

Aus der Poliklinik für Zahnärztliche Prothetik
(Prof. Dr. med. dent. R. Bürgers)
im Zentrum Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

**Proteomanalyse parodontaler Zellen in
Kultur mit *Aggregatibacter
actinomycetemcomitans* und *Eikenella
corrodens***

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizinischen Fakultät der
Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Boris Schminke

aus

Hessisch Lichtenau

Göttingen 2021

Dekan: Prof. Dr. med. W. Brück
Referent/in: Prof. Dr. med. N. Miosge
Ko-Referent/in:
Drittreferent/in:
Datum der mündlichen Prüfung:

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel
"Proteomanalyse parodontaler Zellen in Kultur mit
Aggregatibacter actinomycetemcomitans und *Eikenella corrodens*"
eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir
angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, den

.....
(Unterschrift)

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	III
Tabellenverzeichnis	IV
Abkürzungsverzeichnis	V
1 Einleitung.....	1
1.1 Parodontium.....	1
1.1.1 Gingiva.....	1
1.1.2 Alveolarknochen	3
1.1.3 Zement.....	4
1.1.4 Parodontales Ligament.....	5
1.2 Parodontitis	6
1.2.1 Epidemiologie	6
1.2.2 Ätiologie	7
1.2.3 Klassifikation	8
1.2.4 Pathogenese.....	9
1.2.5 Klinik	10
1.2.6 Diagnostik	11
1.2.7 Differentialdiagnostik.....	11
1.2.8 Therapie und Prävention.....	11
1.3 Bakterien.....	12
1.3.1 <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	12
1.3.2 <i>Eikenella corrodens</i>	13
1.4 Aufgabenstellung	14
2 Material und Methoden	15
2.1 Patientenkollektiv	15
2.2 Generierung der Zellen aus Gewebe.....	15
2.2.1 Gewebeaufbereitung für Zement und PDL	16
2.2.2 Verdau des Alveolarknochens	16
2.2.3 Separierung des Epithels.....	16
2.3 Immortalisierung der Zellen	17
2.3.1 Virusproduktion	17
2.3.2 Transfektion	18
2.3.3 Selektion	18
2.4 Kultur der Bakterienstämme	18
2.5 Zellkultur mit den Bakterienstämmen.....	19
2.6 Vorbereitung der Proteinproben.....	19
2.7 Proteomics - Massenspektrometrische Analysen	19
2.7.1 Probenvorbereitung	19

2.7.2	LC/MS/MS.....	20
2.7.3	Datenverarbeitung und statistische Analysen.....	21
3	Ergebnisse.....	23
3.1	Proliferation versus Apoptose	23
3.2	Eine erste Übersicht: PCA, <i>Heatmap</i> und <i>Volcano plots</i>	25
3.3	Signalweg-Analysen	27
3.3.1	Top 20 angereicherte Signalwege	28
3.3.2	<i>Gene-concept-network</i>	30
3.4	Immunantwort, Zell-Interaktionen & EZM	31
3.4.1	Gingivale Keratinozyten	32
3.4.2	Osteoblastäre Zellen des Alveolarknochens.....	34
3.4.3	Fibroblasten aus dem parodontalen Ligament.....	35
3.4.4	Zellen des Zements	36
3.5	Nicht nur Unterschiede: Ähnliche Veränderungen im Proteom der Zellreihen während der Kultur mit den Bakterien.....	37
4	Diskussion.....	41
4.1	Die Proteome von Zellen aus der mesodermalen Linie unterscheiden sich von gingivalen Keratinozyten aus der ektodermalen Linie.....	42
4.2	Integrative Datenbank-Analysen.....	42
4.3	Keratine werden durch <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> und <i>Eikenella corrodens</i> in gingivalen Keratinozyten reguliert	43
4.4	<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> und <i>Eikenella corrodens</i> modulieren eine Immunantwort in allen Zellen, die an der Bildung des Parodontiums beteiligt sind.....	44
4.5	Proteine der Zellinteraktion und der EZM-Produktion in Zellen des Parodontiums werden durch die Kultur mit <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> und <i>Eikenella corrodens</i> beeinflusst.....	45
4.6	Zellreihen-übergreifende Veränderungen im Proteom.....	46
4.7	Ausblick.....	49
5	Zusammenfassung	51
6	Literaturverzeichnis	52

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematischer Aufbau des Parodontiums (Weber 2017)	2
Abbildung 2: Proliferation und Apoptose über 1 Woche	23
Abbildung 3: Zytologie.....	24
Abbildung 4: PCA.....	25
Abbildung 5: <i>Heatmap</i>	26
Abbildung 6: <i>Volcano plots</i>	27
Abbildung 7: Top 20 angereicherte Signalwege	28
Abbildung 8: <i>Gene-conzept-network</i> der Top 5 angereicherten KEGG-Pfade	30
Abbildung 9: Protein-Expression von Bestandteilen des Immunsystems (links) sowie von Zell-Interaktionsproteinen und Bestandteilen der EZM (rechts) gemessen bei GK.....	32
Abbildung 10: Spezifische Expression von Keratinen in GK.....	33
Abbildung 11: Protein-Expression von Bestandteilen des Immunsystems (links) sowie von Zell-Interaktionsproteinen und Bestandteilen der EZM (rechts) gemessen bei OZAK	34
Abbildung 12: Protein-Expression von Bestandteilen des Immunsystems (links) sowie von Zell-Interaktionsproteinen und Bestandteilen der EZM (rechts) gemessen bei PDLF	35
Abbildung 13: Protein-Expression von Bestandteilen des Immunsystems (links) sowie von Zell-Interaktionsproteinen und Bestandteilen der EZM (rechts) gemessen bei ZZ.....	36
Abbildung 14: Übereinstimmungen im Verhalten der einzelnen Zellen während der Kultur mit Bakterien Teil 1	38
Abbildung 15: Übereinstimmungen im Verhalten der einzelnen Zellen während der Kultur mit Bakterien Teil 2	39

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Aktuelle Klassifikation von PA	8
Tabelle 2: Aktuelles <i>Grading</i> von PA.....	9

Abkürzungsverzeichnis

BHI	<i>Brain Heart Infusion</i>
CAL	<i>Clinical Attachment Loss</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
EZM	extrazelluläre Matrix
FCS	<i>Fetal Calf Serum</i>
GK	gingivale Keratinozyten
KEGG	<i>Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes</i>
OZAK	osteoblastäre Zellen des Alveolarknochens
PA	Parodontitis
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PCA	<i>Principal Component Analysis</i>
PDL	parodontales Ligament
PDLF	PDL Fibroblasten
ZZ	Zellen des Zements

1 Einleitung

Parodontium und Parodontitis stellen die wissenschaftliche Grundlage der vorliegenden Dissertation dar. Die Zusammensetzung des Parodontiums und die Pathogenese der Parodontitis werden im folgendem erläutert. Die aus den einzelnen Bestandteilen des Parodontiums generierten Zellen wurden für den Versuch mit Parodontitis (PA) assoziierten Keimen, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* sowie *Eikenella corrodens*, kultiviert. Beide Bakterien werden hier ebenfalls erläutert.

1.1 Parodontium

Beim Parodontium handelt es sich um einen funktionellen Verbund, der aus der Gingiva, dem Alveolarknochen, dem parodontalen Ligament (PDL) und dem Wurzelzement besteht (Narayanan und Bartold 1996). Diese Hart- und Weichgewebe sind essentiell für Aufhängung und Propriozeption der Zähne (Berkovitz 1990). Außerdem bilden die Komponenten des Parodontiums eine Barriere gegen das orale Mikrobiom, das zu Infektionen und PA führen kann (Tatakis und Kumar 2005).

1.1.1 Gingiva

Die orale Mukosa bedeckt als Epithel die gesamte Mundhöhle, im Bereich des Alveolarknochens spricht man von Gingiva (Rheinwald und Green 1975). Die Gingiva kann anatomisch, wie in Abbildung 1 zu sehen, dreifach unterschieden werden: in die befestigte, die freie marginale und die interdentale Gingiva (Listgarten 1972).

Die befestigte Gingiva reicht von der muko-gingivalen Grenze bis zur gingivalen Furche. Makroskopisch lässt sich eine so genannte Stippelung der Oberfläche erkennen, welche durch den Zug der kollagenen Fasern zu Stande kommt (Bergström 1984).

Von der gingivalen Furche bis zum koronalen Ende spricht man von freier marginaler Gingiva. Die Ausdehnung der freien marginalen Gingiva in apikal-koronaler Richtung beträgt im Mittel ca. 1,5 mm. Die freie marginale Gingiva schlägt in koronaler Richtung zur Oberfläche des Zahns um, ohne an ihm befestigt zu sein. Ihre Innenfläche ist somit strukturgebend für den gingivalen Sulkus. In diesem Bereich spricht man vom oralen Sulkusepithel, das nach apikal vom Saumepithel begrenzt wird. Das Saumepithel reicht bis ca. 2 mm Oberhalb des Alveolarknochens, ist mit der Zahnoberfläche verbunden und schließt als Barriere das PDL nach oral ab (Narayanan und Bartold 1996).

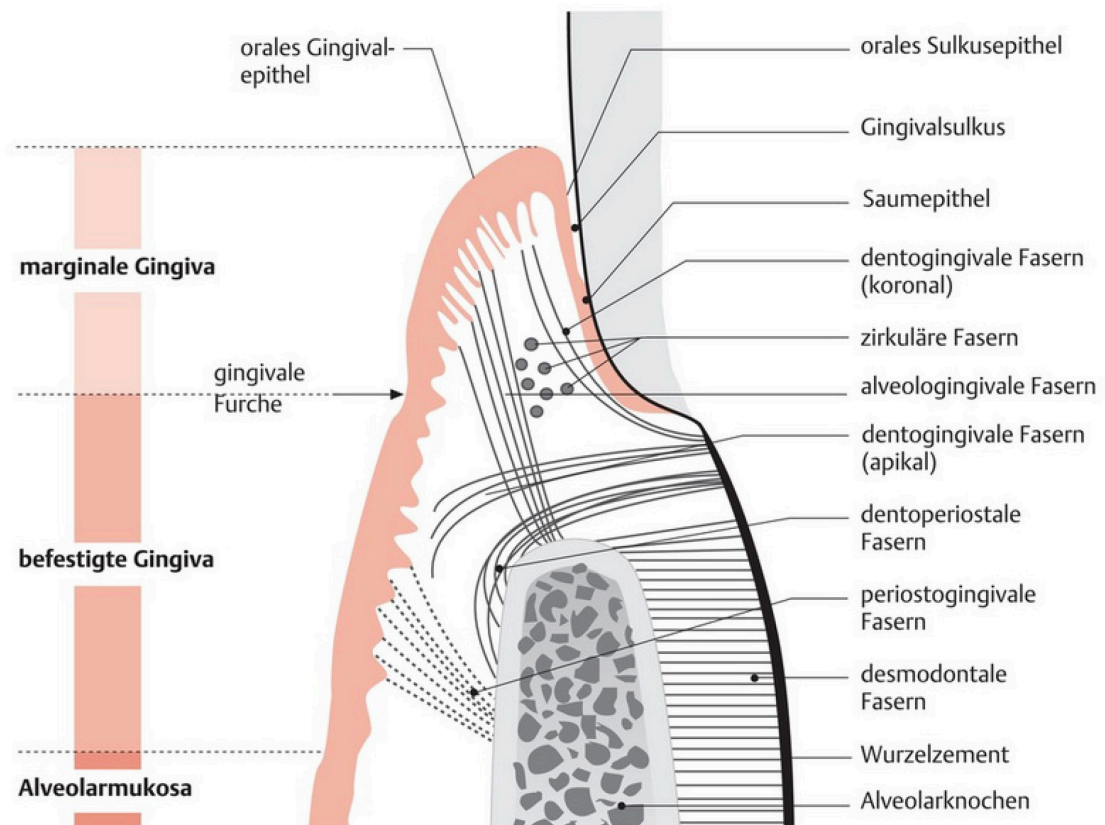


Abbildung 1: Schematischer Aufbau des Parodontiums (Weber 2017). Die Verwendung erfolgt mit freundlicher Genehmigung der Thieme Gruppe.

Die interdentale Gingiva passt sich hinsichtlich Position, Form und Ausprägung den entsprechenden Zähnen an. Sie bildet die Papillen nach vestibulär und oral aus. Die Höhe der Papille entspricht ungefähr der Höhe des Approximalkontaktes der Zähne. Zwischen zwei gegenüberliegenden Papillen liegt der *Col* als eine Abflachung passend zum Verlauf des Zahns (Schroeder und Listgarten 1997).

Histologisch zeigt die Gingiva typische Charakteristika von Epithelien: oberflächlich liegen die entsprechenden Keratinozyten, welche der Basalmembran aufsitzen, tiefer findet sich eine Bindegewebszone, die *Lamina propria*, welche in den Alveolarknochen übergeht (Schroeder und Listgarten 1997). Die befestigte, die freie marginale und die interdentale Gingiva sind keratinisierte mehrschichtige Plattenepithelien, wohingegen das Saumepithel nicht keratinisiert ist (Listgarten 1972). Der Anteil der Keratinisierung und die Zusammensetzung der verschiedenen Keratine korreliert mit der mechanischen Beanspruchung des Epithels (Lindberg und Rheinwald 1990). Insgesamt entspricht der Aufbau der Gingiva dem aller Epithelien mit *Stratum basale*, *Stratum spinosum*, *Stratum granulosum* und *Stratum corneum* (Green et al. 1982). Neben den Keratin produzierenden Keratinozyten finden sich Langerhans-Zellen (DiFranco et al. 1985) als inaktive

dentrische Zellen, Melanozyten (Barrett und Raja 1997) und Merkelzellen (Ramieri et al. 1992). Die Keratinozyten sind miteinander über verschiedene Zell-Zell-Kontakte verbunden. Zur Verankerung an der Basalmembran werden Zell-Matrix-Verbindungen aufgebaut (Raghunath et al. 1999). Zwischen den Keratinozyten existiert nur ein kleiner extrazellulärer Raum mit Glykosaminoglykanen (Bartold et al. 1981). Unterhalb der Basalmembran befindet sich eine *Lamina propria*, hauptsächlich aus Kollagen Typ I und III. Die Fasern dieser Kollagene weisen verschiedene Orientierungen auf. Es lassen sich dentogingivale, dentoperiostale, alveologingivale, zirkuläre und semizirkuläre, transgingivale, interzirkuläre, interpapilläre, periosteogingivale, intergingivale und transseptale Fasern unterscheiden. Einen geringeren Anteil an der *Lamina propria* bilden die Kollagene vom Typ IV, V und VI (Romanos et al. 1991). Die extrazelluläre Matrix (EZM) der *Lamina propria* wird von Fibroblasten synthetisiert. Außerdem befinden sich neutrophile Granulozyten, Monozyten, Mastzellen, Lymphozyten und Makrophagen in der *Lamina propria* (Schroeder et al. 1973).

Die Gingiva mit ihrer Verbindung zu den Zähnen schützt das darunter liegende Gewebe vor Entzündungsreizen, die durch das orale Mikrobiom mit seinen über 700 verschiedenen Erregern verursacht werden können (Rylev und Kilian 2008).

1.1.2 Alveolarknochen

Der Alveolarknochen ist der zahntragende Anteil von Maxilla und Mandibula. Der Aufbau entspricht dem eines herkömmlichen Knochens. Vestibulär, lingual oder palatinal befinden sich Anteile aus Kompakta, welche nach zentral hin von Spongiosa abgelöst werden. Die Alveole umfasst direkt die Zahnwurzel und besteht aus Kompakta (Saffar et al. 1997). Die grazile Struktur des Alveolarknochens bedingt die zügigen Umbauprozesse, die von der eigentlichen Funktion, nämlich der Verankerung der Zähne, abhängig sind. Der Alveolarknochen bildet sich mit dem Zahndurchbruch aus, passt sich im zeitlichen Verlauf den auftretenden Kräften bei der Mastikation an und degeneriert bei PA oder Zahnverlust (Sodek und McKee 2000). Aufgrund seiner Durchsetzung mit kollagenen Fasern wird der Alveolarknochen auch als *bundle bone* bezeichnet (Blaschke und Schwass 2020).

Histologisch ist der Alveolarknochen aus Osteonen und den entsprechenden Lamellen aufgebaut. Zur Versorgung dienen parallel zu den Lamellen angeordnete Haverskanäle und quer verlaufende Volkmannkanäle. Die vaskuläre Versorgung entspringt dem Periost (Buckwalter und Cooper 1987). Metabolisch aktiv sind die Osteoid sezernierenden

Osteoblasten (Long 2011). Osteozyten sind ehemalige Osteoblasten, die sich durch Produktion von Osteoid in die Lamellen eingefügt haben. Sie sind die einzigen Zellen mit direkten Zell-Zell-Verbindungen im Bindegewebe (Bonewald 2011). Für den Umbau sind die Osteoklasten essentiell, da diese mehrkernigen Riesenzellen Knochen abbauen. Der *turn over* des Knochens ist vor allem abhängig von seiner funktionellen Beanspruchung und wird hormonell reguliert (Ono und Kronenberg 2016). Der organische Anteil der EZM besteht hauptsächlich aus Kollagen Typ I und V. Ebenfalls im Alveolarknochen nachweisbares Kollagen Typ III formt mit Kollagen Typ I heterotypische Fasern, die als Sharpey'sche Fasern ebenfalls Bestandteil des PDL sind. Weitere Bestandteile der EZM sind Knochen-Sialoprotein, Osteokalzin Osteopontin, Osteonektin, Biglykan, Dekorin, Fibronektin, Chondroitinsulfat, Hyaluronsäure, Dermatansulfat sowie Heparansulfat (Bartold 1990; Nanci und Bosshardt 2006).

1.1.3 Zement

Das Zement umgibt das Dentin im Bereich der Zahnwurzeln. Anatomisch betrachtet ist das Zement Bestandteil des Zahns, funktionell gesehen gehört es zur Einheit des Parodontiums. Seine Hauptaufgabe ist die Verankerung des PDL und damit ist es verantwortlich für die Übertragung der Kräfte bei der Mastikation auf den Alveolarknochen. Seine weiteren Eigenschaften, wie Resorption und Synthese von Zement, sind ähnlich denen des Knochens (Bosshardt und Selvig 1997). Die Stärke des Zements von 20 bis 200 μm ist sehr variabel. Das Zement ist nicht vaskularisiert, alymphatisch und nicht innerviert. Die Zementozyten sind unregelmäßig verteilt (Mariotti 1993). Je nach verwendeter Literatur kann man morphologische Unterschiede am Zement feststellen. Die Unterschiede beziehen sich dabei auf die Lagebeziehung zu der Wurzel, den Anteil von Zementozyten und die Menge an kollagenen Fasern:

Azelluläres afibrilläres Zement enthält weder Kollagenfibrillen noch Zellen und bedeckt kleine Schmelzbereiche, insbesondere an der Schmelz-Zement-Grenze und um sie herum. Azelluläres Fremdfaserzement besteht aus dichten, kurzen kollagenen Fasern, die senkrecht zur Zahnoberfläche orientiert sind. Es findet sich hauptsächlich an zervikalen und mittleren Wurzelbereichen.

Charakteristisch für das zelluläre Eigenfaserzement sind Zementozyten, die in Lakunen sitzen und eine kollagenreiche EZM produzieren, von der sie umgeben sind. Diese Zementform kann an Furkationen und in apikalen Wurzelbereichen beobachtet werden (Bosshardt und Selvig 1997).

Die Zementozyten produzieren eine vornehmlich aus Kollagen Typ I und III zusammengesetzte organische EZM (Salmon et al. 2013). Es konnten weiterhin Knochen-Sialoprotein, Osteokalzin, Osteopontin (Arzate et al. 2015), Osteonektin (Reichert et al. 1992) und Fibronektin in der EZM des Zements nachgewiesen werden (Bosshardt und Selvig 1997), ähnlich der Zusammensetzung des Alveolarknochens (Bartold 1990; Nanci und Bosshardt 2006). Im zellulären Zement sind im Gegensatz zum azellulären Zement Dekorin, Versikan, Biglykan und Lumican in den Lakunen um die Zementozyten und an den Insertionsstellen der Sharpey'schen Fasern nachweisbar (Ababneh et al. 1999).

1.1.4 Parodontales Ligament

Das PDL ist ein auf die federnde Aufhängung der Zähne spezialisiertes Bindegewebe. Die verschiedenen Fasern des PDL ziehen vom Zement der Zahnwurzeln in den Alveolarknochen. Die Breite des PDL variiert zwischen 0,15 und 0,38 mm und verringert sich mit dem Alter. Die Faserzüge des PDL werden nach ihrem Erstbeschreiber Sharpey benannt (Nanci und Bosshardt 2006). Die Sharpey'schen Fasern verbinden Zahn und Alveolarknochen, wodurch die, während der Mastikaion auftretende Druckkraft in eine Zugbelastung auf den Alveolarknochen umgewandelt wird. Die Zugbelastung des Alveolarknochens ist somit ein physiologischer Wachstumsreiz, wohingegen eine Druckbelastung zur Atrophie des Alveolarknochens führen würde. Diese Umwandlung der Belastung ist erst durch den speziellen Verlauf der Sharpey'schen Fasern möglich. Das PDL ist aber nicht nur für die Aufhängung der Zähne verantwortlich sondern auch essentiell für die feine Propriozeption im Kausystem und bildet eine Barriere gegenüber mikrobiellen Erregern (Beertsen et al. 1997). Das PDL ist stark vaskularisiert, innerviert und lymphatisch versorgt. Der Vaskularisierung wird ebenfalls ein Effekt bei der Pufferung von mechanischen Belastungen, und zwar durch eine Flüssigkeitsverschiebung in benachbarte Kompartimente, zugeschrieben (Birn 1966).

Der vorherrschende Zelltyp im PDL ist der Fibroblast. Er ist für die Synthese und Homöostase der EZM und somit auch der Sharpey'schen Fasern verantwortlich. Er nimmt ungefähr 35 % des Volumens des PDL ein. Weiterhin finden sich Malassez'sche Epithelreste, Progenitorzellen (Kitajima et al. 2019), Osteoblasten, Osteoklasten, Zementoblasten, Odontoklasten, Monozyten und Makrophagen im PDL (Narayanan und Bartold 1996; Nanci und Bosshardt 2006).

