

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

Porphyromonas gingivalis-induzierte Parodontitis bei
Wildtyp-Mäusen und DDR1-Knockout-Mäusen

INAUGURAL - DISSERTATION

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

vorgelegt von
Philipp Buderer
aus
Ludwigsburg

Göttingen 2015

Dekan: Prof. Dr. rer. nat. H. K. Kroemer

Berichterstatter/in: Prof. Dr. med. N. Miosge

Berichterstatter/in: Prof. Dr. med. dent. A. Wiegand

Berichterstatter/in:

Tag der mündlichen Prüfung: Mittwoch, 09.09.2015

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	VI
1 Einleitung	1
1.1 Das Parodontium	1
1.1.1 Die Gingiva	1
1.1.2 Das Wurzelzement	3
1.1.3 Der Alveolarknochen	4
1.1.4 Das Parodontalligament	4
1.2 Parodontitis	9
1.2.1 Definition und Bedeutung der Parodontitis	9
1.2.2 Ätiologie und Pathogenese	9
1.3 Porphyromonas gingivalis	12
1.4 Immunantwort des Wirts	14
1.5 Mausmodell für Parodontitis	15
1.6 DDR1-Knockout-Maus	16
1.7 Aufgabenstellung	17
2 Material und Methoden	18
2.1 Versuchsablauf	18
2.1.1 Die Versuchstiere	18
2.1.2 Anzucht von Porphyromonas gingivalis	18
2.1.3 Antibiotiose und Gabe von Porphyromonas gingivalis	19

2.2 Gewebepräparation	20
2.3 Fixierung	20
2.4 Entkalkung	21
2.5 Einbettung in Paraffin	21
2.6 Anfertigung der histologischen Schnitte	22
2.7 Entparaffinierung und Rehydrierung	23
2.8 Hämatoxylin-Eosin-Färbung (H.E.-Färbung)	23
2.9 Immunhistochemische Färbung	24
2.10 Verwendete Primärantikörper	28
2.11 Gegenfärben, Dehydrieren, Deckeln	29
2.12 Auswertung der immunhistochemischen Ergebnisse	30
3 Ergebnisse	31
3.1 Dentales und parodontales Gewebe von Wildtyp-Maus und DDR1-Knockout-Maus im Vergleich	31
3.2 Immunhistochemischer Nachweis von Kollagen	34
3.2.1 Immunhistochemischer Nachweis von Kollagen Typ I	34
3.2.2 Immunhistochemischer Nachweis von Kollagen Typ III	38
3.3 Immunhistochemischer Nachweis von Entzündungsmarkern	41
3.3.1 Immunhistochemischer Nachweis von CD 11b	41
3.3.2 Immunhistochemischer Nachweis von MMP-13	44
4 Diskussion	47
4.1 Diskussion des Mausmodells	47

4.2	Diskussion des Nachweises von Kollagen Typ I und III	52
4.3	Diskussion des Entzündungsmarkers CD 11b	54
4.4	Diskussion der Nachweisreaktionen von MMP-13	55
4.5	Diskussion der DDR1-Knockout-Maus	57
5	Zusammenfassung	58
6	Anhang	59
6.1	Abbildungsverzeichnis	59
6.2	Tabellenverzeichnis	60
7	Literaturverzeichnis	61

Abkürzungsverzeichnis

AAZ	azelluläres afibrilläres Zement
AFZ	azelluläres fibrilläres Zement
AK	Antikörper
Aqua dest.	destilliertes Wasser
BSA	bovines Serumalbumin
BSP	<i>bone sialoprotein</i>
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CFU	<i>colony forming unit</i>
CPS	<i>capsular polysaccharide</i>
DAB	Diaminobenzidin
DDR	Discoidin-Domäne-Rezeptor
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ERM	Mallassez'sche Epithelzellreste
H.E.	Hämatoxylin-Eosin
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
IL	Interleukin
kDa	Kilodalton
KO	Knockout
LPS	Lipopolysaccharide

MMP	Matrix-Metalloproteinase
PBS	<i>phosphat buffered saline</i>
PDL	Parodontalligament
pH	<i>potentia hydrogenii</i>
SPARC	<i>secreted protein and rich in cysteine</i>
TBS	<i>tris-buffered saline</i>
TBS-T	<i>tris-buffered saline und Tween 20</i>
TGF- β	<i>transforming-growth-factor β</i>
TNF	Tumornekrosefaktor
WT	Wildtyp
ZEZ	zelluläres Eigenfaserzement
ZGZ	zelluläres Gemischtfaserzement

1 Einleitung

In der vorliegenden Arbeit wurden Wildtyp (WT)-Mäuse und DDR1-Knockout (KO)-Mäuse mit *Porphyromonas gingivalis* behandelt, um so eine Parodontitis zu erzeugen. Der Nachweis der Parodontitis wurde mithilfe immunhistochemischer Reaktionen im parodontalen Gewebe durchgeführt.

In der folgenden Einleitung werden der Aufbau des Parodontiums, die pathologischen Vorgänge der Parodontitis und die Möglichkeit der zur Verfügung stehenden Tiermodelle beschrieben.

1.1 Das Parodontium

Das Parodontium (par = um, herum; odontos = der Zahn) besteht aus den zwei Hartgeweben Knochen und Zement und den zwei weichen Komponenten Parodontalligament (PDL) und Gingiva. Gemeinsam dienen sie dem Erhalt der Funktion der Zähne (Bartold und Narayanan 2006). Die Eigenschaften dieser speziellen Strukturen tragen zur speziellen Funktion des Parodontiums bei (Nanci und Bosshardt 2006). Zu seinen Aufgaben zählen die Verankerung der Zähne im Knochen, die Dämpfung der Kaukräfte, die Abwehr äußerer Noxen und die Trennung zwischen Mundhöhlenmilieu und Zahnwurzel (Hellwig et al. 2009).

1.1.1 Die Gingiva

Die Gingiva (Zahnfleisch) ist Bestandteil der Mundschleimhaut, zählt aber auch zum Zahnhalteapparat in Form des marginalen Parodonts (Schroeder 2000). Zusammen mit der Gaumenschleimhaut bezeichnet man sie als mastikatorische Mukosa. Die Gingiva wird topografisch in eine freie, befestigte und interdentale Gingiva unterteilt. Die mukogingivale Grenze entlang des vestibulären und lingualen Alveolarkamms grenzt die hellrosa erscheinende befestigte Gingiva von der dunkelroten, frei beweglichen Alveolarschleimhaut ab (Schroeder und Listgarten 1997). Die Interdentalpapille füllt den Raum zwischen den Approximalflächen benachbarter Zähne aus. Die margi-

nale Gingiva verbindet zwei Interdentalpapillen und umschließt den Zahn. Sie folgt ca. 0,5 - 2 mm koronal der Schmelz-Zement-Grenze in Form einer Girlande. Sie erstreckt sich vom Gingivalsaum bis zur gingivalen Furche (Mutschelknauss 2000).

Das gingivale Epithel kann in drei Typen eingeteilt werden: das orale Gingivaepithel, das Sulkusepithel und das Saumepithel. Das orale Gingivaepithel erstreckt sich von der mukogingivalen Grenzlinie bis zum Gingivalrand und ist nochmals in die freie marginale Gingiva und befestigte Gingiva unterteilt.

Es ist ein mehrschichtiges, verhorntes Plattenepithel, bestehend aus vier Schichten: Stratum basale, Stratum spinosum, Stratum granulosum, Stratum corneum.

Das Stratum basale liegt der Basalmembran direkt auf, welche das Epithel von dem darunter liegenden Bindegewebe trennt. Die Zellen dieser Schicht sind Keratinozyten. Sie sind mitotisch aktiv und dienen der ständigen Epithelerneuerung.

Das Stratum spinosum besteht aus sich differenzierenden polygonalen Zellen und stellt die dickste Schicht aller Epithelschichten dar. Zur Oberfläche hin werden die Zellen flacher und es sind erste Keratohyalin granula im Zytoplasma zu erkennen. Die Zellen gehen in das Stratum granulosum über.

Im Stratum corneum, der oberflächlichsten Schicht, sind die Zellen abgeflacht, liegen eng aneinander und die Zellkerne sind verschwunden.

Das Sulkusepithel reicht vom Gingivalrand bis zum Saumepithel. Es kleidet den Sulcus gingivalis aus und verläuft girlandförmig bis zu 0,5 mm tief um den Zahn herum. Die zelluläre Struktur und Zusammensetzung ähnelt der des oralen Gingivaepithels (Bartold et al. 2000).

Das Saumepithel erstreckt sich vom Sulkusboden bis zur Schmelz-Zement-Grenze. Interdental bilden die Saumepithelien benachbarter Zähne die epitheliale Auskleidung des interdentalen Col (Schroeder 2000). Dieses spezialisierte Epithel variiert in seiner Dicke. So besteht es apikal aus nur wenigen Zelllagen, weiter koronal aus 15-30 Zelllagen. Das Saumepithel besteht aus zwei Schichten: das Stratum basale und das Stratum suprabasale. Die Epithelzellen des Stratum basale differenzieren sich schnell, während die Zellen des Stratum suprabasale mitotisch inaktiv sind (Bartold et al. 2000). Zwischen Saumepithel und Zahnoberfläche besteht ein epithelialer Haft-

mechanismus, der Epithelansatz. Dabei bilden die Epithelzellen eine Basallamina und heften sich mit Hemidesmosomen an das benachbarte Gewebe an (Schroeder 2000). Weitere Aufgaben sind der Stofftransport zwischen dem gingivalen Bindegewebe und der Mundhöhle sowie die Beteiligung an der Immunantwort des Wirtes gegen eine bakterielle Infektion (Bartold et al. 2000).

1.1.2 Das Wurzelzement

Zement ist ein hartes nichtvaskularisiertes Gewebe, das die Zahnwurzel ummantelt (Nanci und Bosshardt 2006). Die Hauptaufgabe des Zements ist die Verankerung der Kollagenfasern des PDLs an der Zahnoberfläche. Es ist somit Teil des Zahnes als auch des Parodontiums. Zusätzlich besitzt Zement adaptive und reparative Fähigkeiten (Bosshardt und Selvig 1997).

Zement besteht zu etwa 45% bis 50% aus Hydroxylapatit (anorganischer Teil) und etwa 50% aus kollagenen und nicht-kollagenen Proteinen (organischer Teil) (Nanci 2003). Der organische Teil wird wiederum zu 90% aus Kollagen Typ I und III gebildet (Bartold und Narayanan 2006).

Es lassen sich vier Zementtypen einteilen, die an unterschiedlichen Stellen der Zahnwurzel vorkommen. Sie unterscheiden sich in ihrem Gehalt an Zementozyten und Kollagenfasern:

Azelluläres afibrilläres Zement (AAZ) bedeckt kleinere Bereiche des Schmelzes, insbesondere entlang der Schmelz-Zement-Grenze. Es besteht aus einer mineralisierten Matrix, besitzt jedoch weder Kollagenfasern noch eingelagerte Zellen. Das Fehlen von Kollagenfasern deutet daraufhin, dass AAZ an der Verankerung der Zähne nicht beteiligt ist (Bosshardt und Selvig 1997).

Azelluläres fibrilläres Zement (AFZ) ist vorwiegend den zervikalen und mittleren Wurzelabschnitten aufgelagert. Die Kollagenfasern inserieren mit extrem hoher Dichte in das AFZ. Dies zeigt die signifikante Rolle, die AFZ bei der Verankerung der Zähne spielt (Bosshardt und Selvig 1997).

An den Stellen der Wurzeloberfläche, wo sich kein AFZ angelagert hat, findet sich zelluläres Eigenfaserzement (ZEZ). Dieses Zement enthält von Zementoblasten gebildete Kollagenfasern. Es ist auch als einziges Zement in der Lage, Defekte, die durch Resorption entstanden sind, zu reparieren (Hassell 1993).

Durch Überlagerungen von AFZ und ZEZ entsteht zelluläres Gemischtfaserzement, das auf die apikale Wurzel und die Furkationen beschränkt ist (Bosshardt und Selvig 1997).

1.1.3 Der Alveolarknochen

Die Alveolarfortsätze sind Verlängerungen der Ober- und Unterkiefer. Sie sind zahnabhängige Strukturen, denn die Zähne sind in diese knöchernen Alveolen eingebaut (Hassell 1993). Die knöchernen Anteile der Ober- und Unterkiefer, in denen die Zahnwurzeln eingelassen sind, werden als Alveolarfortsatz bezeichnet. Der Alveolarfortsatz besteht außen (bukkal, lingual und palatinal) aus einer Kortikalisplatte aus kompaktem Knochen, zentral aus Spongiosa und innen aus einer stark durchlöcher-ten Knochenplatte, dem Alveolarknochen. Am Alveolarkamm treffen Alveolarknochen und Kortikalisplatte aufeinander (Nanci und Bosshardt 2006).

Aufgrund von inserierenden Sharpey-Fasern zeigt die Alveolarwand eine doppel-fibrilläre Orientierung. Sharpey-Fasern der äußeren Schicht verlaufen senkrecht zur Knochenoberfläche. Desmodontale Fibroblasten bilden das Kollagen dieser Fasern. Im Knochen werden sie mineralisiert, die Peripherie der Fasern wird hyperminerali-siert, das Innere hypomineralisiert. Das innen liegende fibrilläre Netzwerk, das von Osteoblasten zwischen den Sharpey-Fasern gebildet wird, liegt unregelmäßig ange-ordnet und ist weniger dicht. Diese spezielle Art von Knochen mit seiner doppelten Faserorientierung wird als Bündelknochen bezeichnet (Saffar et al. 1997).

1.1.4 Das Parodontalligament

Als PDL wird das weiche, spezialisierte Bindegewebe zwischen Wurzelzement und Alveolarknochen bezeichnet. Die Breite des PDLs liegt zwischen 0,15 und 0,38 mm.

Das befestigt den Zahn in seinem Knochenfach, dient der Versorgung sowie dem Schutz und als Sensor bei der Mastikation (Kauakt). Eine weitere, sehr wichtige Aufgabe ist die Bereitstellung von Zellen für die Gewebemöostase und für Reparatur- bzw. Regenerationsvorgänge (Nanci und Bosshardt 2006).

Wie alle Bindegewebe, besteht auch das PDL aus einem zellulären und einem extrazellulären Teil. Den zellulären Anteil bilden Fibroblasten, Osteoblasten und Osteoklasten, Mallassez'sche Epithelzellreste (ERM), Monozyten und Makrophagen sowie undifferenzierte Mesenchymzellen, Zementoblasten und Odontoblasten. Der extrazelluläre Anteil besteht aus bindegewebigen Strukturen, hauptsächlich aus Kollagenfaserbündeln, die in eine Grundsubstanz eingebettet sind (Berkovitz 1990, Nanci und Bosshardt 2006).

Die Hauptzellen des PDLs sind Fibroblasten. Fibroblasten besitzen ein ausgedehntes Zytoplasma mit einer großen Anzahl an Organellen, welche für die Proteinsynthese und Proteinsekretion notwendig sind. Sie zeichnen sich durch eine enorm schnelle Kollagenfasersynthese aus. Die Kollagenfasern der Faserbündel werden fortlaufend umgestaltet. Die Fibroblasten des PDLs sind in der Lage, gleichzeitig sowohl Kollagen zu synthetisieren als auch abzubauen (Nanci und Bosshardt 2006).

Die Epithelzellen des PDLs sind Reste der Hertwig'schen Wurzelreste und werden als ERM bezeichnet. Die ERM-Zellen sind kleine Ansammlungen von Epithelzellen innerhalb des PDLs (Rincon et al. 2006). Sie liegen netzwerkartig (*network shaped manner*) entlang der Wurzeloberfläche und im Furkationsbereich (Becktor et al. 2007). Die genaue Funktion der ERM-Zellen ist noch nicht geklärt. Es wird unter anderem eine Beteiligung an der Reparatur und Regeneration von Zement diskutiert (Rincon et al. 2006).

Die undifferenzierten mesenchymalen Zellen oder Progenitorzellen sind ein weiterer wichtiger Bestandteil des PDLs. Sie spielen bei der parodontalen Wundheilung und bei der Knochen- und Zementregeneration eine entscheidende Rolle (Beertsen et al. 1997, Nanci und Bosshardt 2006).

Die Faseranteile bestehen größtenteils aus Kollagen-Typ I und zu einem kleineren Teil, etwa 20 %, aus Kollagen-Typ II (Birkedal-Hansen et al. 1977, Huang et al. 1991). Zusätzlich finden sich Kollagenfasern vom Kollagen-Typ V, VI und XII sowie ein kleiner Anteil an Mikrofibrillen (Becker et al. 1991, Karimbux et al. 1992).

Die meisten dieser Kollagenfasern lagern sich zu Faserbündeln zusammen. Die äußeren Enden dieser Bündel inserieren in Zement oder Knochen. Diese so verankerten Anteile werden als Sharpey-Fasern bezeichnet. Sie sind ganz oder teilweise mineralisiert (Nanci und Bosshardt 2006).

Oxytalanfasern sind ein eigenständiger, abgegrenzter Fasertyp und zählen zu den elastischen Fasern. Sie verlaufen entlang der Kollagenfasern und inserieren im Alveolarknochen und Zement. Einige Oxytalanfasern stehen mit Nervenfasern, Blut- und Lymphgefäßen in Verbindung, was auf eine regulatorische Funktion hinweisen könnte (Fullmer et al. 1974).

Neben den Kollagenen enthält die EZM des PDLs noch weitere Proteine. Dazu zählen mehrere Proteoglykane (PG). Dies sind extrazelluläre und an der Zelloberfläche vorkommende Makromoleküle. Sie bestehen aus einem zentralen Protein (*core protein*) an das bis zu 100 Kohlenhydratgruppen, Glykosaminoglykane, gebunden sind. Hyaluronan, Chondroitin-Sulfat, Dermatan-Sulfat und Heparan-Sulfat sind die häufigsten Glykosaminoglykane. Die Größe des zentralen Proteinfadens reicht von 200 bis 400 kDa. Sie steuern Adhäsion und Zellwachstum, bilden Komplexe und können Wachstumsfaktoren binden (Hakkinen et al. 1993, Zimmermann und Ruoslahti 1989). Im PDL handelt es sich dabei um Decorin, Biglykan, Versican und CD 44 (Hakkinen et al. 1993). Decorin kann Verbindungen mit Kollagen Typ I bis Typ VI eingehen. Die größte Affinität besteht dabei mit Kollagen Typ VI. So scheint die Bindung zwischen Decorin und Kollagen Typ VI wesentlich für die Organisation der EZM zu sein. Decorin konnte immunhistochemisch auch im Bereich der Basalmembran nachgewiesen werden. Somit verbindet Decorin die Basalmembran mit dem Bindegewebe (Bidanset et al. 1992). In Versuchen mit Decorin-KO-Mäusen konnte die Rolle von Decorin bei der Organisation von Kollagen gezeigt werden (Hakkinen et al. 2000).

Biglykan kommt vor allem in sich entwickelnden Geweben und auf der Zelloberfläche von verschiedenen Bindegewebs- und Epithelzellen vor (Bianco et al. 1990). Biglykan wird im PDL stärker exprimiert als im Gingivagewebe. Eine wesentliche Rolle spielt hierbei der Transforming-growth-factor β (TGF- β). Es konnte gezeigt werden, dass TGF- β die Expression von Biglykan und Versican hochreguliert und die Decorin-Expression herunterreguliert (Kahari et al. 1991). Die Funktionen von Biglykan sind noch nicht vollständig geklärt (Hakkinen et al. 1993).

Versican, ein großes Chondroitin-Sulfat-PG, ist in der Tiefe des PDLs zwischen Kollagenfaserbündeln zu finden (Hakkinen et al. 1993). Das zentrale Protein besitzt eine Bindungsstelle für Hyaluronan, mit dessen Hilfe ein riesiges Volumen erzeugt werden kann (Zimmermann und Ruoslahti 1989). Diese Eigenschaft führt zur hohen Druckelastizität des gesamten PDLs (Gallagher 1989). CD 44 kann auf dem Schleimhautepithel und auf Fibroblasten der Gingiva und des PDLs nachgewiesen werden. Es tritt im Bereich von Zell-Zell-Kontakten auf (Hakkinen et al. 1993). CD 44 ist ein Rezeptor für Hyaluronan, Kollagen, Fibronectin und Osteopontin (Aruffo et al. 1990, Jalkanen und Jalkanen 1992, Weber et al. 1996).

