

AUS DEM INSTITUT FÜR IMMUNOLOGIE
ARBEITSGRUPPE KLINISCHE IMMUNOLOGIE
UND CORE FACILITY FÜR ZELLSORTIERUNG & ZELLANALYSE
LEITUNG: PROF. DR. RER. NAT. B. MÜLLER-HILKE, MME

AUSWIRKUNGEN DER ORALEN INOKULATION VON *PORPHY-*
ROMONAS GINGIVALIS UND
AGGREGATIBACTER ACTINOMYCETEMCOMITANS
AUF DIE KOLLAGEN-INDUZIERTER ARTHRITIS IN DER MAUS

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

EINGEREICHT VON:

LENNART BOLTEN, GEB. AM 09.02.1990 IN CUXHAVEN
WOHNHAFT IN CUXHAVEN

https://doi.org/10.18453/rosdok_id00003928

Vorabveröffentlichung der Dissertation

Die Ergebnisse dieser Arbeit wurden bereits mit freundlicher Genehmigung der medizinischen Fakultät der Universität Rostock unter folgenden Angaben am 31.12.2020 veröffentlicht:

Buschhart AL, **Bolten L**, Volzke J, Ekat K, Kneitz S, Mikkat S, Kreikemeyer B, Müller-Hilke B. Periodontal pathogens alter the synovial proteome. Periodontal pathogens do not exacerbate macroscopic arthritis but alter the synovial proteome in mice. *PLoS One*. 2020;15(12):e0242868. doi:10.1371/journal.pone.0242868

GutachterInnen: Prof. Dr. rer. nat. Brigitte Müller-Hilke
Institut für Immunologie Arbeitsgruppe klinische Immunologie
Universitätsmedizin Rostock

Prof. Dr. rer. nat. Bernd Kreikemeyer
Institut für Medizinische Mikrobiologie, Virologie und Hygiene
Universitätsmedizin Rostock

PD Dr. habil. Catalina Suzana Stingu
Institut für Medizinische Mikrobiologie und Virologie
Universitätsklinikum Leipzig

Datum der Einreichung: 15.01.2022

Datum der Verteidigung: 29.06.2022

In tiefer Dankbarkeit meiner Familie und allen Wegbegleitern gewidmet.

INHALTS- / ABBILDUNGS- / TABELLEN- / ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

I.	ZUSAMMENFASSUNG	1
II.	EINLEITUNG.....	2
2.1	AUFBAU DER ARBEIT	2
2.2	RHEUMATOIDE ARTHRITIS	2
2.3	PARODONTITIS	6
2.4	PARALLELARBEIT UND ZIELSETZUNG	10
III.	MATERIAL	11
3.1	VERBRAUCHSMATERIALIEN	11
3.2	CHEMIKALIEN.....	12
3.3	GERÄTE	13
3.4	BAKTERIELLE ERREGER.....	14
3.5	SOFTWARE.....	14
IV.	METHODEN.....	15
4.1	VERSUCHSAUFBAU	15
4.2	VERSUCHSTIERE.....	17
4.3	ZUCHT UND AUFBEREITUNG DER BAKTERIEN	17
4.4	ANÄSTHESIE DER VERSUCHSTIERE.....	18
4.5	KOLLAGEN-INDUZIERTER ARTHRITIS	19
4.6	INDUKTION DES ALVEOLÄREN KNOCHENVERLUSTES.....	21
4.7	BLUTENTNAHME.....	23
4.8	MAKROSKOPISCHES SCORING DER ARTHRITIS.....	24
4.9	ABBRUCHKRITERIEN	25
4.10	ASSERVIERUNG	26
4.11	SERUMANALYSE	28
4.12	BESTIMMUNG DES ALVEOLÄREN KNOCHENVERLUSTES	29
4.13	HISTOLOGIE.....	32
4.14	ANALYSE DES MIKROBIOMS.....	34

4.15	PROTEOMICS DER SYNOVIA	37
4.16	STATISTISCHE ANALYSE.....	38
V.	ERGEBNISSE	39
5.1	GEWICHTSVERLAUF	39
5.2	ARTHRITISINZIDENZ / -SCHWERE.....	41
5.3	ALVEOLÄRER KNOCHENVERLUST	44
5.4	BAKTERIELLE ANTIKÖRPER	45
5.5	HISTOLOGIE.....	46
5.6	MIKROBIOMANALYSE.....	47
5.7	ZYTOKINANALYSE	50
5.8	PROTEOMICS.....	52
VI.	DISKUSSION	55
VII.	LITERATURVERZEICHNIS	62
VIII.	EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG	68
IX.	LEBENS LAUF	69
X.	THESEN.....	71
XI.	DANKSAGUNG	72

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

ABBILDUNG 1: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DES VERSUCHSABLAUFS	15
ABBILDUNG 2: VERSUCHSABLAUF DER KONTROLLGRUPPE BZW. DES PARALLELVERSUCHES	16
ABBILDUNG 3: ARTHRITISINDUKTION.....	20
ABBILDUNG 4: DARSTELLUNG DER ORALEN INOKULATION.....	22
ABBILDUNG 5: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DES ARTHRITISSCORES DER HINTERLÄUFE	24
ABBILDUNG 6: DARSTELLUNG DER SYNOVIAENTNAHME.....	27
ABBILDUNG 7: MESSPUNKTE IN DER 3D-REKONSTRUKTION UND SCHICHTBILDAUFNAHMEN.....	31
ABBILDUNG 8: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DES ZU SEQUENZIERENDEN DNA-ABSCHNITTES .	36
ABBILDUNG 9: ENTWICKLUNG DES ABSOLUTEN GEWICHTS	39
ABBILDUNG 10: ENTWICKLUNG DES RELATIVEN GEWICHTES ÜBER DIE ZEIT	40
ABBILDUNG 11: SYMPTOMATISCHE UND ASYMPTOMATISCHE PFOTEN IM RAHMEN DER CIA.....	41
ABBILDUNG 12: ARTHRITISINZIDENZ UND SUMME DER ARTHRITISSCORES ZUM ENDZEITPUNKT...	42
ABBILDUNG 13: EIN- UND ZWEIGIPFLIGER GEWICHTSVERLAUF	43
ABBILDUNG 14: μ CT-GESTÜTZTE MESSUNGEN DES ABC-CEJ-ABSTANDES NACH GRUPPEN	44
ABBILDUNG 15: ANTIKÖRPERMESSUNGEN IM SERUM MITTELS ELISA	45
ABBILDUNG 16: HISTOLOGISCHE UNTERSUCHUNG DER HINTERLÄUFE	46
ABBILDUNG 17: HISTOLOGISCHE UNTERSUCHUNG DER KIEFER.....	46
ABBILDUNG 18: DARSTELLUNG DER RELATIVEN HÄUFIGKEITEN VON PORPHYROMONADACEAE ...	48
ABBILDUNG 19: DARSTELLUNG DES MIKROBIOMS AUF DER EBENE DER PHYLA	49
ABBILDUNG 20: HEATMAP DER ZYTOKINSPIEGEL JE INDIVIDUUM ZUM ENDZEITPUNKT	50
ABBILDUNG 21: PROTEOMICS HAUPTKOMPONENTENANALYSE.....	54

TABELLENVERZEICHNIS

TABELLE 1: ABKÜRZUNGEN	VII
TABELLE 2: EINHEITEN.....	IX
TABELLE 3: ACR/EULAR KLASSIFIKATIONSKRITERIEN DER RA VON 2010.....	5
TABELLE 4: VERBRAUCHSMATERIALIEN	11
TABELLE 5: VERWENDETE CHEMIKALIEN	12
TABELLE 6: VERWENDETE GERÄTE	13
TABELLE 7: VERWENDETE BAKTERIELLE ERREGER	14
TABELLE 8: VERWENDETE SOFTWARE.....	14
TABELLE 9: ASSESSMENT DER VERSUCHSTIERBELASTUNG	26
TABELLE 10: EINSTELLUNGEN DER SOFTWARE SCYSCAN 1076.....	30
TABELLE 11: EINSTELLUNGEN DER SOFTWARE NRECON	30
TABELLE 12: ABLAUF DER HISTOLOGISCHEN FÄRBUNG	33
TABELLE 13: ARTHRITISSCORES IM GRUPPENVERGLEICH.....	42
TABELLE 14: GEMESSENE ZYTOKINE MIT JEWEILS WICHTIGSTER FUNKTION.....	51
TABELLE 15: SIGNIFIKANT VERÄNDERTE PROTEINE DER PROTEOMANALYSE	53

