

Arbeitsgruppe Klinische Immunologie  
Leitung: Prof. Dr. rer. nat. B. Müller-Hilke, MME

**WECHSELWIRKUNG DER KOLLAGEN-INDUZIERTEN ARTHRITIS UND  
DER PARODONTITIS IM MAUSMODELL**

Inauguraldissertation  
zur Erlangung des akademischen Grades Doktor der Medizin  
der Universitätsmedizin Rostock

vorgelegt von:

Anna-Lena Buschhart, geb. am 31.07.1995 in Schwerin

aus Rostock

Rostock, den 11.11.2020

Veröffentlichung der Dissertation:

Die Ergebnisse dieser Arbeit wurden unter folgendem Titel bei dem Journal PLOS ONE am 31.12.2020 veröffentlicht.

**Buschhart A**, Bolten L, Volzke J, Ekat K, Kneitz S, Kreikemeyer B, et al. Periodontal pathogens alter the synovial proteome. PloS One. 2020 Dec 31;15(12):e0242868. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0242868>

Gutachter:

1. Gutachterin: Prof. Dr. Brigitte Müller-Hilke, Institut für Immunologie, Universitätsmedizin Rostock
2. Gutachter: Prof. Dr. Bernd Kreikemeyer, Institut für Medizinische Mikrobiologie, Virologie und Hygiene, Universitätsmedizin Rostock
3. Gutachter: Prof. Dr. Thomas Kocher, Abteilung für Parodontologie, Universitätsmedizin Greifswald

Datum der Einreichung: 11.11.2020

Datum der Verteidigung: 11.08.2021

*Lotti und den Mäusen gewidmet*

## **Eidesstattliche Versicherung**

---

Ich versichere eidesstattlich durch eigenhändige Unterschrift, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Stellen, die wörtlich oder sinngemäß aus Veröffentlichungen entnommen sind, habe ich als solche kenntlich gemacht.

Die Arbeit ist noch nicht veröffentlicht und ist in gleicher oder ähnlicher Weise noch nicht als Studienleistung zur Anerkennung oder Bewertung vorgelegt worden. Ich weiß, dass bei Abgabe einer falschen Versicherung die Prüfung als nicht bestanden zu gelten hat.

Rostock, den 11.11.2020

Anna-Lena Buschhart



## Danksagung

---

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die es mir ermöglicht haben, diese Arbeit zu vollenden. Zu allererst danke ich Frau Professorin Dr. rer. nat. Brigitte Müller-Hilke, dass ich unter ihrer Leitung meine Promotion erstellen durfte und gelernt habe, experimentell zu arbeiten. Lennart Bolten danke ich für die Zusammenarbeit während der Experimente und allem, was danach folgte. Johann Volzke danke ich für die großartige Unterstützung bei vielen Experimenten und vor allem dafür, dass er mit seiner Expertise jederzeit zur Verfügung stand. Ich danke Paul Lübcke und Katharina Wenndorf, dass sie mir den Umgang mit den Tieren im experimentellen Rahmen näherbrachten und eine emotionale Unterstützung waren. Für die Analyse der Synovialmembran bedanke ich mich bei Dr. Stefan Mikkat. Michael Sämman danke ich für die Erstellung der 3D-Kiefermodelle. Jana Bull und Dr. Katharina Ekat danke ich für die Anzucht der Bakterien und insbesondere Jana Bull für die Anfertigung der PCR. Dr. Susanne Kneitz danke ich für die Analysen des Mikrobioms. Ich danke Ilona Klammuß und Karin Gerber für die nette Kommunikation und die Hilfe bei der Organisation der Tiere. Für die Durchsicht dieser Arbeit danke ich Frau Dr. Sonja Sälzer, Alena Kaiser, Michael Sämman, Johanna Reimer, Elina Bernitt und Paul Lübcke. Ich möchte mich besonders bei meinen Eltern, meiner Familie und meinen Freunden Lini, Hanni, Michi und Micha für die große Unterstützung im gesamten Studium und während der Doktorarbeit herzlichst bedanken, ohne sie wäre das so nicht möglich gewesen.

### Genderthematische Anmerkung:

In dieser Arbeit wird zur leichteren Verständlichkeit das generische Maskulinum verwendet. Hiermit weise ich darauf hin, dass dabei auch feminine sowie nicht binäre Personen gemeint sind.

## Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	vollständige Bezeichnung
<i>Aa</i>	Aggregatibacter actinomycetemcomitans
ABC	alveolar bone crest (alveolärer Knochenkamm)
ACPA	anti citrullinated peptide antibodies (Antikörper gegen cyclische citrullinierte Peptide)
ANOVA	analysis of variance (Varianzanalyse)
B10.Q	Mausstamm Black 10
BHI	Brain Heart Infusion Medium
BSA	bovines Serumalbumin
CEJ	cementoenamel junction (Übergang Zahnzement zu Zahnschmelz)
CFA	Complete Freund's Adjuvant (komplettes Freund's-Adjuvanz)
CIA	collagen induced arthritis (Kollagen-induzierte Arthritis)
CMC	Carboxymethylcellulose
DBA/1J	Mausstamm (Dilute Brown Non-Agouti)
DMARDs	Disease Modifying Antirheumatic Drugs (Krankheitsmodifizierende Antirheumatika)
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
F1 (DBA/1J x B10.Q)	F1 Generation aus dem DBA/1J- und B10.Q-Stamm
FASP	filter aided sample preparation (filterunterstützte Probenvorbereitung)
FLS	Fibroblasten-ähnliche Synoviozyten
<i>Fn</i>	Fusobacterium nucleatum
GM-CSF	Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (Granulozyten-Monozyten-Kolonie-stimulierender Faktor)
HLA	Human Leukocyte Antigene (Histokompatibilitätsantigen)

IFA	Incomplete Freund's Adjuvant (inkomplettes Freund's-Adjuvant)
IgG	Immunglobulin G
IGKC	konstante Ig-κ-Kette
IL	Interleukin
INF	Interferon
KBE	koloniebildende Einheit
LALLF	Landesamt für Landwirtschaft, Lebensmittelsicherheit und Fischerei M-V
LC/MS	Flüssigkeitschromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung
LSD	least significant difference test (Test auf den geringsten signifikanten Unterschied)
MHC	major histocompatibility complex (Haupthistokompatibilitätskomplex)
MTX	Methotrexat
n	Number (Anzahl)
NaCl	Natriumchlorid
OTU	operational taxonomic unit (operative taxonomische Einheit)
p	probability (Signifikanzwert)
PAD	Peptidylarginine Deiminase
PBS	Phosphate-buffered saline (Phosphatgepufferte Salzlösung)
PC	Hauptkomponente
PD	Parodontitis
PFA	Paraformaldehyd
<i>Pg</i>	<i>Porphyromonas gingivalis</i>
PZN	Pharmazentralnummer
RA	Rheumatoide Arthritis

RANKL	Receptor Activator of NF- $\kappa$ B Ligand (Rezeptor-Aktivator vom NF- $\kappa$ B Ligand)
REF	Artikelnummer als Referenz
RF	Rheumafaktor
ROI	region of interest (Bereich von Interesse)
rpm	rounds per minute (Drehzahl)
SA-PE	Streptavidin-Phycoerythrin
Sham	Scheinbehandlung, wie Placebo
TNF	Tumornekrosefaktor
$\mu$ CT	Micro-Computertomograph

## Zusammenfassung

---

Die rheumatoide Arthritis (RA) ist eine chronisch entzündliche Autoimmunerkrankung der Gelenke, welche zu Knorpel- und Knochenschäden, sowie zu Einschränkungen der Bewegungsfähigkeit und Reduzierung der Lebensqualität führt. Die Parodontitis (PD) ist eine Entzündung des Zahnhalteapparates, die eine Zerstörung des Alveolarknochens und Zahnverluste bewirkt. Beide Erkrankungen gelten als Risikofaktor der jeweils anderen. Dementsprechend leiden Patienten mit RA häufiger an PD und umgekehrt. Zwei PD-typische Bakterien, *Porphyromonas gingivalis* (*Pg*) und *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (*Aa*) bewirken auf unterschiedliche Weise eine Citrullinierung von Proteinen im menschlichen Organismus. Einige Patienten bilden gegen diese citrullinierten Antigene spezifische Antikörper, die ACPAs (Antikörper vom IgG-Typ gegen das cyclische citrullinierte Peptid), welche nach aktuellem Wissensstand die Schnittstelle zwischen RA und PD darstellen. Der gegenseitige Einfluss, den PD auf die RA ausübt und umgekehrt, ist jedoch noch nicht definiert. In der vorliegenden Arbeit wurde ein Tiermodell genutzt, um zu analysieren, wie sich *Pg* und *Aa* in ihrem pathogenen Potenzial unterscheiden und welche Auswirkungen beide Erkrankungen aufeinander haben.

Der Versuchsaufbau umfasste die orale Inokulation mit *Pg* oder *Aa* zur Induktion von alveolärem Knochenverlust gefolgt von der Kollagen-induzierten Arthritis (CIA). Die Arthritis wurde makroskopisch beurteilt, der alveoläre Knochenverlust wurde mittels  $\mu$ -Computertomographie ( $\mu$ CT) evaluiert, Serumzytokine und Antikörper wurden quantifiziert und Proteomanalysen der Synovialmembranen wurden mittels Massenspektrometrie durchgeführt. Keiner der beiden Pathogene wirkte sich auf die makroskopische Arthritis aus, und die Arthritis führte nicht zu einer Verschlimmerung des alveolären Knochenverlusts. Es gab jedoch geringfügige Unterschiede zwischen *Pg* und *Aa*, wobei *Pg* einen stärkeren alveolären Knochenverlust induzierte und gleichzeitig die Entwicklung der nachfolgenden CIA zu verzögern schien. Sowohl die CIA als auch die Inokulation mit *Pg* lösten eine Immunantwort aus, die zu erhöhten Spiegeln von inflammatorischen Zytokinen im Serum führte. Histologisch ließen sich durch die CIA ausgelöste Knorpelschäden und Entzündungszeichen nachweisen. Auf molekularer Ebene führten orale Inokulationen mit *Pg* und *Aa* sowie die CIA zu unterschiedlichen Expressionsmustern in den Synovialmembranen, die an zelluläre beziehungsweise humorale Immunantworten erinnerten.

Die in dieser *in vivo* Studie ausgelösten Erkrankungen CIA und PD führten zu systemischen Immunantworten und veränderten das synoviale Proteom. Insbesondere die *Pg*- und *Aa*-spezifischen Auswirkungen auf die Zusammensetzung der Synovia lassen darauf schließen, dass orale Pathogene eine Rolle bei der Entstehung der RA und deren Therapie haben.

## Inhaltsverzeichnis

---

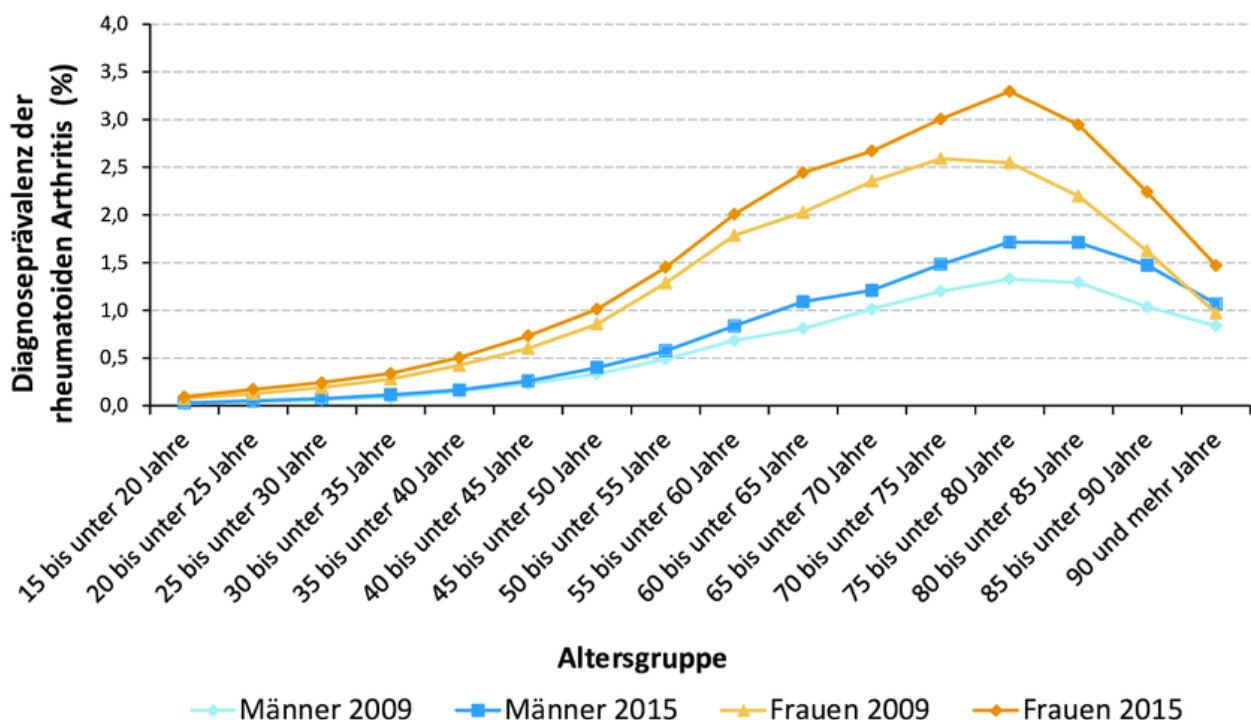
Eidesstattliche Versicherung.....	IV
Danksagung.....	V
Abkürzungsverzeichnis.....	VI
Zusammenfassung .....	IX
Inhaltsverzeichnis .....	X
1. Einleitung .....	1
1.1 Rheumatoide Arthritis .....	1
1.2 Parodontitis .....	4
1.3 Zusammenhang zwischen Rheumatoider Arthritis und Parodontitis .....	6
1.4 Zielsetzung der Studie.....	8
1.5 Versuchsübersicht .....	9
2. Material .....	10
2.1 Verbrauchsmaterialien.....	10
2.2 Chemikalien.....	11
2.3 Geräte .....	12
2.4 Versuchstiere.....	12
2.5 Software .....	13
3. Methoden .....	14
3.1 Experimentaufbau und Studiendesign .....	14
3.2 Versuchstiere und Tierhaltung.....	15
3.3 Zucht und Aufbereitung der Bakterien.....	16
3.4 Induktion der Parodontitis.....	17
3.5 Asservierung der Unterkiefer für die Quantifizierung der Parodontitis .....	18
3.6 Vorgehensweise zur Quantifizierung der Parodontitis via $\mu$ CT .....	18
3.7 Induktion der Kollagen-induzierten Arthritis.....	21
3.8 Scoring der Kollagen-induzierten Arthritis .....	22
3.9 Blutentnahme aus dem retroorbitalen Venenplexus.....	23
3.10 Analyse der Zytokine und Antikörper im Serum .....	23
3.11 Histologie der Pfoten und Unterkiefer.....	25
3.12 Narkose der Versuchstiere .....	26
3.13 Überwachung des Körpergewichtes.....	26

3.14 Analyse der Synovialmembranen.....	27
3.15 Stuhlanalyse.....	31
3.16 Statistische Analysen .....	33
4. Ergebnisse .....	34
4.1 Parodontitis unter Einfluss der Kollagen-induzierten Arthritis.....	34
4.1.1 Bakterieninduzierter alveolärer Knochenverlust .....	34
4.1.2 Systemische Immunreaktion und Antikörperbildung nach oraler Bakterieninokulation ...	36
4.1.3 Histologische Untersuchung der Unterkiefer nach Parodontitisinduktion .....	39
4.2 Kollagen-induzierte Arthritis unter Einfluss der Parodontitis.....	40
4.2.1 Arthritisscores und -inzidenzen in Abhängigkeit der verschiedenen Bakterien.....	40
4.2.2 CIA- und bakterieninduzierte Gewichtsveränderungen .....	42
4.2.3 Systemische Immunreaktion nach der CIA.....	43
4.2.4 Arthritistypische Veränderungen in der histologischen Untersuchung.....	45
4.3 Veränderungen des synovialen Proteoms durch CIA und Bakterieninokulation .....	46
4.4 Auswirkungen der CIA und Bakterieninokulation auf das Darmmikrobiom .....	49
5. Diskussion.....	51
5.1 Porphyromonas gingivalis als Auslöser alveolären Knochenverlusts.....	51
5.2 Die Induktion der Parodontitis führt zu systemischer Immunreaktion .....	52
5.3 Abhängigkeit der Arthritisscores und -inzidenzen vom inokulierten Bakterium .....	53
5.4 Abhängigkeit des Körpergewichts von Bakterieninokulation und CIA .....	54
5.5 CIA führt zu einer Erhöhung von systemischen Zytokinen.....	54
5.6 Inokulierte Bakterien und CIA verändern die Zusammensetzung des synovialen Proteoms ..	55
5.7 Das Darmmikrobiom bleibt von einer CIA und inokulierten Bakterien unbeeinflusst.....	56
5.8 Fazit und Ausblick .....	58
Literaturverzeichnis.....	XII
Abbildungsverzeichnis.....	XXI
Tabellenverzeichnis .....	XXII
Lebenslauf.....	XXIII
Thesen.....	XXIV

## 1. Einleitung

### 1.1 Rheumatoide Arthritis

Die rheumatoide Arthritis (RA) ist eine chronisch autoimmunologische Systemerkrankung, die bis zu 1% der Population betrifft [1]. Wie in Abbildung 1 zu erkennen ist, steigt die Inzidenz mit zunehmendem Alter bis zum achten Lebensjahrzehnt stetig an [2,3], wobei Frauen bis zu drei mal häufiger betroffen sind als Männer [4]. In den meisten Fällen setzt die Krankheit zwischen dem vierten und sechsten Lebensjahrzehnt ein [5]. Abbildung 1 weist zudem auf eine steigende Diagnoseprävalenz in den letzten Jahren hin. Die RA ist die häufigste und zugleich folgenschwerste Erkrankung aus der Gruppe der entzündlich-rheumatischen Systemerkrankungen und somit eine ernstzunehmende Langzeiterkrankung [3]. Es handelt sich hierbei um eine Autoimmunerkrankung, bei der sich das Immunsystem gegen körpereigene gesunde Strukturen, wie Gelenke und Bindegewebe richtet [6]. Daraus resultieren unter anderem persistierende Synovitiden, Knochen- und Gelenkschäden sowie Schmerzen, Fatigue und eine eingeschränkte Bewegungsfähigkeit [3,7,8]. Neben dem Funktionsverlust der betroffenen Gelenke kann es zu extraartikulären Manifestationen, überwiegend an den Gefäßen, der Lunge oder den Augen kommen [9,10,11].



**Abbildung 1:** Diagnoseprävalenz der rheumatoiden Arthritis nach Altersgruppen ab 15 Jahren und Geschlecht unterteilt. Abgebildet sind deutschlandweite vertragsärztliche Abrechnungsdaten. [Abbildung entnommen aus 12]



Des Weiteren ist eine familiäre Häufung zu verzeichnen. Der größte bisher bekannte genetische Risikofaktor ist das HLA-Antigen DRB1 [13,14,15]. Eine spezifische Aminosäuresequenz auf den HLA-DR-Allelen (Allele, die sich in der B1-Kette eine 5-Aminosäure teilen) kodiert für die „Shared Epitope“ [14]. Diese Epitope begünstigen die Entstehung einer seropositiven RA. Darunter versteht man das Vorliegen des Rheumafaktors (Autoantikörper gegen das Fc-Fragment des IgG) oder von ACPAs (Antikörper vom IgG-Typ gegen das cyclische citrullinierte Peptid) [16]. In 80% der Patienten mit RA sind ACPAs im Serum zu finden, wobei der Rheumafaktor in 60% bis 70% der Patienten nachzuweisen ist [17]. Im Gegensatz zum Rheumafaktor sind ACPAs spezifisch für RA [17]. ACPA-positive Patienten leiden häufiger an geschwollenen Gelenken, Gelenkerosionen und einer verringerten Remissionsrate im Vergleich zu ACPA-negativen Patienten [18]. Oft lassen sich schon Jahre vor Einsetzen dieser RA-typischen Symptome bei einigen Patienten die Antikörper nachweisen, was in Zukunft einen präventiven und diagnostischen Vorteil erbringen könnte [19].

Rauchen stellt einen erheblichen Einflussfaktor für die Entstehung der RA dar. Es erhöht das Risiko um das ein- bis dreifache und wird als der dominierende Faktor gezählt [20]. Vor allem bei ACPA- und HLA-DRB1-positiven Patienten wurde der krankheitsfördernde Effekt des Rauchens nachgewiesen [21]. Auch das Geburtsgewicht korreliert mit der Inzidenz der RA. Mandl et al. [22] haben herausgefunden, dass Neugeborene mit einem Geburtsgewicht von über 4,54 kg ein zweifach höheres Risiko für RA gegenüber Neugeborenen mit einem Gewicht zwischen 3,2 kg und 3,85 kg haben. Eine weitere Studie hat gezeigt, dass die Autoantikörperbildung bei RA-Patienten durch eine vorhandene Parodontitis und den Nachweis von *Porphyromonas gingivalis* (*Pg*), ein Parodontitis-typisches Bakterium, intensiviert wird [23]. Ein geringer sozioökonomischer Status erhöht ebenfalls das Risiko, an RA zu erkranken [3]. Im Gegensatz dazu übt Vitamin D einen positiven Einfluss aus. Die Aufnahme von Vitamin D ist mit einem geringeren Risiko für RA assoziiert [24]. Die vegetarische Ernährung stellt einen weiteren positiven Faktor dar. Diese senkt die Dauer der Morgensteifigkeit, die Anzahl geschwollener Gelenke sowie die Schmerzen, also kurz gesagt die Krankheitsaktivität wird reduziert [3,25,26]. Im Endeffekt wird die Pathogenese der RA durch eine Vielzahl von genetischen und umweltbedingten Risikofaktoren beeinflusst und geformt.

Ebenso ist die Pathophysiologie der RA komplex aufgebaut mit diversen entzündlichen Kaskaden, welche zu anhaltenden Synovitiden mit Knorpel- und Knochenschäden im Gelenk führen [3]. Dort befinden sich die Synovialzellen, welche in Makrophagen- und Fibroblasten-ähnliche Synoviozyten (FLS) kategorisiert werden, wobei vor allem erstere die Hauptproduktion der proinflammatorischen Zytokine übernehmen [3]. Die FLS hingegen zeigen bei RA-Patienten ein invasiveres Verhalten im Vergleich zu Osteoarthritis-Patienten, was in vermehrter Gelenkdestruktion mündet [27]. Bis heute ist die genaue Ätiologie der RA unbekannt, dennoch gibt es Hinweise darauf, dass sie in den Gelenken beginnt [28]. Es konnte nachgewiesen werden, dass besonders FLS aus betroffenen

rheumatischen Gelenken die Fähigkeit besitzen, in gesunde Gelenke zu migrieren [28]. Ebenso tragen Osteoklasten zur Progression der RA bei. Werden diese Zellen medikamentös inhibiert, resultiert das in einer verringerten Gelenkzerstörung bei aktiver erosiver RA [29].

Eine weitere erhebliche Rolle in der Pathogenese der RA spielen Zytokine. Sie beeinflussen vor allem die Entzündung in ihrer Induktion und Schwere [30]. Der Tumornekrosefaktor (TNF) und Interleukin 17 (IL-17) zum Beispiel fördern die Aktivierung und das Überleben der oben angesprochenen Synoviozyten [30]. Die Inhibition des TNF in Synovialzellkulturen von RA-Patienten führt dazu, dass andere proinflammatorische Zytokine in ihrer Produktion gedämpft werden [30]. Des Weiteren induziert TNF die Osteoklastogenese wie auch Interleukin 1 (IL-1), welches die Produktion vom Receptor Activator of NF- $\kappa$ B Ligand (RANKL) stimuliert [30,31]. Das bedeutet, beide Zytokine, TNF und IL-1 tragen maßgeblich zu Knochenerosionen bei. Ein weiteres dominantes Zytokin in der Pathogenese der RA ist Interleukin 6 (IL-6), welches im Serum und in der Synovialflüssigkeit von RA-Patienten in einem höheren Level vorhanden ist und mit Gelenkzerstörung sowie erhöhter Krankheitsaktivität assoziiert ist [30,32].

Die Intensität der Erkrankung wird beeinflusst, indem man in die Pathogenese eingreift. In der Rheumatologie gilt „the window of opportunity“ und „hit hard and early“. Das heißt, die Therapie wird sofort nach Diagnosesicherung mit Disease Modifying Antirheumatic Drugs (DMARDs) begonnen, um im besten Falle eine Remission oder zumindest eine Reduktion der Krankheitsaktivität zu erzielen [33,34]. Es konnte gezeigt werden, dass ein verzögerter Therapiebeginn zu einem schlechteren Outcome der Patienten führt [35]. Außerdem scheinen DMARDs die mit RA assoziierte Dysbiose im Darmmikrobiom positiv zu beeinflussen [36]. Unter den DMARDs stellt Methotrexat (MTX) das Mittel der Wahl dar, denn es zeigte bessere Ergebnisse im Vergleich zu anderen Medikamenten dieser Gruppe in Hinblick auf die Entwicklung von Symptomen, klinischen sowie radiologischen Zeichen [33,37]. Ergänzend dazu wird empfohlen, Glukokortikoide zu verabreichen, um die genannten Effekte zu verstärken [38]. Bei insuffizientem Ansprechen auf diese Therapie werden Biologika angeraten, deren Angriffsort vor allem die oben erwähnten Zytokine sind [33]. Besonders die Anti-TNF-Therapie ist relativ weit entwickelt. Mit zum Beispiel Infliximab, Adalimumab und Golimumab wurden drei monoklonale Antikörper entwickelt, die eine klare Milderung der Progression der RA zeigen, wobei aber nur ca. zwei Drittel der Patienten auf diese Therapieform ansprechen [39]. Das zeigt auf, wie wichtig es auch in Zukunft sein wird, noch mehr über Zytokine und Oberflächenmoleküle von Patienten mit entzündlich-rheumatischen Systemerkrankungen zu erforschen, um weitere eventuell noch effektivere Medikamente entwickeln zu können.

## 1.2 Parodontitis

---

Global betrachtet leiden ungefähr 11% der Erwachsenen unter schwerer chronischer Parodontitis (PD) [40]. Damit stellt sie die häufigste durch Bakterien beeinflusste chronisch-entzündliche Erkrankung des Menschen dar [41]. Gemäß Definition ist das Gewebe des Zahnhalteapparates (Parodontium) entzündlich betroffen [42]. Dieser Apparat stellt sicher, dass der Zahn im gesunden Zustand fest im Alveolarknochen verankert ist. Erkrankungsalter und Prävalenz weisen eine positive Korrelation auf, wobei die Prävalenz ihren Höhepunkt um das vierzigste Lebensjahr herum erreicht und danach auf diesem Niveau verbleibt [40]. Im Gegensatz zur RA gibt es hinsichtlich Inzidenz und Prävalenz keinen nennenswerten Unterschied zwischen Frauen und Männern [40].

Die menschliche Mundhöhle beherbergt Milliarden Bakterien und ist damit auf Platz zwei der höchsten Bakteriendichte nach unserem Darm [23]. Eine Dysbiose in diesem oralen Mikrobiom stellt die Hauptursache für die Entstehung einer PD dar [43]. Es sind vor allem gram-negative Bakterien, die die mikrobielle Homöostase durch Formierung einer pathologischen Plaque zum Kippen bringen [43,44]. Die Struktur der Plaque verändert sich stetig, weshalb man davon ausgeht, dass die PD in mehreren Phasen verläuft. Man teilt die parodontogenen Bakterien in Komplexe ein, je nachdem in welchem zeitlichen Stadium sie adhären. In der Initialphase lagern sich auf den Glykoproteinkomplex der Zahnoberfläche zuerst die sogenannten Frühkolonisierer an, wobei der Primärbiofilm zu ungefähr 80% aus oralen Streptokokken besteht, welche Teil des gelben Komplexes sind [45]. Auch *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (*Aa*) wird als Frühkolonisierer klassifiziert [46,47]. Zusammen ermöglichen es diese Bakterien den sogenannten Brückenkeimen, sich an den schon bestehenden Biofilm anzuheften. Sie bilden den orangenen Komplex, zu dem auch *Prevotella intermedia* und *Fusobacterium nucleatum* gehören [48]. Man bezeichnet diesen Prozess, während dessen sich eine Mikroorganismenspezies an eine andere heftet als Koaggregation [45]. Zuletzt ist es den Spätkolonisierern, dem roten Komplex, möglich, Teil des Plaques zu werden. Sie tragen maßgeblich zur Bildung des pathologischen Langzeitbiofilms bei [45]. Zu ihnen zählt man vor allem *Pg* [45,48,49]. Studien haben gezeigt, dass der rote Komplex, *Aa* sowie *Fusobacterium nucleatum*, beide gram-negativ, mit einer rasch fortschreitenden Parodontitis assoziiert sind [49,50,51].

Allerdings sind es nicht die Bakterien allein, sondern vor allem die individuelle Entzündungsreaktion und Veranlagungen des Körpers, die über das Ausmaß der Erkrankung entscheiden [52,53]. Um die Bakterienbesiedlung zu dämpfen, reagiert der Körper zunächst mit einer lokalen Immunantwort, die sich als Entzündung des Zahnfleisches (Gingivitis) äußert. Diese ist gekennzeichnet durch Infiltration von Lymphozyten, Makrophagen und neutrophilen Granulozyten [43]. Des Weiteren kommt es zur Synthese von proinflammatorischen Zytokinen wie TNF, IL-1 $\beta$  sowie IL-6 und zur Sekretion von Enzymen, welche im Idealfall die Bakterien bekämpfen. Allerdings schädigt die Aggressivität dieser Entzündungsmediatoren das eigene Gewebe, sodass

der Kollagenverlust zum Abbau des Bindegewebes führt und dies letztendlich das Parodontium in seiner Stabilität schwächt [43]. Mögliche klinische Kennzeichen der Gingivitis, als reversible Vorstufe der PD, sind Zahnfleischbluten, -rötung und -schwellung sowie Foetor ex ore [44]. Die Symptome der PD an sich sind deutlich schwerwiegender. Zu ihnen zählt man den Abbau von Alveolarknochen und die Degeneration von einzelnen Zähnen oder dentalem Zement [44,53]. Im chronischen Stadium kann der voranschreitende Verlust von stabilisierendem Kollagen, Zahnfleischepithel und Alveolarknochen zum Ablösen des Zahnfleisches vom Zahn führen [44,53]. Die Folge sind Zahntaschen, der ideale Ort für weitere Bakterien, sodass sich der Entzündungsprozess verstärkt entfalten kann [43]. Wenn es dem Körper nicht gelingt, die Bakterien zu eliminieren, chronifiziert die Entzündung und die Spirale zwischen Vergrößerung der Zahntaschen, Vermehrung der Bakterien, Aktivierung des Immunsystems, Rückbau des Zahnhalteapparates und Verlust des Kieferknochens verselbstständigt sich. Bleibt die PD in diesem Stadium unbehandelt, können Zahnverluste resultieren [43]. Um dies zu verhindern, ist es wichtig, zeitig die Dysbiose zu unterbrechen und mit der Therapie zu beginnen. Zum einen spielt die Mundhygiene bei der Prävention und Behandlung der PD eine essenzielle Rolle. Subgingivale Instrumentierung gilt als Standard für die kausale Infektions- und Entzündungsbekämpfung bei Parodontitis [54]. Zum anderen ist es medikamentös möglich, die pathologische orale Flora und Entzündungen zu minimieren [44]. Es werden Statine oder verschiedene Antibiotika verwendet, unter anderem Moxifloxacin und Metronidazol sowie das Antiseptikum Chlorhexidin [44,55,56].

