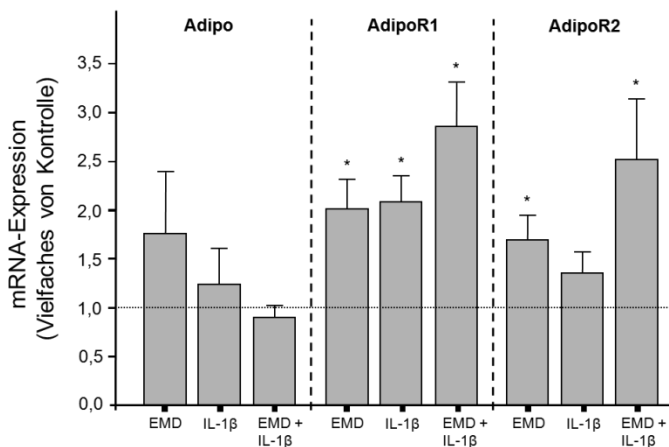


Abb. 3: Genexpression von Adiponektin und seinen Rezeptoren AdipoR1 und AdipoR2 unter regenerativen (EMD) und/oder entzündlichen (IL-1β) Bedingungen in PDL-Zellen nach 24 h
* $p < 0,05$, MW \pm SEM

Abbildung 3 zeigt die Wirkung regenerativer und entzündlicher Bedingungen auf die Genexpression von Adiponektin und seinen Rezeptoren AdipoR1 und AdipoR2. Adiponektin und seine Rezeptoren wurden in humanen PDL-Zellen exprimiert, wie die Grenzlinie für die Kontrollgruppe deutlich zeigt. Eine signifikante Steigerung der Expression erfolgte jedoch nur bei den Rezeptorgenen. Die AdipoR1-mRNA wurde sowohl in EMD-stimulierten als auch in IL-1β-stimulierten PDL-Zellen signifikant hochreguliert. Die Expression der AdipoR2-mRNA wurde nur in EMD-stimulierten PDL-

Zellen signifikant gesteigert. Eine signifikante Hochregulation beider Rezeptoren war auch in der kombinierten Stimulationsgruppe nachweisbar.

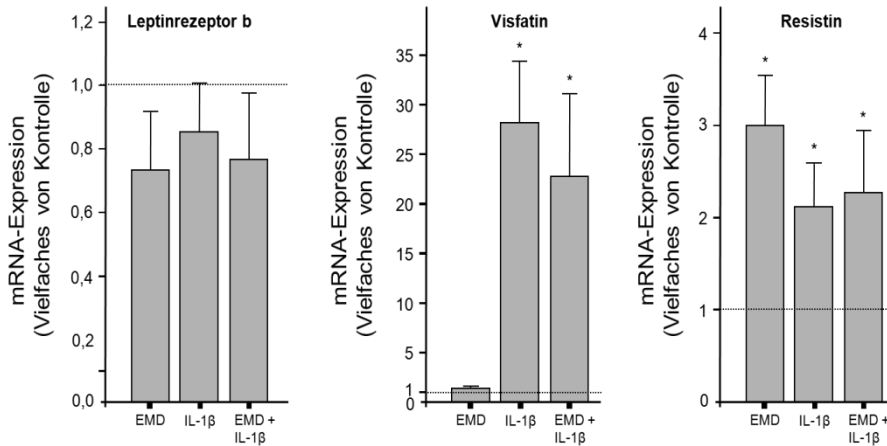


Abb. 4: Genexpression von Leptinrezeptor b, Visfatin und Resistin unter regenerativen (EMD) und/oder entzündlichen (IL-1β) Bedingungen in PDL-Zellen nach 24 h * $p < 0,05$, MW \pm SEM

Abbildung 4 zeigt die Daten für die Expressionsanalyse von Leptinrezeptor b, Visfatin und Resistin unter regenerativen und/oder entzündlichen Bedingungen in PDL-Zellen. Leptinrezeptor b, Visfatin und Resistin wurden in PDL-Zellen unter normalen Bedingungen exprimiert. Die Leptinrezeptor b-Expression wurde jedoch nicht von EMD und/oder IL-1β beeinflusst. Die Expression von Visfatin wurde von EMD nicht reguliert, jedoch von IL-1β um das 27-fache und in der Kombination von EMD und IL-1β um das 22-fache gegenüber der Kontrolle hochreguliert. Die Resistin-Expression wurde sowohl in mit EMD stimulierten PDL-Zellen etwa 3-fach als auch in mit IL-1β stimulierten und in den kombiniert stimulierten PDL-Zellen etwa 2-fach im Vergleich zur Kontrollgruppe exprimiert. Leptin zeigte eine sehr schwache Expression und Regulation und wurde daher nicht dargestellt.

3.1.2 Effekte von Adipokinen auf die Genexpression von Faktoren der parodontalen Wundheilung in PDL-Zellen unter normalen Bedingungen

Humane PDL-Zellen von 2 Donoren wurden mit Adiponektin (3 $\mu\text{g/ml}$), Leptin (3 ng/ml), Resistin (50 ng/ml) und Visfatin (100 ng/ml) inkubiert. Ihre Wirkung auf die Genexpression von Entzündungsmediatoren (IL-6, IL-8, $\text{TNF}\alpha$, COX2), von Wachstumsfaktoren (IGF1, $\text{TGF}\beta$, VEGF, BMP2), von Kollagen Typ 1 (Col1) und von

Osteogenese-assoziierten Mediatoren (ALP, Osteocalcin, Runx2) wurde im Vergleich zu PDL-Zellen unter normalen Bedingungen nach 24 Stunden analysiert.

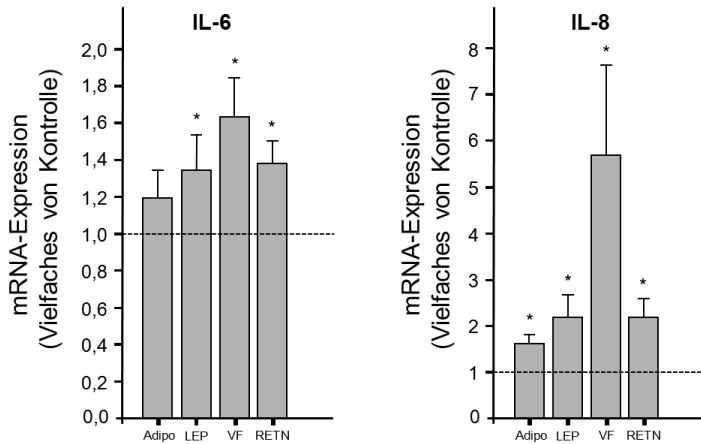


Abb. 5: Genexpression von IL-6 und IL-8 unter dem Einfluss von Adiponektin (Adipo), Leptin (LEP), Visfatin (VF) oder Resistin (RETN) in PDL-Zellen nach 24 h * $p < 0,05$, MW \pm SEM

Abbildung 5 zeigt die Wirkung der Inkubation von PDL-Zellen mit Adiponektin, Leptin, Visfatin oder Resistin nach 24 Stunden auf die Genexpression von IL-6 und IL-8. Leptin, Resistin und Visfatin steigerten signifikant die IL-6-Expression. Alle Adipokine führten zur signifikanten Steigerung der IL-8-mRNA-Synthese.

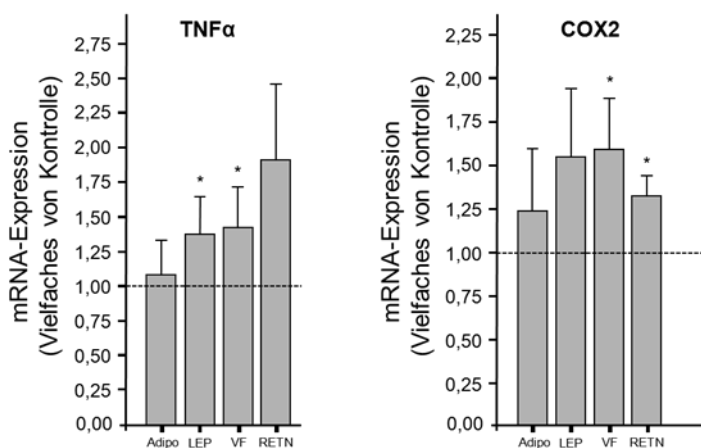


Abb. 6: Genexpression von TNF α und COX2 unter dem Einfluss von Adiponektin (Adipo), Leptin (LEP), Visfatin (VF) oder Resistin (RETN) in PDL-Zellen nach 24 h * $p < 0,05$, MW \pm SEM

Abbildung 6 zeigt die Wirkung der Inkubation von PDL-Zellen mit Adiponektin, Leptin, Visfatin oder Resistin nach 24 Stunden auf die Genexpression von TNF α und COX2. Die Stimulation mit Leptin und Visfatin führte zu einer signifikanten Erhöhung der TNF α -

mRNA. Die COX2-Expression wurde im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle durch die Stimulation mit Visfatin und Resistin signifikant hochreguliert.

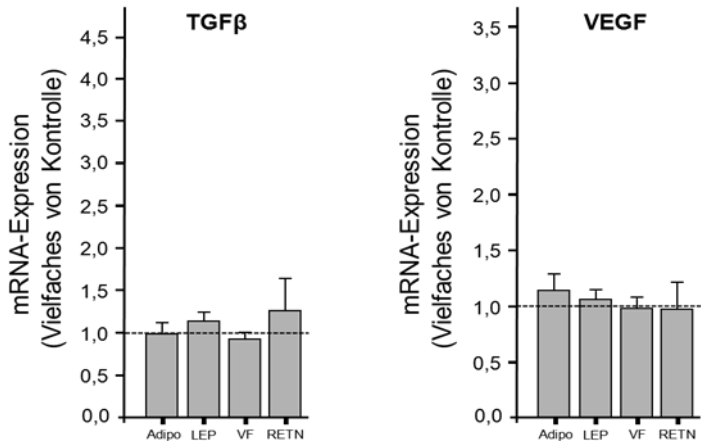


Abb. 7: Genexpression von TGFβ und VEGF unter dem Einfluss von Adiponektin (Adipo), Leptin (LEP), Visfatin (VF) oder Resistin (RETN) in PDL-Zellen nach 24 h * $p < 0,05$, MW \pm SEM

Abbildung 7 zeigt die Wirkung der Inkubation von PDL-Zellen mit Adiponektin, Leptin, Visfatin oder Resistin nach 24 Stunden auf die Genexpression der Wachstumsfaktoren TGFβ und VEGF im Vergleich zur Kontrollgruppe. Diese Wachstumsfaktoren wurden von PDL-Zellen exprimiert, jedoch wurden sie nicht von Adipokinen reguliert.

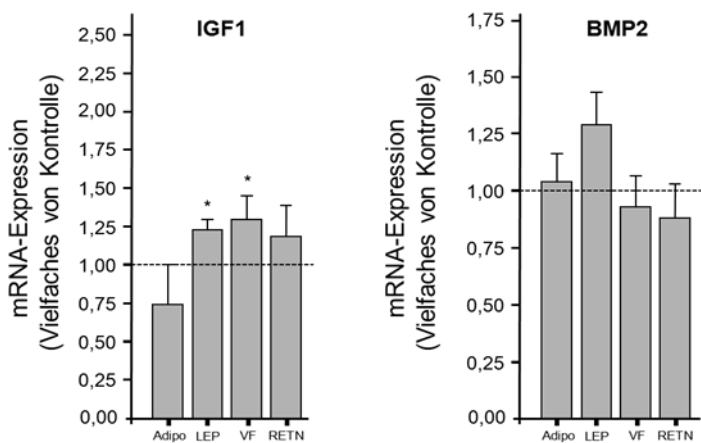


Abb. 8: Genexpression von IGF1 und BMP2 unter dem Einfluss von Adiponektin (Adipo), Leptin (LEP), Visfatin (VF) oder Resistin (RETN) in PDL-Zellen nach 24 h * $p < 0,05$, MW \pm SEM

Abbildung 8 zeigt die Wirkung der Inkubation von PDL-Zellen mit Adiponektin, Leptin, Visfatin oder Resistin nach 24 Stunden auf die Genexpression der Wachstumsfaktoren IGF1 und BMP2 im Vergleich zur Kontrollgruppe. Beide Wachstumsfaktoren wurden von PDL-Zellen exprimiert. Leptin und Visfatin hatten einen signifikanten regulatorischen Einfluss auf die Expression von IGF1.