Die EZM des PDL besteht zum Großteil aus nicht elastischen kollagenen Faserbündeln, die in verschiedenen Ebenen angeordnet sind. Wird der Zahn nicht belastet, erscheinen

die Sharpey'schen Fasern wellenförmig, zueinander parallel und in einem Winkel von 30 ° Richtung Wurzelspitze geneigt. Bei Belastung spannen sich die Sharpey'schen Fasern entlang ihrer Verlaufsrichtung, federn so die Auslenkung des Zahns ab und nehmen anschließend ihre ursprüngliche Konformation wieder an (Hassell 1993). Die Hauptkomponente dieser Sharpey'schen Fasern besteht aus Kollagen Typ I und III (Butler et al. 1975). Während der Synthese der Hauptfibrillen aus Kollagen Typ I und III lagert sich diesen Kollagen Typ V an. Dadurch bildet sich ein mikrofibrilläres Netzwerk aus Kollagen Typ V zwischen den Hauptfasern. Kollagen Typ XII und XIV wurde ebenfalls im Bereich dieses Netzwerks nachgewiesen. Ein kleiner Anteil Kollagen Typ VI befindet sich in Form von Mikrofibrillen um Blutgefäße und Nervenfasern (Becker et al. 1991). Abgesehen von den verschiedenen Kollagenen findet sich ein elastischer Fasertyp im PDL, das Oxytalan. Die Oxytalanfasern verlaufen als dreidimensionales Geflecht entlang der Zementoberfläche, umrunden hierbei die gesamte Zahnwurzel und enden in einem apikalen Gefäßkomplex (Nanci und Bosshardt 2006). Die Funktion des Oxytalans ist noch nicht vollständig erforscht. Seine Assoziation mit Nerven und Blutgefäßen deutet darauf hin, dass sie an der Regulierung des Blutstroms bei Auslenkung der Zähne beteiligt sind (Sims 1975). Fibulin-3, -4 und -5 sowie Matrilin-1, -2, -3 und -4 wurden in Beziehung zu den Oxytalanfasern nachgewiesen (Schubert et al. 2017). Zur Bindung von Wasser und zur Organisation der EZM tragen Glykoproteine und Proteoglyne im PDL bei. Es wurde eine Vielzahl von Proteoglykanen, wie Dekorin, CD44, Fibromodulin, Biglycan, Syndecan-1, -2 und -3, beschrieben. Als Glykoproteine sind vor allem Tenascin, Vitronectin und Fibronectin vertreten. (Mariotti 1993; Ababneh et al. 1999; Nanci und Bosshardt 2006).

1.2 Parodontitis

PA ist definiert als chronisch entzündliche Erkrankung des Parodontiums und führt ohne Therapie zu einer irreversiblen Zerstörung des Zahnhalteapparates und dem resultierendem *Clinical Attachment Loss* (CAL). Mittlerweile ist PA der Hauptgrund für Zahnverlust (Pihlstrom et al. 2005).

1.2.1 Epidemiologie

PA zeigt generell eine steigende Prävalenz und könnte bis zu 90 % der Weltbevölkerung betreffen. Mit dem Alter erhöht sich das Risiko für schwere Verläufe einer PA. Betrachtet man die Geschlechterverteilung, so haben Männer eine höhere Prävalenz an einer PA zu

erkranken als Frauen. Menschen mit Allgemeinerkrankungen zeigen ebenfalls eine erhöhte Prävalenz für PA (Kinane et al. 2017).

1.2.2 Ätiologie

Die Ursachen für eine manifeste PA sind multifaktoriell. Die Hauptursache ist die Entstehung eines vor allem subgingivalen Biofilms mit Besiedelung von prinzipiell parodontal-pathogenen Erregern. Weitere Ursachen stellen genetische Veranlagung, Rauchen, Diabetes mellitus, Beeinträchtigung des Immunsystems, insuffiziente zahnärztliche Versorgung, Stress und unzureichende Mundhygiene dar (Page und Kornman 1997; Meisel et al. 2002; Thornton-Evans et al. 2013).

1.2.3 Klassifikation

Die aktuelle Klassifikation in Stadium 1, 2 oder 3 wird am besten in der folgenden Tabelle wiedergegeben:

Tabelle 1: Aktuelle Klassifikation von PA (Caton et al. 2018; Tonetti und Sanz 2019)

	Stadium I	Stadium II	Stadium III	Stadium IV
interdentaler CAL	1 – 2 mm	3 – 4 mm	≥ 5 mm	≥ 5 mm
radiologischer Knochenverlust	koronales Drittel (< 15 %)	Drittelkoronales Drittel (15 – 33 %)	mittleres Drittel und tiefer	mittleres Drittel und tiefer
Zahnverlust durch PA	Kein Zahnverlust durch PA		Zahnverlust durch PA von ≤ 4 Zähnen	Zahnverlust durch PA von ≥ 5 Zähnen
Komplexität	maximale ST ≤ 4 mm hauptsächlich horizontaler Knochenabbau	maximale ST 4 – 5 mm hauptsächlich horizontaler Knochenabbau	Zusätzlich zu Stadium II: ST ≥ 6 mm, vertikaler Knochenabbau ≥ 3 mm, Furkationsbeteiligung Grad II – III, moderater Kammdefekt	Zusätzlich zu Stadium III: mastikatorische Dysfunktion, sekundäres okklusales Trauma (Mobilität ≥ 2), Zahnwanderung, Auffächerung, < 10 okkludierende Zahnpaare, schwerer Kammdefekt
Ausdehnung Verteilung	lokalisiert (< 30 % der Zähne betroffen), generalisiert, Molaren-Inzisiven-Muster			

Weiterhin erfolgt ein *Grading* der PA in die Grade A, B, und C. Die folgende Tabelle veranschaulicht das neue System (Malpartida-Carrillo et al. 2020).

Tabelle 2: Aktuelles *Grading* von PA (Caton et al. 2018; Tonetti und Sanz 2019)

PA Grad:		Grad A	Grad B	Grad C
		langsame Pro- gression	moderate Pro- gression	schnelle Progression
direkte Evi- denz für Pro- gression	longitudinale Da- ten (CAL oder ra- diologischer Kno- chenverlust)	Evidenz für kei- nen Verlust in den letzten 5 Jahren	< 2 mm über 5 Jahre	≥ 2 mm über 5 Jahre
indirekte Evi- denz für Pro- gression	Knochenverlust auf Alter in %	< 0,25	0,25 - 1,0	> 1,0
Phänotyp des Falls		viel Biofilm, we- nig parodontaler Abbau	parodontaler Abbau entspre- chend Biofilm- menge	parodontaler Abbau übersteigt Erwartung entsprechend Biofilm- menge, Perioden schnel- ler Progression, früher Krankheitsbeginn, feh- lendes Ansprechen auf Standarttherapie
Rauchen		Nichtraucher	Raucher, < 10 Zigaretten pro Tag	Raucher, > 10 Zigaretten pro Tag
Diabetes mellitus		Normo-glykä- misch/ keine Di- abetes mellitus Diagnose	HbA1c < 7,0 %	HbA1c > 7,0 %
high sensitivity CRP		< 1mg / l	1-3 mg / l	> 3 mg / l

1.2.4 Pathogenese

Zunächst lagern sich von den Speicheldrüsen sezernierte Glykoproteine als *acquired pellicle* auf dentalen Oberflächen als Grundlage des Biofilms an. Zusammensetzung und Aufbau des Biofilms sind individuell sehr verschieden und variieren gemäß der Komplextheorie in den verschiedenen Phasen der Entwicklung. Die Organisation von

Bakterien in Biofilmen bietet diesen zahlreiche Vorteile, wie zum Beispiel den Schutz vor Antibiotika. Sogenannte Pionierkeime beginnen mit der Organisation des Biofilms. Nach der Komplextheorie zählen unter anderen *Eikenella corrodens*, *Veillonella parvula*, *Actinomyces odontolyticus*, *Campylobacter rectus*, *Eubacterium nodatum*, *Campylobacter showae*, *Campylobacter gracilis* und *Streptococcus constellatus* zu den Pionierkeimen. Zwar sind sie nur gering pathogen für das Parodontium, bilden aber eine eigene, vor allem aus Mehrfachzuckern bestehende EZM, die eine Grundlage für die nächste Stufe der Kolonisierung des Biofilms darstellt. Der nächste Komplex umfasst moderat bis stark pathogene Erreger für eine PA, beispielsweise *Prevotella intermedia*, *Peptostreptococcus micros*, oder *Fusobacterium nucleatum*. Durch Stoffwechselprodukte und die damit ein tretende Modulation der EZM des Biofilms schaffen diese Bakterien eine Lebensgrundlage für die anaeroben Keime. Als nächste Stufe der Pathogenität etablieren sich gramnegative, obligate Anaerobier wie *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola* und *Tannerella forsythia*. Die sauerstoffempfindlichen Bakterien verfügen über eine breite Ausstattung an proteolytischen Enzymen wie Phosphatasen oder Kollagenasen, die neben der Destruktion des Parodontiums auch für die gewebsinvasiven Eigenschaften dieser Bakterien verantwortlich sind.

Die Etablierung eines subgingivalen Biofilms ist aber nicht allein verantwortlich für die Destruktion des Parodontiums (Page und Kornman 1997; Socransky et al. 1998). Die Mechanismen des Immunsystems tragen ebenfalls zum Abbau parodontaler Strukturen bei. Substanzen, die aus dem Biofilm freigesetzt werden, wie zum Beispiel Lipopolysaccharide, Antigene und andere Virulenzfaktoren, erhalten Zugang zum Parodontium und lösen eine Entzündung mit folgender Immunantwort aus und es kommt zur Aktivierung von hauptsächlich neutrophilen Granulozyten. Aufgrund der zellulären Aktivierung tragen Entzündungsmediatoren, darunter Zytokine, Chemokine, Arachidonsäurestoffwechselprodukte und proteolytische Enzyme, gemeinsam zu einer Gewebeerstörung und letztendlich zu einer irreversiblen Knochenresorption bei (Yucel-Lindberg und Båge 2013).

1.2.5 Klinik

Der zeitliche Verlauf einer PA ist sehr variabel. Die Gingivitis stellt eine Entzündungsreaktion der Gingiva dar. Sie entwickelt sich aufgrund eines Biofilms, der sich auf der Zahnoberfläche gebildet hat. Es kann zu Blutung auf Sondierung kommen. Die Sekretion des Sulkusfluids nimmt zu. An der Basalmembran des Saumeithels kann es zur

Ausbildung von Epithelzapfen kommen. Ulzerationen im Saumepithel liegen im Verlauf ebenfalls vor. Etabliert sich der Biofilm weiter in subgingivaler Richtung, führt die Entzündungsreaktion zur Destruktion der umliegenden Gewebe und eine PA kann ausbrechen. Die Ausbildung der Tasche verschiebt sich bei anhaltender Entzündung in Richtung apikal. Je weiter dieser Prozess nach apikal fortschreitet, desto stärker wird der Verlust parodontaler Strukturen. Hieraus resultiert eine Lockerung des Zahns. Erfolgt keine Therapie, droht ein Verlust des Zahns. In einzelnen Fällen können sich parodontale Abszesse formieren (Page und Kornman 1997).

1.2.6 Diagnostik

Zur Diagnostik werden verschiedene Indizes, wie Parodontaler *Screening* Index, *Bleeding on Probing*, Sulkus-Blutungs-Index, Sondierungstiefe, CAL oder Approximalraum-Plaque-Index erhoben. Der Knochenverlust kann bei bereits vorliegender PA auch radiologisch bestimmt werden (Caton et al. 2018).

1.2.7 Differentialdiagnostik

Differentialdiagnostisch muss die hier beschriebene Form der chronisch-entzündlichen PA gegenüber Biofilm-assoziierten Gingivits, gingivalen Erkrankungen ohne Beteiligung eines Biofilms, nekrotisierenden parodontalen Erkrankungen, PA als Manifestation einer systemischen Erkrankung, systemische Erkrankungen mit Beeinflussung des Parodontiums, parodontalen Abszessen, Paro-Endo-Läsionen, muko-gingivale Deformitäten und Zustände sowie Zahn- und Zahnersatzbezogenen Faktoren abgegrenzt werden (Caton et al. 2018).

1.2.8 Therapie und Prävention

Die Vorbeugung und Behandlung von PA beruht auf einer genauen Diagnose, der Reduzierung oder Beseitigung der Erreger, dem Risikomanagement und der Korrektur der schädlichen Auswirkungen der Krankheit. Der Gesamtplan für die Behandlung der PA umfasst vier Phasen: 1) systemisch, 2) hygienisch, 3) korrigierende und 4) erhaltend.

Die systemische Phase der Parodontalbehandlung umfasst die angemessene Berücksichtigung systemischer Erkrankungen und ihrer Auswirkungen auf die Verursachung oder Behandlung der Krankheit (Pihlstrom 2001; Pihlstrom et al. 2005).

Ziel der Hygienephase ist es, so viele der lokalen Ursachen für eine PA wie möglich zu beseitigen, darunter Biofilm, fehlerhafte Zahnrestorationen und alle anderen Faktoren, die mit parodontalen Entzündungen oder Beschwerden des Patienten verbunden zu sein

scheinen. Es erfolgt die Aufklärung des Patienten über die Erkrankung und eine Unterweisung in häuslicher Mundhygiene. Anschließend wird eine professionelle Zahnreinigung zur Entfernung des supragingivalen Biofilms durchgeführt. Die Hygienephase soll den Patienten in die Lage versetzen eine adäquate Mundhygiene durchführen zu können. Ist der Patient in der Lage eine adäquate Mundhygiene eigenständig zu gewährleisten, wird die Entfernung des subgingivalen Biofilms durchgeführt. Dies kann mit Handinstrumenten oder mit Ultraschallinstrumenten erfolgen (O'Leary 1986; Pihlstrom 2001).

Die korrigierende Phase der Parodontalthherapie umfasst Verfahren, die die Auswirkungen der PA auf das Parodontium und das Kausystem korrigieren sollen. Dazu gehören Anpassung der Okklusion, Herstellung von Okklusionsschutz oder Schienen, kieferorthopädische Behandlung, Implantation und parodontalchirurgische Eingriffe für Débridement, Resektion oder Regeneration (Pihlstrom 2001).

Die unterstützende Parodontalthherapie geht mit einer Biofilm-Kontrolle und einer ständigen Reevaluation des parodontalen Status einher. Eine professionelle Zahnreinigung alle 3 bis 4 Monate ist für die Erhaltung des Parodontiums sinnvoll (Ramfjord 1993).

1.3 Bakterien

1.3.1 *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

Aggregatibacter actinomycetemcomitans ist der parodontale Markerkeim mit der höchsten Pathogenität, der sowohl bei schweren chronischen Formen der PA als auch bei mittelschweren bis leichten Formen der PA anzutreffen ist. Er gilt weiterhin als sogenannter Leitkeim bei juveniler und aggressiver PA. Der gram-negative Erreger kann unter aeroben und anaeroben Bedingungen auch intrazellulär wachsen. Aktuell sind sieben verschiedene Serotypen beschrieben (Slots 1976; Socransky et al. 1998; Nørskov-Lauritsen und Kilian 2006).

Das pathogene Potenzial dieses Bakteriums korreliert mit der Expression von Virulenzfaktoren. Vor allem Leukotoxin A ist in der Lage das Immunsystems zu kompromittieren. Es führt zu Defekten an der Zellmembran von Granulozyten, Makrophagen und Lymphozyten. Dadurch kommt es zur osmotischen Lyse oder der Einleitung der Apoptose. Die Lipid-Phosphatase *Cytolethal Distending Toxin* ruft eine Schwellung der Zellen inklusive des Zellkerns hervor, besitzt eine DNase-Aktivität, führt zu einem Arrest des Zellzyklus und einer Fragmentierung des Chromatins. Insgesamt führt *Cytolethal Distending Toxin* zur Apoptose. Das Fimbriae-assoziierte Protein versetzt das Bakterium in die Lage an

Zahnoberflächen, der EZM oder auch an Epithelzellen zu binden. Außerdem gibt es Virulenzfaktoren, die den Fc-Anteil von Immunglobulin G binden. Dadurch kommt es zu einer Reduktion der Opsonierung und Phagozytose des Immunsystems. Es bildet Immunsuppressionsfaktoren, welche die Antikörperproduktion hemmen und T-Suppressor-Zellen aktivieren. Die Chemotaxis durch neutrophile Granulozyten kann durch niedermolekulare Virulenzfaktoren ebenfalls unterdrückt werden. Die Freisetzung von Kalzium aus der EZM des Knochens durch Lipopolysaccharide verursacht eine Resorption des Knochens. Insgesamt kommt es zu einer erhöhten Interleukin-Ausschüttung, wodurch es zu einem entzündlich bedingten Gewebsabbau kommt. Actinobacillin ist ein Virulenzfaktor, der andere Bakterien unterdrückt, wodurch sich *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* einen Selektionsvorteil verschafft (Socransky et al. 1998; Fives-Taylor et al. 1999; Rylev et al. 2011).

1.3.2 *Eikenella corrodens*

Eikenella corrodens ist ein gram-negativer Erreger, der unter aeroben und anaeroben Bedingungen wachsen kann (Eiken 1958). Das Bakterium gilt als moderat pathogen für das Parodontium und kommt hauptsächlich als Frühbesiedler des Biofilms vor (Socransky et al. 1998). Als opportunistischer Erreger wird es häufig mit anderen bakteriellen Erregern in Verbindung gebracht, die bakterielle Mischinfektionen, wie PA, verursachen. Seine Nachweisrate im Biofilm bei Proben von Patienten mit einer aktiven PA ist höher als bei gesunden Patienten (Chen et al. 1989; Suda et al. 2002).

1.4 Aufgabenstellung

PA ist eine Volkskrankheit, deren Erforschung und regenerativer Therapie sich viele wissenschaftliche Untersuchungen widmen. Die molekularen Mechanismen während der Pathogenese der PA in humanen Zellen des Parodontiums auf Ebene des Proteoms sind dennoch nicht untersucht. Ziel dieser Arbeit war es, eine Proteomanalyse humaner Zellen der Mundhöhle aller Gewebe, die an der Bildung des Parodontiums beteiligt sind, in einzelner Kultur und in Kultur mit den PA-assoziierten Bakterien *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* und *Eikenella corrodens* über 48 Stunden mittels markierungsfreier hochauflösender Massenspektrometrie durchzuführen. Um diesen Versuchsaufbau zu ermöglichen, mussten die entsprechenden Zellen zunächst im Labor etabliert werden. Gingivale Keratinozyten (GK), osteoblastäre Zellen des Alveolarknochens (OZAK), PDL Fibroblasten (PDLF) und Zellen des Zements (ZZ) humanen Ursprungs wurden isoliert, kultiviert und schließlich immortalisiert.

2 Material und Methoden

2.1 Patientenkollektiv

Probenmaterial von PDL, Zement, Alveolarknochen und gingivalem Epithel wurden von Patienten gewonnen, deren Prämolaren oder Weisheitszähne aus kieferorthopädischen Gründen extrahiert werden mussten. Der entsprechende Ethikantrag (27/2/09) wurde durch die Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Georg-August-Universität Göttingen genehmigt und lag zu Beginn der Studie vor. Alle Patienten waren gesunde Nichtraucher und gaben eine schriftliche Einwilligung, konform mit den ethischen Regeln unserer Institution.

Um sicherzustellen, dass die kultivierten Proben vor unseren experimentellen Verfahren nicht unnötig mit Bakterien kontaminiert waren, wurden nur Zähne ohne klinische und radiologische Anzeichen von PA in die Studie eingeschlossen.

Wir erhielten Proben von sechs weiblichen und sechs männlichen Patienten. Ihr Durchschnittsalter zum Zeitpunkt der Zahnextraktion betrug 18 Jahre.

2.2 Generierung der Zellen aus Gewebe

Alle Proben wurden zunächst sorgfältig dreimal für jeweils 1 Minute mit Braunol gewaschen (864219; BBraun). Dies ist erforderlich, um die natürliche Kontamination mit der Mundflora zu eliminieren. Anschließend erfolgten wiederum drei Waschschriffe mit phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS) für jeweils für 1 Minute.

Wenn die Zellen im Verlauf in den Inkubator (C200; Labotect) überführt werden, herrschen standardisierte Kulturbedingungen bei 37 °C, die Luftsättigung mit CO₂ betrug 5 % und die Luftfeuchtigkeit 100 %. Bei Konfluenz der Zellen erfolgt die Passagierung mit 0,05 % Trypsin und 0,02 % EDTA in PBS-Lösung. Das Ablösen der Zellen von der Kunststoffoberfläche der Kulturflasche wurde mikroskopisch überprüft und durch Inkubation bei 37 °C für 3 bis 7 Minuten unter optischer Kontrolle unterstützt. Die Aktivität des Trypsins wurde durch Zugabe von *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) mit GlutaMAX™ (21885-025; Gibco / Thermo Fisher Scientific), mit 10 % *fetal calf serum* (FCS) (10270106; Gibco) gestoppt. Die abgelösten Zellen wurden gesammelt, 10 Minuten bei 300 g abzentrifugiert und anschließend in 1 ml PBS resuspendiert um die Lebendzellzahl zu bestimmen. Die Lebendzellzahl wurde mithilfe einer Zählkammer (Cellometer K2; Nexcelom) bestimmt. Die Kultur kann so weiterentwickelt und

gleichzeitig Untersuchungsmaterial konserviert werden. Generell wurde ab Passage 2 auf den Zusatz von Antibiotika verzichtet.

2.2.1 Gewebeaufbereitung für Zement und PDL

Es wurden verschiedene Möglichkeiten getestet, wie die entsprechenden Zellen am schnellsten aus dem Gewebe gewonnen werden können. Zunächst wurden Kollagenase-Verdau zum Aufschluss des Gewebes durchgeführt. Leider war die Ausbeute an vitalen Zellen nicht ausreichend für die weitere Durchführung der Versuche. Daher entschied man sich für die manuelle Aufbereitung der Proben. Die Proben wurden unter der Lupe (EZ4D; Leica) mit feinen Instrumenten (Mikroinstrumentarium; KLS Martin) sauber präpariert. Es wurde penibel darauf geachtet, dass nur Zement oder PDL weiterverwendet wurde. Die Proben von PDL und Zement wurden in Zellkulturschalen (82.1473.001; Sarstedt) überführt. Als Medium wurde DMEM mit GlutaMAX™ (21885-025; Gibco / Thermo Fisher Scientific), mit 10 % FCS (10270106; Gibco) und 50 µg/ml Gentamycin verwendet. Nach 10 Tagen wurden ausgewachsene PDLF und ZZ geerntet, und 5×10^4 Zellen wurden auf 75 cm² Kultur-Flaschen (83.1811.002; Sarstedt) übertragen.