Die Genese der PD ist multifaktoriell und, wie die diversen Bakterienkomplexe zeigen, zudem auch polymikrobiell [43,53]. Lokal sind es vor allem supragingivale Plaque und Zahnstein, die maßgeblich zur Entstehung der PD beitragen [57]. Allerdings wird die Pathogenese der PD nicht nur von lokalen Faktoren bestimmt, sondern auch von ausschlaggebenden Risikofaktoren. So ist zum Beispiel Rauchen, ebenso wie bei der RA, der größte vermeidbare negative Faktor, wobei das Risiko für PD bei Rauchern im Gegensatz zu Nichtrauchern viermal höher ist [58]. Das liegt zum einen daran, dass Rauchen die Durchblutung verschlechtert und so zu Wundheilungsstörungen führt und zum anderen, dass sich eine pathologische Flora entwickelt, die die oben erwähnte Dysbiose vorantreibt, in der allen voran *Pg*, aber auch *Tannerella forsythia* und *Aa* zu finden sind [23,59]. Außerdem gilt Übergewicht als ein prädisponierender Faktor in der Entstehung der PD [60]. Bei Adipositas steigt das Risiko, an PD zu erkranken um das Zwei- bis Dreifache [43]. Die Ursache liegt zum einen darin, dass die Immunantwort so verändert wird, dass der Körper empfindlicher für Infektionen ist. Zum anderen ist die Entzündungsreaktion verstärkt, zum Teil durch die erhöhte Konzentration von proinflammatorischen Zytokinen und Chemokinen, welche von den Adipozyten sezerniert werden [43,60]. In einer Studie konnte eine positive Korrelation zwischen Body-Mass-Index und TNF- $\alpha$ -Konzentration im Speichel gezeigt werden [60]. Untergewicht weist hingegen eine verringerte Prävalenz auf [61]. All dies deutet darauf hin, dass Übergewicht durch einen systemischen Effekt Einfluss auf die PD nimmt [60]. Eine weitere Studie weist darauf hin, dass eine schwere Parodontitis ein Risikofaktor für die Entstehung eines

metabolischen Syndroms sein kann, welches durch Hypertension, Übergewicht, eingeschränkte Glukosetoleranz und Dyslipidämie gekennzeichnet ist [62,63]. Auch für die Alzheimer-Krankheit und Demenz wurde PD als Risikofaktor beschrieben [64]. Die Gesamtheit dieser Fakten zeigt auf, dass die PD nicht nur durch eine Vielzahl von Faktoren beeinflusst wird, sondern auch, dass die Krankheit an sich einen Risikofaktor für diverse andere Erkrankungen darstellt.

Insgesamt ist es notwendig, die genaue Pathogenese inklusive beteiligter Mikroorganismen und molekularer Entzündungsprozesse weiter zu untersuchen, um neue Therapien zu entwickeln und um die Inzidenz der PD zu minimieren beziehungsweise das Fortschreiten zu verzögern.

### 1.3 Zusammenhang zwischen Rheumatoider Arthritis und Parodontitis

---

Bei dem Vergleich der RA mit der PD fällt auf, dass beide Erkrankungen durch chronische Entzündungen mit proinflammatorischen Zytokinen, Gewebeverlust und Knochendestruktion gekennzeichnet sind [40]. Die Überproduktion der proinflammatorischen Zytokine wie IL-6 und TNF- $\alpha$  spielt in der Pathogenese beider entzündlichen Erkrankungen eine dominante Rolle [65,66]. Sowohl die RA als auch die PD führen zu einer systemischen Entzündungsreaktion, die durch Anstieg des C-reaktiven Proteins im Plasma gekennzeichnet ist [67]. Ein weiteres Merkmal beider Erkrankungen ist eine Dysbiose im Mikrobiom. Im Falle von RA befindet diese sich im Darm, wobei sie sich bei der PD oral abspielt [43,68].

Es konnte gezeigt werden, dass Patienten mit RA häufiger an schwerer PD leiden im Vergleich zu gesunden oder Osteoarthritis-Patienten [66,69]. Im umgekehrten Falle zeigt die Datenlage, dass Patienten mit PD häufiger zu RA neigen als die gesunde Kontrollgruppe [65,68]. Aber auch die Schwere des Verlaufs der jeweiligen Krankheit nimmt beim Vorliegen der anderen beträchtlich zu [70,71].

Wenn man nach gemeinsamen Ursachen dieser beiden Erkrankungen sucht, stößt man auf das PD-auslösende Bakterium *Pg*. Es ist der einzig bisher bekannte Prokaryont, der das Enzym Peptidylarginin Deiminase (PAD) exprimiert, welches in der Posttranslation Arginin in Citrullin umwandelt [72]. Zu erwähnen ist, dass der Mensch selbst über fünf dieser Enzyme verfügt, wobei nur vier davon katalytisch aktiv sind [7]. Die bakterielle PAD führt zur Bildung von citrullinierten Proteinen, die einen Zusammenbruch der immunologischen Toleranz bewirken können [73]. Das resultiert daraus, dass aufgrund der systemischen Immunantwort die Ausbildung von Antikörpern gegen diese Proteine, sogenannte ACPAs, erfolgt [73]. Diese Antikörper haben nachweislich eine überlappende Reaktivität, die bewirkt, dass sie mit diversen citrullinierten Proteinen an unterschiedlichsten Orten kreuzreagieren [17,74]. Die *Pg*-induzierte ACPA-Synthese bei RA-Patienten ist in der unten stehenden Abbildung 2 schematisch dargestellt.

Nachgewiesen ist, dass Patienten mit ACPAs im Serum, sprich einer seropositiven RA, einen schwereren Krankheitsverlauf sowie ein schlechteres Outcome aufweisen im Vergleich zu seronegativen RA-Patienten [17,75]. Wie oben angesprochen, spielen ACPAs in der klinischen Diagnosestellung der RA als Frühmarker eine große Rolle, da sie mehrere Jahre vor Erstmanifestation im Serum der Patienten nachgewiesen werden können [19,73]. Ein anderes bereits erwähntes PD-typisches Pathogen ist *Aa*, assoziiert mit aggressiver PD und eine weitere Schnittstelle zur RA [46]. *Aa* löst auf indirekte Weise die Produktion von ACPAs aus. Es sezerniert das Leukotoxin A, welches zur Aktivierung von körpereigenen PADs, besonders der in neutrophilen Granulozyten, führt und damit eine Hypercitrullinierung von diversen zellulären Proteinen bewirkt [69,76,77]. Somit kommt es zu einem Anstieg der citrullinierten Proteine, was genau wie im Falle von *Pg* zur Ausbildung von ACPAs führt. All dies lässt darauf schließen, dass PD, ausgelöst durch verschiedene Bakterien wie *Pg* und *Aa* eine Autoimmunantwort auslöst, die möglicherweise zu RA führt.

Bezüglich der Risikofaktoren lassen sich weitere Gemeinsamkeiten der beiden Erkrankungen finden. So gehören Rauchen, zunehmendes Alter und Übergewicht zu den Faktoren, die die Inzidenz von RA und PD erhöhen [20,78,79]. Auch ein genetischer Polymorphismus beziehungsweise die genetische Empfänglichkeit scheinen bei der Pathogenese beider eine Rolle zu spielen [13,78]. Insgesamt ist ein bidirektionaler Zusammenhang der beiden Volkskrankheiten in vielerlei Hinsicht, ob molekular oder pathogenetisch, erkennbar.

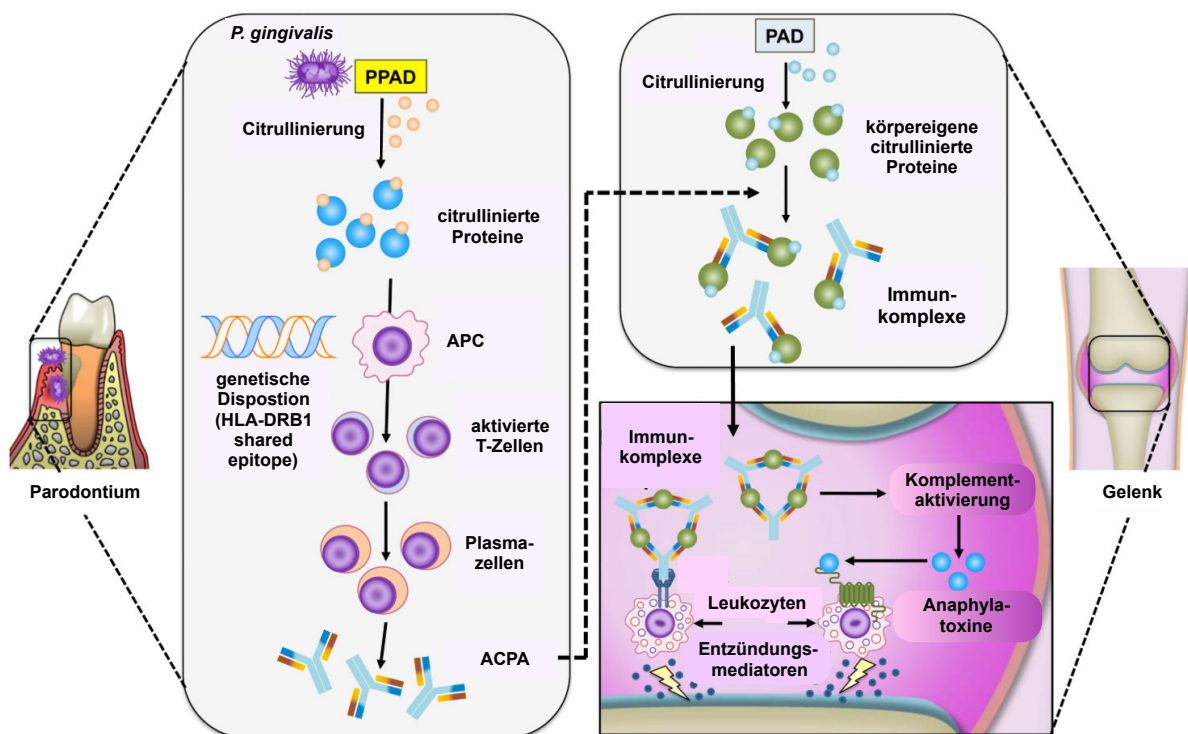


Abbildung 2: *Pg*-induzierte ACPA-Synthese bei RA [veränderte Abbildung aus 80].

## 1.4 Zielsetzung der Studie

---

Mit dem vorliegenden Versuchsvorhaben sollte der epidemiologisch beobachtete Zusammenhang zwischen den beiden Volkskrankheiten RA und PD auf makroskopischer aber vor allem auf molekularer Ebene untersucht werden. Grundlage für diese Arbeit war die Hypothese, dass sich die RA und die PD bidirektional beeinflussen und sich sowohl in der Pathogenese als auch in der Krankheitsaktivität intensivieren. Außerdem dienten die Versuchsergebnisse zum Zusammenhang zwischen RA und PD aus unserer Arbeitsgruppe, Klinische Immunologie der Universitätsmedizin Rostock, als weitere Grundlage dieser Arbeit [55,81].

Bereits unterschiedliche Mausmodelle für die RA in Kombination mit einer durch *Pg* induzierten PD wurden erforscht [82,83]. In diesem Experiment wurde ein Mausstamm verwendet, der in den Vorversuchen am vulnerabelsten für eine Parodontitis war. Hierbei handelte es sich um die F1-Generation aus DBA/1J x B10.Q Tieren. Weiterhin war dieser Tierstamm empfänglich für eine CIA, welche in der Erforschung von Erkrankungen des rheumatischen Formenkreises als fundiert gilt. Bei dieser Form der Arthritis kommt es zu einer Immunreaktion gegen Proteine in Gelenken aufgrund aufgehobener Toleranz gegenüber körpereigenen Proteinen [84,85].

Die Vorexperimente, welche auf Blutentnahmen am Versuchsende fokussiert waren, konnten keine signifikanten Unterschiede in den Zytokinwerten feststellen [81]. Aus diesem Grund sollten in dem vorliegenden Experiment verschiedene Zytokinpiegel im Verlauf gemessen werden. Eine weitere Hypothese, auf der diese Arbeit basiert, ist, dass die hohe bakterielle Belastung während der oralen Inokulationsphase wahrscheinlich zu einer messbaren Immunantwort führt, die jedoch durch die spätere Gelenkentzündung überlagert werden könnte. Diese Vermutung sollte durch die mehrmaligen Blutentnahmen näher untersucht werden.

Die makroskopischen Arthritiscores waren in der Spätphase des Beobachtungszeitraumes des Vorversuches nahezu identisch. Daher sollte der Versuch auf insgesamt 15 Wochen verlängert werden, um einen möglichen Einfluss der verschiedenen Erreger auf das Abklingen der CIA zu untersuchen. Da es sich bei der CIA um eine monophasische Erkrankung handelt, ist zu erwarten, dass die Arthritiscores im Verlauf abfallen. Dies würde einen möglichen Rückgang der Entzündung erklären und ist zum einen über die Messung der Zytokinpiegel im Verlauf sowie am Ende des Versuches und zum anderen anhand der makroskopischen Scores quantifizierbar. Zusätzlich zur makroskopischen Evaluierung sollten die Pfoten und Unterkiefer histologisch untersucht werden, um die Folgen der CIA und des alveolären Knochenverlusts im Sinne einer PD mikroskopisch nachzuweisen.

Des Weiteren sollten die Auswirkungen der PD-assoziierten Bakterien sowie der CIA auf das Mikrobiom und synoviale Proteom untersucht werden. Dazu wurde das intestinale Mikrobiom zu

verschiedenen Zeitpunkten analysiert, da sich die Untersuchung des oralen Mikrobioms auf Grund anatomischer Verhältnisse der Maus nicht eignete. Am Ende des Versuches sollten exemplarisch einige Synovialmembranen mikrochirurgisch entnommen werden, um die Zusammensetzung des Proteoms zu vergleichen.

Weitgehend ungeklärt sind die molekularen Zusammenhänge zwischen beiden Erkrankungen und die Frage, ob nur *Pg* die rheumatoide Arthritis zu verstärken vermag oder ob dieser Einfluss auch von anderen parodontopathogenen Erregern wie zum Beispiel *Aa* ausgeübt werden kann. Soweit bekannt, ist das die erste *in vivo* Studie, welche die molekularen Mechanismen beider Erkrankungen im Serum sowie in der Synovialmembran untersucht. Ziel dieser Arbeit ist es, den bidirektionalen Zusammenhang der PD und RA durch unterschiedliche Bakterienstämme genauer zu beleuchten sowie den Einfluss beider Erkrankungen auf das Immunsystem, synoviale Proteom und Mikrobiom zu untersuchen.

### 1.5 Versuchsübersicht

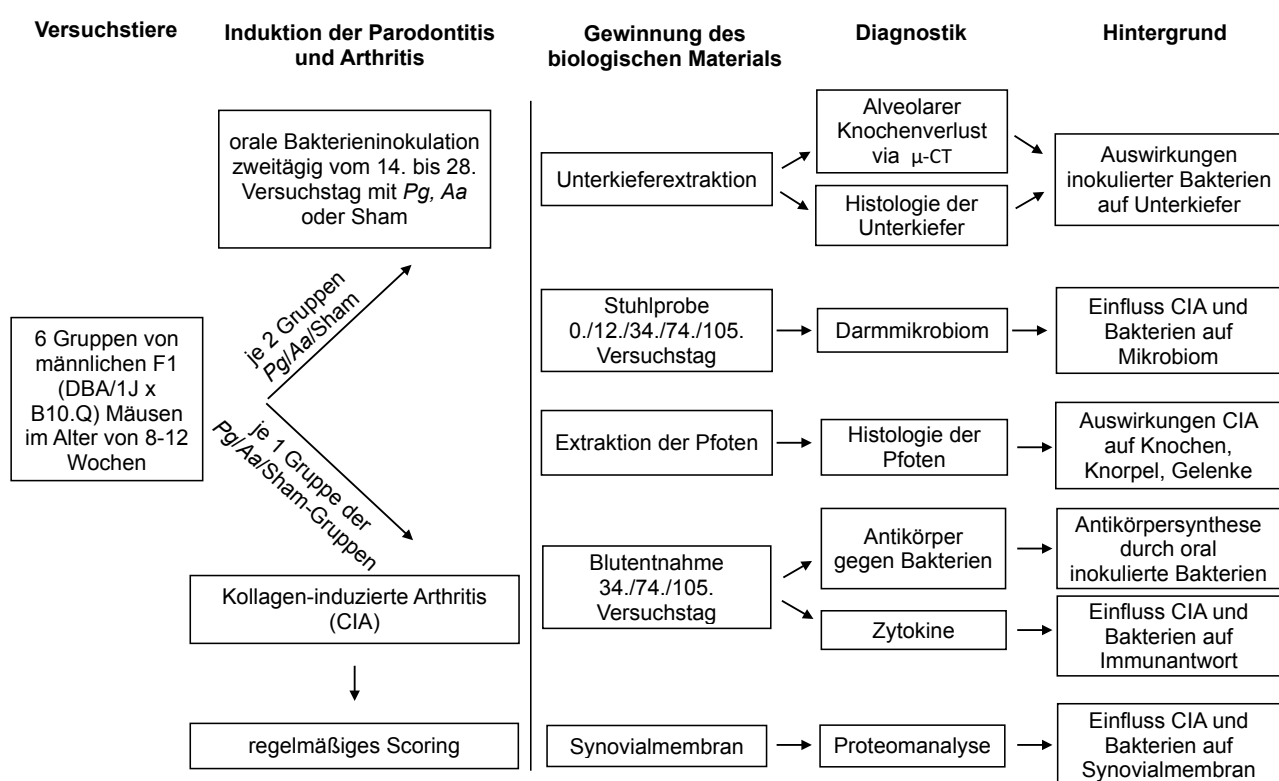


Abbildung 3: Versuchsübersicht des gesamten Experimentes.



## 2. Material

---

### 2.1 Verbrauchsmaterialien

---

Produktbeschreibung	Hersteller	Artikelnummer
Omnifix-F 1 ml	B. Braun Melsungen AG	REF 9161406V
Chirurgische Einmal-Skalpelle	B. Braun Melsungen AG	LOT 4509987545
Omnifix Luer Lock Spritze 5 ml	B. Braun Melsungen AG	REF 4616057V
BD Microlance 3 25G x 1"	Becton, Dickinson and Company	REF 300400
BD Microlance 3 27G x 3/4"	Becton, Dickinson and Company	REF 302200BD
Microlance 3 30G x 1/2"	Becton, Dickinson and Company	REF 304000
M. tuberculosis H37 Ra 100 mg	Becton, Dickinson and Company	LOT 7166920
TMB Substrate	BioLegend	421101
LEGENDplex™		
Mouse Inflammation Panel with V-bottom Plate	BioLegend	LOT B242043
Rabbit anti-mouse IgG	Bio-Rad Laboratories, Inc.	STAR13B
96-Well 340 µl Storage Plate	Corning	REF 353263
Deckgläser, 24 x 50 mm	Gerhard Menzel GmbH	LOT 4741084
15 ml Cellstar Tubes	Greiner Bio-One	E170395
50 ml Cellstar Tubes	Greiner Bio-One	E180438G
Serological Pipette 10 ml	Greiner Bio-One	LOT 15032451
Serological Pipette 5 ml	Greiner Bio-One	LOT 15050171
Spritzenfilter 0,45 µm	Integra Biosciences GmbH	153015
Einbettkassette - Standard	Kabe Labortechnik GmbH	REF 053749
CellSafe Biopsiekapseln	Leica Biosystems Nussloch GmbH	LOT 03701417
Panthenol-Augensalbe	mibe GmbH Arzneimittel	PZN-03524531
Pipette tips PP, 0-200 µl	nerbe plus GmbH	07-375-2015
Adhäsive Objektträger	Paul Marienfeld GmbH & Co.KG	LOT 40008
End-to-End Kapillare 20 µl	Sarstedt Aktiengesellschaft & Co.	LOT 2112526
DNA Miniprep Kit	Zymo Research	ZRC200676

## 2.2 Chemikalien

Produktbeschreibung	Hersteller	Artikelnummer
Rompun 2%	Bayer AG	82826107
Incomplete Freund's Adjuvant 10ml	Becton, Dickinson and Company	LOT 6175929
Eosin G-Lösung 0,5% wässrig	Carl Roth GmbH + Co. KG	X883.2
Kanadabalsam	Carl Roth GmbH + Co. KG	8016.1
Roti®-Histol	Carl Roth GmbH + Co. KG	6640.1
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH + Co. KG	3957.1
Bovines Kollagen Typ II 10mg	Chondrex, Inc.	LOT 180235
Lysoformin 3000	Dr. Hans Rosemann GmbH	CHZB2197
AHD 2000	Dr. Hans Rosemann GmbH	
Formafix 4% gepuffert	Grimm med. Logistik GmbH	F10010G
Bacillol AF	Hartmann	REF 93380
Usedecalc	MEDITE GmbH	REF40-3310-00
Mayers Hämalaulösung	Merck KGaA	1092490500
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Merck KGaA	108418
Ketamin 10%	Pharmanovo GmbH	26709
Tramadol 100 mg/l	Ratiopharm	PZN 06181103
Cotrim K-Saft 240mg/5mg	Ratiopharm	PZN 3788230
Sodium carboxymethyl cellulose	Sigma-Aldrich	1001570140
Bovine Serum Albumin	Sigma-Aldrich	A9418
RNAlater	Thermo Fisher Scientific Baltisch	UABREFAM7021
BupH Carbonate-Bicarbonate		
Buffer Packs	Thermo Fisher Scientific	28382
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline	Thermo Fisher Scientific	REF 14190-094
Benzin DAB	UMR Zentralapotheke	
Ethanol 96% (v/v), vergällt mit Methylethylketon	UMR Zentralapotheke	
Ethanol absolut 96%	Walter CMP	603-002-00-5

## 2.3 Geräte

---

Produkt	Hersteller
Agilent 2100 Bioanalyzer	Agilent Technologies Inc.
HT3 Plattenphotometer	anthos Mikrosysteme GmbH
Microfuge 16 Centrifuge	Beckman Coulter
FACSCalibur	Becton, Dickinson and Company
Precellys 24 Tissue Homogenizer	Bertin Instruments
Luftbefeuchter	Beurer GmbH
microCT SkyScan 1076	Bruker Corporation
Hyrax M 55 Mikrotom	Carl Zeiss AG
Axioskop 40 Mikroskop	Carl Zeiss AG
AxioCam MRc 5 Kamerakopf	Carl Zeiss AG
Thermomixer compact	Eppendorf AG
Centrifuge 5418 R	Eppendorf AG
Biofuge pico	Heraeus
MiSeq	Illumina Inc.
Wild M715 Mikroskop	Leica
Magnetrührer R3T	mlw projects gmbh
FastPrep-24	MP Biomedicals
Vortex Mixer	neoLab
Digitalwaage	Sartorius AG
NanoDrop ND-1000	Thermo Fisher Scientific Inc.

## 2.4 Versuchstiere

---

In diesem Experiment wurden folgende Versuchstiere verwendet:

Mausstamm	Geschlecht	Alter zu Beginn	Anzahl
F1 (DBA/1J x B10.Q)	männlich	8-12 Wochen	51

Dieser Mausstamm stellte sich in den Vorversuchen als derjenige heraus, der am vulnerabelsten für eine durch Bakterien induzierte Parodontitis war [55,81].

## 2.5 Software

---

Produktbeschreibung	Hersteller	Verwendungszweck
1076 Control Version 2.6.5	Bruker Corporation	Computertomographie
NRecon Version 1.6.9.18	Bruker Corporation	3D-Rekonstruktion
DataViewer Version 1.5.1.2	Bruker Corporation	Bestimmung der ROI der Mandibulae
CT Analyser Version 1.15.4.0	Bruker Corporation	Vermessung der ROI
AxioVision Rel Version 4.8	Carl Zeiss AG	Fotographie der histologischen Schnitte
IMB SPSS Statistics 25	IBM	statistische Analysen/ Abbildungen
Mothur	Schloss	Qualitätsfiltrierungen, Verschmelzen von duplizierten Sequenzen, Abgleich mit der Referenzdatenbank
SigmaPlot 13.0	Systat Software GmbH	statistische Analysen/ Abbildungen
Amira Version 6.4.0	Thermo Fisher Scientific	Anfertigung der 3D-Modelle

### 3. Methoden

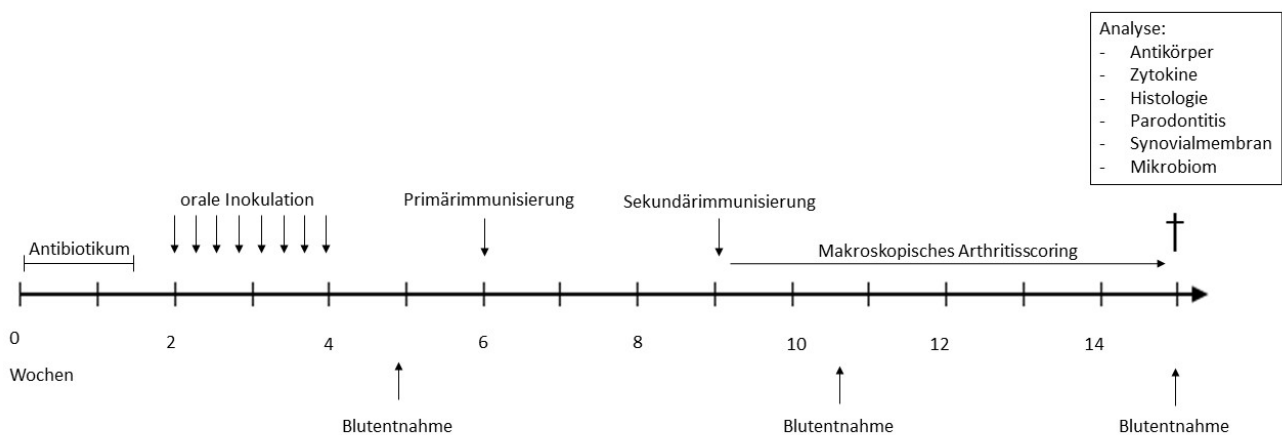
#### 3.1 Experimentaufbau und Studiendesign

Die hier vorliegende Studie zeigt, welchen Einfluss eine durch verschiedene Bakterien ausgelöste Parodontitis und die Kollagen-induzierte Arthritis aufeinander haben. Dazu wurden die Tiere folgendermaßen aufgeteilt:

Gruppe	1	2	3	4	5	6
Bezeichnung	Sh-	Sh+	Aa-	Aa+	Pg-	Pg+
Gruppengröße	7	7	8	8	8	9
Kollagen-induzierte Arthritis	-	+	-	+	-	+
Bakterieninokulation	-	-	Aa	Aa	Pg	Pg

**Tabelle 1:** Übersicht zur Gruppeneinteilung mit entsprechenden Interventionen.

Je zwei der insgesamt sechs Gruppen erhielten *Aa* beziehungsweise *Pg*, um eine mögliche Parodontitis auszulösen. Die restlichen zwei Gruppen erhielten eine bakterienfreie Suspension, um Vergleichsgruppen ohne Parodontitis bereitzustellen. Bei insgesamt drei Gruppen wurde eine CIA ausgelöst, und zwar bei je einer Gruppe mit *Aa*- oder *Pg*-Inokulation beziehungsweise bei einer Gruppe, die keine Bakterien erhielt. Als allgemeine Kontrollgruppe diente jene, die weder Bakterien noch der CIA ausgesetzt war.



**Abbildung 4:** Studiendesign. Zeitliche Abfolge und Einordnung der durchgeführten Versuchsschritte innerhalb des Experimentes.

Die Zuteilung der Tiere zu den jeweiligen Gruppen erfolgte zufällig. Die Tiere wurden nicht alle zum selben Zeitpunkt ins Experiment eingeschlossen, da die Kapazität der Züchtung dies nicht hergab. Das lag zum einen daran, dass es sich um eine F1-Generation aus zwei Mausstämmen (DBA/1J und B10.Q) handelte und zum anderen, dass das Experiment ausschließlich mit männlichen Tieren von statten ging. Im Alter von acht bis zwölf Wochen wurden alle Tiere in das 15-wöchige Experiment eingeführt, welches in Abbildung 4 im Detail dargestellt ist. In den ersten zehn Tagen erhielten die Tiere ein Antibiotikum in Form von Cotrimoxazol gelöst in Trinkwasser. Darauf folgten drei Tage Washout, in denen lediglich reines Trinkwasser zur Verfügung stand.

Zwischen dem 14. und 28. Experimentiertag wurden jeden zweiten Tag insgesamt acht orale Inokulationen mit *Pg*, *Aa* oder bakterienfreiem Gemisch aus CMC (Natrium-Carboxymethyl-Zellulose) und PBS (Phosphatgepufferte Salzlösung) durchgeführt. Am 34. Versuchstag erfolgte die erste Blutentnahme nach der Parodontitisinduktion. Nach sechs Wochen wurden drei Gruppen primärimmunisiert mit bovinem Kollagen II gelöst in komplettem Freund's Adjuvans (CFA). 22 Tage später wurde die Sekundärimmunisierung der CIA mit bovinem Kollagen II in inkomplettem Freund's Adjuvans (IFA) vollzogen, der sogenannte Boost. Ab diesem Zeitpunkt bis zum Versuchsende wurde das makroskopische Scoring der Arthritis (siehe 3.8 Scoring der Kollagen-induzierten Arthritis) vorgenommen. Die zweite Blutentnahme erfolgte an Tag 74 nach der Arthritisinduktion. Am 105. Experimentiertag wurden die Tiere gewogen und narkotisiert. Daraufhin wurde ihnen das letzte Mal Blut entnommen. Nach zervikaler Dislokation wurden die Extremitäten und Unterkiefer asserviert und anschließend histologisch ausgewertet sowie die Unterkiefer im  $\mu$ CT näher untersucht. Stuhlproben wurden an insgesamt fünf Zeitpunkten gesammelt: zum Versuchsbeginn (Tag 0), nach Antibiotikagabe (Tag 12), nach oraler Inokulation (Tag 34), nach der Sekundärimmunisierung (Tag 74) und am Tag der Euthanasierung (Tag 105). Das Körpergewicht wurde jeden zweiten Tag, im Falle von Arthritis jeden Tag, kontrolliert.

### 3.2 Versuchstiere und Tierhaltung

---

Für den Versuch wurde die F1-Generation aus den Stämmen DBA/1J und B10.Q verwendet. Diese F1-Generation ist in der Core Facility Zentrale Versuchstierhaltung der Universitätsmedizin Rostock im Institut für experimentelle Chirurgie unter Specific-Pathogen-Free-nahen Bedingungen gezüchtet worden. Die Core Facility Zentrale wiederum erhielt die beiden oben genannten Stämme von der Firma Harlan Winkelmann, Borcheln, Deutschland. Im Alter von acht bis zwölf Wochen wurden die Tiere in den Tierversuchsraum des Instituts für Medizinische Mikrobiologie, Virologie und Hygiene der Universitätsmedizin Rostock, der für Infektionsversuche vorgesehen war, expediert. Die Anzahl der Mäuse pro Käfig betrug ein bis vier Tiere. Jeder Käfig war einzeln an die Belüftungsanlage angeschlossen und erhielt frische gefilterte Luft, sodass eine Bakterienbesiedlung in der Luft verhindert werden konnte. In dem Tierversuchsraum gab es eine automatische Zeitschaltung für die Beleuchtung (Licht von 6-18 Uhr), die einen geregelten Ablauf unabhängig von der Jahreszeit für die Mäuse sicherstellte. Mindestens jeden zweiten Tag wurden

Temperatur und Luftfeuchtigkeit mittels der im Tierversuchsraum befindlichem digitalen Thermometer und Hygrometer kontrolliert. Ab 20°C wurde geheizt und außerdem zu jeder Zeit regelmäßig gelüftet. Die relative Luftfeuchtigkeit wurde stets über 40% gehalten. Mindestens einmal pro Woche wurden die Mäusekäfige gereinigt, indem das Streu und Trinkwasser (Leitungswasser) erneuert wurde. Sobald es nötig war, wurde das Futter aufgefüllt. Die Tiere konnten je nach Bedarf zu jeder Zeit ohne Limitierung fressen und trinken, mit Ausnahme der einen Stunde nach Inokulation. Die Fußmatte, die man vor Betreten des Tierversuchsraums übertreten musste, wurde ca. alle ein bis zwei Wochen mit Lysoformin 3000 übergossen, um ein Hinein- und Hinaustragen von Schmutz und Bakterien zu minimieren. Der Tierversuchsantrag 7221.3-1.1-057/17 wurde vom Landesamt für Landwirtschaft, Lebensmittelsicherheit und Fischerei M-V (LALLF) genehmigt. Alle Durchführungen richteten sich nach diesem Antrag und gängigen Richtlinien.