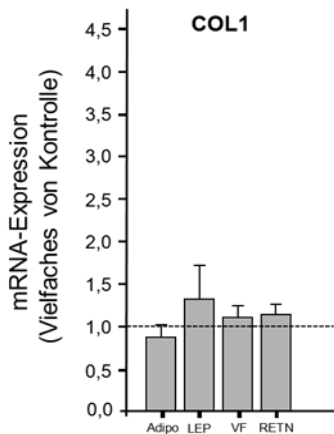


Abb. 9: Genexpression von Col1 unter dem Einfluss von Adiponektin (Adipo), Leptin (LEP), Visfatin (VF) oder Resistin (RETN) in PDL-Zellen nach 24 h * $p < 0,05$, MW \pm SEM

Abbildung 9 zeigt die Wirkung der Inkubation von PDL-Zellen mit Adiponektin, Leptin, Visfatin oder Resistin nach 24 Stunden auf die Genexpression des Matrixmoleküls Kollagen Typ 1 (Col1) im Vergleich zur Kontrollgruppe. Deutlich wurde, dass Col1 von PDL-Zellen exprimiert wurde. Jedoch wurde die Expression nicht von Adiponektin, Leptin, Visfatin oder Resistin beeinflusst.

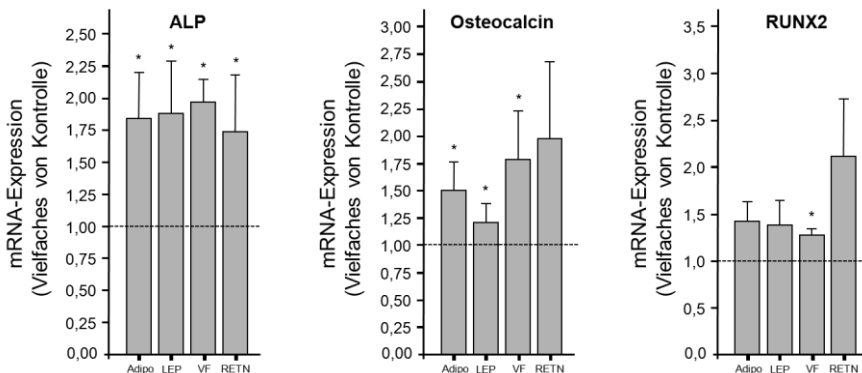


Abb. 10: Genexpression von ALP, Osteocalcin und Runx2 unter dem Einfluss von Adiponektin (Adipo), Leptin (LEP), Visfatin (VF) oder Resistin (RETN) in PDL-Zellen nach 24 h * $p < 0,05$, MW \pm SEM

Abbildung 10 zeigt die Wirkung der Inkubation von PDL-Zellen mit Adiponektin, Leptin, Visfatin oder Resistin nach 24 Stunden auf die Genexpression der Osteogenese-assoziierten Mediatoren Alkalische Phosphatase (ALP), Osteocalcin und Runx2 im Vergleich zur Kontrollgruppe. Alle Mediatoren wurden von Adipokinen reguliert. Die ALP-Expression wurde von allen Adipokinen um das ca. 1,8-fache gesteigert. Unter dem Einfluss von Adiponektin, Leptin und Visfatin wurde die Osteocalcin-Expression erhöht, während Runx2 nur von Visfatin signifikant beeinflusst wurde.

3.1.3 Effekte von Adipokinen auf die Genexpression von Faktoren der parodontalen Wundheilung in PDL-Zellen unter regenerativen Bedingungen

Humane PDL-Zellen von 2 Donoren wurden zur Simulation regenerativer Bedingungen mit EMD (100 µg/ml) inkubiert. Zusätzlich wurden einige Kulturen mit Adiponektin (3 µg/ml), Leptin (3 ng/ml), Resistin (50 ng/ml) oder Visfatin (100 ng/ml) inkubiert. Der Einfluss dieser Adipokin-Inkubation auf die Genexpression von Entzündungsmediatoren (IL-6, IL-8, TNF α , COX2), von Wachstumsfaktoren (IGF1, TGF β , VEGF, BMP2), von Kollagen Typ 1 (Col1) und von Osteogenese-assoziierten Mediatoren (ALP, Osteocalcin, Runx2) nach 24 Stunden wurde analysiert. Als Kontrollgruppe dienten die nur mit EMD inkubierten PDL-Zellen.

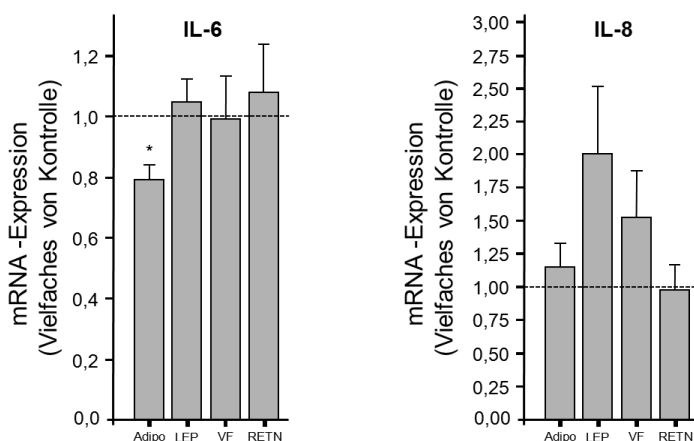


Abb. 11: Genexpression von IL-6 und IL-8 unter dem Einfluss von Adiponektin (Adipo), Leptin (LEP), Visfatin (VF) oder Resistin (RETN) in PDL-Zellen unter regenerativen Bedingungen nach 24 h * p < 0,05, MW \pm SEM

Abbildung 11 zeigt die Wirkung der Inkubation von PDL-Zellen mit Adiponektin, Leptin, Visfatin oder Resistin unter regenerativen Bedingungen nach 24 Stunden auf die Genexpression der proinflammatorischen Zytokine IL-6 und IL-8. Die Inkubation mit Adiponektin zeigte im Vergleich zur Kontrollgruppe eine signifikant reduzierte Expression von IL-6. Alle anderen Kombinationsstimulationen zeigten keine signifikante Wirkung auf die Expression.

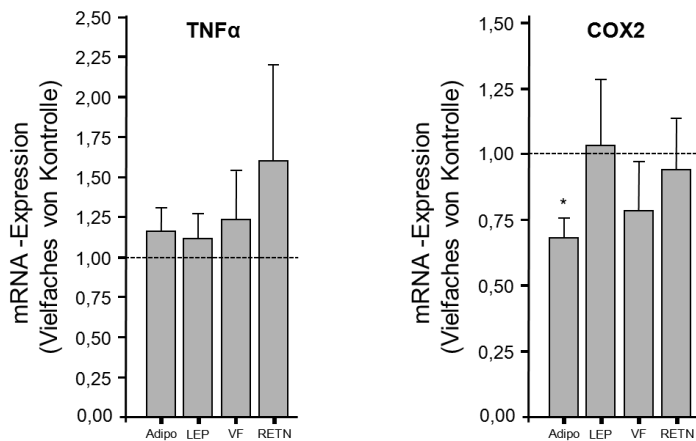


Abb. 12: Genexpression von TNF α und COX2 unter dem Einfluss von Adiponektin (Adipo), Leptin (LEP), Visfatin (VF) oder Resistin (RETN) in PDL-Zellen unter regenerativen Bedingungen nach 24 h
* $p < 0,05$, MW \pm SEM

Abbildung 12 zeigt die Wirkung der Inkubation von PDL-Zellen mit Adiponektin, Leptin, Visfatin oder Resistin unter regenerativen Bedingungen nach 24 Stunden auf die Genexpression der proinflammatorischen Zytokine TNF α und COX2. Auffällig ist die signifikant verminderte Expression von COX2 unter dem Einfluss von Adiponektin im Vergleich mit der Kontrollgruppe.

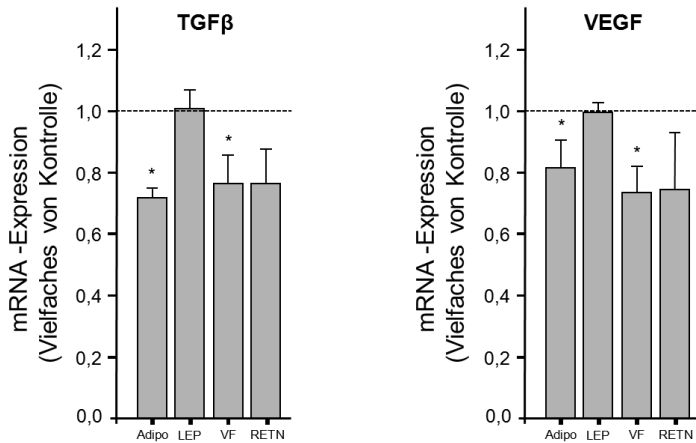


Abb. 13: Genexpression von TGF β und VEGF unter dem Einfluss von Adiponektin (Adipo), Leptin (LEP), Visfatin (VF) oder Resistin (RETN) in PDL-Zellen unter regenerativen Bedingungen nach 24 h * $p < 0,05$, MW \pm SEM

Abbildung 13 zeigt die Wirkung der Inkubation von PDL-Zellen mit Adiponektin, Leptin, Visfatin oder Resistin unter regenerativen Bedingungen nach 24 Stunden auf die Genexpression der Wachstumsfaktoren TGF β und VEGF. Alle Adipokine außer Leptin führten zu einer reduzierten Expression dieser Wachstumsfaktoren.

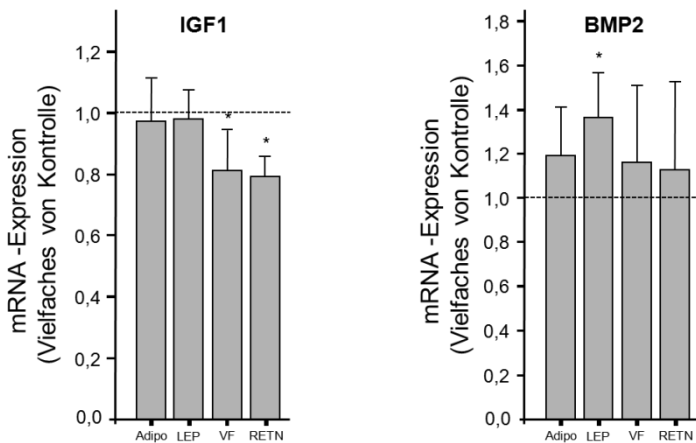


Abb. 14: Genexpression von IGF1 und BMP2 unter dem Einfluss von Adiponektin (Adipo), Leptin (LEP), Visfatin (VF) oder Resistin (RETN) in PDL-Zellen unter regenerativen Bedingungen nach 24 h * $p < 0,05$, MW \pm SEM

Abbildung 14 zeigt die Wirkung der Inkubation von PDL-Zellen mit Adiponektin, Leptin, Visfatin oder Resistin unter regenerativen Bedingungen nach 24 Stunden auf die Genexpression der Wachstumsfaktoren IGF1 und BMP2. Visfatin und Resistin

inhibierten signifikant die Expression von IGF1 im Vergleich zur Kontrolle. Leptin steigerte signifikant die BMP2-Expression.