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

TABELLE 1: ABKÜRZUNGEN

ABKÜRZUNG	BEDEUTUNG
<i>Aa</i>	<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>
Abb.	Abbildung
ABC	Alveolärer Knochenkamm (engl. alveolar bone crest)
ACPA	Antikörper gegen citrullinierte Proteine (engl. anti-citrullinated protein antibodies)
ACR	American College of Rheumatology (engl.)
APC	Antigenpräsentierende Zellen (engl. antigen presenting cells)
BHI	Brain Heart Infusion (engl.)
BSA	Rinderserumalbumin (engl. bovine serum albumin)
bzw.	beziehungsweise
C II	Kollagen Typ II (engl. Type II collagen)
CCL	CC-Chemokinligand (engl. CC-chemokine ligand)
CEJ	Zahnzement/ -schmelz Übergang (engl. cement-enamel junction)
CFA	Komplettes Freund-Adjuvans (engl. complete Freund's adjuvant)
CIA	Kollagen-induzierte Arthritis (engl. collagen induced arthritis)
CMC	Carboxymethylcellulose
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium (engl.)
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl. deoxyribonucleic acid)
DNase	Desoxyribonuklease
EULAR	European League Against Rheumatism (engl.)
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay (engl.)
engl.	englisch
erkl. Var.	erklärende Varianz
et al.	und andere (lateinisch et alii)
GM-CSF	Granulocyten Macrophagen (engl. colony-stimulating factor)
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HE	Hämatoxylin-Eosin
HLA / MHC	Humanes Leukozytenantigen (engl. human leukocyte antigen / engl. major histocompatibility complex)
IFA	Inkomplettes Freund-Adjuvans (engl. incomplete Freund's adjuvant)
IFN	Interferon

Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IVC	Individual ventilated cages (engl.)
KBE	Koloniebildende Einheiten
LPS	Lipopolysaccharide
Ltx	Leukotoxin A
MCP	monocyte chemotactic protein (engl.)
NaCl	Natriumchlorid
Nr.	Nummer
o.g.	oben genannt
OTU	operational taxonomic unit (engl., Plural OTUs)
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (engl. phosphate-buffered saline)
PD	Parodontitis
PFA	Paraformaldehydlösung
<i>Pg</i>	<i>Porphyromonas gingivalis</i>
pH	pH-Wert (Gegenzahl des dekadischen Logarithmus gelöster Wasserstoffatome)
pPAD	Bakterielle Peptidylarginin deiminase des <i>Porphyromonas gingivalis</i>
PYG	Peptone Yeast Extract Glucose Broth (engl.)
RA	Rheumatoide Arthritis
RNase	Ribonuklease
ROI	Bereich von Interesse (engl. region of interest)
rpm	Umdrehungen pro Minute (engl. rounds per minute)
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure (engl. ribonucleic acid)
sham	Orale Inokulation mit PBS und Natriumcarboxymethylcellulose
SPF	Spezifisch pathogenfrei (engl. specific-pathogen-free)
Tab.	Tabelle
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
TNF	Tumornekrosefaktor (engl. tumor necrosis factor)
UA	Harnstofflösung (engl. urea)
μCT	Micro-Computertomographie

TABELLE 2: EINHEITEN

EINHEITEN	BEDEUTUNG
%	Prozent, Teil von Hundert
°C	Grad Celsius
A	Ampere
g	Gramm
h	Stunde
L	Liter
m	Meter
M	Molar
min	Minute
V	Volt

I. ZUSAMMENFASSUNG

Die rheumatoide Arthritis (RA) ist mit einer weltweiten Prävalenz von 1 % eine häufige systemische Autoimmunerkrankung, die zu einer schmerzhaften Entzündung und bei unzureichender Therapie zu einem Funktionsverlust der betroffenen Gelenke mit einer starken Einschränkung der Lebensqualität führt. Die Parodontitis (PD) ist eine entzündliche Erkrankung des Zahnhalteapparates, welche in schweren Verläufen zu Zahnverlust und ebenfalls zu Lebensqualitätsminderung führen kann, die Prävalenz beträgt in den westlichen Nationen etwa 50 %. Beide Erkrankungen weisen gewisse Verbindungen zueinander auf, so korrelieren schwere Verläufe beider Erkrankungen klinisch miteinander. Es zeigten sich zudem Parallelen in der Pathogenese.

In dieser Arbeit gilt es sich dem Zusammenhang der Erkrankungen in einem Mausmodell zu nähern, die RA wurde mittels der kollageninduzierten Arthritis und die PD durch orale Inokulation spezieller Pathogene modelliert. Dazu wurde der Einfluss zweier keystone-Pathogene der PD *Porphyromonas gingivalis* (Pg) und *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa) auf beide Erkrankungen untersucht. Beide Erreger sind in der Lage, entweder indirekt oder direkt, Proteine zu citrullinieren. Sie sind damit auch mit der Pathogenese der RA verknüpft. Die Reihenfolge, in der die Modelle ausgelöst werden, ist bisher selten untersucht worden. Die vorliegende Arbeit steht in direktem Zusammenhang mit einer Parallelarbeit, bei der die Versuchsanordnung invertiert ist.

Die kollagen-induzierte Arthritis (CIA) und der alveoläre Knochenverlust als Modelle für die RA und PD konnten erfolgreich ausgelöst werden. Es wurden die Versuchstiere über einen längeren Zeitraum als in der Literatur üblich beobachtet, hierbei fiel bei einigen Tieren ein zweigipfliger Verlauf der Arthritisschwere auf. Die Inokulation beider Erreger zeigte eine spezifische, humorale Immunantwort. Die Schwere des alveolären Knochenverlustes blieb bei beiden verwendeten Erregern vergleichbar. Ein direkter Einfluss beider Erkrankungen aufeinander konnte weder makroskopisch (Arthritisschwere, Arthritisdauer) noch mikroskopisch (Alveolärer Knochenverlust, Histologie, Zytokinanalysen) gezeigt werden. Die Analyse des intestinalen Mikrobioms als nichtinvasiver Proxy für die orale Inokulation zeigte sich als nicht praktikabel. Die Proteomanalyse synovialen Gewebes wiederum konnte deutliche Hinweise für unterschiedliche Entitäten der rheumatoiden Arthritis zeigen, da sich das Proteom je nach inokuliertem Erreger unterschied und damit auf verschiedene Formen der Immunantwort schließen ließ.

Als Ausblick könnte die Analyse des synovialen Proteoms nach weiteren Forschungsbemühungen zu einem neuen Diagnostikum reifen mit dem Ergebnis, besonders im Frühstadium der rheumatoiden Arthritis, eine zielgerichtete Therapie zu erreichen. Nebenbefundlich zeigten sich Hinweise auf eine mögliche Regeneration des Knochengewebes muriner Kiefer.

II. EINLEITUNG

2.1 AUFBAU DER ARBEIT

In der Einleitung (Kapitel II.) wird der theoretische Hintergrund der beiden untersuchten Erkrankungen rheumatoide Arthritis (RA) und die Parodontitis (PD) beleuchtet. Es werden das Krankheitsbild definiert und detaillierte Angaben zur Epidemiologie, Ätiopathogenese, Symptomatik sowie Therapie aufgezeigt.

Im Anschluss werden in Kapitel III. die verwendeten Materialien aufgelistet und in Kapitel IV. die Methoden vorgestellt, die in dieser experimentellen Arbeit angewandt wurden. Die Ergebnisse der Untersuchungen sind in Kapitel V. dargestellt. In Kapitel VI. werden die Ergebnisse vor dem Hintergrund der aktuellen Forschungssituation diskutiert und eingeordnet. Im Anhang folgen das Literaturverzeichnis, die Eidesstattliche Erklärung, der tabellarische Lebenslauf und die zusammengefassten Thesen, die sich aus dieser Arbeit ergeben haben.

2.2 RHEUMATOIDE ARTHRITIS

„Die rheumatoide Arthritis ist die häufigste entzündliche Gelenkerkrankung.“

- Deutsche Rheumaliga [1]

Die rheumatoide Arthritis (RA) ist eine chronisch-entzündliche Erkrankung der Gelenke, Sehnen und Bänder autoimmunen Ursprungs [2]. Neben den primär entzündlich geschwollenen und schmerzhaften kleinen und mittelgroßen Gelenken mit konsekutiver Destruktion der gelenknahen Strukturen kann im Zuge der Erkrankung auch eine Affektion der Lunge, des Herzens, des Gastrointestinaltraktes, der Niere und des Nerven- sowie Gefäßsystems auftreten [3]. Unbehandelt führt diese Erkrankung zu einer beträchtlichen Einschränkung der Lebensqualität.