2.2.2 Verdau des Alveolarknochens

Die Proben des Alveolarknochens wurden mit der Knochenmühle (38-019-01-07; KLS Martin) fein zerkleinert. Der Verdau erfolgt mit 0,5 mg Dispase II (17105041; Gibco) und 1 mg Kollagenase (17018029; Gibco) in 1 ml DMEM für 12 Stunden im Inkubator unter Standard-Kulturbedingungen bei 37 °C, mit einer Luftsättigung von CO₂ bei 5 % und einer Luftfeuchtigkeit von 100 %. Nach Abschluss des Verdaus wurden die Zellen von der gelösten EZM unter Zuhilfenahme eines *Cell Strainer* mit einer Porengröße von 40 µm (352340; Falcon/Thermo Fisher Scientific) befreit. Die OZAK wurden gezählt und 5×10^4 Zellen auf 75 cm² Kultur-Flaschen (83.1811.002; Sarstedt) übertragen.

2.2.3 Separierung des Epithels

Das Epithel der Gingiva muss zunächst vom unterliegenden Bindegewebe getrennt werden. Dies erfolgt durch Aufschluss der Basalmembran. Die Gewebeprobe wird in eine Verdauungslösung mit 1,5 mg Dispase II (17105041; Gibco) in 1 ml DMEM für 12 Stunden im Inkubator unter den zuvor beschriebenen Standard-Bedingungen überführt. Mit mikrochirurgischem Instrumentarium (Mikroinstrumentarium; KLS Martin) unter der Lupe (EZ4D; Leica) kann nun die Epithelschicht vom Bindegewebe unter Sicht getrennt werden. Die Zell-Zell-Verbindungen des Epithels werden dann durch einen zweiten Verdau

mit 0.25 % Trypsin in PBS für 30 Minuten getrennt. Die nun separierten GK können auf verschiedene Arten weiter kultiviert werden. Prinzipiell wird eine Kultur ohne Hilfsmittel Initial nicht empfohlen. Man kann den Epithelzellen eine Art Basalmembran oder eine Kollagenbeschichtung als Grundlage bieten oder man nutzt inaktivierte *feeder cells* (Rheinwald und Green 1975; Tjin et al. 2020). Nach mehrfachen Vorversuchen erwiesen sich die *feeder cells* als Grundlage für die Kultur von GK als effektiv. Die mitotische Inaktivierung der *feeder cells* wird durch 50 µg Mytomyacin C (M0503; Sigma-Aldrich) 1 ml DMEM für 30 Minuten erzielt. Als *feeder cells* wurden gingivale Fibroblasten genutzt, welche bei der Separierung von Epithel und Bindegewebe sowieso als Nebenprodukt angefallen waren. Die *feeder cells* wurden so ausgesät, dass sich je nach verwendeter Größe der Kulturflaschen eine Konfluenz von 80 % nach Adhäsion am Boden ergab. Nun wird kein DMEM-Medium mehr verwendet. Es erfolgt der Wechsel auf *Keratinocyte Growth Medium 2* (C-20011; PromoCell) mit 0.125 ng/ml EGF, 5 µg/ml Insulin, 0.33 µg/ml Hydrocortison, 0.39 µg/ml Epinephrin, 10 µg/ml Transferrin, 0.004 µl/ml *Bovine Pituitary Extrakt* (C-39016; PromoCell) und 0.06 mM CaCl₂ (C-34006; PromoCell). Anschließend werden die GKs auf die so geschaffene Wachstumsgrundlage gebracht. Sobald 5×10^4 GK gewachsen sind, kann auf die *feeder cells* verzichtet werden. Unabhängig von der Größe der Kulturflasche sollten GK immer dicht ausgesät werden. Bewährt hat sich eine Konfluenz von 70 %, um eine zügige Passagierung der Zellen zu erreichen.

2.3 Immortalisierung der Zellen

Um eine leicht zugängliche und reproduzierbare Quelle an Zellen für weitere Untersuchungen *in-vitro* zu generieren, wurden die Zellen via Infektion mit hTERT immortalisiert (Bodnar et al. 1998). Die Immortalisierung hat keine statistisch signifikanten Auswirkungen auf die Genexpression und das Proteinprofil der jeweiligen Zellen.

2.3.1 Virusproduktion

Es wurden 5×10^5 293T-Zellen (ACC635; DSMZ,) in einer 10 cm durchmessenden Petrischale (82.1473.001; Sarstedt) kultiviert. Bei einer Konfluenz von 80 % wurde am folgenden Tag mit dem Versuch begonnen. Es wurden 10 µg des hTERT-Lentivirus Plasmid (Kundenauftrag; Amsbio) mit 10 µg der *packaging plasmid mixture* (LV053; ABM) in 1 ml DMEM gemischt. Außerdem wurden 80 µl Lentifectin (G074; ABM) mit 1 ml DMEM gemischt. Beide Lösungen wurden bei Raumtemperatur für 5 Minuten inkubiert, anschließend gemischt, um die Bildung des Transfektionskomplexes zu ermöglichen. Nach

20 Minuten wurden dem Transfektionskomplex 4,5 ml DMEM hinzugefügt. Der Transfektionskomplex wurde auf die Zellen pipettiert und nach 6 h 0,65 ml hitzeinaktiviertes FCS hinzugefügt. Am nächsten Tag wurde das Medium vorsichtig von den Zellen entnommen und 10 ml DMEM oder *Keratinocyte Growth Medium 2* (C-20011; PromoCell) + 10 % hitzeinaktivierte FCS + 1 % bovines Serumalbumin Fraktion V (BL63-0500; Equitech-Bio) wurden hinzugefügt. Nach 24 Stunden hatten die Zellen eine ausreichende Menge des Virus produziert und der Überstand wurde geerntet, zentrifugiert und filtriert (SLHA033SB; Merck Millipore).

2.3.2 Transfektion

Zunächst wurden $1,8 \times 10^5$ frisch trypsinisierte Zellen in 3 ml des Virusüberstandes mit 30 μ l Protaminsulfat (P3369; Sigma-Aldrich) resuspendiert. Drei Kavitäten einer 24-Well-Platte (83.3922.005; Sarstedt) wurden jeweils mit 1 ml dieser Lösung gefüllt. Nach 6 Stunden wurde 1 ml des entsprechenden Mediums substituiert. Am nächsten Tag wurden das Medium und tote Zellen entfernt. Die adhärenen Zellen wurden einer weiteren Behandlung mit 1 ml des Virusüberstands und 10 μ l Protaminsulfat pro Well über Nacht unterzogen.

2.3.3 Selektion

Die infizierten Zellen wurden in eine 75 cm² Kultur-Flasche (83.1811.002; Sarstedt) mit dem entsprechenden Medium überführt. Durch Zugabe von bis zu 10 μ g Blasticidin pro ml Medium wurden die Zellen schließlich selektiert (Schminke et al. 2015).

2.4 Kultur der Bakterienstämme

Die Bakterienstämme *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* Serotype A (11122; DSMZ) und *Eikenella corrodens* (8340; DSMZ) wurden freundlicherweise vom Institut für medizinische Mikrobiologie der Universitätsmedizin Göttingen zur Verfügung gestellt. Die Bakterienkolonien wurden von einer Agarplatte in einem Erlenmeyerkolben mit 10 ml *Brain Heart Infusion* (BHI)-Bouillon (CM1135; Oxoid / Thermo Fisher Scientific) überführt und 4 Tage bei Raumtemperatur bewegt inkubiert. Um einen ausreichenden Vorrat anzulegen, wurden die Bakterien 10 Minuten bei 300 g zentrifugiert und in Aliquots mit 30 % Glycerin in BHI bei – 80 °C gelagert. Für die Versuche wird jeweils ein Aliquot des Stammes in BHI bei Raumtemperatur resuspendiert.

2.5 Zellkultur mit den Bakterienstämmen

Es wurden jeweils 5×10^4 Zellen von GK, OZAK, PDLF und ZZ in der vierten Passage in 75 cm² Kultur-Flaschen (83.1811.002; Sarstedt) ausgesät und zu einer Konfluenz von 80 % im jeweiligen Medium ohne Zusatz von Antibiotika inkubiert.

Gemäß der entsprechenden Fachliteratur und den Pilotversuchen in unserem Labor wurden die Zellen mit 2×10^6 Bakterienzellen von jedem Stamm infiziert (Meyer et al. 1996). Die Anzahl der Bakterien wurde nach den McFarland-Standards bestimmt (Zapata und Ramirez-Arcos 2015). Nach 48 Stunden wurde das Medium entfernt und die Zellen 3-mal für je 1 Minute sorgfältig mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen abzentrifugiert, um Zellpellets für die Analyse zu generieren.

2.6 Vorbereitung der Proteinproben

Die Zellpellets wurden in *basic lysis buffer*, bestehend aus 25 mM Tris, pH 7,4, 0,9 % NP-40, 150 mM NaCl und Protease-Inhibitoren (11873580001; Roche) resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen fünf Mal mit flüssigem Stickstoff eingefroren und wieder aufgetaut, um sie aufzuschließen. Die Proteinkonzentration wurde mit einem *Pierce BCA Protein Assay Kit* (23225; Thermo Fisher Scientific) und einem Nanodrop 1000 Spektrophotometer (0H517; Thermo Fisher Scientific) bestimmt. Jeweils 50 µg der Proteinproben wurden mit Aceton bei -20 °C für 12 Stunden gefällt.

Es wurden insgesamt acht Proben an die Kollegen der Serviceeinheit übergeben. Einmal Proteinproben von GK, OZAK, PDLF und ZZ in einzelner Kultur sowie von GK, OZAK, PDLF und ZZ in Kultur mit den Bakterienstämmen.

2.7 Proteomics - Massenspektrometrische Analysen

Die massenspektrometrischen Analysen wurden von der Wissenschaftlichen Serviceeinrichtung Proteomanalyse der Universitätsmedizin Göttingen durchgeführt.

2.7.1 Probenvorbereitung

Jeweils 50 µg Protein pro Probe wurden auf ein 4 - 12 %iges NuPAGE Novex Bis-Tris-Minigel (NP0326BOX; Thermo Fisher Scientific) geladen und 1,5 cm in das Gel einlaufen gelassen. Nach Coomassie-Färbung wurden die Proteinbanden ausgeschnitten und zerkleinert. Anschließend wurden die Proteine mit Dithiothreitol reduziert, mit Iodacetamid alkyliert und über Nacht mit Trypsin (Sequencing Grade; Promega) verdaut. Die trypsinierten Peptide wurden aus dem Gel extrahiert und die Lösung in einer *Speedvac*

(Savant SPF111V, Thermo Fisher Scientific) getrocknet. Für weitere Analysen wurden die Proben bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert (Atanassov und Urlaub 2013). Aliquots jeder Probe wurden zu insgesamt $80\text{ }\mu\text{g}$ gepoolt und mit Hilfe einer Umkehrphasen-Spinsäule (*Pierce Reverse Phase Peptide Fractionation Kit*; Thermo Fisher Scientific) in acht Fraktionen getrennt, um eine Peptidbibliothek zu erstellen. Alle Proben wurden zur Kalibrierung der Retentionszeit mit einem synthetischen iRT-Peptidstandard (Biognosys) gespikt.

2.7.2 LC/MS/MS

Die Proteinverdauungen wurden mit einem Nanofluss-Chromatographiesystem (Eksigent nanoLC425) in Kopplung an ein hybrides Quadrupol-Flugzeit-Massenspektrometer (TripleTOF 5600+, Sciex) mit Nanospray III-Ionenquelle (Quellenspannung 2400 V , Interface-Temperatur $150\text{ }^{\circ}\text{C}$, Sheathgas 12) und *Analyst TF 1.7.1 Software Build 1163* analysiert. Die Peptide wurden in Ladepuffer ($2\text{ }\%$ Acetonitril und $0,1\text{ }\%$ Ameisensäure in Wasser) zu einer Konzentration von $0,3\text{ }\mu\text{g}/\mu\text{l}$ aufgenommen. Pro Injektion wurden $1,5\text{ }\mu\text{g}$ Peptide auf einer Vorsäule ($0,18\text{ mm} \times \text{ID } 20\text{ mm}$, Symmetry C18.5 μm ; 186000197; Waters) angereichert und auf einer analytischen RP-C18-Säule ($0,075\text{ mm ID} \times 250\text{ mm HSS T3}$, $1,8\text{ }\mu\text{m}$; 186003539; Waters) unter Verwendung eines 90-minütigen linearen Gradienten von $5 - 35\text{ }\%$ Acetonitril/ $0,1\text{ }\%$ Ameisensäure (v:v) bei einer Flussrate von 300 nl/min getrennt.

Die qualitative Analyse wurde unter Verwendung einer Top25 Methode zur datenabhängigen Analyse (*data-dependent acquisition*, DDA) durchgeführt, mit einem MS-Scan im Bereich m/z 350-1250 über 350 ms bei einer Auflösung von 30.000 FWHM (Full Width Half Maximum) durchgeführt. MS/MS-Scans von m/z 180-1600 wurden für 100 ms aufgenommen bei einer Auflösung von 17.500 FWHM und einer Vorläuferisoliationsweite von $0,7\text{ FWHM}$, resultierend in einer Gesamtzykluszeit von $2,9\text{ s}$. Vorläufer mit einer Mindestintensität von 125 cps und Ladungszuständen $2+$, $3+$ und $4+$ wurden für MS/MS ausgewählt, und im Weiteren für 30 s von der Fragmentierung ausgeschlossen. Die MS/MS-Aktivierung wurde durch CID unter Verwendung von Stickstoff als Kollisionsgas mit linear angepasster Kollisionsenergie durchgeführt. Vier technische Replikate pro Umkehrphasenfraction und ein einzelnes Replikat jeder Zellkultur-Bedingung wurden analysiert, um eine annotierte MS/MS-Spektrenbibliothek zu erstellen.

Für die quantitative SWATH-Analyse wurden MS/MS-Daten unter Verwendung von 65 Fenstern variabler Größe über den Bereich m/z 400-1050 erfasst (Zhang et al. 2015). Die Fragmente wurden unter Verwendung linear angepasster Kollisionsenergie für den

Ladungszustand 2+ erzeugt, und die Fragmente wurden über einen m/z Bereich von 350-1400 für 40 ms pro Segment aufgenommen. Einschließlich eines 100 ms MS-Übersichtsscans führte dies zu einer Gesamtzykluszeit von 2,8 s. Die Daten wurden aus drei wiederholten Injektionen jeder biologischen Probe gewonnen.

2.7.3 Datenverarbeitung und statistische Analysen

Die Proteine wurden mit *ProteinPilot Software Version 5.0 Build 4769* (AB Sciex), mit der Einstellung "gründlich", identifiziert. Insgesamt wurden 689558 MS/MS-Spektren aus den kombinierten qualitativen Analysen gegen die kombinierten UniProtKB Referenzproteome (Revision 12-2018, 105.242 Einträge) von *Homo sapiens*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* und *Eikenella corrodens* durchsucht. Unter Berücksichtigung 52 bekannter gängiger Laborverunreinigungen führte die Analyse zur Identifizierung von 2.408 Proteinen mit einer falschen Entdeckungsrate von 1 %.

Die Erzeugung der Spektralbibliothek und die SWATH-Peak-Extraktion wurden mit der *PeakView-Software Version 2.1 Build 11041* (AB Sciex) unter Verwendung der SWATH-Quantifizierungs-MicroApp Version 2.0 Build 2003 durchgeführt. Nach der Korrektur der Retentionszeit mit dem iRT-Standard wurden die Peakflächen mit Informationen aus der MS/MS-Bibliothek zu einem FDR von 1 % extrahiert, was zu einer Anzahl von 2.000 Proteinen in allen Proben geführt hat (Lambert et al. 2013).

Die Protein-Peakflächen wurden auf Gesamtflächensummen normalisiert, in die Software Perseus v1.5.6.0 importiert und mit einer log₂-Skala transformiert. Eine nicht gerichtete *principal component analysis* (PCA) wurde durchgeführt, um die Reproduzierbarkeit biologischer und technischer Replikate zu untersuchen. Die Protein-Peakflächen der bakteriellen Bedingungen wurden paarweise mit den Standardbedingungen unter Verwendung des Student's t-Tests ($p < 0,05$) und der Benjamini-Hochberg-Korrektur für multiple Tests verglichen (Lambert et al. 2013; Tyanova et al. 2016). Die Ergebnisse der MS-Rohdaten, der Proteinidentifizierung und der Proteinquantifizierung wurden im ProteomeXchange Consortium PRIDE Partner-Repository unter der Datensatz-Kennung PXD013919 hinterlegt (Vizcaino et al. 2014). Es wurde eine *Heatmap* der Proteinquantifizierungen über alle Proben erstellt und ein hierarchisches Clustering für alle Proben auf ihre Proteinexpressionsprofile angewendet. Die Proteinexpression wurde mit *limma* (Version r packageVersion "limma") modelliert (Ritchie et al. 2015). Als Faktoren von der entsprechenden Zelllinie und den beiden Kulturbedingungen gingen in das Modell ein. Die Ergebnisse der ANOVA Tests über alle Gruppen werden zusammen mit den Ergebnissen der

paarweisen Kontrasttests dargestellt. Die meisten differentiellen Proteine aus dem ANOVA-Typ-Test wurden gruppenübergreifend in Boxplots sowie in einer *Heatmap* visualisiert. Für jeden paarweisen Kontrasttest wurden die Ergebnisse in *Volcano plots* und *Heatmaps* der signifikant differentiellen Proteine visualisiert. Die funktionelle Anreicherung gegenüber *Gen Ontology* (GO) Termen und *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* (KEGG) Pfaden wurde mittels Anreicherungs- und Überrepräsentationstests unter Verwendung von *clusterProfiler* (Version 3.14.3) getestet (Yu et al. 2012). Die Ergebnisse der funktionalen Anreicherungstests wurden visualisiert. Beziehungen zwischen Proteinen und angereicherten beziehungsweise überrepräsentierten Termen wurden in *Gene-concept-networks* visualisiert. Beziehungen zwischen angereicherten beziehungsweise überrepräsentierten Termen wurden in *Enrichment-Maps* visualisiert. Die Häufigkeit von Signalwegen oder GO-Terms wurde mithilfe der Gene-Set-Variationsanalyse zusammengefasst (Hänzelmann et al. 2013). Die Gensatz-Variations-Scores wurden über Proben hinweg mit annotierten *Heatmaps* visualisiert. Für GO-Term-Überrepräsentationsanalysen wurden relevante Teile der GO-Ontologie als Baumdiagramme visualisiert und nach Effekt annotiert. Im Falle von signifikant angereicherten Gensätzen werden die top signifikant angereicherten Gensätze in GSEA-Plots visualisiert. Im Falle von signifikant angereicherten oder überrepräsentierten KEGG-Pfaden wurden die top KEGG-Pfade mit Annotation nach Effekt (log fold change) unter Verwendung von *pathview* (Version 1.26.0) visualisiert (Luo und Brouwer 2013). Sowohl die proteinweisen Tests als auch die gensatzweisen Tests wurden mit Benjamini-Hochberg für multiples Testen korrigiert, um die Falschentdeckungsrate zu kontrollieren. Das Signifikanzniveau wurde für alle statistischen Tests auf $\alpha = 5\%$ gesetzt. Alle Analysen wurden mit der Statistiksoftware R (Version 3.6.2; R Core Team 2018) durchgeführt. *ComplexHeatmap* (Version 2.2.0) wurde zur Erstellung der *Heatmaps* verwendet (Gu et al. 2016).

3 Ergebnisse

Die einzelnen Zellen werden im weiteren Verlauf mit einem „+“ für Kultur mit *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* und *Eikenella corrodens* oder einem „-“ für die Kulturbedingung ohne Bakterien markiert.

3.1 Proliferation versus Apoptose

GK, OZAK, PDLF und ZZ in einzelner Kultur und in Kultur mit *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* und *Eikenella corrodens* wurden über 7 Tage inkubiert (Abbildung 2). Die lebenden Zellen wurden täglich ermittelt. GK, OZAK, PDLF und ZZ ohne Kultur mit Bakterien zeigten während des gesamten Zeitraums ein proliferatives Verhalten. GK, OZAK, PDLF und ZZ in Kultur mit *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* und *Eikenella corrodens* führten keine Zellteilungen mehr durch. Die Zellen begannen zwischen 48 und 72 Stunden mit der Einleitung der Apoptose. Daher wurde die Proteomanalyse mittels markierungsfreier hochauflösender Massenspektrometrie nach 48 Stunden durchgeführt. So wurde vermieden, dass die Analyse durch apoptotische Phänomene überlagert wurde.

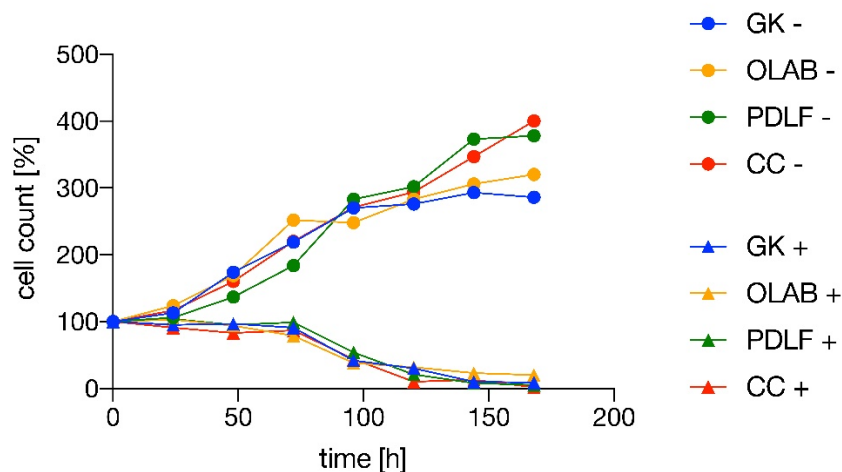


Abbildung 2: Proliferation und Apoptose über 1 Woche. Die Abbildung wurde der englischen Originalpublikation entnommen. OLAB entspricht OZAK und CC entspricht ZZ als deutsche Abkürzungen im Text der Dissertation. „+“ bedeutet Inkubation mit Bakterien. „-“ bedeutet Kultur ohne Bakterien. Die Y-Achse spiegelt die Zellzahl in Prozent wider und die X-Achse die Zeit in Stunden.

Nach 7 Tagen waren die Zellen humanen Parodontiums in Kultur mit den Bakterien alle abgestorben. Die Zellen in einzelner Kultur, ohne Bakterien, hingegen zeigten weiterhin ein proliferatives Verhalten.