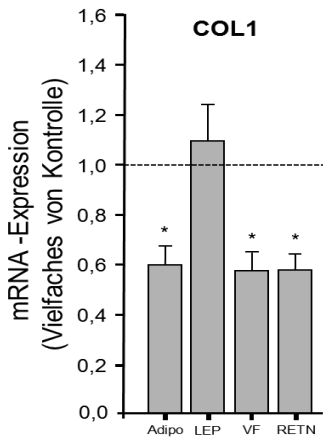


Abb. 15: Genexpression von Col1 unter dem Einfluss von Adiponektin (Adipo), Leptin (LEP), Visfatin (VF) oder Resistin (RETN) in PDL-Zellen unter regenerativen Bedingungen nach 24 h * $p < 0,05$, MW \pm SEM

Abbildung 15 zeigt die Wirkung der Inkubation von PDL-Zellen mit Adiponektin, Leptin, Visfatin oder Resistin unter regenerativen Bedingungen nach 24 Stunden auf die Genexpression des Matrixmoleküls Col1. Alle Adipokine außer Leptin führten zu einer signifikant reduzierten Expression von Kollagen Typ 1.

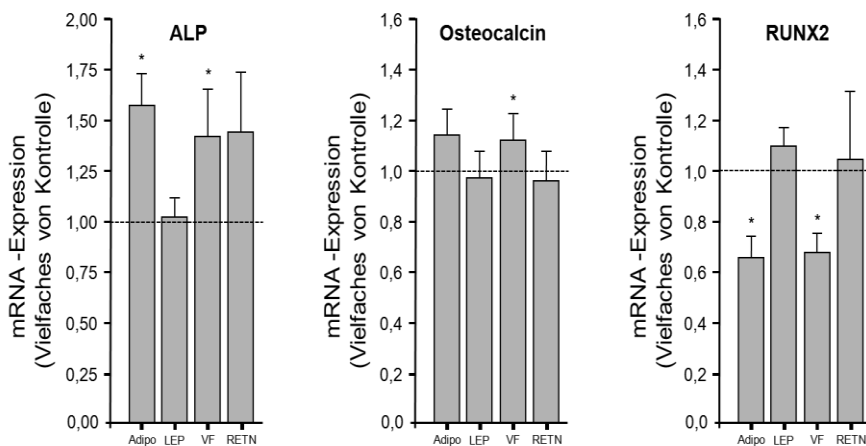


Abb. 16: Genexpression von ALP, Osteocalcin und Runx2 unter dem Einfluss von Adiponektin (Adipo), Leptin (LEP), Visfatin (VF) oder Resistin (RETN) in PDL-Zellen unter regenerativen Bedingungen nach 24 h * $p < 0,05$, MW \pm SEM

Abbildung 16 zeigt die Wirkung der Inkubation von PDL-Zellen mit Adiponektin, Leptin, Visfatin oder Resistin unter regenerativen Bedingungen nach 24 Stunden auf die Genexpression der Osteogenese-assoziierten Mediatoren ALP, Osteocalcin und Runx2. Adiponektin und Visfatin wirkten signifikant stimulatv auf die ALP-Expression und inhibierend auf die Runx2-Expression. Auch Osteocalcin wurde von Visfatin signifikant hochreguliert. Die Leptin-Gruppen zeigten durchgehend kaum Veränderungen in der Genexpression.

3.1.4 Einfluss von Adipokinen auf die Genexpression von Adipokinen und ihren Rezeptoren in PDL-Zellen (Autoregulation)

Humane PDL-Zellen von einem Donor wurden mit Adiponektin (3 µg/ml), Leptin (3 ng/ml), Resistin (50 ng/ml) und Visfatin (100 ng/ml) inkubiert. Ihre Wirkung auf die eigene Genexpression und die der Rezeptoren AdipoR1, AdipoR2 und LEPRb im Vergleich zu normalen PDL-Zellen nach 24 Stunden wurde analysiert.

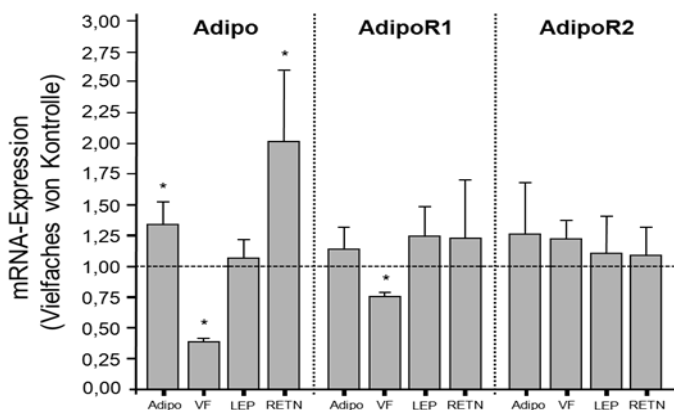


Abb. 17: Genexpression von Adiponektin und seinen Rezeptoren AdipoR1 und AdipoR2 unter dem Einfluss von Adiponektin (Adipo), Leptin (LEP), Visfatin (VF) oder Resistin (RETN) in PDL-Zellen nach 24 h * $p < 0,05$, MW \pm SEM

Abbildung 17 zeigt die Wirkung der Inkubation von PDL-Zellen mit Adiponektin, Leptin, Visfatin oder Resistin im Vergleich zu unstimulierten PDL-Zellen nach 24 Stunden auf die Genexpression von Adiponektin, AdipoR1 und AdipoR2. Die Expression von Adiponektin und AdipoR1 wurde durch Visfatin signifikant vermindert. Außerdem steigerten Adiponektin und Resistin die Expression von Adiponektin signifikant.

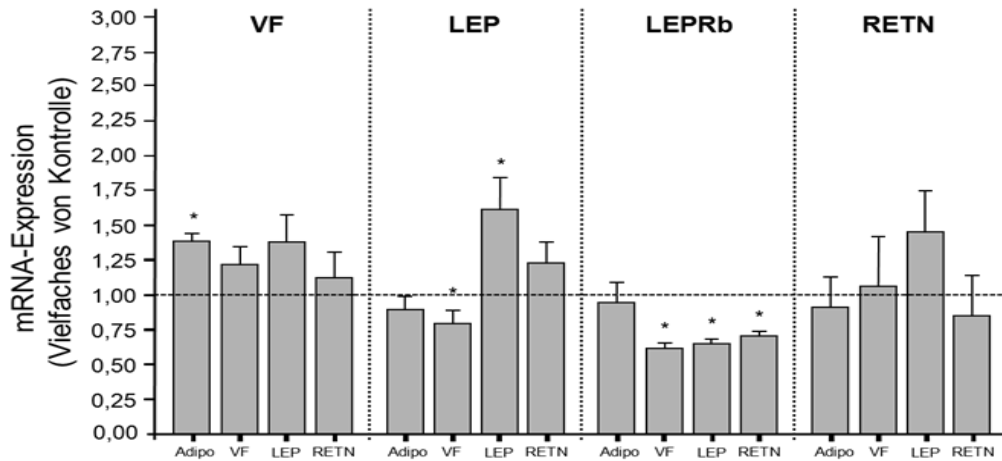


Abb. 18: Genexpression von Visfatin, Leptin, LEPRb und Resistin unter dem Einfluss von Adiponektin (Adipo), Leptin (LEP), Visfatin (VF) oder Resistin (RETN) in PDL-Zellen nach 24 h * $p < 0,05$, MW \pm SEM

Abbildung 18 zeigt die Wirkung der Inkubation von PDL-Zellen mit Adiponektin, Leptin, Visfatin oder Resistin im Vergleich zu normalen PDL-Zellen nach 24 Stunden auf die Genexpression von Visfatin, Leptin, LEPRb und Resistin. Adiponektin führte zu einer signifikanten Hochregulation von Visfatin, und Leptin zu einer signifikanten Hochregulation der eigenen Expression. Visfatin, Leptin und Resistin hemmten signifikant die LEPR b-Expression, und Visfatin führte zusätzlich zu einer Hemmung der Leptin-Expression.

3.2 Effekte von Adipokinen auf die Kalziumakkumulation in PDL-Zellen unter normalen und regenerativen Bedingungen

Um die Kalziumakkumulation zu bestimmen, wurden PDL-Zellen von einem Donor 14 Tage in Kulturschalen kultiviert und dabei mit Adiponektin (3 $\mu\text{g/ml}$), Leptin (3 ng/ml), Resistin (100 ng/ml) und Visfatin (100 ng/ml) alle 3 Tage unter regenerativen Bedingungen inkubiert. Nach 14 Tagen wurde in jeder Versuchsgruppe die Zellzahl bestimmt und die Alizarinrot S-Färbung (Merck) durchgeführt. Die Absorptionswerte der Färbung wurden gegen eine Standardreihe kalkuliert und in Relation zur Zellzahl ausgewertet. Unstimulierte Zellen dienten als Kontrolle.

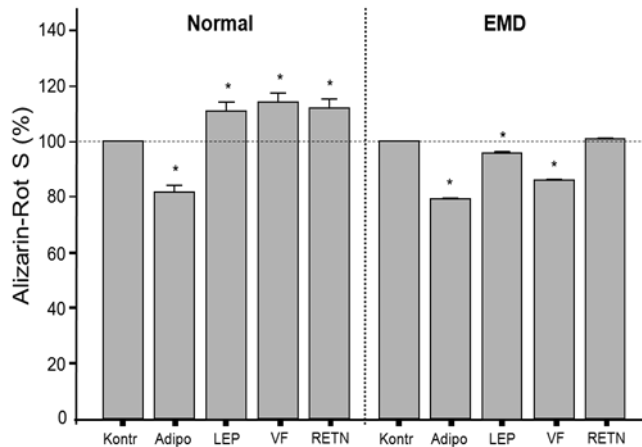


Abb. 19: Alizarinrot S-Färbung in PDL-Zellen in % nach 14-tägiger Inkubation mit Adiponektin (Adipo), Leptin (LEP), Visfatin (VF) oder Resistin (RETN) unter normalen (Normal) und regenerativen (EMD) Bedingungen * $p < 0,05$, MW \pm SEM

Abbildung 19 zeigt die Auswertung der Alizarinrot S-Färbung in der jeweiligen Gruppe in % im Vergleich zu den Kontrollgruppen nach 14-tägiger Inkubation mit Adiponektin, Visfatin, Leptin oder Resistin in PDL-Zellen. Adiponektin hemmte und Leptin, Visfatin und Resistin stimulierten signifikant die Kalziumakkumulation in PDL-Zellen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle unter normalen Bedingungen. Unter regenerativen Bedingungen hemmten Adiponektin, Leptin und Visfatin die Kalziumakkumulation in PDL-Zellen im Vergleich zur Kontrolle signifikant. Resistin hatte keinen Einfluss auf die Kalziumakkumulation unter regenerativen Bedingungen.

3.3 Effekte von Adipokinen auf die In-vitro-Wundheilung in PDL-Zellen unter normalen und regenerativen Bedingungen

Um den Einfluss der Adipokine auf die In-vitro-Wundheilung unter normalen und regenerativen Bedingungen zu ermitteln, wurde ein In-vitro-Versuch zum Wundverschluss durchgeführt. Konfluente Zellmonolayer von 3 Donoren wurden in normierter Breite von 3 mm verletzt und täglich mit Adiponektin (3 $\mu\text{g/ml}$), Leptin (3 ng/ml), Resistin (50 ng/ml) oder Visfatin (100 ng/ml) unter normalen und regenerativen Bedingungen inkubiert. Täglich wurde die Breite dieser In-vitro-Verletzung fotografisch dokumentiert und histomorphometrisch ausgewertet. PDL-Zellen unter normalen und regenerativen Bedingungen dienten als Kontrolle.