Unter den Glykoproteinen konnten Undulin, Fibronectin und Tenascin von Zhang et al. (1993) nachgewiesen werden. Undulin steht in enger Beziehung zu Kollagen Typ I, III, V und VI und ist somit an der funktionellen und strukturellen Organisation der Kollagenfasern zu flexiblen Faserbündeln in Form eines flexiblen Ankers beteiligt (Zhang et al. 1993). Tenascin wird vor allem während des physiologischen als auch des pathologischen Wachstums gebildet und kommt somit im gesunden Erwachsenen eher selten vor (Lukinmaa et al. 1991). Es konnte im Gegensatz zu Undulin und Fibronectin in weniger dichten Gewebegebieten des PDLs nachgewiesen werden. Diese aufgelockerten Gewebebereiche ermöglichen die Einwanderung von Fibroblasten (Zhang et al. 1993). Fibronectin kann sowohl im Plasma als auch im interstitiellen Gewebe vorkommen. Es beteiligt sich an der Blutkoagulation, der Wundheilung und der Chemotaxis. Im Gewebe ist Fibronectin weit verbreitet und dient der Zellhaftung und der kollagenen Architektur (Zhang et al. 1993). Tenascin und Fibronectin werden gemeinsam in den Bereichen der Zement- und Knochenbildung exprimiert und regu-

lieren hier Zelldifferenzierung. Sie nehmen somit Einfluss auf die Gewebestruktur (Lukinmaa et al. 1991).

Weitere Glykoproteine im PDL sind Vitronectin, Osteonectin (*Secreted protein and rich in cysteine = SPARC*) und Bone Sialoprotein (BSP). Vitronectin kommt gemeinsam mit Fibronectin in Granulationsgewebe, neu gebildetem PDL, Zement und Knochen vor. SPARC kann ebenfalls in neu gebildetem PDL, Zement und Knochen nachgewiesen werden. BSP ist hingegen auf Zement und Knochen beschränkt.

Fibronectin und Vitronectin beeinflussen Reparatur- und Regenerationsprozesse des PDLs (Matsuura et al. 1995, Steffensen et al. 1992).

Im PDL kommen auch Syndecan 1, 2 und 3 sowie Glypican und Betaglykan vor. Es handelt sich dabei um Transmembranproteine an der Zelloberfläche. Sie sind Bindungsstelle für Wachstumsfaktoren und nehmen somit direkt Einfluss auf die Wachstumsvorgänge von Zellen. Sie spielen auch eine entscheidende Rolle bei der Gewebemöostase, Reparatur- und Regenerationsvorgängen (Worapamorn et al. 2000). Syndecan 1 und Syndecan 2 konnten während der Wundheilung nachgewiesen werden. Syndecan 1 wurde speziell im Saumepithel zu Beginn der Wundheilung exprimiert, Syndecan 2 hingegen im späteren Wundheilungsstadium in den neugebildeten Kollagenfibrillen im Bereich der Wurzeloberfläche und des Alveolarknochens. Syndecan 1 beeinflusst somit die Zell-Zell- als auch die Zell-Matrix-Interaktionen, Syndecan 2 die Zell-Matrix-Interaktionen bei der Bildung von Hartgewebe (Worapamorn et al. 2002).

Eine weitere Gruppe der PG stellen die kleinen leucinreichen PG dar. Im PDL sind das Fibromodulin und Lumican. Auch das oben erwähnte Decorin gehört dieser Gruppe an. Sie koordinieren den Aufbau der Kollagenfibrillen und die Organisation der Kollagenfasern zu Bündeln (Matheson et al. 2005). Über die Funktionen dieser kleinen leucinreichen PG im PDL ist noch wenig bekannt (Barczyk et al. 2013).

Integrine sind Proteine, die auf der Oberfläche von Fibroblasten, Osteoblasten und weiteren Zellen des PDLs sitzen (Steffensen et al. 1992). Sie gelten als Organisatoren der EZM und vermitteln Gewebsregeneration. Im pathologischen, verletzten Parodontium ist die Neuorganisation des neugebildeten Gewebes essenziell, um wieder

eine physiologische Struktur zu erhalten. Weitere Funktionen der Integrine, wie die Aktivierung von TGF- β und die Regulation von Matrix-Metalloproteinasen (MMP) werden diskutiert (Barczyk et al. 2013).

1.2 Parodontitis

1.2.1 Definition und Bedeutung der Parodontitis

Grundsätzlich lassen sich beim Zahnhalteapparat zwei Erkrankungen unterscheiden: die Gingivitis und die Parodontitis. Erstere ist die Entzündung der Gingiva Rückgang des zahntragenden Gewebes. Die Erkrankung ist auf die Weichgewebsanteile, das Gingivaepithel und das Bindegewebe begrenzt. Bei der Parodontitis handelt sich um die Entzündung des gesamten Zahnhalteapparates (Cekici et al. 2014). Klinische Zeichen einer Parodontitis sind Verlust der parodontalen Verankerung (Attachmentverlust = in mm angegebene Strecke zwischen Schmelz-Zement-Grenze und dem Boden der Zahnfleischtasche), Alveolarknochenverlust, parodontale Taschen und Entzündung der Gingiva. Zusätzlich können Zahnfleischrezessionen, Zahnfleischbluten, erhöhte Beweglichkeit und schlussendlich der Zahnverlust auftreten (Flemmig 1999).

Laut der „Vierten Deutschen Mundgesundheitsstudie“ aus dem Jahre 2006 leiden mehr als die Hälfte der 35- bis 44-Jährigen unter einer mittelschweren und 20,5 % an einer schweren Parodontitis. Unter den Senioren ist die Parodontitis am weitesten verbreitet. 48 % sind von einer mittelschweren und 39,8 % von einer schweren Ausprägung der Krankheit betroffen. Insgesamt konnte in allen Altersgruppen eine Zunahme der Prävalenz im Vergleich zu 1997 festgestellt werden. Dies ist durch einen Rückgang der Zahnverluste im selben Zeitraum zu erklären (DMS IV 2006).

1.2.2 Ätiologie und Pathogenese

Parodontitis ist eine chronisch-entzündliche Erkrankung des Zahnhalteapparats multifaktorieller Genese. Die Entzündung wird durch koloniebildende gram-negative und anaerobe Bakterien, die in Form eines subgingivalen Biofilms auftreten, ausgelöst. Sowohl die direkten Effekte der Bakterien auf das Gewebe als auch die selbstschä-

digende Immunantwort des Wirtes führen zum Fortschreiten der Erkrankung (Sharma 2010, Socransky et al. 1998).

Es lassen sich verschiedene Arten der Parodontitis klassifizieren, die sich in Ätiologie, Krankheitsverlauf und Therapieerfolg unterscheiden. Allen liegt jedoch die gleiche Pathogenese zu Grunde. So entsprechen sich die histopathologischen und ultrastrukturellen Merkmale. Die Vorgänge bei der Gewebsschädigung und die Heilungs- und Regenerationsprozesse der unterschiedlichen Parodontitisformen unterscheiden sich jedoch sehr (Page et al. 1997).

Page und Kornman fassten 1997 die neuesten Erkenntnisse über die Pathogenese zusammen. So lassen sich die Abläufe bei der Entstehung der Parodontitis in vier Pfeiler aufgliedern:

- Entstehung eines subgingivalen Biofilms aus pathogenen Mikroorganismen
- Entzündungsreaktion und Immunantwort des Wirtes
- Metabolismus von Bindegewebe und Knochen
- klinisches Krankheitsbild, Attachmentverlust

Entzündungsreaktion, Immunantwort und der Bindegewebs- und Knochenmetabolismus des Wirtes können durch bestimmte Faktoren zusätzlich negativ beeinflusst werden. Dies können einmal intrinsische, also genetische Risikofaktoren und umweltbedingte oder erworbene Risikofaktoren, z.B. Rauchen oder systemische Erkrankungen sein (Page und Kornman 1997).

Auf der frisch geputzten Zahnoberfläche entsteht schon nach kurzer Zeit ein Biofilm. Es entsteht ein sogenanntes erworbenes Pellikel (*acquired pellicle*), das aus Proteinen und Glykoproteinen besteht, die über den Speichel und die Sulkusflüssigkeit sezerniert werden. Das Pellikel bildet die Grundlage für die Bakterienbesiedelung (Darveau et al. 1997, Kolenbrander und London 1993).

Die Bakterien innerhalb eines Biofilms sind in der Lage Informationen auszutauschen und eine komplexe Matrix aufzubauen, in der optimale Bedingungen für das Wachstum der Bakterien herrschen. In dieser Matrix können der pH, der Sauerstoffgehalt und das Nährstoffangebot enorm variieren (Page et al. 1997). Man unterscheidet zwei unterschiedliche Formen des dentalen Biofilms: Supragingivaler Biofilm bildet

sich oberhalb des Gingivalrandes, subgingivaler unterhalb davon. Ihre bakterielle Zusammensetzung unterscheidet sich deutlich voneinander. Der subgingivale Biofilm ist durch seine Lage vor Abrasion (z.B. durch Mundhygienemaßnahmen) und vor der Abwehrfunktion des Speichels geschützt und wird durch die Sulkusflüssigkeit mit Nährstoffen versorgt (Darveau et al. 1997). Die Sulkusflüssigkeit beinhaltet allerdings auch Komplementfaktoren, Antikörper und alle weiteren im Blut vorhandenen Kontroll- und Abwehrsysteme. Trotzdem überleben und gedeihen die Bakterien: Sie breiten sich entlang der Wurzeloberfläche nach apikal und zur Seite aus und führen zur Gewebszerstörung und Vergrößerung der Tasche (Page et al. 1997). Ein Biofilm bietet den Bakterien somit optimale Bedingungen und Schutz vor der Immunantwort des Wirts (Darveau et al. 1997). Hinzu kommt eine außergewöhnlich hohe Resistenz gegen Antibiotika und andere antimikrobielle Agenzien (Page et al. 1997).

Die Bakterien des Biofilms wurden von Socransky untersucht und in fünf Komplexe eingeteilt. Zum ersten Komplex zählen *Treponema denticola*, *Porphyromonas (P.) gingivalis* und *Tannerella forsythia*. Der zweite Komplex besteht aus *Fusobacterium nucleatum subspecies*, *Prevotella intermedia*, *Peptostreptokokkus micros* und mit diesem Komplex assoziierten Bakterien: *Campylobacter rectus*, *Campylobacter showae*, *Campylobacter gracilis*, *Eubacterium nodatum* und *Streptokokkus constellatus*. Zum dritten Komplex zählt eine Gruppe von Streptokokken (S.): *S. mitis*, *S. oralis* und *S. sanguis*. Der vierte Komplex wird von *Capnocytophaga*-Spezies, *Eikenella corrodens* und *Actinobacillus (A.) actinomycetemcomitans*. Der letzte Komplex besteht aus *Veillonella parvula* und *Actinomyces odontolyticus* (Socransky et al. 1998).

Nach den Postulaten von Socransky und Haffajee (2005) treten die Komplexe in einer bestimmten Reihenfolge auf. Jeder Komplex kann einem bestimmten Stadium der Parodontitis zugeteilt werden. Es gibt bestimmte Bakterien, die als erste im Biofilm vorkommen. Zu ihnen zählen die Komplexe drei, vier und fünf. Sie sind die sogenannten Erstsiedler und bereiten ein passendes Milieu für die nachfolgenden Keime vor. Zum einen kann die ansässige Bakterienart ihre Umgebung so verändern, dass sie durch Bakterien ersetzt wird, die besser in diese Umgebung passen. Zum ande-

ren kann sich die Umgebung durch nichtmikrobielle Faktoren verändern, beispielsweise durch Veränderung der chemischen oder physikalischen Eigenschaften des Milieus oder durch Veränderungen seitens des Wirts. So kann sich z.B. das Nährstoffangebot oder der Sauerstoffgehalt zugunsten einer anderen Bakterienart verändern. Im Falle der Parodontitis sind dies die Bakterien der Komplexe eins und zwei. Diese Bakterien führen zu einer Veränderung des Lebensraums, die sich klinisch als Gingivitis äußert. Die Gingivitis wiederum führt zur Ansiedlung weiterer Keime aller Gruppen, was zu einem immer destruktiveren Kreislauf führt (Socransky und Haffajee 2005). Die Bakterien des ersten Komplexes, also *P. gingivalis*, *Treponema denticola* und *Tannerella forsythia* verursachen die meisten Parodontitiden. Diese Bakterien korrelieren mit der Ausprägung der Taschentiefe. (Socransky et al. 1998). In vielen Studien konnte der Zusammenhang zwischen der Schwere der Parodontitis und dem Vorhandensein der drei genannten Keime gezeigt werden (van Winkelhoff et al. 2002, Yang et al. 2004).

1.3 *Porphyromonas gingivalis*

P. gingivalis in einer parodontalen Tasche beeinflusst den Verlauf der destruktiven Parodontitis und ist klinisch immer mit einer erhöhten Taschentiefe verbunden (Kawada et al. 2004, van Winkelhoff et al. 2002). Die Entfernung von *P. gingivalis* durch eine Parodontalbehandlung kann zum Rückgang der Parodontitis führen (Bostanci und Belibasakis 2012, Fujise et al. 2002, Haffajee et al. 1997).

P. gingivalis ist ein schwarz-pigmentiertes, unbewegliches, gram-negatives, stäbchenförmiges und anaerobes Bakterium. Für sein Wachstum benötigt *P. gingivalis* ein anaerobes Milieu und zusätzlich Hämine und Vitamin K als Nährstoffe. *P. gingivalis* ist in der Lage Aminosäuren zu verstoffwechseln. Damit hat dieser Keim die optimale Voraussetzung in Parodontaltaschen zu überleben, in die Zucker nur schwer gelangen können (Bostanci und Belibasakis 2012).

P. gingivalis verfügt über eine Reihe von Virulenzfaktoren, die seine hohe Pathogenität erklären. *P. gingivalis* ist in der Lage, in die Wirtszellen einzudringen und auch in ihr zu überleben. Diese Invasionstaktik ist bei vielen Bakterien bekannt und bietet

Schutz vor dem Immunsystem des Wirts (Finlay und Falkow 1997). Der Invasionsmechanismus wird im Falle von *P. gingivalis* durch Adhäsine wie Fimbrien und Hämagglutinin ermöglicht (Lamont und Jenkinson 1998). Fimbrien bestehen aus dem multifunktionalen Protein FimA. Dieses Protein ist in der Lage mit der EZM, anderen Bakterien und den Zellen des angeborenen Immunsystems zu kommunizieren (Wang et al. 2007).

P. gingivalis trägt auf seiner Hülle wie alle gram-negativen Bakterien Lipopolysaccharide (LPS). LPS sitzen auf der äußeren Membran und können beim Wirt intrazelluläre Signale auslösen (Bostanci und Belibasakis 2012). LPS aktivieren über Tumornekrosefaktoren (TNF) und IL-1 Osteoklasten und führen damit zu Knochenresorption (Chiang et al. 1999). In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass *P. gingivalis* in vitro die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen, wie z. B. IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-18 und TNF- α in Monozyten stimuliert (Bostanci et al. 2007, Hamedi et al. 2009, Zhou et al. 2005).

Manche *P. gingivalis*-Stämme besitzen eine Kapsel, die sogenannte CPS (*capsular polysaccharide*) (Farquharson et al. 2000, Holt et al. 1999). Es konnten einige Unterschiede zwischen Bakterienstämmen bezüglich des Vorhandenseins einer Kapsel gezeigt werden. So verursachen Stämme, die eine Kapsel besitzen phlegmonöse, sich ausbreitende Entzündungen, während Stämme ohne eine Kapsel weniger starke Entzündungen hervorrufen (Laine und van Winkelhoff 1998). Die Kapsel schützt *P. gingivalis* auch vor Phagozytose durch polymorphkernige Leukozyten (Sundqvist et al. 1991).

P. gingivalis sezerniert eine ganze Reihe proteolytischer Enzyme. Dazu zählen z.B. Endopeptidasen, Aminopeptidasen, Carboxypeptidasen, Oligopeptidasen und Kollagenasen (Potempa et al. 2000). Die wichtigste Protease, die *P. gingivalis* sezerniert ist Gingipain, eine Cystein-Endopeptidase. Der Name wird aus *P. gingivalis* und Clostripain gebildet. Es lassen sich argininspezifische und lysinspezifische Gingipaine unterscheiden (Sheets et al. 2008). Sie sind für 85 % der proteolytischen Aktivität durch *P. gingivalis* verantwortlich (Potempa et al. 1997) und besitzen trypsinähnliche Aktivität (Potempa et al. 1995). Gingipaine können auf verschiedene Art und Weise die

Immunantwort beeinflussen und diese sogar unterbinden (Bostanci und Belibasakis 2012). So spalten sie z.B. die T-Zell-Oberflächenproteine CD 4 und CD 8 und deaktivieren so die T-Zellen (Kitamura et al. 2002).

1.4 Immunantwort des Wirts

Eine Entzündung ist die physiologische Antwort des Immunsystems auf einen bestimmten Reiz. Diese Reize können z.B. Hitze, chemische Substanzen oder bakterielle Infektionen sein (Cekici et al. 2014). Antigene und andere Virulenzfaktoren lösen eine sofortige Entzündung und Immunantwort aus. Bei der Immunantwort kommt es zur Ausschüttung von Zytokinen, Eicosanoiden, Kininen, komplementaktivierenden Produkten und MMPs, die alle die Gewebs- und Knochenzerstörung nach sich ziehen (Page und Kornman 1997).

Die Immunantwort geschieht zum einen auf zellulärer Basis zum anderen humoral. Außerdem unterscheidet man das angeborene, unspezifische vom erworbenen, spezifischen Immunsystem (Zadeh et al. 1999). Der Entzündungsprozess beginnt mit einer initialen Antwort ortsständiger Leukozyten und der Epithelzellen auf den bakteriellen Biofilm. Die Epithelzellen produzieren Zytokine und Neuropeptide, die eine lokale Vasodilatation auslösen. Die Ausschüttung von Chemokinen führt zur Einwanderung von neutrophilen Granulozyten in das Entzündungsgewebe. Im Verlauf wandern Makrophagen, Lymphozyten, Plasmazellen und Mastzellen ins Gewebe ein und das Komplementsystem wird aktiviert. Nun sind erste Anzeichen einer Gingivitis, wie z.B. eine Zahnfleischblutung zu sehen. Auf diese initiale Läsion folgt die etablierte Läsion, die sich durch das Vorhandensein von Makrophagen, Plasmazellen sowie T- und B-Lymphozyten und Immunglobulin G auszeichnet. In diesem Stadium ist das spezifische Immunsystem also bereits aktiviert. In dieser Phase wird Stützgewebe aufgelöst. In der fortgeschrittenen Läsion sind klinisch und histologisch Attachment- und Knochenverlust zu beobachten (Cekici et al. 2014).

MMPs sind eine Familie von Endopeptidasen, die zusammen mit anderen Faktoren wie Wachstumsfaktoren, Zelloberflächenrezeptoren und anderen Proteasen Proteine der EZM zerstören können (Sternlicht und Werb 2001). Die MMPs werden in ver-

schiedene Klassen unterteilt und bisher sind über 24 verschiedene MMPs bekannt. Eine dieser Gruppen sind die Kollagenasen (MMP-1, -8, -13, -18), die maßgeblich an der Zerstörung von Weich- und Hartgeweben beteiligt sind (Golub et al. 1997, Hill et al. 1994). Speziell MMP-13 wird bei Patienten mit Parodontitis über die Sulkusflüssigkeit (Tervahartiala et al. 2000) und durch die Fibroblasten der Gingiva (Ravanti et al. 1999) exprimiert. Die bisherigen Erkenntnisse lassen eine entscheidende Rolle der MMP-13 bei den Knochenresorptionsprozessen (Hernandez et al. 2006) und der gesamten parodontalen Matrixzerstörung vermuten (Ilgenli et al. 2006). Die genauen Mechanismen der Aktivierung von MMP-13 und dessen genaue Funktion bei der Gewebszerstörung sind bisher noch nicht geklärt (Hernandez Rios et al. 2009).

1.5 Mausmodell für Parodontitis

Um die physiologischen und pathologischen Vorgänge während einer Parodontitis und die komplizierte Immunantwort des Wirts besser erforschen zu können, wurden viele Tiermodelle entwickelt. Das komplexe Geschehen kann in Zellkulturen, also *in vivo*, meist nicht so genau reproduziert werden. Die eingesetzten Tierarten sind Nagetiere, Hasen, Schweine, Hunde und Primaten. Eine Parodontitis wird dabei entweder durch eine mit Bakterien getränkte Ligatur im gingivalen Sulkus oder die einfache Gabe bzw. Impfung mit menschlichen oralen Bakterien induziert (Graves et al. 2012, Oz und Puleo 2011).