### 3.3 Zucht und Aufbereitung der Bakterien

---

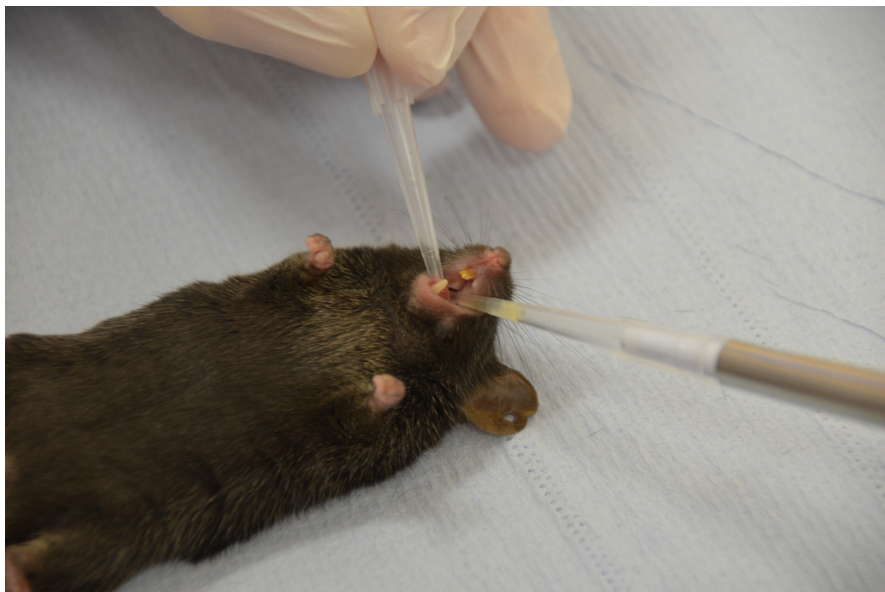
Die Herstellung der Kryo-Stocks von *Pg* und *Aa* erfolgte durch das Institut für medizinische Mikrobiologie, Virologie und Hygiene der Universitätsmedizin Rostock mit Unterstützung von Dr. Katharina Ekat und Jana Bull. Es wurden folgende Materialien und Chemikalien verwendet: Eppendorfgeläße (1,5 ml), konische Zentrifugenröhrchen (15 ml, 50 ml), Brain Heart Infusion Medium (BHI-Medium), PBS, Glycerin sowie Col-Blut-Agarplatten. Medien, Glycerin und Agarplatten mussten mindestens zwei Tage vor Anzucht in anaerober Umgebung vorreduziert werden. Alle nachfolgenden Schritte wurden in einer Anaerobenbox bei 37°C durchgeführt. Am ersten Tag wurde die Übernachtskultur des jeweiligen Bakterienstammes mit 10 ml BHI-Medium und dem Koloniematerial beimpft. Einen Tag später wurde 1 ml der Übernachtskultur vom Vortag mit 9 ml BHI-Medium gemischt. Wiederum einen Tag später wurden jeweils acht mal 1 ml der Übernachtskultur vom zweiten Tag mit 9 ml BHI-Medium beimpft. Am vierten Tag wurden jeweils 16 mal 5 ml der Übernachtskultur vom dritten Tag 45 ml BHI-Medium hinzugefügt. Die Herstellung der 1 ml Kryo-Röhrchen erfolgte am letzten Tag. Hierzu wurden 50 ml der Übernachtskulturen bei Raumtemperatur zehn Minuten mit 4000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 1 ml BHI-Medium aufgenommen. Daraufhin wurden alle Pellets vereinigt, was ungefähr eine Gesamtmenge von 16 ml ergab. Die entstandene Bakteriensuspension wurde mit BHI-Medium 1:10 beziehungsweise 1:100 in einer Küvette verdünnt, um dann bei 600 nm die optische Dichte messen zu können. Um eine optische Dichte von 2,0 zu erreichen, wurde die Bakteriensuspension erneut in BHI-Medium und zusätzlich Glycerin (10% der Gesamtvolumens der Suspension) verdünnt. Nach jeder Anzucht wurde die Bakteriensuspension eines Zentrifugationsröhrchen ausgestrichen und ausgezählt und anschließend bei -80°C im Tiefkühlraum des Institutes für Mikrobiologie gelagert. Alle Röhrchen wurden zeitnah in den -80°C-Tiefkühlschrank des Institutes für klinische Immunologie überführt. Am Tag der Inokulation wurden die Zentrifugationsröhrchen (KBE/ml mindestens  $2 \times 10^9$ ) bei 37°C und 300 rpm aufgetaut. Sie

wurden für zehn Minuten bei 6000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und 50 µl einer Mischung aus 0,1 g CMC in 5 ml PBS hinzupipettiert und gevortext.

### 3.4 Induktion der Parodontitis

---

Zwei Wochen vor der ersten Inokulation bekamen die Versuchstiere für zehn Tage 2%-Cotrimoxazolsaft in das Trinkwasser (1 ml Cotrimoxazol auf 50 ml Wasser) gemischt. Dies sollte eine weitgehende Eliminierung der bakteriellen Mundflora sicherstellen. Nach korrekter Anästhesie und Herstellung der Bakterien-CMC-PBS-Suspension mit einer Bakterienmenge von  $2 \times 10^9$  KBE/ml, wobei die Kontrolltiere nur die bakterienfreie CMC-PBS-Mischung erhielten, wurden die Tiere in Rückenlage gebracht. Die jeweilige Suspension wurde auf den rechten Unterkiefer in 2 x 25 µl Dosen appliziert, was in Abbildung 5 zu sehen ist. Um eine Aspiration der Flüssigkeit zu verhindern, wurden die Versuchstiere nach der Applikation kurz auf die rechte Körperseite gelegt. Anschließend wurden sie in einem leicht abschüssigen Winkel, um erneut der Aspiration entgegenzuwirken, zurück in den Käfig gelegt. Um die Bakterienansiedlung besser zu gewährleisten, wurde den Tieren eine Stunde die Nahrungsaufnahme verwehrt. Da die Narkose ca. eine Stunde anhielt, war die Futterenthaltung für die Versuchstiere selbst nicht von Bedeutung.



**Abbildung 5:** Fotografische Darstellung der oralen Bakterieninokulation. Die jeweilige Suspension (mit Bakterien oder ohne) wurde auf den rechten Unterkiefer in 2 x 25 µl Dosen appliziert.



### 3.5 Asservierung der Unterkiefer für die Quantifizierung der Parodontitis

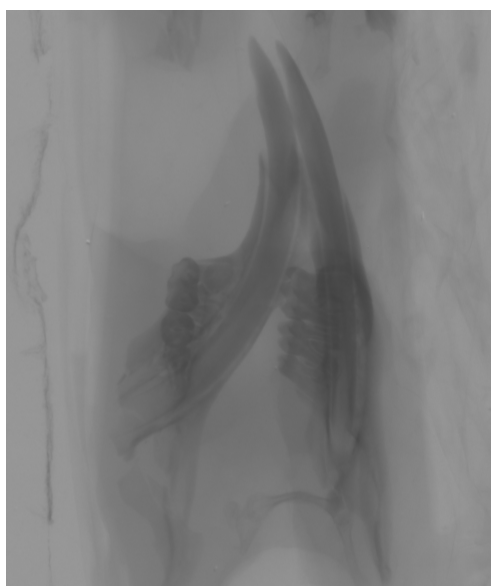
---

Nachdem am letzten Experimentiertag die zervikale Dislokation der Tiere vollzogen war, wurden die Unterkiefer auf Höhe der Rami mandibulae mit einer dafür geeigneten Knochenschere durchtrennt und überschüssiges Gewebe entfernt. Die Unterkiefer wurden einzeln in Röhrchen, gefüllt mit 4% Paraformaldehyd (PFA), für eine Woche aufbewahrt. Anschließend wurden sie nach 30-minütiger Spülung mit Leitungswasser in 70%igem Ethanol umgefüllt. Ein Tag vor der  $\mu$ CT-Messung wurden die Proben nochmals 30 Minuten mit Leitungswasser gespült und in 0,9% NaCl eingelegt. Zwischen diesen Vorgängen wurden die Unterkiefer in einem Kühlschrank bei 4°C aufbewahrt. Am Tag der Untersuchung via  $\mu$ CT wurden sechs bis sieben Unterkiefer mit etwas 0,9% NaCl in Frischhaltefolie gewickelt und in einer Rolle aus Styropor in das CT-Gerät gelegt.

### 3.6 Vorgehensweise zur Quantifizierung der Parodontitis via $\mu$ CT

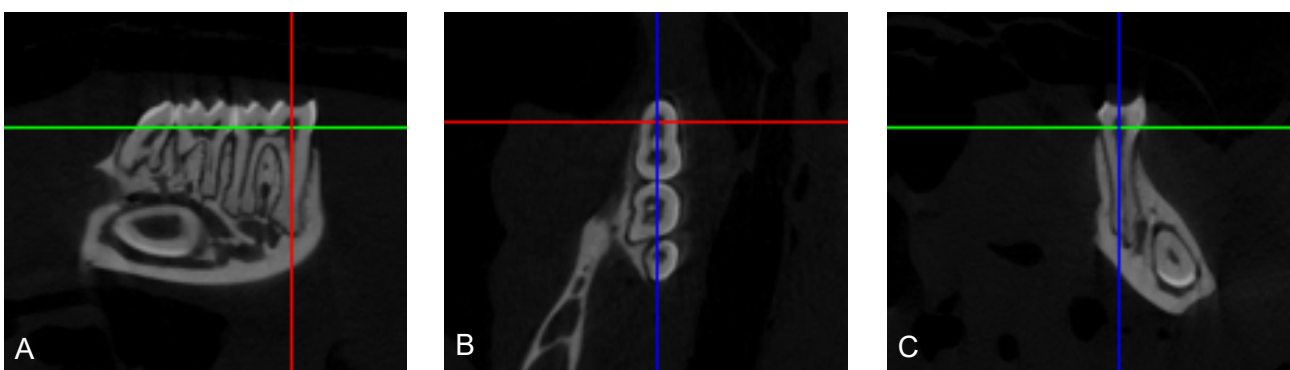
---

Um die Auswirkungen der applizierten Bakterien auf den Unterkiefer untersuchen und somit eine mögliche Parodontitis verifizieren zu können, wurde eine aus unserer Arbeitsgruppe entwickelte Methode verwendet. Hierfür wurde zu Beginn jeder Unterkiefer mittels  $\mu$ CT gescannt (Abbildung 6). Die Einstellungen waren für jeden Durchgang stets die gleichen (Pixel Size 9  $\mu$ m, Averaging 3, Sync acquisition with event 5 und Rotation step 0,6). Anschließend wurde aus den nativen CT-Scans mittels der Software NRecon eine 3D-Rekonstruktion erstellt, um dann mit dem Programm DataViewer den Bereich, der von Interesse war (region of interest, ROI), auswählen zu können. Hierzu wurden jeweils nur die drei Molaren der rechten Mandibula immer auf die gleiche Weise in drei Ebenen ausgerichtet (siehe Abbildung 7). Zuerst wurden die Zähne in der Sagittalebene so ausgerichtet, dass die grüne Linie des Programmes, welche die Transversalebene



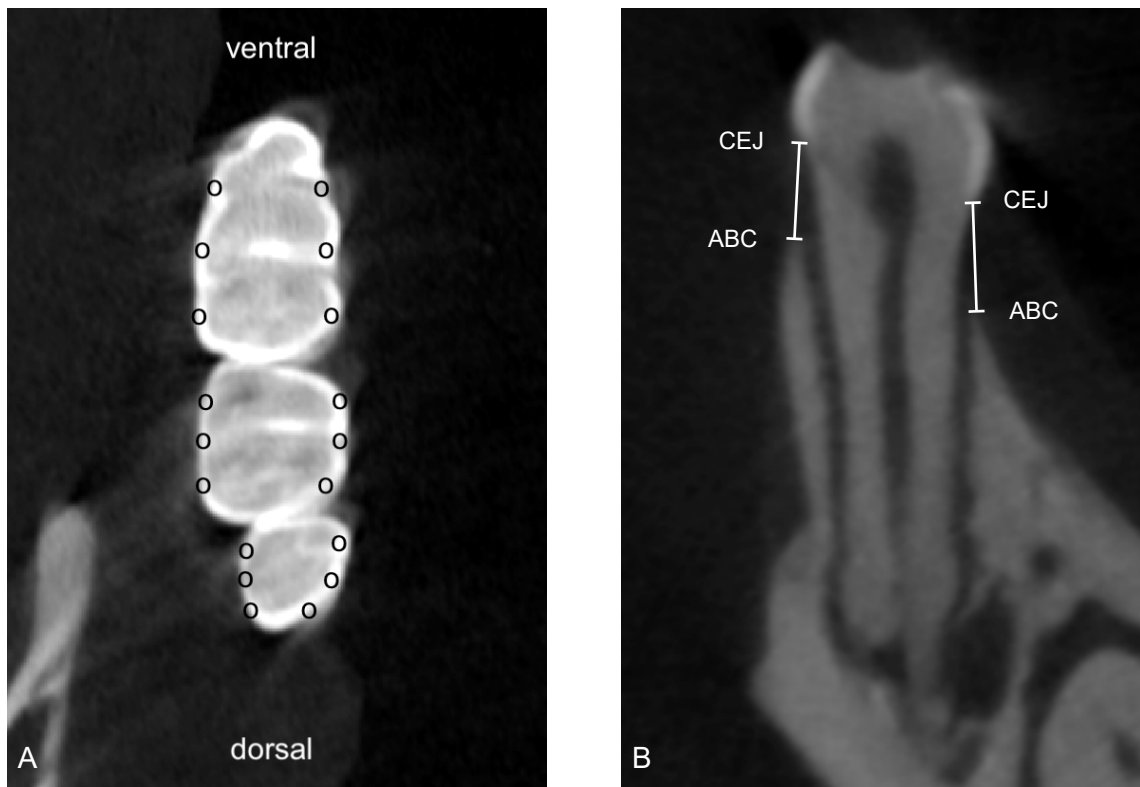
**Abbildung 6:**  $\mu$ CT-Scan eines Unterkiefers.

ne repräsentiert, das kraniale Ende der Pulpa markierte und die rote Linie, sprich die Coronarebene, senkrecht durch einen Zahn inklusive Zahnwurzel verlief (siehe Abbildung 7A). Daraufhin erfolgte die Ausrichtung in der Transversalebene, indem die blaue Linie, welche die Sagittalebene darstellt, sowohl den am weitesten dorsal gelegenen als auch den am weitesten ventral gelegenen Punkt der Zahnreihe schnitt (siehe Abbildung 7B). Als letztes wurde die Coronarebene korrekt dargestellt. Dazu wurde erneut die Linie verwendet, welche die Sagittalebene repräsentiert. Diese verlief möglichst senkrecht durch den Zahn zwischen den Zahnwurzeln hindurch (siehe Abbildung 7C). Anschließend wurde die ROI ausgewählt, in der sich die drei Molaren der rechten Mandibula befanden. Die nächsten Schritte erfolgten mit der Software CT Analyzer. Die Methode zur Quantifizierung der Parodontitis beruht auf einem 18-Punkte-Messsystem. Jedem der drei Molaren wurden insgesamt sechs Messpunkte, drei lingual und drei buccal zugewiesen. Das erste Paar, bestehend aus zwei Messpunkten mit je einem lingualen und einem buccalen Punkt, befand sich bei 25% der Länge des Zahnes. Das zweite Paar lag bei 50% und das dritte bei 75%. Um diese Punkte exakt für jedes Tier individuell festlegen zu können, wurden die Scans von ventral nach dorsal in der Coronarebene durchgescrollt. Es wurde das Schnittbild aufgesucht, welches den Anfang des ersten Molaren zeigte. Das konnte daran erkannt werden, dass ein Teil der Zahnwurzel sowie etwas Zahnschmelz sichtbar waren. Die nächsten beiden benötigten Schnittbilder waren die Übergänge zwischen erstem und zweitem sowie zweitem und drittem Molar. Auf diesen Scans musste von jedem der beiden Zähne ungefähr der gleiche Anteil zu sehen gewesen sein. Das letzte Schnittbild stellte das Ende des dritten Molaren dar. Jedes Schnittbild hatte eine eigene Nummerierung. Somit ergab die Differenz zwischen dem Schnittbild mit dem Anfang und dem Schnittbild mit dem Ende des Zahnes die 100% eines jeweiligen Zahnes. Durch diese Kenntnis konnten die 25%-, 50%- und 75%-Positionen für jeden Molar ermittelt werden (siehe Abbildung 8A). Nachdem pro Mandibula diese 18 Messpunkte (je neun Punkte buccal und lingual) feststanden, konnte nun der Knochenverlust gemessen werden. Dazu wurde der Abstand zwischen alveolärem Knochenkamm (alveolar bone crest, ABC) und dem Übergang zwischen Zahnschmelz und -zement (cementoenamel junction, CEJ) jeweils buccal und



**Abbildung 7:** Ausrichtung der drei Molaren im rechten Unterkiefer in drei Ebenen mit dem DataViewer. A: Sagittalebene. B: Transversalebene. C: Coronarebene.

lingual auf den identifizierten Schnittbildern gemessen. Hierzu wurde mit der Software eine Gerade zwischen ABC und CEJ angelegt und der Abstand gemessen, wie in Abbildung 8B zu erkennen ist. Aus den 18 Werten pro Tier wurde ein Durchschnittswert ermittelt. Die Kontrollgruppen dienten als Vergleich zu den Gruppen, welche mit Bakterien inokuliert worden waren und einen größeren Abstand zwischen ABC und CEJ zeigten. Dieser Unterschied zu den Kontrollgruppen wurde als der durch die applizierten Bakterien verursachte Knochenverlust interpretiert.

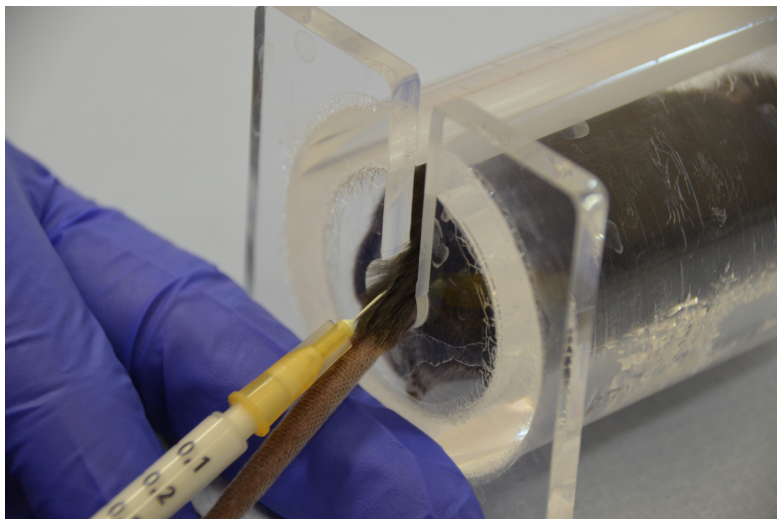


**Abbildung 8:** Übersicht der 18 Messpunkte am rechten Unterkiefer und Vermessung des Zahnes an einem dieser Punkte. A: Lokalisation der 18 Messpunkte auf der rechten Mandibula. Je bei 25%, 50% und 75% wurde lingual und buccal ein Messpunkt definiert. Jeder schwarze Kreis entspricht einem dieser Messpunkte. B: Messung des Abstandes zwischen ABC und CEJ an einem Beispielzahn mit dem CT Analyzer.

### 3.7 Induktion der Kollagen-induzierten Arthritis

---

Die Arthritisinduktion verlief zweiphasig. Die Primärimmunisierung mit Komplettem Freund's Adjuvans (CFA) fand am 42. Experimentiertag und 22 Tage danach die Sekundärimmunisierung, der sogenannte Boost, mit Inkomplettem Freund's Adjuvans (IFA) statt. Für die Herstellung des Kollagengemisches wurden 17,4 M Eisessig auf 0,1 M Essigsäure mit destilliertem Wasser verdünnt, um eine Essigsäure mit einem pH von 2,88 zu erhalten. 5 ml dieser Essigsäure wurden durch einen 0,2 µm Spritzenfilter gegeben und eine Ampulle bovines Kollagen II (10 mg) darin aufgelöst. Über Nacht wurde die Lösung bei 4°C auf einem Magnetrührer gelagert und mit einem Magnetstäbchen versehen, um eine ständige Bewegung zu gewährleisten. Entsprechend der jeweiligen Gruppengrößen wurden passende Mengen des Kollagens in Zentrifugationsröhrchen pipettiert und bis zum Gebrauch bei -20°C gelagert. Am Tag der Immunisierung wurde es bei Raumtemperatur wieder aufgetaut. Für die Herstellung von CFA wurden 25 ml IFA mit 100 mg hitzegetötetem *Mycobacterium tuberculosis* gemischt und bis zu Verwendung bei 4°C gelagert. CFA (im Falle der Primärimmunisierung) beziehungsweise IFA (im Falle der Sekundärimmunisierung) und die Kollagenlösung wurden jeweils in eine Spritze im Verhältnis 1:1 unter Entfernung von Luftblasen aufgezogen. Beide Spritzen wurden mit einem speziellen Metalladapter verbunden, woraufhin die Spritze mit dem Kollagen zuerst in Richtung der anderen Spritze (CFA oder IFA) gedrückt wurde. Insgesamt wurde die Suspension 50 x hin- und hergedrückt, um eine homogene Lösung zu erhalten. Anschließend wurde ein Tropfen der Mischung in einen Behälter mit Wasser gegeben, um zu prüfen, ob die Lösung stabil ist. Löste sich der Tropfen im Wasser, war die Lösung instabil und eine neue wurde angesetzt. Nach dieser Prozedur wurden die Tiere in einem Restraîner fixiert. Dieser hatte die Form eines Zylinders mit einer durchgehenden Öffnung für den Schwanz. Mit Hilfe des Restrainers war ein leichtes Injizieren möglich und das Tier hatte wenig Spielraum für Bewegung, was die Immunisierung erleichterte und die Maus vor Verletzungen schützte. In Abbildung 9 ist dargestellt wie kranial der Schwanzbasis 70 µl der kurz



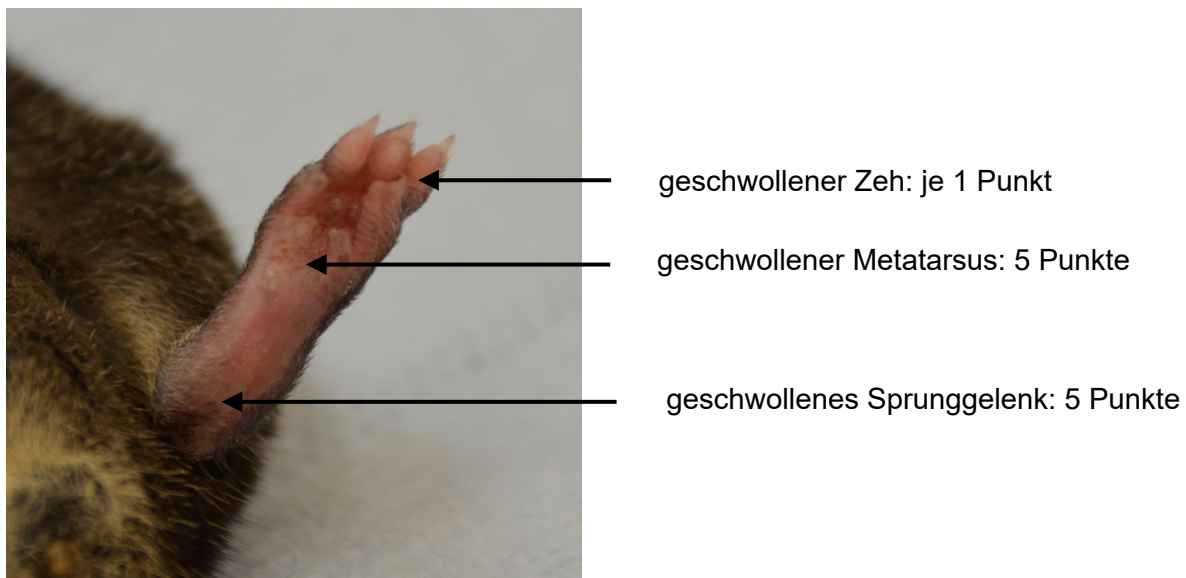
**Abbildung 9:** Fotografische Darstellung der Induktion der Kollagen-induzierten Arthritis. Es wurden 70 µl eines Gemisches aus Kollagenlösung und Freund's Adjuvans kranial der Schwanzbasis subkutan appliziert.

zuvor gemischten Lösung subkutan appliziert wurden. Dies passierte auf beiden Seiten, sodass letztendlich jedes Tier 140 µg Kollagen II und bei der Primärimmunisierung zusätzlich 280 µg *Mycobacterium tuberculosis* erhielt. Nach der Injektion wurden die Tiere aus dem Restrainer gelassen und zurück in den Käfig gesetzt. Die Injektion konnte bei korrekter Durchführung als Depot erkannt werden.

### 3.8 Scoring der Kollagen-induzierten Arthritis

---

Ab dem 66. Experimentiertag, zwei Tage nach der Sekundärimmunisierung, erfolgte zweitägig die visuelle Beurteilung des Arthritisscores. Anzeichen für Arthritis wie Schwellung oder Rötung wurden mit fünf Punkten für jeden Metacarpus und Metatarsus sowie für jedes Sprunggelenk und Handgelenk bewertet. Jede betroffene Phalanx wurde mit jeweils einem Punkt gescort, wobei der erste Digitus der vorderen Extremität aufgrund schlechter Beurteilungsfähigkeit nicht mit einberechnet wurde. Somit ergab sich ein Maximalscore von 58 pro Tier. Mäuse mit mindestens einem Punkt wurden als erkrankt klassifiziert und wurden als positiv für die Inzidenz deklariert. Das Schema zur Messung des Scores ist in Abbildung 10 dargestellt.



**Abbildung 10:** Scoring der CIA an einer komplett von Arthritis betroffenen Hinterpfote. Es ergab sich ein Score von 15 für diese Beispielpfote.

### 3.9 Blutentnahme aus dem retroorbitalen Venenplexus

---

Die Entnahme des Blutes erfolgte aus dem retroorbitalen Venenplexus zu drei Zeitpunkten, nach der Parodontitisinduktion, nach dem Boost und zum Zeitpunkt der Asservierung. Als Narkose wurde den Tieren 0,01 ml Ketamin/Rompun-Kombination pro 10 g Körpergewicht intraperitoneal gespritzt. Die narkotisierten Mäuse wurden im Bereich des Kopfes mit der einen Hand fixiert. Mittels einer dünnen Glaskapillare wurde nasal in das Bindegewebe des Auges gestochen und nach wenigen Millimetern erreichte man den Venenplexus hinter dem Bulbus oculi. Daraufhin wurden maximal 10% des Blutvolumens entnommen. Anschließend wurden beide Augen mit einer Salbe versorgt. Die Tiere wurden mit einer Rotlichtlampe gewärmt, bis sie wieder erwachten. Bei 5000 rpm wurde das Blut sieben Minuten lang zentrifugiert. Dadurch befand sich das Serum in der oberen Phase und es konnte abpipettiert werden. Die einzelnen Serumproben wurden bei -80°C eingefroren.

### 3.10 Analyse der Zytokine und Antikörper im Serum

---

Die Analyse der Seren erfolgte mit Unterstützung von Johann Volzke und Wendy Bergmann. Zum einen wurde das Serum durchflusszytometrisch auf inflammatorische Zytokine untersucht und zum anderen auf das Vorhandensein von murinen IgG Antikörpern gegen *Pg* und *Aa*. Zur Bestimmung der Zytokine im Serum wurde ein LEGENDplex™ (Mouse Inflammation Panel with V-bottom Plate) von BioLegend genutzt. Es wurde die Gebrauchsanweisung vom Hersteller befolgt, die hier im Detail beschrieben ist. Am Tag der Analyse wurden die Serumproben aus dem -80°C-Tiefkühler geholt und für ein schonenderes Auftauen auf Eis gelegt. Die Proben wurden gevortext und zentrifugiert. Die Antikörper-konjugierten Beads wurden für eine Minute gevortext, als sie Raumtemperatur erreicht hatten. Der Waschpuffer wurde ebenfalls bei Raumtemperatur geschüttelt und 25 ml davon mit 475 ml deionisiertem Wasser gemischt. 5 ml Assay Puffer wurden dem lyophilisierten Matrix C hinzugefügt und anschließend gevortext. Der gefriergetrocknete Mouse Inflammation Panel Standard Cocktail wurde mit 250 µl Assay Puffer gemischt und zehn Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen. Dieses Gemisch diente für die Kalibration. 25 µl vom Standard wurde zum Röhrchen mit der Nummer sechs hinzugefügt, um eine 1:4 serielle Verdünnung zu erhalten. Daraufhin wurden 25 µl vom Röhrchen sechs zum Röhrchen fünf hinzugefügt und so weiter, bis man bei dem Röhrchen mit der Nummer eins eine Verdünnung von 1:4096 erreicht hatte. Röhrchen null enthielt lediglich 75 µl Assay Puffer. In die 16 Standardwells wurden je 25 µl Matrix C-Gemisch und 25 µl des Standards (jedes je zwei Mal) beigemischt. In die restlichen 80 Probenwells wurden jeweils 37,5 µl Assay Puffer und 12,5 µl von der jeweiligen Serumprobe hinzugefügt. Die Beads wurden nochmals für 30 Sekunden gevortext und 25 µl zu jedem Well hinzupipettiert, wobei darauf zu achten war, die Beads zwischendurch zu schütteln, um deren Absetzen zu vermeiden. Die 96-Well-Platte wurde mit Plattenversiegelung beklebt und mit Aluminiumfolie abgedeckt, um für zwei Stunden bei 800 rpm auf dem Schüttelapparat zu

inkubieren. Danach wurde die Platte für fünf Minuten bei 1100 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Platte dann kurz kopfüber auf einem Zellstofftuch abgelegt, um Flüssigkeitsreste zu entfernen. 200 µl Waschpuffer wurden zu jedem Well pipettiert. Die Platte wurde für eine Minute bei 800 rpm auf dem Schüttelapparat platziert, danach wiederum für fünf Minuten bei 1100 rpm zentrifugiert, damit der Überstand nochmals verworfen werden konnte. Jedem Well wurden 25 µl eines Cocktails, bestehend aus 13 Detektionsantikörpern, beigemischt. Eine Plattenversiegelung und Aluminiumfolie wurden erneut zur Abdeckung genutzt. Die 96-Well-Platte wurde für eine Stunde bei 800 rpm auf dem Schüttelapparat gestellt. Anschließend wurden 25 µl Streptavidin-Phycoerythrin (SA-PE) in jedes Well pipettiert. Die Platte wurde mit neuer Versiegelung und Aluminiumfolie für 30 Minuten bei 800 rpm auf dem Schüttler platziert. Daraufhin erfolgte fünf Minuten eine Zentrifugation bei 1100 rpm, um den Überstand ein letztes Mal zu werfen. 150 µl Waschpuffer wurden zu jedem Well hinzugefügt. Die Datenerfassung wurde mit einem FACSVerse (Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA) durchgeführt.

Ebenfalls zum Endzeitpunkt des Experimentes wurden die Seren auf murine IgG-Antikörper gegen *Pg* und *Aa* mittels Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) untersucht. Dafür wurde sich mit wenigen Abweichungen an das Protokoll von Gemmell et al. [86] gehalten. Jeweils  $2 \times 10^9$  KBE der Bakterien wurden in 1 mM EDTA, 600 µl Carbonat-Bicarbonatpuffer mit einem pH-Wert von 9,4 und einer Proteaseinhibitormischung resuspendiert. Die entstandene Lösung wurde dreimal für 30 Sekunden bei 6000 rpm mit Glasperlen mechanisch lysiert. Um Schäden an den Proben durch Überhitzung zu vermeiden, wurden die Röhrchen nach jeder Zentrifugation auf Eis gekühlt. Je 100 µl des Bakterienlysats mit einer Proteinkonzentration von 1 µg/ml Carbonat-Bicarbonatpuffer wurden auf zwei 96-Well-Platten pipettiert und über Nacht bei 4°C inkubiert. Daraufhin wurden die Platten dreimal mit 0,05%iger TRIS-gepufferter Kochsalzlösung/Tween-20 gewaschen und 2%iges PBS gepuffertes bovines Serumalbumin (BSA) hinzugefügt, um die noch freien Proteinbindungsstellen zu besetzen. Anschließend wurden die Platten wiederholt gewaschen. Das aufgetaute Serum wurde mit 1%igem BSA in PBS 1:400 verdünnt und auf die Platten aufgetragen, um dann für 90 Minuten bei Raumtemperatur zu inkubieren. Es erfolgte nochmals eine Waschung bevor die Platten für eine Stunde bei Raumtemperatur mit einem 1:2000 verdünnten Kaninchen F(ab')<sub>2</sub> anti-Maus IgG:HRP (konjugiert mit Meerrettichperoxidase) inkubiert wurden. Danach wurden die Platten ein letztes Mal gewaschen. 100 µl Substrat aus TMB/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> wurde hinzugefügt, um eine Farbreaktion auszulösen, welche nach ungefähr sieben Minuten durch 0,5 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> unterbrochen wurde. Die Extinktion wurde bei 450 nm mittels ELISA-Reader HT3 Plattenphotometer gemessen.