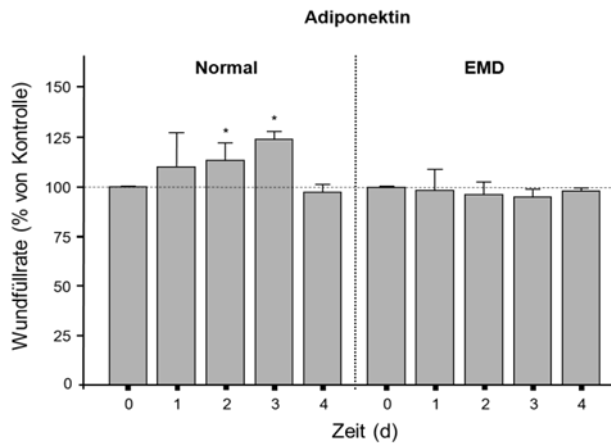


Abb. 20: In-vitro-Wundheilung in % nach Inkubation von PDL-Zellen mit Adiponektin über 4 Tage unter normalen (Normal) und regenerativen (EMD) Bedingungen * $p < 0,05$, MW \pm SEM

Abbildung 20 zeigt den Einfluss der Inkubation von PDL-Zellen mit Adiponektin auf die In-vitro-Wundfüllrate über 4 Tage unter normalen und regenerativen Bedingungen. Am 2. und 3. Tag wirkte Adiponektin signifikant stimulatив auf die In-vitro-Wundheilung unter normalen Bedingungen. Unter regenerativen Bedingungen war kein signifikanter Effekt von Adiponektin nachweisbar.

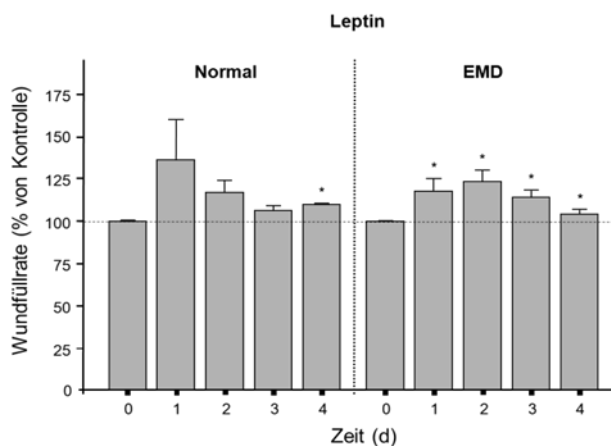


Abb. 21: In-vitro-Wundheilung in % nach Inkubation von PDL-Zellen mit Leptin über 4 Tage unter normalen (Normal) und regenerativen (EMD) Bedingungen * $p < 0,05$, MW \pm SEM

Abbildung 21 zeigt den Einfluss der Inkubation von PDL-Zellen mit Leptin auf die In-vitro-Wundfüllrate über 4 Tage unter normalen und regenerativen Bedingungen. Leptin hatte eine positive Wirkung auf die In-vitro-Wundfüllung. Besonders unter regenerativen

Bedingungen zeigte Leptin einen signifikanten Effekt auf den Wundverschluss im Vergleich zur Kontrolle.

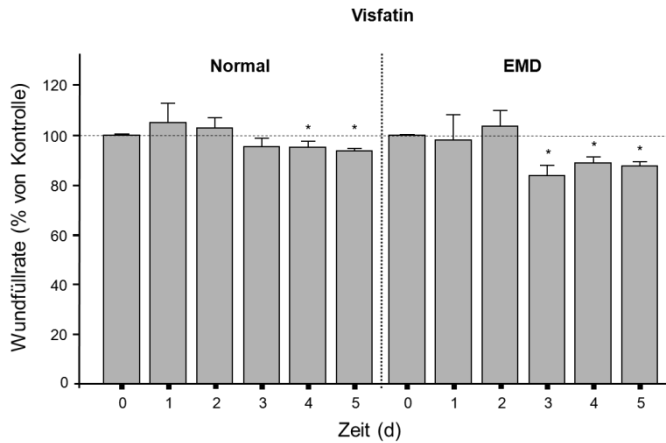


Abb. 22: In-vitro-Wundheilung in % nach Inkubation von PDL-Zellen mit Visfatin über 5 Tage unter normalen (Normal) und regenerativen (EMD) Bedingungen * $p < 0,05$, MW \pm SEM

Abbildung 22 zeigt den Einfluss der Inkubation von PDL-Zellen mit Visfatin auf die In-vitro-Wundfüllrate über 5 Tage unter normalen und regenerativen Bedingungen. Sowohl unter normalen als auch unter regenerativen Bedingungen wirkte Visfatin besonders ab dem 3. Tag des Experimentes hemmend auf die In-vitro-Wundheilung.

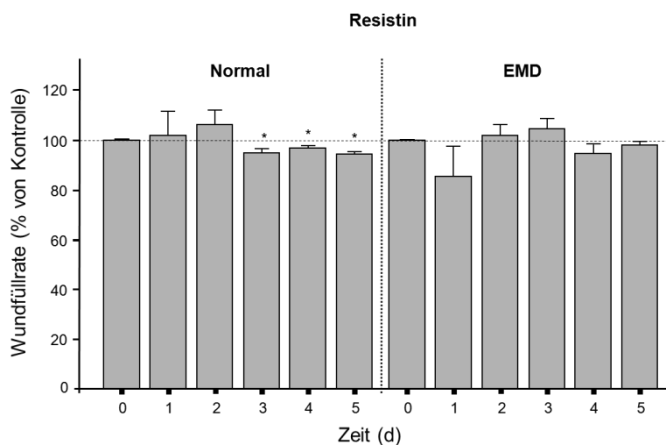


Abb. 23: In-vitro-Wundheilung in % nach Inkubation von PDL-Zellen mit Resistin über 5 Tage unter normalen (Normal) und regenerativen (EMD) Bedingungen * $p < 0,05$, MW \pm SEM

Abbildung 23 zeigt den Einfluss der Inkubation von PDL-Zellen mit Resistin auf die In-vitro-Wundfüllrate über 5 Tage unter normalen und regenerativen Bedingungen. Unter normalen Bedingungen inhibierte Resistin vom 3. Tag an den Wundverschluss im Vergleich zur Kontrolle. Unter regenerativen Bedingungen war die Wirkung von Resistin nicht signifikant.

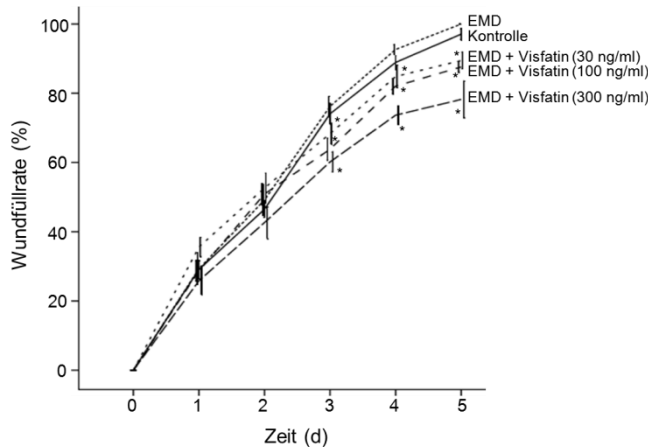


Abb. 24: In-vitro-Wundheilung in % nach Inkubation von PDL-Zellen mit Visfatin (30 / 100 / 300 ng/ml) über 5 Tage unter normalen (Kontrolle) und regenerativen (EMD) Bedingungen * $p < 0,05$, MW \pm SEM

Abbildung 24 zeigt den Einfluss der Inkubation von PDL-Zellen mit Visfatin in den Konzentrationen 30 / 100 / 300 ng/ml und EMD auf die In-vitro-Wundfüllrate über 5 Tage. Die positive Wirkung von EMD auf den Wundverschluss wurde in diesem Versuch bestätigt und durch Visfatin dosisabhängig inhibiert. Die Hemmung war bei einer Visfatinkonzentration von 300 ng/ml am stärksten.

3.4 Effekte von Adipokinen auf die Zellzahl in PDL-Kulturen unter normalen und regenerativen Bedingungen

Humane PDL-Zellen von einem Donor wurden über einen Zeitraum von 14 Tagen alle 3 Tage mit Adiponektin (3 μ g/ml), Leptin (3 ng/ml), Resistin (50 ng/ml) oder Visfatin (100 ng/ml) unter normalen und regenerativen Bedingungen inkubiert. Die Wirkung der Adipokine auf die Zellzahl wurde analysiert.

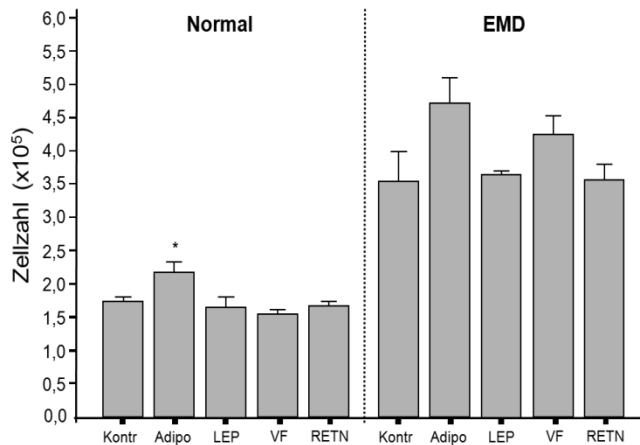


Abb. 25: Anzahl der PDL-Zellen (in 10^5) nach Inkubation mit Adiponektin (Adipo), Leptin (LEP), Visfatin (VF) oder Resistin (RETN) nach 14 Tagen unter normalen (Normal) und regenerativen Bedingungen (EMD) im Vergleich zur Kontrolle (Kontr) * $p < 0,05$, MW \pm SEM

Abbildung 25 zeigt die signifikant positive Wirkung von Adiponektin auf die Zellzahl von PDL-Zellen unter normalen Bedingungen, welche unter regenerativen Bedingungen den gleichen Trend hatte. Mit Leptin, Resistin oder Visfatin behandelte Zellkulturen unter normalen und regenerativen Bedingungen zeigten keine signifikanten Unterschiede zur Kontrolle.

3.5 Zusammenfassung der wichtigsten Ergebnisse

Abbildung 26 stellt eine Zusammenfassung aller signifikanten Ergebnisse für die jeweils hemmenden und stimulierenden Effekte der Adipokine auf die Genexpression der untersuchten Mediatoren, die Wirkung auf die Kalziumakkumulation und die In-vitro-Wundheilung der PDL-Zellen unter normalen Bedingungen dar.

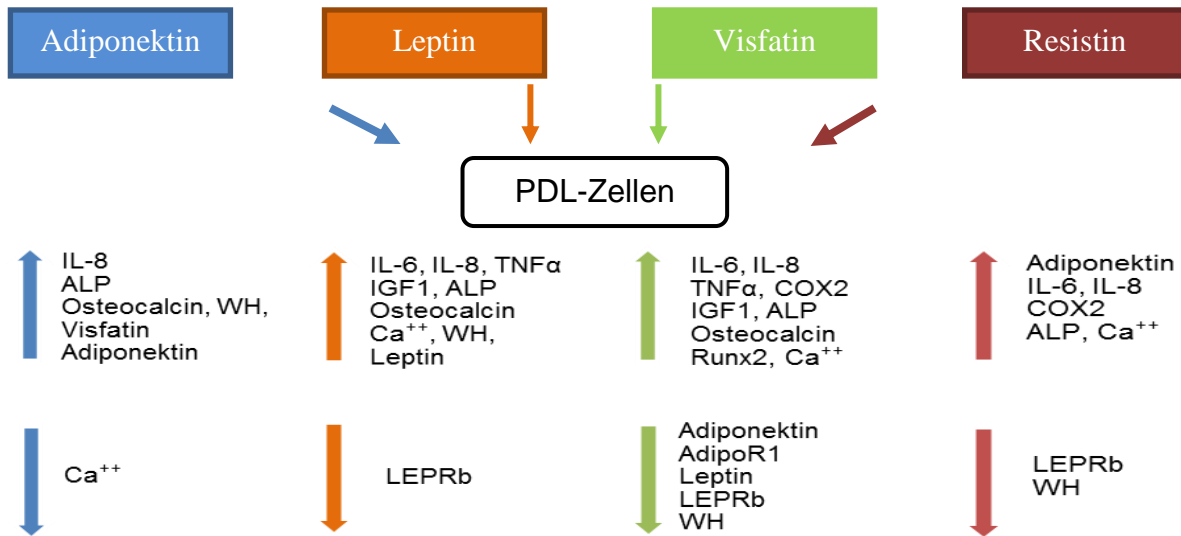


Abb. 26: Überblick über die signifikant stimulierenden (↑) und signifikant hemmenden (↓) Effekte der Adipokine auf die Genexpression, die Kalziumakkumulation (Ca⁺⁺) und die In-vitro-Wundheilung (WH) der PDL-Zellen im Bezug zur Kontrolle unter normalen Bedingungen

Abbildung 27 stellt eine Zusammenfassung aller signifikanten Ergebnisse für die jeweils hemmenden und stimulierenden Effekte der Adipokine auf die Genexpression der untersuchten Mediatoren, die Wirkung auf die Kalziumakkumulation und die In-vitro-Wundheilung der PDL-Zellen unter regenerativen Bedingungen, simuliert mit EMD, dar.