Zum Zeitpunkt der Proteomanalyse in Abbildung 3 zeigten GK ektodermalen Ursprungs, sowohl mit als auch ohne bakterielle Reizung eine Kopfsteinpflaster-Morphologie, eine hohe Zelldichte und direkte Zell-Zell-Kontakte. Die Zellen mesodermalen Ursprungs, OZAK, PDLF und ZZ hatten eine Fibroblasten-ähnliche Form. OZAK waren etwas runder als PDLF und ZZ. Im Vergleich zu OZAK und PDLF zeigten ZZ längliche Zellkörper.

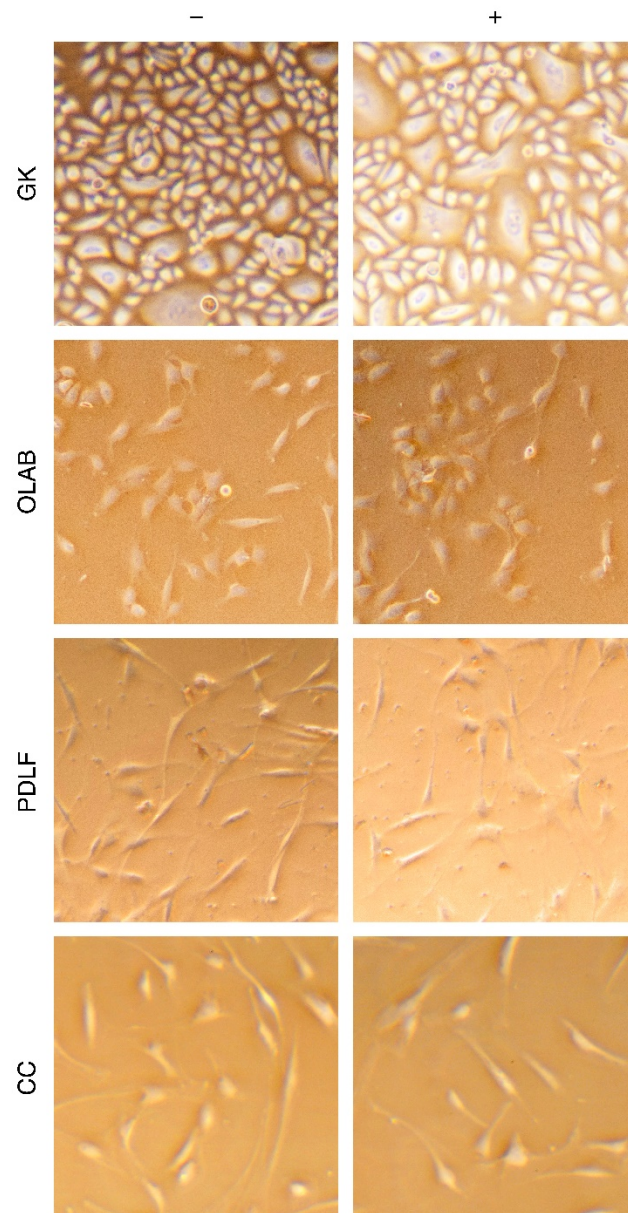


Abbildung 3: Zytologie. Unterschiede der einzelnen Zellen zueinander sowie im Vergleich von einzelner Kultur („-“) und Kultur mit Bakterien („+“). Die Abbildung wurde der englischen Originalpublikation entnommen. OLAB entspricht OZAK und CC entspricht ZZ als deutsche Abkürzungen im Text der Dissertation.

Die Zellen unabhängig von Art der Kultur und ihres Ursprungs waren vital sowie adhären an der Oberfläche der Kulturflaschen zum Zeitpunkt der Proteomanalyse.

3.2 Eine erste Übersicht: PCA, *Heatmap* und *Volcano plots*

Eine erste Übersicht über das Proteom, also die Gesamtheit aller Proteine, Zellen und den Versuchsaufbau ergibt die PCA. Die PCA zeigt Proteinmuster für jeden Zelltyp und für beide Kulturbedingungen.

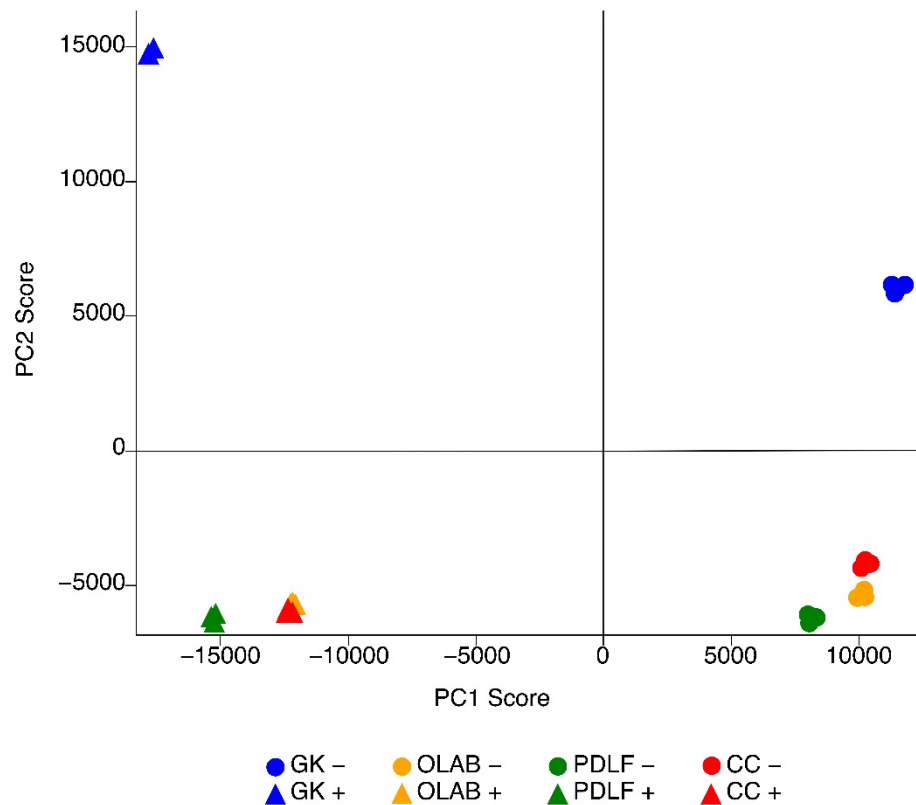


Abbildung 4: PCA. Die Achsen spiegeln die Diversität des Proteoms wider. Die Abbildung wurde der englischen Originalpublikation entnommen. OLAB entspricht OZAK und CC entspricht ZZ als deutsche Abkürzungen im Text der Dissertation. „+“ bedeutet Inkubation mit Bakterien. „-“ bedeutet Kultur ohne Bakterien. Jede Probe wurde in mit 3 technischen Replikaten gemessen

Ohne Bakterien kultiviert, zeigen die OZAK -, PDLF - und ZZ - mesodermalen Ursprungs eine Gruppierung mit ähnlicheren Proteinexpressionsmustern zueinander, die sich von den ektodermalen GK - klar unterscheiden. Diese Gruppierung der Proteinexpressionsmuster zeigt sich ebenfalls bei allen Zellen, die 48 Stunden in Kultur mit Bakterien waren. Man erkennt demnach einen Unterschied von mesodermalen und ektodermalen Zellen sowie einen Unterschied von einzelner Kultur gegenüber Kultur mit den PA-assoziierten Bakterien *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* und *Eikenella corrodens*. Betrachtet man die Resultate weiter im Detail, bringt die *Heatmap* ähnlichen Aufschluss über den Versuchsaufbau wie die PCA. Die *Heatmap* in Abbildung 5 zeigt alle signifikant detektierten Proteine, verteilt über alle Proben in Beziehung zueinander.

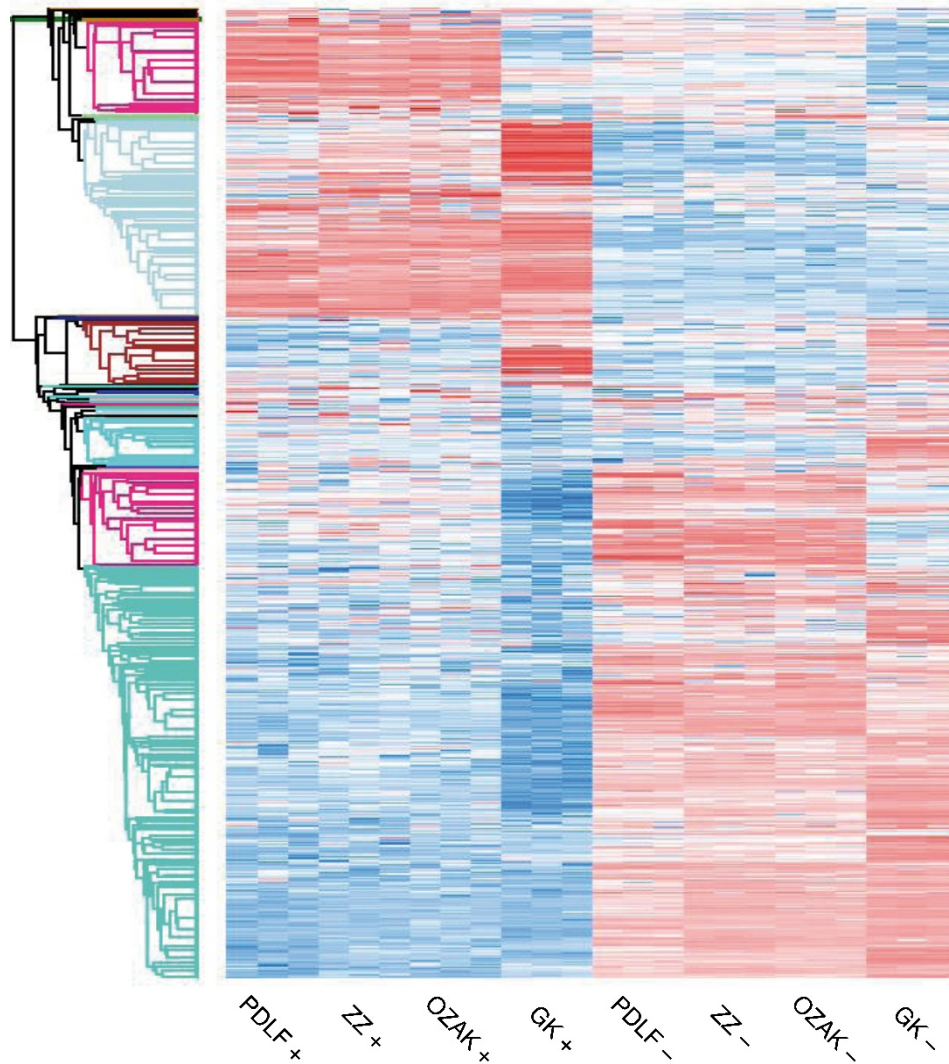


Abbildung 5: *Heatmap*. „+“ bedeutet Inkubation mit Bakterien. „-“ bedeutet Kultur ohne Bakterien. Mit rot markiert sind die Proteine die verstärkt exprimiert werden. Mit blau sind Proteine markiert, die vermindert exprimiert werden. Links sind die Zusammenhänge der einzelnen Proteine verknüpft. Jede Probe wurde mit 3 technischen Replikaten gemessen.

Auch hier erkennt man den Unterschied von einzelner Kultur gegenüber Kultur mit Bakterien. Es zeigen sich Gruppen von verstärkt exprimierten Proteinen (rötlich) gegenüber Proteinen, die vermindert synthetisiert (bläulich) werden. Auch hier erkennt man den in Abbildung 4 zuvor beschriebenen Unterschied im Proteinmuster von mesodermalen Zellen, OZAK, PDLF und ZZ sowie den ektodermalen GK. Außerdem spiegelt sich die Differenz zwischen beiden Kulturbedingungen auch in der *Heatmap* wider.

Die *Volcano plots* in Abbildung 6 verdeutlichen noch einmal die Menge an signifikant veränderten Proteinen pro untersuchter Zellreihe und Kondition.

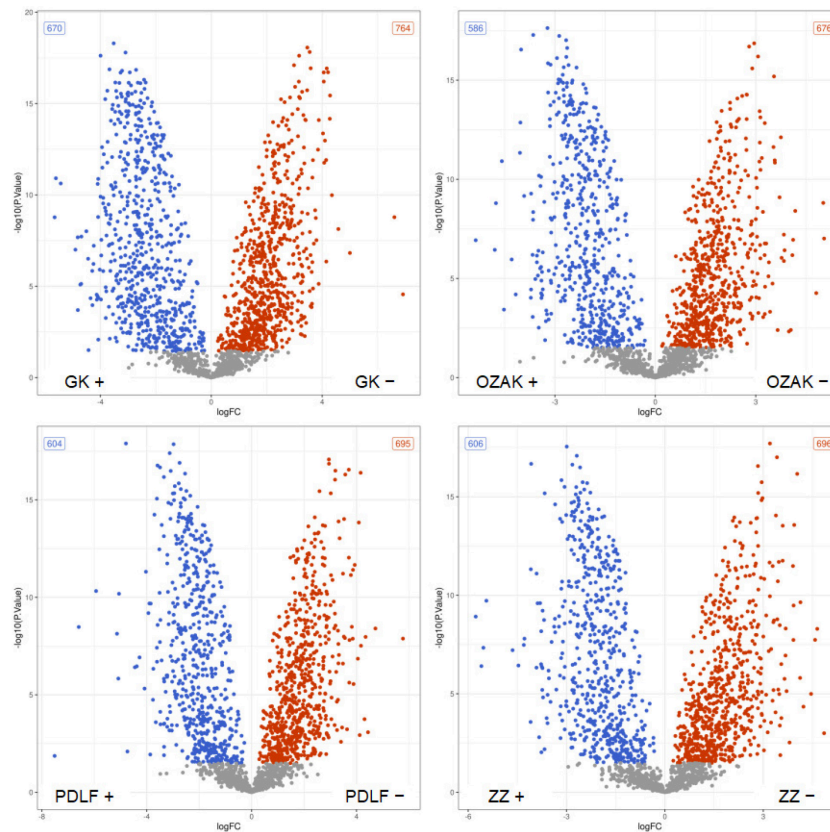


Abbildung 6: Volcano plots der einzelnen Zellen. „+“ bedeutet Inkubation mit Bakterien. „-“ bedeutet Kultur ohne Bakterien. Hier werden die Ergebnisse des Kontrasttests für die differentielle Proteinhäufigkeit beim Vergleich „+“ vs. „-“ veranschaulicht. Die x-Achse zeigt die Effektgröße (als \log_2 fold change), die y-Achse zeigt die Signifikanz (als $-\log_{10}(p \text{ value})$). Jeder Punkt ist ein Protein. Farbige Punkte stellen signifikant differentiell exprimierte Proteine dar.

In den oberen Ecken der Abbildungen sind die jeweiligen Anzahlen an signifikant verstärkt angereicherten Proteinen angegeben. Mit rot sind die Zellen in einzelner Kultur markiert. Die blauen Punkte zeigen Proteine von Zellen in Kultur mit Bakterien. In GK + wurden 670, in GK - 764, in OZAK + 586, in OZAK - 676, in PDLF + 604, in PDLF - 695, in ZZ + 606 und ZZ - 696 vermehrt synthetisierte Proteine identifiziert. Die so identifizierten Proteine wurden weiteren Analysen zugeführt.

3.3 Signalweg-Analysen

Mehr Verständnis über die funktionellen Unterschiede zwischen den Kulturbedingungen der unterschiedlichen Zellen ergeben sogenannte Signalweg-Analysen. Ihnen liegen Datenbanken zugrunde, welche mit den im Experiment generierten Daten gespeist werden. Hier werden exemplarisch die KEGG Signalweganalysen gezeigt.

3.3.1 Top 20 angereicherte Signalwege

Die in Abbildung 7 gezeigten Top 20 angereicherten Signalwege aus der *enrichment analysis* werden nach Signifikanz und Häufigkeit graphisch dargestellt.

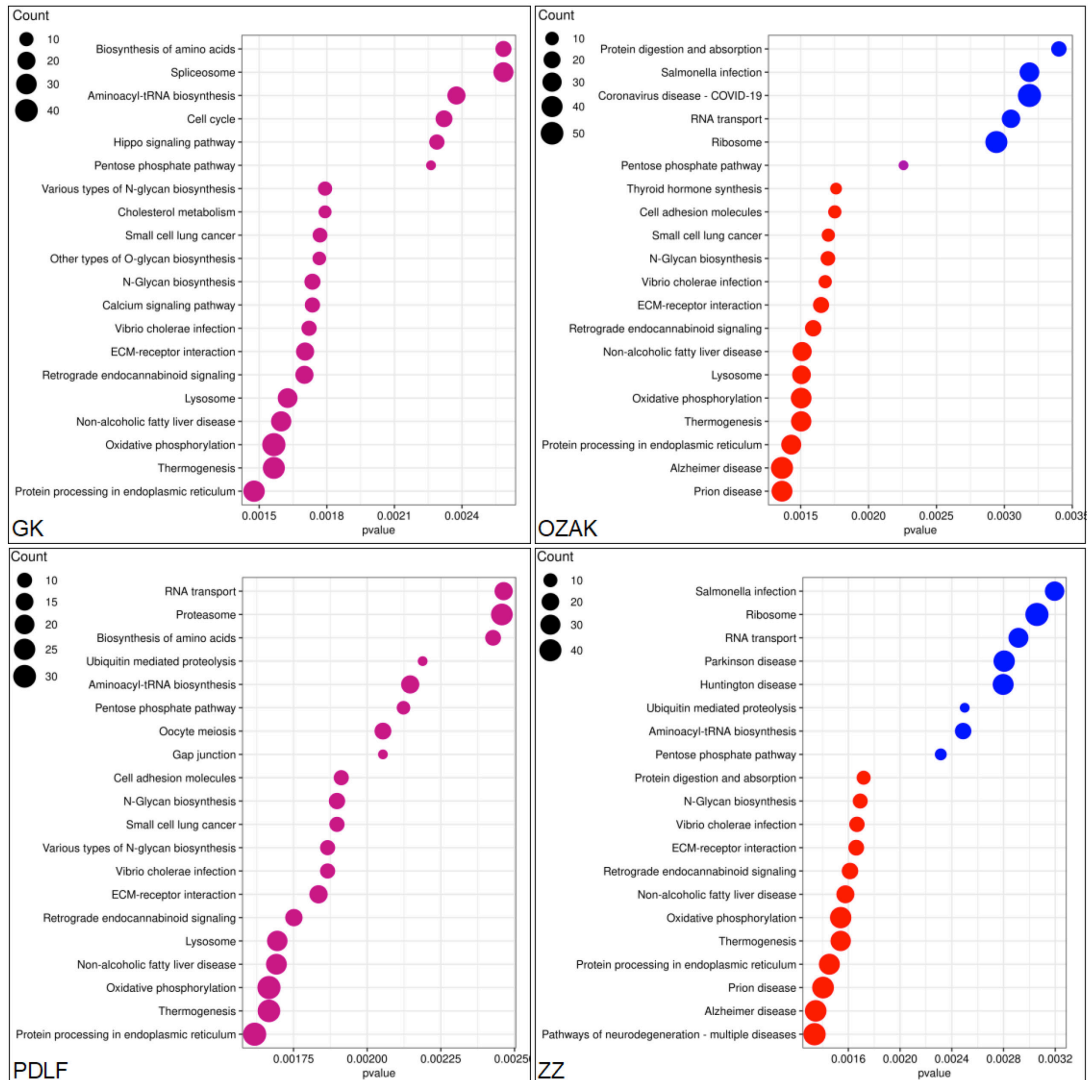


Abbildung 7: Top 20 angereicherte Signalwege. Pfade im Vergleich einzelner Kultur vs. Kultur mit Bakterien. Die Pfade sind nach Signifikanz geordnet (signifikantester angereicherter Pfad ganz unten) und durch den Benjamini-Hochberg-Korrektur-bereinigten p-Wert eingefärbt. Die Größe der Punkte repräsentiert die Größe des Terms. Die Abbildung wurde der englischen Originalpublikation entnommen. Oben links sind die Ergebnisse für GK, oben rechts für OZAK, unten links für PDLF und unten rechts für ZZ dargestellt.

Die erstellten Grafiken in Abbildung 7 beschreiben alle angereicherten Signalwege in den Zellen mit bakterieller Kultur gegenüber den Zellen in einzelner Kultur. So erkennt man, dass in GK während der bakteriellen Kultur die Proteinprozessierung im endoplasmatischen Retikulum als Signalweg am prominentesten vertreten ist. In nun absteigender Reihenfolge finden sich weitere interessante Ergebnisse von Signalwegen wie Thermogenese, oxidative Phosphorylierung, nichtalkoholische Fettlebererkrankung, Lysosom, retrograder Endocannabinoid-Signalweg, EZM-Rezeptor-Interaktionen, Vibrio-Cholera-

Infektionen, Calcium Signalwege, N-Glycan Biosynthese, andere Arten der O-Glykan-Biosynthese, Kleinzelliges Lungenkarzinom, Cholesterin-Stoffwechsel, verschiedene Arten der N-Glykan-Biosynthese, Pentosephosphat-Weg, Hippo-Signalweg, Zellzyklus, Aminoacyl-tRNA-Biosynthese, Spliceosom und Biosynthese von Aminosäuren.

OZAK + zeigt etwas andere Signalwege in der Analyse als GK +. Hier ist vor allem der Signalweg der Prionenerkrankung vertreten. Morbus Alzheimer, Proteinprozessierung im endoplasmatischen Retikulum, Thermogenese, oxidative Phosphorylierung, Lysosom, nichtalkoholische Fettlebererkrankung, retrograder Endocannabinoid-Signalweg, EZM-Rezeptor-Interaktionen, Vibrio-Cholera-Infektionen, N-Glycan Biosynthese, Kleinzelliges Lungenkarzinom, Zelladhäsionsmoleküle, Synthese von Schilddrüsenhormonen, Pentosephosphat-Weg, Ribosom, RNA-Transport, Coronavirus-Erkrankung - COVID-19, Salmonellen-Infektion sowie Proteinverdauung und -absorption folgen in absteigender Reihenfolge.