### 3.11 Histologie der Pfoten und Unterkiefer

Um Entzündungen und Gelenkerosionen in den Pfoten sowie mikroskopische Veränderungen der Unterkiefer aufgrund einer PD nachzuweisen, wurde eine histologische Präparation von Hinterläufen sowie Unterkiefern durchgeführt. Nach der Narkose und zervikaler Dislokation wurden

<i>Entparaffinieren</i>	1.	Roti-Histol, 15 x eintauchen
	2.	Roti-Histol, 15 x eintauchen
<i>Wässern</i>	3.	Propanol, 15 x eintauchen
	4.	Propanol, 15 x eintauchen
	5.	96%iges Ethanol, 15 x eintauchen
	6.	80%iges Ethanol, 15 x eintauchen
	7.	70%iges Ethanol, 15 x eintauchen
	8.	Aquadest, 15 x eintauchen
	9.	Aquadest, 15 x eintauchen
<i>Kernfärbung</i>	10.	Mayer's Hämalaunlösung von Merck, Pfoten 30 Sekunden und Unterkiefer 45 Sekunden
<i>Bläuen</i>	11.	fließendes Leitungswasser, 25 Minuten
<i>Wässern</i>	12.	Aquadest, 15 x eintauchen
<i>Plasmafärbung</i>	13.	Eosin, Pfoten 40 Sekunden/ Unterkiefer 80 Sekunden
	14.	Aquadest, 3 x eintauchen
<i>Entwässern</i>	15.	70%iges Ethanol, 3 x eintauchen
	16.	80%iges Ethanol, 2 x eintauchen
	17.	96%iges Ethanol, 2 x eintauchen
	18.	Propanol, 2 x eintauchen
	19.	Propanol, 2 x eintauchen
	20.	Roti-Histol, 10 x eintauchen
	21.	Roti-Histol, 45 Minuten

**Tabelle 2:** Protokoll zur Hämatoxylin-Eosin-Färbung.



die Hinterläufe proximal des Kniegelenkes abgetrennt. Muskeln, Sehnen, Bänder und teilweise Weichgewebe wurden entfernt. Die Unterkiefer wurden hinter den Molaren durchtrennt. Zunge und Weichgewebe wurden auch entfernt. Die Präparate wurden einzeln in Histokassetten in 4%igem PFA fixiert, wobei die Pfoten für 2 Wochen und die Unterkiefer für eine Woche in der Lösung verblieben. Daraufhin wurden die Proben für 30 Minuten mit Leitungswasser gespült und in 70%igem Ethanol gelagert bis zur Entkalkung. Dafür wurden die Präparate für mehrere Wochen in Usedecalc® überführt. Wöchentlich erfolgten Kontrollen, inwieweit die Proben dekalzifiziert und entkalkt waren. Dazu wurde die Flexibilität und Biegung der jeweiligen Knochen geprüft. Waren diese ausreichend gegeben, wurden die Präparate in Paraffin eingebettet. Kurz vor dem Anfertigen der histologischen Schnitte wurden die Proben für wenige Minuten in einen -20°C Tiefkühlschrank gelegt. Mit Hilfe eines Mikrotoms wurden 5 µm dünne Schnitte angefertigt. Diese wurden zuerst für maximal eine Minute in ein 50°C warmes Wasserbad überführt und anschließend auf einem Objektträger fixiert, sodass eine Hämatoxylin-Eosin-Färbung wie in Tabelle 2 beschrieben, vollzogen werden konnte. Nach der Hämatoxylin-Eosin-Färbung wurden die Proben mit Kanadabalsam eingedeckt. Anschließend wurde ein Deckgläschen auf den Schnitten platziert und mit Bleiklötzern für drei Tage beschwert.

### **3.12 Narkose der Versuchstiere**

---

Vor jeder Bakterieninokulation und Blutentnahme wurden die Tiere narkotisiert, um es für sie möglichst stressfrei zu gestalten und den Handlungsablauf korrekt durchführen zu können. Als Anästhesie diente 0,6 ml Ketamin in Kombination mit 0,2 ml Rompun. Die Tiere wurden in den Zwangsgriff genommen und daraufhin wurde ihnen 0,01 ml pro 10 g ihres Körpergewichtes Narkosemittel intraperitoneal in den Unterbauch unter Umgehung der Vesica urinaria injiziert. Diese Kombination der Medikamente und die Dosierung wirkten nicht atemdepressiv, weshalb keine genaue Kontrolle der Vitalparameter von Nöten war. Da die Tiere ihre Augen während der Anästhesie nicht verschlossen, wurde ihnen Augen- und Nasensalbe direkt auf den Bulbus oculi verabreicht. Es dauerte ungefähr eine Stunde, ehe die Mäuse wieder ihren ursprünglichen Wachheitsgrad erreicht hatten. Innerhalb dieser Zeit wurde mittels einer Rotlichtlampe dafür gesorgt, dass ihre Körpertemperatur stabil blieb.

### **3.13 Überwachung des Körpergewichtes**

---

Die Tiere wurden mindestens jeden zweiten Tag, im Falle eines Arthritisscore größer gleich 1 jeden Tag, gewogen. Dazu wurden sie in einen leeren Mäusekäfig gesetzt und mittels einer digitalen Waage wurde das Körpergewicht in Gramm erfasst. Wenn das Gewicht um 20% ihres Ausgangsgewichtes sank, mussten die Tiere aus dem Versuch genommen werden, was in diesem Experiment zu keinem Zeitpunkt der Fall war.

### 3.14 Analyse der Synovialmembranen

---

#### Entnahme der Synovialmembranen

Die Entnahme der Synovialmembranen erfolgte anhand des Protokolls von Valverde-Franco et al. [87]. Am Tag der Asservierung wurden die Mäuse nach der Narkose, Blutentnahme und zervikaler Dislokation dorsalwärts gelagert und die Hinterläufe mit Klebeband auf einer festen Unterlage fixiert. Unter Zuhilfenahme eines chirurgischen Mikroskops wurde zuerst eine mediale Arthrotomie des Knies vom tibialen Plateau zur proximalen Patella mittels Skalpell und Pinzette durchgeführt. Die daraufhin sichtbare Patellarsehne wurde durchtrennt und eine laterale Arthrotomie folgte. Die Patella und der Musculus quadriceps femoris wurden nach proximal verlagert, um die Gelenkkapsel und die Synovialmembran auf dem Femur darzustellen. Als nächstes folgte eine hufeisenförmige Inzision um die Trochlea femoris herum. Die Synovialmembran wurde anschließend vorsichtig abgelöst und in ein Zentrifugationsröhrchen befördert, welches für eine Minute in flüssigem Stickstoff lagerte. Zuletzt wurden die Synovialmembranen bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefroren.

#### Proteinextraktion aus den Synovialmembranen für Proteomics

Die Analyse der entnommenen Proben erfolgte mit freundlicher Unterstützung von Dr. Stefan Mikkat aus dem Institut für Immunologie, Abteilung für Proteomforschung und Johann Volzke ebenfalls aus dem Institut für Immunologie. Für das Extrahieren der Proteine wurden 20  $\mu\text{L}$  Lysepuffer (2% Natriumdodecylsulfat, 50 mM Dithiothreitol, 50 mM TRIS/HCl pH 7,6) zu den Gewebeproben hinzugegeben. Nach fünf Minuten Inkubation bei  $95^{\circ}\text{C}$  erfolgte für fünf Minuten eine Ultraschallbehandlung. Mit Hilfe des Qubit Protein Assay Kits schloss sich die fluorometrische Quantifizierung des Proteingehalts an. Für die filtergestützte Probenaufbereitung (filter aided sample preparation; FASP) wurden die Proben mit 200  $\mu\text{L}$  Urea (8 M Harnstoff, 100 mM Tris/HCl pH 8,5) versetzt. Bei der FASP wurde sich an vorherige Protokolle gehalten [88,89]. Microcon YM-30-Filter wurden mit 1% Ameisensäure gespült und für fünf Minuten zentrifugiert. Die Zentrifugation zwischen den Schritten erfolgte bei 12000 - 13000 rpm in Abhängigkeit von den Durchflusssgeschwindigkeiten. Die Probenlösungen wurden hinzugefügt und für 15 Minuten zentrifugiert. Nach dem Waschen mit 100  $\mu\text{L}$  Urea wurden 50  $\mu\text{L}$  50 mM Iodacetamid, gelöst in Urea, hinzugefügt. Es folgte eine 20-minütige Inkubation im Dunkeln für eine vollständige Alkylierung von Cysteinresten. Die Filter wurden zweimal gewaschen mit 100  $\mu\text{L}$  oder 50  $\mu\text{L}$  Urea und anschließend nochmals dreimal mit 100  $\mu\text{L}$ , 75  $\mu\text{L}$  oder 50  $\mu\text{L}$  50 mM Ammoniumbicarbonat. Der Proteinverdau erfolgte mit 1  $\mu\text{g}$  Trypsin (Promega V5111) in 40  $\mu\text{L}$  50 mM Ammoniumbicarbonat pro 50  $\mu\text{g}$  Probenprotein über Nacht bei  $37^{\circ}\text{C}$  in einer Feuchtkammer. Peptide wurden durch Zentrifugation gesammelt und frische Trypsinlösung wurde dem Filter für einen zweiten Aufschluss für 90 Minuten hinzugefügt. Nach der Zentrifugation wurden die kombinierten Extrakte mit Trifluoressigsäure (Endkonzentration 0,25%) angesäuert, mit Hilfe eines Zentrifugalverdampfers konzentriert und mit einer Lösung, die 2% Acetonitril und 0,1% Ameisensäure in

Wasser enthält, auf ein Endvolumen von 40 µl verdünnt. Die Quantifizierung des Peptidgehaltes erfolgte wie oben beschrieben auf einem Qubit Fluorometer.

### **Proteinanalyse mittels hochauflösender Flüssigkeitschromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung (LC/MS)**

Die Trennung und massenspektrometrische Analyse der Peptide wurde nach dem Protokoll von Pappesch et al. [90] an einem nanoAcquity UPLC-System (Waters, Manchester, UK) durchgeführt, das mit einem Waters Synapt G2-S Massenspektrometer gekoppelt war. 160 ng der Probenpeptide, ergänzt mit 40 fmol Hi3 ClpB\_ECOLI Standard für die absolute Quantifizierung von Proteinen, wurden mit einer Vorsäule (ACQUITY UPLC Symmetry C18, 5 µm, 180 µm x 20 mm, Waters) bei einer Flussrate von 10 µl/min für vier Minuten mit 99,9% mobiler Phase A (0,1% Ameisensäure in Wasser) entsalzt. Anschließend wurden die Peptide auf einer analytischen Säule (ACQUITY UPLC HSS T3, 1,8 µm, 75 µm x 250 mm, Waters) mit einem Gradienten von 3% bis 32% mobiler Phase B (0,1% Methansäure in Acetonitril) über 120 Minuten bei einer Durchflussrate von 300 nl/min und 55°C getrennt. Die Datenerfassung für Peptidionen erfolgte mit datenunabhängigem Wechsel von Scans bei niedriger und erhöhter Kollisionsenergie, um Vorläufer- und Fragmentionen für jeweils 0,6 Sekunden zu erhalten.

### **Proteomics-Datenverarbeitung, Proteinannotation und Quantifizierung**

Progenesis Q1 für die Proteomics Version 4.1 (Nonlinear Dynamics, Newcastle upon Tyne, Vereinigtes Königreich) wurde für die Rohdatenverarbeitung, Proteinidentifikation und Quantifizierung, wie zuvor beschrieben, eingesetzt [89]. Die Ausrichtungskompensation der HDMSE-Daten wurde durchgeführt, um Schwankungen der LC-Separation zwischen den Durchgängen zu berücksichtigen. Peptid- und Proteinidentifikationen wurden durch die Suche auf einer Mus musculus-Datenbank mit 17.006 überprüften Proteinsequenzen erhalten, die mit den Sequenzen von ClpB\_ECOLI und Schweinetrypsin ergänzt wurden. Zwei fehlende Spaltstellen wurden akzeptiert, die Oxidation von Methioninresten wurde als variable Modifikation und die Carbamidomethylierung von Cysteinen als fixe Modifikation betrachtet. Die Falschfindungsrate basierend auf der gleichzeitigen Suche in einer Köderdatenbank wurde auf 1% gesetzt. Peptide mussten durch mindestens drei Fragmentionen und Proteine durch mindestens sechs Fragmentionen aus mindestens zwei Peptiden identifiziert werden. Anschließend wurden die Peptidionendaten gefiltert, um nur Peptidionen zu speichern, die die folgenden Kriterien erfüllten: mindestens zweimal innerhalb des Datensatzes identifiziert, Ionenscore größer 5,5, Massenfehler unter 13,0 ppm und mindestens eine Länge von sechs Aminosäureresten. Nur Proteine mit mindestens zwei einmaligen Peptiden wurden in die quantitative Analyse einbezogen. Für die markierungsfreie Quantifizierung wurde die in den Workflow Progenesis Q1 für Proteomics implementierte Hi3-Methode mit dem Hi3 ClpB\_ECOLI-Standard als Referenz verwendet. Die Hi3-Peptidquantifizierung verwendete die Summe der Signalintensitäten der drei am häufigsten vorkommenden Peptide jedes Proteins, geteilt durch die Summe der Signalintensitäten der drei am

häufigsten vorkommenden Peptide des internen Standards, multipliziert mit der Menge des auf die Säule angewandten Standards. Folgende multivariate und einzelne Variationsanalysen wurden mit Proteinhäufigkeiten durchgeführt, die zwischen allen Proben signifikant verändert wurden.

Die in den Synovialmembranen hochregulierten Proteine sind in der folgenden Tabelle dargestellt. Die Tabelle wurde mit der Hilfe von UniProt vervollständigt [91].

Protein	vollständiger Name	Funktion/Bedeutung
HB2	$\beta$ -Kette des H-2 Klasse II Histokompatibilitätsantigens	Teil der humoralen Immunantwort, auf antigenpräsentierenden Zellen
HA2	$\alpha$ -Kette des H-2 Klasse II Histokompatibilitätsantigens	Teil der humoralen Immunantwort, auf antigenpräsentierenden Zellen
LYZ2	Lysozym C-2	Hydrolysierung von glykosidischen Bindungen, Teil des angeborenen Immunsystems, bakteriolytische Funktion
ACOT 9	Acyl-CoA-Thioesterase 9	katalysiert die Hydrolyse von Acyl-CoAs zu freien Fettsäuren und zum Coenzym A
FA12	Koagulationsfaktor XII	Einleitung der Blutgerinnung, Fibrinolyse und Bildung von Bradykinin und Angiotensin
IGHG1	$\gamma$ 1 schwere Kette der Immunglobuline	Bestandteil von Antikörpern, Antigen-Bindung, Immunglobulin-Rezeptor-Bindung
GCA	$\gamma$ -Carboanhydrase	Enzym, das am Katabolismus von $H_2CO_3$ beteiligt ist, vermittelt den Zusammenbau des Komplexes I in Mitochondrien
IGG2B	C-Region der Ig $\gamma$ -2B Kette	Antigen-Bindung, Immunglobulin-Rezeptor-Bindung
HVM	Ig schwere Kette V	Antigen-Bindung, Immunglobulin-Rezeptor-Bindung
KV3A	Ig- $\kappa$ -Kette V-III	adaptive Immunantwort, Immunglobulin-Produktion
IGKC	konstante Ig- $\kappa$ -Kette	Antigen-Bindung, Immunglobulin-Rezeptor-Bindung
NFM	Neurofilament mittleres Polypeptid	proteinhaltige Komplexbindung, Signalrezeptor-Bindung, Aktivität der Strukturmoleküle, Giftstoffbindung
RAB6A	Ras-verwandtes Protein Rab-6A	Proteintransport, Regulator des Membranverkehrs vom Golgi-Apparat zum endoplasmatischen Retikulum

TMED3	Transmembran emp24-domänenhaltiges Protein 3	Vermittlung Transport vom endoplasmatischen Retikulum zum Golgi-Vesikel, Golgi-Organisation
PSMD2	26S-Proteasom-nicht-ATPase-regulatorische Untereinheit 2	Enzymregulator-Aktivität, Proteasom-vermittelter Ubiquitin-abhängiger Protein-Katabolismus-Prozess, Regulierung des katabolischen Prozesses von Proteinen
CAH2	Carboanhydrase 2	Knochenresorption, Differenzierung der Osteoklasten
EPB42	Erythrocyten-Membranprotein Band 4.2	ATP-bindendes Protein, Regulierung der Form und der mechanischen Eigenschaften von Erythrozyten
LMNB1	Lamin-B1	Strukturprotein in der Kernlamina, Regulierung der Molekülbewegung in den und aus dem Nucleus
MYH8	Myosin-8	Muskelkontraktion
PCCB	$\beta$ -Kette der Propionyl-CoA-Carboxylase	Katalysieren der Umwandlung von Propionyl-CoA zu D-Methylmalonyl-CoA (Fett- und Aminosäurenstoffwechsel)
UGGG1	UDP-Glucose Glycoprotein Glucosyltransferase 1	Erkennung fehlgefalteter Glykoproteine, Übertragung eines Glucosemonomers auf die terminale Mannose der A-Verzweigung des Glykans am Glykoprotein
CP2E1	Cytochrome P450 2E1	am Metabolismus von Fettsäuren beteiligt
MYPO	Myeloperoxidase	Teil des Abwehrsystems der polymorphnuklearen Leukozyten, mikrobizide Aktivität
THRSP	Schilddrüsenhormon-induzierbares hepatisches Protein	Regulierung der Lipogenese, Biosynthese von Triglyceriden

**Tabelle 3:** Übersicht der hochregulierten Proteine in den Synovialmembranen mit vollständigem Namen und Funktion/ Bedeutung.

### 3.15 Stuhlanalyse

---

Insgesamt wurden fünf Stuhlproben während des Versuchsverlaufes gesammelt: am Versuchstag null, am Versuchstag zwölf nach Antibiotikagabe und vor Parodontitisinduktion, am Versuchstag 34 nach Parodontitisinduktion und vor der Immunisierung, am Versuchstag 74 nach dem Boost und am Versuchstag 105 kurz vor der Asservierung. Dazu wurden die Tiere in einen sauberen Käfig gesetzt und der produzierte Stuhl für jede Maus in jeweils ein Zentrifugationsröhrchen gefüllt. Diese Röhrchen wurden bis zur Analyse im -80°C-Tiefkühlschrank aufbewahrt.

#### **DNA-Extraktion**

Zur Analyse wurden zwei Versionen des ZymoBIOMICS™ DNA Miniprep Kit verwendet, da die ältere Version nicht mehr erhältlich war. Es wurde die entsprechende Gebrauchsanweisung befolgt, welche hier im Detail beschrieben ist. Am Tag der Aufbereitung wurden die jeweiligen Stuhlproben aus dem Tiefkühlschrank entnommen und zusammen mit 750 µl ZymoBIOMICS™ Lysis Solution in die ZR BashingBead™ Lysis Tubes gefüllt. Diese wurden dann dreimal für je 40 Sekunden bei 6,5 m/s im Precellys 24 Tissue Homogenizer geschüttelt. Nach jedem Durchlauf wurden die Tubes für fünf Minuten auf Eis gelagert, um der Überhitzung entgegenzuwirken. Anschließend wurden die Proben für eine Minute bei 10000 G zentrifugiert. 400 µl des Überstandes wurden durch einen Zymo-Spin™-Filter in ein Sammelröhrchen pipettiert und bei 8000 G für eine Minute zentrifugiert. 1200 µl DNA Binding Buffer wurden der entstandenen Lösung hinzugefügt. 800 µl dieses Gemisches wurden über eine Zymo-Spin™-Column in ein Sammelröhrchen gegeben und bei 10000 G für eine Minute zentrifugiert. Dieser Schritt wurde wiederholt, nachdem der Durchfluss verworfen wurde. 400 µl DNA Wash Buffer 1 wurden über die Zymo-Spin™-Column in ein neues Sammelröhrchen gegeben und wiederum bei 10000 G eine Minute zentrifugiert. Nach dem Verwerfen des Durchflusses wurde der Schritt erst mit 700 µl DNA Wash Buffer 2 und dann mit 200 µl DNA Wash Buffer 2 wiederholt. Die Zymo-Spin™-Column wurde in ein 1,5 ml Röhrchen gesteckt und 100 µl DNase/RNase Free Water wurden hinzugefügt, was eine Minute inkubierte bevor es bei 10000 G für eine Minute zentrifugiert wurde, um die DNA zu eluieren. In Version 1 des Kits wurde der Zymo-Spin™ IV-HRC Spin Filter im Sammelröhrchen für drei Minuten bei 8000 G zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen, 400 µl DNase/RNase Free Water hinzugefügt und es erfolgte noch eine Zentrifugation bei 8000 G für zwei Minuten. In Version 2 wurde der Zymo-Spin™ III-HRC Filter in ein neues Sammelröhrchen gesteckt und 600 µl ZymoBIOMICS™ HRC Prep Solution dazugegeben, woraufhin wieder für drei Minuten bei 8000 G zentrifugiert wurde. Die eluierte DNA wurde dem Zymo-Spin™ HRC Filter, der sich in einem 1,5 ml Röhrchen befand, hinzugefügt und bei 8000 G für eine Minute (Version 1) beziehungsweise bei 16000 g für drei Minuten (Version 2) zentrifugiert. In dem Röhrchen befand sich die gefilterte DNA.

### **Konzentrationsbestimmung und -anpassung**

Um die 16S rRNA der DNA-Proben zu sequenzieren, mussten die Konzentrationen der Proben auf einen festgelegten Wert angepasst werden. Die DNA-Konzentrationen wurden mittels NanoDrop® 1000 Spektrophotometer via Lichtabsorption bei 260 nm gemessen. Jeweils 1,2 µl der Proben wurden auf die entsprechende Stelle des Gerätes pipettiert. Die Proben wurden mit Nuklease-freiem Wasser auf eine DNA-Konzentration von 1 ng/µl eingestellt und bei - 20°C gelagert.

### **PCR und Sequenzierung**

Die PCR und die Sequenzierung erfolgte mit freundlicher Unterstützung von Frau Jana Bull aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie, Virologie und Hygiene der Universitätsmedizin Rostock. Es erfolgte eine Amplicon-PCR der 16S rRNA. Hierfür wurde die mikrobielle genetische DNA in einer Konzentration von 5 ng/µl in 10 mM Tris mit einem pH-Wert von 8,5 genutzt. Die PCR-Amplifikation der V3/V4-Regionen der bakteriellen 16S rRNA wurde mit den Primern Pro341-XT (TCG-TCG-GCA-GCG-TCA-GAT-GTG-TAT-AAG-AGA-CAG-CCT-ACG-GGN-BGC-ASC-AG) und Pro805-XT (GTC-TCG-TGG-GCT-CGG-AGA-TGT-GTA-TAA-GAG-ACA-GGA-CTA-CNV-GGG-TAT-CTA-ATC-C) durchgeführt. Daraus resultierte eine Amplicongröße kleiner als 550 Basenpaare. Anhand des Illumina „16S Metagenomic Sequencing Library Preparation“-Protokolls erfolgten die Schritte des Datenbankaufbaus wie Index-PCR, PCR-Reinigung, Datenbankquantifizierung, Normalisierung und Pooling. Der Bioanalyzer DNA 1000 chips (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) und Qubit kits (Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA) wurden angewendet, um die Quantität und Qualität jeder individuellen Probensammlung und des finalen Probenpools zu bestimmen. 5 pM der finalen Mischung, die mindestens 5% PhiX control enthielt, durchliefen einen individuellen Sequenzdurchlauf mit 2 x 250 oder 2 x 300 Zyklen, für den drei Reagenzkartuschen in einer Illumina MiSeq-Maschine genutzt wurden. Alle gewonnenen Rohdaten wurden für die Sequenzdatenanalyse genutzt.

### **Mikrobiomanalyse**

Die Analyse des Mikrobioms wurde durchgeführt von Frau Dr. Susanne Kneitz aus dem Theodor Boveri Institut der Universität Würzburg. Für diese Analyse wurden Qualitätsfiltrierungen (erlaubte Länge: 440-466 Basenpaare, ohne mehrdeutige Basen), das Verschmelzen von duplizierten Sequenzen und der Abgleich mit der Referenzdatenbank mit Hilfe des Programms Mothur durchgeführt. Nur operative taxonomische Einheiten (operational taxonomic unit; OTU) mit einer Gesamtmenge von größer gleich drei wurden berücksichtigt. Sequenzen von Archaea, Chloroplasten von Eukaryoten und Mitochondrien wurden entfernt. Für die deskriptive Analyse und die Hauptkomponentenanalyse wurde das CRAN-Paket „vegan“ benutzt.

### 3.16 Statistische Analysen

---

Die statistischen Analysen wurden mit den Programmen IBM SPSS Statistics 25 und SigmaPlot 13.0 durchgeführt. Zunächst wurden die Daten der Gewichte, der Arthritisscores, der Inzidenzen der CIA, der Zytokinwerte und die der Durchschnittswerte der Abstandsmessungen zwischen ABC und CEJ mit dem Shapiro-Wilk-Test auf Normalverteilung getestet. Lediglich die Durchschnittswerte der Abstandsmessungen zwischen ABC und CEJ waren normalverteilt. Diese Daten wurden mit dem One-Way ANOVA-Verfahren auf Signifikanzen geprüft. Der LSD-Test (least significant difference) zeigte als Post-hoc-Test auf, zwischen welchen Gruppen sich die Signifikanzen befanden. Die Inzidenzen der CIA wurden mit einer Kaplan-Meier-Kurve dargestellt und mit Hilfe der Log Rank-/ Breslow- und Tarone-Ware-Tests berechnet. Die Gewichte, die Zytokinwerte im Serum, sowie die Arthritisscores wurden mit dem Kruskal-Wallis-Test auf Signifikanzen untersucht. Da sich bei den Zytokinwerten signifikante Unterschiede zeigten, wurde anschließend der LSD-Test durchgeführt. Innerhalb der Mikrobiomanalyse wurde die Übereinstimmung mit dem Jaccard Index berechnet, wobei bei Ungleichheit der Bray-Curtis Index genutzt wurde. Anschließend wurde die Anzahl der Reads mittels Kruskal-Wallis-Test mit paarweisem Vergleich via Nemenyi-Tests statistisch ausgewertet. Im Falle der statistischen Analysen der Synovialmembranen wurden verschiedene Tests angewendet. Die multivariate Analyse der Proteomdaten wurde in der Software R, wie Fox et al. [92] beschrieben haben, durchgeführt. Das Clustering der Probanden wurde mit normalen Ellipsen mit einem Konfidenzintervall von 0,95 berechnet. Die Einzelvariablenanalyse wurde mit der Kruskal-Wallis-einfaktoriellen Varianzanalyse mit anschließendem Post-hoc Wilcoxon signiertem Rank Test und Bonferroni-Korrektur für Mehrfachvergleiche durchgeführt.

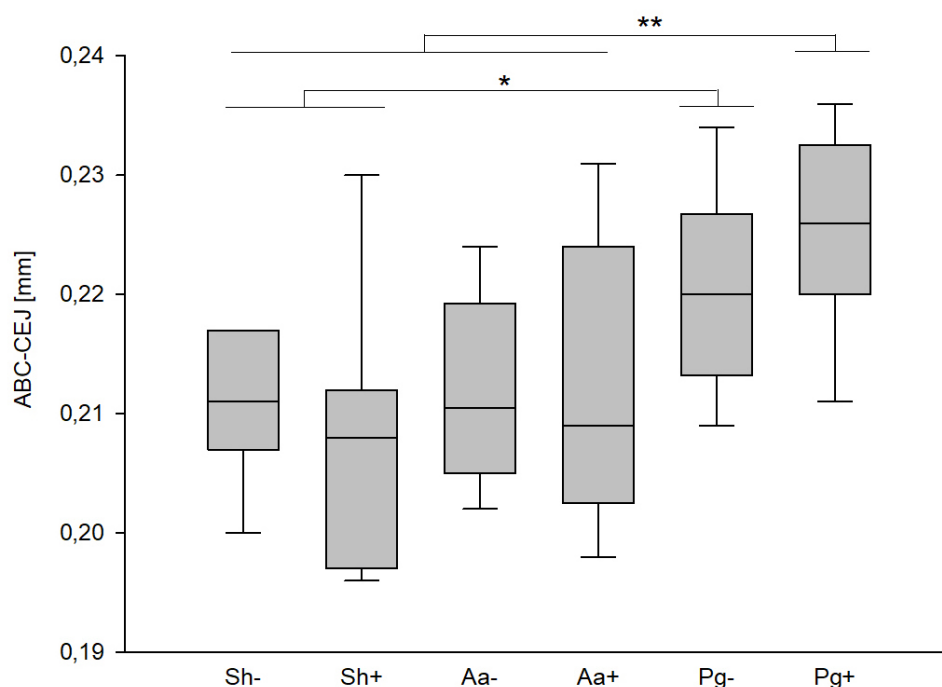


## 4. Ergebnisse

### 4.1 Parodontitis unter Einfluss der Kollagen-induzierten Arthritis

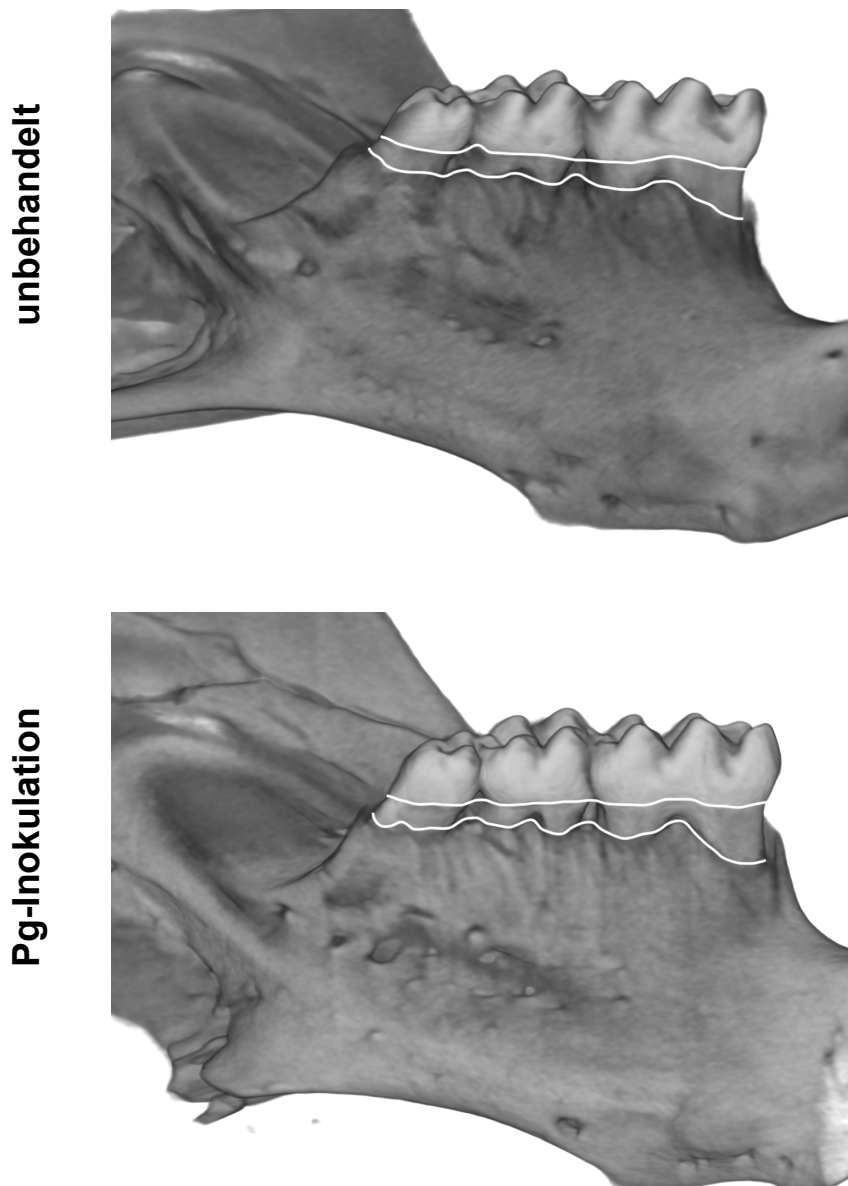
#### 4.1.1 Bakterieninduzierter alveolärer Knochenverlust

Insgesamt achtmal wurden die entsprechenden Gruppen mit 50 µl einer *Pg*- beziehungsweise *Aa*-Suspension und einer Bakterienmenge von  $2 \times 10^9$  KBE/ml im Zeitraum vom 14. bis 28. Experimentiertag inokuliert. Als Kontrolle diente die Gruppe, welche eine bakterienfreie CMC-PBS-Lösung erhielt. Für die Quantifizierung der Parodontitis via µCT wurden die drei Molaren des rechten Unterkiefers untersucht. Dies ist in Abbildung 11 mit Medianen dargestellt, rechnerisch wurden jedoch die Mittelwerte verglichen. Die beiden Kontrollgruppen wiesen einen Mittelwert des Abstandes zwischen ABC und CEJ bei der Sham-negativ-Gruppe von 0,210 mm und bei der Sham-positiven Gruppe von 0,208 mm auf. Der Mittelwert der mit *Aa* inokulierten Tiere lag bei 0,212 mm für beide Gruppen. Den höchsten Knochenverlust zeigten die Tiere, die mit *Pg* inokuliert worden sind. Der Mittelwert der Abstandsmessung ergab für die *Pg*-negative Gruppe einen Wert von 0,220 mm und für die *Pg*-positive Gruppe 0,225 mm. Die statistische Auswertung mit dem One-Way ANOVA-Verfahren ergab signifikante Unterschiede zwischen einzelnen Gruppen. Der LSD-Test zeigte, dass die Gruppe, die lediglich mit *Pg* inokuliert wurde (*Pg*-), einen signifikant größeren Abstand zwischen alveolärem Knochenkamm und Zement-Schmelzgrenze aufwies als die beiden Kontrollgruppen ( $p < 0,05$ ). Die Gruppe, die sowohl mit *Pg* inokuliert wurde als auch



**Abbildung 11:** *Pg* führte zu alveolärem Knochenverlust, welcher von einer CIA unbeeinflusst blieb. Gemessen wurde der Abstand zwischen alveolärem Knochenkamm (ABC) und Zement-Schmelzgrenze (CEJ) in mm via µCT. Die Daten wurden gruppenweise als Boxplot dargestellt. Die statistische Analyse erfolgte mit Hilfe des One-Way ANOVA-Verfahrens. Sternchen kennzeichnen signifikante Unterschiede, \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ .