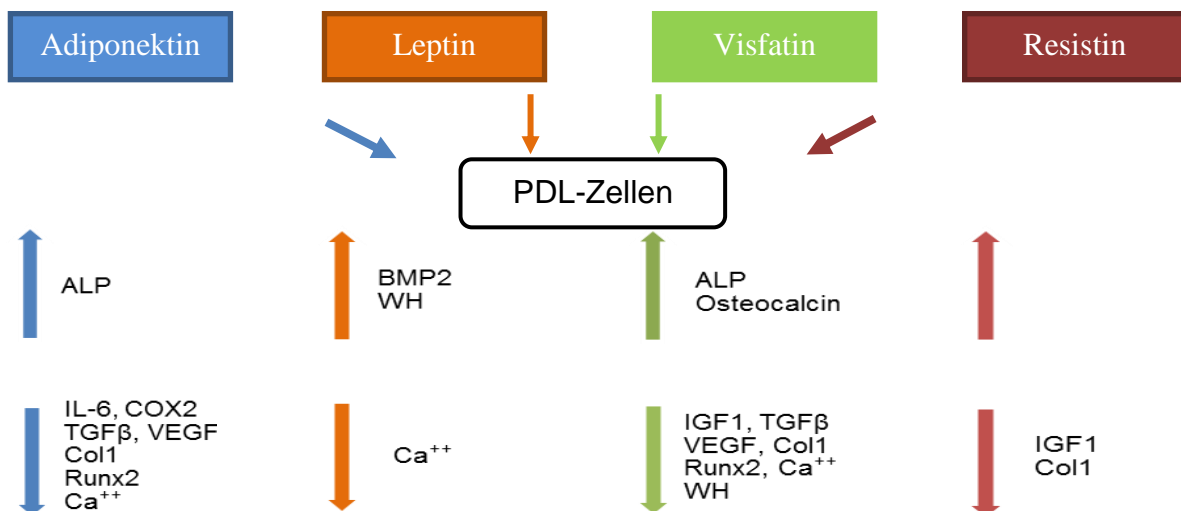


Abb. 27: Überblick über die signifikant stimulierenden (↑) und signifikant hemmenden (↓) Effekte der Adipokine auf die Genexpression, die Kalziumakkumulation (Ca⁺⁺) und die In-vitro-Wundheilung (WH) der PDL-Zellen im Bezug zur Kontrolle unter regenerativen Bedingungen

4. Diskussion

Die Fragestellung dieser In-vitro-Arbeit war, ob PDL-Zellen Adipokine wie Adiponektin, Leptin, Resistin und Visfatin unter normalen, entzündlichen und regenerativen Bedingungen produzieren und ob diese Adipokine die osteogene Differenzierung, die Wundfüllrate, die Produktion von Wachstumsfaktoren, Zytokinen und Kollagen von PDL-Zellen unter normalen und regenerativen Bedingungen beeinflussen.

4.1 Ergebnisse

Humane PDL-Zellen wurden unter normalen, regenerativen und entzündlichen Bedingungen kultiviert. Regenerative Bedingungen wurden mit EMD, einem Schmelzmatrixprotein, und entzündliche Bedingungen mit IL-1 β , einem proinflammatorischen Zytokin, simuliert. Nach 24 Stunden wurde die RNA aus unstimulierten und stimulierten PDL-Zellen extrahiert und die cDNA Synthese und anschließend die quantitative RT-PCR durchgeführt. Die Genexpressionsanalyse zeigte, dass unbehandelte PDL-Zellen die Gene für Adiponektin, Leptin, Resistin und Visfatin exprimierten. Frühere Studien haben Leptin, Resistin und Visfatin in der gingivalen Sulkusflüssigkeit (Karthikeyan et al., 2007) sowie in Biopsiematerial nachgewiesen (Johnson und Serio, 2001). Park et al. (2011) haben Rezeptoren für Adiponektin in humanen PDL-Zellen aufgezeigt. Studien an anderen Zellarten wie Osteoblasten, kardialen und dermalen Fibroblasten sowie Synovialfibroblasten haben die Produktion einiger dieser Adipokine nachgewiesen (Berner et al., 2004; Ezure et al., 2007; Tan et al., 2009; Tang et al., 2007; Thommesen et al., 2006). Es ist daher anzunehmen, dass Adipokine nicht nur im Fettgewebe, sondern auch in zahlreichen anderen Geweben, einschließlich im Parodontium, lokal produziert werden.

Unter dem Einfluss von EMD exprimierten PDL-Zellen nach 24 Stunden die Gene für Resistin und für Adiponektinrezeptoren. EMD ist ein Schmelzmatrixprotein, welches in der regenerativen chirurgischen Parodontitisbehandlung lokal angewendet wird (Matarasso et al., 2015).

Die Stimulation mit dem proinflammatorischen Zytokin IL-1 β erhöhte nach 24 Stunden signifikant die Expression der Gene für AdipoR1, Resistin und Visfatin. Studien an synovialen Zellen und neutrophilen Granulozyten zeigten ebenfalls erhöhte Werte für

AdipoR1 und Visfatin unter IL-1 β -Stimulation (Jia et al., 2004; Moschen et al., 2007). Visfatin wirkt antiapoptotisch auf die genannten Immunzellen, was die Annahme der proinflammatorischen Wirkung Visfatins bestärkt. Studien an Patienten mit parodontalen Erkrankungen haben gezeigt, dass die Betroffenen im Vergleich zu gesunden Probanden veränderte Adipokinkonzentrationen im Serum aufweisen. So wurde bei Patienten mit einer aktiven Parodontitis, v.a. bei chronischen Formen, tendenziell verminderte Adiponektinwerte und erhöhte Resistin- und Visfatinwerte im Serum nachgewiesen (Akram et al., 2017; Furugen et al., 2008; Shimazaki et al., 2007). Ähnliche Befunde wurden bei Adipositas und Diabetes mellitus Typ II-Patienten beobachtet: So wurden niedrige Adiponektin- und hohe Visfatin- und Leptinserumkonzentrationen nachgewiesen (Chen et al., 2006; Pradeep et al., 2011). Eine nichtchirurgische Parodontitistherapie beeinflusst, wie einige Studien zeigten, die Serumkonzentrationen von Adipokinen: Leptin- und Visfatinkonzentrationen wurden reduziert (Saito et al., 2008; Shimada et al., 2010). Resistinkonzentrationen wurden nicht signifikant reduziert (Devanoorkar et al., 2012). Der Einfluss einer nichtchirurgischen Parodontitisbehandlung auf die Adiponektinserumkonzentration ist nicht eindeutig geklärt, da einige Studien erhöhte Werte (Kardesler et al., 2010) und andere Studien keinen Einfluss (Iwamoto et al., 2003; Gonçalves et al., 2015) nachwiesen.

Im Stimulationsversuch wurde die Wirkung der Adipokine auf die Genexpression von Entzündungsmediatoren (IL-6, IL-8, TNF α , COX2), Wachstumsfaktoren (TGF β , VEGF, IGF1, BMP2), Kollagen Typ 1 (Col1) und Osteogenese-assoziierten Proteinen (ALP, Osteocalcin, Runx2) in PDL-Zellen unter normalen und regenerativen Bedingungen nach 24 Stunden analysiert. Alle im Versuch verwendeten Adipokine, insbesondere Visfatin, stimulierten die Expression des Gens für IL-8. Andere Studien zeigen diese Wirkung von Adiponektin und Leptin in Synovialfibroblasten (Lee et al., 2012; Tong et al., 2008) und von Leptin in parodontalen Zellen (Li et al., 2015). Dieses proinflammatorische Zytokin hat chemotaktische Wirkung auf neutrophile Granulozyten, d.h. Abwehrzellen, die eine wichtige Rolle in der initialen Phase einer Entzündung und in der Wundheilung haben. Des Weiteren fördert IL-8 die Bildung und Neubildung von Blutgefäßen. Während Visfatin die Expression aller proinflammatorischen Zytokine stimulierte, zeigte Adiponektin keinen Einfluss. Moschen et al. (2007) erzielten ähnliche

Resultate an Monozyten. Die Zytokine IL-6 und TNF α wirken stark proinflammatorisch und können durch Stimulierung von B- und T-Zellen eine chronische Entzündung hervorrufen. Ähnliche Ergebnisse zeigten Studien aus dem Bereich der rheumatoiden Arthritis (Brentano, et al. 2007). Unter den Adipokinen hatten v.a. Leptin und Visfatin eine signifikante stimulative Wirkung auf die Synthese des Wachstumsfaktors IGF1 in PDL-Zellen. Dieser Faktor hat eine strukturelle Ähnlichkeit mit Insulin und fördert das Wachstum und die Differenzierung von Zellen. Gröschl et al. (2005) zeigen in ihrer Studie die Stimulation von Wachstumsfaktoren (EGF und KGF) an humanen oralen Keratinozyten durch Leptin. Alle untersuchten Osteogenese-assoziierten Proteine wurden von Adipokinen reguliert. Dabei wirkten alle Adipokine positiv auf die Genexpression von Alkalischer Phosphatase. Iwayama et al. (2012) wiesen ebenfalls eine positive Wirkung von Adiponektin auf Alkalische Phosphatase nach. Insbesondere Adiponektin, Leptin und Visfatin wirkten stimulierend auf die Genexpression von Osteocalcin und nur Visfatin stimulierte die Genexpression von Runx2. Das ideale Ziel einer Parodontitisbehandlung ist neben der Ausheilung der Entzündung die vollständige Wiederherstellung der zerstörten Strukturen. Dazu gehört auch die Rekonstruktion knöcherner Gewebeanteile. PDL-Zellen sind in der Lage, mineralisierte Strukturen zu synthetisieren und die Stimulierung dieser Mineralisationsprozesse durch Adipokine könnte positiv im Hinblick auf die Regeneration des Parodontiums bewertet werden. Studien mit Adipokinen an Osteoblasten belegen ihren positiven Einfluss auf die Mineralisation (Gordeladze et al., 2002; Kanazawa et al., 2007). Adiponektin hemmte unter regenerativen Bedingungen signifikant die Genexpression der proinflammatorischen Zytokine IL-6 und COX2. Während Adiponektin, Visfatin und Resistin in Kombination mit EMD eine hemmende Wirkung auf die Expression von Wachstumsfaktoren und Kollagen Typ 1 hatten, zeigte Leptin entweder keine inhibierende oder eine stimulierende Wirkung unter diesen Bedingungen. Dieser Trend für Leptin zeigte sich auch für die Osteogenese-assoziierten Marker. Dabei wirkten Adiponektin und Visfatin wie unter normalen Bedingungen stimulativ auf die Expression der Alkalischen Phosphatase und Osteocalcin. Adipokine beeinflussten sich auch gegenseitig. So fiel auf, dass die Stimulation mit Adiponektin die Adiponektin- und Visfatin-Genexpression in PDL-Zellen erhöhte. Umgekehrt jedoch inhibierte die Visfatin-Stimulation sowohl die Expression des Adiponektin- als auch die des AdipoR1-Gens im

Sinne einer negativen Rückkopplung signifikant. Auch auf die Leptin- und LEPRb-Genexpression wirkte sich Visfatin negativ aus. Leptin förderte als einziges Stimulanz die eigene Genexpression und inhibierte zugleich wie alle Adipokine, außer Adiponektin, die Expression des LEPRb. Die Stimulation mit Resistin hingegen wirkte positiv auf die Adiponektin-Expression. Die biochemischen Grundlagen dieser Erkenntnisse und die klinische Bedeutung sind noch weitgehend unbekannt. Auch die Relevanz für andere Zelltypen ist Gegenstand weiterer Studien. Das Potential von PDL-Zellen zur Kalziumakkumulation und Mineralisation wurde getestet. Kultivierte PDL-Zellen wurden mit EMD und/oder Adipokinen stimuliert. Nach 14 Tagen wurden sie nach dem Alizarinrot-S-Färbeprotokoll behandelt, um die Menge an Kalzium in den Zellen zu detektieren. Nach einer Versuchsphase von 14 Tagen bildeten mit Adiponektin behandelte PDL-Zellen weniger Kalziumverbindungen als die unbehandelte Kontrollgruppe, während Leptin, Visfatin und Resistin die Kalziumakkumulation deutlich erhöhten. Gordeladze et al. (2002) beschreiben in ihren Versuchen die proliferations- und mineralisationsfördernden Eigenschaften von Leptin an Osteoblasten. Weitere Studien vermuten eine Rolle von Resistin im Knochenstoffwechsel (Thommesen et al., 2006). Unter regenerativen Bedingungen hemmten Adiponektin, Leptin und Visfatin die Kalziumanreicherung in PDL-Zellen, während Resistin keinen Einfluß zeigte. EMD wird in der Literatur als mineralisationsfördernd beschrieben (Sculean et al., 2007). Adiponektin fördert in Osteoblasten ebenfalls die Mineralisation (Luo et al., 2005). Diese Wirkung blieb bei unbehandelten und mit EMD-behandelten PDL-Zellen im In-vitro-Versuch allerdings aus.