Das Gebiss von Nagern besteht aus einem Incisivus und drei Molaren in jedem Quadranten. In der Literatur wird bei Mäusen die von Baker et al. (1994) entwickelte Methode genutzt, während bei Ratten meist eine Ligatur um die Molaren gelegt wird, durch die es zur Biofilmretention kommt.

Bei der nach Baker et al. durchgeführten Methode werden den Mäusen humane Keime in die Mundhöhle appliziert. In auf diese Weise durchgeführten Versuchen konnte Knochenverlust bei den Mäusen nachgewiesen werden (Cantley et al. 2009). Außerdem konnten mit dieser Methode erhöhte Werte von TNF- α und IL-1 β gemessen werden (Polak et al. 2009).

Durch das Legen einer Ligatur um den Zahn herum, die mit parodontopathogenen Keimen getränkt ist, konnten erfolgreich Parodontitiden erzeugt werden. Dieses Modell wird vor allem bei Ratten und größeren Tieren benutzt. Die Ligatur führt zu Biofilmmakkumulation, Ulzerationen des Epithels und ermöglicht somit das Eindringen weiterer parodontopathogener Keime in das Bindegewebe (Graves et al. 2012). Nach sieben Tagen zeigte sich bereits Knochenverlust (Bezerra et al. 2002).

1.6 DDR1-Knockout-Maus

Die beiden Discoidin-Domäne-Rezeptoren (DDR) 1 und 2 gehören zur Familie der Rezeptor-Tyrosinkinasen. Discoidin, ein Lektin wurde zum ersten Mal bei Aggregationsprozessen des Schleimpilzes *Dictyostelium discoideum* beschrieben (Rosen et al. 1973, Springer et al. 1984). Die DDRs bestehen extrazellulär aus einem Discoidin-Molekül, einer einzigen transmembranen Domäne, einer Juxtamembran-Domäne und der katalytischen Kinase-Domäne (Vogel 1999). Kollagen konnte als der Ligand der DDRs identifiziert werden. Die Bindung von Kollagen an den DDR aktiviert die Tyrosinkinase (Vogel et al. 1997). Neben der Kollagenbindung führt eine Tyrosin-Autophosphorylierung zur Auslösung von Zellregulationsprogrammen, welche die Zell-Kollagen-Interaktionen regulieren (Fu et al. 2013).

DDR1 kommen in vielen Geweben von Säugetieren vor und regulieren Zelladhäsion, Migration, Proliferation und Differenzierung (Leitinger 2011). In verschiedenen Studien konnte eine Überexpression von DDR1 in Tumoren gezeigt werden, speziell im primären Brustzellkarzinom (Barker et al. 1995), aber auch in Ovarialkarzinomen (Laval et al. 1994), in Ösophagealkarzinomen (Nemoto et al. 1997) und in Hirntumoren (Weiner et al. 1996). Mäuse, denen DDR1 oder DDR2 fehlt sind zwar lebensfähig, zeigen aber Beeinträchtigungen im Wachstum und diverse andere Defekte (Carafoli und Hohenester 2013). So tritt bei DDR1-KO-Mäusen häufig Osteoarthritis im Kiefergelenk auf (Schminke et al. 2014).

1.7 Aufgabenstellung

Zentrale Aufgabenstellung der vorliegenden Arbeit ist es, ein Tiermodell für Parodontitis mit Mäusen zu etablieren sowie das Auftreten und die Intensität der Parodontitis zwischen WT-Mäusen und DDR1-KO-Mäusen zu vergleichen. Die Parodontitis soll mithilfe des Keims *P. gingivalis* bei den Mäusen induziert werden. Im Zuge dessen sollen strukturelle Unterschiede des murinen Zahnhalteapparates zwischen unbehandelten und mit *P. gingivalis* behandelten Mäusen histologisch untersucht werden. Immunhistochemische Nachweisreaktionen von Entzündungsmarkern und Kollagen Typ I und III sollen angefertigt und miteinander verglichen werden.

Des Weiteren soll gezeigt werden, ob die DDR1-KO-Maus empfänglicher für eine induzierte Parodontitis ist und somit als ein praktikables und reproduzierbares Parodontitis-Modell dienen könnte.

2 Material und Methoden

2.1 Versuchsablauf

2.1.1 Die Versuchstiere

Bei den verwendeten Versuchstieren handelte es sich um Mäuse des Stammes C57BL/6 und DDR1-KO-Mäuse desselben Stammes. Die DDR1-KO-Mäuse wurden nach der bereits veröffentlichten Methode generiert (Vogel et al. 2001). Alle Tiere entstammten dem Tierstall des Max-Planck-Instituts für Experimentelle Medizin, Hermann-Rein-Straße 3 in 37075 Göttingen. Der Pool an Versuchstieren bestand aus 16 WT-Mäusen und 16 DDR1-KO-Mäusen im Alter von 21 bis 35 Wochen.

Die Versuche wurden im Tierstall mit Sicherheitsstufe 2 im Institut für Medizinische Mikrobiologie, Kreuzberggring 57 in 37099 Göttingen durchgeführt. Die Tiere wurden gemäß den Regulierungen des Tierschutzgesetzes des Landes Niedersachsen, Deutschland, behandelt (Antrag-Nr. G11/597).

2.1.2 Anzucht von *Porphyromonas gingivalis*

Für den Versuch wurde *P. gingivalis* vom Stamm 33277 verwendet. Dieser wurde nach Rücksprache mit Frau Margarte J. Duncan vom *Forsyth Institut in Cambridge, USA*, über die *Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH* bestellt und in gefriergetrocknetem Zustand geliefert. Im Institut für Medizinische Mikrobiologie der Universitätsmedizin Göttingen wurden die Bakterien aufbewahrt und kultiviert.

Im weiteren Verlauf wurden die Bakterien unter anaeroben Bedingungen in einem Anaerobiertopf der Firma Biomerieux (GENbox anaer, Ref. 96124, Biomerieux, Nürtingen, Deutschland) kultiviert. Als Kulturmedium wurde Columbia Blut-Agar (Columbia-Agar + 5 % Schafblut, Biomerieux, Nürtingen, Deutschland) und Schaedler-Anaerobier-Agar (Oxoid Limited, Basingstoke, UK) verwendet. Um das Wachstum des strikt anaeroben Keims *P. gingivalis* zu verbessern, wurde diesen Kulturmedien

noch Thioglycolat (Thermo Scientific Oxoid, Schwerte, Deutschland) zugesetzt. Thioglycolat senkt als reduzierende Substanz das Redoxpotenzial des Mediums und verhindert so die Bildung von toxischen freien Sauerstoffradikalen. Die sehr langsam wachsenden Bakterien stellten sich nach vier Tagen als schwarze Kolonien auf dem Blut-Agar dar. Um *P. gingivalis* in ausreichender Menge zur Verfügung zu haben, wurden die Bakterien einmal in der Woche auf vier neue Agarplatten überimpft und subkultiviert.

Um für jede Inokulation die gleiche Bakteriendichte zu erhalten, wurde eine Dichte von 10^9 koloniebildenden Einheiten pro Inokulationsprobe festgelegt.

2.1.3 Antibiotiose und Gabe von *Porphyromonas gingivalis*

Vor Beginn der *P. gingivalis*-Gabe bekamen alle Mäuse eine Antibiotiose über 10 Tage mit Kanamycin (Kanamycinsulfat, A1493,0025, AppliChem, Darmstadt Deutschland) verabreicht, um alle endogenen Bakterien zu beseitigen. Hierfür wurden 500 mg Kanamycin in 500 ml Trinkwasser aufgelöst und den Mäusen ad libitum gegeben. Darauf folgte eine 4-tägige Antibiotika-freie Periode.

Die Mäuse wurden nach einer von Cantley et al. (2009) vorgestellten Methode mit *P. gingivalis* behandelt. Dazu wurde eine Suspension aus 10^9 Colony Forming Units (CFU) lebenden Bakterien in 100 μ l PBS und 2 % Carboxymethylcellulose (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) mithilfe von Microbrush Applikatoren (HS-Roundtips, Henry Schein) in die Mundhöhle eingebracht und speziell auf den Molaren verteilt.

Die WT-Mäuse und die DDR1-KO-Mäuse wurden jeweils in eine behandelte Gruppe (n=12) und eine unbehandelte Gruppe (n=4) eingeteilt. Die Mäuse der behandelten Gruppe bekamen jeden zweiten Tag über eine Dauer von sechs bzw. zwölf Wochen *P. gingivalis* verabreicht. Im selben Zeitraum bekamen die Mäuse der unbehandelten Gruppe nur Carboxymethylcellulose verabreicht und stellten somit die Kontrollgruppe dar.

2.2 Gewebepräparation

Nach Abschluss der P. gingivalis-Gabe wurden die Tiere durch zervikale Dislokation getötet. Anschließend wurden die Ober- und Unterkiefer herauspräpariert und das Weichgewebe entfernt. Die Molaren aller vier Quadranten wurden voneinander getrennt, um möglichst kleine Präparate zu erhalten und so die anschließende Entkalkung zu beschleunigen.

2.3 Fixierung

Die Präparate wurden über Nacht im Kühlraum bei 4°C in gepuffertem Formalin nach Lillie fixiert. Das Fixans wurde anschließend unter fließendem Leitungswasser für 15 Minuten abgespült.

Gepuffertes Formalin nach Lillie (3,7%)

20 ml 37 % Formaldehyd (Bestellnummer P733.3, Roth, Karlsruhe, Deutschland) und 66,6 ml 0,3 M Sörensen-Puffer mischen und mit Aqua dest. auf 200 ml auffüllen.

0,3M Sörensen-Puffer:

Lösung A:

41,37 g 0,3 M Kaliumhydrogenphosphat (Bestellnummer 3904-1, Roth, Karlsruhe, Deutschland) in 500 ml Aqua dest. lösen.

Lösung B:

85,18 g 0,3 M Dinatriumhydrogenphosphat (Bestellnummer A3599,0500, Appli-Chem, Darmstadt, Deutschland) in 2000 ml Aqua dest. lösen.

Um 100 ml Sörensen-Puffer herzustellen werden 18,2 ml der Lösung A und 81,8 ml der Lösung B miteinander vermischt und ein pH von 7,4 eingestellt.

2.4 Entkalkung

Die Entkalkung erfolgte in 20 % EDTA (pH 7,4) auf einem Wippschüttler (Elmi DRS-12, Riga, Lettland) in 15 ml fassenden Falcon-Tubes (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) für etwa fünf Wochen. Das verwendete EDTA wurde aus 895 ml Aqua dest. in 105 ml 5 N NaOH und 200 g EDTA (AppliChem, Darmstadt, Deutschland) bei 70 °C unter pH-Kontrolle hergestellt. Das EDTA wurde in der ersten Woche jeden Tag gewechselt, anschließend jeden zweiten Tag. Die Entkalkung wurde solange durchgeführt bis die Nadelprobe positiv war. Vor der Einbettung wurden die Präparate über Nacht in 70 % Ethanol gelagert.

2.5 Einbettung in Paraffin

Die Einbettung erfolgte im Einbettautomaten (Duplex Processor, Shandon Southern Products LTD, Runcorn, England) nach dem Protokoll in Tabelle 1.

Tabelle 1: Protokoll der Gewebedehydrierung und Überführung in Paraffin

Reihenfolge	Küvetteninhalt	Behandlungsdauer
1	Ethanol (70 %)	3 h
2	Ethanol (80 %)	1 h
3	Ethanol (90 %)	1 h
4	Ethanol (96 %)	1 h
5	Ethanol (100 %)	2 h
6	Isopropylalkohol	2 h
7	Isopropylalkohol	1,5 h
8	Xylol	30 min
9	Xylol	45 min
10	Xylol	45 min
11	Paraplast (52 °C)	6 h
12	Paraplast (56 °C)	4,5 h

Ethanol 99 % (Bestellnummer 603-002-00-5, Chemie-Vertrieb Hannover, Hannover, Deutschland) jeweils der entsprechenden Konzentration mit Aqua dest. verdünnt

Xylol 98,5 % (CN80.2, Roth, Karlsruhe, Deutschland)

Isopropylalkohol (Bestellnummer 67-63-0, Chemie-Vertrieb Hannover, Hannover, Deutschland)

Paraplast (52 °C) (Paraplast X-tra, Bestellnummer X882.1, Roth, Karlsruhe, Deutschland), Paraplast (56 °C) (Shandon Histoplast, Bestellnummer 6774060, Thermoscientific, Runcorn, England)

Anschließend wurden die Präparate mit einem Paraffinerhitzer (#43900, Medax, Rendsburg, Deutschland) in Metallförmchen ausgerichtet, mit flüssigem Paraffin (1/3 Paraplast 52 °C, 2/3 Paraplast 56 °C) aufgefüllt und auf einer Kühlplatte (PARA COOLER B, RWW Medizintechnik, Forchheim, Deutschland) abgekühlt. Die weitere Abkühlung erfolgte über Nacht bei Raumtemperatur. Die Kiefersegmente wurden so ausgerichtet, dass die spätere Schnittachse in koronal-apikaler Richtung verlief.

2.6 Anfertigung der histologischen Schnitte

Mit dem Mikrotom (Jung Biocut 2035 Leica, Nussloch, Deutschland) wurden ca. 7 µm dünne Paraffinschnitte hergestellt. Die Schnitte wurden in ein Wasserbad (Typ 1052 GFL, Burgwedel Deutschland) gegeben und auf die Objektträger (Superfrost® Plus Menzel, Braunschweig, Deutschland) überführt und auf einer Wärmeplatte (Typ 14801 Medax, Rendsburg, Deutschland) bei 37 °C getrocknet. Danach wurden die Schnitte auf den Objektträgern für 24 Stunden in einem Wärmeschrank (Typ B 5042 Heraeus, Hanau, Deutschland) bei 37 °C weiter getrocknet.

2.7 Entparaffinierung und Rehydrierung

Die Objektträger mit den Paraffinschnitten wurden mithilfe eines Färbeautomaten (Linearfärber LS-15, Artikelnummer 15000, Weinkauf Medizin- und Umwelttechnik, Forchheim, Deutschland) entparaffiniert und rehydriert und somit für die anschließende immunhistochemische Färbung vorbereitet.

Tabelle 2: Protokoll Entparaffinierung und Rehydrierung

Reihenfolge	Küvetteninhalt	Behandlungsdauer
1	Xylol	10 min
2	Xylol	10 min
3	Ethanol (100 %)	5 min
4	Ethanol (90 %)	5 min
5	Ethanol (80 %)	5 min
6	Ethanol (60 %)	5 min
7	Ethanol (50 %)	5 min
8	1 x PBS (pH 7,4)	10 min

2.8 Hämatoxylin-Eosin-Färbung (H.E.-Färbung)

Die H.E.-Färbung wurde mit dem Färbeautomaten (Linearfärber LS-15, Artikelnummer 15000, Weinkauf Medizin- und Umwelttechnik, Forchheim, Deutschland) durchgeführt. Zur Herstellung der Hämaunlösung nach Meyer 1:4 wurden 3 Teile Aqua dest. mit 1 Teil Hämaun nach Meyer (HX093785 Merck, Darmstadt, Deutschland) gemischt. Die 0,1 %ige Eosinlösung wurde durch Mischen von 1 g Eosin (E6003 Sigma, Aldrich, St. Louis, USA) hergestellt.

Der Hämaun-Farbstoff färbt basophile (saure) Strukturen blau. Das sind vor allem die Zellkerne. Die azidophilen (eosinophilen) Strukturen wie die Zellplasmaproteine werden durch Eosin rot gefärbt.

Tabelle 3: Protokoll H.E.-Färbung

Reihenfolge	Küvetteninhalt	Behandlungsdauer
1	Xylol	5 min
2	Ethanol (100 %)	2 min
3	Ethanol (80 %)	2 min
4	Aqua dest.	2 min
5	Hämalaun (Meyer 1:4)	4 min
6	Aqua dest.	1 min
7	fließendes Wasser	15 min
8	Eosin (0,1 %)	7 min
9	Aqua dest.	1 min
10	Ethanol (60 %)	1 min
11	Ethanol (80 %)	1 min
12	Ethanol (100 %)	2 min
13	Xylol	3 min

2.9 Immunhistochemische Färbung

Mit der Immunhistochemie lassen sich mittels primärer Antikörper (AK) Proteine in verschiedenen Geweben sichtbar machen. In der vorliegenden Arbeit sollten die folgenden Proteine nachgewiesen und Unterschiede zwischen behandelten und nicht-behandelten Mäusen sowie DDR1-KO- und WT-Mäusen dargestellt werden: Kollagen Typ I und Kollagen Typ III, CD 11b und MMP-13. Die AK gegen diese Proteine wurden mithilfe des HiDef Detection HRP Mouse/Rabbit Polymer System (Ca. No. 954D-10) von Cell Marque (Rocklin, USA) sichtbar gemacht. Hierbei handelt es sich um ein Polymer-Detektionssystem. Der Primärantikörper wird durch einen Amplifier detektiert und dieser Amplifier anschließend durch das HRP (=horseradish peroxidase) Polymer gekoppelt. Durch Zugabe des Chromogens kommt es zur Färbereaktion.

Die Proben wurden wie in 2.7 beschrieben entparaffiniert und rehydriert und anschließend die immunhistochemische Färbung (siehe Tabelle 4) durchgeführt.

Tabelle 4: Protokoll immunhistochemische Färbung

Reihenfolge	Schritt	Behandlungsdauer
1	Präparate in TBS-T-Puffer waschen	10 min
2	Zugabe von Universalblock	30 min
3	Präparate in TBS-T-Puffer waschen	3 x 3 min
4	Antigendemaskierung im Citratpuffer bei 95 °C	20 min
5	Präparate auf Raumtemperatur abkühlen	20 min
6	Präparate in TBS-T-Puffer waschen	3 x 3 min
7	Präparate in 3 % H ₂ O ₂ in Methanol blocken	20 min
8	Präparate in TBS-T-Puffer waschen	3 x 3 min
9	Vorverdau mit Protease 24	2 min
10	Präparate in TBS-T-Puffer waschen	3 x 3 min
11	Blocken mit 1 % TBS/BSA	10 min
12	Inkubation mit primären Antikörper	je nach AK
13	Präparate in TBS-T-Puffer waschen	3 x 5 min
14	Inkubation mit HiDef Amplifier	10 min
15	Präparate in TBS-T-Puffer waschen	3 x 3 min
16	Inkubation mit HiDef Polymer	10 min
17	Präparate in TBS-T-Puffer waschen	3 x 3 min
18	Färben mit DAB unter Sicht	je nach AK
19	Präparate in TBS-T-Puffer waschen	10 min

Bei Verwendung des AK Kollagen Typ I wurden die Präparate vor der Behandlung mit Protease 24 noch mit Chondroitinase ABC und Hyaluronidase für jeweils 10 min. vorverdaut.

10 x TBS:

24,2 g 200 mM TRIS (#5429.3, Roth, Karlsruhe, Deutschland)

87,6 g 1,5 M NaCl auffüllen auf 1 Liter mit Aqua dest.

pH 7,4 einstellen

1x TBS-T:

100 ml 10 x TBS

500 µl Tween (0,05 %) (#P2287, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)

auffüllen auf 1 Liter mit Aqua dest.

Citratpuffer:

Lösung A:

4,2 g Zitronensäuremonohydrat (#100244.0500, Merck, Darmstadt, Deutschland)

200 ml Aqua dest.

Lösung B:

29,4 g Trinatriumdicitrat (#3580.3, Roth, Karlsruhe, Deutschland)

1000 ml Aqua dest.

18 ml Lösung A + 82 ml Lösung B

mit 900 ml Aqua dest. auf 1000 ml auffüllen, pH 6 einstellen

3 % H₂O₂-Methanol:

7 ml 30 % H₂O₂ (#1.07210.1000, Merck, Darmstadt, Deutschland)

63 ml Methanolin (Bestellnummer 4627.2, Roth, Karlsruhe)

in lichtgeschützter Küvette mischen.

Protease 24:

25 mg Protease XXIV (#P8038, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)

45 ml Aqua dest.