Die Prävalenz der RA wird in Nordamerika und Europa mit 0,5 - 1 % angegeben. In Südeuropa und afrikanischen Ländern wird sie geringer vermutet, zudem werden Unterschiede in bestimmten ethnischen Gruppen beobachtet [4, 5, 6]. Ferner erkranken häufiger Frauen als Männer [7]. Die RA hat eine hohe sozioökonomische Relevanz, die nicht zuletzt der Tatsache ge-

schuldet ist, dass sie mit hohen Therapiekosten einhergeht. Der Erkrankungsbeginn liegt häufig im berufstätigen Alter und führt bei Progress zumindest intermittierend zur Arbeitsunfähigkeit [8].

Die Ätiologie der RA ist bis heute nicht eindeutig geklärt. Es wurden Risikofaktoren wie genetische Prädisposition, weibliches Geschlecht und Umwelteinflüsse definiert. Zu den Umwelteinflüssen werden Zigarettenrauchen, Siliziumexposition, Vitamin-D-Mangel, Adipositas und Veränderungen im oralen Mikrobiom gezählt [2].

Die RA geht mit einer Destruktion von Knorpel- und Knochengewebe durch eine verstärkte Aktivität von Osteoklasten im Zuge einer fehlgeleiteten Immunantwort einher. Der Mechanismus ist noch nicht abschließend erklärt und damit noch Bestandteil aktueller Forschungsbemühungen. Nach heutigem Kenntnisstand ist davon auszugehen, dass bestimmte Klasse-II humane Leukozyten Antigene (HLA / MHC) mit der Entstehung von RA vergesellschaftet sind [9]. Diese teilen sich vor allem in den Subklassen HLA-DRB1*01 und HLA-DRB1*04 das sogenannte "shared epitope", eine spezifische Aminosäuresequenz. Träger dieser Antigene haben ein signifikant erhöhtes Risiko an einer RA zu erkranken [9]. Auf dem Boden dieser genetischen Prädisposition scheint es durch o.g. umweltbedingte Stressoren zu einer entzündlichen und destruktiven synovialen Reaktion zu kommen. Die genauen Mechanismen sind bisher nicht eindeutig geklärt. Ein Erklärungsansatz ist die Entstehung von Antikörpern gegen citrullinierte Proteine (ACPA). Diese können in mukosalen Strukturen des Körpers entstehen. Genannt seien hier drei Mechanismen: In der Lunge durch Zigarettenrauch induzierte Citrullinierung, in der Mundhöhle oder dem unteren Gastrointestinaltrakt durch *Porphyromonas gingivalis* (*Pg*) sowie *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (*Aa*). *Pg* besitzt eine eigene Peptidylarginin Deaminase (pPAD), welche die Deamination von Peptidylarginin zu Peptidylcitrullin katalysiert. *Aa* wiederum bildet Leukotoxin (Ltx), welches durch Kalziuminflux in neutrophile Granulozyten zur Lyse dieser und zur Initiierung der NETosis führt. Konsekutiv kommt es zur endogenen Citrullinierung körpereigener Proteine [10, 11]. Diese durch Citrullinierung entstandenen Neoepitope führen zu einer Aktivierung von antigenpräsentierenden Zellen (z.B. Makrophagen oder Dendritische Zellen) und werden über HLA-DRB1-Haplotypen mit dem shared epitope exprimiert. Nach der Migration in das lymphatische System kommt es zur T- und B-Zell-Aktivierung mit anschließender Produktion von Autoantikörpern gegen die o.g. citrullinierten Epitope (ACPA). So entstandene ACPA führen über die Bindung an körpereigenen Epitopen in den Gelenken zu einer Rekrutierung von Leukozyten und in der Folge zu einer Entzündungsreaktion [2].

Die Symptome der RA reichen von Abgeschlagenheit und allgemeiner Schwäche über Gelenksteifheit und -schwellung bis hin zu leichten bis mitunter stärksten Schmerzen der betroffenen Gelenke. Zudem beschreiben einige Betroffene einen emotionalen und psychischen Einfluss der Erkrankung. Das Spektrum der nicht körperlichen Symptome erstreckt sich von Angst und Wut bis Depressivität und Suizidgedanken. Auch wird gerade in der frühen Krankheitsperiode Unsicherheit und vermindertes Selbstwertgefühl angegeben [12]. Die Gelenksteifheit tritt klassischerweise in den frühen Morgenstunden auf (die sogenannte Morgensteifigkeit). Das Verteilungsmuster entzündeter Gelenke weist häufig eine Symmetrie entlang der langen Körperachse auf. Betroffene Gelenke werden in klein und groß unterteilt. Zu den kleinen Gelenken zählen die Gelenke der Füße und der Hände, klassisch ist hier die Aussparung der distalen Interphalangealgelenke (DIP). Die Schulter, Ellenbogen, Hüfte, Knie und das Sprunggelenk zählen zu den großen Gelenken [13]. Bei unzureichender Therapie kann es als Folge der chronischen Gelenkentzündung zu schmerzhaften Schwanenhals-, Knopflochdeformitäten der Finger und der Ulnardeviation der Hände kommen [2].

Extraartikulär können Rheumaknoten im Sinne von Granulomen im Subcutangewebe entstehen. Auch Vaskulitiden, Organschäden im Rahmen einer Pleuritis, Lungenfibrose oder Endo- bzw. Perikarditis sind beschrieben. Athrophien der Muskulatur, besonders nach Beteiligung des Karpaltunnels und Irritation des Nervus medianus im Zuge eines Karpaltunnelsyndroms, können zu einer weiteren Einschränkung der Lebensqualität führen [14].

Im Jahr 1987 wurden Diagnosekriterien des American College of Rheumatology (ACR) veröffentlicht, die eine Diagnosestellung unter anderem anhand der Klinik erlaubte [15]. Aufgrund der mangelnden Erfassung von Frühstadien verfasste die ACR 2010 aktualisierte Kriterien. Hier erfolgte für die Klassifizierung der RA die Einteilung der betroffenen Gelenke nach Größe, Lokalisation und Anzahl. Serologische Marker wie Antikörperstatus (ACPA und Rheumafaktor) und Entzündungsparameter (CRP und BSG) sowie die Symptombdauer spielen dabei auch eine Rolle (Tab. 2). Entsprechend der erhobenen Kriterien werden Punkte verteilt, die summiert werden. Ab kumulativ sechs Punkten kann die Diagnose einer RA gestellt werden [16]. Die Labordiagnostik hat in den letzten Jahrzehnten einen erhöhten Stellenwert in der Diagnosestellung der RA eingenommen, so wurden die ACPA in die Klassifikationskriterien von 2010 aufgenommen. Dabei stellen die Rheumafaktoren (RF) eine Standarduntersuchung dar. Hier werden Autoantikörper gegen das Fc-Fragment der Immunglobuline der Klasse G (IgG) nachgewiesen. Diese sind mit einer Sensitivität von 70 % und einer Spezifität von 80 % in Bezug auf die RA nicht sehr aussagekräftig, jedoch bei Nachweis mit einem aggressiveren Krankheitsbild und extraartikulären Manifestationen assoziiert. Es handelt sich dabei um die soge-

TABELLE 3: ACR/EULAR KLASSIFIKATIONSKRITERIEN DER RA VON 2010

KRITERIEN	PUNKTE
A. Gelenkbeteiligung	
1 großes Gelenk	0
2 - 10 große Gelenke	1
1 - 3 kleine Gelenke	2
4-10 kleine Gelenke	3
> 10 Gelenke (davon mindestens 1 kleines)	5
B. Serologie (mindestens eines muss vorliegen)	
negative RF und negative ACPA	0
niedrig-positive RF oder niedrig-positive ACPA	2
hoch-positive RF oder hoch-positive ACPA	3
C. akute Phase Reaktion (mindestens eine muss vorliegen)	
normales CRP und normale BSG	0
erhöhtes CRP oder erhöhtes BSG	1
D. Dauer der Symptome	
< 6 Wochen	0
> 6 Wochen	1

nannte seropositive RA [17]. Dem gegenüber sind ACPA mit einer Spezifität von 95 % bezogen auf die RA den RF überlegen. Die laborchemische Bestimmung des C-reaktiven Proteins (CRP) und der Blutsenkungsgeschwindigkeit (BSG) lassen neben dem klinischen Bild als Akute-Phase Proteine Rückschlüsse auf die Aktivität der RA zu.