PDLF + am stärksten repräsentierter Signalweg ist wie bei GK + die Proteinprozessierung im endoplasmatischen Retikulum. Es folgen Thermogenese, oxidative Phosphorylierung, nichtalkoholische Fettlebererkrankung, Lysosom, retrograder Endocannabinoid-Signalweg, EZM-Rezeptor-Interaktionen, Vibrio-Cholera-Infektionen, verschiedene Arten der N-Glycan-Biosynthese, Kleinzelliges Lungenkarzinom, N-Glycan Biosynthese, Zelladhäsionsmoleküle, *Gap junction*, Meiose der Eizelle, Pentosephosphat-Weg, Aminoacyl-tRNA-Biosynthese, Ubiquitin-vermittelte Proteolyse, Biosynthese von Aminosäuren, Proteasom und RNA-Transport in absteigender Reihenfolge.

Im Kontrast zu GK + und PDLF + werden in ZZ + vor allem Signalwege der Neurodegeneration und multiple Krankheiten verstärkt exprimiert. Weiterhin in den Top 20 Signalwegen sind Morbus Alzheimer, Prionenerkrankung, Proteinprozessierung im endoplasmatischen Retikulum, Thermogenese, oxidative Phosphorylierung, nichtalkoholische Fettlebererkrankung, retrograder Endocannabinoid-Signalweg, EZM-Rezeptor-Interaktionen, Vibrio-Cholera-Infektionen, N-Glycan-Biosynthese, Proteinverdauung und -absorption, Pentosephosphat-Weg, Aminoacyl-tRNA-Biosynthese, Ubiquitin-vermittelte Proteolyse, Chorea Huntington, Morbus Parkinson, RNA-Transport, Ribosom und Salmonellen-Infektion in absteigender Reihenfolge präsent.

3.3.2 Gene-concept-network

In Abbildung 8 sind für alle Zellreihen Netzwerke der Top 5 signifikantesten Signalwege und deren assoziierter Proteine dargestellt. Somit werden Verbindungen, Überschneidungen und bzw. Assoziationen untereinander visualisiert.

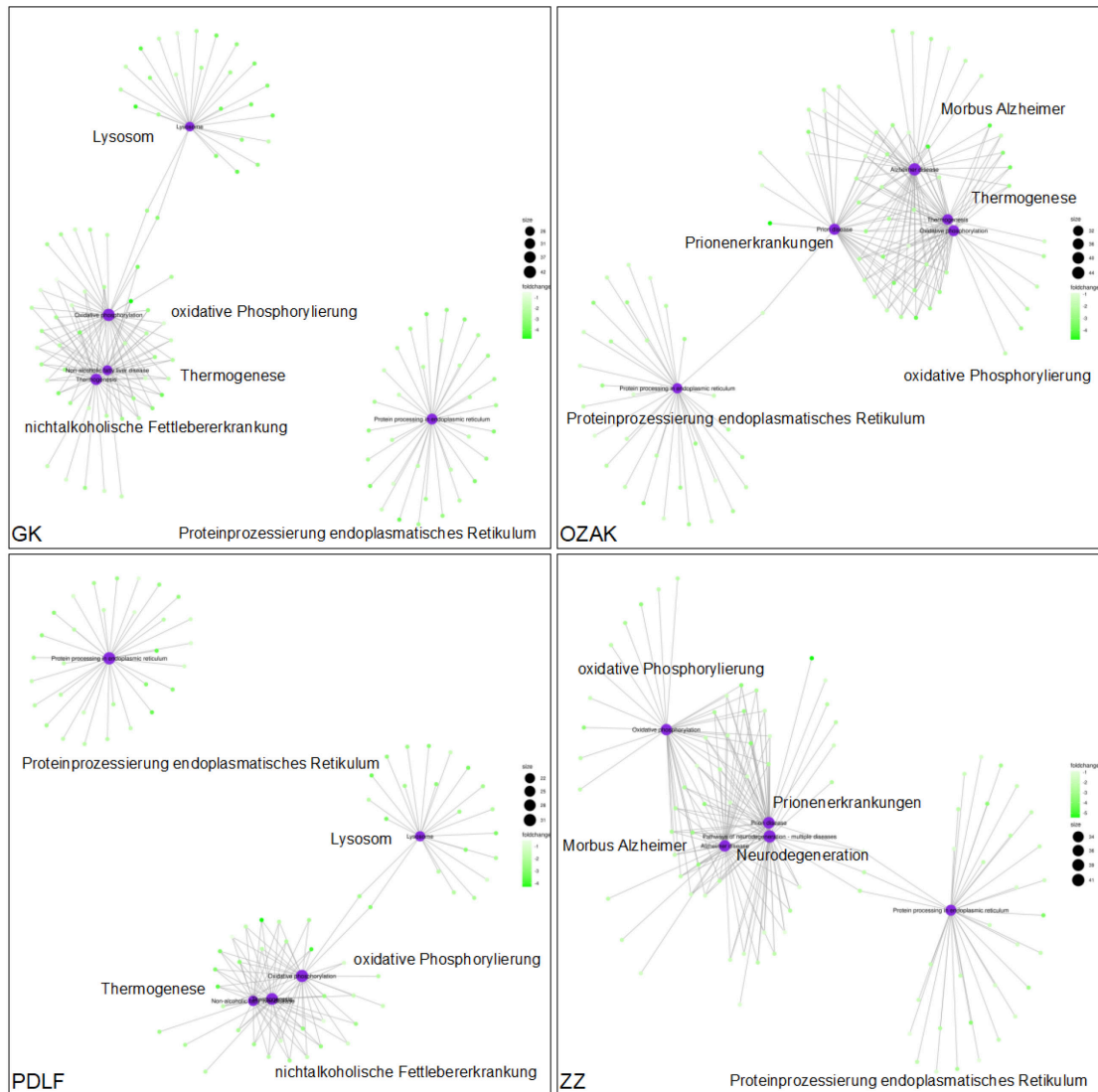


Abbildung 8: Gene-concept-network der Top 5 angereicherten KEGG-Pfade. Gezeigt wird Vergleich von einzelner Kultur vs. Kultur mit Bakterien. Die lila gefärbten Punkte repräsentieren KEGG-Pfade mit Größen entsprechend der Anzahl der signifikant differenziellen Proteine, die mit dem Pfad assoziiert sind. Die kleineren Punkte stellen die signifikant differenziellen Proteine (rot: Hochregulierung, grün: Herunterregulierung) dar, die mit mindestens einem der dargestellten KEGG-Pfade assoziiert sind, wobei deren Assoziationen als Verbindungslinien visualisiert werden.

In Abbildung 8 oben links werden die Ergebnisse für GK dargestellt. Die 5 am stärksten angereicherten Signalwege sind Proteinprozessierung im endoplasmatischen Retikulum, Thermogenese, oxidative Phosphorylierung, nichtalkoholische Fettlebererkrankung und Lysosom. Diese Signalwege sind in GK + signifikant erhöht. In der Darstellung wird deutlich, dass der Signalweg mit der stärksten Expression, Proteinprozessierung im

endoplasmatischen Retikulum, keine weiteren Assoziationen zu den andern Signalwegen aufweist. Thermogenese, oxidative Phosphorylierung sowie nichtalkoholische Fettlebererkrankung zeigen hingegen starke Assoziationen untereinander. Die Signalwege von Lysosom und oxidativer Phosphorylierung sind über zwei gefunden Proteine miteinander gering assoziiert.

Für OZAK werden in Abbildung 8 oben rechts die entsprechenden Signalwege dargestellt. OAZK + weist signifikante Veränderungen auf. Hier stellen Prionenerkrankung, Morbus Alzheimer, Proteinprozessierung im endoplasmatischen Retikulum, Thermogenese und oxidative Phosphorylierung die Top 5 dar. Es gibt, wie zuvor ähnlich für GK – gezeigt, nur eine Verbindung für die Proteinprozessierung im endoplasmatischen Retikulum zu Prionenerkrankung. Einen Komplex mit diversen Assoziationen untereinander stellen Prionenerkrankung, Morbus Alzheimer, Thermogenese und oxidative Phosphorylierung dar.

Unten links in der Abbildung 8 sind die Ergebnisse PDLF summiert. Die stärksten Proteinlevel wurden in PDLF + für die Signalwege von Proteinprozessierung im endoplasmatischen Retikulum, Thermogenese, oxidative Phosphorylierung, nichtalkoholische Fettlebererkrankung und Lysosom. Die Ergebnisse sind vergleichbar mit den Resultaten für GK +.

Für ZZ werden die Ergebnisse in Abbildung 8 unten rechts dargestellt. Die signifikanten Abweichungen ergaben sich für ZZ + in den Signalwegen Neurodegeneration, Morbus Alzheimer, Prionenerkrankung, Proteinprozessierung im endoplasmatischen Retikulum und oxidative Phosphorylierung. Ähnlich wie zuvor beschrieben gibt es einen Komplex aus den Signalwegen Neurodegeneration, Morbus Alzheimer, Prionenerkrankung, und oxidative Phosphorylierung mit verschiedensten assoziierten Protein-Verbindungen untereinander. Die Proteinprozessierung im endoplasmatischen Retikulum überschneidet sich mit drei Verbindungen in den Komplex und steht somit wieder etwas gesondert dar.

3.4 Immunantwort, Zell-Interaktionen & EZM

Zum Verständnis des Experimentes bzw. dem Nachweis einer immunogenen Reaktion der Zellen in bakterieller Kultur wurden, die signifikant veränderten Bestandteile der Immunsystems separat betrachtet. Weiterhin erfolgt eine Charakterisierung der Zellen über Zell-Interaktionen und deren produzierte EZM. Analog dazu werden die Veränderung von Zell-Interaktionen und die EZM während der bakteriellen Kultur betrachtet.

3.4.1 Gingivale Keratinozyten

Bei GK + ergeben sich geringere Proteinlevel für *Interleukin-1 receptor antagonist protein*, *Macrophage migration inhibitory factor*, *Programmed cell death protein 4* sowie verstärkte Proteinmengen für *Neutrophil gelatinase-associated lipocalin* und *Prostaglandin G/H synthase 1*. Die Anpassungen dieser Proteine, links in Abbildung 9, während der bakteriellen Kultur resultieren insgesamt in einer vermehrten Immunantwort.

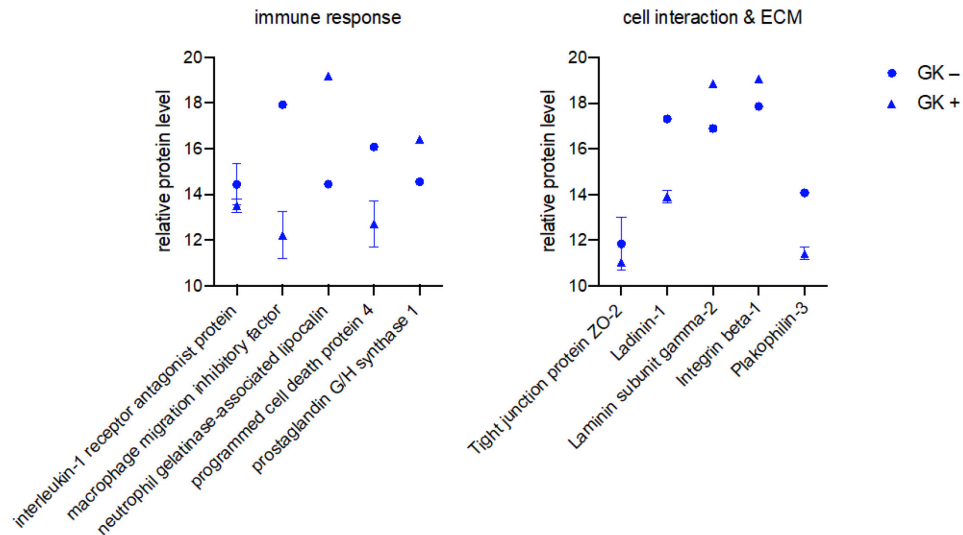


Abbildung 9: Protein-Expression von Bestandteilen des Immunsystems (links) sowie von Zell-Interaktionsproteinen und Bestandteilen der EZM (rechts) gemessen bei GK. Wie zuvor sind die GK in einzelner Kultur mit GK – (blaue Punkte) und die GK in bakterieller Kultur mit GK + (blaue Dreiecke) beschriftet. Die Protein-Peakflächen wurden mit einer log₂-Skala transformiert und die bakteriellen Bedingungen paarweise mit den Standardbedingungen unter Verwendung des Student's t-Tests ($p < 0,05$) und der Benjamini-Hochberg-Korrektur für multiple Tests verglichen. Die Abbildung wurde der englischen Originalpublikation entnommen. „relative protein level“ bedeutet relative Proteinmenge; „immune response“ bedeutet Immunantwort; „cell interaction & ECM“ bedeutet Zell-Interaktion & EZM als deutsche Abkürzungen im Text der Dissertation.

Auf der rechten Seite von Abbildung 9 werden die Veränderungen der Zell-Interaktionen und der EZM dargestellt. GK + weist im Vergleich zu GK – Reduktionen von *Tight junction protein ZO-2*, *Laminin-1* und *Plakophilin-3* auf, resultierend in einer gestörten direkten Zellinteraktion. *Laminin subunit gamma-2* und *Integrin beta-1* als Bestandteil bzw. Verbindung zur Basalmembran werden hingegen vermehrt in GK + und weniger in GK – gebildet.

Das spezifische Expressionsprofil für die Keratine in GK wird gesondert aufgrund der besseren Übersicht in Abbildung 10 dargestellt. GK synthetisieren Keratin 1, 2, 5, 6A, 6B, 8, 9, 10, 13, 14, 16 und 18. Während der Kultur mit den PA assoziierten Erregern *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* und *Eikenella corrodens* werden alle zuvor beschriebenen Keratine vermindert von GK + im Vergleich mit GK – synthetisiert.

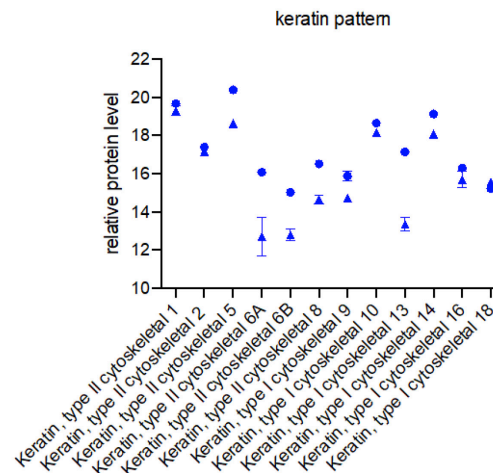


Abbildung 10: Spezifische Expression von Keratinen in GK. Wie zuvor sind die GKs in einzelner Kultur mit GK – (blaue Punkte) und die GKs in bakterieller Kultur mit GK + (blaue Dreiecke) beschriftet. Die Abbildung wurde der englischen Originalpublikation entnommen. „relative protein level“ bedeutet relative Proteinmenge; „keratin pattern“ bedeutet Keratin-Muster als deutsche Abkürzungen im Text der Dissertation.

Eine Ausnahme stellt Keratin 18 dar, welches als einziges Keratin während der Kultur mit Bakterien in GK + vermehrt synthetisiert wurde.

3.4.2 Osteoblastäre Zellen des Alveolarknochens

Während der Kultur mit Bakterien zeigt OZAK + im Vergleich zu OZAK – eine Reduktion von *Leukocyte elastase inhibitor*, *Macrophage migration inhibitory factor* und *Prostaglandin reductase 1* sowie eine verstärkte Synthese von Nectin-2 und Prostaglandin G/H Synthase 1.

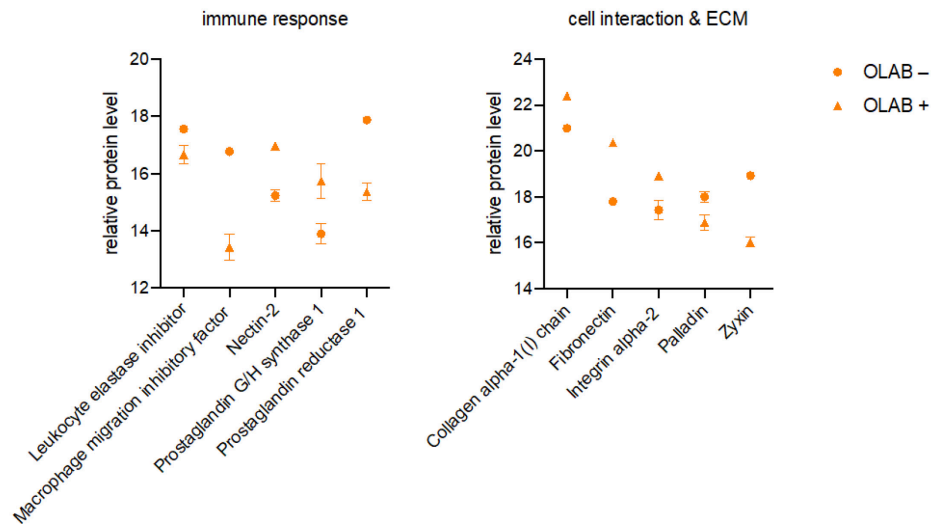


Abbildung 11: Protein-Expression von Bestandteilen des Immunsystems (links) sowie von Zell-Interaktionsproteinen und Bestandteilen der EZM (rechts) gemessen bei OZAK. Wie zuvor sind die OZAK in einzelner Kultur mit OZAK – (gelbe Punkte) und die OZAK in bakterieller Kultur mit OZAK + (gelbe Dreiecke) beschriftet. Die Abbildung wurde der englischen Originalpublikation entnommen. „relative protein level“ bedeutet relative Proteinmenge; „immune response“ bedeutet Immunantwort; „cell interaction & ECM“ bedeutet Zell-Interaktion & EZM als deutsche Abkürzungen im Text der Dissertation.

Diese Ergebnisse in Abbildung 11 resultieren, wie zuvor für GK in Abbildung 10 beschrieben, in einer vermehrten Immunantwort. Die Veränderungen im Bereich von Zell-Interaktion und der EZM, rechts in Abbildung 11 dargestellt, zeigen für OZAK + eine Erhöhung von *Collagen alpha-1(I) chain*, Fibronectin und Integrin alpha-2 sowie eine verminderte Produktion von Palladin und Zyxin im Vergleich zu OZAK.

3.4.3 Fibroblasten aus dem parodontalen Ligament

Wie schon zuvor für GK und OZAK beschrieben, gibt es vermehrte und verminderte Mengen an immun-modulierenden Proteinen für PDLF, dargestellt in Abbildung 12. Es zeigt sich eine verstärkte Synthese von *CD 166 antigen*, *Complement component C9* und *Leukocyte elastase inhibitor* in PDLF +. Verminderte Level an Protein werden für *Macrophage migration inhibitory factor* und für *Prostaglandin reductase 1* in PDLF + gemessen. Auch hier erfolgt eine verstärkende Modulation der Immunantwort für PDLF +.

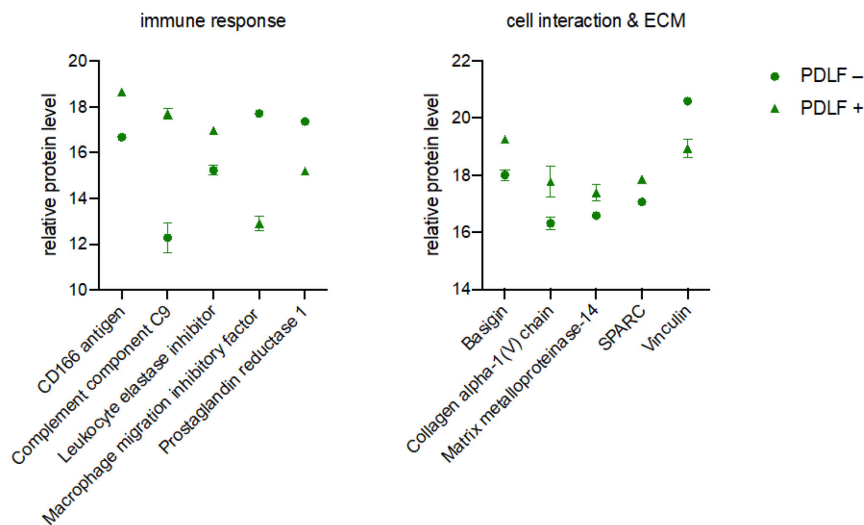


Abbildung 12: Protein-Expression von Bestandteilen des Immunsystems (links) sowie von Zell-Interaktionsproteinen und Bestandteilen der EZM (rechts) gemessen bei PDLF. Wie zuvor sind die PDLF in einzelner Kultur mit PDLF – (grüne Punkte) und die PDLF in bakterieller Kultur mit PDLF + (grüne Dreiecke) beschriftet. Die Abbildung wurde der englischen Originalpublikation entnommen. „relative protein level“ bedeutet relative Proteinmenge; „immune response“ bedeutet Immunantwort; „cell interaction & ECM“ bedeutet Zell-Interaktion & EZM.

Auf Ebene von Zellinteraktion und EZM ergeben sich verstärkte Proteinmengen in PDLF + für Basigin, *Collagen alpha-1(V) chain*, Matrix metalloproteinase-14 und SPARC sowie ein vermindertes Level für Vinculin im Vergleich zu PDLF –. Hier bewirkt die bakterielle Kultur eine Umstrukturierung der Zellinteraktion und EZM in PDLF +.

3.4.4 Zellen des Zements

Auch für ZZ ergeben sich teilweise Überschneidungen mit den zuvor beschriebenen Zellen, dargestellt in Abbildung 13. Die Synthese für CD166 antigen, CD276 antigen und *Leukocyte elastase inhibitor* ist in verstärkt ZZ + im Vergleich zu ZZ -. Eine Verminderung der Proteinlevel zeigt sich hingegen für *Macrophage migration inhibitory factor* und Prostaglandin G/H synthase 1 in ZZ +. Diese Modulation der Proteinlevel resultiert wie schon bei GK, OZAK und PDLF in einer Verstärkung der Immunantwort.