25 mg CaCl_2

5 ml 0.05 M Tris-HCl

pH 7,6 einstellen

Hyaluronidase

6,66 ml einer 0,3 M Sörensen-Pufferlösung werden mit Aqua dest. auf 100 ml aufgefüllt (Endkonzentration: 0,02 M Phosphatpuffer), darin werden gelöst:

0,45 g NaCl (77mM)

0,01 g BSA (0,01%)

100 mg Hyaluronidase (1mg/ ml) (H3506, Sigma-Adrich, St. Louis, USA)

Chondroitinase ABC

In 100 ml Aqua dest. werden gelöst:

0,61 g Tris $\text{NH}_2\text{C}(\text{CH}_2\text{OH})_3$ (50 mM, pH 8.0)

0,492 g Natriumacetat $\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2$ (60 mM)

0,02 g BSA (0,02%)

1 Unit Chondroitinase (#C2905 Sigma-Adrich, St. Louis, USA) wird in 1ml dieses Ansatzes gelöst.

1 % TBS/BSA:

1 g BSA (#A9647-50G, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) mit 100 ml 1xTBS mischen.

DAB-Lösung

1 Tropfen DAB-Chromogen (Bestellnummer 957D-11, Cell Marque, Rocklin, Kalifornien, USA) mit 1 ml DAB-Pufferlösung (Bestellnummer 957D-12, Cell Marque, Rocklin, Kalifornien, USA) in lichtgeschütztem Umfeld mischen.

2.10 Verwendete Primärantikörper

Tabelle 5: Liste der verwendeten Antikörper

Antikörper	Klonalität	Wirt	Reaktivität	Herkunft
Kollagen Typ I	polyklonal	Kaninchen	Mensch, Maus, Ratte, Rind	Acris, Herford, Deutschland
Kollagen Typ III	polyklonal	Kaninchen	Mensch, Maus, Ratte	Acris, Herford, Deutschland
CD 11b	polyklonal	Kaninchen	Mensch, Maus, Ratte	Novus Biologicals, Littleton, USA
MMP-13	polyklonal	Kaninchen	Mensch, Maus, Hund	Abcam, Cambridge, England

Kollagen Typ I (R1038)

Der Antikörper (AK) der Firma Acris ist ein polyklonaler AK, welcher im Kaninchen produziert wurde. Dieser AK richtet sich gegen die alpha 1 und alpha 2 Ketten von Kollagen Typ I. Er wird durch Immunoaffinitätschromatografie hergestellt und weist laut Herstellerangaben eine Kreuzreaktivität gegen andere Kollagentypen von unter einem Prozent auf.

Kollagen Typ III (AP06517PU-N)

Der AK der Firma Acris ist ein polyklonaler AK, welcher aus dem Kaninchen gewonnen wird. Dieser AK richtet sich gegen die alpha 1 Kette von Kollagen Typ III.

CD 11b (NB110-89474)

Der AK der Firma Novus Biologicals ist ein polyklonaler AK und stammt aus dem Kaninchen. Mit diesem AK lassen sich Monozyten und Granulozyten sowie Knochenmarkstammzellen markieren (Sheldon und Roberts 2010, Wong et al. 2012).

MMP-13 (ab39012)

Der AK der Firma Abcam ist ein polyklonaler AK und wird im Kaninchen produziert. Er richtet sich gegen die Kollagenase MMP-13.

In Vorversuchen wurden für jeden AK die idealen Bedingungen für die Inkubation getestet. So ergab sich für die AK gegen Kollagen Typ I, CD 11b und MMP-13 eine Verdünnung von 1:100, für den AK gegen Kollagen Typ III eine Verdünnung von 1:50. Die Inkubation für alle AK erfolgte bei Raumtemperatur über Nacht.

2.11 Gegenfärben, Dehydrieren, Deckeln

Nach der immunhistochemischen Färbung wurden die Präparate mit einer Häma-launlösung (Meyer 1:4) gegengefärbt und anschließend im Färbeautomaten (Line-arfärber LS-15, Artikelnummer 15000, Weinkauf Medizin- und Umwelttechnik, Forchheim, Deutschland) dehydriert (siehe Tabelle 6). Danach wurden die Präparate mit dem Einbettmedium Eukitt® (Eukitt® quick-hardening mounting medium Sigma, Aldrich, St. Louis, USA) und mit einem Deckglas (Cover Slips Menzel, Braunschweig, Deutschland) abgedeckt. Die H.E.-gefärbten Schnitte wurden ebenfalls mit Deckglas abgedeckt.

Tabelle 6: Protokoll Dehydrierung

Reihenfolge	Küvetteninhalt	Behandlungsdauer
1	Ethanol (50 %)	3 min
2	Ethanol (60 %)	3 min
3	Ethanol (80 %)	3 min
4	Ethanol (90 %)	3 min
5	Ethanol (100 %)	3 min
6	Xylol	10 min
7	Xylol	10 min

2.12 Auswertung der immunhistochemischen Ergebnisse

Um die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse sicherzustellen, wurden alle Versuche mit spezifischen AK jeweils dreimal pro Präparat wiederholt. Dazu wurde bei jeder immunhistochemischen Reaktion eine Kontrollreaktion zusätzlich durchgeführt. Es wurden alle Arbeitsschritte gemäß des Protokolls mit Ausnahme der Inkubation mit dem primären AK durchgeführt. So konnte der Spezifitätsnachweis der immunhistochemischen Reaktionen erbracht werden. Alle Kontrollen waren negativ.

Die lichtmikroskopische Auswertung erfolgte mithilfe eines Primostar Lichtmikroskops (# 415500-0004-000, Zeiss, Göttingen, Deutschland).

3 Ergebnisse

Im Folgenden werden die lichtmikroskopischen Untersuchungen und die immunhistochemischen Nachweisreaktionen und deren Ergebnisse dargestellt.

Zur lichtmikroskopischen Untersuchung wurden die dentalen und parodontalen Gewebe der Mäuse mit Hämatoxylin-Eosin angefärbt.

Der immunhistochemische Nachweis für Kollagen Typ I und Kollagen Typ III, CD 11b und MMP-13 wurde ebenfalls an den dentalen und parodontalen Geweben der Mäuse durchgeführt.

Für die Untersuchung wurden WT-Mäuse und DDR1-KO-Mäuse gegenübergestellt und die behandelten und unbehandelten Mäuse miteinander verglichen.

3.1 Dentales und parodontales Gewebe von Wildtyp-Maus und DDR1-Knockout-Maus im Vergleich

Auf den H.-E.-Übersichtsaufnahmen sind die zahntragenden Kieferabschnitte mit dentalen und parodontalen Geweben einer unbehandelten DDR1-KO-Maus (Abbildung 1A) und einer behandelten DDR1-KO-Maus zu sehen (Abbildung 1B). Aufgrund der Behandlung des Zahnes mit EDTA wurde der Zahnschmelz herausgelöst und ist in den histologischen Abbildungen nicht zu sehen. Die Pulpa und das die Pulpa umgebende Dentin waren bei WT-Maus und DDR1-KO-Maus regelrecht und es waren histologisch keine strukturellen Unterschiede erkennbar.

Die zahntragenden Strukturen, das Parodontium mit Alveolarknochen, PDL und Wurzelzement wiesen zwischen WT-Maus und DDR1-KO-Maus und zwischen der unbehandelten und behandelten Gruppe keinen Unterschied auf. PDL und Alveolarknochen waren auf allen histologischen Schnitten mit einer Vielzahl von Blutgefäßen durchsetzt. Im Alveolarknochen waren die Osteozyten in den typischen Osteozytenlakunen in eine vorwiegend azidophile Matrix eingebettet.

Im PDL zeigte sich kein Unterschied in Zellzahl und Zellform. Die Fibroblasten, die Hauptzellen des PDLs waren in eine azidophile EZM eingebettet. In Abbildung 1, De-

tailaufnahme B und D, waren die Sharpey-Fasern gut zu erkennen. Diese kollagenen Faserbündel verliefen wellenförmig durch das PDL und inserierten in den Alveolarknochen und das Wurzelzement. Das Wurzelzement stellte sich als eine homogene Schicht dar.

Da zwischen Mäusen, die sechs Wochen *P. gingivalis* bekamen und denen, die zwölf Wochen behandelt wurden, kein Unterschied festzustellen war, wurden diese beiden Gruppen als eine Gruppe, als die Gruppe der behandelten Mäuse, gewertet.

Die Gabe von *P. gingivalis* (behandelte Gruppe) führte zu keiner strukturellen Veränderung des Parodontiums. Sowohl in der Übersichtsfärbung mit H.E. (Abbildung 1) als auch in den immunhistochemischen Nachweisreaktionen mit den Antikörpern gegen Kollagen Typ I (Abbildung 2) und Kollagen Typ III (Abbildung 3) waren keine Unterschiede im strukturellen Aufbau des Parodontiums zu erkennen.

In den folgenden Tabellen sind die Auswertungen der Ergebnisse aller Färbungen zusammengefasst. Die Abbildungen zeigen jeweils Beispiele der mehrheitlichen Reaktionsergebnisse.

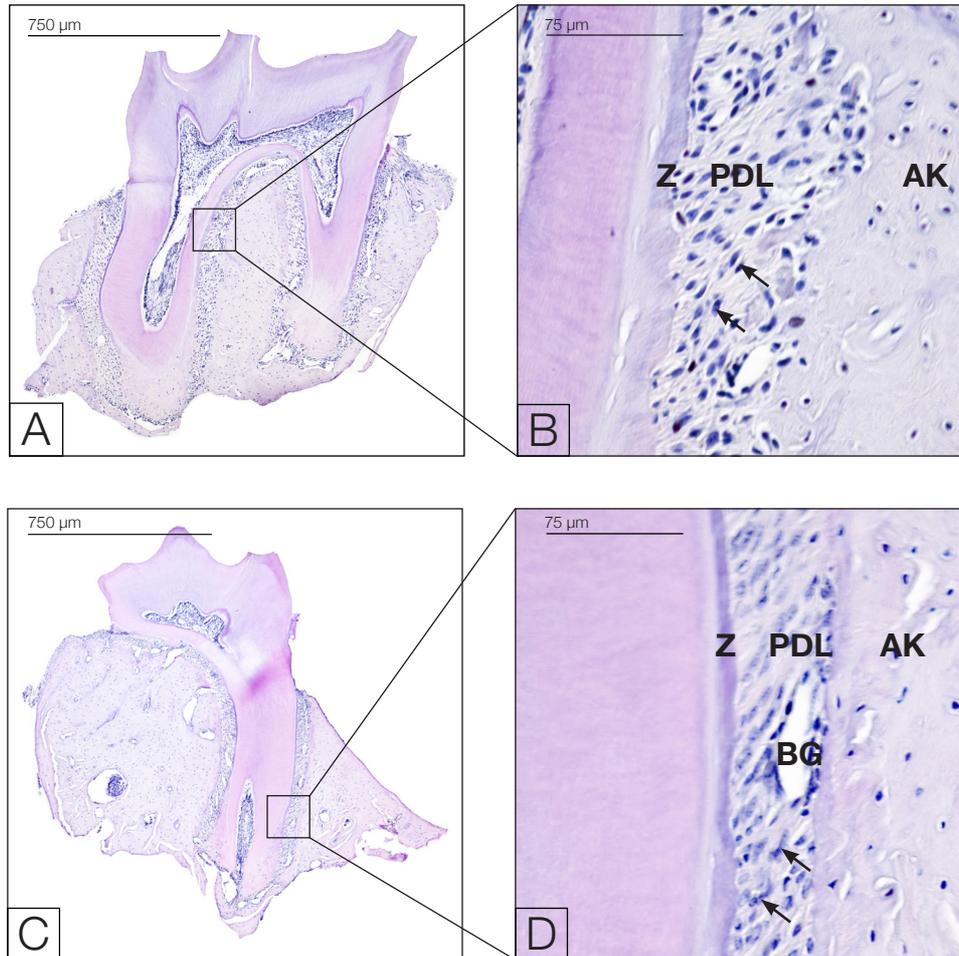


Abbildung 1: Hämatoxylin-Eosin-Färbung

A: Schnitt durch das Kiefersegment einer unbehandelten DDR1-KO-Maus, zweiwurzeliger Molar; Dentin, Pulpa, PDL, Zement und Alveolarknochen sind regelrecht ausgebildet, Vergrößerung: 10-fach.

C: Schnitt durch das Kiefersegment einer behandelten DDR1-KO-Maus, einwurzeliger Molar, Dentin, Pulpa, PDL, Zement und Alveolarknochen regelrecht ausgebildet, Vergrößerung: 10-fach.

B,D: Detailaufnahmen Zahnhalteapparat; im PDL verlaufen parallele kollagene Faserbündel und inserieren in den Alveolarknochen (AK) und das Zement (Z), zwischen den Faserbündeln liegen die Fibroblasten (Pfeile), Vergrößerung: 40-fach.

3.2 Immunhistochemischer Nachweis von Kollagen

3.2.1 Immunhistochemischer Nachweis von Kollagen Typ I

Der immunhistochemische Nachweis von Kollagen Typ I zeigte keinen Unterschied. Sowohl bei WT-Mäusen als auch bei DDR1-KO-Mäusen fiel eine vergleichbare homogene positive Färbung der Fasern im PDL, des Dentins und des Alveolarknochens auf. Zwischen den behandelten und unbehandelten Mäusen konnte kein Unterschied festgestellt werden (siehe Abbildung 3). Auch bei Betrachtung der koronalen Abschnitte des PDLs zeigten sich keine Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen.

Es wurden drei voneinander unabhängige immunhistochemische Reaktionen an mindestens drei Mäusen je Versuchsgruppe durchgeführt. Den Pool an untersuchten Mäusen bildeten vier unbehandelte und zwölf behandelte WT-Mäuse sowie vier unbehandelte und zwölf behandelte DDR1-KO-Mäuse.

In der Tabelle 7 sind die Ergebnisse aller immunhistochemischen Reaktionsergebnisse zusammengefasst. Abbildungen 2 und 3 zeigen exemplarisch immunhistochemische Reaktionsergebnisse an ausgewählten Präparaten.

Ergebnisse

Tabelle 7: Auswertung der immunhistochemischen Nachweise von Kollagen Typ I

WT unbehandelt	Dentin	+
	PDL	+
	Alveolarknochen	+
<hr/>		
WT behandelt	Dentin	+
	PDL	+
	Alveolarknochen	+
<hr/>		
KO unbehandelt	Dentin	+
	PDL	+
	Alveolarknochen	+
<hr/>		
KO behandelt	Dentin	+
	PDL	+
	Alveolarknochen	+

+ = positive Reaktion, WT = Wildtyp-Maus, KO = DDR1-Knockout-Maus

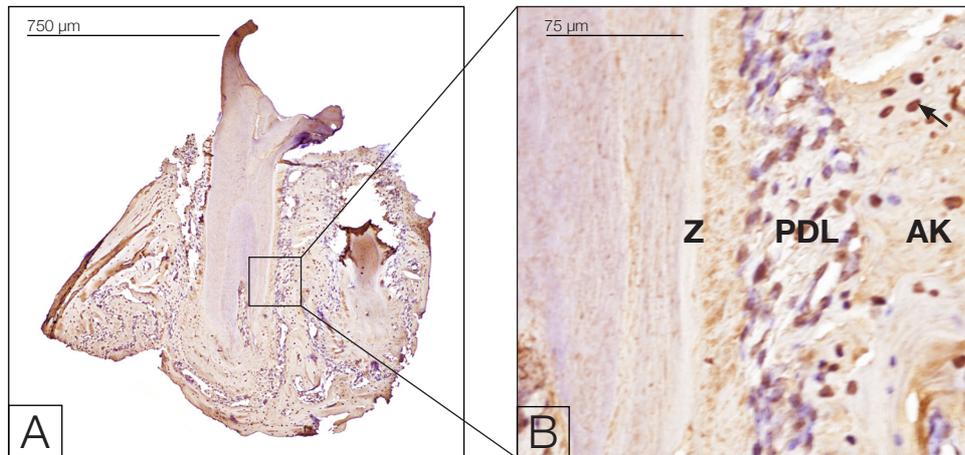


Abbildung 2: Immunhistochemischer Nachweis von Kollagen Typ I

A: Übersichtsaufnahme, B: Detailaufnahme

A: Schnitt durch das Kiefersegment einer unbehandelten WT-Maus. Positive Reaktion im Dentin, im PDL und im Alveolarknochen, Vergrößerung: 10-fach.

B: Positive Reaktion vor allem im Dentin, im PDL und im Alveolarknochen. Insertion der kollagenen Fasern ins Zement (Z) und in den Alveolarknochen (AK) deutlich zu erkennen. Osteozyten in den Osteozytenlakunen (Pfeil) positiv angefärbt, Vergrößerung: 40-fach.

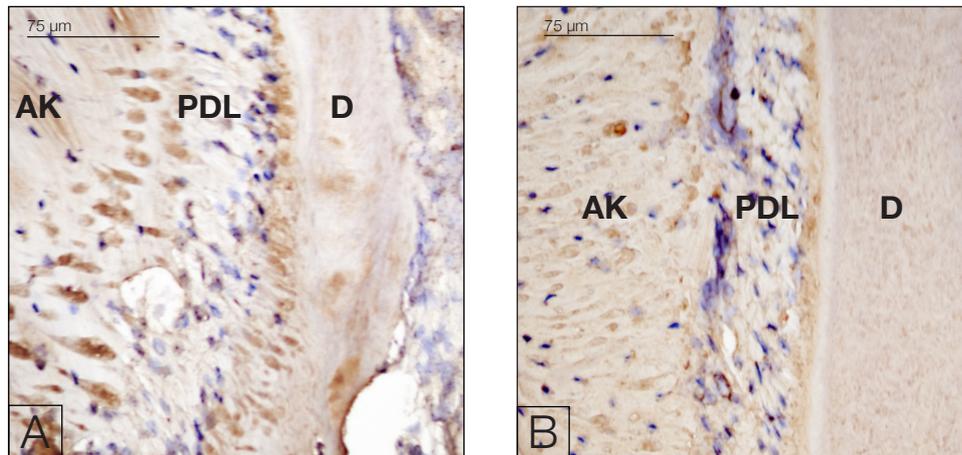


Abbildung 3: Vergleich unbehandelter (A) mit behandelter (B) DDR1-Knockout-Maus

Alveolarknochen (AK), PDL und Dentin (D) positives Reaktionsergebnis, kein Unterschied zwischen den beiden Versuchsgruppen erkennbar, Vergrößerung: 40-fach.

3.2.2 Immunhistochemischer Nachweis von Kollagen Typ III

Der immunhistochemische Nachweis von Kollagen Typ III zwischen den untersuchten Gruppen stellte sich als vergleichbar dar. Sowohl bei den WT-Mäusen als auch bei den DDR1-KO-Mäusen zeigte sich eine positive Färbung der EZM im PDL. Teile des Alveolarknochens wiesen nur eine leichte positive Färbung auf. Zwischen den behandelten und unbehandelten Mäusen konnte kein Unterschied festgestellt werden.

Für die Auswertung wurden drei voneinander unabhängige immunhistochemische Reaktionen an Präparaten von mindestens drei Mäusen je Versuchsgruppe angefertigt. Der Pool an untersuchten Mäusen bestand aus vier unbehandelten und zwölf behandelten WT-Mäusen sowie vier unbehandelten und zwölf behandelten DDR1-KO-Mäusen.

In der Tabelle 8 sind die Ergebnisse aller immunhistochemischen Reaktionsergebnisse zusammengefasst. Abbildung 4 zeigt exemplarisch ein immunhistochemisches Reaktionsergebnis an einem ausgewählten Präparat.