Der morphologische Zustand der betroffenen Gelenke und knöchernen Strukturen kann mittels konventionellem Röntgen, Computertomographie (CT) oder Magnetresonanztomographie (MRT) quantifiziert werden.

Die aktuelle Therapie erfolgt abhängig von der Krankheitsaktivität, die mittels des Disease Activity Score 28 erhoben wird [18]. Grundlegendes Prinzip aller Therapieansätze liegt in der Immunsuppression, um eine frühe Remission der RA zu erreichen. Wichtig ist eine individuell angepasste sowie zügig und ausreichend hoch dosierte Therapie. Dieses Vorgehen spiegelt sich in den Begriffen „hit hard and early“ sowie „treat to target“ wider [19]. Die Therapie der RA stand bereits in der Vergangenheit unter einem stetigen Wandel, so fanden Präparate, die Gold enthalten, schon früh Anwendung [20]. Mit der Entwicklung von nicht steroidal Antirheumatika (NSAR) und Glucocorticoiden erhielten diese eine Anwendung als Erstlinientherapie [21]. Glucocorticoide sind in der Lage, die systemische Immunreaktion bei entsprechender Dosierung drastisch zu senken. Dies ist allerdings bei anhaltender Therapiedauer mit häufig erheblichen Nebenwirkungen assoziiert, so wie gastrointestinalen Blutungen, Muskelatrophie, Fettverteilungsstörungen, Gewichtszunahme, erhöhte Anfälligkeit für Infektionserkrankungen, Osteoporose, diabetischen Stoffwechsellagen und weiteren Einschränkungen der Lebensqualität.

In der modernen Therapie werden drei Phasen unterschieden: In der ersten Phase spielt noch immer die initiale Gabe von Glucocorticoiden eine Rolle, die jedoch möglichst reduziert werden sollte. Dies wird mit der frühen Kombination mit disease-modifying anti rheumatic drugs (DMARDs) erreicht. Daher wird früh mit einer Kombinationstherapie mit Glucocorticoiden und konventionell synthetischen DMARDs (csDMARDs), wie Metotrexat, alternativ Leflunomid oder Sulfasalazin, begonnen. Nach sechs Monaten kann bei entsprechender Wirksamkeit die Dosis der Medikation versuchsweise reduziert werden. Wenn sich jedoch nach drei Monaten keine klinische Besserung der Symptome abzeichnet, öffnen sich weitere Behandlungspfade in den Phasen zwei und drei. Es können biological DMARDs (bDMARDs), sogenannte Biologicals, als Kombinationspartner in Betracht gezogen werden. Die Gruppe der Biologicals ist sehr heterogen, an dieser Stelle seien Anti-CD20-Antikörper (z.B. Rituximab) und TNF-Inhibitoren (z.B. Adalimumab) genannt. Rituximab reduziert die B-Zell-Zahl und greift damit in die spezifische humorale Immunreaktion ein. Adalimumab senkt die TNF-Spiegel, welche die Osteoklastendifferenzierung und -aktivität mindern. Januskinasen-Inhibitoren sind relativ neue Therapeutika, beispielsweise Baricitinib, und werden zu den targeted-synthetic DMARDs gezählt. Diese greifen gezielt in die Mechanismen des pathologisch fehlgeleiteten Immunsystems ein. Die Therapie orientiert sich am klinischen Bild der Erkrankung, in dem es viel Spielraum für eine individualisierte Therapie gibt [19]. Bis ein geeignetes Therapieregime gefunden ist, kann es mitunter einige Monate des „trial and error“ geben.

Das Ziel der Therapie ist die Reduktion der Gelenkdestruktion und Optimierung der physiologischen Funktion der betroffenen Gelenke bis hin zur Remission der RA. Eine suffiziente Therapie ermöglicht zudem die uneingeschränkte soziale Partizipation sowie Erwerbstätigkeit [19].

2.3 PARODONTITIS

Die Deutsche Gesellschaft für Parodontologie definiert die Parodontitis (PD) als „[...] eine Entzündung des Zahnhalteapparates“. Dieser besteht aus der Gingiva, den parodontalen Ligamenten und dem alveolären Knochenkamm des Kiefers. „Sie gehört zu den häufigsten Erkrankungen des Menschen. Verursacht [...] durch Bakterien und die Entzündungsreaktion des Körpers. Durch diese chronische Entzündung wird der Kieferknochen zerstört, wodurch es bei fortgeschrittener Erkrankung zu Zahnverlust kommt“. [22].

Die PD muss von einer isolierten Gingivitis abgegrenzt werden. Die erstgenannte geht mit einer Ablösung des Zahnes vom Zahnhalteapparat einher. Diese Ablösung wird Attachmentverlust genannt und kann durch eine Gingivitis ausgelöst werden. Der Attachmentverlust wird

anhand der Sondierung des Sulcus gingivalis, also der Bereich zwischen Zahnwand und angrenzendem Zahnfleisch, quantifiziert. Die Tiefe der Zahntaschen wird in Millimetern angegeben. Dies wird in der Praxis als klinischer Attachmentverlust (CAL) bezeichnet, in der Regel ist ein CAL von mehr als 2 mm auffällig [23].

Bezüglich der Epidemiologie hat die fünfte Auflage der Deutsche Mundhygienestudie (DMS V) des Instituts der Deutschen Zahnärzte zuletzt 2016 Zahlen aus Deutschland veröffentlicht. 2014 wurden 4600 Teilnehmer aus einem repräsentativen Kollektiv befragt und untersucht. Hier zeigte sich bei jüngeren Erwachsenen im Alter von 35 bis 44 Jahren, dass 43,4 % eine moderate und 8,2 % eine schwere PD entwickelten. Im Vergleich zu den 2005 erhobenen Zahlen lässt sich eine Verbesserung der Zahngesundheit feststellen. So lag beispielsweise die Prävalenz von moderater PD vorherig bei 53,6 %. Ein ähnlicher Trend konnte auch bei jüngeren Senioren im Alter von 65 bis 74 Jahren beobachtet werden. Hier wurde die Prävalenz einer schweren PD 2005 noch mit 44,1 % und 2014 mit 19,8 % angegeben. Jedoch herrscht in der älteren Bevölkerungsgruppe ein insgesamt höheres Erkrankungsniveau der PD. Im Zuge der demographischen Entwicklung wird vermutet, dass es zukünftig einen erhöhten Therapiebedarf gibt, auch wenn die Parodontitisprophylaxe sich bereits jetzt positiv auf die parodontale Gesundheit auszuwirken scheint. Die weitere Entwicklung bleibt abzuwarten, die Erhebungen zum DMS VI beginnen ab Januar 2021 [24].

Zum internationalen Vergleich innerhalb der westlichen Bevölkerung wurde in den Vereinigten Staaten von Amerika im Zeitraum von 2009 bis 2012 eine Prävalenz der PD von 45,9 % bei allen Erwachsenen ab 30 Jahren angegeben. In der untersuchten Population von 141 Millionen Erwachsenen konnte bei 8,9 % eine schwere PD und bei 37,1 % eine PD geringerer Schwere nachgewiesen werden [25].

Die PD verläuft in der Frühphase meist asymptomatisch. Auch wenn eine Gingivitis strenggenommen von der PD abgegrenzt wird, ist häufig eine Gingivitis durch eine progrediente Schwellung und Rötung der Gingiva in der Frühphase einer PD zu beobachten. Bei mechanischer Belastung kann Zahnfleischbluten auftreten, ebenso können Absonderungen aus dem Sulcus gingivalis auftreten. Wenn die Gingivitis zu einem Ablösen des Zahnfleisches vom Zahn führt, herrschen in diesen neuentstandenen Zahntaschen ideale Bedingungen für die weitere Ansiedelung von pathogenen Bakterien, die zu einer Aggravierung des Attachmentverlustes führen können.