Kollagen-induzierter Arthritis ausgesetzt war ( $Pg+$ ), zeigte zudem signifikant höhere Abstandsmessungen zu beiden Kontrollgruppen sowie zu beiden  $Aa$ -Gruppen ( $p < 0,01$ ). Es bestand jedoch kein signifikanter Unterschied der beiden  $Aa$ -Gruppen im Vergleich zu den Kontrollgruppen. Vergleicht man jeweils die beiden Gruppen miteinander, die das gleiche Medium (bakterienfrei,  $Pg$  oder  $Aa$ ) inokuliert bekamen, fällt auf, dass es keine signifikanten Unterschiede gibt. Das bedeutet, dass die Arthritisinduktion keinen nennenswerten Einfluss auf den Knochenverlust im Sinne einer Zunahme des Abstands zwischen alveolärem Knochenkamm und Zement-Schmelzgrenze hatte. Zusammenfassend wiesen nur die beiden mit  $Pg$  inokulierten Gruppen einen signifikant erhöhten Knochenverlust als Zeichen einer Parodontitis im Vergleich zu allen anderen Gruppen auf.

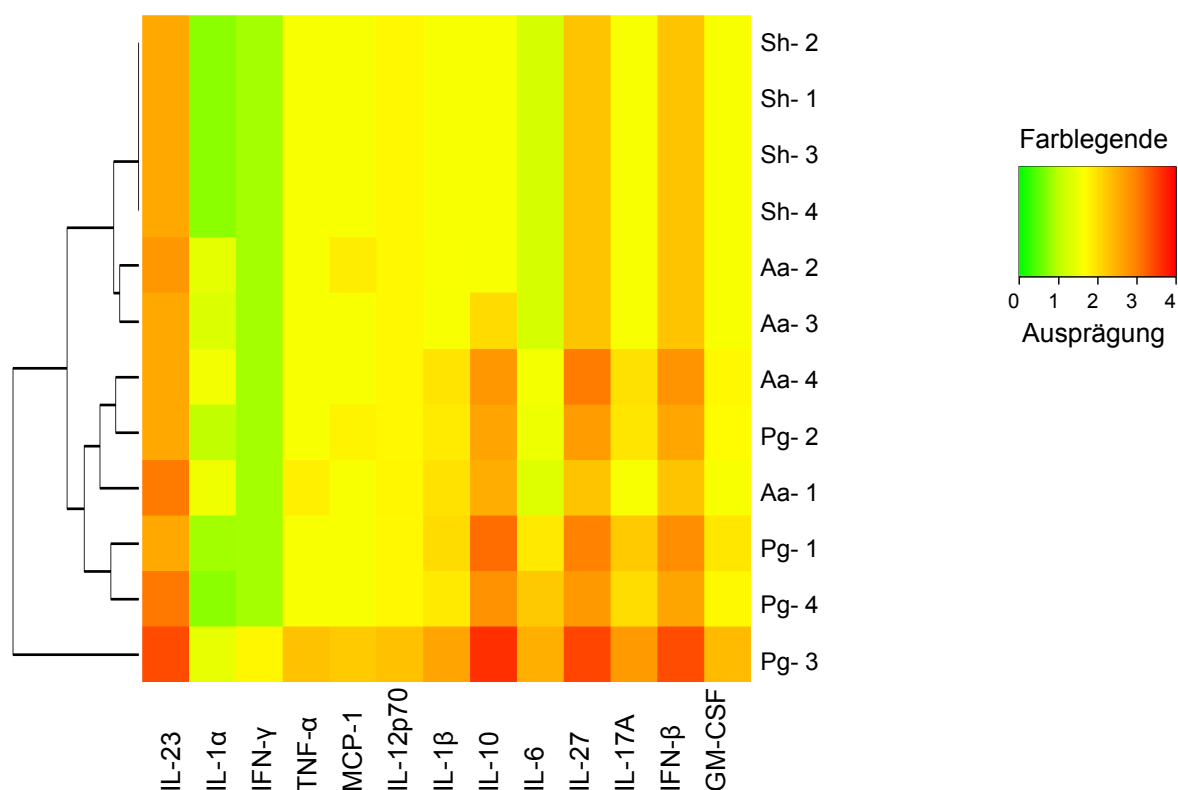


**Abbildung 12:** Der alveoläre Knochenverlust im 3D-Modell war nach  $Pg$ -Inokulation verglichen mit der Kontrollgruppe größer. Dargestellt sind je ein rechter Unterkiefer einer unbehandelten Maus (oben) und einer mit  $Pg$  inokulierten Maus (unten).

Repräsentativ wurden zwei 3D-Modelle von je einem unbehandelten und einem mit *Pg* inokulierten Tier zur besseren Veranschaulichung angefertigt (siehe Abbildung 12). Die obere weiße Linie spiegelt den Übergang zwischen Zahnschmelz und -zement wider, während die untere Linie den alveolären Knochenkamm darstellt. Zu erkennen ist, dass die Fläche zwischen den beiden Linien bei dem mit *Pg* inokulierten Tier größer ist und somit hier der Knochenverlust im Vergleich zum unbehandelten Tier stärker war. Insgesamt führte die Parodontitisinduktion mit *Pg* zu alveolärem Knochenverlust und blieb von einer Arthritis unbeeinflusst.

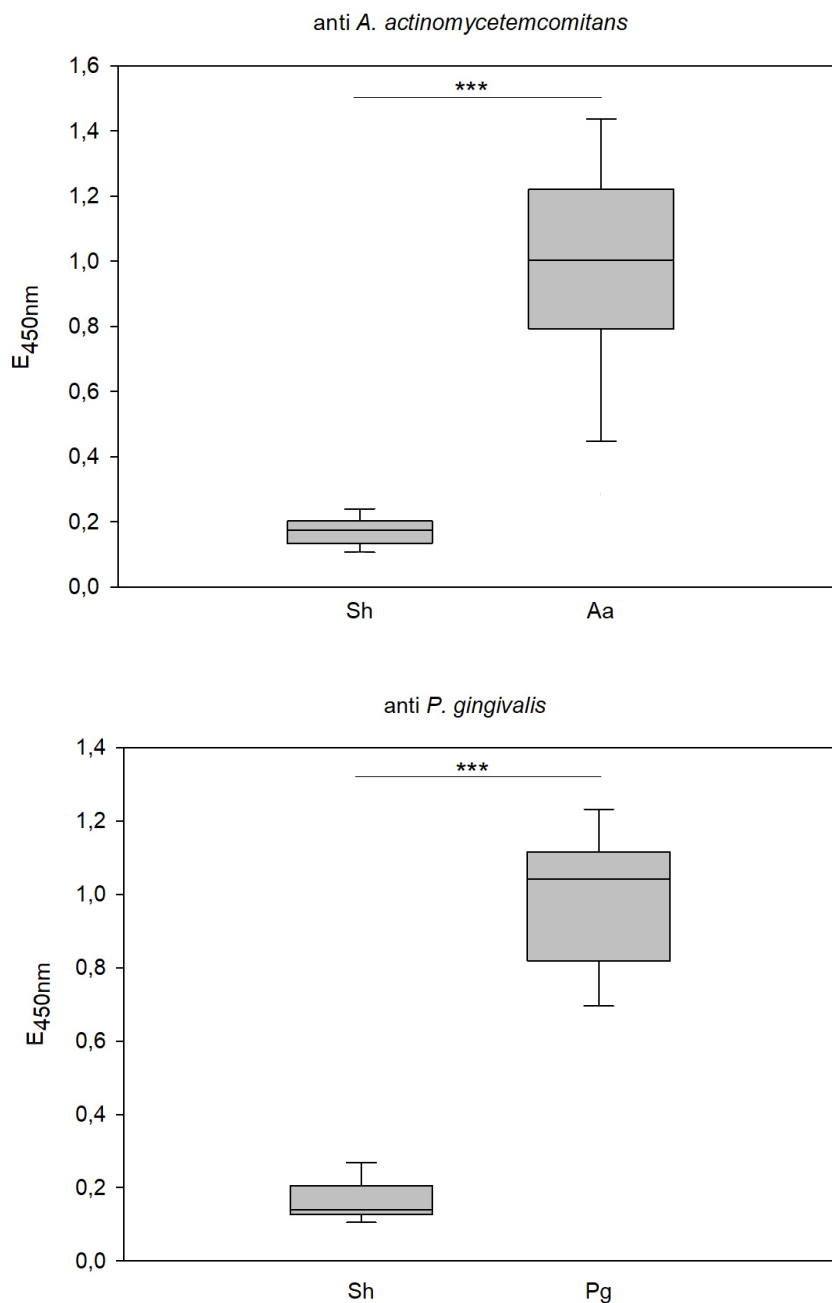
#### 4.1.2 Systemische Immunreaktion und Antikörperbildung nach oraler Bakterieninokulation

An insgesamt drei Zeitpunkten, nach der Parodontitis- und Arthritisinduktion sowie am Versuchsende, wurde den Tieren Blut entnommen, um inflammatorische Zytokine quantifizieren zu können. Es sollten die Auswirkungen der jeweiligen Erkrankungen sowie der Einfluss der einzelnen Bakterien auf die Immunantwort analysiert werden. Dazu wurde der Spiegel von folgenden 13 Zytokinen im Serum mittels Bead-basiertem Immunoassay und nachfolgender Durchflusszytometrie gemessen: IL-23, IL-1 $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , MCP-1, IL-12p70, IL-1 $\beta$ , IL-10, IL-6, IL-27, IL-17A, IFN- $\beta$ , GM-CSF.



**Abbildung 13:** Die orale Inokulation mit Bakterien führte zu einer systemischen Immunantwort. Dargestellt sind die Zytokinspiegel der Tiere ohne CIA zum Zeitpunkt der zweiten Blutentnahme. Vier Tiere wurden zufällig aus jeder der drei Gruppen ohne CIA ausgewählt. Die Ausprägung von 13 inflammatorischen Zytokinen wurde per Multiplexanalyse ausgewertet und als Heatmap dargestellt. Jede Zeile repräsentiert je ein Tier, jede Spalte ein Zytokin. Die Farblegende gibt den dekadischen Logarithmus der Massenkonzentration in pg/ml der Zytokine an (0  $\hat{=}$  1 pg/ml, 1  $\hat{=}$  10 pg/ml, 2  $\hat{=}$  100 pg/ml, 3  $\hat{=}$  1000 pg/ml, 4  $\hat{=}$  10000 pg/ml).

IL-17A, IFN- $\beta$  und GM-CSF. Die Wahl fiel auf diese Entzündungsmarker, da die meisten von ihnen von angeborenen Immunzellen produziert werden und sie des Weiteren eine für die Immunantwort essenzielle Verbindung zwischen angeborenem und erworbenem Immunsystem sowie an der Entzündungsreaktion teilhabenden Nachbarzellen herstellen. Die Analyse der Zytokine der ersten Blutentnahme vom 34. Versuchstag ergab keine nennenswerten Unterschiede. In Abbildung 13 sind die Auswertungen der zweiten Blutentnahme von Tag 74 dargestellt, welche vor allem zeigen,



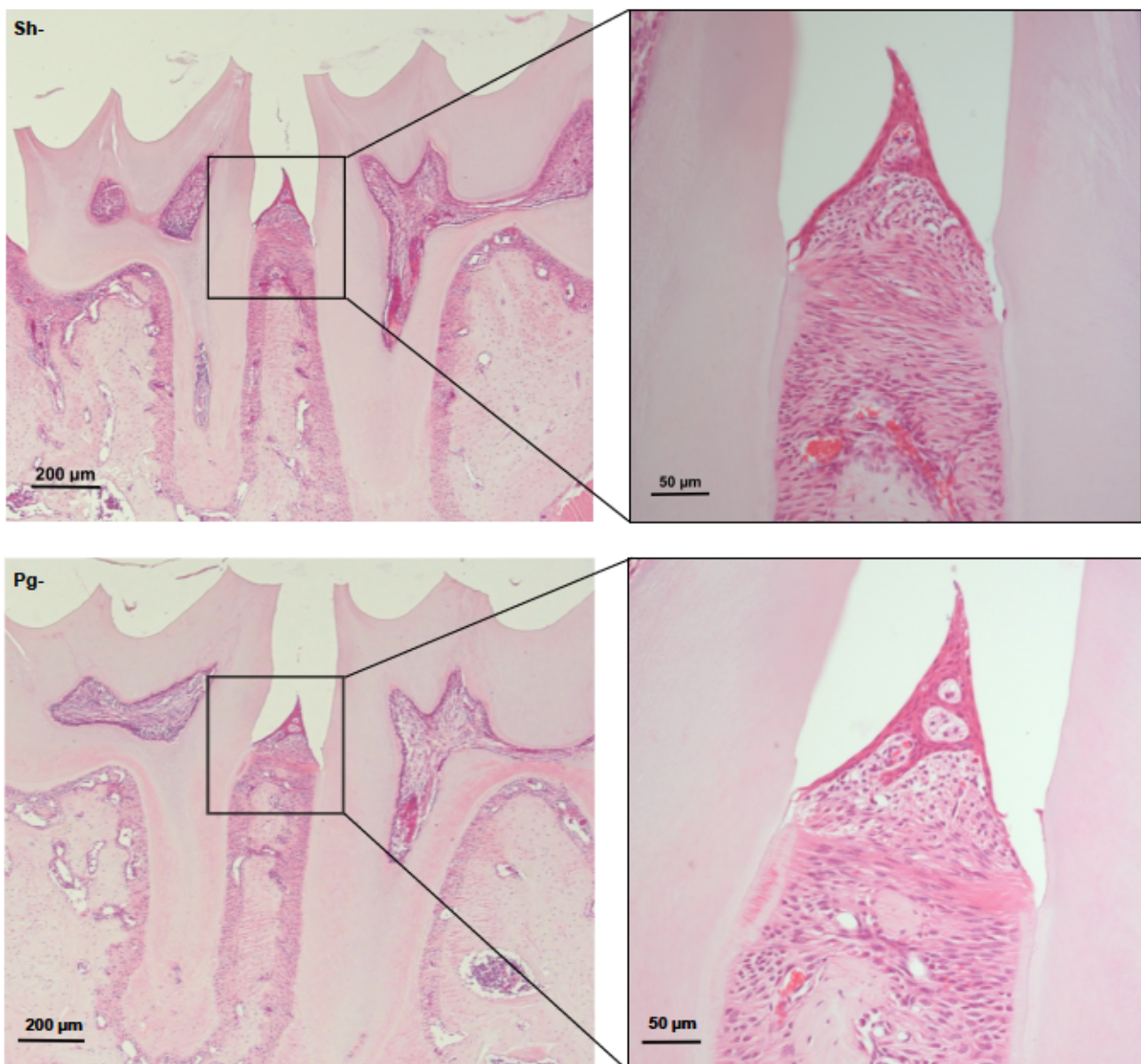
**Abbildung 14:** Die orale Inokulation mit Bakterien initiierte eine Antikörperbildung. Die IgG-Antikörper gegen *Pg* und *Aa* wurden via ELISA gemessen. In den Abbildungen sind die Werte als Extinktion bei einer Wellenlänge von 450 nm dargestellt. Als Kontrollgruppe dienten jeweils alle Tiere der Gruppen Sh- und Sh+ ( $n = 14$ ). Alle Seren der Tiere, welche *Pg* ( $n = 17$ ) beziehungsweise *Aa* ( $n = 16$ ) inokuliert bekamen, wurden in die Messung mit einbezogen. Sternchen kennzeichnen signifikante Unterschiede, \*\*\*  $p < 0,001$ .

dass die Bakterieninokulationen zu ansteigenden Zytokinspiegeln führten. Um diesen Effekt der Bakterien ohne die Auswirkungen der Arthritis auf die Immunreaktion deutlicher zu machen, wurden in der dargestellten Heatmap nur Mäuse aufgezeigt, welche inokuliert, aber nicht immunisiert wurden. Besonders *Pg* führte zu hohen Konzentrationen von IL-23, IL-10, IL-27 und IFN- $\beta$ . Tiere, die Kontakt zu *Aa* hatten, zeigten auch einen Anstieg dieser Zytokine, jedoch von geringerer Intensität. Als Kontrolle diente die Gruppe, welche die bakterienfreie Suspension erhielt. Die hierarchische Clusteranalyse ergab eine Zusammengehörigkeit der Kontrolltiere auf molekularer Ebene, sprich die Ähnlichkeit der Proben in Bezug auf die Zytokinkonzentrationen, was links an der Abbildung 13 dargestellt ist. Weiterhin wies die Kontrollgruppe die niedrigsten Zytokinlevel auf. Alles in allem führte insbesondere die Inokulation mit *Pg* zu einer systemischen Immunantwort.

Das Serum, welches zum Ende des Beobachtungszeitraumes entnommen wurde, diente zusätzlich zur Bestimmung der Zytokinwerte auch zur Messung der Antikörper gegen *Pg* und *Aa*, um eine erfolgreiche Inokulation der jeweiligen Bakterien nachzuweisen. Als Kontrollgruppe dienten die 14 Tiere, welche mit der bakterienfreien Suspension inokuliert wurden. Im Falle der anti-*Aa*-Antikörper lag der Median der Kontrollgruppe bei einer Extinktion von 0,1745 (siehe Abbildung 14 oben). Die Antikörpertiter der Tiere aus den Gruppen *Aa*- und *Aa*+ ergaben eine mittlere Extinktion von 1,003. Im Vergleich zur Kontrollgruppe ergab der Mann-Whitney-U-Test einen hoch-signifikanten Unterschied ( $p < 0,001$ ). Im Falle der anti-*Pg*-Antikörper lag die mittlere Extinktion der insgesamt 17 mit *Pg* inokulierten Tiere bei 1,042, die der Kontrollgruppe bei 0,1395 (siehe Abbildung 14 unten). Auch hier zeigte sich ein hochsignifikanter Unterschied zwischen *Pg*-Gruppe und Kontrollgruppe ( $p < 0,001$ ). Diese Ergebnisse bestätigten die erfolgreiche Inokulation der Tiere mit *Aa* beziehungsweise *Pg*. Zusammenfassend gesagt, initiierte die orale Inokulation mit Bakterien eine Antikörperbildung sowie eine systemische Immunantwort.

### 4.1.3 Histologische Untersuchung der Unterkiefer nach Parodontitisinduktion

Es wurde die rechte Hälfte des Unterkiefers histologisch untersucht, um die Auswirkungen der Bakterieninokulation nachzuweisen. In Abbildung 15 sind exemplarisch ein Unterkiefer der Kontrollgruppe und der Gruppe mit *Pg*-Inokulation dargestellt. Es zeigten sich keine klaren Unterschiede zwischen Tieren, die oral Bakterien erhielten und jenen, denen die bakterienfreie Suspension appliziert wurde. Es konnten keine Zeichen einer Entzündung nachgewiesen werden. Schlussendlich konnte der alveoläre Knochenverlust histologisch nicht nachgewiesen werden.



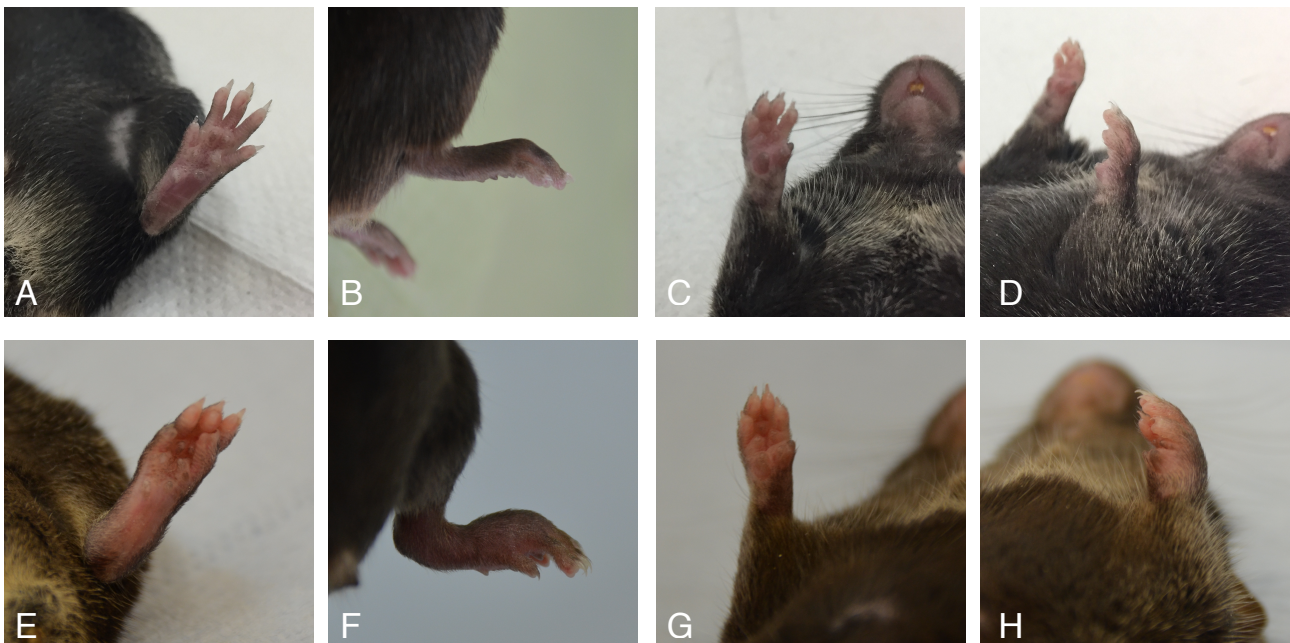
**Abbildung 15:** Die Auswirkungen einer Parodontitis konnten histologisch nicht nachgewiesen werden. Exemplarische Ausschnitte der rechten Mandibulae sind histologisch dargestellt. Oben ist die Mandibula eines Tieres der Kontrollgruppe Sh- und unten die von einer mit *Pg* behandelten Maus abgebildet. Vergrößerungen: links 5x; rechts 20x.



## 4.2 Kollagen-induzierte Arthritis unter Einfluss der Parodontitis

### 4.2.1 Arthritisscores und -inzidenzen in Abhängigkeit der verschiedenen Bakterien

Am 64. Experimentiertag wurden die Tiere mit IFA sekundärimmunisiert. Zwei Tage nach diesem sogenannten Boost erfolgte zweitägig ein visuelles Scoring der Arthritis (Beispiele siehe Abbildung 16). Insgesamt wurde an 21 Tagen von jedem Tier ein Wert ermittelt. Zum Ende des Versuches wurde aus allen 21 einzelnen Werten des Scores die Summe für jedes Tier einzeln berechnet (siehe Abbildung 17). Dies ergab für die Sham-Tiere den höchsten Median mit 66 Punkten, gefolgt von den Aa-Tieren mit einem Median von 55. Der niedrigste Median mit 0 ergab sich für die Gruppe, welche mit *Pg* inokuliert wurde. Die statische Auswertung mit Hilfe des Kruskal-Wallis-Tests ergab allerdings keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen. In Hinblick auf die Inzidenzen, welche in Abbildung 18 dargestellt sind, hatten die mit Aa inokulierten Tiere zum einen den schnellsten Anstieg mit 25% erkrankter Tiere an Tag acht nach Boost. Die Hälfte der Tiere war an Tag 14 post Boost erkrankt. Zum anderen wiesen sie auch die höchste Inzidenz am Versuchsende von 75% auf. Die Sham-Gruppe entwickelte in der Zeit kurz nach Boost langsamer als die Aa-Gruppe, jedoch schneller als die Pg-Gruppe Arthritis. Ab dem 18. Tag post Boost mit 57,14% und 71,43% erkrankter Tiere am 20. Tag post Boost verzeichnete die Sham-Gruppe allerdings die höchste Inzidenz, bis zum 38. Tag post Boost, ab dem die Aa-Gruppe bis zum Versuchsende die meisten erkrankten Tiere aufwies. Die mit *Pg* inokulierten Tiere entwickelten nicht nur am langsamsten Arthritis, sondern hatten zu jedem Zeitpunkt die geringste Inzidenz, mit einem Wert von 33,3% am Versuchsende. Die Log Rank-/Breslow- und Tarone-Ware-Tests



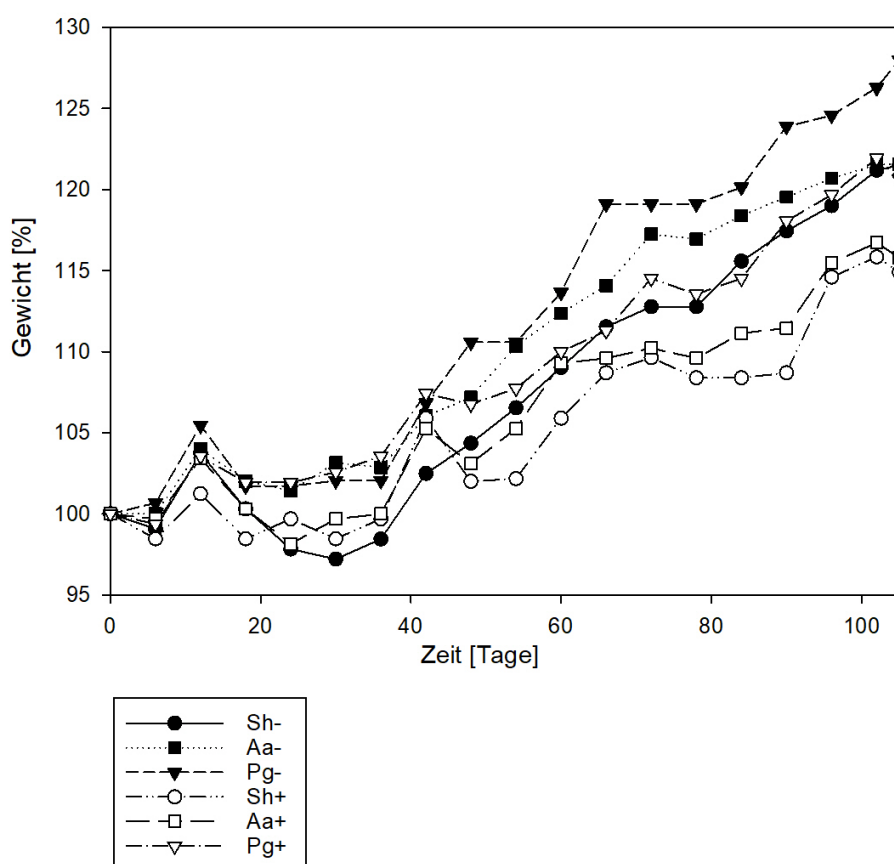
**Abbildung 16:** Die CIA führte zu makroskopisch sichtbaren Zeichen einer Arthritis. A: gesunder linker Hinterlauf von plantar. B: gesunder rechter Hinterlauf von lateral. C: gesunde rechte Vorderpfote von palmar. D: gesunde linke Vorderpfote von lateral. E: erkrankter linker Hinterlauf von plantar. F: erkrankter linker Hinterlauf von lateral. G: erkrankte rechte Vorderpfote von palmar. H: erkrankte linke Vorderpfote von lateral.





#### 4.2.2 CIA- und bakterieninduzierte Gewichtsveränderungen

Die Messung des Körpergewichtes erfolgte regelmäßig an jedem zweiten Tag, beginnend an dem Tag der Überführung der Tiere vom IEC in den Tierversuchsraum bis hin zur Asservierung am 105. Experimentiertag. Tiere, die an Arthritis erkrankt waren, wurden jeden Tag gewogen. Dieses kontinuierliche Monitoring stellte sicher, dass sich die Tiere für ihr Alter angemessen entwickelten. Außerdem konnten Gewichtsverluste möglichst schnell erkannt werden und entsprechende Gegenmaßnahmen ergriffen werden, wie zum Beispiel angefeuchtetes Futter in Bodennähe zur Verfügung zu stellen. Der Gewichtsverlauf ist in Abbildung 19 dargestellt. Alle Tiere entwickelten sich adäquat und keines musste aufgrund eines zu hohen Gewichtsverlustes aus dem Versuch ausgeschlossen werden. Das Ausgangsgewicht jeder Gruppe wurde am Experimentiertag 0 auf 100% normiert. Alle Gruppen wurden zweitägig vom 14. bis 28. Experimentiertag anästhesiert, um die Inokulation durchführen zu können. Diese acht aufeinanderfolgenden Narkosen führten zu dem sichtbaren Gewichtsverlust. Es ist zu erkennen, dass die Tiere mit CIA im letzten Drittel und besonders zum Ende des Versuchs weniger Körpergewicht aufwiesen (am Experimentiertag 105 zwischen 114,91 und 120,65%), als diejenigen ohne RA (zwischen 121,50 und 127,99%).

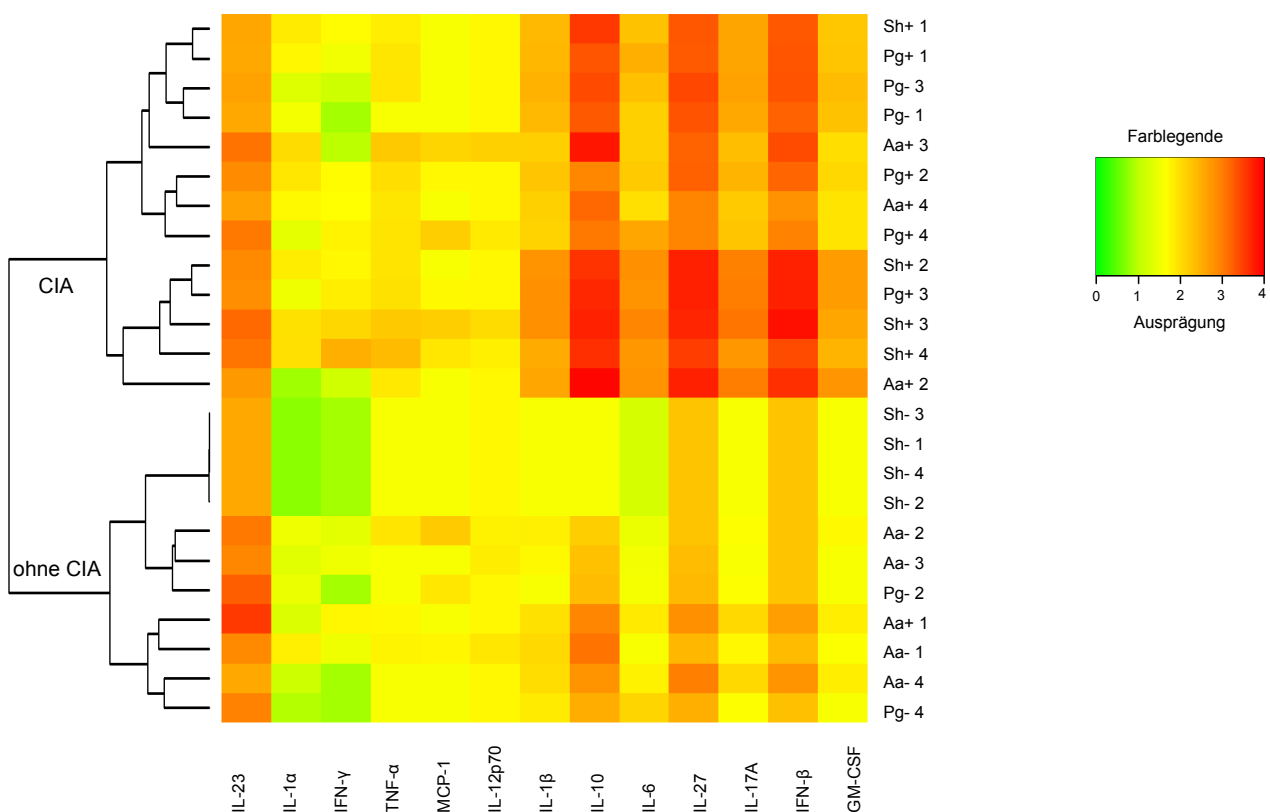


**Abbildung 19:** Es ist kein signifikanter Unterschied der Gewichtsverläufe zwischen den Gruppen zu verzeichnen. Der relative Gewichtsverlauf ist in Tagen gruppenweise dargestellt. Gruppen mit hellen Symbolen wurden inokuliert und immunisiert. Gruppen mit dunklen Symbolen erhielten Inokulationen, jedoch keine CIA.