Kultivierte PDL-Zellen wurden mit EMD und/oder Adipokinen inkubiert, und die In-vitro-Wundfüllrate wurde untersucht. Hierbei wurde die konfluente Zellkultur in normierter Breite verletzt und die PDL-Zellen wurden auf ihre Fähigkeit hin, diesen „Wundbereich“ zu schließen, untersucht. Die Annäherung der „Wundränder“ bis zum kompletten Verschluss wurde dokumentiert. Leptin wirkte unter regenerativen Bedingungen positiv auf die In-vitro-Wundheilung und beschleunigte die Annäherung der Wundränder. Die positive Wirkung der Stimulation mit EMD von PDL-Zellen hinsichtlich ihrer Fähigkeit zur Migration und Proliferation ist in zahlreichen Studien bereits dargestellt worden (Rincon et al., 2003; Hoang et al., 2000; Lackler et al., 2000). Leptin wurde im Tiermodell in der dermalen Wundheilung erfolgreich nachgewiesen (Murad et al., 2003) und förderte auch

auf zellulärer Ebene die Proliferation von Keratinozyten und dermalen Fibroblasten (Li et al., 2005). Adiponektin, Resistin und Visfatin inhibierten im Versuch den „Wundverschluss“. Visfatin zeigte sogar eine Dosisabhängigkeit: je höher die Visfatinkonzentration war, desto schlechter bzw. später erfolgte die Annäherung der In-vitro-Wundränder (Nokhbeh-saim et al., 2013). In diesem Versuch wurden sowohl die Migration als auch die Proliferation der PDL-Zellen überprüft. Diese Eigenschaften sind in der In-vivo-Wundheilung ebenfalls von Bedeutung. Hemmende Substanzen behindern somit auch die parodontale Wundheilung. Am oben genannten Beispiel des Leptin ist zu erkennen, dass es doch Parallelen gibt, auch wenn sich die dermale Wundheilung von der parodontalen Wundheilung unterscheidet und andere Zelltypen beteiligt sind. Anhand weiterer Studien mit Adipokinen an ähnlichen Zelllinien kann die Aussagefähigkeit überprüft werden.

Humane PDL-Zellen wurden kultiviert und mit Adipokinen und/oder EMD inkubiert. Nach 14 Tagen wurde die Anzahl der PDL-Zellen mit einem automatischen Zellzählgerät bestimmt. Positive Wirkung erzielten hierbei das Adiponektin unter normalen Bedingungen und die mit EMD behandelten Zellen. Die stimulative Wirkung von EMD auf die Proliferation wurde bereits in vielen Studien bestätigt (Gestrelus et al., 1997; Lyngstadaas et al., 2001). Bei Adiponektin ist aus anderen Studien die Proliferationsförderung von Osteoblasten bekannt.

4.2 Material und Methoden

Diese Arbeit wurde unter In-vitro-Bedingungen durchgeführt. Dies erlaubt eine Wiederholung von Versuchen ohne ethische Bedenken im Gegensatz zu In-vivo-Versuchen. Durch den Einsatz von isolierten Zellkulturen unter definierten Laborbedingungen können systemische Einflüsse wie in Tierversuchen ausgeschlossen werden. Zellen einer bestimmten Passage, hier die der 3. bis 5. Passage, zeigen eine geringe Variation in ihrem biologischen Verhalten. Dadurch wird eine Verbesserung der Reproduzierbarkeit und der Aussagefähigkeit der Ergebnisse erreicht.

Die in den In-vitro-Versuchen verwendeten PDL-Zellen sind humanen Ursprungs und stammen von kariesfreien, parodontal gesunden Zähnen, welche im Rahmen kieferorthopädischer Behandlung extrahiert wurden. Sie wurden von der Wurzelhaut gewonnen und unter standardisierten Laborbedingungen konserviert und kultiviert. Die

Verwendung eines Zelltyps ermöglichte es eine Vielzahl an Versuchen durchzuführen. Somit können viele Erkenntnisse über die Eigenschaften dieser Zellen gewonnen werden. Gleichzeitig wurde die biologische Varianz erhalten, da die Zellen von unterschiedlichen Spendern stammen.

Das Parodont besteht aus der Gingiva, dem Alveolarknochen, dem Wurzelzement und dem Desmodont. Jedes dieser Gewebeanteile des Parodonts ist auf komplexe Art aus zellulären und faserigen Anteilen aufgebaut. Neben spezifischen Zellarten wie gingivale Keratinozyten, Osteoblasten und Osteoklasten, Zementoblasten und Fibroblasten befinden sich auch Fasersysteme wie die Sharpey'schen Fasern und verschiedene Zementarten im Parodontium. Die in dieser Arbeit eingesetzten PDL-Zellen aus dem Desmodont bilden zwar nur einen Teilausschnitt aus dem komplexen histologischen Gebilde des Parodonts, jedoch bilden diese Zellen auf Grund ihrer Eigenschaften die wichtigste Population im Parodont. Um den Einfluss der Adipokine auf den gesamten Zahnhalteapparat zu verstehen, bedarf es weiterer Studien mit anderen Zelltypen.

Adipokine, auch Adipozytokine genannt, fungieren als Mediatoren und werden neben Adipozyten auch von anderen Zellarten produziert. Leptin und Adiponektin waren die ersten Adipokine, die entdeckt wurden. Seitdem kamen zahlreiche andere hinzu wie Resistin, Visfatin, Chemerin, Apelin, Vaspin, Omentin und Hecpidin, um nur einige zu erwähnen. Adiponektin, Leptin Resistin und Visfatin sind die bis heute am besten untersuchten Adipokine. Diese haben Einfluss auf wichtige Stoffwechselprozesse wie dem Kohlehydrat- und Fettmetabolismus. Sie regulieren das Hunger- und Sättigungsgefühl und die Insulinresistenz. Ihre einflussreiche Rolle bei Adipositas und Diabetes mellitus Typ II ist gesichert. Der Nachweis von Adiponektin, Leptin, Resistin und Visfatin bei Parodontitispatienten und in der Sulkusflüssigkeit in anderen Studien macht sie auch für die Grundlagenforschung an PDL-Zellen interessant.

So wurde zunächst die Expression der Gene für diese Adipokine in PDL-Zellen unter normalen, entzündlichen und regenerativen Bedingungen analysiert. Hierzu wurde die RNA Extraktion und anschließend die cDNA-Synthese durchgeführt. Die real-time PCR ermöglicht die enzymatische Vervielfältigung geringer Mengen an Nukleinsäuren. Diese Methode hat eine hohe Spezifität durch die Auswahl eines spezifischen Primers und durch die anschließende Auswertung der Schmelzkurven. Durch den Einsatz eines Fluoreszenzmarkers wie das SYBR[®] Green ist es möglich, die amplifizierte DNA

quantitativ zu erfassen. Ein ELISA Assay (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) oder das Western Blot-Verfahren können die Proteinsynthese überprüfen.

Der Farbstoff Alizarinrot S, welcher zum Kalziumnachweis verwendet wurde, ist eine chemische Verbindung aus der Gruppe der Anthrachinone. Es bildet bei einem pH-Wert von 4,2 mit zweiwertigem Kalzium eine Chelatverbindung, welche sich als intensiv rötlich-orange gefärbte Kalziumsalze darstellt. Die Auswertung erfolgt durch Absorptionsmessung nach Extraktion der Farblösung aus den PDL-Zellen. Unter Einhaltung des Färbeprotokolls und Einstellung des pH-Wertes ist dies eine kostengünstige, sichere und gängige Methode für den Nachweis von Kalzium (Gregory et al., 2004). Technisch aufwendiger ist der quantitative Nachweis von Kalziumsekretion aus Zellen mittels Atomemissionsspektrometrie.

Im In-vitro-Versuch zur Wundheilung wurde ein Monolayer aus PDL-Zellen mit einem sterilen Instrument in normierter Breite von 3 mm verletzt. Die Annäherung der Wundränder der unstimulierten Kontrollgruppe und der stimulierten Zellgruppen wurde ab Tag 0 bis zum kompletten Verschluss der Wundfläche täglich fotografisch dokumentiert und ausgewertet. Dieses einfache und etablierte In-vitro-Versuchsmodell wurde in vielen Studien angewendet und ist leicht reproduzierbar (Katz et al., 2002). Durch den regelmäßigen Mediumwechsel mit reduziertem FBS Anteil von 1 % wurden avitale und nicht adhärente Zellen eliminiert. Zum Verschluss der Wundränder tragen sowohl die Proliferation als auch die Migration der PDL-Zellen bei, was in vivo ebenfalls zu erwarten wäre. Um die Proliferationskapazität und das Migrationsverhalten von PDL-Zellen unabhängig voneinander beurteilen zu können, müssen allerdings zusätzliche Assays durchgeführt werden. Die Untersuchung der Wirkung von Stimulanzien auf die Anzahl der Zellen unter Berücksichtigung der Ausgangszellzahl ist eine einfache Methode zur Analyse des Proliferationsverhaltens. Unter Einhaltung des Protokolls ist die Messung mit einem automatischen Counter reproduzierbar und kostengünstig.

Einige Studien richteten ihren Fokus auf die intrazellulären Effekte von Adipokinen. So fördert Adiponektin die Proliferation, osteogene Differenzierung und Matrixmineralisation von Osteoblasten über p38 und JNK. Leptin aktiviert die Signalwege JAK/STAT, MAPK, PI3K in Keratinozyten und Fibroblasten (Burguera et al., 2006). Zukünftige Studien sollten klären, welche intrazellulären Signalwege durch Adipokine in PDL-Zellen getriggert werden.

5. Zusammenfassung

Parodontitis ist eine entzündlich-destruktive Erkrankung des Zahnbettes. Risikofaktoren wie Systemerkrankungen, z.B. Adipositas, Diabetes mellitus Typ II und das metabolische Syndrom scheinen, die Progredienz der Parodontitis zu beeinflussen. Das endokrin aktive, viszerale Fettgewebe produziert Adipokine, wie Adiponektin, Leptin, Visfatin und Resistin, welche in Stoffwechsel- und Entzündungsprozesse regulatorisch eingreifen. Einige Studien haben einzelne Adipokine in parodontalen Geweben sowie veränderte Adipokinspiegel bei Parodontitispatienten nachgewiesen.