Der Inflammation des Zahnhalteapparates unterliegen komplexe Mechanismen [26]. Als Ursache wird heute von einer oralen Dysbiose im Bereich des Sulcus gingivalis mit einer verminderten Diversität der Bakterienspezies zugunsten gram-negativer Bakterien ausgegangen [26,

27]. Dabei kommt es zur Bildung eines Biofilmes. Hierbei spielen *Pg* und *Aa* als „keystone“-Pathogene eine wichtige Rolle, auch wenn *Pg* als alleiniger Auslöser einer PD, wie in der Vergangenheit angenommen, heute kritischer diskutiert wird. Als Grundlage für die Ansiedlung von *Aa* und *Pg* sind isoliert nicht pathologische, sogenannte „akzessorische“ Spezies, notwendig. Zu diesen zählt beispielsweise *Streptococcus gordonii* [28, 29]. Dieses Erregerspektrum steht in ihrer Gesamtheit in einem symbiontischen Gleichgewicht. Es entsteht ein Mikromilieu mit destruierender Entzündungsreaktion zunächst der Gingiva und im Verlauf des Zahnhalteapparates, was zu alveolärem Knochenverlust führen kann. Dieses Milieu unterliegt einem komplexen Zusammenspiel aus bakteriellen Virulenzfaktoren, einer übermäßigen Aktivierung des Komplementsystems, als auch ausgeschütteten Transmittern des körpereigenen Immunsystems. Hier seien die Zytokine TNF- α , TNF- β , IL-17 und IL-1 erwähnt, die, vermittelt durch bakterielle Lipopolysaccharide (LPS), durch aktivierte Fibroblasten und Monozyten ausgeschüttet werden [26]. In ihrem Zusammenspiel aus proinflammatorischen und antiinflammatorischen Funktionen stehen die involvierten Zytokine in einem Ungleichgewicht zu Gunsten einer Entzündung. Auch neutrophile Granulozyten werden in die entstandenen parodontalen Taschen rekrutiert [26, 30]. Diese fördern den Abbau des Zahnhalteapparates und des Knochengewebes durch vermehrte Differenzierung von Ostoklasten [26, 31, 32]. Gleichzeitig schützt der entstandene Biofilm mit einer schwer durchschreitbaren Extrazellulärmatrix dieses Mikromilieu vor äußeren Einflüssen durch das Immunsystem oder einer eingeleiteten antibiotischen Therapie. Daher kann der Entzündungsprozess nur schwer eingedämmt werden [26].

Die bakterielle Dysbiose führt jedoch nur in für PD anfälligen Individuen zur Krankheitsausprägung. Gesunde Menschen können massiven zahnassoziierten Biofilm aufweisen, andere dagegen erkranken mit nur geringem Biofilm an starker PD. Vor diesem Hintergrund werden auch genetische Faktoren und eine virale Beteiligung mechanistisch diskutiert [33]. Zu den verdächtigen Viren zählen zum Beispiel Herpes simplex, Cytomegalie- oder Epstein-Barr-Viren [34]. Dies macht deutlich, dass die PD nicht monokausalen Ursprungs ist. Supportiv werden auch Lifestyle-Faktoren wie Rauchen und eine einseitige, ungesunde Ernährung als Risikofaktoren angenommen.

Diagnostiziert wird die PD durch die Untersuchung der Zahnwurzeln bzw. des Sulcus gingivalis mittels einer Sonde. Dabei spielt der CAL eine bedeutende Rolle. Die Fallfindung differiert im internationalen Vergleich, je nach verwendeten Diagnosekriterien. In dem International Workshop for a Classification of Periodontal Diseases and Conditions der American Academy of Periodontology wurde 1999 die Klassifikation der parodontalen Erkrankungen festgelegt [35].

2018 gab es eine Erneuerung der Klassifikation in transatlantischer Zusammenarbeit der American Academy of Periodontology und der European Federation of Periodontology [36]. Folgende Formen der PD werden demnach unterschieden:

1. Nekrotisierende Parodontitis
2. Parodontitis als Manifestation einer systemischen Erkrankung
3. Parodontitis
 - a. Stadieneinteilung nach Schwere und Komplexität des klinischen Managements
 - b. Ausbreitung: lokalisiert, generalisiert, Molar- oder Schneidezahnverteilung
 - c. Graduierung nach Progression und Therapieansprechen

Im Gegensatz zur Klassifikation von 1999 wird nun eine isolierte Gingivitis von der PD klarer abgegrenzt. Auch ein stabiler PD-Patient wird nach erfolgreicher Therapie bei klinisch gingivaler Gesundheit niedriger eingestuft, somit ist einem Therapieerfolg mehr Rechnung getragen. Die Fallfindung erfolgt, indem entweder ein interdentaler CAL an zwei oder mehr, nicht benachbarten Zähnen festgestellt wird. Alternativ muss bukkal oder oral ein CAL ≥ 3 mm mit Taschenbildung von ≥ 3 mm an zwei oder mehr Zähnen nachweisbar sein. Der CAL darf in diesem Fall jedoch keine erkennbare andere, nicht PD-bedingte Ursache aufweisen [23].

Das langfristige Ziel einer erfolgreichen Parodontitistherapie ist eine Reduktion der bakteriellen Besiedelung und die Vermeidung einer Biofilmbildung. Dies kann zunächst konservativ mittels Verbesserung der Mundhygiene oder durch mechanische Entfernung von Plaque auf der Wurzeloberfläche erzielt werden. Auch lokale Antiinfektiva oder systemische Antibiotika sowie neuere ultraschall- oder lasergestützte Systeme können eingesetzt werden. Kommt es dennoch zu einer Verschlechterung der Symptomatik oder ist die parodontale Läsion zu groß, kann eine operative Therapie erwogen werden. Als ultima ratio ist eine Zahnextraktion bis zur Knochenresektion anzusehen [37].

Über das lokale Geschehen am Zahnhalteapparat hinaus wurden bei schwerer PD auch systemische Folgen beobachtet. So ist das Risiko für Atherosklerose, ungewollte Schwangerschaftsabbrüche, Aspirationspneumonien, Krebserkrankungen und rheumatoider Arthritis erhöht [38, 39, 40, 41]. Dieser Beobachtung wird auch in der obigen Klassifikation Rechnung getragen: „Parodontitis als Manifestation einer systemischen Erkrankung“.

2.4 PARALLELARBEIT UND ZIELSETZUNG

Die oben beschriebenen Pathomechanismen der RA und PD weisen gewisse Gemeinsamkeiten auf, beide Erkrankungen zeichnen sich durch eine fehlgerichtete Immunantwort aus und können mit den bakteriellen Pathogenen *Pg* und *Aa* gemeinsame ursächliche Faktoren aufweisen. Es bleibt bisher jedoch unklar, ob die beiden Erkrankungen sich in ihrer Entstehung gegenseitig bedingen oder diese lediglich die gleichen prädisponierenden Faktoren teilen.

Um dies näher zu untersuchen bediente sich diese experimentelle Arbeit eines Mausmodells. Dabei wurde hier die Parodontitis zeitlich nach der Arthritis in Form der Kollagen-induzierten Arthritis (CIA) und der oralen Inokulation von *Pg* und *Aa* ausgelöst. Zu dieser hier vorliegenden Arbeit entstand eine Parallelarbeit von Dr. med. Anna-Lena Buschhart. Beide Arbeiten sind in einem gemeinschaftlichen Zusammenhang zu interpretieren und wurden 2020 in Form eines wissenschaftlichen Papers veröffentlicht [42].

Die Grundlage der Versuche waren die Ergebnisse von Dr. med. Meinolf Ebbers aus derselben Arbeitsgruppe: In seinen Experimenten in der Maus folgte die Arthritis zeitlich auf eine bereits induzierte PD. Hier zeigte sich, dass mittels *Aa* und *Pg* durch ein mehrtägiges Regime der oralen Inokulation jeweils ein suffizienter alveolärer Knochenverlust erzielt und mittels μ CT quantifiziert werden konnte. Zudem wurde erkennbar, dass die Arthritisinzidenz und -schwere abhängig von dem jeweils oral inokulierten Erreger ist. Eine einmalige Messung der Zytokinspiegel am Ende der zwölfwöchigen Beobachtungszeit ergab keine belastbaren Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen [43]. Folglich wurde die Analyse der Zytokine in der vorliegenden Arbeit auf insgesamt fünf Beobachtungszeitpunkte und die gesamte Dauer des Experimentes von 15 Wochen ausgedehnt. Das gemeinsame Ziel der Versuche ist es gewesen, die Auswirkungen der Arthritis auf die Parodontitis im zeitlichen Ablauf der Erkrankungen zu untersuchen. Dabei wurde ein besonderes Augenmerk auf die Entwicklung der Zytokinspiegel im Verlauf unserer Versuche gelegt. In der Parallelarbeit wurde die Arthritis nach der Parodontitisinduktion ausgelöst – in umgekehrter Reihenfolge zum Versuchsaufbau in dieser Arbeit.