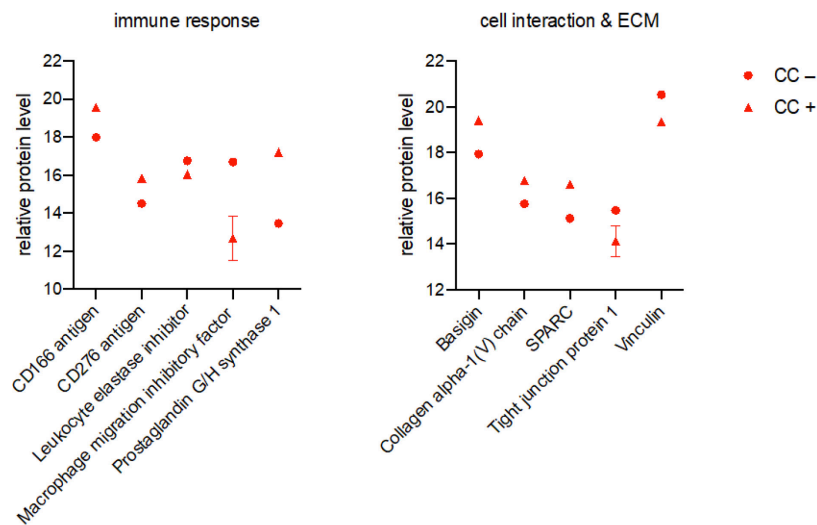


Abbildung 13: Protein-Expression von Bestandteilen des Immunsystems (links) sowie von Zell-Interaktionsproteinen und Bestandteilen der EZM (rechts) gemessen bei ZZ. Wie zuvor sind die ZZ in einzelner Kultur mit ZZ - (rote Punkte) und die ZZ in bakterieller Kultur mit ZZ + (rote Dreiecke) beschriftet. Die Abbildung wurde der englischen Originalpublikation entnommen. „relative protein level“ bedeutet relative Proteinmenge; „immune response“ bedeutet Immunantwort; „cell interaction & ECM“ bedeutet Zell-Interaktion & EZM.

Veränderungen des Proteoms im Bereich von Zell-Interaktion und EZM zeigen sich vor allem in einer vermehrten Synthese von Basigin, *Collagen alpha-1(V) chain* und SPARC sowie einer verminderten Synthese von *Tight junction protein 1* und Viculin in ZZ+. Die bakteriellen Erreger verursachen auch hier einen Umbau mit Tendenz zu einer Degeneration bei ZZ+.

3.5 Nicht nur Unterschiede: Ähnliche Veränderungen im Proteom der Zellreihen während der Kultur mit den Bakterien.

Zuvor wurden hauptsächlich Unterschiede der einzelnen Zellreihen während der Kultur mit *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* und *Eikenella corrodens* betrachtet. Um mögliche therapeutische Ansätze zu generieren, sollten eben auch Gemeinsamkeiten der unterschiedlichen Zellen betrachtet werden, so kann ein potenzieller therapeutischer Kandidat identifiziert und weiter untersucht werden. Die Abbildungen 14 und 15, zur besseren Übersicht geteilt, demonstrieren die 12 am stärksten differentiell exprimierten Proteine. Oben links in Abbildung 14 erkennt man die eine Erhöhung der Proteinmenge für *Collagen alpha-1 (XII) chain* in GK +, OZAK +, PDLF + und ZZ + im Vergleich zu den korrespondierenden Zellreihen in einzelner Kultur ohne Bakterien. Eine ähnliche Erhöhung der Proteinmenge zeigt sich für *Cytoskeleton-associated protein 4* (oben rechts in Abbildung 14) und für Peptidylprolyl isomerase (unten links in Abbildung 14) in den Zellen in bakterieller Kultur.

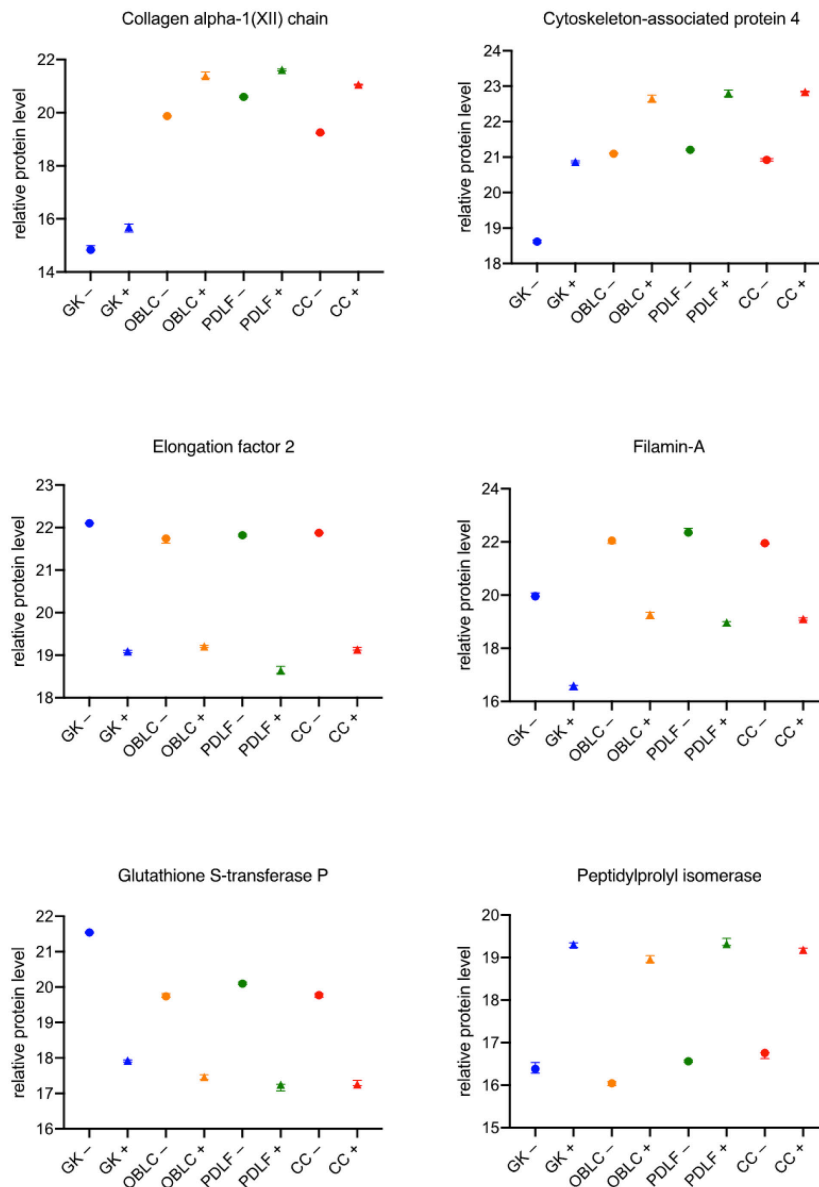


Abbildung 14: Übereinstimmungen im Verhalten der einzelnen Zellen während der Kultur mit Bakterien Teil 1. Die Protein-Peakflächen wurden mit einer log₂-Skala transformiert und die bakteriellen Bedingungen wurden paarweise mit den Standardbedingungen unter Verwendung des Student's t-Tests ($p < 0,05$) und der Benjamini-Hochberg-Korrektur für multiple Tests verglichen. Die Abbildung wurde der englischen Originalpublikation entnommen. „relative protein level“ bedeutet relative Proteinmenge. OLAB entspricht OZAK und CC entspricht ZZ als deutsche Abkürzungen im Text der Dissertation. „+“ bedeutet Inkubation mit Bakterien. „-“ bedeutet Kultur ohne Bakterien.

Eine Reduktion der Proteinlevel in GK⁺, OZAK⁺, PDLF⁺ und ZZ⁺ im Vergleich zu GK⁻, OZAK⁻, PDLF⁻ und ZZ⁻ konnte für *Elongation factor 2* (mittig links in Abbildung 14), Filamin-A (mittig rechts in Abbildung 14) und *Glutathione S-transferase P* (unten links in Abbildung 14) gemessen werden.

In Abbildung 15 werden die Ergebnisse von Abbildung 14, wie zuvor erwähnt, fortgesetzt.

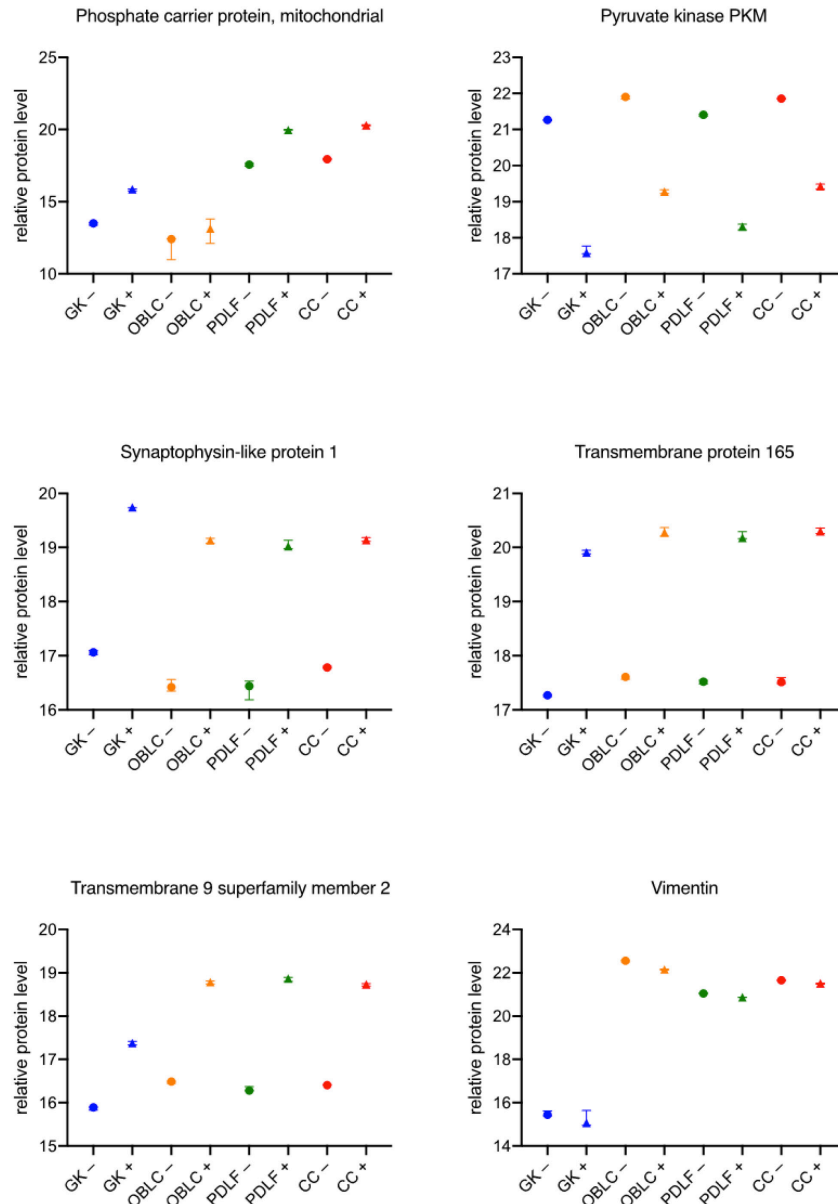


Abbildung 15: Übereinstimmungen im Verhalten der einzelnen Zellen während der Kultur mit Bakterien Teil 2. Die Protein-Peakflächen wurden mit einer log₂-Skala transformiert und die bakteriellen Bedingungen wurden paarweise mit den Standardbedingungen unter Verwendung des Student's t-Tests ($p < 0,05$) und der Benjamini-Hochberg-Korrektur für multiple Tests verglichen. Die Abbildung wurde der englischen Originalpublikation entnommen. „relative protein level“ bedeutet relative Proteinmenge. OLAB entspricht OZAK und CC entspricht ZZ als deutsche Abkürzungen im Text der Dissertation. „+“ bedeutet Inkubation mit Bakterien. „-“ bedeutet Kultur ohne Bakterien.

Während der Kultur mit den PA assoziierten Bakterien *Aggregatibacter actinomycetem-comitans* und *Eikenella corrodens* ergibt sich eine Erhöhung der relativen Proteinmengen in GK⁺, OZAK⁺, PDLF⁺ und ZZ⁺ für *Phosphate carrier protein mitochondrial*, *Synaptophysin-like protein 1*, *Transmembrane protein 165* und *Transmembrane 9 superfamily member 2*. Für *Pyruvate kinase PKM* und *Vimentin* hingegen werden verminderte

relative Proteinlevel in GK +, OZAK +, PDLF + und ZZ + im Vergleich zu GK –, OZAK –, PDLF – und ZZ – gemessen.

4 Diskussion

Ein wesentlicher Bestandteil dieser Dissertation stellte die Etablierung humaner oraler Zellen des Parodontiums aus der befestigten Gingiva, dem Alveolarknochen, dem PDL und dem Zement dar. Die verwendeten Zellen sind ein wissenschaftliches Alleinstellungsmerkmal. Heutzutage ergeben sich verschiedene Möglichkeiten, auf Ebene von Genom und Proteom umfassende Analysen zur Charakterisierung von Zellreihen zu gewährleisten. *RNA Microarrays* wurden lange als Routine-*Screening* verwendet, obwohl nachteilig posttranskriptionelle Modifizierungen der mRNA nicht erfasst werden können. Die *RNA*-Sequenzierung stellt die sinnvolle Weiterentwicklung im Bereich der *RNA*-Analysen dar (Mardis 2008). Um funktionelle Beschreibungen der Zellen zu ermöglichen, stellen Proteinanalysen jedoch das Mittel der Wahl dar. Die Proteomanalyse mittels markierungsfreier hochauflösender Massenspektrometrie scheint die vielversprechendste Methode zu sein (Atanassov und Urlaub 2013; Dihazi et al. 2018). Vor allem die Möglichkeiten der modernen Datenanalyse sind schier grenzenlos. Mittlerweile sind nicht nur die statistische Auswertung, sondern eben auch das Erkennen von funktionellen Zusammenhängen in einem Stoffwechsel als methodischer Standard etabliert (Huang et al. 2009; Yu et al. 2012).

Weiterhin gibt diese Arbeit Aufschluss über das Verhalten der generierten humanen Zellen des Parodontiums unter PA-ähnlichen Bedingungen *in vitro*. In der Literatur existieren verschiedenste Methoden und Modelle zur Induzierung einer PA. *In vivo* sind mehrheitlich PA-Modelle in Maus und Ratte publiziert. Meist wird die PA durch Legen einer Ligatur um den Zahn oder durch orale Gabe verschiedener parodontopathogener Keime induziert (Oz und Puleo 2011). Für *in vitro* Untersuchungen stehen oft sogenannte Biofilm-Modelle mit unterschiedlichen Bakterien zur Verfügung, welche meist an einer Zellreihe getestet werden (Weinreb und Nemcovsky 2015; Faveri et al. 2020).

Das Merkmal dieser Arbeit ist zum einem die Untersuchung aller Zellreihen des humanen Parodontiums, GK, OZAK, PDLF und ZZ sowie deren Verhalten in Kultur mit den PA assoziierten Keimen *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* und *Eikenella corrodens* (Socransky et al. 1998; Fives-Taylor et al. 1999).

4.1 Die Proteome von Zellen aus der mesodermalen Linie unterscheiden sich von gingivalen Keratinozyten aus der ektodermalen Linie

OZAK, PDLF und ZZ zeigen in der *PCA* und in der *Heatmap* zwar spezifische, aber einander ähnliche Proteinmuster auf. Vergleichbare Ergebnisse für spezifische Gensignaturen und Signalwege konnten in mesodermalen Zellen und ihren Derivaten, die embryonalen Stammzellen entstammen, gezeigt werden (Doss et al. 2012). Bemerkenswerterweise zeigten sich nach bakterieller Irritation durch Kultur mit *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* und *Eikenella corrodens* analoge Proteinmuster der untersuchten Zellen der mesodermalen Linie (Weinreb und Nemcovsky 2015). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die bakterielle Irritation verschiedener mesodermaler Zellen zu ähnlichen metabolischen Reaktionen führt, obwohl rein morphologisch keine Veränderungen visualisierbar waren.

Wie erwartet wurden große Unterschiede im Proteinmuster von GK aus der ektodermalen Linie im Vergleich zur Gruppe bestehend aus OZAK, PDLF und ZZ mit mesodermalem Ursprung beobachtet. Das Proteinmuster von GK ist nach bakterieller Irritation signifikant verändert, aber mit verbleibender Differenz zu Zellen der mesodermalen Linie. In einem *Multi-omics profiling* Experiment konnten ähnliche Erkenntnisse bezüglich der Unterschiede von ektodermalen und mesodermalen Zellen beschrieben werden (Argelaguet et al. 2019).

4.2 Integrative Datenbank-Analysen

Die Interpretation von statistisch relevanten Veränderungen im Proteom von GK⁻, OZAK⁻, PDLF⁻ und ZZ⁻ gegenüber von GK⁺, OZAK⁺, PDLF⁺ und ZZ⁺ mit bakterieller Kultur über Datenbanken kann auf verschiedene Arten erfolgen. Nach Analyse und Fokussierung auf die signifikanten Proteine, dargestellt in den *Volcano plots*, folgt die Übertragung auf die jeweilige Datenbank. Durch die Nutzung der KEGG-Datenbank wurden Signalwege über Erkrankungen, dominante Zellkompartimente oder signifikante Prozesse in der Zelle erkannt. Alternativ hätte die GO-Wissensdatenbank verwenden können. Hier wurden die Daten einer *Enrichment Analysis* zugeführt, wobei diese als äquivalent zur *Overrepresentation Analysis* gesehen werden muss. Somit kommen schon bei der Auswahl der entsprechenden *Tools* mögliche Variablen auf (Huang et al. 2009; Yu et al. 2012).

Es zeigt sich zum Beispiel die Proteinprozessierung im endoplasmatischen Retikulum sehr präsent, sogar über alle Zellreihen hinweg. Ein bekanntes Phänomen während entzündlicher Prozesse (Zhang und Kaufman 2008) mit der entsprechenden Immunantwort, wie sie auch hier gezeigt wird. Als weiterer dominanter Schwerpunkt sind die EZM-Interaktionen ebenfalls in die Regulation der Immunantwort involviert (Korpos et al. 2009). So ergeben manche der dominanten Signalwege sinnhafte Schlussfolgerungen und manche führen scheinbar ohne jeglichen Zusammenhang zum Experiment ins Leere. Ähnliche Aufschlüsse können auch aus den sogenannten *Gene concept networks* abgeleitet werden. Sie dienen vor allem dazu, Überschneidungen mit den verschiedenen Signalwegen zu visualisieren.

Ob die Daten aus den integrativen Analysen für das Verständnis des Experiments ausreichen, sollte jeder Wissenschaftler im Zusammenhang mit den erwarteten Ergebnissen und passend zur eigentlichen Fragestellung klären. Meist scheint die Kombination aus integrativen Analysen und die manuelle Recherche passend zur Fragestellung zielführend zu sein. Weiterhin folgen in den meisten Publikationen aufbauende Experimente, um die Daten zu bestätigen und zu vertiefen.

4.3 Keratine werden durch *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* und *Eikenella corrodens* in gingivalen Keratinozyten reguliert

Keratinozyten weisen ein charakteristisches Profil an Keratinen auf. Keratine sind für den Aufbau des *Stratum corneum*, einer mechanischen Barriere, verantwortlich. Die Keratinschicht bietet Schutz gegen physikalische Irritation, wie bei der Mastikation, oder gegen chemische Reize (Murphrey et al. 2020). Orale Keratinozyten exprimieren in Zellkultur die Keratine 5, 6, 7, 8, 13, 14, 16, 17, 18 und 19 (Lindberg und Rheinwald 1990). Zusätzlich konnte in GK die Expression der Keratine 1, 2 und 10 gezeigt und das Expressionsprofil somit erweitert werden. In Übereinstimmung mit den hier gezeigten Ergebnissen weisen massenspektrometrische Proteom-Analysen von humanem *Sulkusfluid* die Keratine 1, 2, 3, 9 und 10 (Huynh et al. 2015) nach. Eine mehrheitliche Abnahme der Keratinlevel bei bakterieller Irritation wird im Experiment deutlich erkennbar, was mit einer beeinträchtigten mechanischen Barriere vereinbar ist. Keratin 18 steigt als einziges Keratin während der Kultur mit den PA-assoziierten Erregern an. Eine solche Erhöhung von Keratin 18 wurde bereits bei kolorektalen Karzinomen gezeigt (Sirniö et al. 2020). Interessanterweise wurden außerdem Anstiege der Keratine 1, 10 und 14 nach Kultivierung

mit ausschließlich *Porphyromonas gingivalis* (Li et al. 2013) gemessen. Insgesamt scheint die Rolle der Keratine komplexer zu sein als die reine Barrierefunktion in entzündlichen oder neoplastischen Prozessen. Somit bleibt abzuwarten, wie die Rolle der Keratine sich im Verlauf weiterer Untersuchungen entwickelt.

4.4 *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* und *Eikenella corrodens* modulieren eine Immunantwort in allen Zellen, die an der Bildung des Parodontiums beteiligt sind

In den gezeigten Ergebnissen ergeben sich bisher unbeschriebene Hinweise auf eine Immunaktivierung in allen untersuchten humanen oralen Zellen des Parodontiums nach bakterieller Reizung durch *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* und *Eikenella corrodens*, die auf eine Entzündung hinweisen.

Anzeichen für eine verstärkte Aktivierung des Immunsystems in GK fanden sich in hochregulierten Proteinleveln von *Neutrophil gelatinase-associated lipocalin* (Westerlund et al. 1996), *Programmed cell death protein 4* (Elmore 2007) und herunterregulierten Spiegeln von *Interleukin-1 receptor antagonist protein* (Arend et al. 1998). Der *Macrophage migration inhibitory factor* war in allen untersuchten Zellen herabreguliert, was auf eine erhöhte Makrophagenaktivität hinweist. Erhöhte Spiegel von *Macrophage migration inhibitory factor* wurden in einer klinischen Studie, im Gegensatz zu den hier gezeigten Resultaten, anhand einer chronischen Parodontitis beschrieben (Ortiz-García et al. 2019). Die bakterielle Irritation in dieser Studie ist akuter Natur und könnte sich daher von chronischen Zuständen unterscheiden. Die *Prostaglandin G/H synthase 1*, von der bekannt ist, dass sie den Entzündungsmarker Prostaglandin E2 produziert (Simmons et al. 2004), war in GK, ZZ und OZAK erhöht. Die Abnahme der *Prostaglandin reductase 1* in OZAK und PDLF nach bakterieller Reizung kann zu höheren Leukotrien B4-Spiegeln führen und somit eine Entzündungsreaktion verstärken (Yokomizo et al. 1996). Die Herabregulierung von *Leukocyte elastase inhibitor* in den Zellen der mesodermalen Linie ist ebenfalls mit einer aktivierten Immunantwort vereinbar, in dem mehr Elastase aus den Leukozyten freigesetzt wird (Torrighia et al. 2017). Die Bindung von *CD 166 antigen* an CD6 fördert die Aktivierung des erworbenen Immunsystems durch T-Zellen (Hassan et al. 2004). Die *CD166 antigen* Expression war auch hier in PDLF und ZZ nach bakterieller Reizung erhöht. In ähnlicher Weise war Nectin-2, ein Modulator der T-Zell-Signalisierung (Deuss et al. 2017), in OZAK erhöht. In ZZ ist das *CD276 antigen*, das mit T-Zell-Aktivierung und IFN-Verstärkung assoziiert ist (Chapoval et al. 2001), erhöht. Das

Complement component C9 war in PDLF erhöht, was auf eine verstärkte angeborene Immunantwort hinweist (Courts et al. 1977).