Ergebnisse

Tabelle 8: Auswertung der immunhistochemischen Nachweise für Kollagen Typ III

WT unbehandelt	Dentin	-
	PDL	+
	Alveolarknochen	-
	Blutgefäße	+
WT behandelt	Dentin	-
	PDL	+
	Alveolarknochen	-
	Blutgefäße	+
KO unbehandelt	Dentin	-
	PDL	+
	Alveolarknochen	-
	Blutgefäße	+
KO behandelt	Dentin	-
	PDL	+
	Alveolarknochen	-
	Blutgefäße	+

+ = positive Reaktion, - = negative Reaktion, WT = Wildtyp-Maus, KO = DDR1-Knockout-Maus

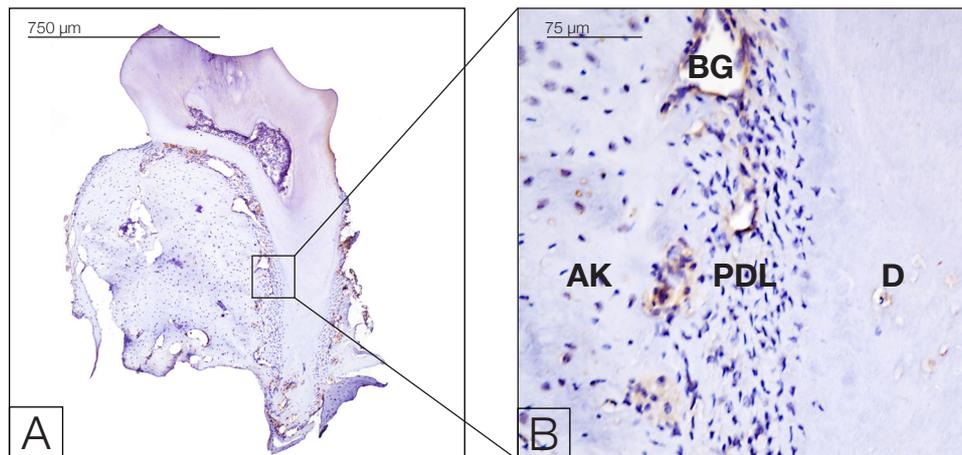


Abbildung 4: Immunhistochemischer Nachweis von Kollagen Typ III

A: Übersichtsaufnahme, B: Detailaufnahme

A: Schnitt durch das Kiefersegment einer behandelten DDR1-KO-Maus. Positive Reaktion im Dentin (D), Alveolarknochen (AK) schwach positiv angefärbt, im Dentin negatives Reaktionsergebnis, Vergrößerung: 10-fach.

B: Positive Reaktion im PDL und in der Gefäßwand eines Blutgefäßes (BG). Dentin (D) negatives Reaktionsergebnis, Vergrößerung: 40-fach.

3.3 Immunhistochemischer Nachweis von Entzündungsmarkern

3.3.1 Immunhistochemischer Nachweis von CD 11b

Der immunhistochemische Nachweis von CD 11b zeigte eine positive Reaktion des PDLs sowohl bei behandelten als auch bei unbehandelten Mäusen. Ebenso waren die Blutgefäßwände und die Osteozytenlakunen im Alveolarknochen positiv angefärbt. In der Pulpa waren die Zellkerne negativ angefärbt, allerdings war eine positive Reaktion der EZM der Pulpa zu erkennen. Zwischen den DDR1-KO- und WT-Mäusen konnte kein Unterschied festgestellt werden.

Für die Auswertung wurden drei voneinander unabhängige immunhistochemische Reaktionen an Präparaten von mindestens drei verschiedenen Mäusen je Versuchsgruppe durchgeführt. Den Pool an untersuchten Mäusen bildeten vier unbehandelte und zwölf behandelte WT-Mäuse sowie vier unbehandelte und zwölf behandelte DDR1-KO-Mäuse.

In Tabelle 9 sind die Ergebnisse aller immunhistochemischen Reaktionsergebnisse zusammengefasst. Abbildung 5 zeigt exemplarisch ein immunhistochemisches Reaktionsergebnis an einem ausgewählten Präparat.

Ergebnisse

Tabelle 9: Auswertung immunhistochemischer Nachweis von CD 11b

WT unbehandelt	Pulpa	+
	PDL	+/-
	Alveolarknochen	+/-
	Blutgefäße	+
WT behandelt	Pulpa	+
	PDL	+
	Alveolarknochen	+
	Blutgefäße	+
KO unbehandelt	Pulpa	+
	PDL	+/-
	Alveolarknochen	+/-
	Blutgefäße	+
KO behandelt	Pulpa	+
	PDL	+
	Alveolarknochen	+
	Blutgefäße	+

+ = positive Reaktion, +/- = schwach positive Reaktion, WT = Wildtyp-Maus, KO = DDR1-Knockout-Maus

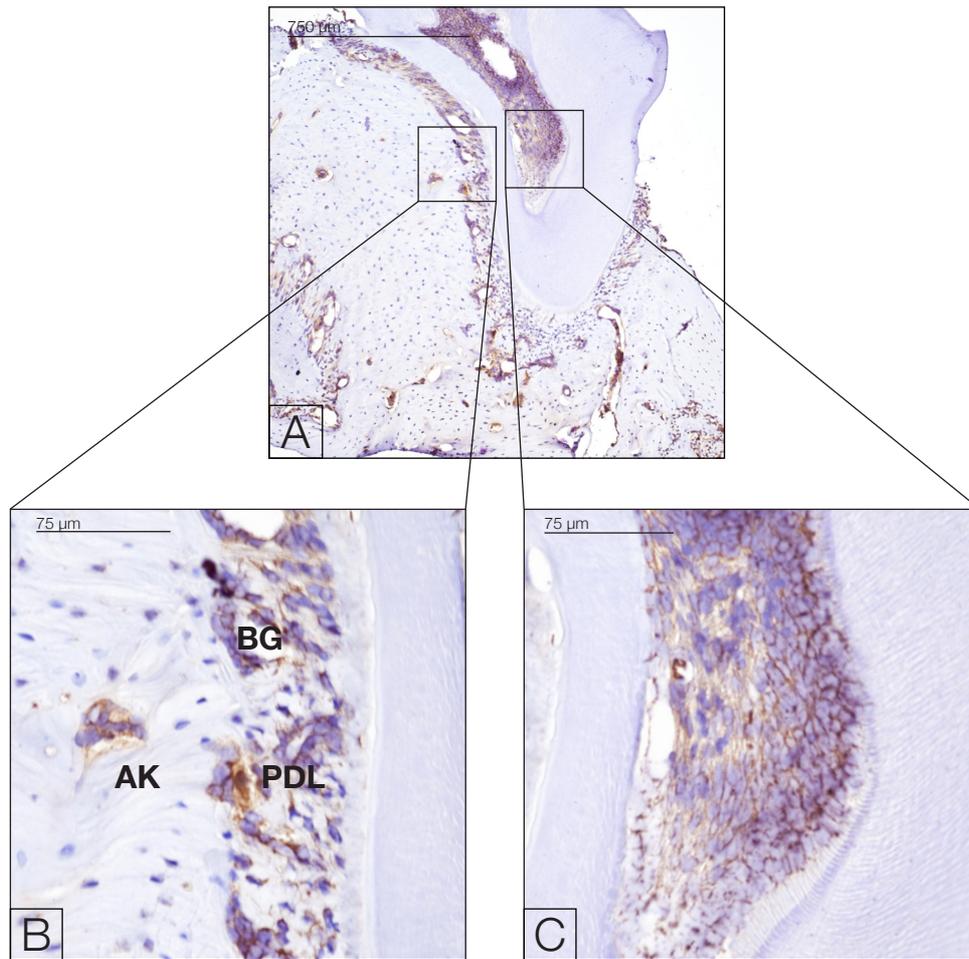


Abbildung 5: Immunhistochemischer Nachweis von CD 11b

A: Übersichtsaufnahme, B, C: Detailaufnahme

A: Schnitt durch das Kiefersegment einer unbehandelten DDR1-KO-Maus. Positive Reaktion im PDL und in der Wand von Blutgefäßen, Vergrößerung: 10-fach.

B: Detailaufnahme des Parodontiums, positives Reaktionsergebnis im PDL und in der Gefäßwand eines Blutgefäßes (BG), im Alveolarknochen (AK) negatives Reaktionsergebnis, Vergrößerung: 40-fach.

C: Detailaufnahme der Pulpa, EZM der Pulpa positives Reaktionsergebnis, Zellkerne negativ, Vergrößerung: 40-fach.

3.3.2 Immunhistochemischer Nachweis von MMP-13

Der immunhistochemische Nachweis von MMP-13 erbrachte keine Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen. In allen Schnitten zeigte sich ein positives Reaktionsergebnis des PDLs, in der Pulpa und in der Wand von Blutgefäßen. Ebenso waren die Osteozyten in den Osteozytenlakunen des Alveolarknochens positiv angefärbt.

Für die Auswertung wurden mindestens drei voneinander unabhängige immunhistochemische Reaktionen an Präparaten von mindestens drei verschiedenen Mäusen je Versuchsgruppe durchgeführt. Den Pool an untersuchten Mäusen bildeten vier unbehandelte und zwölf behandelte WT-Mäuse sowie vier unbehandelte und zwölf behandelte DDR1-KO-Mäuse.

In Tabelle 10 sind die Ergebnisse aller immunhistochemischen Reaktionsergebnisse zusammengefasst. Abbildung 6 zeigt ein exemplarisches immunhistochemisches Reaktionsergebnis an einem ausgewählten Präparat.

Ergebnisse

Tabelle 10: Auswertung immunhistochemischer Nachweis von MMP-13

WT unbehandelt	Pulpa	+
	PDL	+
	Alveolarknochen	+
	Blutgefäße	+
WT behandelt	Pulpa	+
	PDL	+
	Alveolarknochen	+
	Blutgefäße	+
KO unbehandelt	Pulpa	+
	PDL	+
	Alveolarknochen	+/-
	Blutgefäße	+
KO behandelt	Pulpa	+
	PDL	+
	Alveolarknochen	+
	Blutgefäße	+

+ = positive Reaktion, +/- = schwach positive Reaktion, WT = Wildtyp-Maus, KO = DDR1-Knockout-Maus

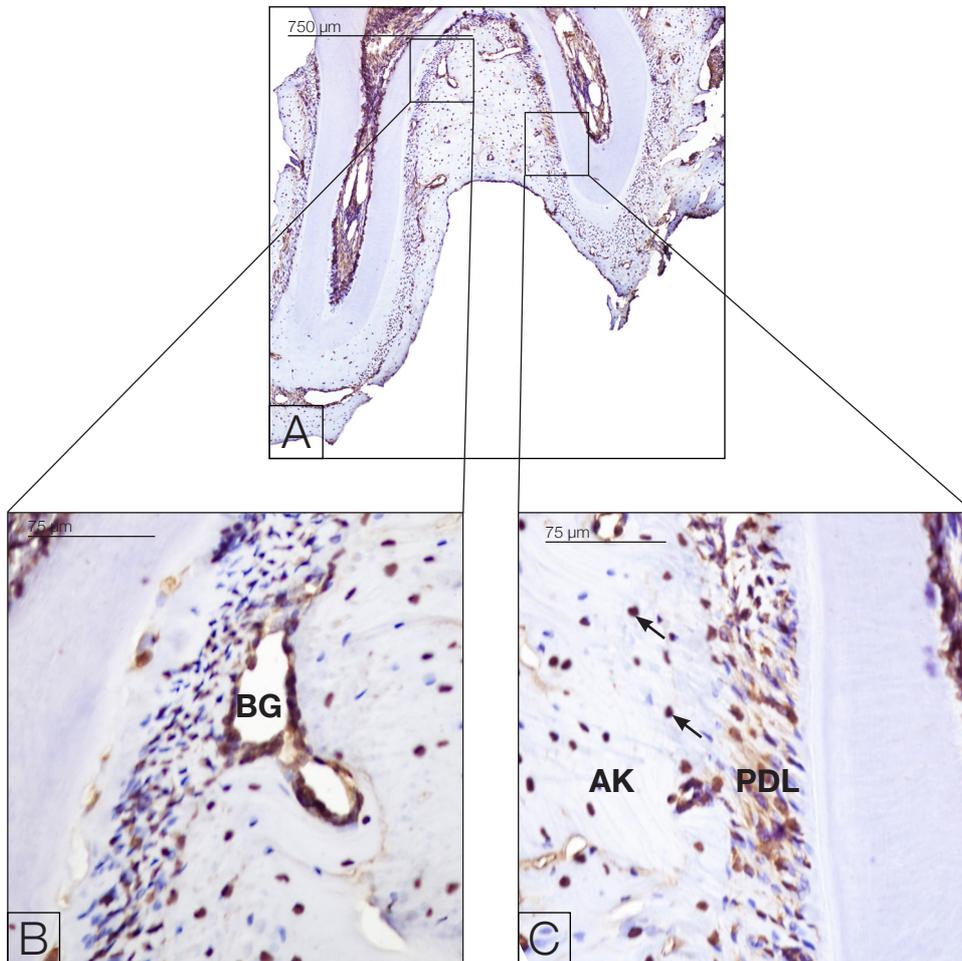


Abbildung 6: Immunhistochemischer Nachweis von MMP-13

A: Übersichtsaufnahme, B, C: Detailaufnahme

A: Schnitt durch das Kiefersegment einer behandelten DDR1-KO-Maus. Positive Reaktion im PDL, in Pulpa und in der Wand von Blutgefäßen, Vergrößerung: 10-fach.

B: Detailaufnahme des Parodontiums mit einem Blutgefäß (BG), positives Reaktionsergebnis der Blutgefäßwand, Vergrößerung: 40-fach.

C: Detailaufnahme der Parodontiums, Fibrozyten im PDL und Osteozyten in den Osteozytenlakunen (Pfeile) positiv angefärbt, Vergrößerung: 40-fach.

4 Diskussion

4.1 Diskussion des Mausmodells

In der Literatur wurden bereits viele verschiedene Tiermodelle zur Untersuchung einer Parodontitis beschrieben. Durch Tiermodelle ist es möglich, Krankheitsentstehung und -verlauf nachzuvollziehen sowie neue Therapiemöglichkeiten zu untersuchen. Unter den verschiedenen Tiermodellen sind die Untersuchungen an Mäusen und Ratten besonders vorteilhaft, da für diese Arten bereits Informationen über deren Immunsystem sowie immunologische und molekulare Reagenzien zur Verfügung stehen (Graves et al. 2008). Eine Parodontitis bei Nagern zu induzieren, kann auf zwei Weisen geschehen: durch Legen einer Ligatur um den Zahn oder durch orale Gabe verschiedener parodontopathogener Keime.

Wie sich die orale Gabe humaner Bakterienstämme auf das Parodontium von Nagern auswirkt, wurde in diversen Studien gezeigt. Dieses Modell wurde mit verschiedenen Keimen wie *P. gingivalis* (Baker et al. 2000a, Baker et al. 2000c, Baker et al. 1994, Lalla et al. 1998), *A. actinomycetemcomitans* (Garlet et al. 2006), *Tanarella forsythia* (Sharma et al. 2005) und *Treponema denticola* (Lee et al. 2009) oder einer Kombination der beiden Keime *P. gingivalis* und *Fusobacterium nucleatum* (Bendyk et al. 2009, Polak et al. 2009) durchgeführt. Dass einige dieser Keime nicht natürlich in Nagern vorkommen, stellt ein Problem dar. Lediglich *A. actinomycetemcomitans* konnte sowohl als natürlicher Besiedler des Menschen als auch der Ratte, der Kuh und von Primaten nachgewiesen werden (Fine et al. 2005).

Das Mausmodell, auf das sich die meisten Studien stützen, wurde von Baker et al. im Jahre 1994 veröffentlicht (Baker et al. 1994). 12 bis 18 Wochen alte Mäuse der Stämme C57BL/6J und BALB/cByJ sowie C.B17-scid, ein immuninsuffizienter Mausstamm, wurden in diesem Experiment mit dem *P. gingivalis*-Stamm ATCC 530977 in zwei bis vier Tagesintervallen behandelt und 42 Tage nach der letzten Gabe getötet. Bakterielle Proben wurden den Mäusen entnommen und so die orale Kolonisierung des Keims in den Mäusen gezeigt. Im Blutserum dieser Mäuse konnten

für *P. gingivalis* spezifische Immunglobuline mittels ELISA nachgewiesen werden (Baker et al. 1994). Horizontaler Knochenabbau konnte mithilfe einer von Klausen et al. (1991) entwickelten morphometrischen Methode untersucht werden. Das Alveolarknochenlevel kann demnach an entfleischten Kiefersegmenten mikroskopisch bei 30-facher Vergrößerung anhand der Distanz zwischen Schmelz-Zement-Grenze und Alveolarknochenkamm gemessen werden (Klausen et al. 1991). Die statistische Auswertung des Alveolarknochenverlustes von Baker et al. (1994) zeigte bei der immuninsuffizienten Maus (C.B17-scid) stärkeren Alveolarknochenabbau als bei der nah verwandten immunkompetenten Maus (BALB/cByJ). Ebenso war zwischen den *P. gingivalis*-infizierten Mäusen der Alveolarknochenverlust größer als bei den nicht-infizierten Mäusen. Der Unterschied zwischen BALB/cByJ- und C57BL/6J-Mäusen wurde hingegen nicht gezeigt (Baker et al. 1994). In zahlreichen weiteren Studien konnte mit dieser Methode der Alveolarknochenabbau nach induzierter Parodontitis nachgewiesen werden (Baker et al. 2000c, Evans et al. 1992, Hart et al. 2004, Sharma et al. 2005).

Kuula et al. (2009) konnten an MMP-8-KO-Mäusen mithilfe der histologischen Analyse Alveolarknochenabbau bei den infizierten Mäusen zeigen. Dabei wurden Längsschnitte der zweiten Molaren von Maxilla und Mandibula angefertigt, mit H.E. angefärbt und die Distanz zwischen Schmelz-Zement-Grenze und Alveolarknochenkamm gemessen (Kuula et al. 2009). In weiteren Studien wurde auf diese Weise Knochenverlust nachgewiesen (Alayan et al. 2006, Bendyk et al. 2009, Tatakis und Guglielmoni 2000).

Wilensky et al. (2005) verglichen in ihrer Studie die morphometrische Methode mit den Messungen am Mikro-Computer-Tomogramm (μ -CT). In diesem Experiment wurden sieben bis acht Wochen alte BALB/c-Mäuse nach der von Baker et al. (1994) vorgestellten Methode mit *P. gingivalis* behandelt und nach 42 Tagen der Alveolarknochenverlust untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass sich die mit morphometrischer Methode gewonnenen Werte zwischen unbehandelten und behandelten Mäusen statistisch nicht unterschieden. Die Messungen mit dem μ -CT wiesen jedoch signifikant größeren Knochenverlust bei der mit *P. gingivalis* behandelten Gruppe auf.

In dieser Arbeit sollte der Nachteil morphometrischer und histologischer Techniken gezeigt werden, denn unter dem Mikroskop lassen sich nur zweidimensionale Bilder analysieren und so der horizontale Knochenabbau messen. Der Nachteil hierbei ist, dass approximaler Knochenabbau nicht berücksichtigt werden kann. Defekte dieser Art sollen jedoch mit dem μ -CT darstellbar und messbar sein (Wilensky et al. 2005). Mithilfe des μ -CT lassen sich schnell und ohne Zerstörung sehr präzise Messungen an Spongiosa und Kompakta des Knochens vornehmen und dreidimensionale morphometrische Analysen erstellen (Muller et al. 1998). Cantley et al. (2009) führten diese Methode an lebenden Tieren durch. Acht Wochen alte BALB/c-Mäuse wurden über 13 Wochen mit *P. gingivalis* behandelt. Die Mäuse wurden zu Beginn, nach sieben Wochen und am Ende der *P. gingivalis*-Gabe im μ CT gescannt und so eine Abnahme des Knochenvolumens festgestellt. Makroskopisch sichtbar erhöhtes Gewebevolumen und Rötung der Schleimhaut sollen die chronische Entzündung und damit die induzierte Parodontitis zeigen (Cantley et al. 2009).

Die andere Methode, das Ligatur-Modell, findet vorrangig bei Ratten (Bezerra et al. 2000, Lohinai et al. 1998), Hamstern (Okuda et al. 1988), Hunden (Lindhe und Ericsson 1978, Schroeder und Lindhe 1980) und Affen (Clark et al. 1991, Holt et al. 1988) Verwendung. Diese Methode soll schon nach sieben Tagen zu messbarem Attachment- und Knochenverlust führen (Bezerra et al. 2000, Bezerra et al. 2002).

In Studien, bei denen bei Mäusen mittels Ligatur eine Parodontitis induziert wurde, konnte die erfolgreiche Kolonisation der Mundhöhle mit *P. gingivalis* und der daraus resultierende Alveolarknochenverlust nachgewiesen werden. So legten Kimura et al. (2000) um die ersten Molaren pathogen-freier C3H/HeN-Mäuse mit *P. gingivalis* getränkte Ligaturen aus Seide, wiesen in Plaqueproben der behandelten Mäuse *P. gingivalis* nach und zeigten einen mit der *P. gingivalis*-Besiedelung korrelierenden Alveolarknochenverlust. Zum Legen der Ligatur wurden die Mäuse betäubt (Kimura et al. 2000). Li und Amar (2007) führten einen ähnlichen Versuch durch und stellten vermehrten Alveolarknochenabbau bei den Mäusen fest, die mit einer mit *P. gingivalis* getränkten Ligatur behandelt wurden. Bei den Mäusen, die eine nicht-infizierte Ligatur bekamen, konnte dies nicht gezeigt werden. Bei den infizierten Mäusen wur-

de außerdem eine vermehrte Osteoklastenaktivität mittels TRAP-Färbung dargestellt sowie vermehrte Entzündungszellen und der Niedergang des Epithels am H.E.-Bild beschrieben. All diese Ergebnisse sollen bereits zehn Tage nach Legen der Ligatur aufgetreten sein (Li und Amar 2007).