Diesem Vorhaben wurden 4 Hypothesen vorangesetzt:

1. Beide Erkrankungen verstärken jeweils die Pathogenese der anderen.
2. *Porphyromonas gingivalis* und *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* zeigen jeweils unterschiedliche Wirkungen auf die Erkrankungen mitsamt ihrem Verlauf.
3. Die Zytokinspiegel verändern sich in Abhängigkeit der Krankheitsphase.
4. Das Proteom der Synovia unterliegt einer Veränderung im Zuge der unterschiedlichen Krankheitsexposition.

III. MATERIAL

3.1 VERBRAUCHSMATERIALIEN

TABELLE 4: VERBRAUCHSMATERIALIEN

PRODUKT	HERSTELLER	ARTIKELNUMMER
BD Microlance 3 (26G 1/2“)	Becton, Dickinson and Company	303800
BD Microlance™ 3 (25G 1“, Nr. 18)	Becton, Dickinson and Company	300400
Bepanthen Augensalbe	Bayer AG	01578675
Deckgläser (24x50 mm, Nr. 1)	Thermo SCIENTIFIC	MEZ 102450
End-to-End Kapillare 20 µL K2E	Sarstedt AG&Co.	19.447
Gewebeeinbettkassetten, hellblau	Kabe Labortechnik GmbH	053761
LEGENDplex™ Mouse Inflammation Panel (13-plex)	BioLegend® Inc.	740446
Objektträger Histobond®+	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG	0810421
Omnifix®-F (0,01-1 mL)	B.Braun Meisungen AG	9161406V
Peha-soft® nitrile fino powderfree	Paul Hartmann AG	9422211
Pipettenspitzen PP 1.000 µL	Nerbe plus GmbH	07-368-2015
Pipettenspitzen PP 20 µL	Nerbe plus GmbH	07-372-2015
Pipettenspitzen PP 200 µL	Nerbe plus GmbH	07-376-2015
Reaktionsgefäße ROTILABO®	Carl Roth GmbH & Co. KG	5913.1
Spritzenfilter 0,2 µm	Integra Biosciences GmbH	156608
Surgical Disposable Scalpel (Figur 11)	B.Braun AESCULAP® AG	08112285
Zentrifugenröhrchen CELLSTAR® 15 mL	Greiner Bio-One GmbH	188241
Zentrifugenröhrchen CELLSTAR® 50 mL	Greiner Bio-One GmbH	227270
ZymoBIOMICSTM DNA Miniprep Kit	Zymo Research Europe GmbH	D4300

3.2 CHEMIKALIEN

TABELLE 5: VERWENDETE CHEMIKALIEN

PRODUKT	HERSTELLER	ARTIKELNUMMER
Adjuvant Incomplete Freund	Becton, Dickinson and Company	263910
Bepanthen Augen- und Nasensalbe	Bayer Vital GmbH	PZN 1578681
Brain heart infusion medium	BHI, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA	
Cotrim K-ratiopharm® 240 mg/ 5 mL Saft	Ratiopharm GmbH	PZN 3788230
Formafix 4 % gepuffert	Grimm med. Logistik GmbH	F10010G
Immunization Grade Bovine Type II Collagen (lyophilized)	Chondrex, Inc.	CHX-20021
Ketamin 10 %	PHARMANOVO GmbH	
Mycobacterium tuberculosis H37Ra	Becton, Dickinson and Company	231141
Rompun 2 % (Xylazin)	BAYER	80721102
Sodium Carboxymethylcellulose	Sigma-Aldrich	
Tramadol-ratiopharm® 100 mg/mL Tropfen	ratiopharm GmbH	6181103
Trypsin	Promega	V5111
TWEEN® 20	Sigma-Aldrich	P1379
Usedecalc®	Medite GmbH	REF 40-3310-00

3.3 GERÄTE

TABELLE 6: VERWENDETE GERÄTE

PRODUKT	HERSTELLER
Anthos htIII Fotometer	Anthos Labtec Instruments
AxioCam MRc 5	Carl Zeiss AG
Axioskop 40	Carl Zeiss AG
Bioanalyzer DNA 1000 Chip	Agilent Technologies
Centrifuge 5418 R	Eppendorf AG
Eppendorf Reference 1000 µL Pipette	Eppendorf AG
Eppendorf Reference 2 µL Pipette	Eppendorf AG
Eppendorf Reference 20 µL Pipette	Eppendorf AG
Eppendorf Reference 200 µL Pipette	Eppendorf AG
EWJ Präzisionswaage	KERN & SOHN GmbH
FACSVerse™	Becton, Dickinson and Company
Hyrax M 55 Mikrotom	Carl Zeiss AG
Magnetrührer	Heidolph Instruments GmbH
microCT Skyscan 1076	Bruker Corporation
MiSeq	Illumina Inc.
nanoAcquity UPLC System	Waters Co.
NanoDrop ND-1000	Thermo Fisher Scientific Co.
Precellys® Homogenisator	Bertin Technologies
Qubit DNA Kit	Thermo Fisher Scientific Co.
Qubit Fluorometer	Thermo Fisher Scientific Co.
Qubit Protein Assay	Thermo Fisher Scientific Co.
Synapt G2-S Massenspektrometer	Waters Co.
Thermomixer compact	Eppendorf AG
Wild M715 Mikroskop	LEICA Microsystems GmbH

3.4 BAKTERIELLE ERREGER

TABELLE 7: VERWENDETE BAKTERIELLE ERREGER

ART	ABKÜRZUNG	STAMM
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	<i>Aa</i>	DSMZ 11123
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	<i>Pg</i>	W83

3.5 SOFTWARE

TABELLE 8: VERWENDETE SOFTWARE

PRODUKT (VERSION)	HERSTELLER	VERWENDUNGSZWECK
CT Analyser	Bruker	Messung
ZEN 2 lite	Carl ZEISS AG	Mikroskopie
SPSS Statistics (27)	IBM	Statistische Analyse
R (4.0)	R Core Team	Hauptkomponentenanalyse
Numbers (6.2.1)	Apple Inc.	Datendokumentation
NRecon (1.7.3.1)	Bruker	3D Rekonstruktion
Data Viewer (1.5.6)	Bruker	Ausrichtung, ROI
Progenesis QI for Proteomics (4.1)	nonlinear DYNAMICS	Proteomanalyse
1076 Control (4.3)	Bruker	Computertomographie
Mothur (1.43.0)	open source (Dr. Schloss)	Mikrobiomanalyse
SigmaPlot (13.0)	Systat Software Inc.	Statistische Analyse
Microsoft Excel (16.35)	Microsoft	Datendokumentation
Microsoft PowerPoint für Mac (16.35)	Microsoft	Abbildungen / Verteidigung
Microsoft Word für Mac (16.35)	Microsoft	Dissertationsschrift

IV. METHODEN

4.1 VERSUCHSAUFBAU

Der Teil der Experimente, der in dieser Arbeit vordergründig beschrieben wird, beinhaltet die Induktion der Arthritis zeitlich vor der Parodontitisinduktion. Die Versuchstiere wurden in fünf Gruppen á acht Tiere eingeteilt. Die Tiere aus drei Versuchsgruppen erhielten eine CIA (Gruppen mit einem „+“ im Namen) und jene aus zwei weiteren Gruppen bekamen keine Induktion der Arthritis (Gruppen mit einem „-“ im Namen). Innerhalb der CIA Gruppen wurden die Tiere anschließend mit *Pg*, *Aa* oder als sham-Gruppe nur mit Trägerlösung oral inokuliert (abgekürzt mit *Pg*, *Aa* oder *Sh* im Gruppennamen). Innerhalb der Gruppen ohne CIA erfolgte ebenfalls die orale Inokulation mit *Aa* oder *Pg* (Abb. 1). Vor dem Hintergrund der Reduktion der Versuchstiere wurde bereits bei der Beantragung der Versuche eine gemeinsame Kontrollgruppe (*Sh*-) gewählt. Diese durchlief die unterschiedlichen Phasen des Versuches analog zu dem Aufbau des Parallelversuches und damit in umgekehrter Reihenfolge der oben genannten Versuchsgruppen (Abb. 2).

Die Versuchstiere durchliefen in dieser Arbeit verschiedene Phasen, zunächst wurde zur Induktion der Arthritis am Tag 1 die Immunisierung durchgeführt, zur Komplettierung der CIA erfolgte am Tag 22 eine Boost-Injektion.