In vivo wird eine parodontale Entzündung durch eine Vielzahl von Pathogenen induziert, die komplexe Biofilme bilden und die eine erhöhte Immunantwort im Wirt provozieren (Pihlstrom et al. 2005; Rylev und Kilian 2008). Da aktuell die Kultivierung von Multispezies-Biofilmen eine methodische Herausforderung mit geringer Reproduzierbarkeit bleibt, ist die *in vitro* Forschung zur PA beeinträchtigt. Obwohl die vorliegenden Ergebnisse nicht vollständig auf die PA übertragbar sind, scheint die in dieser Studie durchgeführte bakterielle Irritation von humanen oralen Zellen des Parodontiums geeignet zu sein, eine orale Entzündung zu induzieren und umfasst eine hohe Reproduzierbarkeit.

4.5 Proteine der Zellinteraktion und der EZM-Produktion in Zellen des Parodontiums werden durch die Kultur mit *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* und *Eikenella corrodens* beeinflusst

Entzündungen gehen mit Veränderungen in der Zellinteraktion und der EZM-Struktur einher. Diesbezüglich wurden in den humanen Zellen des Parodontiums nach bakterieller Irritation teilweise diskrepante Befunde erzielt. Die Reduktionen von *Tight junction protein ZO-2* (Chelakkot et al. 2018), Ladinin-1 (Abé et al. 2017) und Plakophilin-3 (Bonné et al. 2003) in GK, von Paladin (Mykkänen et al. 2001) und Zyxin (Frenette und Wagner 1996) in OZAK, von *Tight junction protein 1* (Chelakkot et al. 2018) in ZZ und von Vinculin (Frenette und Wagner 1996) in PDLF und ZZ können als gestörte Zellinteraktion und verminderte EZM-Integrität subsumiert werden. In der Summe werden also Proteine, die direkten Zell-Zell-Kontakten und der Verbindung zur Basalmembran dienen, vermindert synthetisiert. Ebenso spiegeln erhöhte Proteinlevel der Matrix-Metalloproteinase-14 und ihres Aktivators Basigin, typisch für Entzündungen, in PDLF den Abbau der EZM wieder (Fingleton 2017). Die Hochregulation von *Laminin subunit gamma-2* (Timpl und Brown 1996) und von Integrin beta-1 (Larjava et al. 2014) in GK, von *Collagen alpha-1(I) chain* (Narayanan und Bartold 1996), von Fibronectin (Pankov und Yamada 2002) und von Integrin alpha-2 (Larjava et al. 2014) in OZAK sowie der *Collagen alpha-1(V) chain* (Narayanan und Bartold 1996) in PDLF und ZZ erscheint in diesem Licht widersprüchlich. Vermutlich finden bei der simulierten Entzündung *in vitro* Degradations- und Regenerationsprozesse gleichzeitig statt (Govindaraju et al. 2019). SPARC, eine strukturelle Komponente der EZM mit verschiedenen Funktionen, einschließlich der

zellvermittelten Immunantwort, wurde in PDLF und ZZ hochreguliert, was die nicht ganz klare Rolle bei Entzündung und EZM-Integrität unterstreicht und weiter aufgeklärt werden sollte (Lund et al. 2009).

4.6 Zellreihen-übergreifende Veränderungen im Proteom

In verschiedenen Bereichen reagieren GK, OZAK, PDLF und ZZ mit simultanen Änderungen ihres Proteoms auf die Kultur mit den PA-assoziierten Keimen. Ein ähnliches Verhalten der Zellen wurde zunächst zu Beginn der Experimente gezeigt, als die Apoptose einsetzte. Gemeinsame Veränderungen im Proteom der Zellen sind von therapeutischer Bedeutung, um potenzielle Kandidaten zu identifizieren, welche dann intensiviert weiter untersucht werden müssten. Idealerweise fokussiert man kleinere Moleküle als leichtere pharmakologische Ziel-Struktur (Lu et al. 2020).

Collagen alpha-1 (XII) ist ein Fibrillen-assoziiertes Kollagen, liegt als homotrimer vor und ist für Muskeldystrophien in mutierter Variante verantwortlich. Mit 190 kDa pro Kette stellt es ein Makromolekül dar und ist in der EZM strukturgebend. Es wird vermehrt während der bakteriellen Kultur gebildet. Das PDL der Backenzähne einer genetisch veränderten Maus mit Mutation für *Collagen alpha-1 (XII)*, zeigte den Verlust der geordneten Architektur des PDL, ohne dass eine Entzündung erkennbar war. Der zelluläre Zement schien an der PDL-Insertion gestört zu sein. In der konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopie zeigte das PDL der transgenen Mäuse geschwollene und unregelmäßig angeordnete Kollagenfasern (Reichenberger et al. 2000). Eine Modulation von *Collagen alpha-1 (XII)* erscheint daher als nicht zielführend im Sinne eines neuen therapeutischen Ansatzes für die PA.

Cytoskeleton-associated protein 4 reguliert die Exozytose von sekretorischen Granula, wie Proteasen, Lipasen und Entzündungsmediatoren, durch neutrophile Granulozyten (Borregaard et al. 2007). Es wird verstärkt in bakterieller Kultur synthetisiert und ist in die Immunantwort involviert. Eine erhöhte Expression wie im Experiment scheint als Teil des Immunsystems sinnvoll, trägt aber auf der anderen Seite zum Abbau des Parodontiums bei. Eine Modulation im Bereich der neutrophilen Granulozyten wirkt zu riskant, wenn man bedenkt, dass sie ein essentieller Bestandteil der angeborenen Immunabwehr sind und der Identifizierung und Zerstörung von Mikroorganismen dienen.

Der *Elongation factor 2* katalysiert die koordinierte Bewegung der beiden tRNA-Moleküle, der mRNA und Konformationsänderungen im Ribosom während der Translation. In der Summe wird also, wie im gezeigten Experiment, die Proteinbiosynthese durch den

Mangel an *Elongation factor 2* verringert (Castello et al. 2012). Dies scheint ein möglicher interessanter Ansatzpunkt für eine lokale Therapie der PA darzustellen. Dazu sollte zunächst untersucht werden, ob eine Überexpression von *Elongation factor 2* im gleichen experimentellen *Setting* einen positiven Effekt auf GK, OZAK, PDLF und ZZ hat. Im *vice versa* Experiment durch zum Beispiel einen *knockdown* via RNAi oder *knockout* via CRISPR/Cas9 von *Elongation factor 2* sollten kongruente Ergebnisse folgen, bevor ein Tierexperiment in Erwägung gezogen werden kann.

Filamin-A wird während der bakteriellen Kultur von GK, OZAK, PDLF und ZZ stark vermindert synthetisiert. Die Aufgaben, von Aktin-Bindung bis Zellmigration, sind weit verteilt innerhalb der Zelle und beinhalten diverse Interaktionsproteine. Vor allem die nicht genau geklärte Rolle in der Entwicklung von Neoplasien bei Verstärkung der Expression (Savoy und Ghosh 2013) lässt einen therapeutischen Benefit für die Therapie von PA in den Hintergrund rücken.

Glutathione S-transferase P dient als Enzym unter anderem der Regeneration der Zelle, indem es zu entsorgende Metabolite mit Glutathion konjugiert und so deren Elimination ermöglicht. Vor allem Prostaglandin A₂ und J₂ werden konjugiert, wodurch ihre anti-proliferativen Eigenschaften auf die Mitose unterdrückt werden (Bogaards et al. 1997). Auch Xenobiotika können eliminiert werden. Aber ein Zusammenhang mit dem breitem Erregerspektrum der PA und den dabei entstehenden Xenobiotika ist aktuell nicht beschrieben. Bestimmte Varianten von genetischen Polymorphismen sind in einer Studie mit 60 Probanden als Risikofaktor bei chronischer PA beschrieben worden (Camargo Ortega et al. 2014).

Die Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP11 ist stark erhöht in den Zellen, welche der bakteriellen Irritation mit *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* und *Eikenella corrodens* ausgesetzt waren. Als klassische cis-trans Isomerase verfügt sie vermutlich über eine geringe Bedeutung für die Therapie der PA, obwohl bereits erhöhte Level auf Ebene des Transkriptoms bei Patienten mit chronischer PA nachgewiesen wurden (Suzuki et al. 2019).

Als fester Bestandteil der Atmungskette und somit essentieller Energielieferant innerhalb der Zellen, oder genauer in der Mitochondrien-Membran, ist das *Phosphate carrier protein mitochondrial* ubiquitär, über die Evolution hoch konserviert und insgesamt ein kaum beeinflussbarer Faktor in diesem Experiment oder der PA. Mängel an *Phosphate carrier protein mitochondrial*, ursächlich für Laktatazidose, hypertropher Kardiomyopathie sowie Muskelhypotonie, sind innerhalb des ersten Lebensjahres letal (Mayr et al. 2007).

Phosphate carrier protein mitochondrial wird in den Zellen während der Kultur mit *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* und *Eikenella corrodens* vermehrt synthetisiert und scheint somit eventuell eine Reaktion der Zellen auf den erhöhten Energiebedarf während einer Entzündung zu sein (Wang und Ye 2015).

Die *Pyruvate kinase PKM* ist ein glykolytisches Enzym, das die Übertragung einer Phosphorylgruppe von Phosphoenolpyruvat auf Adenosindiphosphat katalysiert und dabei Adenosintriphosphat, als universellen Energieträger im Körper, erzeugt. Sie ist Bestandteil der Glykolyse und wird im beschriebenen Experiment während der bakteriellen Kultur von GK, OZAK, PDLF und ZZ vermindert produziert. Es sind keine publizierten Daten über einen Zusammenhang der *Pyruvate kinase PKM* mit PA bekannt. Eine lokale Substitution der Zellen, in welcher Form auch immer, mit *Pyruvate kinase PKM* ist aufgrund des Zusammenhangs mit dem oralen Plattenepithelkarzinom als nicht besonders sinnvoll zu betrachten (Kurihara-Shimomura et al. 2018).

Die Rolle von *Synptophysin-like protein 1* ist wissenschaftlich noch kaum belegt. Das zeigt sich auch an der geringen Anzahl von Publikationen. Eine Bindung zu *Syntaxin-1A* ist beschrieben und somit eine Involvierung in die Formation des SNARE-Komplexes bei der Freisetzung von Neurotransmittern aus der Synapse (Craig et al. 2015). Ob nun eine therapeutische Relevanz für die PA besteht, lässt sich aus der aktuellen Datenlage nicht ableiten und verlangt somit weitere wissenschaftlicher Untersuchungen auf allen Ebenen.

Die Proteinlevel für *Transmembrane protein 165* in GK+, OZAK+, PDLF+ und ZZ+ sind stark gestiegen im Vergleich mit den jeweiligen Kontrollen. Das *Transmembrane protein 165* ist hauptsächlich in die Glykosylierung von Proteinen involviert (Foulquier et al. 2012). Dies konnte auch durch die zuvor gezeigten integrativen Datenanalysen bestätigt werden. Inwieweit eine therapeutische Konsequenz für die PA entstehen kann, bleibt hierbei ebenfalls abzuwarten, obwohl die Bedeutung der Glykosylierung für mikrobielle Infektionen unbestritten ist (Reily et al. 2019).

Es wurden verstärkte Mengen an *Transmembrane 9 superfamily member 2* in allen Zellen mit bakterieller Kultur nachgewiesen. Es ist ein ubiquitäres, mit neun putativen Transmembrandomänen aufgebautes sowie höchst konserviertes Protein während der Evolution (Schimmöller et al. 1998) und scheint eine Assoziation mit PA zu besitzen (Offenbacher et al. 2016). Eine Erhöhung der Level von *Transmembrane 9 superfamily member 2*, wie hier gezeigt, konnte auch auf mRNA-Niveau bei Patienten im Verdauungstrakt nachgewiesen werden. Es wird als potenzielles *Oncogene* dargestellt und soll ein

mögliches Wirkstoffziel neuerer Medikamente werden (Clark et al. 2018). Es ist durchaus vorstellbar, dass man viele Ergebnisse aus der Forschung über *Transmembrane 9 superfamily member 2* als neues *Oncogene* auch auf die PA-Forschung übertragen kann. Aber ein Nutzen als Therapeutikum für PA zum aktuellen Zeitpunkt bleibt hoch spekulativ. Vimentin als Intermediärfilament innerhalb der Zelle wird in GK +, OZAK +, PDLF + und ZZ + vermindert produziert. Während der Pathogenese der PA werden Kollagene Strukturen mehrheitlich abgebaut, so kommt es zu Degradation von PDL, Alveolarknochen und letztendlich zum Verlust des Zahns durch Lockerung. Vimentin scheint einen protektiven Effekt auf die Stabilität der mRNAs von Kollagenen zu besitzen (Pihlstrom et al. 2005; Challa und Stefanovic 2011). Somit könnte es ebenfalls eine mögliche Ansatzstelle für PA-Therapien darstellen, indem es den entsprechenden Zellen in einer Form zugeführt wird, um die Biosynthese der Kollagene auch unter der Infektion aufrechtzuerhalten. Dies ist ebenfalls als lokales Therapeutikum denkbar, sollte aber wie zuvor beschrieben tiefergehend untersucht werden, da auch Vimentin eine Rolle in der Biologie epithelialer Tumoren und bei der epithelial-mesenchymalen Transition inne hat (Satelli und Li 2011).

4.7 Ausblick

Die vorliegende Studie gibt zum ersten Mal einen umfassenden Einblick in das Proteom humaner oraler Zellen des Parodontiums. Zellen der ektodermalen Linie aus der befestigten Gingiva weisen ein einzigartiges Proteom auf, das sich signifikant von Zellen der mesodermalen Linie aus Alveolarknochen, PDL und Zement unterscheidet. Somit kann jeder Zellreihe ein spezifisches Protein-Profil zur Charakterisierung zugeordnet werden. Die bakterielle Irritation durch die PA-assoziierten Erreger *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* und *Eikenella corrodens* während der Kultur induzierte in GK, OZAK, PDLF und ZZ Veränderungen im spezifischen Protein-Muster der Zellen, die auf entzündliche Prozesse hinweisen.

Obwohl die gezeigten Ergebnisse nicht vollständig auf die *in vivo* PA übertragen werden können, sind die etablierten humanen Zelllinien des Parodontiums und die reproduzierbare bakterielle Irritation vielversprechend für die zukünftige *in vitro* Forschung zur PA. Um therapeutische Ansätze weiterzuerfolgen, sind Methoden im zellbiologischen Bereich, wie RNAi als *knockdown* oder *knockout* via CRISPR/Cas9 sowie lentivirale Überexpressionen der Kandidaten erforderlich. Im weiteren Verlauf können passende Methoden entwickelt werden, um neue therapeutische Ansätze zu generieren. Eine Proteom-

Analyse stellt in der Kombination mit Datenbankinterpretationen eine sinnvolle erste Methode zur Verschaffung einer Übersicht dar und bietet die Möglichkeit, Details zu identifizieren.

Ungeachtet der Proteomanalyse kommt auch der Etablierung der hier untersuchten humanen Zelllinien des Parodontiums, die nun der zahnmedizinischen Forschungsgemeinde zur Verfügung stehen, eine hohe wissenschaftliche Bedeutung zu.

5 Zusammenfassung

Das Parodontium wird von Gingiva, Wurzelzement, PDL und Alveolarknochen gebildet. Es ist verantwortlich für die elastische Verankerung des Zahns in der Alveole, die Propriozeption während Mastikation und Sprechen sowie den Schutz der angrenzenden Strukturen vor dem oralen Mikrobiom. Die chronisch-entzündliche Erkrankung des Parodontiums wird als PA definiert und führt ohne Therapie zu einer irreversiblen Zerstörung des Zahnhalteapparates. Die PA ist mittlerweile der Hauptgrund für Zahnverlust. Die molekularen Mechanismen während der Pathogenese von PA in humanen Zellen des Parodontiums auf Ebene des Proteoms sind nicht untersucht. Ziel dieser Arbeit ist, eine Proteomanalyse mittels markierungsfreier hochauflösender Massenspektrometrie aller hier etablierten Zellen des Parodontiums in einzelner Kultur und in Kultur mit den PA-assoziierten Bakterien *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* und *Eikenella corrodens*. Jeder Zellreihe kann erstmals ein spezifisches Proteinprofil für die Charakterisierung zugeordnet werden. Wie erwartet wurden große Unterschiede im Proteom von GK aus der ektodermalen Linie im Vergleich zur Gruppe bestehend aus OZAK, PDLF und ZZ mit mesodermalen Ursprung beobachtet. Diese Unterscheidung blieb auch während der bakteriellen Kultur bestehen. In der Summe zeigen zellspezifische Veränderungen von immunregulatorischen Proteinen eine Aktivierung des Immunsystems bei GK +, OZAK +, PDLF + und ZZ +. Außerdem kommt es zu einer Störung im Bereich von Zellinteraktionen und der EZM, welche als typische Anzeichen für eine Entzündung gewertet werden können. Ein essentieller Bestandteil des Ribosoms ist *Elongation factor 2*. Er zeigt über alle Zellreihen hinweg eine Verminderung durch die bakterielle Irritation. Er stellt somit ein potentiell Target für eine zielgerichtete lokale Therapie dar, um so die Proteinbiosynthese während der PA aufrecht zu erhalten. Ein ebenfalls interessanter Ansatz könnte die Protektion von Kollagenen als Grundstruktur der EZM im gesamten Parodontium auf Niveau der mRNA durch Substitution von während der Kultur vermindert produziertem Vimentin darstellen.

Die generierten Ergebnisse können nicht vollständig auf die *in vivo* PA übertragen werden, aber die etablierten Zellreihen und die reproduzierbare bakterielle Irritation sind vielversprechend für die zukünftige *in vitro* Forschung zur PA, um auch therapeutische Ansätze weiterzuentwickeln.

6 Literaturverzeichnis

- Ababneh KT, Hall RC, Embery G (1999): The proteoglycans of human cementum: immunohistochemical localization in healthy, periodontally involved and ageing teeth. *J Periodontal Res* 34, 87–96
- Abé T, Maruyama S, Yamazaki M, Xu B, Babkair H, Sumita Y, Cheng J, Yamamoto T, Saku T (2017): Proteomic and histopathological characterization of the interface between oral squamous cell carcinoma invasion fronts and non-cancerous epithelia. *Exp Mol Pathol* 102, 327–336
- Arend WP, Malyak M, Guthridge CJ, Gabay C (1998): Interleukin-1 receptor antagonist: role in biology. *Annu Rev Immunol* 16, 27–55
- Argelaguet R, Clark SJ, Mohammed H, Stapel LC, Krueger C, Kapourani C-A, Imaz-Rosshandler I, Lohoff T, Xiang Y, Hanna CW, et al. (2019): Multi-omics profiling of mouse gastrulation at single-cell resolution. *Nature* 576, 487–491
- Arzate H, Zeichner-David M, Mercado-Celis G (2015): Cementum proteins: role in cementogenesis, biomineralization, periodontium formation and regeneration. *Periodontol 2000* 67, 211–233
- Atanassov I, Urlaub H (2013): Increased proteome coverage by combining PAGE and peptide isoelectric focusing: comparative study of gel-based separation approaches. *Proteomics* 13, 2947–2955
- Barrett AW, Raja AM (1997): The immunohistochemical identification of human oral mucosal melanocytes. *Arch Oral Biol* 42, 77–81
- Bartold PM (1990): A biochemical and immunohistochemical study of the proteoglycans of alveolar bone. *J Dent Res* 69, 7–19
- Bartold PM, Wiebkin OW, Thonard JC (1981): Glycosaminoglycans of human gingival epithelium and connective tissue. *Connect Tissue Res* 9, 99–106
- Becker J, Schuppan D, Rabanus JP, Rauch R, Niechoy U, Gelderblom HR (1991): Immunoelectron microscopic localization of collagens type I, V, VI and of procollagen type III in human periodontal ligament and cementum. *J Histochem Cytochem Off J Histochem Soc* 39, 103–110
- Beertsen W, McCulloch CA, Sodek J (1997): The periodontal ligament: a unique, multifunctional connective tissue. *Periodontol 2000* 13, 20–40
- Bergström J (1984): The topography of papillary gingiva in health and early gingivitis. *J Clin Periodontol* 11, 423–431
- Berkovitz BK (1990): The structure of the periodontal ligament: an update. *Eur J Orthod* 12, 51–76
- Birn H (1966): The vascular supply of the periodontal membrane. An investigation of the number and size of perforations in the alveolar wall. *J Periodontal Res* 1, 51–68

- Blaschke C, Schwass DR (2020): The socket-shield technique: a critical literature review. *Int J Implant Dent* 6, 52
- Bodnar AG, Ouellette M, Frolkis M, Holt SE, Chiu CP, Morin GB, Harley CB, Shay JW, Lichtsteiner S, Wright WE (1998): Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science* 279, 349–352
- Bogaards JJ, Venekamp JC, van Bladeren PJ (1997): Stereoselective conjugation of prostaglandin A2 and prostaglandin J2 with glutathione, catalyzed by the human glutathione S-transferases A1-1, A2-2, M1a-1a, and P1-1. *Chem Res Toxicol* 10, 310–317
- Bonewald LF (2011): The amazing osteocyte. *J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res* 26, 229–238
- Bonné S, Gilbert B, Hatzfeld M, Chen X, Green KJ, van Roy F (2003): Defining desmosomal plakophilin-3 interactions. *J Cell Biol* 161, 403–416
- Borregaard N, Sørensen OE, Theilgaard-Mönch K (2007): Neutrophil granules: a library of innate immunity proteins. *Trends Immunol* 28, 340–345
- Bosshardt DD, Selvig KA (1997): Dental cementum: the dynamic tissue covering of the root. *Periodontol 2000* 13, 41–75
- Buckwalter JA, Cooper RR (1987): Bone structure and function. *Instr Course Lect* 36, 27–48
- Butler WT, Birkedal-Hansen H, Beegle WF, Taylor RE, Chung E (1975): Proteins of the periodontium. Identification of collagens with the [alpha1(I)]2alpha2 and [alpha1(III)]3 structures in bovine periodontal ligament. *J Biol Chem* 250, 8907–8912
- Camargo Ortega VR, Bravo López LD, Visoso Salgado A, Mejia Sanchez F, Castillo Cadena J (2014): Polymorphisms in Glutathione S-Transferase M1, T1, and P1 in Patients with Chronic Periodontitis: A Pilot Study. *Int Sch Res Not* 2014, 135368
- Castello A, Fischer B, Eichelbaum K, Horos R, Beckmann BM, Strein C, Davey NE, Humphreys DT, Preiss T, Steinmetz LM, et al. (2012): Insights into RNA biology from an atlas of mammalian mRNA-binding proteins. *Cell* 149, 1393–1406
- Caton JG, Armitage G, Berglundh T, Chapple ILC, Jepsen S, Kornman KS, Mealey BL, Papapanou PN, Sanz M, Tonetti MS (2018): A new classification scheme for periodontal and peri-implant diseases and conditions - Introduction and key changes from the 1999 classification. *J Periodontol* 89 Suppl 1, S1–S8
- Challa AA, Stefanovic B (2011): A novel role of vimentin filaments: binding and stabilization of collagen mRNAs. *Mol Cell Biol* 31, 3773–3789
- Chapoval AI, Ni J, Lau JS, Wilcox RA, Flies DB, Liu D, Dong H, Sica GL, Zhu G, Tamada K, Chen L (2001): B7-H3: a costimulatory molecule for T cell activation and IFN-gamma production. *Nat Immunol* 2, 269–274