Des Weiteren fällt auf, dass Tiere, die mit *Pg* inokuliert wurden, mehr als andere Gruppen an Gewicht zunahmten, wobei die Tiere mit bakterienfreier Spülung zum geringsten Körpergewicht tendierten. Diese Tendenz ist ab ungefähr dem 50. Versuchstag zu verzeichnen. Letztendlich zeigten die statistischen Analysen, berechnet mit dem Kruskal-Wallis-Test, zu keinem Zeitpunkt einen signifikanten Unterschied im Gewicht der Gruppen untereinander. Alle Versuchsgruppen entwickelten sich adäquat und konnten zeitlich begrenzte Gewichtsverluste schnell regulieren. Zusammenfassend gesagt, tendierten Mäuse mit Kollagen-induzierter Arthritis zu einer verringerten Gewichtszunahme.

#### 4.2.3 Systemische Immunreaktion nach der CIA

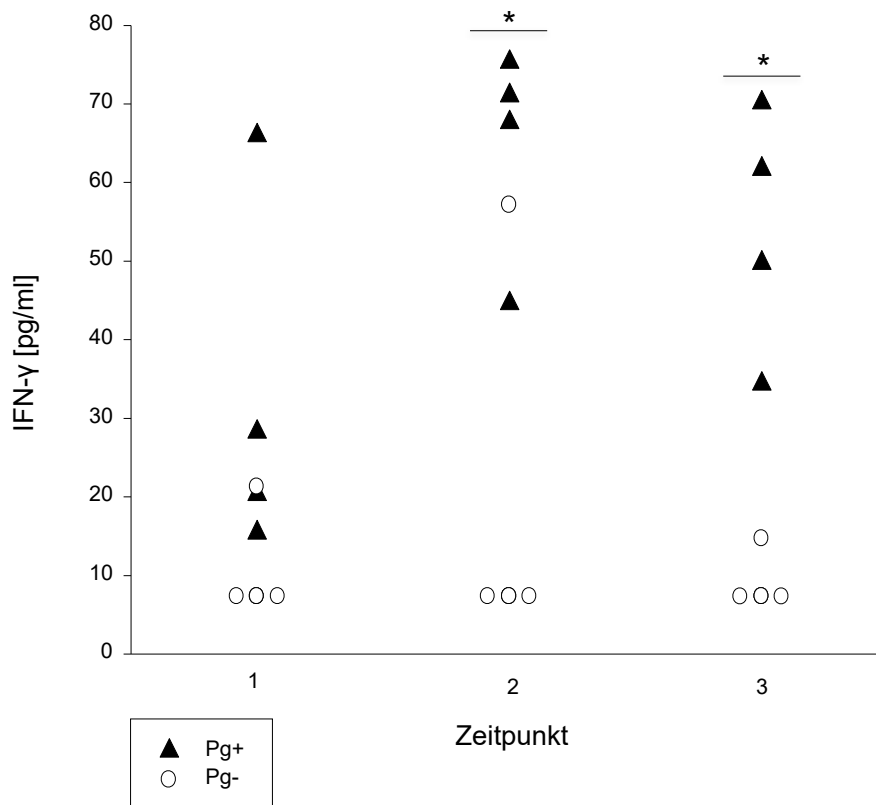
Zum Zeitpunkt der letzten Blutentnahme war ein Großteil der Tiere von leichter bis starker CIA betroffen. Dies spiegelte sich auch in den Auswertungen der Zytokine wider. Die Heatmap in Abbildung 20 sowie die Clusteranalyse zeigten deutlich den Unterschied zwischen Tieren mit und ohne CIA. Bis auf wenige Ausnahmen clusterten Tiere mit CIA zusammen. Insbesondere IL-10, IL-27 und IFN- $\beta$  wurden in hohen Konzentrationen nachgewiesen. Auch IL-23, IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-17A



**Abbildung 20:** Die CIA löste eine systemische Immunreaktion aus. Dargestellt sind die Zytokinspiegel aller Gruppen zum Endzeitpunkt. Es wurden vier Tiere zufällig aus jeder Gruppe ausgewählt. Die Heatmap repräsentiert je ein Tier pro Zeile und je eines der 13 inflammatorischen Zytokine pro Spalte. Die Farblegende gibt den dekadischen Logarithmus der Massenkonzentration in pg/ml der Zytokine an ( $0 \hat{=} 1$  pg/ml,  $1 \hat{=} 10$  pg/ml,  $2 \hat{=} 100$  pg/ml,  $3 \hat{=} 1000$  pg/ml,  $4 \hat{=} 10000$  pg/ml).

und GM-CSF waren ausgeprägt im Serum zu detektieren. Die Kontrollgruppe, in diesem Fall die Tiere ohne Bakterieninokulation und CIA (Sh-), zeigte im Vergleich zu allen anderen Gruppen die geringste Ausprägung aller Zytokine.

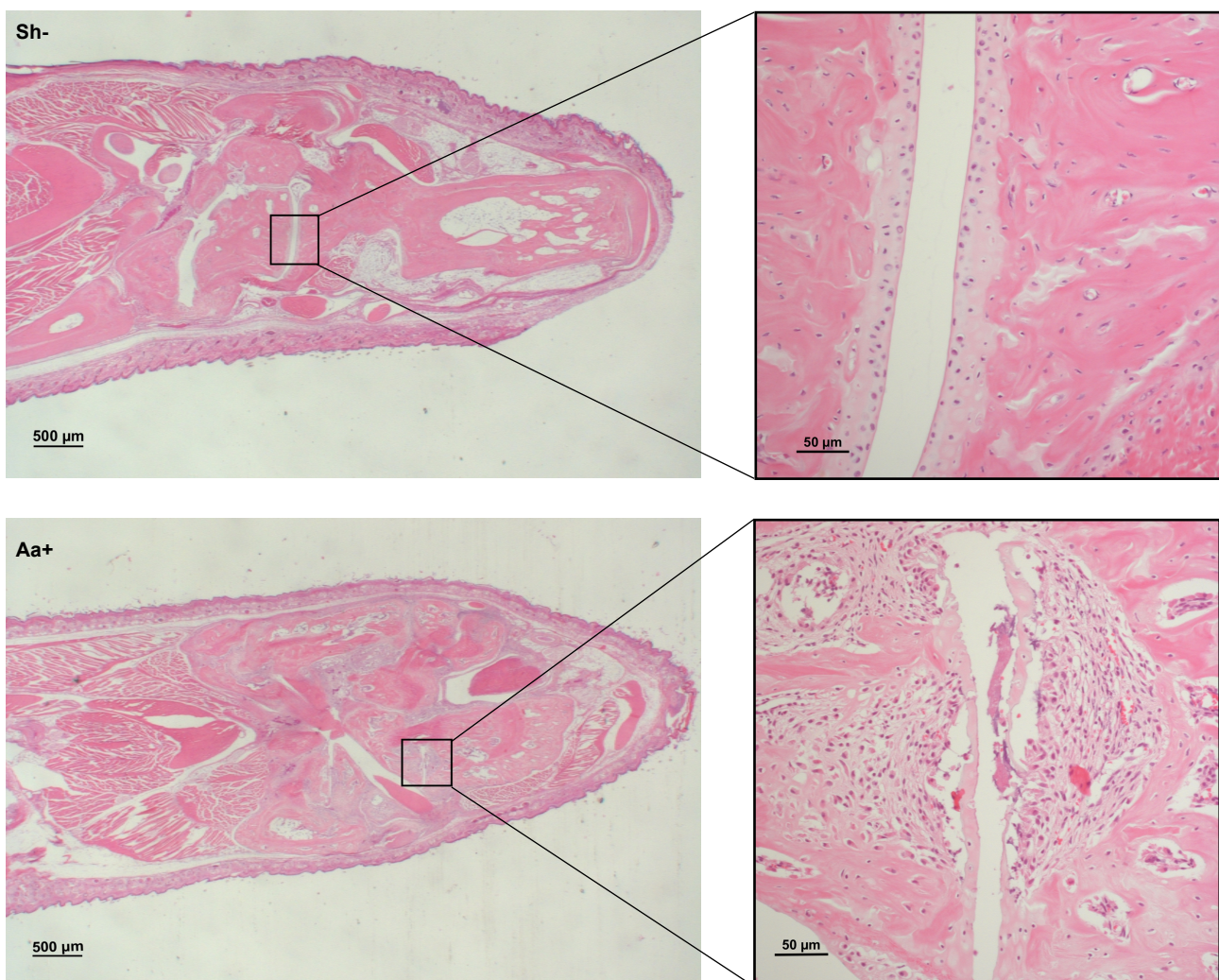
Der Effekt der CIA auf die Immunantwort wird auch am Beispiel von IFN- $\gamma$  in Abbildung 21 ersichtlich. Die miteinander verglichenen Gruppen Pg- und Pg+ unterschieden sich nur durch die CIA voneinander. Zum Zeitpunkt der ersten Blutentnahme erhielten beide Gruppen dieselben Interventionen. Der Kruskal-Wallis-Test ergab keinen signifikanten Unterschied. Zum zweiten und dritten Zeitpunkt unterschieden sich die Gruppen Pg+ und Pg- durch die CIA voneinander. Die Gruppe Pg+ wies signifikant höhere IFN- $\gamma$ -Werte auf. Fazit ist, dass die CIA eine systemische Immunantwort mit steigenden Zytokinen initiierte.



**Abbildung 21:** Die CIA führte zu einer Erhöhung der IFN- $\gamma$ -Spiegel im Serum. Die IFN- $\gamma$ -Konzentration ist in pg/ml von je vier Tieren aus den Gruppen Pg+ und Pg- zu allen drei Zeitpunkten der Blutentnahme dargestellt. Der Kruskal-Wallis-Test ergab eine signifikant höhere IFN- $\gamma$ -Konzentration bei der Gruppe mit CIA (Pg+). Signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ) sind mit \* gekennzeichnet.

#### 4.2.4 Arthritistypische Veränderungen in der histologischen Untersuchung

Die Extremitäten wurden auf mikroskopische Zeichen einer Entzündungsreaktion und Knochenveränderungen untersucht. Die Hinterläufe waren deutlich häufiger und zudem auch noch stärker von der CIA betroffen als die Vorderpfoten. Deswegen wurde exemplarisch aus jeder Gruppe eine stark betroffene Hinterpfote histologisch untersucht. Als Kontrollgruppe diente die Gruppe ohne CIA und ohne Bakterieninokulation (Sh-). Abbildung 22 zeigt, dass die Tiere mit CIA Knorpelschäden und Entzündungszeichen im Vergleich zu der Kontrollgruppe aufwiesen. Die von Arthritis betroffenen Pfoten waren durch Gelenkspaltverschmälerungen sowie dünnere und unregelmäßig begrenzte Knorpel gekennzeichnet. Es ließen sich außerdem Nester aus Entzündungszellen in den erkrankten Pfoten nachweisen.



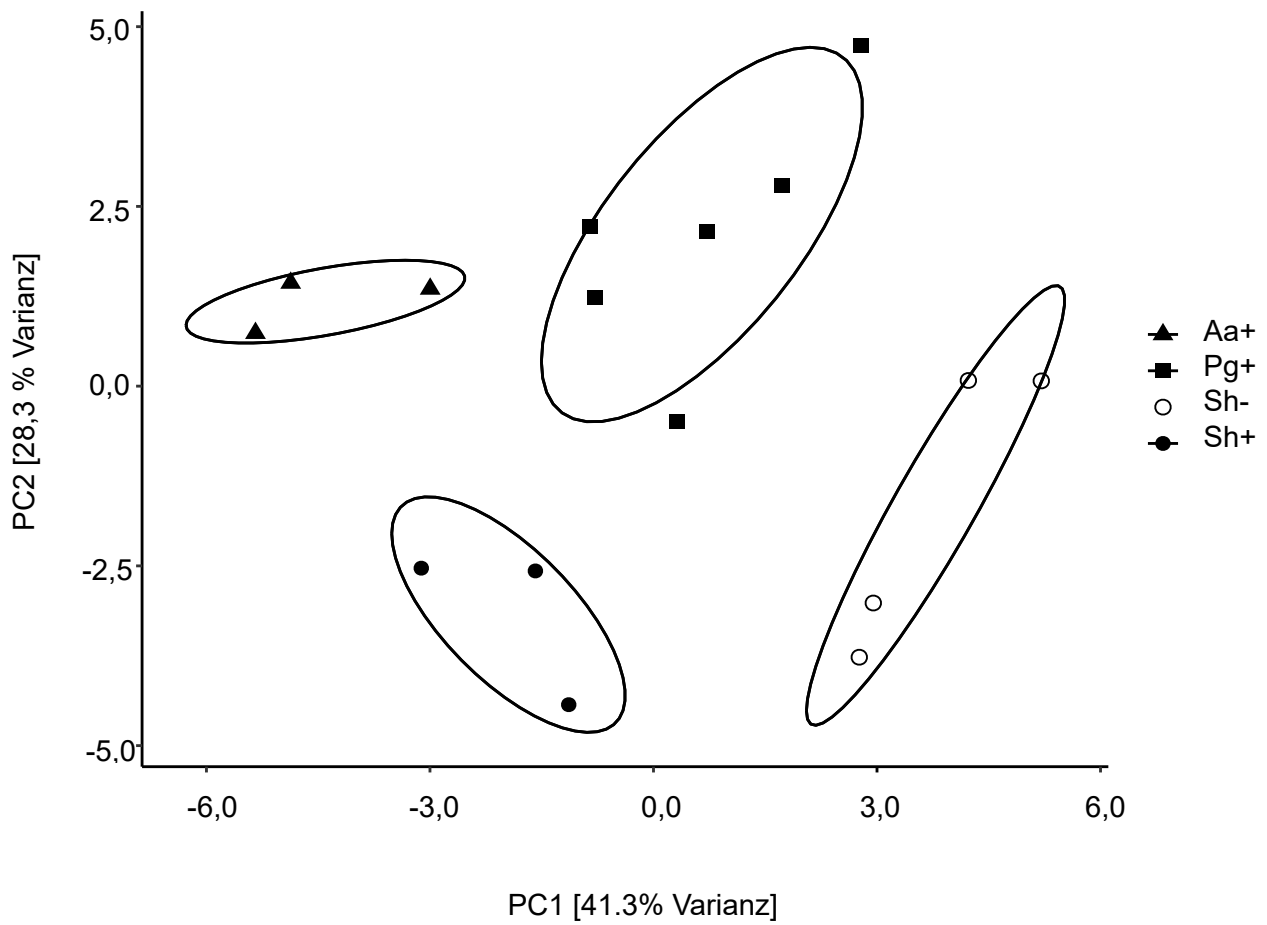
**Abbildung 22:** Die CIA führte zu mikroskopisch sichtbaren Zeichen einer Arthritis. Ausgewählte Hinterläufe sind histologisch dargestellt. Oben ist die Pfote eines Tieres aus der Kontrollgruppe Sh- und unten eine erkrankte Pfote aus der Gruppe Aa+ abgebildet. Vergrößerungen: links 1,25x; rechts 20x.

### 4.3 Veränderungen des synovialen Proteoms durch CIA und Bakterieninokulation

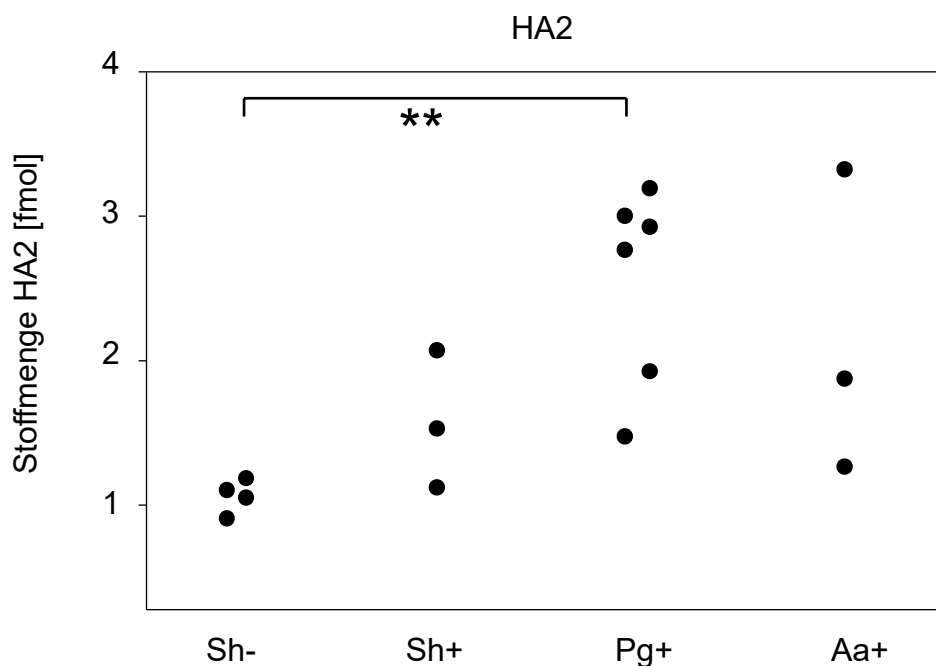
Um die Auswirkungen der CIA auf die Synovia festzustellen, wurden Veränderungen der Zusammensetzung der Synovialmembran insbesondere hinsichtlich des Gehalts und der Vielfalt der Proteine massenspektrometrisch untersucht. Dafür wurden insgesamt 20 Proben zum Endzeitpunkt von zehn Tieren jeweils bilateral entnommen und anschließend analysiert. Die einzelnen Synovialmembranen stammten aus diesem Experiment und dem von Lennart Bolten. Der Experimentaufbau von Herrn Bolten war invers zu meinem, die Mäuse bekamen erst CIA und danach wurden die jeweiligen Bakterien inokuliert. Die Experimente waren vergleichbar und liefen unter demselben Tierschutzantrag. Aufgrund der zu geringen Aussagekraft von 14 Membranen aus meinem Versuch, wurden die Proben aus beiden Experimenten verwendet. Insgesamt vier der 20 Proben wurden aus den Analysen ausgeschlossen, da sie fehlerhaft entnommen wurden und aufgrund dessen zu viel Muskel- und Blutproteine enthielten. In den verbliebenen 16 Proben wurden 1275 verschiedene Proteingruppen identifiziert, die mindestens zwei einzigartige Peptide und einen fold-change größer als zwei zwischen allen experimentellen Gruppen aufwiesen. Laut des One-way-ANOVA-Tests waren 24 Proteine dieses Datensatzes in Abhängigkeit vom Auslösen der CIA und PD signifikant verändert. Die Hauptkomponentenanalyse ergab eindeutig ein Clustern der Daten entsprechend der unterschiedlichen Gruppen, was in Abbildung 23 dargestellt ist. Innerhalb der Synovialmembranen der Gruppe mit der Kombination aus CIA und *Pg*-Inokulation (*Pg*+) konnte eine Hochregulierung der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Ketten des H-2 Klasse II Histokompatibilitätsantigens (HB2 und HA2) nachgewiesen werden (siehe Abbildung 24). Abbildung 25 zeigt, dass Tiere mit *Aa*-Gabe und nachfolgender CIA eine höhere Expressierung der Immunglobulin-domänen wie der konstanten Ig- $\kappa$ -Kette (IGKC) aufwiesen. In der nachfolgenden Tabelle sind Proteine aufgelistet, welche in den jeweiligen Gruppen höher exprimiert waren. Unter Punkt 3.14 in der Tabelle 3 sind Funktion und Bedeutung dieser Proteine aufgeführt. Zusammenfassend bewirkten die CIA sowie die orale Inokulation mit *Pg* beziehungsweise *Aa* eine Veränderung im synovialen Proteom.

Gruppe	Proteine
<i>Pg</i> +	HB2; HA2; LYZ2
<i>Aa</i> +	ACOT9; FA12; IGHG1; GCA; IGG2B; HVM; KV3A; IGKC; NFM; RAB6A; TMED3
<i>Sh</i> +	PSMD2; CAH2; EPB42; LMNB1; MYH8; PCCB; UGGG1
<i>Sh</i> -	CP2E1; MYPO; THRSP

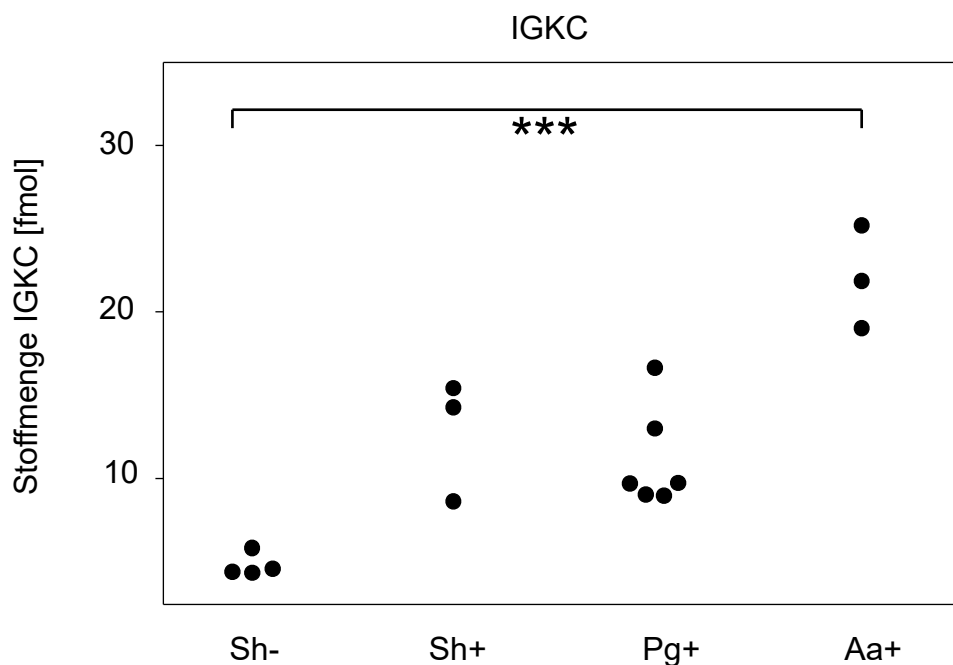
**Tabelle 4:** Hochregulierte Proteine in den Synovialmembranen der jeweiligen Gruppen.



**Abbildung 23:** Die orale Inokulation mit Bakterien sowie die CIA veränderten das synoviale Proteom. Dargestellt sind die Hauptkomponentenanalyse und das Clustering der Proteinsignalintensitäten aus der LC/MS-Analyse. PC1 = Hauptkomponente 1, PC2 = Hauptkomponente 2. Angaben in Klammern geben an, wie viel % der Varianz, die zwischen den Proben existiert, erklärt werden können.



**Abbildung 24:** Die Inokulation mit *Pg* bewirkte eine erhöhte Expression der  $\alpha$ -Kette des H-2 Klasse II Histokompatibilitätsantigens. Dargestellt sind die Mengen der  $\alpha$ -Kette des H-2 Klasse II Histokompatibilitätsantigens in den jeweiligen Synovialmembranproben in Femtomol. Die 16 Proben stammten aus vier Gruppen (Sh-, Sh+, Pg+ und Aa+). Der Kruskal-Wallis-Test ergab einen signifikanten Unterschied ( $p = 0,0084$ ). Signifikante Unterschiede ( $p < 0,01$ ) sind mit \*\* gekennzeichnet.



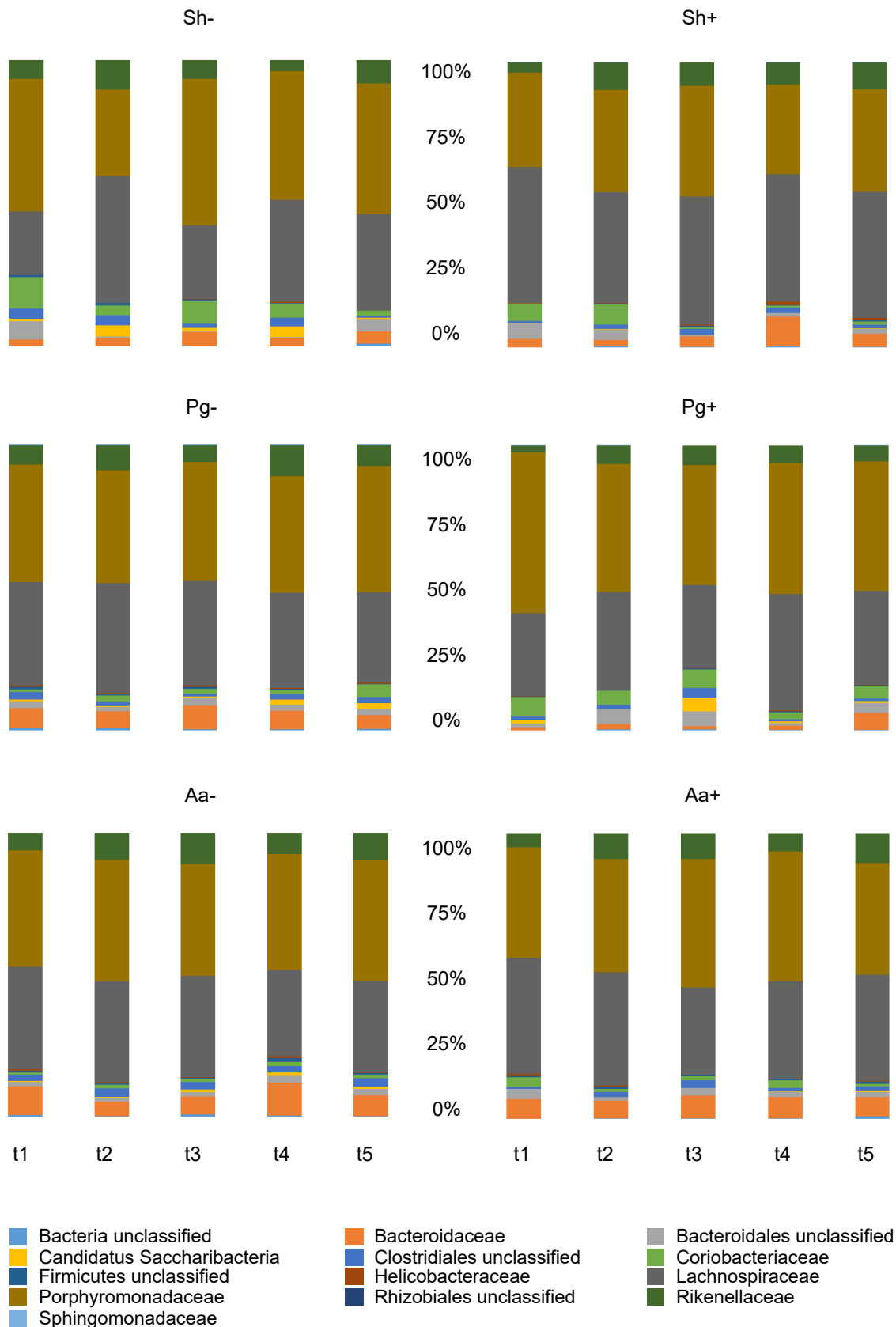
**Abbildung 25:** Die Inokulation mit *Aa* bewirkte eine erhöhte Expression der konstanten Ig- $\kappa$ -Kette. Dargestellt sind die Mengen der konstanten Ig- $\kappa$ -Kette in den jeweiligen Synovialmembranproben in Femtomol. Die 16 Proben stammten aus vier Gruppen (Sh-, Sh+, Pg+ und Aa+). Der Kruskal-Wallis-Test ergab einen hoch signifikanten Unterschied ( $p = 0,0002$ ). Signifikante Unterschiede ( $p < 0,001$ ) sind mit \*\*\* gekennzeichnet.

#### 4.4 Auswirkungen der CIA und Bakterieninokulation auf das Darmmikrobiom

---

Während des Versuchsverlaufes wurde insgesamt an fünf Experimentiertagen Stuhl gesammelt. Dies erfolgte an Tag null vor jeglicher Intervention, an Tag zwölf nach oraler Antibiotikagabe, an Tag 34 nach der oralen Inokulation, an Tag 74 nach der Sekundärimmunisierung (im Falle der RA-postiven Gruppen) und am Versuchsende, Tag 105. Die DNA aus allen Proben wurde aufgereinigt und verflüssigt via ZymoBIOMICS™ DNA Miniprep. Anschließend wurde eine PCR durchgeführt, gefolgt von einer Sequenzdatenanalyse. Dabei wurde der relative Anteil verschiedener Bakterienfamilien am gesamten Mikrobiom ermittelt. In Abbildung 26 sind folgende Bakterienfamilien dargestellt: *Bacteroidaceae*, *Bacteroidales*, *Candidatus Saccharibacteria*, *Clostridiales*, *Coriobacteriaceae*, *Firmicutes*, *Helicobacteraceae*, *Lachnospiraceae*, *Porphyromonadaceae*, *Rhizobiales*, *Rikenellaceae*, *Sphingomonadaceae* und nicht näher klassifizierte Bakterien. Zwischen den sechs Gruppen und innerhalb jeder Gruppe im zeitlichen Verlauf ließen sich lediglich kleine Veränderungen verzeichnen, welche jedoch nicht signifikant waren. Es fällt auf, dass die Bakterien der Familie *Pasteurellaceae*, zu der *Aa* zählt, in keiner nachweisbaren Menge im Mikrobiom des Darms zu finden waren. Dies gilt sowohl für die Zeit vor der Inokulation mit *Aa* als auch nach der oralen Gabe des Bakteriums. Im Gegensatz dazu machten die Bakterien der Familie *Porphyromonadaceae*, zu denen *Pg* gehört, im gesamten Experimentverlauf einen wesentlichen Anteil, teilweise bis zu 50%, des Mikrobioms aus. Diese Bakterien waren dementsprechend schon vor der oralen Inokulation im Darm zu finden. Den größten Anteil am Mikrobiom hatten die Bakterien der Familien *Lachnospiraceae* und *Porphyromonadaceae*. Ihr Anteil schwankte jeweils zwischen 20% und 50%. Im Großen und Ganzen hatten sowohl die orale Verabreichung von Antibiotikum als auch die Auslösung einer CIA sowie die orale Inokulation mit Bakterien keine nennenswerten Auswirkungen auf das Darmmikrobiom.





**Abbildung 26:** Die Interventionen hatten keine signifikanten Auswirkungen auf das Darmmikrobiom. Dargestellt ist die Zusammensetzung des intestinalen Mikrobioms nach Gruppen und Zeitpunkten (t1 bis t5) unterteilt. Insgesamt 13 Bakterienfamilien wurden quantitativ analysiert.

## 5. Diskussion

---

### 5.1 *Porphyromonas gingivalis* als Auslöser alveolären Knochenverlusts

---

In der Literatur werden sowohl *Pg* als auch *Aa* mit Parodontitis assoziiert [93]. In diesem Experiment konnte lediglich bei Tieren mit einer *Pg*-Inokulation ein alveolärer Knochenverlust im Sinne einer PD nachgewiesen werden, wobei keine Anzeichen einer anhaltenden Entzündung der Gingiva histologisch festzustellen waren. *Aa* führte zu keinem signifikanten Knochenverlust verglichen mit den Kontrollgruppen. Die mittels ELISA nachgewiesenen Antikörper gegen die jeweiligen Bakterien, *Pg* oder *Aa*, bestätigten indirekt die erfolgreiche orale Inokulation der Tiere im Falle beider Pathogene. Eine Studie von Alshammara et al. [94] zeigte, dass eine *Pg*-Inokulation sowohl alleine aber vor allem in Verbindung mit einer CIA zu einem gesteigerten Knochenverlust führte. In dieser hier vorliegenden Arbeit konnte ein Knochenverlust durch *Pg* gezeigt werden, welcher jedoch von einer nachfolgenden CIA unbeeinflusst blieb. Eine Erklärung für diese Differenz könnte die Zeitspanne zwischen dem Auslösen beider Erkrankungen sein. Während Alshammara et al. CIA und PD zeitgleich induzierten, lagen in der hier präsentierten Untersuchung mehrere Wochen dazwischen, die den verstärkenden Effekt beider Erkrankungen aufeinander möglicherweise reduzierten. Hervorzuheben ist, dass lediglich die Gruppe, welche sowohl die Gabe von *Pg* als auch die CIA erfuhr (*Pg*+), signifikant mehr Knochenverlust als Tiere mit der *Aa*-Inokulation aufwies. Da jedoch zwischen den beiden Gruppen mit *Pg*-Inokulation (*Pg*+ und *Pg*-) kein signifikanter Unterschied bestand, kann nicht klar gesagt werden, dass die CIA den Knochenverlust verstärkte.