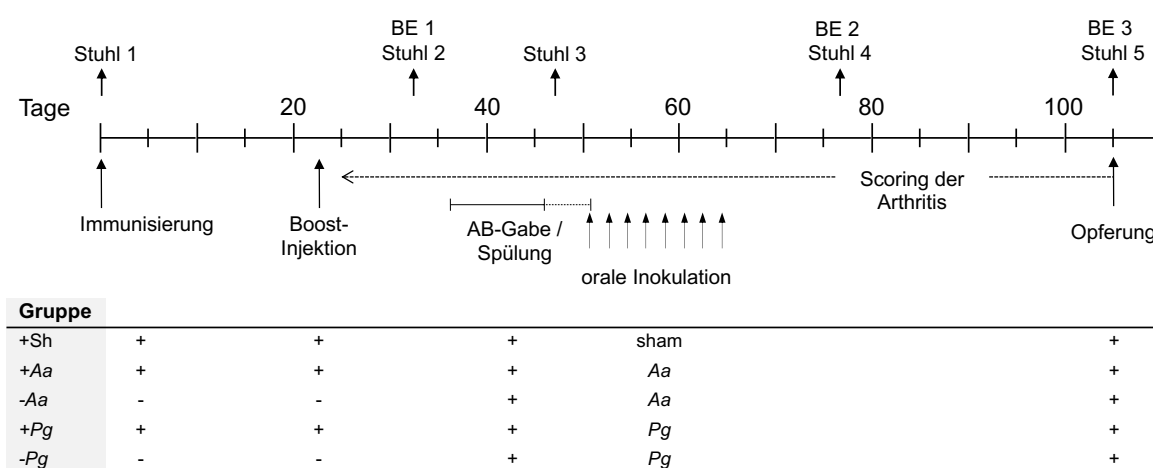


ABBILDUNG 1: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DES VERSUCHSABLAUFS

Oben: Zeitstrahl mit Angabe der Versuchstage. **BE:** Blutentnahmezeitpunkte nummeriert. **Stuhl:** Stuhlentnahmezeitpunkte nummeriert. **AB:** Antibiotikum-Gabe über das Trinkwasser.

Unten: Tabelle mit Versuchsgruppennamen und entsprechender Behandlung im Versuchsablauf, z.B. -Pg: keine Arthritisinduktion und orale Inokulation mit *Porphyromonas gingivalis*, +Sh: Arthritisinduktion und orale sham Inokulation nur mit Trägerlösung.

Zur Induktion der Parodontitis wurde zunächst ab dem Tag 37 mit der oralen antibiotischen Therapie mittels Cotrimoxazol im Trinkwasser begonnen, die den Tieren bis Tag 47 ad libitum zur Verfügung stand. Hierauf folgten drei Tage ohne Antibiotikum im Trinkwasser – als Washout –, um eine eventuelle Elimination der ab Tag 50 eingebrachten Erreger durch verbliebenes Antibiotikum zu vermeiden. Die orale Inokulation erfolgte an acht Terminen im Abstand von jeweils zwei Tagen. Zur Messung der Zytokinspiegel im Verlauf und Antikörperbestimmung am Ende des Versuches erfolgten Blutentnahmen zu drei Zeitpunkten. Die Erste nach der Arthritis- und vor der Parodontitisinduktion am Tag 34, gefolgt von der Zweiten im Verlauf nach der Parodontitisinduktion am Tag 72. Die letzte Blutentnahme fand zum Zeitpunkt der Asservierung am Tag 105 statt. Als Surrogatparameter für die Besiedelung mit den inokulierten Erregern wurde das Darmmikrobiom analysiert. Hierfür erfolgten zu insgesamt fünf Zeitpunkten das Sammeln von Stuhlproben: zu Beginn des Versuchszeitraumes am Tag 1, nach der Boost-Injektion bzw. vor der Antibiotikagabe am Tag 32, während des oralen Washout am Tag 48, im Verlauf nach der Parodontitisinduktion am Tag 70 und schließlich am letzten Tag 105. Beendet wurde das Experiment am Tag 105 mit den o.g. letzten Stuhl- und Blutentnahmen sowie Asservierung weiterer Gewebe (Abb. 1).

Bei der gemeinsamen Kontrollgruppe fand das Protokoll der Parallelarbeit Anwendung, bei dem vom Tag 1 bis 10 die antibiotische Behandlung erfolgte, die orale Inokulation unter sham-Bedingungen an jedem zweiten Tag vom Tag 14 bis 28. Die Blutentnahmezeitpunkte wurden zudem etwas an das Protokoll angepasst. Der Beobachtungszeitraum von 105 Tagen blieb der gleiche (Abb. 2).

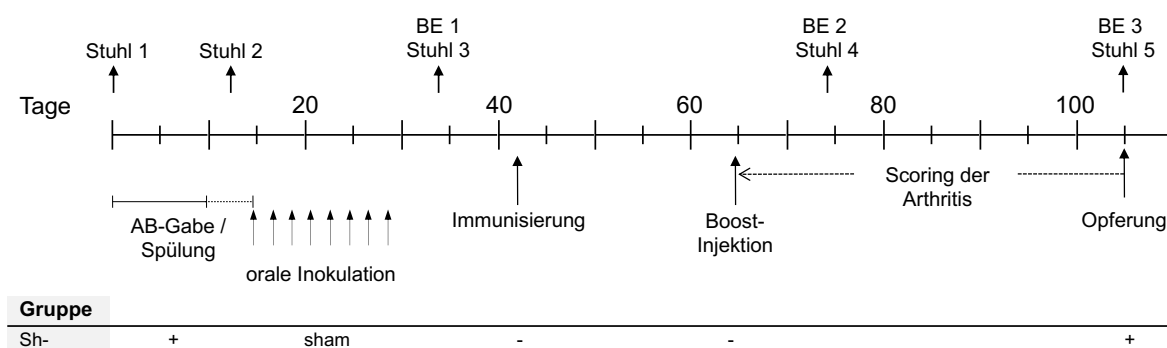


ABBILDUNG 2: VERSUCHSABLAUF DER KONTROLLGRUPPE BZW. DES PARALLELVERSUCHES

Oben: Zeitstrahl mit Angabe der Versuchstage. Abkürzungen Analog zu Abb. 1.

Unten: Versuchsgruppenname und entsprechende Behandlung im Versuchsablauf Sh-: orale sham Inokulation nur mit Trägellösung und keine Arthritisinduktion.

4.2 VERSUCHSTIERE

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Versuchstiere sind Mäuse der F1 Generation aus den Stämmen DBA/1J und B10Q. Diese zeigten sich sowohl gegenüber des alveolären Knochenverlustes als auch der CIA empfänglich [43]. Zudem wurden aus der F1 Generation nur männliche Tiere in den Versuch aufgenommen, um einen potenziellen Einfluss unterschiedlicher Geschlechtshormone auszuschließen.

Die Tiere stammen ursprünglich aus der Harlan Winkelmann GmbH (Borchen, Deutschland). Die weitere Zucht erfolgte unter SPF-Bedingungen im Institut für experimentelle Chirurgie der Universität Rostock. Während der Versuche wurden die Tiere in Käfigen mit einer Grundfläche von 530 cm², in Gruppen von zwei bis maximal vier Tieren gehalten. Die Käfige wurden einzeln belüftet (IVC), um eine Kreuzkontamination zu verhindern. In diesem Tierversuchsraum lag die Luftfeuchtigkeit bei 55 % ± 10 % und die Temperatur bei 26 °C ± 4 °C. Die IVC unterlagen einer der Norm entsprechenden Luftwechselrate. Die Käfige wurden mindestens einmal wöchentlich oder bei sichtbarer Verschmutzung gereinigt und mit frischer Einstreu sowie Nistmaterial bestückt. Trinkwasser in Form von Leitungswasser und Standardfutterpellets standen den Tieren zu jeder Zeit ad libitum bereit. Einzige Ausnahme war eine Stunde Flüssigkeits- und Nahrungsrestriktion nach der oralen Inokulation. Eine Erneuerung der Trinkflaschen erfolgte nach wenigen Tagen, die des Futters nach Bedarf oder bei Käfigwechsel. Die durchgeführten Versuche wurden durch das Landesamt für Landwirtschaft, Lebensmittelsicherheit und Fischerei Mecklenburg-Vorpommern; (www.lallf.de) am 20.03.2018 unter dem Aktenzeichen 7221.3-1-071/17 genehmigt. Alle Experimente wurden gemäß den gängigen Richtlinien und Gesetzen durchgeführt [44, 45]

4.3 ZUCHT UND AUFBEREITUNG DER BAKTERIEN

Die verwendeten bakteriellen Erreger wurden aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie, Virologie und Hygiene des Universitätsklinikums Rostock bezogen. Ein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Bernd Kreikemeyer, Dr. Katharina Ekat und Jana Bull.