Ziel dieser In-vitro-Studie war die Analyse von Adipokinen und ihrer Rezeptoren in humanen Parodontalen Ligament (PDL)-Zellen unter normalen, entzündlichen und regenerativen Bedingungen. Des Weiteren wurde ihr Einfluss auf die Proliferation, Mineralisation, Kollagensynthese sowie die Produktion von Wachstumsfaktoren und Entzündungsmediatoren in PDL-Zellen untersucht. Humane PDL-Zellkulturen wurden mit und ohne Adiponektin, Leptin, Visfatin, Resistin und/oder EMD kultiviert. Nach Extraktion der RNA und Synthese der cDNA wurden mittels RT-PCR Genexpressionsanalysen durchgeführt. In weiteren Versuchen wurde mittels Alizarinrot S-Färbung die Kalziumakkumulation analysiert. Mit Hilfe eines In-vitro-Wundheilungsexperimentes wurde das Migrations- und Proliferationsverhalten von PDL-Zellen überprüft. Die statistische Analyse erfolgte mit der Software SPSS. Mittelwert und Standardfehler wurden kalkuliert und der Mann-Whitney-U Test ($p < 0,05$) durchgeführt. Die Expression der oben genannten Adipokine und ihrer Rezeptoren konnte nachgewiesen und ihre Regulation durch regenerative und entzündliche Signale dokumentiert werden. Alle Adipokine förderten die Expression von proinflammatorischen Zytokinen und Osteogenese-assoziierten Mediatoren, während nur Leptin und Visfatin die Expression von IGF1, einem Wachstumsfaktor, erhöhten. Adipokine beeinflussten sich auch gegenseitig: während Adiponektin die Genexpression von Visfatin erhöhte, hemmte Visfatin die Expression der Gene für Adiponektin und AdipoR1. Adiponektin und Leptin stimulierten die In-vitro-Wundheilung, während Visfatin und Resistin diese hemmten. Visfatin förderte die Kalziumakkumulation in PDL-Zellen. Adiponektin erhöhte die Zellzahl nach 14 Tagen. Unter regenerativen Bedingungen hemmten Adipokine die Expression von proinflammatorischen Zytokinen, Wachstumsfaktoren, Kollagen Typ 1

und Runx2 und förderten gleichzeitig andere Osteogenese-assoziierte Marker. Visfatin hemmte dosisabhängig die In-vitro-Wundheilung in Anwesenheit von EMD.

Die Anwesenheit der untersuchten Adipokine in PDL-Zellen und ihr Einfluss auf lokale zelluläre und molekulare Prozesse konnte in dieser In-vitro-Studie nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse sollen dazu beitragen, den (möglicherweise) gegenseitigen Einfluss und die komplexen Beziehungen zwischen parodontalen und systemischen Erkrankungen besser zu verstehen.

6. Literaturverzeichnis

Akram Z, Rahim ZH, Taiyeb-Ali TB, Shahdan MS, Baharuddin NA, Vaithilingam RD, Safii SH. Resistin as potential biomarker for chronic periodontitis: A systematic review and meta-analysis. *Arch Oral Biol* 2017; 73: 311-320

Al-Zahrani MS, Bissada NF, Borawskit EA. Obesity and periodontal disease in young, middle-aged, and older adults. *J Periodontol* 2003; 74: 610-615

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

Berner HS, Lyngstadaas SP, Spahr A, Monjo M, Thommesen L, Drevon CA, Syversen U, Reseland JE. Adiponectin and its receptors are expressed in bone-forming cells. *Bone* 2004; 35: 842-849

Bokarewa M, Nagaev I, Dahlberg L, Smith U, Tarkowski A. Resistin, an adipokine with potent proinflammatory properties. *J Immunol* 2005; 174: 5789-5795

Booth A, Magnuson A, Fouts J, Foster MT. Adipose tissue: an endocrine organ playing a role in metabolic regulation. *Horm Mol Biol Clin Investig* 2016; 26: 25-42

Bosshardt DD. Biological mediators and periodontal regeneration: a review of enamel matrix proteins at the cellular and molecular levels. *J Clin Periodontol* 2008; 35: 87-105

Bozkurt FY, Ay ZY, Sütcü R, Delibas N, Demirel R. Gingival crevicular fluid Leptin levels in periodontitis patients with long-term and heavy smoking. *J Periodontol* 2006; 77: 634-640

Brentano F, Schorr O, Ospelt C, Stanczyk J, Gay RE, Gay S, Kyburz D. Pre-B Cell Colony-Enhancing Factor/Visfatin, a new marker of Inflammation in rheumatoid arthritis with proinflammatory and matrix-degrading activities. *Arthritis Rheum* 2007; 56: 2829-2839

Buhlin K, Gustafsson A, Pockley AG, Frostegård J, Klinge B. Risk factors for cardiovascular disease in patients with periodontitis. *Eur Heart J* 2003; 24: 2099-2177

Burguera B, Brunetto A, Garcia-Ocana A, Teijeiro R, Esplen J, Thomas T, Marta E, Couce ME, Allan Z. Leptin increases proliferation of human osteosarcoma cells through activation of PI(3)-K and MAPK pathways. *Med Sci Monit* 2006; 12: BR341-349

Chen MP, Chung FM, Chang DM, Tsai JC, Huang HF, Shin SJ, Lee YJ. Elevated plasma level of visfatin/pre-B cell colony-enhancing factor in patients with type 2 diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab* 2006; 91: 295–299

Cochran DL, Wozney JM. Biological mediators for periodontal regeneration. *Periodontol.* 2000 1999; 19: 40-58

Curat CA, Wegner V, Sengenès C, Miranville A, Tonus C, Busse R, Bouloumié A. Macrophages in human visceral adipose tissue: increased accumulation in obesity and a source of resistin and visfatin. *Diabetologia* 2006; 49: 744-747

D'Aiuto F, Sabbah W, Netuveli G, Donos N, Hingorani AD, Deanfield J, Tsakos G. Association of the metabolic syndrome with severe periodontitis in a large U.S. population-based survey. *J Clin Endocrinol Metab* 2008; 93: 3989-3994

DAG 2014: Interdisziplinäre Leitlinie der Qualität S3 zur „Prävention und Therapie der Adipositas“. http://www.adipositas-gesellschaft.de/fileadmin/PDF/Leitlinien/050-001I_S3_Adipositas_Praevention_Therapie_2014-11.pdf (Zugriffsdatum: 30.11.2017)

Dalla Vecchia CF, Susin C, Rösing CK, Oppermann RV, Albandar JM. Overweight and obesity as risk indicators for periodontitis in adults. *J Periodont* 2005; 76: 1721-1728

Deschner J, Eick S, Damanaki A, Nokhbehshaim M. The role of adipokines in periodontal infection and healing. *Mol Oral Microbiol* 2014; 29: 258-269

Devanoorkar A, Dwarakanath CD, Gundanavar G, Kathariya R, Patil SR. Evaluation of serum resistin levels in periodontal health and disease and effects of nonsurgical periodontal therapy on its levels. *Dis Markers* 2012; 32: 289-294

Ehling A, Schäffler A, Herfarth H, Tarner IH, Anders S, Distler O, Paul G, Distler J, Gay S, Schölmerich J, Neumann E, Müller-Ladner U. The Potential of adiponectin in driving arthritis. *J Immunol* 2006; 176: 4468-4478

Ezure T, Amano S. Adiponectin and leptin up-regulate extracellular matrix production by dermal fibroblasts. *Biofactors* 2007; 31: 229-236

Fang Y, Svoboda KK. Nicotine inhibits human gingival fibroblast migration via modulation of Rac signalling pathways. *J Clin Periodontol* 2005; 32: 1200-1207

Furugen R, Hayashida H, Saito T. Porphyromonas gingivalis and Escherichia coli lipopolysaccharide causes resistin release from neutrophils. *Oral Dis* 2013; 19: 479-483

Furugen R, Hayashida H, Yamaguchi N, Yoshihara A, Ogawa H, Miyazaki H, Saito T. The relationship between periodontal condition and serum levels of resistin and adiponectin in elderly Japanese. *J Periodont Res* 2008; 43: 556–562

Gestrelius S, Andersson C, Lidström D, Hammarström L, Somerman M. In vitro studies on periodontal ligament cells and enamel matrix derivative. *J Clin Periodontol* 1997; 24: 685-692

Gonçalves TE, Feres M, Zimmermann GS, Faveri M, Figueiredo LC, Braga PG, Duarte PM. Effects of scaling and root planing on clinical response and serum levels of adipocytokines in patients with obesity and chronic periodontitis. *J Periodontol* 2015; 86: 53-61

Gordeladze JO, Drevon CA, Syversen U, Reseland JE. Leptin stimulates human osteoblastic cell proliferation, de novo collagen synthesis, and mineralization: impact on

differentiation markers, apoptosis, and osteoclastic signaling. *J Cell Biochem.* 2002; 85: 825-836

Gregory CA, Gunn WG, Peister A, Prockop DJ. An Alizarin red-based assay of mineralization by adherent cells in culture: comparison with cetylpyridinium chloride extraction. *Analytical Biochemistry* 2004; 329: 77-84

Gröschl M, Topf H-G, Kratzsch J, Dötsch J, Rascher W, Rauh M. Salivary leptin induces increased expression of growth factors in oral keratinocytes. *J Mol Endocrinol* 2005; 34: 353-366

Hiroshima Y, Bando M, Inagaki Y, Mihara C, Kataoka M, Murata H, Shinohara Y, Nagata T, Kido J. Resistin in gingival crevicular fluid and induction of resistin release by *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide in human neutrophils. *J Periodontal Res* 2012; 47: 554-562

Hoang AM, Oates TW, Cochran DL. In vitro wound healing responses to enamel matrix derivative. *J Periodontol* 2000; 71: 1270-1277

IDF, 2006: The IDF Consensus Worldwide Definition of the Metabolic Syndrome. <https://www.idf.org/e-library/consensus-statements/60-idfconsensus-worldwide-definitionof-the-metabolic-syndrome.html> (Zugriffsdatum: 30.11.2017)

Iwamoto Y, Nishimura F, Soga Y, Takeuchi K, Kurihara M, Takashiba S, Murayama Y. Antimicrobial periodontal treatment decreases c-reactive protein, tumor necrosis factor-alpha, but not adiponectin levels in patients with chronic periodontitis. *J Periodontol* 2003; 74: 1231-1236

Iwamoto I, Fujino T, Douchi T. The leptin receptor in human osteoblasts and the direct effect of leptin on bone metabolism. *Gynecol Endocrinol* 2004; 19: 97-104

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 Periodontol Res* 2012; 47: 563-571

Jia SH, Li Y, Parodo J, Kapus A, Fan L, Rotstein OD, Marshall JC. Pre-B cell colony-enhancing factor inhibits neutrophil apoptosis in experimental inflammation and clinical sepsis. *J Clin Invest* 2004; 113: 1318-1327

Johnson RB, Serio FG. Leptin within healthy and diseased human gingiva. *J Periodontol* 2001; 72: 1254-1257

Kanazawa I, Yamaguchi T, Yano S, Yamauchi M, Yamamoto M, Sugimoto T. Adiponectin and AMP kinase activator stimulate proliferation, differentiation, and mineralization of osteoblastic MC3T3-E1 cells. *BMC Cell Biol* 2007; 8: 51

Kardeşler L, Buduneli N, Cetinkalp S, Kinane DF. Adipokines and inflammatory mediators after initial periodontal treatment in patients with type 2 diabetes and chronic periodontitis. *J Periodontol* 2010; 81: 24-33

Karthikeyan BV, Pradeep AR. Gingival crevicular fluid and serum leptin: their relationship to periodontal health and disease. *J Clin Periodontol* 2007; 34: 467-472

Karthikeyan BV, Pradeep AR. Leptin levels in gingival crevicular fluid in periodontal health and disease. *J Periodont Res* 2007; 42: 300-304