In allen genannten Studien konnte nach der Gabe von *P. gingivalis* Knochenabbau nachgewiesen werden. Wie dieser Knochenabbau entstanden sein soll, wird wenig diskutiert und bleibt offen. Neuere Studien setzten sich intensiver mit der Entstehung des Knochenverlustes auseinander. In einer von Izawa et al. (2014) veröffentlichten Studie wurden WT-Mäuse und IL-1-Rezeptor-Antagonist-KO-Mäuse durch Gabe von *A. actinomycetemcomitans* infiziert. Die Ergebnisse zeigten bei den infizierten KO-Mäusen eine erhöhte Expression von mRNA für Rezeptor-Aktivator für NF-kappaB-Ligand RANKL und Monozytenkolonie-stimulierender-Faktor M-CSF sowie eine erhöhte Produktion von TNF- α und IL-6 in Osteoblasten im Vergleich zu den WT-Mäusen. Bei den KO-Mäusen wies die unbehandelte Kontrollgruppe Alveolarknochenverlust auf. Interessanterweise konnte kein signifikanter Unterschied zwischen behandelten und unbehandelten WT-Mäusen bezüglich des Alveolarknochenlevels festgestellt werden (Izawa et al. 2014). Diese Ergebnisse stimmen eher mit den hier gezeigten Ergebnissen überein.

Im vorliegenden Versuch wurden 21 bis 35 Wochen alte Mäuse gewählt Das heißt diese Mäuse waren älter als die in den genannten Studien. Ob das Alter ausschlaggebend für die hier gezeigten Ergebnisse war und ob ältere Mäuse empfänglicher für die induzierte Parodontitis sind, kann nicht geklärt werden. Des Weiteren wurde für das Experiment eine unsterile Umgebung für die Mäuse gewählt, um eine zusätzliche Infektion mit anderen murinen Keimen zu erleichtern. Auswirkungen dieser pathogenen Umgebung können nicht mit den hier gezeigten Ergebnissen bestätigt werden.

In der Literatur werden die Tierexperimente mit verschiedenen *P. gingivalis*-Stämmen durchgeführt. Bei dem von Baker et al. (1994) beschriebenen Modell wurde der *P. gingivalis*-Stamm ATCC 53977 verwendet und weitere Studien wurden mit diesem Stamm durchgeführt (Baker et al. 1999, Baker et al. 2000c, Lalla et al. 1998). In anderen Studien wurde für die Induktion einer Parodontitis der *P. gingivalis*-Stamm

55277 (Kuula et al. 2009, Polak et al. 2009, Zhang et al. 2014) oder der Stamm 53978 (W50) (Cantley et al. 2009, O'Brien-Simpson et al. 2005) verwendet. Ein Unterschied zwischen diesen beiden Keimen war also nicht zu erwarten, da mit beiden Stämmen entsprechende Ergebnisse veröffentlicht wurden. Deshalb wurde im vorliegenden Experiment der *P. gingivalis*-Stamm 55277 verwendet. Der Vergleich der beiden Stämme 53977 und 55277 zeigte einen Unterschied bei der Fähigkeit, Alveolarknochenverlust auszulösen. Dabei konnte kein Knochenverlust durch den Stamm 55277 festgestellt werden (Baker et al. 2000a). Wilensky et al. (2005) konnten in ihrem Vergleich mittels Mikro-CT Unterschiede im Alveolarknochenverlust messen, diese waren jedoch nicht signifikant.

P. gingivalis steht vor einer großen Herausforderung, wenn er die Mundhöhle besiedeln soll, denn er ist ein anspruchsvoller, obligat anaerober, asaccharolytischer und säuresensibler Keim, der für sein Wachstum Hemin benötigt (Lamont und Jenkinson 1998). Zusätzlich dazu interagiert *P. gingivalis* bei der Besiedelung mit zahlreichen anderen gram-negativen obligaten und fakultativ anaeroben Keimen, wie beispielsweise *Fusobacterium nucleatum* (Polak et al. 2009). Laut van Winkelhoff et al. (2002) lässt sich *P. gingivalis* beim gesunden Menschen nicht kultivieren.

Bei genauerer Betrachtung der verschiedenen Stämme fällt auf, dass sie sich in der Ausprägung ihrer Virulenzfaktoren jedoch voneinander unterscheiden. So lösen verschiedene Stämme beispielweise nach intrakutaner Inokulation unterschiedliche Arten von Entzündungen aus (Laine und van Winkelhoff 1998). Baker et al. (2000c) konnten nachweisen, dass die Schwere der induzierten Parodontitis und des damit verbundenen Knochenabbaus zum einen vom genetischen Hintergrund der Maus und zum anderen von dem genutzten *P. gingivalis*-Stamm abhängen. Baker et al. (2000c) zeigten in einer Studie, dass die verschiedenen Mausstämme bei *P. gingivalis*-Gabe unterschiedliche Infektionsanfälligkeiten aufweisen. In dieser Studie konnte bei Mäusen der Stämme AKR/J, DBA/2J, BALB/cByJ und BALB/cJ Knochenverlust induziert werden, während Mäuse der Stämme A/J, A/HeJ, 129/J, SJL/J und C57BL/6J eine stärkere Resistenz gegen die Keime zeigten (Baker et al. 2000c). In der vorgestellten Arbeit wurden Mäuse des Stammes C57BL/6 verwendet, da auf

diesem genetischen Hintergrund die DDR1-KO-Maus basiert. Dies könnte eine Erklärung für die hier gezeigten Ergebnisse sein.

Die Auseinandersetzung mit den möglichen Modellen zeigt eine Vielzahl von Variablen, die die Auswahl des richtigen Modells erheblich beeinflussen und erschweren. Graves et al. (2008) kommen zu dem Schluss, dass die verschiedenen Modelle sorgfältig ausgewählt werden müssen und jedes Modell die Betrachtung von nur einer der verschiedenen Komponenten der Parodontitis, wie z.B. Kolonisierung, Attachementverlust, Knochenresorption oder Pathogenität der Keime zulässt, nicht jedoch alle. Ein praktikables Modell, das der natürlichen Pathogenese einer Parodontitis beim Menschen möglichst nahekommt, gibt es nicht und muss noch entwickelt werden (Oz und Puleo 2011).

4.2 Diskussion des Nachweises von Kollagen Typ I und III

In der vorliegenden Arbeit wurden immunhistochemische Nachweisreaktionen mit Antikörpern gegen Kollagen Typ I und III angefertigt, um mögliche Veränderungen vor allem im Zahnhalteapparat zwischen behandelten und unbehandelten Mäusen zu untersuchen. Bei einer Parodontitis wären Unterschiede zu erwarten gewesen, denn Studien haben gezeigt, dass bei Entzündungsprozessen wie der Parodontitis vor allem Kollagen Typ I und Typ III zerstört werden. Denn schon kleinste Veränderungen der Fibroblastenfunktion, wie es bei parodontalen Krankheitsprozessen der Fall ist, führen zu Veränderungen der Turnover-Rate von Kollagen im PDL und somit zur Zerstörung des Zahnhalteapparates (Nanci und Bosshardt 2006). Diese Zerstörung ist auf die proteolytische Aktivität der parodontopathogenen Keime zurückzuführen. In vielen Studien konnten diverse, von *P. gingivalis* gebildete proteolytische Enzyme nachgewiesen werden. So sind mindestens acht unterschiedliche Endopeptidasen und eine Reihe von Exopeptidasen bekannt. Welche dieser proteolytischen Enzyme letztendlich Kollagene zerstören können, ist umstritten (Potempa et al. 2000). Die Studien zu der Endopeptidase Gingipain beispielsweise sind konträr. So gibt es Studien, die dem Gingipain eine kollagenolytische Fähigkeit nachweisen (Abe et al. 1998, Bedi und Williams 1994) sowie Studien, die das Gegenteil behaupten (Barkocy-Gallagher et al. 1999, Potempa et al. 1998). Trotzdem ist sich die Literatur

darüber einig, dass *P. gingivalis* kollagenauflösende Proteasen exprimiert. Es bleibt jedoch zu diskutieren, ob es die von Bakterien gebildeten Proteasen sind oder vielmehr die endogenen, bei der Immunantwort entstehenden Proteasen, die das Kollagenetzwerk zerstören (Potempa et al. 2000). In der vorliegenden Arbeit konnten jedoch keine Unterschiede zwischen unbehandelten und behandelten Mäusen in den immunhistochemischen Nachweisreaktionen für Kollagen Typ I und III gezeigt werden. Es stellt sich also die Frage, ob eine experimentelle Parodontitis erzeugt wurde, oder ob diese mit der Untersuchung der Kollagene nicht nachweisbar ist.

In mikroskopisch histologischen Nachweisen konnte an verschiedenen Tierarten und beim Menschen gezeigt werden, dass Kollagen Typ I in Dentin, Alveolarknochen, Zement und im Parodontalspalt vorkommt (Becker et al. 1991, Butler et al. 1975, Lukinmaa und Waltimo 1992, MacNeil et al. 1998). Diese Ergebnisse konnten in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden.

Studien über das PDL an Ratten, Krallenaffen und Rindern beschrieben, dass sich die Kollagenfibrillen des Typs III entlang der Kollagen Typ I-Fibrillen anlagern und sie umschließen (Lukinmaa und Waltimo 1992, Romanos et al. 1992, Wang et al. 1980). Becker et al. (1991) konnten in ihren lichtmikroskopischen Untersuchungen bestätigen, dass Kollagen Typ III zusammen mit Kollagen Typ I Hauptbestandteil der Faserbündel im PDL sind. Die immunelektronenmikroskopischen Untersuchungen zeigten jedoch, dass die Kollagen Typ III-Fibrillen nicht die Kollagenfibrillen Typ I umschließen (Becker et al. 1991). Die unterschiedlichen Ergebnisse könnten mit den verwendeten Dekalzifizierungs- und Einbettmethoden, welche die Antigenität der anzufärbenden Proteine erhalten sollen, erklärt werden (Becker et al. 1986). Die hier gezeigten Ergebnisse für Kollagen Typ III zeigen eine schwache Färbung des PDLs. Verglichen mit der Kollagen Typ I-Färbung ist sie viel schwächer. Eine mögliche Erklärung für das schwache Anfärben von Kollagen Typ III könnte eine zu geringe Antigendemas- kierung sein.

In den beiden mineralisierten Geweben, dem Alveolarknochen und dem Zement, zeigten sich in dieser Arbeit für Kollagen Typ III keine positiven Färbungen. Dies stimmt mit Ergebnissen anderer Studien überein, wobei in diesen Studien Prokol-

lagen Typ III nachgewiesen worden war (Thesleff et al. 1979, Wang et al. 1980). Das Vorkommen von Kollagen Typ III im Dentin wird in Studien kontrovers beschrieben. So konnte die Anwesenheit von Kollagen Typ III im Dentin der Maus und des Menschen gezeigt werden (Becker et al. 1986, Nagata et al. 1992), während in der vorliegenden Arbeit und zahlreichen weiteren Studien dies nicht bestätigt werden konnte (Huang et al. 1991, Romanos et al. 1992, Wang et al. 1980).

An Schweinen konnte eine positive Kollagen Typ III-Färbung der Gefäßwände im PDL und Alveolarknochen nachgewiesen werden (Wang et al. 1980). Auch dieses Ergebnis konnte in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden. Die Wände der Gefäße im Alveolarknochen und im PDL zeigen eine positive Färbung für Kollagen Typ III.

4.3 Diskussion des Entzündungsmarkers CD 11b

Das Vorkommen von Entzündungszellen wie Granulozyten, Makrophagen, Lymphozyten und Plasmazellen konnte in verschiedenen tierexperimentellen Studien gezeigt werden. Die dabei untersuchten Gewebeproben stammten hauptsächlich aus der Nähe des gingivalen Sulkus (Adams et al. 1979, Adams et al. 1981, Avery und Simpson 1973). In der vorliegenden Arbeit konnten ebenfalls Entzündungszellen nachgewiesen werden. Jedoch handelte es sich bei den untersuchten Gewebeproben um das PDL-Gewebe. Das gingivale Gewebe wurde im Zuge der Präparateherstellung entfernt und konnte somit nicht untersucht werden.

Die hier gezeigten Resultate zeigten keinen histologisch erkennbaren Unterschied bezüglich der Ausprägung der Entzündungszellen zwischen den behandelten und unbehandelten Mäusen. Diverse tierexperimentelle Studien wiesen jedoch einen Unterschied nach. So konnte an Totenkopffäffchen durch das Einlegen einer plaquerelevanten Ligatur eine experimentelle Parodontitis erzeugt werden, was ein vermehrtes Aufkommen von Entzündungszellen zur Folge hatte. Jedoch wurden auch diese Untersuchungen an gingivalem Gewebe und nicht wie in dieser Arbeit, am PDL-Gewebe, durchgeführt (Adams et al. 1979, Adams et al. 1981, Avery und Simpson 1973). Da das gingivale Epithel und speziell der gingivale Sulkus als erste Barriere des Parodontiums beim Entzündungsprozess dient und das PDL apikal davon liegt

(Schroeder und Listgarten 1997), könnte eine Erklärung dafür sein, dass im hier gezeigten Versuch keine Unterschiede zwischen behandelter und unbehandelter Gruppe zu erkennen sind.

In einer Studie von Garlet et al. (2006) konnte die Expression verschiedener am Entzündungsprozess beteiligter Faktoren im PDL nachgewiesen werden. Allerdings wurde die Parodontitis bei diesem Versuch durch den Keim *Actinobacillus actinomycetemcomitans* und nicht wie in dem hier beschriebenen Experiment mit *P. gingivalis* herbeigeführt.

Bis auf die letztgenannte Arbeit konzentrieren sich die zitierten Arbeiten auf das gingivale Gewebe, welches nicht Gegenstand dieser Arbeit ist. Dies erschwert den direkten Vergleich der Ergebnisse dieser Arbeit mit den Ergebnissen vorangegangener Studien. Ob bei einer experimentellen Parodontitis die Menge inflammatorischer Zellen im PDL-Gewebe geringer ist als im gingivalen Gewebe, konnte nicht eindeutig geklärt werden.

Die hier gezeigten Ergebnisse zeigen eine starke Färbung für CD 11b in der Pulpa. Eine Reaktion dieser Art wäre bei einer Manipulation des Zahnhartgewebes, beispielsweise durch kariogene Keime oder durch Kontakt der Pulpa mit den Parodontitis-induzierenden Keimen, im Sinne einer parodontalen Pulpitis zu erwarten gewesen. Da im hier durchgeführten Versuch jedoch kein Kontakt der applizierten Keime mit der Pulpa über das PDL möglich war, kann diese Art der Infektion ausgeschlossen werden. In den histologischen Schnitten sind auch keine Schädigungen der Zahnhartsubstanzen zu erkennen. Das schließt eine Infektion der Pulpa durch kariogene Keime ebenfalls aus.

4.4 Diskussion der Nachweisreaktionen von MMP-13

Der Zusammenhang zwischen Entzündung und Knochenmetabolismus während entzündlicher Erkrankungen konnte bereits in verschiedenen klinischen Studien sowie Tiermodellen gezeigt werden (Hardy und Cooper 2009). Gao et al. (2013) und Barnes et al. (2013) fanden in ihren Studien heraus, dass mit LPS stimulierte Osteoblasten MMP-13 mRNA verstärkt exprimieren. Wie in der Einleitung erwähnt, sind die

LPS auf der Außenmembran gram-negativer Bakterien zu finden und rufen eine Immunantwort bei Tieren und Menschen hervor. Diese Ergebnisse unterstreichen die Verknüpfung von Knochenmetabolismus und Entzündung (Hardy und Cooper 2009).

MMPs werden während einer Parodontitis sowohl von Entzündungszellen wie Monozyten, Makrophagen, Lymphozyten und polymorphkernigen Granulozyten als auch von ansässigen Zellen wie Fibroblasten, Epithelzellen oder Endothelzellen gebildet (Birkedal-Hansen 1993). Bei den Nachweisreaktionen von MMP-13 in der vorliegenden Arbeit konnten deutliche positive Färbungen in den Gefäßwänden und im PDL beobachtet werden. Dies könnte als eine beginnende Entzündungsreaktion gedeutet werden, die von Blutgefäßen ausgeht und sich in die umliegenden Gewebe ausbreitet. Jedoch besitzen MMPs auch physiologische Funktionen. Zu ihnen zählen Zellmigration, Gewebeumbau während Organentwicklung und Wachstum, Wundheilung, Angiogenese, Schmelzbildung und Antigenprozessierung und -präsentation (Hannas et al. 2007). Wie wichtig die MMPs für die Entwicklung und Struktur von Knochen sind, konnte in zahlreichen Studien gezeigt werden (Inada et al. 2004, Johansson et al. 1997, Stickens et al. 2004). Somit ist die hier beschriebene Beobachtung für einen Nachweis einer Parodontitis nicht eindeutig.

Zu diskutieren sind die hier gezeigten positiven Ergebnisse für MMP-13 im PDL und Alveolarknochen und die nicht vorhandene Veränderungen bzw. Destruktionen im Zahnhalteapparat. In beiden Versuchsgruppen zeigen sich immunhistochemisch positive Ergebnisse für MMP-13. Die Kollagenaseaktivität von MMP-13 konnte jedoch durch immunhistochemisches Anfärben der Kollagene nicht nachgewiesen werden. Warum hier keine entsprechende Reaktion im PDL nachzuweisen war ist fraglich. So könnte die Inokulation mit *P. gingivalis* unzureichend erfolgt sein und die Keime durch die angewandte Methode nicht ausreichend an den Ort gelangt sein, wo sie ihre pathogene Wirkung entfalten. Andererseits könnte das vorliegende Ergebnis auch durch eine unzureichende Spezifität der verwendeten Antikörper erklärt werden.

Die vorliegenden Ergebnisse zu MMP-13 zeigen eine positive Färbung in der Pulpa in beiden Versuchsgruppen. MMPs konnten bei Entzündungsprozessen der Pulpa nachgewiesen werden. Beim Abbau des entzündeten Pulpagewebes spielen vor al-

lem MMP-8 und MMP-9 eine wichtige Rolle (Gusman et al. 2002, Wahlgren et al. 2002). Jedoch wird MMP-13 auch in gesundem Pulpagewebe erheblich höher exprimiert als in anderen menschlichen Geweben (Sulkala et al. 2004). Die genannten Studien wurden an menschlichem Pulpagewebe durchgeführt. Ein direkter Vergleich der vorliegenden Arbeit mit den genannten Studien ist nur eingeschränkt möglich.

4.5 Diskussion der DDR1-Knockout-Maus

In der Literatur sind diverse KO-Mäuse als potenzielle Parodontitis-Modelle untersucht worden. So wurde bei genetisch veränderten Mäusen, denen Zelladhäsionsmoleküle fehlen, über erheblichen induzierten Alveolarknochenverlust berichtet (Baker et al. 2000b, Niederman et al. 2001). Auch das Fehlen von IL-10, einem anti-entzündlichem Zytokin (Sasaki et al. 2004), oder das Fehlen von IL-1 Rezeptor-Antagonist (Izawa et al. 2014) wirken sich auf die Ausprägung einer induzierten Parodontitis negativ aus und verstärken den Alveolarknochenverlust. In einer weiteren Studie wurde bei MFG-E8-KO-Mäusen (*milk fat globule-epidermal growth factor 8*) eine erhöhte Anzahl an Osteoklasten sowie vermehrter Alveolarknochenverlust gezeigt (Abe et al. 2014).

Die Verwendung der DDR1-KO-Maus sollte im Vergleich zur WT-Maus die Induktion einer Parodontitis vereinfachen und die induzierte Parodontitis möglichst verschlimmern. Die Untersuchungen des PDLs vor dem Versuch zeigten keine Unterschiede bezüglich des allgemeinen Aufbaus und speziell des Verlaufs der Sharpey-Fasern. Ob eine Parodontitis schwerer aufgetreten wäre, kann nicht beantwortet werden, da die Induktion weder bei den WT-Mäusen noch bei den DDR1-KO-Mäusen erfolgreich war.