Obwohl *Aa* als Auslöser der aggressiven Parodontitis gilt und zu Knochendestruktion sowie zum Verlust des Zahnhalteapparates führt [95,96], konnte in diesem Experiment kein signifikanter Knochenverlust nachgewiesen werden. Dies kann zum einen daran liegen, dass es zu keiner relevanten oralen Besiedlung von *Aa* kam, entweder weil die applizierten Bakterienmengen nicht ausreichend hoch waren oder die Eliminierung der physiologisch vorhandenen Mundflora mittels der Antibiotikagabe zu Beginn durch die folgenden drei Tage Wash-out abgeschwächt wurde, sodass für *Aa* nicht die optimalen Bedingungen zur Besiedlung des oralen Biofilms gegeben waren. Zum anderen wäre denkbar, dass ein Knochenverlust, ausgelöst durch *Aa*, möglich gewesen sein könnte, der jedoch am Ende des Experimentes nicht mehr nachzuweisen war. Diese Vermutung wird gestützt durch Ergebnisse aus einer bisher noch nicht abgeschlossenen Dissertation aus unserer Arbeitsgruppe. Hier wurde gezeigt, dass der Knochenverlust, gemessen sechs Wochen anstatt elf Wochen nach letzter Inokulation, signifikant größer war. Dies impliziert, dass sowohl *Aa* als auch *Pg* oral Mechanismen in Gang setzen, die zum Knochenabbau führen, doch dieser Verlust scheint reversibel zu sein. Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass der Alveolarknochen der Maus zumindest in einem frühen Stadium der Parodontitis über eine ausreichende Kapazität zur Remodellierung und Regeneration verfügt. In der Literatur wird

erläutert, dass eine begrenzte Wiedergewinnung von verlorenem Alveolargewebe beim Menschen nach einer antiinfektiösen Behandlung und Operation möglich ist [97,98]. Für zukünftige Studien könnte es daher sinnvoll sein, den Knochenverlust zu verschiedenen Zeitpunkten zu analysieren, um die zeitliche Dynamik darstellen zu können.

Histologisch konnten in keiner Gruppe Anzeichen für Parodontitis nachgewiesen werden. Mögliche Erklärungen dafür sind, dass die orale Inokulation mit einer einzigen Bakterienart bei Mäusen nicht ausreicht, um eine chronische Gingivitis zu induzieren, oder dass der Knochenverlust sowie die Entzündungsreaktion elf Wochen nach letzter Inokulation stark reversibel waren, sodass die Durchführung der Histologie am Endpunkt zu spät war, um durch Entzündung verursachte Veränderungen nachzuweisen. Davon ausgehend, dass ein Biofilm oder eine Art Plaque existierte, wäre es möglich, dass dieser nicht stabil genug war, um den Dekalzifikations-, Schnitt- und Färbungsprozess zu überstehen. Im Verlauf der Studie haben sich weitere Limitationen der Untersuchungen gezeigt. So konnte der Knochenverlust histologisch nicht nachgewiesen werden, da organische Knochenkomponenten aufgrund der Entkalkung nicht mit der konventionellen Histologie untersucht werden konnten und die exakte Ausrichtung der Proben, wie sie im  $\mu$ CT gegeben war, in der Histologie nicht reproduziert werden konnte. Daraus resultiert, dass der Knochenverlust auf den Schnittbildern im  $\mu$ CT beurteilbar war, mikroskopisch durch die lediglich zweidimensionale Darstellung jedoch nicht.

## **5.2 Die Induktion der Parodontitis führt zu systemischer Immunreaktion**

---

Besonders die Inokulation von *Pg* führte zu erhöhten Konzentrationen von IL-23, IL-10, IL-27 und IFN- $\beta$ , wohingegen die Kontrollgruppe keinen Anstieg verzeichnen ließ. Diese Entzündungsreaktion mit erhöhten proinflammatorischen Zytokinen belegt indirekt eine erfolgreiche Inokulation mit *Pg* sowie eine durch *Pg* ausgelöste Infektion. In diesem Fall wurden nur Mäuse ohne CIA miteinander verglichen, sodass die Immunantwort nur auf die Bakterien und nicht auf die CIA zurückzuführen war. Im Einklang damit konnten andere Studien zeigen, dass *Pg* einen Anstieg der Entzündungsmediatoren induziert, der durch die Zellwandkomponente Lipopoly-saccharid (LPS) vermittelt wird [99,100]. In der vorliegenden Arbeit konnte weiterhin gezeigt werden, dass eine Inokulation mit *Pg* zu signifikant höheren IFN- $\gamma$ -Konzentrationen führte, was für eine gesteigerte Entzündungsreaktion spricht. Im Gegensatz zu *Pg* führte *Aa* jedoch nur zu einem geringen Anstieg der Zytokine. Dem widersprechen Ergebnisse aus einer publizierten Studie, die eine deutliche Erhöhung von IL-6 und IL-15 durch *Aa* zeigt [101]. Die Gründe für die geringe systemische Immunantwort durch *Aa* könnten dieselben sein, wie bezüglich des nicht nachweisbaren Knochenverlustes nach *Aa*-Inokulation. Die Menge an applizierten Bakterien war möglicherweise zu gering, um eine Immunantwort auszulösen, die der nach *Pg*-Inokulation gleicht oder die oralen Bedingungen waren nicht geeignet, damit *Aa* als Frühkolonisierer an den Zahn adhärieren konnte.

### 5.3 Abhängigkeit der Arthritisscores und -inzidenzen vom inokulierten Bakterium

---

In dem vorliegenden Experiment konnte eine Arthritis induziert werden, die makroskopisch durch Rötung und Schwellung der Pfoten sowie Schonhaltung der Tiere und histologisch durch zelluläre Infiltrate sowie Knorpel- und Knochenerosionen gekennzeichnet war. Hinsichtlich des Arthritisscores gab es keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen. Der Trend lässt allerdings vermuten, dass die Inokulation mit *Pg* zu einem geringeren Score führte. Es waren auch nur 33% der Mäuse aus der Gruppe mit *Pg*-Inokulation (*Pg*+) von Arthritis betroffen. Hingegen erreichten die mit *Aa* inokulierten Mäuse (*Aa*+) eine Inzidenz zum Endzeitpunkt von 75%. Davon ausgehend, dass PD eine wesentliche Rolle im Krankheitsbild der RA spielt, ist es durchaus denkbar, dass PD-auslösende Bakterien die Pathogenese der RA im menschlichen Organismus in unterschiedlichen Phasen beeinflussen. Dies lässt sich damit begründen, dass *Pg* und *Aa* auf eine andere Weise die Antikörperbildung bedingen, welche möglicherweise zu RA führt [102]. Die gezeigten Ergebnisse lassen vermuten, dass die Inokulation mit *Aa* die Entstehung einer CIA beschleunigen könnte, wohingegen eine Inokulation mit *Pg* die Entstehung einer CIA erst in späteren Phasen zu beeinflussen vermag. Bei weiterführenden Studien ist es daher sinnvoll, den Versuch noch länger als 105 Tage durchzuführen, um zu beobachten, ob sich die hier angedeuteten Trends bestätigen lassen und ob sich zu späteren Zeitpunkten Änderungen hinsichtlich der CIA-Inzidenz zeigen. Außerdem könnte die Zeitspanne zwischen den Induktionen beider Erkrankungen verkürzt werden, um deren Auswirkungen aufeinander noch besser beurteilen zu können, da es wie zuvor erwähnt durchaus plausibel erscheint, dass der durch Bakterien induzierte Knochenverlust reversibel ist.

Dem Trend der geringen Inzidenz in der *Pg*+-Gruppe widersprechen allerdings Ergebnisse aus publizierten Studien, die gezeigt haben, dass eine CIA durch die Inokulation von *Pg* exazerbiert [103,104]. Die Unterschiede bezüglich dieser Beobachtungen könnten zum einen auf einer anderen Art der Bakterienverabreichung beruhen, welche zum Teil intraperitoneal durchgeführt wurde. Zum anderen wurden nicht die gleichen Mausstämme untersucht. Diesbezüglich wäre es möglich, dass der genetische Hintergrund der Tiere einen bisher unbekanntem Einfluss auf die Pathogenese der RA und PD hat. Eine weitere Erklärung für die nicht-signifikanten Unterschiede in Inzidenz und Arthritisscore zwischen den Gruppen im vorliegenden Experiment könnte folgende sein: PD und RA können durchaus auch unabhängig voneinander auftreten, sodass eine CIA eventuell unbeeinflusst von inokulierten Bakterien bliebe. Letztendlich kann nicht definitiv gesagt werden, dass Inokulationen mit verschiedenen PD-assoziierten Bakterien den Verlauf einer nachfolgenden CIA unterschiedlich beeinflussen.

#### 5.4 Abhängigkeit des Körpergewichts von Bakterieninokulation und CIA

---

Die Körpergewichte der einzelnen Gruppen zeigten keine signifikanten Unterschiede. Dennoch lassen diese vermuten, dass immunisierte Mäuse weniger an Gewicht zunehmen als Mäuse ohne CIA. Alabarse et al. [105] beobachteten ähnliches: Mäuse mit CIA tendierten zu einer geringeren Gewichtszunahme im Vergleich zur Kontrollgruppe, aber auch hier nicht signifikant.

In dem vorliegenden Experiment erfuhren die Mäuse zwischen dem 14. und 28. Versuchstag insgesamt acht Narkosen, um die oralen Inokulationen durchzuführen. Nach der maximal einstündigen Anästhesie waren die Tiere noch deutlich geschwächt und unsicher in ihren Bewegungen. Dies wirkte sich reduzierend auf ihre Nahrungsaufnahme aus, weshalb im Gewichtsverlauf während dieses Zeitraumes eine Abnahme des Körpergewichts erkennbar war.

Wie der zeitliche Gewichtsverlauf zeigt, tendierten Mäuse mit einer *Pg*-Inokulation zu einer höheren Gewichtszunahme als die Kontrollgruppe oder jene mit *Aa*-Inokulation. Andere Studien zeigen einen kausalen Zusammenhang zwischen parodontalen Infektionen und Übergewicht beim Menschen [106,107]. Dennoch wird dies meist nur unidirektional diskutiert, die Patienten leiden erst an Übergewicht, was die Entstehung von parodontalen Erkrankungen beschleunigt. Das bedeutet, dass entweder die Ernährung oder erhöhte Zytokine im Zusammenhang mit Adipositas einen Einfluss auf die Entstehung der PD haben [108]. Die Art der Ernährung in dem hier vorgestellten Experiment hatte jedoch keine Relevanz, da die Mäuse stets dasselbe Futter erhielten. Abschließend kann nicht sicher gesagt werden, dass eine CIA zu einer verringerten Gewichtszunahme führt. Dafür bedarf es weiterer Untersuchungen mit gegebenenfalls stärkeren Gruppengrößen, um den genauen Effekt einer rheumatischen Erkrankung auf das Gewicht zu evaluieren.

#### 5.5 CIA führt zu einer Erhöhung von systemischen Zytokinen

---

Zytokine beeinflussen die Pathogenese und den Krankheitsverlauf sowohl von der RA als auch von der PD in erheblichem Maß [30,65,66]. Die hierarchische Clusteranalyse in diesem Experiment ergab, dass Tiere mit CIA entsprechend ihrer Entzündungsreaktion zusammenclusterten, unabhängig davon, welche orale Intervention sie erfuhren. Vor allem IL-10, IL-27 und IFN- $\beta$  wurden in hohen Konzentrationen im Serum zum Endpunkt detektiert. Auch IL-23, IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-17A und GM-CSF wiesen hohe Level auf. In der Vergangenheit wurde über erhöhte proinflammatorische Zytokinlevel bei Patienten mit RA und dessen Schlüsselrolle in der Entwicklung von chronischen Krankheiten berichtet [30]. Insbesondere IL-1, IL-6 und TNF $\alpha$  werden in Assoziation mit Knochenerosion, Gelenkzerstörung und erhöhter Krankheitsaktivität der RA gebracht [30,31]. Es sind vor allem diese Zytokine, die Gegenstand aktueller Forschung bezüglich neuer Therapiewege der RA sind [109].

In diesem Experiment war IL-23 sowohl durch die CIA als auch durch *Pg* in erhöhten Konzentrationen zu finden. Eine andere Studie zeigte, dass auch Seren und Synovialflüssigkeiten von Patienten mit RA höhere IL-23-Spiegel verglichen mit gesunden Personen aufwiesen [110]. Im Menschen wirkt IL-23 nicht nur fördernd auf die Osteoklastogenese sondern induziert auch die Expression von proinflammatorischen Zytokinen wie IFN- $\gamma$  und IL-17 durch T-Zellen [111].

Die Ergebnisse aus der vorliegenden Arbeit zeigen, dass auch die antiinflammatorischen Zytokine IL-10 und IL-27 durch eine CIA und *Pg*-Inokulation erhöht waren. Andere Publikationen weisen darauf hin, dass IL-27 fähig ist, eine IL-23-induzierte Arthritis auf verschiedenste Weise zu supprimieren und dass NK-Zellen IL-10 erst nach längerem Kontakt mit aktivierenden Zytokinen sezernieren [112,113]. Wahrscheinlich werden diese immunsuppressiven Metabolite zum Schutz des Organismus gebildet, um eine überschießende Entzündungsreaktion zu regulieren und um schwerwiegende Folgen oder sogar einen letalen Ausgang zu verhindern, beziehungsweise zu verzögern.

Die zu Beginn aufgestellte Hypothese, dass die bakterielle Belastung der Mäuse während der oralen Inokulationsphase möglicherweise zu einer messbaren Immunantwort führt, die durch eine folgende Arthritis überlagert werden könnte, kann bestätigt werden. Zum Endzeitpunkt sind die Entzündungswerte durch die CIA hoch, unabhängig von der oralen Intervention. Es scheint, als hätte sich die Entzündung, induziert durch die Bakterien, im Laufe des Versuches in Remission befunden, während eine Immunreaktion durch die CIA wieder ausbrach, sodass zum Endzeitpunkt die Zytokinlevel hoch waren, was ohne CIA nicht der Fall war.

## **5.6 Inokulierte Bakterien und CIA verändern die Zusammensetzung des synovialen Proteoms**

---

Eine Synovitis ist bei vielen RA-Patienten nachzuweisen [114]. Ein grundlegender Teil der Immunantwort und Entzündungsreaktion der RA findet in der Synovia beziehungsweise in der Synovialflüssigkeit statt, unter anderem weil Synoviozyten Zytokine produzieren [3]. Studien haben gezeigt, dass Patienten mit Arthritis Veränderungen in der Zusammensetzung der Synovialflüssigkeit im Vergleich zu gesunden Personen aufweisen. Zum einen sind Zytokine in erhöhten Konzentrationen nachweisbar, zum anderen steigt Calprotectin an, welches mit Apoptose und der Produktion von proinflammatorischen Mediatoren in Verbindung gebracht wird [32,115,116]. Die vorliegende Arbeit zeigt, dass der Einfluss von Bakterien und einer Arthritis zu Veränderungen im synovialen Proteom führte. Wie vermutet, wurden Proteine, die für eine verschlechterte Immunhomöostase relevant sind, aufgrund von PD und CIA in der Synovia unterschiedlich exprimiert. Auch die Expression von Proteinen wie PSMD2 als Teil des Ubiquitin-Proteasomwegs wurde verändert. Obwohl *Pg* und *Aa* oral inokuliert wurden und dies weder zu einer Exazerbation der makroskopischen Arthritis führte noch histologisch nachweisbare Änderungen im Unterkiefer hervorrief, bewirkte es eine unterschiedliche Zusammensetzung der Synovia. Die Inokulation mit

*Aa* führte zu einer Hochregulierung der Immunglobuline IgG1 und IgG2b sowie der leichten Ketten  $\kappa$ , was eine verstärkte humorale Immunantwort vermuten lässt. *Pg* hingegen induzierte eine vermehrte Expression von HA2 in der Synovia. Diese Hochregulation von MHC-Klasse-II-Proteinen deutet auf eine erhöhte Aktivität von Antigen-präsentierenden Zellen und T-Lymphozyten im Sinne einer verstärkten zellulären Immunantwort hin. Eine mögliche Erklärung für die Unterschiede im Proteom der Synovia ist, dass die Bakterien zu einer individuellen systemischen Immunantwort führten, abhängig vom Bakterium, die zusammen mit der Entzündungsreaktion aufgrund der Arthritis die Expression von Proteinen beeinflusste. Obwohl direkt in der Synovia keine Bakterien nachgewiesen werden konnten, berichten Studien über bakterielle Translokation im Zusammenhang mit RA und Synovitis. Es scheint, als können Bakterien über den Blutkreislauf, das lymphatische System oder mit Hilfe von dendritischen Zellen, die als Vehikel fungieren, in die Gelenke gelangen [117,118]. Es kann dann davon ausgegangen werden, dass die Erreger direkt das synoviale Proteom verändern und Gelenkschäden verursachen, obwohl sie ursprünglich oral verabreicht wurden.

Insgesamt weisen diese Daten auf Unterschiede auf molekularer Ebene hin, die einen Einfluss auf das Ansprechen einer RA-Therapie im menschlichen Organismus haben könnten. So könnten Patienten, deren Pathogenese durch eine erhöhte Antigenpräsentation gekennzeichnet ist, vermehrt auf TNF- $\alpha$ -Antagonisten (Infliximab, Adalimumab) ansprechen, während eine verstärkte humorale Antwort durch eine B-Zell-Depletion mit Rituximab limitiert werden könnte. Es ist weitere Forschung von Nöten, um den Einfluss von oralen Pathogenen auf die Entstehung von rheumatischen Erkrankungen und deren Auswirkungen auf das Ansprechen von Therapien zu untersuchen.

## **5.7 Das Darmmikrobiom bleibt von einer CIA und inokulierten Bakterien unbeeinflusst**

---

Es ist bekannt, dass ein Zusammenhang zwischen RA und einer Dysbiose im Darm existiert, wobei insbesondere gramnegative Bakterien das Fortschreiten der RA zu begünstigen scheinen [119,120]. In dieser Arbeit konnten keine Unterschiede in der Diversität des intestinalen Mikrobioms zwischen Mäusen mit oder ohne CIA festgestellt werden. Eine Studie berichtet über eine geringere Alpha-Diversität im Mikrobiom von RA-Patienten verglichen mit gesunden Personen [119]. Diese Differenzen zwischen den Ergebnissen könnten durch die verschiedenen Arten von Arthritis erklärt werden. In der vorliegenden Arbeit wurde das Modell der CIA bei Mäusen als eine akute, monophasische Entzündung mit begrenzter Progression verwendet. Im Gegensatz dazu ist die RA beim Menschen eine mehrphasige und chronische Krankheit.

Da es nicht realisierbar war, eine orale Dysbiose der Mäuse nach Bakterienexposition zu untersuchen, wurde anstelle dessen das Darmmikrobiom analysiert. Nach der Inokulation war *Aa* nicht im Darmmikrobiom vorhanden und veränderte die Zusammensetzung der intestinalen Flora

somit nicht. Einerseits könnte die Magensäure die Ansiedlung von *Aa* im Darm verhindert haben. Andererseits war möglicherweise keine Nische vorhanden, in der *Aa* überleben konnte. Ein weiterer Grund wäre, dass durch das zuvor verabreichte Antibiotikum ein Milieu im Darm entstand, welches die Ansiedlung von *Aa* ungünstig beeinflusste. *Pg* veränderte die Zusammensetzung des Darmmikrobioms unwesentlich. Porphyromonadaceae, zu denen *Pg* gehört, sind bereits im naiven Darmmikrobiom von Mäusen vorhanden.

Die zehntägige orale Antibiotikatherapie mit Cotrimoxazol bewirkte keine Verschiebungen in der Alpha-Diversität des Mikrobioms im Darm. Ob diese Behandlung zu Veränderungen der absoluten Bakterienmengen führte, ist nicht beurteilbar, da diese nicht gemessen worden sind. Eine Studie an Ratten belegt, dass Cotrimoxazol zu einer Zunahme der Dicke der Schleim-Gel-Schicht des Epithels und somit zu einer verringerten transepithelialen Leitfähigkeit führt. Dies bewirkt eine Veränderung der aktiven Sekretion von später verabreichten Medikamenten [121]. Zwar sind diese Aussagen nur begrenzt mit denen aus der vorliegenden Arbeit vergleichbar, da der Darm an sich untersucht wurde und nicht das Mikrobiom. Dennoch weisen die Ergebnisse darauf hin, dass die Gabe von Cotrimoxazol Auswirkungen auf den Darm hat, die in der vorliegenden Arbeit nicht gezeigt werden konnten.

Ergebnisse aus einer noch unveröffentlichten Publikation aus unserer Arbeitsgruppe zeigen, dass Mäuse, welche einen oralen Mix aus Kenamycin, Metronidazol, Gentamicin, Colistin und Vancomycin sowie eine einmalige intraperitoneale Gabe von Clindamycin erhielten, Veränderungen im Mikrobiom aufgrund der Antibiotika zeigten. Unter anderem wurde der Anteil von Porphyromonadaceae reduziert. Der Unterschied zu der hier vorliegenden Arbeit liegt insbesondere in der Verabreichungsform, Art und Menge der Antibiotika, welche wahrscheinlich zu den verschiedenen Ergebnissen der Mikrobiomanalyse führten. Der Einfluss der inokulierten Bakterien scheint eher auf die Mundhöhle und weniger auf das Darmmikrobiom begrenzt zu sein, was allerdings nicht belegt werden konnte, da das orale Mikrobiom nicht untersucht wurde. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die CIA sowie die Inokulation mit Bakterien keine relevanten Auswirkungen auf die intestinale Flora zeigten.



## 5.8 Fazit und Ausblick

---

Diese Dissertation beschäftigte sich mit der Frage, ob und inwieweit sich PD und RA gegenseitig beeinflussen. Einerseits wurde der alveoläre Knochenverlust im Sinne einer PD, welcher nur durch *Pg* ausgelöst werden konnte, von einer nachfolgenden CIA nicht wesentlich beeinflusst. Andererseits schien eine bereits ausgelöste PD erregerspezifische Auswirkungen auf die CIA zu haben. Die Daten deuten darauf hin, dass *Pg* die Arthritisinzidenz abschwächte, wohingegen *Aa* vergleichbar mit der Kontrollgruppe war. Dies konnte jedoch nicht eindeutig bestätigt werden und es bedarf weiterer Untersuchungen, um die Einflüsse der oralen Pathogene auf eine nachfolgende CIA aufzudecken. Weiterhin ist zu erwähnen, dass die PD im Mausmodell vorübergehend zu sein scheint, wohingegen die PD beim Menschen besonders im nicht therapierten Zustand persistierend ist. Deswegen ist es schwer zu beurteilen, wie eine beständige PD eine später auftretende Arthritis beeinflussen würde. An dieser Stelle werden die Limitierungen dieser Arbeit deutlich. Es wurde nur zu einem Zeitpunkt der Alveolarknochen histologisch und radiologisch untersucht. Eine mehrzeitige Untersuchung wäre eine zukünftige Option, um den Verlauf der PD inklusive Höhepunkt der Krankheitsaktivität neben den stattgefundenen Zytokinmessungen deutlicher darstellen zu können. Da es nicht realisierbar war, das orale Mikrobiom im Mausmodell zu untersuchen, wurde anstelle das intestinale genutzt, was eine weitere Limitierung dieser Studie ist. Sowohl die CIA als auch die inokulierten Bakterien hatten keine wesentlichen Auswirkungen auf das Darmmikrobiom. In der histologischen Auswertung waren jedoch deutlich arthritistypische Entzündungszeichen sowie Knorpel- und Knochenschäden sichtbar.

Zusammenfassend wurden in dieser *in vivo* Studie die Einflüsse und Folgen der PD und RA aufeinander untersucht. Trotz der geringen Auswirkungen auf makroskopischer Ebene, führten beide Erkrankungen zu systemischen Immunantworten und lösten Veränderungen im synovialen Proteom aus. Dies stellt das wohl bedeutendste Ergebnis dieser Arbeit dar. Obgleich es keine expliziten Erklärungen für die Wirkungsweise der oralen PD-assoziierten Pathogene in der Synovia gibt, ist es durchaus denkbar, dass diese die Pathogenese einer RA und deren Therapieverlauf beeinflussen.

Durch die entstandenen Ergebnisse werden neue Forschungsfragen aufgeworfen, die es zukünftig zu beantworten bedarf. Es wäre sinnvoll, die Unterkiefer zu unterschiedlichen Zeitpunkten zu untersuchen, um genauere Aussagen über den Krankheitsverlauf der PD hinsichtlich Manifestationsstadium, Remissionen oder Rezidiven machen zu können. Weiterhin stellt sich die Frage, wie eine orale Therapie der PD zum Beispiel mit Metronidazol oder Chlorhexidin das Proteom der Synovia beeinflusst und welche Folgen dies auf die Therapiestrategien der RA hat.

**Literaturverzeichnis**

---

1. Cross M, Smith E, Hoy D, Carmona L, Wolfe F, Vos T, et al. The global burden of rheumatoid arthritis: estimates from the global burden of disease 2010 study. *Annals of the Rheumatic Diseases*. 2014;73(7):1316–1322. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2013-204627>.
2. Pedersen JK, Svendsen AJ, Hørslev-Petersen K. Incidence of rheumatoid arthritis in the southern part of Denmark from 1995 to 2001. *The Open Rheumatology Journal*. 2007;1:18-23. <https://doi.org/10.2174/1874312900701010018>.
3. Scott DL, Wolfe F, Huizinga TWJ. Rheumatoid arthritis. *Lancet*. 2017;376(9746):53–79. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-59963-2\\_3](https://doi.org/10.1007/978-3-319-59963-2_3).
4. Chancay MG, Guendeschadze SN, Blanco I. Types of pain and their psychosocial impact in women with rheumatoid arthritis. *Women's Midlife Health*. 2019;5(3). <https://doi.org/10.1186/s40695-019-0047-4>.
5. Pelechas E, Voulgari PV, Drosos AA. Clinical evaluation of the safety, efficacy and tolerability of sarilumab in the treatment of moderate to severe rheumatoid arthritis. *Therapeutics and Clinical Risk Management*. 2019;15:1073-1079. <https://doi.org/10.2147/TCRM.S167452>.
6. Mudano AS, Tugwell P, Wells GA, Singh JA. Tai Chi for rheumatoid arthritis. *Cochrane Library*. 2019;9:CD004849. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD004849.pub2>.
7. Tilvawala R, Nguyen SH, Maurais AJ, Nemmara VV, Nagar M, Salinger AJ, et al. The rheumatoid arthritis-associated citrullinome. *Cell Chemical Biology*. 2018;25(6):691–704. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2018.03.002>.
8. Strand V, Khanna D. The impact of rheumatoid arthritis and treatment on patients ' lives. *Clinical and Experimental Rheumatology*. 2010;28(59):32-40.
9. Soubrier M, Chamoux NB, Tatar Z, Couderc M, Dubost JJ, Mathieu S. Cardiovascular risk in rheumatoid arthritis. *Joint Bone Spine*. 2014;81(4):298–302. <https://doi.org/10.1016/j.jbspin.2014.01.009>.
10. Kim EJ, Elicker BM, Maldonado F, Webb WR, Ryu JH, Van Uden JH, et al. Usual interstitial pneumonia in rheumatoid arthritis-associated interstitial lung disease. *European Respiratory Journal*. 2009;35(6):1322–1328. <https://doi.org/10.1183/09031936.00092309>.
11. Hurd ER. Extraarticular manifestations of rheumatoid arthritis. *Seminars in Arthritis and Rheumatism*. 1979;8(3).
12. Steffen A, Holstiege J, Goffrier B, Bätzing J. Epidemiologie der rheumatoiden Arthritis in Deutschland – eine Analyse anhand bundesweiter vertragsärztlicher Abrechnungsdaten. *Research Gate*. 2017; <https://doi.org/10.20364/VA-17.08>.
13. Terao C, Brynedal B, Chen Z, Jiang X, Westerlind H, Hansson M. Distinct HLA associations with rheumatoid arthritis subsets defined by serological subphenotype. *The American Journal of Human Genetics*. 2019;105(3):616–624. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2019.08.002>.
14. Pianta A, Arvikar SL, Strle K, Drouin EE, Wang Q, Costello CE, et al. Two rheumatoid arthritis-specific autoantigens correlate microbial immunity with autoimmune responses in joints. *The Journal of Clinical Investigation*. 2017;127(8):2946–2956. <https://doi.org/10.1172/JCI93450>.

15. Boman A, Brink M, Lundquist A, Hansson M, Mathsson-Alm L, Rönnelid J. Antibodies against citrullinated peptides are associated with clinical and radiological outcomes in patients with early rheumatoid arthritis: a prospective longitudinal inception cohort study. *Rheumatic & Musculoskeletal Diseases*. 2019;5(2):000946. <https://doi.org/10.1136/rmdopen-2019-000946>.
16. Anaparti V, Meng X, Hemshekhar M, Smolik I, Mookherjee N, El-gabalawy H. Circulating levels of free 25(OH)D increase at the onset of rheumatoid arthritis. *PLoS One*. 2019;14(9):0219109. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0219109>.
17. Trier NH, Holm BE, Hansen PR, Slot O, Locht H, Houen G. Specificity of anti-citrullinated protein antibodies in rheumatoid arthritis. *Antibodies*. 2019;8(2):37. <https://doi.org/10.3390/antib8020037>.
18. van der Helm-van Mil AHM, Verpoort KN, Breedveld FC, Toes REM, Huizinga TWJ. Antibodies to citrullinated proteins and differences in clinical progression of rheumatoid arthritis. *Arthritis Research & Therapy*. 2005;7(5):R949-R958. <https://doi.org/10.1186/ar1767>.
19. Nielen MMJ, van Schaardenburg D, Reesink HW, Van De Stadt RJ, van der Horst-Bruinsma IE, De Koning MHMT. Specific autoantibodies precede the symptoms of rheumatoid arthritis: a study of serial measurements in blood donors. *Arthritis and Rheumatism*. 2004;50(2):380–386. <https://doi.org/10.1002/art.20018>.
20. Carlens C, Hergens MP, Grunewald J, Ekblom A, Eklund A, Höglund CO, et al. Smoking, use of moist snuff, and risk of chronic inflammatory diseases. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 2010;181(11):1217–1222. <https://doi.org/10.1164/rccm.200909-1338OC>.
21. Källberg H, Padyukov L, Plenge RM, Rönnelid J, Gregersen PK, van der Helm-van Mil AHM, et al. Gene-gene and gene-environment interactions involving HLA-DRB1, PTPN22, and smoking in two subsets of rheumatoid arthritis. *The American Journal of Human Genetics*. 2007;80(5):867–875. <https://doi.org/10.1086/516736>.
22. Mandl LA, Costenbader KH, Simard J, Karlson EW. Is birthweight associated with risk of rheumatoid arthritis? Data from a large prospective cohort study. *Annals of the Rheumatic Diseases*. 2009;68(4):514–518. <https://doi.org/10.1136/ard.2007.080937>.
23. Scher J U, Bretz WA, Abramson SB. Periodontal disease and subgingival microbiota as contributors for rheumatoid arthritis pathogenesis: Modifiable risk factors? *Current Opinion in Rheumatology*. 2014; 26(4):424–429. <https://doi.org/10.1097/BOR.0000000000000076>.
24. Merlino LA, Curtis J, Mikuls TR, Cerhan JR, Criswell LA, Saag KG. Vitamin D intake is inversely associated with rheumatoid arthritis: results from the Iowa women's health study. *Arthritis and Rheumatism*. 2004;50(1):72–77. <https://doi.org/10.1002/art.11434>.
25. Kjeldsen-Kragh J, Haugen M, Borchgrevink CF, Laerum E, Eek M, Mowinkel P, Hovi K, Førre Ø. Controlled trial of fasting and one-year vegetarian diet in rheumatoid arthritis. *The Lancet*. 1991;338(8772):899–902. [https://doi.org/10.1016/0140-6736\(91\)91770-u](https://doi.org/10.1016/0140-6736(91)91770-u).
26. Alwarith J, Kahleova H, Rembert E, Yonas W, Dort S, Calcagno M, et al. Nutrition interventions in rheumatoid arthritis: the potential use of plant-based diets. *Frontiers in Nutrition*. 2019;6:141. <https://doi.org/10.3389/fnut.2019.00141>.
27. Tolboom TCA, van der Helm-van Mil AHM, Nelissen RGHH, Breedveld FC, Toes REM, Huizinga TWJ. Invasiveness of fibroblast-like synoviocytes is an individual patient characteristic associated with the rate of joint destruction in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis and Rheumatism*. 2005;52(7):1999–2002. <https://doi.org/10.1002/art.21118>.