- Chelakkot C, Ghim J, Ryu SH (2018): Mechanisms regulating intestinal barrier integrity and its pathological implications. *Exp Mol Med* 50, 103
- Chen CK, Dunford RG, Reynolds HS, Zambon JJ (1989): *Eikenella corrodens* in the human oral cavity. *J Periodontol* 60, 611–616
- Clark CR, Maile M, Blaney P, Hellweg SR, Strauss A, Durose W, Priya S, Habicht J, Burns MB, Blekhman R, et al. (2018): Transposon mutagenesis screen in mice identifies TM9SF2 as a novel colorectal cancer oncogene. *Sci Rep* 8, 15327
- Courts FJ, Boackle RJ, Fudenberg HH, Silverman MS (1977): Detection of functional complement components in gingival crevicular fluid from humans with periodontal diseases. *J Dent Res* 56, 327–331
- Craig TJ, Anderson D, Evans AJ, Girach F, Henley JM (2015): SUMOylation of Syntaxin1A regulates presynaptic endocytosis. *Sci Rep* 5, 17669
- Deuss FA, Gully BS, Rossjohn J, Berry R (2017): Recognition of nectin-2 by the natural killer cell receptor T cell immunoglobulin and ITIM domain (TIGIT). *J Biol Chem* 292, 11413–11422
- DiFranco CF, Toto PD, Rowden G, Gargiulo AW, Keene JJ, Connelly E (1985): Identification of Langerhans cells in human gingival epithelium. *J Periodontol* 56, 48–54
- Dihazi H, Asif AR, Beißbarth T, Bohrer R, Feussner K, Feussner I, Jahn O, Lenz C, Majcherczyk A, Schmidt B, et al. (2018): Integrative omics - from data to biology. *Expert Rev Proteomics* 15, 463–466
- Doss MX, Gaspar JA, Winkler J, Hescheler J, Schulz H, Sachinidis A (2012): Specific gene signatures and pathways in mesodermal cells and their derivatives derived from embryonic stem cells. *Stem Cell Rev Rep* 8, 43–54
- Eiken M (1958): Studies on an anaerobic, rodshaped, gram-negative microorganism: *Bacteroides corrodens* n. sp. *Acta Pathol Microbiol Scand* 43, 404–416
- Elmore S (2007): Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol* 35, 495–516
- Faveri M, Miquelleto DEC, Bueno-Silva B, Pinguero JMS, Figueiredo LC, Dolkart O, Yakobson E, Barak S, Feres M, Shibli JA (2020): Antimicrobial effects of a pulsed electromagnetic field: an in vitro polymicrobial periodontal subgingival biofilm model. *Biofouling* 36, 862–869
- Fingleton B (2017): Matrix metalloproteinases as regulators of inflammatory processes. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res* 1864, 2036–2042
- Fives-Taylor PM, Meyer DH, Mintz KP, Brissette C (1999): Virulence factors of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Periodontol 2000* 20, 136–167
- Foulquier F, Amyere M, Jaeken J, Zeevaert R, Schollen E, Race V, Bammens R, Morrelle W, Rosnoble C, Legrand D, et al. (2012): TMEM165 deficiency causes a congenital disorder of glycosylation. *Am J Hum Genet* 91, 15–26

- Frenette PS, Wagner DD (1996): Adhesion molecules--Part 1. *N Engl J Med* 334, 1526–1529
- Govindaraju P, Todd L, Shetye S, Monslow J, Puré E (2019): CD44-dependent inflammation, fibrogenesis, and collagenolysis regulates extracellular matrix remodeling and tensile strength during cutaneous wound healing. *Matrix Biol J Int Soc Matrix Biol* 75–76, 314–330
- Green H, Fuchs E, Watt F (1982): Differentiated structural components of the keratinocyte. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 46 Pt 1, 293–301
- Gu Z, Eils R, Schlesner M (2016): Complex heatmaps reveal patterns and correlations in multidimensional genomic data. *Bioinforma Oxf Engl* 32, 2847–2849
- Hänzelmann S, Castelo R, Guinney J (2013): GSVA: gene set variation analysis for microarray and RNA-seq data. *BMC Bioinformatics* 14, 7
- Hassan NJ, Barclay AN, Brown MH (2004): Frontline: Optimal T cell activation requires the engagement of CD6 and CD166. *Eur J Immunol* 34, 930–940
- Hassell TM (1993): Tissues and cells of the periodontium. *Periodontol 2000* 3, 9–38
- Huang DW, Sherman BT, Lempicki RA (2009): Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat Protoc* 4, 44–57
- Huynh AHS, Veith PD, McGregor NR, Adams GG, Chen D, Reynolds EC, Ngo LH, Darby IB (2015): Gingival crevicular fluid proteomes in health, gingivitis and chronic periodontitis. *J Periodontal Res* 50, 637–649
- Kinane DF, Stathopoulou PG, Papapanou PN (2017): Periodontal diseases. *Nat Rev Dis Primer* 3, 17038
- Kitajima K, Das R, Liang X, Neppelberg E, Johannessen AC, Costea DE, Igarashi M (2019): Isolation and characterization of cells derived from human epithelial rests of Malassez. *Odontology* 107, 291–300
- Korpos E, Wu C, Sorokin L (2009): Multiple roles of the extracellular matrix in inflammation. *Curr Pharm Des* 15, 1349–1357
- Kurihara-Shimomura M, Sasahira T, Nakashima C, Kuniyasu H, Shimomura H, Kirita T (2018): The Multifarious Functions of Pyruvate Kinase M2 in Oral Cancer Cells. *Int J Mol Sci* 19
- Lambert J-P, Ivosev G, Couzens AL, Larsen B, Taipale M, Lin Z-Y, Zhong Q, Lindquist S, Vidal M, Aebersold R, et al. (2013): Mapping differential interactomes by affinity purification coupled with data-independent mass spectrometry acquisition. *Nat Methods* 10, 1239–1245
- Larjava H, Koivisto L, Heino J, Häkkinen L (2014): Integrins in periodontal disease. *Exp Cell Res* 325, 104–110
- Li S, Dong G, Moschidis A, Ortiz J, Benakanakere MR, Kinane DF, Graves DT (2013): P. gingivalis modulates keratinocytes through FOXO transcription factors. *PLoS*

One 8, e78541

- Lindberg K, Rheinwald JG (1990): Three distinct keratinocyte subtypes identified in human oral epithelium by their patterns of keratin expression in culture and in xenografts. *Differ Res Biol Divers* 45, 230–241
- Listgarten MA (1972): Normal development, structure, physiology and repair of gingival epithelium. *Oral Sci Rev* 1, 3–67
- Long F (2011): Building strong bones: molecular regulation of the osteoblast lineage. *Nat Rev Mol Cell Biol* 13, 27–38
- Lu H, Zhou Q, He J, Jiang Z, Peng C, Tong R, Shi J (2020): Recent advances in the development of protein-protein interactions modulators: mechanisms and clinical trials. *Signal Transduct Target Ther* 5, 213
- Lund SA, Giachelli CM, Scatena M (2009): The role of osteopontin in inflammatory processes. *J Cell Commun Signal* 3, 311–322
- Luo W, Brouwer C (2013): Pathview: an R/Bioconductor package for pathway-based data integration and visualization. *Bioinforma Oxf Engl* 29, 1830–1831
- Malpartida-Carrillo V, Tinedo-Lopez PL, Guerrero ME, Amaya-Pajares SP, Özcan M, Rösing CK (2020): Periodontal phenotype: A review of historical and current classifications evaluating different methods and characteristics. *J Esthet Restor Dent Off Publ Am Acad Esthet Dent AI*
- Mardis ER (2008): Next-generation DNA sequencing methods. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 9, 387–402
- Mariotti A (1993): The extracellular matrix of the periodontium: dynamic and interactive tissues. *Periodontol 2000* 3, 39–63
- Mayr JA, Merkel O, Kohlwein SD, Gebhardt BR, Böhles H, Fötschl U, Koch J, Jaksch M, Lochmüller H, Horváth R, et al. (2007): Mitochondrial phosphate-carrier deficiency: a novel disorder of oxidative phosphorylation. *Am J Hum Genet* 80, 478–484
- Meisel P, Siegemund A, Dombrowa S, Sawaf H, Fanghaenel J, Kocher T (2002): Smoking and polymorphisms of the interleukin-1 gene cluster (IL-1alpha, IL-1beta, and IL-1RN) in patients with periodontal disease. *J Periodontol* 73, 27–32
- Meyer DH, Lippmann JE, Fives-Taylor PM (1996): Invasion of epithelial cells by *Actinobacillus actinomycetemcomitans*: a dynamic, multistep process. *Infect Immun* 64, 2988–2997
- Murphrey MB, Miao JH, Zito PM: Histology, Stratum Corneum. In: StatPearls. StatPearls Publishing, Treasure Island (FL) 2020
- Mykkänen OM, Grönholm M, Rönty M, Lalowski M, Salmikangas P, Suila H, Carpen O (2001): Characterization of human palladin, a microfilament-associated protein. *Mol Biol Cell* 12, 3060–3073

- Nanci A, Bosshardt DD (2006): Structure of periodontal tissues in health and disease. *Periodontol 2000* 40, 11–28
- Narayanan AS, Bartold PM (1996): Biochemistry of periodontal connective tissues and their regeneration: a current perspective. *Connect Tissue Res* 34, 191–201
- Nørskov-Lauritsen N, Kilian M (2006): Reclassification of *Actinobacillus actinomycesetemcomitans*, *Haemophilus aphrophilus*, *Haemophilus paraprophilus* and *Haemophilus segnis* as *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* gen. nov., comb. nov., *Aggregatibacter aphrophilus* comb. nov. and *Aggregatibacter segnis* comb. nov., and emended description of *Aggregatibacter aphrophilus* to include V factor-dependent and V factor-independent isolates. *Int J Syst Evol Microbiol* 56, 2135–2146
- Offenbacher S, Divaris K, Barros SP, Moss KL, Marchesan JT, Morelli T, Zhang S, Kim S, Sun L, Beck JD, et al. (2016): Genome-wide association study of biologically informed periodontal complex traits offers novel insights into the genetic basis of periodontal disease. *Hum Mol Genet* 25, 2113–2129
- O’Leary TJ (1986): The impact of research on scaling and root planing. *J Periodontol* 57, 69–75
- Ono N, Kronenberg HM (2016): Bone repair and stem cells. *Curr Opin Genet Dev* 40, 103–107
- Ortiz-García YM, García-Iglesias T, Morales-Velazquez G, Lazalde-Ramos BP, Zúñiga-González GM, Ortiz-García RG, Zamora-Perez AL (2019): Macrophage Migration Inhibitory Factor Levels in Gingival Crevicular Fluid, Saliva, and Serum of Chronic Periodontitis Patients. *BioMed Res Int* 2019, 7850392
- Oz HS, Puleo DA (2011): Animal models for periodontal disease. *J Biomed Biotechnol* 2011, 754857
- Page RC, Kornman KS (1997): The pathogenesis of human periodontitis: an introduction. *Periodontol 2000* 14, 9–11
- Pankov R, Yamada KM (2002): Fibronectin at a glance. *J Cell Sci* 115, 3861–3863
- Pihlstrom BL (2001): Periodontal risk assessment, diagnosis and treatment planning. *Periodontol 2000* 25, 37–58
- Pihlstrom BL, Michalowicz BS, Johnson NW (2005): Periodontal diseases. *Lancet Lond Engl* 366, 1809–1820
- Raghunath M, Tschödrich-Rotter M, Sasaki T, Meuli M, Chu ML, Timpl R (1999): Confocal laser scanning analysis of the association of fibulin-2 with fibrillin-1 and fibronectin define different stages of skin regeneration. *J Invest Dermatol* 112, 97–101
- Ramfjord SP (1993): Maintenance care and supportive periodontal therapy. *Quintessence Int Berl Ger* 24, 465–471
- Ramieri G, Panzica GC, Viglietti-Panzica C, Modica R, Springall DR, Polak JM (1992):

- Non-innervated Merkel cells and Merkel-neurite complexes in human oral mucosa revealed using antiserum to protein gene product 9.5. *Arch Oral Biol* 37, 263–269
- Reichenberger E, Baur S, Sukotjo C, Olsen BR, Karimbux NY, Nishimura I (2000): Collagen XII mutation disrupts matrix structure of periodontal ligament and skin. *J Dent Res* 79, 1962–1968
- Reichert T, Störkel S, Becker K, Fisher LW (1992): The role of osteonectin in human tooth development: an immunohistological study. *Calcif Tissue Int* 50, 468–472
- Reily C, Stewart TJ, Renfrow MB, Novak J (2019): Glycosylation in health and disease. *Nat Rev Nephrol* 15, 346–366
- Rheinwald JG, Green H (1975): Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cells. *Cell* 6, 331–343
- Ritchie ME, Phipson B, Wu D, Hu Y, Law CW, Shi W, Smyth GK (2015): limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. *Nucleic Acids Res* 43, e47
- Romanos G, Schröter-Kermani C, Hinz N, Bernimoulin JP (1991): Immunohistochemical distribution of the collagen types IV, V, VI and glycoprotein laminin in the healthy rat, marmoset (*Callithrix jacchus*) and human gingivae. *Matrix Stuttg Ger* 11, 125–132
- Rylev M, Kilian M (2008): Prevalence and distribution of principal periodontal pathogens worldwide. *J Clin Periodontol* 35, 346–361
- Rylev M, Abduljabar AB, Reinholdt J, Ennibi O-K, Haubek D, Birkelund S, Kilian M (2011): Proteomic and immunoproteomic analysis of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* JP2 clone strain HK1651. *J Proteomics* 74, 2972–2985
- Saffar JL, Lasfargues JJ, Cherruau M (1997): Alveolar bone and the alveolar process: the socket that is never stable. *Periodontol 2000* 13, 76–90
- Salmon CR, Tomazela DM, Ruiz KGS, Foster BL, Paes Leme AF, Sallum EA, Somerman MJ, Nociti FH (2013): Proteomic analysis of human dental cementum and alveolar bone. *J Proteomics* 91, 544–555
- Satelli A, Li S (2011): Vimentin in cancer and its potential as a molecular target for cancer therapy. *Cell Mol Life Sci CMLS* 68, 3033–3046
- Savoy RM, Ghosh PM (2013): The dual role of filamin A in cancer: can't live with (too much of) it, can't live without it. *Endocr Relat Cancer* 20, R341-356
- Schimmöller F, Díaz E, Mühlbauer B, Pfeffer SR (1998): Characterization of a 76 kDa endosomal, multispinning membrane protein that is highly conserved throughout evolution. *Gene* 216, 311–318
- Schminke B, Vom Orde F, Gruber R, Schliephake H, Bürgers R, Miosge N (2015): The pathology of bone tissue during peri-implantitis. *J Dent Res* 94, 354–361

- Schroeder HE, Listgarten MA (1997): The gingival tissues: the architecture of periodontal protection. *Periodontol 2000* 13, 91–120
- Schroeder HE, Münzel-Pedrazzoli S, Page R (1973): Correlated morphometric and biochemical analysis of gingival tissue in early chronic gingivitis in man. *Arch Oral Biol* 18, 899–923
- Schubert A, Schminke B, Miosge N (2017): Fibulins and matrilins are novel structural components of the periodontium in the mouse. *Arch Oral Biol* 82, 216–222
- Simmons DL, Botting RM, Hla T (2004): Cyclooxygenase isozymes: the biology of prostaglandin synthesis and inhibition. *Pharmacol Rev* 56, 387–437
- Sims MR (1975): Oxytalan-vascular relationships observed in histologic examination of the periodontal ligaments of man and mouse. *Arch Oral Biol* 20, 713–716
- Sirniö P, Väyrynen JP, Mutt SJ, Herzig K-H, Walkowiak J, Klintrup K, Mäkelä J, Karttunen TJ, Mäkinen MJ, Tuomisto A (2020): Systemic inflammation is associated with circulating cell death released keratin 18 fragments in colorectal cancer. *Oncoimmunology* 9, 1783046
- Slots J (1976): The predominant cultivable organisms in juvenile periodontitis. *Scand J Dent Res* 84, 1–10
- Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent RL (1998): Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol* 25, 134–144
- Sodek J, McKee MD (2000): Molecular and cellular biology of alveolar bone. *Periodontol 2000* 24, 99–126
- Suda R, Lai C-H, Yang H-W, Hasegawa K (2002): *Eikenella corrodens* in subgingival plaque: relationship to age and periodontal condition. *J Periodontol* 73, 886–891
- Suzuki A, Horie T, Numabe Y (2019): Investigation of molecular biomarker candidates for diagnosis and prognosis of chronic periodontitis by bioinformatics analysis of pooled microarray gene expression datasets in Gene Expression Omnibus (GEO). *BMC Oral Health* 19, 52
- Tatakis DN, Kumar PS (2005): Etiology and pathogenesis of periodontal diseases. *Dent Clin North Am* 49, 491–516, v
- Thornton-Evans G, Eke P, Wei L, Palmer A, Moeti R, Hutchins S, Borrell LN, Centers for Disease Control and Prevention (CDC) (2013): Periodontitis among adults aged ≥ 30 years - United States, 2009-2010. *MMWR Suppl* 62, 129–135
- Timpl R, Brown JC (1996): Supramolecular assembly of basement membranes. *BioEssays News Rev Mol Cell Dev Biol* 18, 123–132
- Tjin MS, Chua AWC, Tryggvason K (2020): Chemically defined and xenogeneic-free culture method for human epidermal keratinocytes on laminin-based matrices. *Nat Protoc* 15, 694–711
- Tonetti MS, Sanz M (2019): Implementation of the new classification of periodontal

- diseases: Decision-making algorithms for clinical practice and education. *J Clin Periodontol* 46, 398–405
- Torriglia A, Martin E, Jaadane I (2017): The hidden side of SERPINB1/Leukocyte Elastase Inhibitor. *Semin Cell Dev Biol* 62, 178–186
- Tyanova S, Temu T, Sinitcyn P, Carlson A, Hein MY, Geiger T, Mann M, Cox J (2016): The Perseus computational platform for comprehensive analysis of (prote)omics data. *Nat Methods* 13, 731–740
- Vizcaíno JA, Deutsch EW, Wang R, Csordas A, Reisinger F, Ríos D, Dianes JA, Sun Z, Farrah T, Bandeira N, et al. (2014): ProteomeXchange provides globally coordinated proteomics data submission and dissemination. *Nat Biotechnol* 32, 223–226
- Wang H, Ye J (2015): Regulation of energy balance by inflammation: common theme in physiology and pathology. *Rev Endocr Metab Disord* 16, 47–54
- Weber T: *Memorix Zahnmedizin*. 5. Auflage; Georg Thieme Verlag, Stuttgart 2017
- Weinreb M, Nemcovsky CE (2015): In vitro models for evaluation of periodontal wound healing/regeneration. *Periodontol 2000* 68, 41–54
- Westerlund U, Ingman T, Lukinmaa PL, Salo T, Kjeldsen L, Borregaard N, Tjäderhane L, Konttinen YT, Sorsa T (1996): Human neutrophil gelatinase and associated lipocalin in adult and localized juvenile periodontitis. *J Dent Res* 75, 1553–1563
- Yokomizo T, Ogawa Y, Uozumi N, Kume K, Izumi T, Shimizu T (1996): cDNA cloning, expression, and mutagenesis study of leukotriene B4 12-hydroxydehydrogenase. *J Biol Chem* 271, 2844–2850
- Yu G, Wang L-G, Han Y, He Q-Y (2012): clusterProfiler: an R package for comparing biological themes among gene clusters. *Omics J Integr Biol* 16, 284–287
- Yucel-Lindberg T, Båge T (2013): Inflammatory mediators in the pathogenesis of periodontitis. *Expert Rev Mol Med* 15, e7
- Zapata A, Ramirez-Arcos S (2015): A comparative study of McFarland turbidity standards and the Densimat photometer to determine bacterial cell density. *Curr Microbiol* 70, 907–909
- Zhang K, Kaufman RJ (2008): From endoplasmic-reticulum stress to the inflammatory response. *Nature* 454, 455–462
- Zhang Y, Bilbao A, Bruderer T, Luban J, Strambio-De-Castillia C, Lisacek F, Hopfgartner G, Varesio E (2015): The Use of Variable Q1 Isolation Windows Improves Selectivity in LC-SWATH-MS Acquisition. *J Proteome Res* 14, 4359–4371

Danksagung

Meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. med. Nicolai Miosge möchte ich an dieser Stelle ganz besonders Danken. Über Jahre hat sich unter seiner Führung eine Zusammenarbeit entwickelt, die mir die Promotionen, Publikationen und eine eigene wissenschaftliche Expertise ermöglicht hat. Ich möchte mich für die freundschaftliche und hilfsbereite Atmosphäre der Arbeitsgruppe orale Biologie und Geweberegeneration bedanken. Dank gilt ebenfalls der Serviceeinrichtung Proteomanalyse innerhalb der Universitätsmedizin Göttingen. Mein herzlichster Dank gilt Frau Christa Bode, die mir jederzeit mit Ihrer großen wissenschaftlichen Erfahrung, Ihrer Geduld im Labor und Freundschaft zur Seite stand.