Katz RW, Teng SY, Thomas S, Landesberg R. Paracrine activation of extracellular signal-regulated kinase in a simple in vitro model of wounded osteoblasts. *Bone* 2002; 31: 288-295

Khader Y, Khassawneh B, Obeidat B, Hammad M, El-Salem K, Bawadi H, Al-akour N. Periodontal status of patients with metabolic syndrome compared to those without metabolic syndrome. *J Periodontol* 2008; 79: 2048-2053

Kitahara K, Kusunoki N, Kakiuchi T, Suguro T, Kawai S. Adiponectin stimulates IL-8 production by rheumatoid synovial fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 2009; 378: 218-223

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

Lackler KP, Cochran DL, Hoang AM, Takacs V, Oates TW. Development of an in vitro wound healing model for periodontal cells. *J Periodontol* 2000; 71: 226-237

Lago F, Dieguez C, Gómez-Reino J, Gualillo O. Adipokines as emerging mediators of immune response and inflammation. *Nat Clin Prac Rheum* 2007; 3: 716-724

Lago R, Gómez R, Lago F, Gómez-Reino J, Gualillo O. Review: Leptin beyond body weight regulation - Current concepts concerning its role in immune function and inflammation. *Cell Immun* 2008; 252: 139-145

Lee YA, Choi HM, Lee SH, Yang HI, Yoo MC, Hong SJ and Soo K. Synergy between adiponectin and interleukin-1 β on the expression of interleukin-6, interleukin-8, and cyclooxygenase-2 in fibroblast-like synoviocytes. *Exp Mol Med* 2012; 44: 440–447

Li P, Jin H, Liu D, Gao L, Xu Z, Nan W, Wang Y, Gao L. Study on the effect of leptin on fibroblast proliferation and collagen synthesis in vitro in rats. *Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi* 2005; 19: 20-22

Li W, Huang B, Liu K, Hou J, Meng H. Upregulated Leptin in Periodontitis Promotes Inflammatory Cytokine Expression in Periodontal Ligament Cells. *J Periodontol* 2015; 86: 917-926

Liao W, Yu C, Wen J, Jia W, Li G, Ke Y, Zhao S, Campell W. Adiponectin Induces Interleukin-6 Production and activates STAT3 in adult mouse cardiac fibroblasts. *Bio Cell* 2009; 101: 263-272

Luo XH, Guo LJ, Yuan LQ, Xie H, Zhou HD, Wu XP, Liao EY. Adiponectin stimulates human osteoblasts proliferation and differentiation via the MAPK signaling pathway. *Exp Cell Res* 2005; 309: 99-109

Luo XH, Guo LJ, Xie H, Yuan LQ, Wu XP, Zhou HD, Liao EY. Adiponectin stimulates RANKL and inhibits OPG expression in human osteoblasts through the MAPK signaling pathway. *J Bone Miner Res* 2006; 21: 1648-1656

Liu YY, Zhang X, Shi D, Cheng ZB, Meng HX. Association between plasma leptin level and periodontal parameters in patients with aggressive periodontitis. *Zhonghua Kou Qiang Yi Xue Za Zhi*. 2013; 48: 3-6

Lu SC, Shieh WY, Chen CY, Hsu SC, Chen HL. Lipopolysaccharide increases resistin gene expression in vivo and in vitro. *FEBS Letters* 2002; 530: 158-162

Lyngstadaas SP, Lundberg E, Ekdahl H, Andersson C, Gestrelus S. Autocrine growth factors in human periodontal ligament cells cultured on enamel matrix derivative. *J Clin Periodontol* 2001; 28: 181-188

Matarasso M, Iorio-Siciliano V, Blasi A, Ramaglia L, Salvi GE, Sculean A. Enamel matrix derivative and bone grafts for periodontal regeneration of intrabony defects. A systematic review and meta-analysis. *Clin Oral Investig* 2015; 19: 1581-1593

Matsumoto S, Ogawa H, Soda S, Hirayama S, Amarasena N, Aizawa Y, Miyazaki H. Effect of antimicrobial periodontal treatment and maintenance on serum adiponectin in Type 2 Diabetes Mellitus. *J Clin Periodontol* 2009; 36: 142-148

Moschen AR, Kaser A, Enrich B, Mosheimer B, Theurl M, Niederegger H, Tilg H. Visfatin, an adipocytokine with proinflammatory and immunomodulating properties. *J Immunol* 2007; 178: 1748-1758

Mu H, Ohashi R, Yan S, Chai H, Yang H, Lin P, Yao Q, Chen C. Adipokine resistin promotes in vitro angiogenesis of human endothelial cells. *Cardiovascular Res* 2006; 70: 146-157

Murad A, Nath AK, Cha ST, Demir E, Flores-Riveros J, Sierra-Honigmann MR. Leptin is an autocrine/paracrine regulator of wound healing. *FASEB J* 2003; 17: 1895-1897

Nogueira AV, Nokhbehshaim M, Eick S, Bourauel C, Jäger A, Jepsen S, Cirelli JA, Deschner J. Regulation of visfatin by microbial and biomechanical signals in PDL cells. *Clin Oral Investig* 2014; 18: 171-178

Nokhbehshaim M, Keser S, Nogueira AV, Cirelli JA, Jepsen S, Jäger A, Eick S, Deschner J. Beneficial effects of adiponectin on periodontal ligament cells under normal and regenerative conditions. *J Diabetes Res* 2014; 2014: 796565

Nokhbehshaim M, Keser S, Jäger A, Jepsen S, Deschner J. Regulation of regenerative periodontal healing by NAMPT. *Mediators Inflamm* 2013; 2013: 202530

Nokhbehshaim M, Keser S, Nogueira AV, Jäger A, Jepsen S, Cirelli JA, Bourauel C, Eick S, Deschner J. Leptin effects on the regenerative capacity of human periodontal cells. *Int J Endocrinol* 2014; 2014: 180304

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

Park HG, Bak EJ, Kim JH, Lee YS, Choi SH, Cha JH, Yoo YJ. Effect of globular adiponectin on interleukin-6 and interleukin-8 expression in periodontal ligament and gingival fibroblasts. *J Periodontal Implant Sci* 2011; 41: 149-156

Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research* 2001; 29: 45

Pradeep AR, Raghavendra NM, Prasad MV, Kathariya R, Patel SP, Sharma A. Gingival crevicular fluid and serum visfatin concentration: their relationship in periodontal health and disease. *J Periodontol* 2011; 82: 1314–1319

Pradeep AR, Raghavendra NM, Sharma A, Patel SP, Raju A, Kathariya R, Rao NS, Naik SB. Association of serum and crevicular visfatin levels in periodontal health and disease with type 2 diabetes mellitus. *J Periodontol* 2012; 83: 629–634

Raghavendra NM, Pradeep AR, Kathariya R, Sharma A, Rao NS, Naik SB. Effect of non-surgical periodontal therapy on gingival crevicular fluid and serum visfatin concentration in periodontal health and disease. *Dis Markers* 2012; 32: 383-388

Rincon JC, Haase HR, Bartold PM. Effect of Emdogain on human periodontal fibroblasts in an in vitro wound-healing model. *J Periodontol Res* 2003; 38: 290-295

Robinson K, Prins J, Venkatesh B. Clinical review: Adiponectin biology and its role in inflammation and critical illness. *Critical Care* 2011; 15: 221

Saito T, Yamaguchi N, Shimazaki Y, Hayashida H, Yonemoto K, Doi Y, Kiyohara Y, Iida M, Yamashita Y. Serum levels of resistin and adiponectin in women with periodontitis: the Hisayama study. *J Dent Res* 2008; 87: 319-322

Santos-Alvarez J, Goberna R, Sánchez-Margalet V. Human leptin stimulates proliferation and activation of human circulating monocytes. *Cell Immunol* 1999; 194: 6-

Sculean A, Chapple ILC, Giannobile WV. Wound Models for Periodontal and Bone Regeneration: the role of biological research. *Periodontol 2000* 2015; 68: 7-20

Sculean A, Schwarz F, Becker J, Brex M. The application of an enamel matrix protein derivative (Emdogain®) in regenerative periodontal therapy: a review. *Med Princ Pract* 2007; 16: 167-180

Shimada Y, Komatsu Y, Ikezawa-Suzuki I, Tai H, Sugita N, Yoshie H. The effect of periodontal treatment on serum leptin, interleukin-6, and C-reactive protein. *J Periodontol* 2010; 81: 1118-1123

Shimazaki Y, Saito T, Yonemoto K, Kiyohara Y, Iida M, Yamashita Y. Relationship of metabolic syndrome to periodontal disease in Japanese women: the Hisayama Study. *J Dent Res* 2007; 86: 271-275

Statistisches Bundesamt, 2013: Mikrozensus Fragen zur Gesundheit - Körpermaße der Bevölkerung. https://www.destatis.de/DE/Publikationen/Thematisch/Gesundheit/Gesundheitszustand/Koerpermasse5239003139004.pdf?__blob=publicationFile (Zugriffsdatum: 30.11.2017)

Tan W, Wang F, Zhang M, Guo D, Zhang Q, He S. High adiponectin and adiponectin receptor 1 expression in synovial fluids and synovial tissues of patients with rheumatoid arthritis. *Semin Arthritis Rheum* 2009; 38: 420-427

Tang CH, Chiu YC, Tan TW, Yang RS, Fu WM. Adiponectin enhances IL-6 production in human synovial fibroblast via an AdipoR1 Receptor, AMPK, p38, and NF-κB Pathway. *J Immunol* 2007; 179: 5483-5492

Thommesen L, Stunes AK, Monjo M, Grøsvik K, Tamburstuen MV, Kjølbi E, Lyngstadaas SP, Reseland JE, Syversen U. Expression and regulation of Resistin in osteoblasts and osteoclasts indicate a role in bone metabolism *J Cell Biochem* 2006; 99: 824-834

Tong KM, Shieh DC, Chen CP, Tzeng CY, Wang SP, Huang KC, Chiu YC, Fong YC, Tang CH. Leptin induces IL-8 expression via leptin receptor, IRS-1, PI3K, Akt cascade and promotion of NF- κ B/p300 binding in human synovial fibroblasts. *Cell Signal* 2008; 20: 1478-1488

Xie H, Tang SY, Luo XH, Huang J, Cui RR, Yuan LQ, Zhou HD, Wu XP; Liao EY. Insulin-Like Effects of Visfatin on human osteoblasts. *Calcif Tissue Int* 2007; 80: 201-210

Yamaguchi N, Kukita T, Li YJ, Argueta JGM, Saito T, Hanazawa S, Yamashita Y. Adiponectin inhibits osteoclast formation stimulated by lipopolysaccharide from *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2007; 49: 28-34

Zimmet P, Hodge A, Nicolson M, Staten M, de Courten M, Moore J, Morawiecki A, Lubina J, Collier G, Alberti G, Dowse G. Serum leptin concentration, obesity, and insulin resistance in Western Samoans: cross sectional study. *BMJ* 1996; 313: 965-969

7. Danksagung

Herrn Prof. Dr. James Deschner, Leiter der Sektion für Experimentelle Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde des Zentrums für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, danke ich für die Bereitstellung des Themas, die finanzielle Unterstützung zur Durchführung aller Experimente und die Betreuung der Arbeit.

Frau Dr. Marjan Nokhbehaim, Biologin und Mitarbeiterin in der Sektion für Experimentelle Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde, danke ich für die Unterstützung bei der praktischen Durchführung der zell- und molekularbiologischen Experimente.

Herrn Dr. Jochen Winter, Leiter des molekular- und zellbiologischen Labors der Poliklinik für Parodontologie, Zahnerhaltung und Präventive Zahnheilkunde des Zentrums für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn gilt mein Dank für die Unterstützung bei der Durchführung der Experimente.

Insbesondere danke ich allen medizinisch-technischen Assistentinnen des Labors für ihr Engagement und ihre Geduld.

Meinem Mann Ibrahim Serkan Tekin, meiner Familie und meinen Freunden danke ich ganz besonders: sie haben mich immer herzlich unterstützt und es mir ermöglicht, meinen ganz eigenen Weg zu gehen.