28. Lefèvre S, Knedla A, Tennie C, Kampmann A, Wunrau C, Dinser R, et al. Synovial fibroblasts spread rheumatoid arthritis to unaffected joints. *Nature Medicine*. 2009;15(12):1414–1420. <https://doi.org/10.1038/nm.2050>.
29. Cohen SB, Dore RK, Lane NE, Ory PA, Peterfy CG, Sharp JT, et al. Denosumab treatment effects on structural damage, bone mineral density, and bone turnover in rheumatoid arthritis: A twelve-month, multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled, phase II clinical trial. *Arthritis and Rheumatism*. 2008;58(5):1299–1309. <https://doi.org/10.1002/art.23417>.
30. Noack M, Miossec P. Selected cytokine pathways in rheumatoid arthritis. *Seminars in Immunopathology*. 2017;39(4):365–383. <https://doi.org/10.1007/s00281-017-0619-z>.
31. Osta B, Benedetti G, Miossec P. Classical and paradoxical effects of TNF- $\alpha$  on bone homeostasis. *Frontiers in Immunology*. 2014;5(48):1–9. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00048>.
32. Madhok R, Crilly A, Watson J, Capell HA. Serum interleukin 6 levels in rheumatoid arthritis: correlations with clinical and laboratory indices of disease activity. *Annals of the Rheumatic Diseases*. 1993;52(3):232–234. <https://doi.org/10.1136/ard.52.3.232>.
33. Krüger K, Wollenhaupt J, Albrecht K, Alten R, Backhaus M, Baerwald C, et al. S1-Leitlinie der DGRh zur sequenziellen medikamentösen Therapie der rheumatoiden Arthritis. *Zeitschrift für Rheumatologie*. 2012;71:592-603.
34. Vermeer M, Kuper HH, Hoekstra M, Haagsma CJ, Posthumus MD, Brus HLM, et al. Implementation of a treat-to-target strategy in very early rheumatoid arthritis: Results of the Dutch rheumatoid arthritis monitoring remission induction cohort study. *Arthritis and Rheumatism*. 2011;63(10):2865–2872. <https://doi.org/10.1002/art.30494>.
35. van der Linden MPM, le Cessie S, Raza K, van der Woude D, Knevel R, Huizinga TWJ, et al. Long-term impact of delay in assessment of patients with early arthritis. *Arthritis and Rheumatism*. 2010;62(12):3537–3546. <https://doi.org/10.1002/art.27692>.
36. Bodkhe R, Balakrishnan B, Taneja V. The role of microbiome in rheumatoid arthritis treatment. *Therapeutic Advances in Musculoskeletal Disease*. 2019;11:1-16. <https://doi.org/10.1177/1759720X19844632>.
37. Gaujoux-Viala C, Smolen JS, Landewé R, Dougados M, Kvien TK, Mola EM, et al. Current evidence for the management of rheumatoid arthritis with synthetic disease-modifying antirheumatic drugs: A systematic literature review informing the EULAR recommendations for the management of rheumatoid arthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases*. 2010;69(6):1004–1009. <https://doi.org/10.1136/ard.2009.127225>.
38. Schneider M, Lelgemann M, Abholz HH, Blumenroth M, Flügge C, Gerken M, et al. *Management der frühen rheumatoiden Arthritis*. 3. Auflage. Berlin: Springer Verlag, 2011.
39. Hetland ML, Christensen IJ, Tarp U, Dreyer L, Hansen A, Hansen IT, et al. Direct comparison of treatment responses, remission rates, and drug adherence in patients with rheumatoid arthritis treated with adalimumab, etanercept, or infliximab: Results from eight years of surveillance of clinical practice in the nationwide Danish DANBIO registry. *Arthritis and Rheumatism*. 2010;62(1):22–32. <https://doi.org/10.1002/art.27227>.
40. Kassebaum NJ, Bernabé E, Dahiya M, Bhandari B, Murray CJL, Marcenes W. Global burden of severe periodontitis in 1990-2010: A systematic review and meta-regression. *Journal of Dental Research*. 2014;93(11):1045–1053. <https://doi.org/10.1177/0022034514552491>.

41. Potempa J, Mydel P, Koziel J. The case for periodontitis in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Nature Reviews Rheumatology*.2017;13(10):606-620. <https://doi.org/10.1038/nrrheum.2017.132>.
42. Palioto DB, Finoti LS, Kinane DF, Benakanakere M. Epigenetic and inflammatory events in experimental periodontitis following systemic microbial challenge. *Journal of Clinical Periodontology*. 2019;46(8):819-829. <https://doi.org/10.1111/jcpe.13151>.
43. Suvan JE, Finer N, D’Aiuto F. Periodontal complications with obesity. *Periodontology 2000*. 2018;78(1):98–128. <https://doi.org/10.1111/prd.12239>.
44. Swain GP, Patel S, Gandhi J, Shah P. Development of Moxifloxacin Hydrochloride loaded in-situ gel for the treatment of periodontitis: In-vitro drug release study and antibacterial activity. *Journal of Oral Biology and Craniofacial Research*.2019;9(3):190–200. <https://doi.org/10.1016/j.jobcr.2019.04.001>.
45. Aruni AW, Dou Y, Mishra A, Fletcher HM. The biofilm community: rebels with a cause. *Current Oral Health Reports*. 2015;2(1):48–56. <https://doi.org/10.1007/s40496-014-0044-5>.
46. Fine DH, Patil AG, Velusamy SK. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa) under the radar: myths and misunderstandings of Aa and its role in aggressive periodontitis. *Frontiers in Immunology*. 2019;10:728. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00728>.
47. Fine DH, Markowitz K, Furgang D, Velliyagounder K. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* as an early colonizer of oral tissues: Epithelium as a reservoir? *Journal of Clinical Microbiology*.2010.48(12):4464–4473. <https://doi.org/10.1128/JCM.00964-10>.
48. Haffajee AD, Socransky SS, Patel MR, Song X. Microbial complexes in supragingival plaque. *Oral Microbiology and Immunology*. 2008;23(3):196–205. <https://doi.org/10.1111/j.1399-302X.2007.00411.x>.
49. Souto R, Silva-Boghossian CM, Colombo APV. Prevalence of *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* spp. in subgingival biofilm and saliva of subjects with chronic periodontal infection. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2014;45(2):495–501. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822014000200017>.
50. Kolenbrander PE, Andersen RN, Blehert DS, Eglund PG, Foster JS, Palmer Jr RP. Communication among oral bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 2002;66(3):1–20. <https://doi.org/10.1128/MMBR.66.3.486>.
51. Saito A, Inagaki S, Ishihara K. Differential ability of periodontopathic bacteria to modulate invasion of human gingival epithelial cells by *Porphyromonas gingivalis*. *Microbial Pathogenesis*. 2009;47(6):329–333. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2009.09.012>.
52. Bartold PM. Lifestyle and periodontitis: The emergence of personalized periodontics. *Periodontology 2000*.2018;78(1):7–11. <https://doi.org/10.1111/prd.12237>.
53. Loutan L, Alpizar-Rodriguez D, Courvoisier DS, Finckh A, Mombelli A, Giannopoulou C. Periodontal status correlates with anti-citrullinated protein antibodies (ACPA s) in first degree relatives of individuals with rheumatoid arthritis. *Journal of Clinical Periodontology*. 2019;46(7):690-698. <https://doi.org/10.1111/jcpe.13117>.
54. Smiley CJ, Tracy SL, Abt E, Michalowicz BS, John MT, Gunsolley J et al. Systematic review and meta-analysis on the nonsurgical treatment of chronic periodontitis by means of scaling and root planing with or without adjuncts. *Journal of the American Dental Association*. 2015;146(7):508-524. <https://doi.org/10.1016/j.adaj.2015.01.028>.

55. Lübcke PM, Ebbers MNB, Volzke J, Bull J, Kneitz S, Engelmann R, et al. Periodontal treatment prevents arthritis in mice and methotrexate ameliorates periodontal bone loss. *Scientific Reports*. 2019;9(1):8128. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-44512-9>.
56. Cao R, Li Q, Chen Y, Yao M, Wu Q, Zhou, H. Efficacy of locally-delivered statins adjunct to non-surgical periodontal therapy for chronic periodontitis: a Bayesian network analysis. *BMC Oral Health*.2019;19(1):105 1–10. <https://doi.org/10.1186/s12903-019-0789-2>.
57. Kocher T, Schwahn C, Gesch D, Bernhardt O, John U, Meisel P, Baelum V. Risk determinants of periodontal disease - An analysis of the study of health in Pomerania (SHIP 0). *Journal of Clinical Periodontology*. 2005;32(1):59–67. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051X.2004.00629.x>.
58. Tomar SL., Asma S. Smoking-attributable periodontitis in the United States: findings from NHANES III. *Journal of Periodontology*. 2005;71(5):743–751. <https://doi.org/10.1902/jop.2000.71.5.743>.
59. Teixeira SRL, Mattarazo F, Feres M, Figueiredo LC, de Faveri M, Simionato MRL, Mayer MPA. Quantification of Porphyromonas gingivalis and fimA genotypes in smoker chronic periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology*. 2009;36(6):482–487. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051X.2009.01411.x>.
60. Falagas ME, Kompoti M. Obesity and infection. *The Lancet Infectious Diseases*. 2006;6(7):438-446. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(06\)70523-0](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(06)70523-0).
61. Al-Zahrani MS, Bissada NF, Borawski EA. Obesity and periodontal disease in young, middle-aged, and older adults. *Journal of Periodontology*. 2005;74(5):610–615. <https://doi.org/10.1902/jop.2003.74.5.610>.
62. Kim OS, Shin MH, Kweon SS, Lee YH, Kim OJ, Kim, YJ, et al. The severity of periodontitis and metabolic syndrome in Korean population: The Dong-gu study. *Journal of Periodontal Research*. 2018;53(3):362-368. <https://doi.org/10.1111/jre.12521>.
63. Kim J, Kim SY, Byon MJ, Lee JH, Jeong SH, Kim JB. Association between periodontitis and metabolic syndrome in a Korean nationally representative sample of adults aged 35 – 79 years. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 2019;16(16):2930. <https://doi.org/10.3390/ijerph16162930>.
64. Ilievski V, Zuchowska PK, Green SJ, Toth PT, Ragozzino ME, Le K, et al. Chronic oral application of a periodontal pathogen results in brain inflammation, neurodegeneration and amyloid beta production in wild type mice. *PLoS One*. 2018;13(10):e0204941. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0204941>.
65. Kobayashi T, Yoshie H. Host responses in the link between periodontitis and rheumatoid arthritis. *Current Oral Health Reports*. 2015;2(1):1–8. <https://doi.org/10.1007/s40496-014-0039-2>.
66. Dissick A, Redman RS, Jones M, Rangan BV, Reimold A, Griffiths GR, et al. Association of periodontitis with rheumatoid arthritis: a pilot study. *Journal of Periodontology*. 2010;81(2):223–230. <https://doi.org/10.1902/jop.2009.090309>.
67. Rhodes B, Furnrohr BG, Vyse TJ. C-reactive protein in rheumatology: biology and genetics. *Nature Reviews Rheumatology*. 2011;7(5):282-289. <https://doi.org/10.1038/nrrheum.2011.37>.
68. Horta-Baas G, Romero-Figueroa MS, Montiel-Jarquín AJ, Pizano-Zárate ML, García-Mena J, Ramírez-Durán N. Intestinal dysbiosis and rheumatoid arthritis: a link between gut microbiota and the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Journal of Immunology Research*. 2017;2017:4835189. <https://doi.org/10.1155/2017/4835189>.

69. Gómez-Bañuelos E, Mukherjee A, Darrach E, Andrade F. Rheumatoid arthritis-associated mechanisms of *Porphyromonas gingivalis* and *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *Clinical Medicine*. 2019; 8(9):1309. <https://doi.org/10.3390/jcm8091309>.
70. Mikuls TR, Payne JB, Yu F, Thiele GM, Reynolds RJ, Cannon, et al. Periodontitis and *Porphyromonas gingivalis* in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheumatology*. 2015;66(5):1090–1100. <https://doi.org/10.1002/art.38348>.
71. Janssen KMJ, Vissink A, de Smit MJ, Westra J, Brouwer E. Lessons to be learned from periodontitis. *Current Opinion in Rheumatology*. 2013;25(2):241–247. <https://doi.org/10.1097/BOR.0b013e32835d833d>.
72. Vermilyea DM, Ottenberg GK, Davey ME. Citrullination mediated by PPAD constrains biofilm formation in *P. gingivalis* strain 381. *npj Biofilms and Microbiomes*. 2019;5(1):1–11. <https://doi.org/10.1038/s41522-019-0081-x>.
73. Asteriou E, Gkoutzourelas A, Mavropoulos A, Katsiari C, Sakkas LI, Bogdanos DP. Early ACPA-positive rheumatoid arthritis: killing two birds with one stone. *Nutrients*. 2018;10(7):908. <https://doi.org/10.3390/nu10070908>.
74. Ioan-Facsinay A, el-Bannoudi H, Scherer HU, van der Woude D, Ménard HA, Lora M, et al. Anti-cyclic citrullinated peptide antibodies are a collection of anti-citrullinated protein antibodies and contain overlapping and non-overlapping reactivities. *Annals of the Rheumatic Diseases*. 2011; 70(1):188-193. <https://doi.org/10.1136/ard.2010.131102>.
75. Rönnelid J, Wick MC, Lampa J, Lindblad S, Nordmark B, Klareskog L, et al. Longitudinal analysis of citrullinated protein/peptide antibodies (anti-CP) during 5 year follow up in early rheumatoid arthritis: anti-CP status predicts worse disease activity and greater radiological progression. *Annals of the Rheumatic Diseases*. 2005;64(12):1744-1749. <https://doi.org/10.1136/ard.2004.033571>.
76. König MF, Abusleme L, Reinholdt J, Palmer RJ, Teles RP, Sampson K, et al. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*-induced hypercitrullination links periodontal infection to autoimmunity in rheumatoid arthritis. *Science Translational Medicine*. 2017;1:18–23. <https://doi.org/10.2174/1874312900701010018>.
77. de Molon RS, Rossa C Jr, Hurlings RM, Cirelli JA, Koenders MI. Linkage of periodontitis and rheumatoid arthritis: current evidence and potential biological interactions. *International Journal of Molecular Sciences*. 2019;20(18):4541. <https://doi.org/10.3390/ijms20184541>.
78. Dahlen G, Basic A, Bylund J. Importance of virulence factors for the persistence of oral bacteria in the inflamed gingival crevice and in the pathogenesis of periodontal disease. *Clinical Medicine*. 2019;8(9):1339. <https://doi.org/10.3390/jcm8091339>.
79. Curtis JR, Flake DD, Weinblatt ME, Shadick NA, Østergaard M, Hetland ML, et al. Adjustment of the multi-biomarker disease activity score to account for age, sex and adiposity in patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatology*. 2019;58(5):874–883. <https://doi.org/10.1093/rheumatology/key367>.
80. Hajshengallis G. Periodontitis: from microbial immune subversion to systemic inflammation. *Nature Reviews Immunology*. 2015;15(1):30–44. <https://doi.org/10.1038/nri3785>.
81. Ebbers M, Lübcke PM, Volzke J, Kriebel K, Hieke C, Engelmann R, et al. Interplay between *P. gingivalis*, *F. nucleatum* and *A. actinomycetemcomitans* in murine alveolar bone loss, arthritis onset and progression. *Scientific Reports*. 2018;8(1):1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-33129-z>.

82. Marchesan JT, Gerow EA, Schaff R, Taut AD, Shin SY, Sugai J, et al. Porphyromonas gingivalis oral infection exacerbates the development and severity of collagen-induced arthritis. *Arthritis Research and Therapy*. 2013;15(6):1–13. <https://doi.org/10.1186/ar4376>.
83. Gully N, Bright R, Marino V, Marchant C, Cantley M, Haynes D, et al. Porphyromonas gingivalis peptidylarginine deiminase, a key contributor in the pathogenesis of experimental periodontal disease and experimental arthritis. *PLoS One*. 2014;9(6):100838. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0100838>.
84. Schurgers E, Billiau A, Matthys P. Collagen-induced arthritis as an animal model for rheumatoid arthritis: focus on Interferon- $\gamma$ . *Journal of Interferon & Cytokine Research*. 2011;31(12):917–926. <https://doi.org/10.1089/jir.2011.0056>.
85. Brand DD, Latham KA, Rosloniec EF. Collagen-induced arthritis. *Nature Protocols*. 2007;2(5):1269–1275. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.173>.
86. Gemmell E, Bird PS, Ford PJ, Ashman RB, Gosling P, Hu Y, Seymour GJ. Modulation of the antibody response by Porphyromonas gingivalis and Fusobacterium nucleatum in a mouse model. *Oral Microbiology and Immunology*. 2004;19(4):247–51. <https://doi.org/10.1111/j.1399-302X.2004.00147.x>.
87. Valverde-Franco G, Hum D, Matsuo K, Lussier B, Pelletier JP, Fahmi H, Kapoor M, Martel-Pelletier J. The in vivo effect of prophylactic subchondral bone protection of osteoarthritic synovial membrane in bone-specific Ephb4-overexpressing mice. *American Journal of Pathology*. 2015;185(2):335–346. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2014.10.004>.
88. Wiśniewski JR, Zougman A, Nagaraj N, Mann M. Universal sample preparation method for proteome analysis. *Nature Methods*. 2009;6(5):359–362. <https://doi.org/10.1038/NMETH.1322>.
89. Joost S, Mikkat S, Wille M, Schümann A, Schmitt O. Membrane protein identification in rodent brain tissue samples and acute brain slices. *Cells*. 2019;8(5):423. <https://doi.org/10.3390/cells8050423>.
90. Pappesch R, Warnke P, Mikkat S, Normann J, Wisniewska-Kucper A, Huschka F et al. The regulatory small RNA MarS supports virulence of Streptococcus pyogenes. *Scientific Reports*. 2017;7:12241. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-12507-z>.
91. The UniProt Consortium, UniProt: a worldwide hub of protein knowledge. *Nucleic Acids Research*. 2019;47(D1):D506–D515. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1049>.
92. J. Fox and S. Weisberg. *An R companion to applied regression*. Third Edit. Sage Publications, 2018.
93. Elkaim R, Bugueno-Valdebenito IM, Benkirane-Jessel N, Tenenbaum H. Porphyromonas gingivalis and its LPS differentially regulate the expression of peptidyl arginine deiminases in human chondrocytes. *Innate Immunity*. 2017;23(5):468–475. <https://doi.org/10.1177/1753425917716266>.
94. Alshammara A, Amard S. Proposal for a novel murine model of human periodontitis using Porphyromonas gingivalis and type II collagen antibody injections. *Saudi Dental Journal*. 2019;31(2): 181–187. <https://doi.org/10.1016/j.sdentj.2019.02.043>.
95. Lally ET, Boesze-Battaglia K, Dhingra A, Gomez NM, Lora J, Mitchell CH et al. Aggregatibacter actinomycetemcomitans LtxA hijacks endocytic trafficking pathways in human lymphocytes. *Pathogens*. 2020;9(2):74. <https://doi.org/10.3390/pathogens9020074>.



96. Fine DH, Patil AG, Loos BG. Classification and diagnosis of aggressive periodontitis. *Journal of Periodontology*. 2018;89(Suppl 1):S103-S119. <https://doi.org/10.1002/JPER.16-0712>.
97. Reynolds MA, Kao RT, Camargo PM, Caton JG, Clem DS, Fiorellini JP, et al. Periodontal regeneration – intrabony defects: a consensus report from the AAP Regeneration Workshop, *Journal of Periodontology*. 2015;5(1):105–107. <https://doi.org/10.1902/jop.2015.140378>.
98. Könönen E, Gursoy M, Gursoy UK. Periodontitis: a multifaceted disease of tooth-supporting tissues. *Journal of Clinical Medicine*. 2019;8(8):1135. <https://doi.org/10.3390/jcm8081135>.
99. Kassem A, Henning P, Lundberg P, Souza PP, Lindholm C, Lerner UH. *Porphyromonas gingivalis* stimulates bone resorption by enhancing RANKL (Receptor Activator of NF- $\kappa$ B Ligand) through activation of Toll-like receptor 2 in osteoblasts. *The Journal of Biological Chemistry*. 2015;290(33):20147–20158. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.655787>.
100. Xiong G, Ji W, Wang F, Zhang F, Xue P, Cheng M, et al. Quercetin inhibits inflammatory response induced by LPS from *Porphyromonas gingivalis* in human gingival fibroblasts via suppressing NF- $\kappa$ B signaling pathway. *BioMed Research International*. 2019;2019:6282635. <https://doi.org/10.1155/2019/6282635>.
101. Belibasakis GN, Maula T, Bao K, Lindholm M, Bostanci N, Oscarsson J, et al. Virulence and pathogenicity properties of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *Pathogens*. 2019;8(4):222. <https://doi.org/10.3390/pathogens8040222>.
102. Gómez-Bañuelos E, Mukherjee A, Darrah E, Andrade F. Rheumatoid arthritis-associated mechanisms of *Porphyromonas gingivalis* and *aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *Journal of Clinical Medicine*. 2019;8(9):1309. <https://doi.org/10.3390/jcm8091309>.
103. Okumura G, Kondo N, Sato K, Yamazaki K, Ohshima H, Kawashima H, et al. Experimental arthritis and *Porphyromonas gingivalis* administration synergistically decrease bone regeneration in femoral cortical defects. *Scientific Reports*. 2019;9:20031. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-56265-6>.
104. Jung H, Jung SM, Rim YA, Park N, Nam Y, Lee J, et al. Arthritic role of *Porphyromonas gingivalis* in collagen-induced arthritis mice. *PLoS One*. 2017;12(11):e0188698. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0188698>. eCollection 2017.
105. Alabarse PVG, Lora PS, Silva JMS, Santo RCE, Freitas EC, de Oliveira MS, et al. Collagen-induced arthritis as an animal model of rheumatoid cachexia. *Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle*. 2018;9:603–612. <https://doi.org/10.1002/jcsm.12280>.
106. Muluke M, Gold T, Kiefhaber K, Al-Sahli A, Celenti R, Jiang H, et al. Diet-induced obesity and its differential impact on periodontal bone loss. *Journal of Dental Research*. 2016;95(2):223–229. <https://doi.org/10.1177/0022034515609882>.
107. Pischon N, Heng N, Bernimoulin JP, Kleber BM, Willich SN, Pischon T. Obesity, inflammation, and periodontal Disease. *Critical reviews in oral biology and medicine*. 2007;86(5):400-409. <https://doi.org/10.1177/154405910708600503>.
108. Popko K. et al. Proinflammatory cytokines Il-6 and TNF-alpha and the development of inflammation in obese subjects. *European Journal of Medical Research*. 2010;15(2):120-122. <https://doi.org/10.1186/2047-783x-15-s2-120>.
109. Kim H, Baek S, Hong SM, Lee J, Jung SM, Lee J et al. 1,25-dihydroxy vitamin D3 and interleukin-6 blockade synergistically regulate rheumatoid arthritis by suppressing interleukin-17 production and osteoclastogenesis. *Journal of Korean Medical Science*. 2020;17;35(6):e40. <https://doi.org/10.3346/jkms.2020.35.e40>.

110. Yago T, Nanke Y, Kawamoto M, Kobashigawa T, Yamanaka H, Kotake S. IL-23 and Th17 disease in inflammatory arthritis. *Journal of Clinical Medicine*. 2017;6(9):81. <https://doi.org/10.3390/jcm6090081>.
111. Aggarwal S, Ghilardi N, Xie MH, de Sauvage FJ, Gurney AL. Interleukin-23 promotes a distinct CD4 T cell activation state characterized by the production of interleukin-17. *Journal of Biological Chemistry*. 2003;278(3):1910-1914. <https://doi.org/10.1074/jbc.M207577200>.
112. Bouchareychas L, Grössinger EM, Kang M, Adamopoulos IE.  $\gamma\delta$ TCR regulates production of interleukin-27 by neutrophils and attenuates inflammatory arthritis. *Science Reports*. 2018;8:7590. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-25988-3>.
113. Brady J, Carotta S, Thong RPL, Chan CJ, Hayakawa Y, Smyth MJ et al. The Interactions of multiple cytokines control NK cell maturation. *The Journal of Immunology*. 2010;185(11):6679-6688. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0903354>.
114. Nielsen MA, Lomholt S, Mellemejkær A, Andersen MN, Buckley CD, Kragstrup TW. Responses to cytokine inhibitors associated with cellular composition in models of immune-mediated inflammatory arthritis. *ACR Open Rheumatology*. 2020;2(1):3–10. <https://doi.org/10.1002/acr2.11094>.
115. Wang Q, Chen W, Lin J. The role of calprotectin in rheumatoid arthritis. *Journal of Translational Internal Medicine*. 2019;7(4):126–131. <https://doi.org/10.2478/jtim-2019-0026>.
116. Watt FE, Hamid B, Garriga C, Judge A, Hrusecka R, Custers RHJ. The molecular profile of synovial fluid changes upon joint distraction and is associated with clinical response in knee osteoarthritis. *Osteoarthritis Research Society International*. 2019;28(3):324-333. <https://doi.org/10.1016/j.joca.2019.12.005>.
117. Berthelot JM, Claudepierre P. Trafficking of antigens from gut to sacroiliac joints and spine in reactive arthritis and spondyloarthropathies: Mainly through lymphatics? *Joint Bone Spine*. 2016;83(5):485-490. <https://doi.org/10.1016/j.jbspin.2015.10.015>.
118. Sandhya P, Danda D, Sharma D, Scaria V. Does the buck stop with the bugs?: an overview of microbial dysbiosis in rheumatoid arthritis. *International Journal of Rheumatic Diseases*. 2015;19:18-20. <https://doi.org/10.1111/1756-185X.12728>.
119. Sun Y, Chen Q, Lin P, Xu R, He D, Ji W et al. Characteristics of gut microbiota in patients with rheumatoid arthritis in Shanghai, China. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2019;9:369. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00369>.
120. Brusca SB, Abramson SB, Scher JU. Microbiome and mucosal inflammation as extra-articular triggers for rheumatoid arthritis and autoimmunity. *Current Opinion in Rheumatology*. 2014;26(1):101-107. <https://doi.org/10.1097/BOR.0000000000000008>.
121. Dossou-Yovo F, Mamadou G, Soudy ID, Limas-Nzouzi N, Miantezila J, Desjeux JF, et al. Metronidazole or Cotrimoxazole therapy is associated with a decrease in intestinal bioavailability of common antiretroviral drugs. *PLoS One*. 2014;26;9(2):89943. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0089943>.

## Abbildungsverzeichnis

---

Abbildung 1: Diagnoseprävalenz der rheumatoiden Arthritis nach Altersgruppen ab 15 Jahren und Geschlecht unterteilt .	1
Abbildung 2: <i>Pg</i> -induzierte ACPA-Synthese bei RA.	7
Abbildung 3: Versuchsübersicht des gesamten Experimentes.	9
Abbildung 4: Studiendesign.	14
Abbildung 5: Fotografische Darstellung der oralen Bakterieninokulation.	17
Abbildung 6: $\mu$ CT-Scan eines Unterkiefers.	18
Abbildung 7: Ausrichtung der drei Molaren im rechten Unterkiefer in drei Ebenen mit dem DataViewer.	19
Abbildung 8: Übersicht der 18 Messpunkte am rechten Unterkiefer und Vermessung des Zahnes an einem dieser Punkte.	20
Abbildung 9: Fotografische Darstellung der Induktion der Kollagen-induzierten Arthritis.	21
Abbildung 10: Scoring der CIA an einer komplett von Arthritis betroffenen Hinterpfote.	22
Abbildung 11: <i>Pg</i> führte zu alveolärem Knochenverlust, welcher von einer CIA unbeeinflusst blieb.	34
Abbildung 12: Der alveoläre Knochenverlust im 3D-Modell war nach <i>Pg</i> -Inokulation verglichen mit der Kontrollgruppe größer.	35
Abbildung 13: Die orale Inokulation mit Bakterien führte zu einer systemischen Immunantwort.	36
Abbildung 14: Die orale Inokulation mit Bakterien initiierte eine Antikörperbildung.	37
Abbildung 15: Die Auswirkungen einer Parodontitis konnten histologisch nicht nachgewiesen werden.	39
Abbildung 16: Die CIA führte zu makroskopisch sichtbaren Zeichen einer Arthritis.	40
Abbildung 17: Die Summen des Arthritiscores unterschieden sich nicht signifikant zwischen den einzelnen Gruppen.	41
Abbildung 18: Die Inzidenzen der CIA unterschieden sich nicht signifikant voneinander.	41
Abbildung 19: Es ist kein signifikanter Unterschied der Gewichtsverläufe zwischen den Gruppen zu verzeichnen.	42
Abbildung 20: Die CIA löste eine systemische Immunreaktion aus.	43
Abbildung 21: Die CIA führte zu einer Erhöhung der IFN- $\gamma$ -Spiegel im Serum.	44
Abbildung 22: Die CIA führte zu mikroskopisch sichtbaren Zeichen einer Arthritis.	45
Abbildung 23: Die orale Inokulation mit Bakterien sowie die CIA veränderten das synoviale Proteom.	47
Abbildung 24: Die Inokulation mit <i>Pg</i> bewirkte eine erhöhte Expression der $\alpha$ -Kette des H-2 Klasse II Histokompatibilitätsantigens.	48
Abbildung 25: Die Inokulation mit <i>Aa</i> bewirkte eine erhöhte Expression der konstanten Ig- $\kappa$ -Kette.	48
Abbildung 26: Die Interventionen hatten keine signifikanten Auswirkungen auf das Darmmikrobiom.	50

**Tabellenverzeichnis**

---

Tabelle 1:	Übersicht zur Gruppeneinteilung mit entsprechenden Interventionen.	14
Tabelle 2:	Protokoll zur Hämatoxylin-Eosin Färbung.	25
Tabelle 3:	Übersicht der hochregulierten Proteine in den Synovialmembranen mit vollständigem Namen und Funktion/Bedeutung.	29
Tabelle 4:	Hochregulierte Proteine in den Synovialmembranen der jeweiligen Gruppen.	46

**Lebenslauf**

---

**Persönliche Daten**

Name: Anna-Lena Buschhart  
1. Anschrift: Rehnaer Straße 6 D, 19217 Vitense, Germany  
2. Anschrift: c/o Sämann, Friedhofsweg 42, 18057 Rostock, Germany  
geb.: 31.07.1995 in Schwerin  
E-mail: anna-lena211@gmx.de

**Ausbildung**

09/2014 - 12/2021 Medizinstudium an der Universität Rostock  
12/2021 3. Abschnitt der ärztlichen Prüfung  
10/2020 2. Abschnitt der ärztlichen Prüfung  
09/2016 1. Abschnitt der ärztlichen Prüfung  
07/2014 Abitur am Gymnasium Gadebusch

**Promotion**

05/2017- 08/2021 Wechselwirkung der rheumatoiden Arthritis und der Parodontitis im Mausmodell  
AG klinische Immunologie, Frau Prof. Dr. rer. nat. B. Müller-Hilke, MME  
Institut für Immunologie, Universitätsmedizin Rostock

**Berufliche Erfahrungen**

11/2018 - 02/2019 studentische Hilfskraft in der Universitätsfrauenklinik und Poliklinik am Klinikum Südstadt Rostock  
04/2018 - 12/2018 studentische Hilfskraft in der Klinik für Unfallchirurgie, Orthopädie und Handchirurgie am Klinikum Südstadt Rostock

**Thesen**

---

1. Die orale Inokulation mit *Porphyromonas gingivalis* löst bei Mäusen einen alveolären Knochenverlust im Sinne einer Parodontitis aus.
2. Der alveoläre Knochenverlust bleibt von einer nachfolgenden Kollagen-induzierten Arthritis unbeeinflusst.
3. Die orale Inokulation mit *Porphyromonas gingivalis* führt im Vergleich zur Kontrollgruppe zu höheren Zytokinspiegeln im Serum.
4. Die orale Inokulation mit *Porphyromonas gingivalis* beziehungsweise *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* löst eine Antikörperbildung gegen diese Bakterien aus.
5. Die Kollagen-induzierte Arthritis verursacht eine systemische Immunantwort.
6. Die Kollagen-induzierte Arthritis führt zu histologisch sichtbaren Knorpelschäden und Entzündungszeichen.
7. Sowohl die Kollagen-induzierte Arthritis als auch die orale Inokulation mit *Porphyromonas gingivalis* oder *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* bewirken eine Veränderung im synovialen Proteom.
8. Weder die Kollagen-induzierte Arthritis noch die orale Inokulation mit *Porphyromonas gingivalis* oder *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* haben relevante Auswirkungen auf das Darmmikrobiom.