Genetisch veränderte Mäuse haben bisher eine wichtige Rolle beim Verstehen der Entstehung von Krankheiten und beim Effekt bestimmter Genprodukte gespielt. Vorteile eines Mausmodells sind die vielen verschiedenen bereits vorhandenen KO-Mäuse, die den Zusammenhang zwischen möglichen Vorerkrankungen und der Parodontitis zulassen.

5 Zusammenfassung

Die chronisch entzündliche Erkrankung des Zahnhalteapparates, die Parodontitis, hat die Karies als Hauptursache für Zahnverlust in Deutschland abgelöst. Um Krankheitsentstehung und Krankheitsverlauf zu verstehen und Therapiemöglichkeiten zu finden, wurden Tiermodelle für die Parodontitis entwickelt.

In der vorliegenden Arbeit sollte durch orale Gabe des humanen parodontopathogenen Keims *P. gingivalis* bei Mäusen eine Parodontitis erzeugt werden. Hierzu wurden WT- und DDR1-KO-Mäuse über mehrere Wochen mit diesem Keim behandelt. Durch den immunhistochemischen Nachweis von Kollagen Typ I und Kollagen Typ III sollten die potenziellen strukturellen Veränderungen im PDL dargestellt werden. Mit den Entzündungsmarkern CD 11b und MMP-13 sollten die Entzündungsreaktionen des PDLs auf die Gabe von *P. gingivalis*, die dem Alveolarknochenverlust vorausgehen, nachgewiesen werden. Die immunhistochemischen Ergebnisse zeigten, dass weder bei WT- noch bei DDR1-KO-Mäusen eine Parodontitis entstanden war.

Das hier angewandte Parodontitismodell scheint nicht verlässlich und reproduzierbar zu sein. Die DDR1-KO-Maus ist für eine Parodontitis nicht empfänglicher und kann somit nicht als praktikables Parodontitismodell dienen.

6 Anhang

6.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Hämatoxylin-Eosin-Färbung	33
Abbildung 2: Immunhistochemischer Nachweis von Kollagen Typ I	36
Abbildung 3: Vergleich unbehandelter mit behandelter DDR1-Knockout-Maus	37
Abbildung 4: Immunhistochemischer Nachweis von Kollagen Typ III	40
Abbildung 5: Immunhistochemischer Nachweis von CD 11b	43
Abbildung 6: Immunhistochemischer Nachweis von MMP-13	46

6.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Protokoll der Gewebedehydrierung und Überführung in Paraffin	21
Tabelle 2: Protokoll Entparaffinierung und Rehydrierung	23
Tabelle 3: Protokoll H.E.-Färbung	24
Tabelle 4: Protokoll immunhistochemische Färbung	25
Tabelle 5: Liste der verwendeten Antikörper	28
Tabelle 6: Protokoll Dehydrierung	29
Tabelle 7: Auswertung der immunhistochemischen Nachweise von Kollagen Typ I	35
Tabelle 8: Auswertung der immunhistochemischen Nachweise für Kollagen Typ III	39
Tabelle 9: Auswertung immunhistochemischer Nachweis von CD 11b	42
Tabelle 10: Auswertung immunhistochemischer Nachweis von MMP-13	45

7 Literaturverzeichnis

Abe N, Kadowaki T, Okamoto K, Nakayama K, Ohishi M, Yamamoto K (1998): Biochemical and functional properties of lysine-specific cysteine proteinase (Lys-gingipain) as a virulence factor of *Porphyromonas gingivalis* in periodontal disease. *J Biochem* 123, 305-12

Abe T, Shin J, Hosur K, Udey MC, Chavakis T, Hajishengallis G (2014): Regulation of osteoclast homeostasis and inflammatory bone loss by MFG-E8. *J Immunol* 193, 1383-91

Adams R, Zander H, Polson A (1979): Cell populations in the transeptal fiber region before, during and after experimental periodontitis in squirrel monkeys. *Journal of periodontology* 50, 7-12

Adams R, Zander H, Polson A (1981): Interproximal and buccal cell populations apical to the sulcus before and during experimental periodontitis in squirrel monkeys. *J Periodontol* 52, 416-9

Alayan J, Ivanovski S, Gemmell E, Ford P, Hamlet S, Farah CS (2006): Deficiency of iNOS contributes to *Porphyromonas gingivalis*-induced tissue damage. *Oral Microbiol Immunol* 21, 360-5

Aruffo A, Stamenkovic I, Melnick M, Underhill CB, Seed B (1990): Cd44 Is the Principal Cell-Surface Receptor for Hyaluronate. *Cell* 61, 1303-1313

Avery BE, Simpson DM (1973): The baboon as a model system for the study of periodontal disease: clinical and light microscopic observations. *J Periodontol* 44, 675-86

Baker PJ, Evans RT, Roopenian DC (1994): Oral infection with *Porphyromonas gingivalis* and induced alveolar bone loss in immunocompetent and severe combined immunodeficient mice. *Arch Oral Biol* 39, 1035-40

Baker PJ, Dixon M, Evans RT, Dufour L, Johnson E, Roopenian DC (1999): CD4(+) T cells and the proinflammatory cytokines gamma interferon and interleukin-6 contribute to alveolar bone loss in mice. *Infect Immun* 67, 2804-9

Baker PJ, Dixon M, Evans RT, Roopenian DC (2000a): Heterogeneity of *Porphyromonas gingivalis* strains in the induction of alveolar bone loss in mice. *Oral Microbiol Immunol* 15, 27-32

Baker PJ, DuFour L, Dixon M, Roopenian DC (2000b): Adhesion molecule deficiencies increase *Porphyromonas gingivalis*-induced alveolar bone loss in mice. *Infect Immun* 68, 3103-7

Baker PJ, Dixon M, Roopenian DC (2000c): Genetic control of susceptibility to *Porphyromonas gingivalis*-induced alveolar bone loss in mice. *Infect Immun* 68, 5864-8

Barczyk M, Bolstad AI, Gullberg D (2013): Role of integrins in the periodontal ligament: organizers and facilitators. *Periodontol 2000* 63, 29-47

Barker KT, Martindale JE, Mitchell PJ, Kamalati T, Page MJ, Phippard DJ, Dale TC, Gusterson BA, Crompton MR (1995): Expression patterns of the novel receptor-like tyrosine kinase, DDR, in human breast tumours. *Oncogene* 10, 569-75

Barkocy-Gallagher GA, Foley JW, Lantz MS (1999): Activities of the *Porphyromonas gingivalis* PrtP proteinase determined by construction of prtP-deficient mutants and expression of the gene in *Bacteroides* species. *J Bacteriol* 181, 246-55

Barnes VM, Xu T, Shimizu E, Nakatani T, Jefcoat S, Vasilov A, Qin L, Partridge NC (2013): Triclosan blocks MMP-13 expression in hormone-stimulated osteoblasts. *J Periodontol* 84, 1683-9

Bartold PM, Narayanan AS (2006): Molecular and cell biology of healthy and diseased periodontal tissues. *Periodontol 2000* 40, 29-49

Bartold PM, Walsh LJ, Narayanan AS (2000): Molecular and cell biology of the gingiva. *Periodontol* 2000 24, 28-55

Becker J, Schuppan D, Benzian H, Bals T, Hahn EG, Cantaluppi C, Reichart P (1986): Immunohistochemical distribution of collagens types IV, V, and VI and of procollagens types I and III in human alveolar bone and dentine. *J Histochem Cytochem* 34, 1417-29

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* 39, 103-10

Becktor KB, Nolting D, Becktor JP, Kjaer I (2007): Immunohistochemical localization of epithelial rests of Malassez in human periodontal membrane. *Eur J Orthod* 29, 350-3

Bedi GS, Williams T (1994): Purification and characterization of a collagen-degrading protease from *Porphyromonas gingivalis*. *J Biol Chem* 269, 599-606

Beertsen W, McCulloch CA, Sodek J (1997): The periodontal ligament: a unique, multifunctional connective tissue. *Periodontol* 2000 13, 20-40

Bendyk A, Marino V, Zilm PS, Howe P, Bartold PM (2009): Effect of dietary omega-3 polyunsaturated fatty acids on experimental periodontitis in the mouse. *J Periodontal Res* 44, 211-6

Berkovitz BK (1990): The structure of the periodontal ligament: an update. *Eur J Orthod* 12, 51-76

Bezerra MM, de Lima V, Alencar VB, Vieira IB, Brito GA, Ribeiro RA, Rocha FA (2000): Selective cyclooxygenase-2 inhibition prevents alveolar bone loss in experimental periodontitis in rats. *J Periodontol* 71, 1009-14

Bezerra MM, Brito GA, Ribeiro RA, Rocha FA (2002): Low-dose doxycycline prevents inflammatory bone resorption in rats. *Braz J Med Biol Res* 35, 613-6

Bianco P, Fisher LW, Young MF, Termine JD, Robey PG (1990): Expression and localization of the two small proteoglycans biglycan and decorin in developing human skeletal and non-skeletal tissues. *J Histochem Cytochem* 38, 1549-63

Bidanset DJ, Guidry C, Rosenberg LC, Choi HU, Timpl R, Hook M (1992): Binding of the proteoglycan decorin to collagen type VI. *J Biol Chem* 267, 5250-6

Birkedal-Hansen H (1993): Role of matrix metalloproteinases in human periodontal diseases. *J Periodontol* 64, 474-84

Birkedal-Hansen H, Butler WT, Taylor RE (1977): Proteins of the periodontium. Characterization of the insoluble collagens of bovine dental cementum. *Calcif Tissue Res* 23, 39-44

Bosshardt DD, Selvig KA (1997): Dental cementum: the dynamic tissue covering of the root. *Periodontol 2000* 13, 41-75

Bostanci N, Belibasakis GN (2012): *Porphyromonas gingivalis*: an invasive and evasive opportunistic oral pathogen. *FEMS Microbiol Lett* 333, 1-9

Bostanci N, Allaker R, Johansson U, Rangarajan M, Curtis MA, Hughes FJ, McKay IJ (2007): Interleukin-1 α stimulation in monocytes by periodontal bacteria: antagonistic effects of *Porphyromonas gingivalis*. *Oral Microbiol Immunol* 22, 52-60

Butler WT, Birkedal-Hansen H, Beegle WF, Taylor RE, Chung E (1975): Proteins of the periodontium. Identification of collagens with the $[\alpha 1(I)]_2\alpha 2$ and $[\alpha 1(III)]_3$ structures in bovine periodontal ligament. *J Biol Chem* 250, 8907-12

Cantley MD, Bartold PM, Marino V, Reid RC, Fairlie DP, Wyszynski RN, Zilm PS, Haynes DR (2009): The use of live-animal micro-computed tomography to determine the effect of a novel phospholipase A2 inhibitor on alveolar bone loss in an in vivo mouse model of periodontitis. *J Periodontal Res* 44, 317-22

Carafoli F, Hohenester E (2013): Collagen recognition and transmembrane signalling by discoidin domain receptors. *Biochim Biophys Acta* 1834, 2187-94

Cekici A, Kantarci A, Hasturk H, Van Dyke TE (2014): Inflammatory and immune pathways in the pathogenesis of periodontal disease. *Periodontol 2000* 64, 57-80

Chiang CY, Kyritsis G, Graves DT, Amar S (1999): Interleukin-1 and tumor necrosis factor activities partially account for calvarial bone resorption induced by local injection of lipopolysaccharide. *Infect Immun* 67, 4231-6

Clark WB, Magnusson I, Beem JE, Jung JM, Marks RG, McArthur WP (1991): Immune modulation of *Prevotella intermedia* colonization in squirrel monkeys. *Infect Immun* 59, 1927-31

Darveau RP, Tanner A, Page RC (1997): The microbial challenge in periodontitis. *Periodontol 2000* 14, 12-32

DMS: Vierte Deutsche Mundgesundheitsstudie (DMS IV). Kurzfassung. Hrsg.: Institut der Deutschen Zahnärzte (IDZ) im Auftrag von Bundesärztekammer und Kassenzahnärztlicher Bundesvereinigung, 2006.
www.bzaek.de/fileadmin/PDFs/presse/dms/brosch.pdf. Abgerufen im Oktober 2014

Evans RT, Klausen B, Ramamurthy NS, Golub LM, Sfintescu C, Genco RJ (1992): Periodontopathic potential of two strains of *Porphyromonas gingivalis* in gnotobiotic rats. *Arch Oral Biol* 37, 813-9

Farquharson SI, Germaine GR, Gray GR (2000): Isolation and characterization of the cell-surface polysaccharides of *Porphyromonas gingivalis* ATCC 53978. *Oral Microbiol Immunol* 15, 151-7

Fine DH, Velliyagounder K, Furgang D, Kaplan JB (2005): The *Actinobacillus actinomycetemcomitans* autotransporter adhesin Aae exhibits specificity for buccal epithelial cells from humans and old world primates. *Infect Immun* 73, 1947-53

Finlay BB, Falkow S (1997): Common themes in microbial pathogenicity revisited. *Microbiol Mol Biol Rev* 61, 136-69

Flemmig TF (1999): Periodontitis. *Ann Periodontol* 4, 32-8

Fu HL, Valiathan RR, Arkwright R, Sohail A, Mihai C, Kumarasiri M, Mahasen KV, Mobashery S, Huang P, Agarwal G (2013): Discoidin domain receptors: unique receptor tyrosine kinases in collagen-mediated signaling. *J Biol Chem* 288, 7430-7

Fujise O, Hamachi T, Inoue K, Miura M, Maeda K (2002): Microbiological markers for prediction and assessment of treatment outcome following non-surgical periodontal therapy. *J Periodontol* 73, 1253-9

Fullmer HM, Sheetz JH, Narkates AJ (1974): Oxytalan connective tissue fibers: a review. *J Oral Pathol* 3, 291-316

Gallagher JT (1989): The extended family of proteoglycans: social residents of the pericellular zone. *Curr Opin Cell Biol* 1, 1201-18

Gao A, Kantarci A, Herrera BS, Gao H, Van Dyke TE (2013): A critical role for suppressors of cytokine signaling 3 in regulating LPS-induced transcriptional activation of matrix metalloproteinase-13 in osteoblasts. *PeerJ* 1, e51

Garlet GP, Cardoso CR, Silva TA, Ferreira BR, Avila-Campos MJ, Cunha FQ, Silva JS (2006): Cytokine pattern determines the progression of experimental periodontal disease induced by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* through the modulation of MMPs, RANKL, and their physiological inhibitors. *Oral Microbiol Immunol* 21, 12-20

Golub LM, Lee HM, Greenwald RA, Ryan ME, Sorsa T, Salo T, Giannobile WV (1997): A matrix metalloproteinase inhibitor reduces bone-type collagen degradation fragments and specific collagenases in gingival crevicular fluid during adult periodontitis. *Inflamm Res* 46, 310-9

Graves DT, Fine D, Teng YT, Van Dyke TE, Hajishengallis G (2008): The use of rodent models to investigate host-bacteria interactions related to periodontal diseases. *J Clin Periodontol* 35, 89-105

Graves DT, Kang J, Andriankaja O, Wada K, Rossa C, Jr. (2012): Animal models to study host-bacteria interactions involved in periodontitis. *Front Oral Biol* 15, 117-32

Gusman H, Santana RB, Zehnder M (2002): Matrix metalloproteinase levels and gelatinolytic activity in clinically healthy and inflamed human dental pulps. *Eur J Oral Sci* 110, 353-7

Haffajee AD, Cugini MA, Dibart S, Smith C, Kent RL, Jr., Socransky SS (1997): The effect of SRP on the clinical and microbiological parameters of periodontal diseases. *J Clin Periodontol* 24, 324-34

Hakkinen L, Oksala O, Salo T, Rahemtulla F, Larjava H (1993): Immunohistochemical localization of proteoglycans in human periodontium. *J Histochem Cytochem* 41, 1689-99

Hakkinen L, Strassburger S, Kahari VM, Scott PG, Eichstetter I, Lozzo RV, Larjava H (2000): A role for decorin in the structural organization of periodontal ligament. *Lab Invest* 80, 1869-80

Hamed M, Belibasakis GN, Cruchley AT, Rangarajan M, Curtis MA, Bostanci N (2009): Porphyromonas gingivalis culture supernatants differentially regulate interleukin-1beta and interleukin-18 in human monocytic cells. *Cytokine* 45, 99-104

Hannas AR, Pereira JC, Granjeiro JM, Tjaderhane L (2007): The role of matrix metalloproteinases in the oral environment. *Acta Odontol Scand* 65, 1-13

Hardy R, Cooper MS (2009): Bone loss in inflammatory disorders. *J Endocrinol* 201, 309-20

Hart GT, Shaffer DJ, Akilesh S, Brown AC, Moran L, Roopenian DC, Baker PJ (2004): Quantitative gene expression profiling implicates genes for susceptibility and resistance to alveolar bone loss. *Infect Immun* 72, 4471-9

Hassell TM (1993): Tissues and cells of the periodontium. *Periodontol* 2000 3, 9-38

Hellwig E, Klimek J, Attin T: Einführung in die Zahnerhaltung. 5. Auflage; Deutscher Zahnärzte Verlag, Köln 2009

Hernandez M, Valenzuela MA, Lopez-Otin C, Alvarez J, Lopez JM, Vernal R, Gamonal J (2006): Matrix metalloproteinase-13 is highly expressed in destructive periodontal disease activity. *J Periodontol* 77, 1863-70

Hernandez Rios M, Sorsa T, Obregon F, Tervahartiala T, Valenzuela MA, Pozo P, Dutzan N, Lesaffre E, Molas M, Gamonal J (2009): Proteolytic roles of matrix metalloproteinase (MMP)-13 during progression of chronic periodontitis: initial evidence for MMP-13/MMP-9 activation cascade. *J Clin Periodontol* 36, 1011-7

Hill PA, Murphy G, Docherty AJ, Hembry RM, Millican TA, Reynolds JJ, Meikle MC (1994): The effects of selective inhibitors of matrix metalloproteinases (MMPs) on bone resorption and the identification of MMPs and TIMP-1 in isolated osteoclasts. *J Cell Sci* 107 (Pt 11), 3055-64

Holt SC, Ebersole J, Felton J, Brunsvold M, Kornman KS (1988): Implantation of *Bacteroides gingivalis* in nonhuman primates initiates progression of periodontitis. *Science* 239, 55-7

Holt SC, Kesavalu L, Walker S, Genco CA (1999): Virulence factors of *Porphyromonas gingivalis*. *Periodontol* 2000 20, 168-238

Huang YH, Ohsaki Y, Kurisu K (1991): Distribution of type I and type III collagen in the developing periodontal ligament of mice. *Matrix* 11, 25-35

Ilgeli T, Vardar-Sengul S, Gurkan A, Sorsa T, Stackelberg S, Kose T, Atilla G (2006): Gingival crevicular fluid matrix metalloproteinase-13 levels and molecular forms in various types of periodontal diseases. *Oral Dis* 12, 573-9

Inada M, Wang Y, Byrne MH, Rahman MU, Miyaura C, Lopez-Otin C, Krane SM (2004): Critical roles for collagenase-3 (Mmp13) in development of growth plate cartilage and in endochondral ossification. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 17192-7

Izawa A, Ishihara Y, Mizutani H, Kobayashi S, Goto H, Okabe E, Takeda H, Ozawa Y, Kamiya Y, Sugita Y (2014): Inflammatory bone loss in experimental periodontitis induced by *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* in interleukin-1 receptor antagonist knockout mice. *Infect Immun* 82, 1904-13

Jalkanen S, Jalkanen M (1992): Lymphocyte CD44 binds the COOH-terminal heparin-binding domain of fibronectin. *J Cell Biol* 116, 817-25

Johansson N, Saarialho-Kere U, Airola K, Herva R, Nissinen L, Westermarck J, Vuorio E, Heino J, Kahari VM (1997): Collagenase-3 (MMP-13) is expressed by hypertrophic chondrocytes, periosteal cells, and osteoblasts during human fetal bone development. *Dev Dyn* 208, 387-97

Kahari VM, Larjava H, Uitto J (1991): Differential regulation of extracellular matrix proteoglycan (PG) gene expression. Transforming growth factor-beta 1 up-regulates biglycan (PGI), and versican (large fibroblast PG) but down-regulates decorin (PGII) mRNA levels in human fibroblasts in culture. *J Biol Chem* 266, 10608-15

Karimbux NY, Rosenblum ND, Nishimura I (1992): Site-specific Expression of Collagen I and XII mRNAs in the Rat Periodontal Ligament at Two Developmental Stages. *Journal of Dental Research* 71, 1355-1362

Kawada M, Yoshida A, Suzuki N, Nakano Y, Saito T, Oho T, Koga T (2004): Prevalence of *Porphyromonas gingivalis* in relation to periodontal status assessed by real-time PCR. *Oral Microbiol Immunol* 19, 289-92

Kimura S, Nagai A, Onitsuka T, Koga T, Fujiwara T, Kaya H, Hamada S (2000): Induction of experimental periodontitis in mice with *Porphyromonas gingivalis*-adhered ligatures. *J Periodontol* 71, 1167-73

Kitamura Y, Matono S, Aida Y, Hirofuji T, Maeda K (2002): Gingipains in the culture supernatant of *Porphyromonas gingivalis* cleave CD4 and CD8 on human T cells. *J Periodontal Res* 37, 464-8

Klausen B, Sfantescu C, Evans RT (1991): Asymmetry in periodontal bone loss of gnotobiotic Sprague-Dawley rats. *Arch Oral Biol* 36, 685-7

Kolenbrander PE, London J (1993): Adhere today, here tomorrow: oral bacterial adherence. *J Bacteriol* 175, 3247-52

Kuula H, Salo T, Pirila E, Tuomainen AM, Jauhiainen M, Uitto VJ, Tjaderhane L, Pussinen PJ, Sorsa T (2009): Local and systemic responses in matrix metalloproteinase 8-deficient mice during *Porphyromonas gingivalis*-induced periodontitis. *Infect Immun* 77, 850-9

Laine ML, van Winkelhoff AJ (1998): Virulence of six capsular serotypes of *Porphyromonas gingivalis* in a mouse model. *Oral Microbiol Immunol* 13, 322-5

Lalla E, Lamster IB, Feit M, Huang L, Schmidt AM (1998): A murine model of accelerated periodontal disease in diabetes. *J Periodontal Res* 33, 387-99

Lamont RJ, Jenkinson HF (1998): Life below the gum line: pathogenic mechanisms of *Porphyromonas gingivalis*. *Microbiol Mol Biol Rev* 62, 1244-63

Laval S, Butler R, Shelling AN, Hanby AM, Poulsom R, Ganesan TS (1994): Isolation and characterization of an epithelial-specific receptor tyrosine kinase from an ovarian cancer cell line. *Cell Growth Differ* 5, 1173-83

Lee SF, Andrian E, Rowland E, Marquez IC (2009): Immune response and alveolar bone resorption in a mouse model of *Treponema denticola* infection. *Infect Immun* 77, 694-8

Leitinger B (2011): Transmembrane collagen receptors. *Annu Rev Cell Dev Biol* 27, 265-90

Li CH, Amar S (2007): Morphometric, histomorphometric, and microcomputed tomographic analysis of periodontal inflammatory lesions in a murine model. *J Periodontol* 78, 1120-8

Lindhe J, Ericsson I (1978): Effect of ligature placement and dental plaque on periodontal tissue breakdown in the dog. *J Periodontol* 49, 343-50

Lohinai Z, Benedek P, Feher E, Gyorfı A, Rosivall L, Fazekas A, Salzman AL, Szabo C (1998): Protective effects of mercaptoethylguanidine, a selective inhibitor of inducible nitric oxide synthase, in ligature-induced periodontitis in the rat. *Br J Pharmacol* 123, 353-60

Lukinmaa PL, Waltimo J (1992): Immunohistochemical localization of types I, V, and VI collagen in human permanent teeth and periodontal ligament. *J Dent Res* 71, 391-7

Lukinmaa PL, Mackie EJ, Thesleff I (1991): Immunohistochemical localization of the matrix glycoproteins-tenascin and the ED-sequence-containing form of cellular fibronectin--in human permanent teeth and periodontal ligament. *J Dent Res* 70, 19-26

MacNeil RL, Berry JE, Strayhorn CL, Shigeyama Y, Somerman MJ (1998): Expression of type I and XII collagen during development of the periodontal ligament in the mouse. *Arch Oral Biol* 43, 779-87

Matheson S, Larjava H, Hakkinen L (2005): Distinctive localization and function for lumican, fibromodulin and decorin to regulate collagen fibril organization in periodontal tissues. *J Periodontal Res* 40, 312-24

Matsuura M, Herr Y, Han KY, Lin WL, Genco RJ, Cho MI (1995): Immunohistochemical expression of extracellular matrix components of normal and healing periodontal tissues in the beagle dog. *J Periodontol* 66, 579-93

Muller R, Van Campenhout H, Van Damme B, Van Der Perre G, Dequeker J, Hildebrand T, Ruegsegger P (1998): Morphometric analysis of human bone biopsies: a quantitative structural comparison of histological sections and micro-computed tomography. *Bone* 23, 59-66

Mutschelknauss RE (Hrsg.): Lehrbuch der klinischen Parodontologie; Quintessenz Verlag, Berlin u.a. 2000

Nagata K, Huang YH, Ohsaki Y, Kukita T, Nakata M, Kurisu K (1992): Demonstration of type III collagen in the dentin of mice. *Matrix* 12, 448-55

Nanci A: Ten Cate's oral histology: development, structure, and function. 6. Auflage; Mosby Inc., and affiliate of Elsevier Inc., St. Louis, MO 2003

Nanci A, Bosshardt DD (2006): Structure of periodontal tissues in health and disease. *Periodontol 2000* 40, 11-28

Nemoto T, Ohashi K, Akashi T, Johnson JD, Hirokawa K (1997): Overexpression of protein tyrosine kinases in human esophageal cancer. *Pathobiology* 65, 195-203

Niederman R, Westernoff T, Lee C, Mark LL, Kawashima N, Ullman-Culler M, Dewhirst FE, Paster BJ, Wagner DD, Mayadas T (2001): Infection-mediated early-onset periodontal disease in P/E-selectin-deficient mice. *J Clin Periodontol* 28, 569-75

O'Brien-Simpson NM, Pathirana RD, Paolini RA, Chen YY, Veith PD, Tam V, Ally N, Pike RN, Reynolds EC (2005): An immune response directed to proteinase and adhesin functional epitopes protects against *Porphyromonas gingivalis*-induced periodontal bone loss. *J Immunol* 175, 3980-9

Okuda K, Kato T, Naito Y, Takazoe I, Kikuchi Y, Nakamura T, Kiyoshige T, Sasaki S (1988): Protective efficacy of active and passive immunizations against experimental infection with *Bacteroides gingivalis* in ligated hamsters. *J Dent Res* 67, 807-11

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

Page RC, Offenbacher S, Schroeder HE, Seymour GJ, Kornman KS (1997): Advances in the pathogenesis of periodontitis: summary of developments, clinical implications and future directions. *Periodontol 2000* 14, 216-48

Polak D, Wilensky A, Shapira L, Halabi A, Goldstein D, Weiss EI, Houry-Haddad Y (2009): Mouse model of experimental periodontitis induced by *Porphyromonas gingivalis*/Fusobacterium nucleatum infection: bone loss and host response. *J Clin Periodontol* 36, 406-10

Potempa J, Pike R, Travis J (1995): The multiple forms of trypsin-like activity present in various strains of *Porphyromonas gingivalis* are due to the presence of either Arg-gingipain or Lys-gingipain. *Infect Immun* 63, 1176-82

Potempa J, Pike R, Travis J (1997): Titration and mapping of the active site of cysteine proteinases from *Porphyromonas gingivalis* (gingipains) using peptidyl chloromethanes. *Biol Chem* 378, 223-30

Potempa J, Mikolajczyk-Pawlinska J, Brassell D, Nelson D, Thogersen IB, Enghild JJ, Travis J (1998): Comparative properties of two cysteine proteinases (gingipains R), the products of two related but individual genes of *Porphyromonas gingivalis*. *J Biol Chem* 273, 21648-57

Potempa J, Banbula A, Travis J (2000): Role of bacterial proteinases in matrix destruction and modulation of host responses. *Periodontol 2000* 24, 153-92

Ravanti L, Hakkinen L, Larjava H, Saarialho-Kere U, Foschi M, Han J, Kahari VM (1999): Transforming growth factor-beta induces collagenase-3 expression by human gingival fibroblasts via p38 mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem* 274, 37292-300

Rincon JC, Young WG, Bartold PM (2006): The epithelial cell rests of Malassez--a role in periodontal regeneration? *J Periodontal Res* 41, 245-52

Romanos GE, Schroter-Kermani C, Hinz N, Wachtel HC, Bernimoulin JP (1992): Immunohistochemical localization of collagenous components in healthy periodontal tissues of the rat and marmoset (*Callithrix jacchus*). I. Distribution of collagen types I and III. *J Periodontal Res* 27, 101-10

Rosen SD, Kafka JA, Simpson DL, Barondes SH (1973): Developmentally regulated, carbohydrate-binding protein in Dictyostelium discoideum. Proc Natl Acad Sci U S A 70, 2554-7

Saffar JL, Lasfargues JJ, Cherruau M (1997): Alveolar bone and the alveolar process: The socket that is never stable. Periodontol 2000 13, 76-90

Sasaki H, Okamatsu Y, Kawai T, Kent R, Taubman M, Stashenko P (2004): The interleukin-10 knockout mouse is highly susceptible to Porphyromonas gingivalis-induced alveolar bone loss. J Periodontol Res 39, 432-41

Schminke B, Muhammad H, Bode C, Sadowski B, Gerter R, Gersdorff N, Burgers R, Monsonigo-Ornan E, Rosen V, Miosge N (2014): A discoidin domain receptor 1 knock-out mouse as a novel model for osteoarthritis of the temporomandibular joint. Cell Mol Life Sci 71, 1081-96

Schroeder HE: Orale Strukturbiologie. 5. Auflage; Thieme, Stuttgart 2000

Schroeder HE, Lindhe J (1980): Conditions and pathological features of rapidly destructive, experimental periodontitis in dogs. J Periodontol 51, 6-19

Schroeder HE, Listgarten MA (1997): The gingival tissues: the architecture of periodontal protection. Periodontol 2000 13, 91-120

Sharma A (2010): Virulence mechanisms of Tannerella forsythia. Periodontol 2000 54, 106-16

Sharma A, Inagaki S, Honma K, Sfantescu C, Baker PJ, Evans RT (2005): Tannerella forsythia-induced alveolar bone loss in mice involves leucine-rich-repeat BspA protein. J Dent Res 84, 462-7

Sheets SM, Robles-Price AG, McKenzie RM, Casiano CA, Fletcher HM (2008): Gingipain-dependent interactions with the host are important for survival of Porphyromonas gingivalis. Front Biosci 13, 3215-38

Sheldon IM, Roberts MH (2010): Toll-like receptor 4 mediates the response of epithelial and stromal cells to lipopolysaccharide in the endometrium. *PLoS One* 5, e12906

Socransky SS, Haffajee AD (2005): Periodontal microbial ecology. *Periodontol 2000* 38, 135-87

Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent RL, Jr. (1998): Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol* 25, 134-44

Springer WR, Cooper DN, Barondes SH (1984): Discoidin I is implicated in cell-substratum attachment and ordered cell migration of *Dictyostelium discoideum* and resembles fibronectin. *Cell* 39, 557-64

Steffensen B, Duong AH, Milam SB, Potempa CL, Winborn WB, Magnuson VL, Chen D, Zardeneta G, Klebe RJ (1992): Immunohistological localization of cell adhesion proteins and integrins in the periodontium. *J Periodontol* 63, 584-92

Sternlicht MD, Werb Z (2001): How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol* 17, 463-516

Stickens D, Behonick DJ, Ortega N, Heyer B, Hartenstein B, Yu Y, Fosang AJ, Schorpp-Kistner M, Angel P, Werb Z (2004): Altered endochondral bone development in matrix metalloproteinase 13-deficient mice. *Development* 131, 5883-95

Sulkala M, Paakkonen V, Larmas M, Salo T, Tjaderhane L (2004): Matrix metalloproteinase-13 (MMP-13, collagenase-3) is highly expressed in human tooth pulp. *Connect Tissue Res* 45, 231-7

Sundqvist G, Figdor D, Hanstrom L, Sorlin S, Sandstrom G (1991): Phagocytosis and virulence of different strains of *Porphyromonas gingivalis*. *Scand J Dent Res* 99, 117-29

Tatakis DN, Guglielmoni P (2000): HLA-B27 transgenic rats are susceptible to accelerated alveolar bone loss. *J Periodontol* 71, 1395-400

Tervahartiala T, Pirila E, Ceponis A, Maisi P, Salo T, Tuter G, Kallio P, Tornwall J, Srinivas R, Konttinen YT (2000): The in vivo expression of the collagenolytic matrix metalloproteinases (MMP-2, -8, -13, and -14) and matrilysin (MMP-7) in adult and localized juvenile periodontitis. *J Dent Res* 79, 1969-77

Thesleff I, Stenman S, Vaheeri A, Timpl R (1979): Changes in the matrix proteins, fibronectin and collagen, during differentiation of mouse tooth germ. *Dev Biol* 70, 116-26

van Winkelhoff AJ, Loos BG, van der Reijden WA, van der Velden U (2002): Porphyromonas gingivalis, Bacteroides forsythus and other putative periodontal pathogens in subjects with and without periodontal destruction. *J Clin Periodontol* 29, 1023-8

Vogel W (1999): Discoidin domain receptors: structural relations and functional implications. *FASEB J* 13 Suppl, S77-82

Vogel W, Gish GD, Alves F, Pawson T (1997): The discoidin domain receptor tyrosine kinases are activated by collagen. *Mol Cell* 1, 13-23

Vogel WF, Aszodi A, Alves F, Pawson T (2001): Discoidin domain receptor 1 tyrosine kinase has an essential role in mammary gland development. *Mol Cell Biol* 21, 2906-17

Wahlgren J, Salo T, Teronen O, Luoto H, Sorsa T, Tjaderhane L (2002): Matrix metalloproteinase-8 (MMP-8) in pulpal and periapical inflammation and periapical root-canal exudates. *Int Endod J* 35, 897-904

Wang HM, Nanda V, Rao LG, Melcher AH, Heersche JN, Sodek J (1980): Specific immunohistochemical localization of type III collagen in porcine periodontal tissues using the peroxidase-antiperoxidase method. *J Histochem Cytochem* 28, 1215-23

Wang M, Shakhathreh MA, James D, Liang S, Nishiyama S, Yoshimura F, Demuth DR, Hajishengallis G (2007): Fimbrial proteins of porphyromonas gingivalis mediate in vivo virulence and exploit TLR2 and complement receptor 3 to persist in macrophages. *J Immunol* 179, 2349-58

Weber GF, Ashkar S, Glimcher MJ, Cantor H (1996): Receptor-ligand interaction between CD44 and osteopontin (Eta-1). *Science* 271, 509-12

Weiner HL, Rothman M, Miller DC, Ziff EB (1996): Pediatric brain tumors express multiple receptor tyrosine kinases including novel cell adhesion kinases. *Pediatr Neurosurg* 25, 64-71; discussion 71-2

Wilensky A, Gabet Y, Yumoto H, Houry-Haddad Y, Shapira L (2005): Three-dimensional quantification of alveolar bone loss in Porphyromonas gingivalis-infected mice using micro-computed tomography. *J Periodontol* 76, 1282-6

Wong CC, Zhang H, Gilkes DM, Chen J, Wei H, Chaturvedi P, Hubbi ME, Semenza GL (2012): Inhibitors of hypoxia-inducible factor 1 block breast cancer metastatic niche formation and lung metastasis. *J Mol Med (Berl)* 90, 803-15

Worapamorn W, Li H, Pujic Z, Xiao Y, Young WG, Bartold PM (2000): Expression and distribution of cell-surface proteoglycans in the normal Lewis rat molar periodontium. *J Periodontal Res* 35, 214-24

Worapamorn W, Xiao Y, Li H, Young WG, Bartold PM (2002): Differential expression and distribution of syndecan-1 and -2 in periodontal wound healing of the rat. *J Periodontal Res* 37, 293-9

Yang HW, Huang YF, Chou MY (2004): Occurrence of Porphyromonas gingivalis and Tannerella forsythensis in periodontally diseased and healthy subjects. *J Periodontol* 75, 1077-83

Zadeh HH, Nichols FC, Miyasaki KT (1999): The role of the cell-mediated immune response to Actinobacillus actinomycetemcomitans and Porphyromonas gingivalis in periodontitis. *Periodontol 2000* 20, 239-88

Zhang W, Ju J, Rigney T, Tribble G (2014): Porphyromonas gingivalis infection increases osteoclastic bone resorption and osteoblastic bone formation in a periodontitis mouse model. BMC Oral Health 14, 89

Zhang X, Schuppan D, Becker J, Reichart P, Gelderblom HR (1993): Distribution of undulin, tenascin, and fibronectin in the human periodontal ligament and cementum: comparative immunoelectron microscopy with ultra-thin cryosections. J Histochem Cytochem 41, 245-51

Zhou Q, Desta T, Fenton M, Graves DT, Amar S (2005): Cytokine profiling of macrophages exposed to Porphyromonas gingivalis, its lipopolysaccharide, or its FimA protein. Infect Immun 73, 935-43

Zimmermann DR, Ruoslahti E (1989): Multiple domains of the large fibroblast proteoglycan, versican. EMBO J 8, 2975-81

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Nicolai Miosge für die geduldige und außergewöhnlich gute Betreuung und Unterstützung bei der Entstehung dieser Arbeit. Danken möchte ich auch für die Möglichkeit, einen Einblick in das wissenschaftliche Arbeiten in einem Labor zu erhalten.

Ich danke Herrn PD Dr. med. dent. Nikolaus Gersdorff, der mir die Promotion in der Abteilung erst ermöglicht hat.

Frau Silvia Kellner, leitende MTA des Instituts für Mikrobiologie der Universitätsmedizin Göttingen, danke ich für ihre großzügige Unterstützung, ohne die die Durchführung der Versuche nicht möglich gewesen wäre.

Ich danke Frau Andrea Bernhard und Frau Boguslawka Sadowski für die Hilfe und Anregungen bei den lichtmikroskopischen Arbeiten und Frau Christa Bode für die Unterstützung und den fachlichen Rat bei der Arbeit im Labor.

Danken möchte ich außerdem Herrn Dr. med. dent. Boris Schminke, Herrn Dr. Hayat Muhammad und Gökhan Cingöz für die geduldige Hilfsbereitschaft und die stete Beantwortung fachlicher und methodischer Fragen.

Andrea Schubert und Robert Eschholz danke ich für die Zusammenarbeit und gegenseitige Motivation sowie die vielen gemeinsamen Stunden im Labor. Ich bedanke mich bei allen Mitarbeitern und Doktoranden der *Arbeitsgemeinschaft orale Biologie und Geweberegeneration* für die Hilfsbereitschaft und das schöne Arbeitsklima.

Lebenslauf

Am 2. März 1987 wurde ich als ältester Sohn von drei Kindern meiner Eltern Eva Buderer und Dr. Johannes Buderer in Ludwigsburg geboren. Meine Mutter studierte Pädagogik für Heilberufe und ist selbstständig im Bereich Ernährungsberatung tätig. Mein Vater ist niedergelassener Allgemeinmediziner mit den Schwerpunkten Ernährungsmedizin, Prävention und Psychotherapie.

Von 1993 bis 1997 besuchte ich die Hillerschule in Bietigheim-Bissingen. Ab 1997 setzte ich meine Schullaufbahn an der Realschule in Bissingen fort und wechselte im Jahr 2000 auf das Helene-Lange-Gymnasium in Markgröningen, an dem ich 2006 das Abitur ablegte. Anschließend absolvierte ich beim Deutschen Roten Kreuz in Ludwigsburg meinen Zivildienst in Form eines Freiwilligen Sozialen Jahres. Dabei erhielt ich eine Ausbildung zum Rettungssanitäter. Im Frühjahr 2008 machte ich in der Zentralen Notaufnahme des Städtischen Klinikums Mittelbaden in Baden-Baden ein dreimonatiges Pflegepraktikum.

Zum Sommersemester 2008 begann ich das Zahnmedizinstudium an der Georg-August-Universität in Göttingen. Seit 2010 bin ich Doktorand im Zentrum für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde in der *Arbeitsgemeinschaft orale Biologie und Geweberegeneration* unter der Leitung von Prof. Dr. med. Nicolai Miosge. Im Juni 2013 absolvierte ich mein zahnmedizinisches Staatsexamen. Seit Oktober 2013 studiere ich Humanmedizin ebenfalls an der Universität in Göttingen. Im Herbst 2014 legte ich das Physikum ab.