Porphyromonas gingivalis W83 (Pg) wurde in Peptone Yeast Extract Glucose (PYG) Broth unter Zugabe von 5 mg/ml Hemin sowie 1 % Vitamin K unter anaeroben Bedingungen (10 % CO₂, 10 % H₂, 80 % N₂) kultiviert. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa) wurde in Brain Heart Infusion (BHI) Medium bei 37 °C in einer auf 5% CO₂ aufgesättigten Raumluftatmosphäre kultiviert. Beide Arten wurden bis zum Erreichen der logarithmischen Phase ange-

züchtet. Nach Zentrifugation und Verwerfen des Überstandes wurden ca. 2×10^9 koloniebildende Einheiten (KBE) mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) gewaschen und in 2 mL Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) resuspendiert und jeweils in Aliquots bei -80°C bis zur weiteren Verwendung verwahrt. Um eine konstante Anzahl an KBE bei der Verwendung der Erreger zu garantieren, wurden im Abstand von sechs Wochen jeweils ein Aliquot pro hergestellter Charge ausplattiert und konsekutiv die lebenden KBE ausgezählt.

4.4 ANÄSTHESIE DER VERSUCHSTIERE

Während der Versuche war es für einige Prozeduren notwendig, die Versuchstiere in Allgemeinanästhesie zu versetzen. Dazu zählten die oralen Inokulationen zur Parodontitisinduktion, die Blutentnahmen sowie die Entnahme aus dem Experiment. Das diente einerseits zur Minderung der entstandenen Schmerzen, Belastung bzw. Stress, andererseits zur Vermeidung von Aspiration und zur sicheren Fixierung der Tiere während der Eingriffe.

Auf Grund der niederschweligen technischen Umsetzung wurde bei dieser Arbeit die Narkose mit Ketamin und Xylazin durchgeführt. Hierzu wurden die Tiere mit jeweils 90 mg Ketamin und 6 mg Xylazin pro kg Körpergewicht narkotisiert. Beide Medikamente sind in der Tiermedizin weit verbreitet und zeichnen sich durch ein vorteilhaftes Wirkungs- und Nebenwirkungsspektrum aus. So ist beispielsweise das Risiko einer Atemdepression deutlich niedriger, sodass eine externe Sauerstoffzufuhr nicht notwendig ist und der kardiovaskuläre Kreislauf aufrecht bleibt. Damit war unter anderem eine gute Organperfusion bei der Blutentnahme gewährleistet.

Praktisch wurde wie folgt vorgegangen: 0,6 mL Ketamin und 0,2 mL Xylazin wurden mittels 1 mL Spritzen und 25G Kanülen aus den Stechampullen entnommen, dabei wurde das Totraumvolumen der Koni berücksichtigt. Das Xylazin wurde dann in die mit Ketamin gefüllte Spritze überführt und durch Schwenken zur fertigen Lösung gemischt. Die Applikation erfolgte gewichtsadaptiert intraperitoneal im Zwangsgriff. Bis zum Eintritt der Wirkung wurde das Tier in den Käfig zurückgesetzt. Die Tiefe der Narkose konnte durch unschädliche und gezielte Schmerzreizsetzung überprüft werden, beispielsweise indem Druck auf den Zwischenzeherraum ausgeübt wurde. Bei ausbleibender Reaktion wurde von einer ausreichenden Tiefe der Narkose ausgegangen. Während der Zeit der Narkose wurden die Augen der Tiere – bei nicht vollständigem Lidschluss unter der Narkose – mit dexpanthenolhaltiger Augensalbe feucht und die Körpertemperatur der Versuchstiere mittels Infrarotlicht konstant gehalten.

4.5 KOLLAGEN-INDUZIERTE ARTHRITIS

Bei dem Modell der Kollagen-induzierten Arthritis (CIA) wurde dem Protokoll von Brand et. al. gefolgt [46]. Zur Induktion der Arthritis wurde den Versuchstieren zu zwei Zeitpunkten bovines Kollagen in Verbindung mit einem Adjuvanz injiziert, die erste Injektion wird nachfolgend Immunisierung und die zweite Boost-Injektion genannt. In diesem Versuchsaufbau wurde am ersten Tag des Experimentes die Immunisierung mit Kollagen in Emulsion mit komplettem Freund Adjuvanz (CFA) und drei Wochen später am Tag 22 die Boost-Injektion mit Kollagen in inkomplettem Freund Adjuvanz (IFA) durchgeführt.

Zur Herstellung des injizierbaren Kollagengemisches wurde im ersten Schritt 10 mg bovines Kollagen Typ II unter einer Sterilwerkbank mit 5 mL 0,1 M Essigsäure (pH 2,88) versetzt. Die Essigsäure wurde vorher durch einen sterilen 0,2 µm Filter geleitet, um eventuelle Unreinheiten zu entfernen. Das Kollagen löste sich bei 4 °C über etwa 12h unter leichtem Rühren mittels eines Magnetrührgerätes in der Essigsäure. Es entstand eine klare, ungetrübte Lösung. Die Kühlung sorgte in erster Linie dafür, dass das Protein nicht denaturiert. Im Anschluss wurde das gelöste Kollagen in handhabbare Volumina aufgeteilt, in 500 µL Reaktionsgefäße überführt und bei -20 °C eingefroren. Die Volumina richteten sich nach der Anzahl der in einer Sitzung zu immunisierenden Tiere – zwei Tiere entsprechen unter Berücksichtigung von etwaigen Verlusten (Totraum der Spritzen und Kanülen etc.) etwa 300 µL, vier Tiere 500 µL.

Im zweiten Schritt wurden die Adjuvanzen vorbereitet: Es ist das inkomplette (IFA) von dem kompletten Freund Adjuvanz (CFA) zu unterscheiden. Zur Herstellung von CFA wurden 25 mL IFA mit einer Ampulle (100 mg) hitzeattenuierten *Mycobacteria tuberculosis*, welches in Pulverform vorlag, unter einer Sterilwerkbank versetzt, kräftig geschwenkt und über etwa 12 h gelöst. Die Adjuvanzen wurden bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C gelagert.

Zur Immunisierung und Boost-Injektion wurden im dritten Schritt die Kollagenlösung und das jeweilige Adjuvanz am Tag der Verwendung emulgiert. Bei der Immunisierung am Tag eins des Versuches wurde die bei Raumtemperatur aufgetaute Kollagenlösung in eine 1 mL Spritze aufgenommen. CFA wurde in gleichem Volumen in eine zweite Spritze aufgezogen. Mittels eines Adapters, mit dem sich zwei Luer-Koni verbinden ließen, wurde der Spritzeninhalt der einen Spritze in die Zweite überführt und umgekehrt. Durch mehrmaliges (etwa 50-fach) Überführen der Lösungen entstand eine stabile Emulsion (Abb. 3 A und B).

Dabei war darauf zu achten, dass zum einen die Spritze mit der Kollagenlösung zuerst entleert wird, zum anderen, dass der Vorgang zügig abläuft, um ein Verstopfen des Adapters zu ver-

meiden. Zur Überprüfung der Stabilität wurde ein Tropfen der Lösung auf eine ruhige Wasseroberfläche gegeben. Wenn der Tropfen intakt auf der Wasseroberfläche schwamm, konnte von einer stabilen Emulsion ausgegangen werden. Hat sich die Emulsion hingegen schnell aufgelöst und an der Wasser-Luft-Grenzschicht verteilt, musste weiter über den Adapter emulgiert werden (Abb. 3 C und D). Für die Stabilität der Emulsion hat sich gezeigt, dass die Spritzen und der Adapter möglichst luftleer sein mussten. Für die Erstellung der Emulsion der Boost-Injektion am Tag 22 wurde analog vorgegangen, mit dem Unterschied, dass IFA anstelle von CFA verwendet wurde.

Im vierten Schritt wurden den Versuchstieren am Tag der Primärimmunisierung in einem Gesamtvolumen von 140 μL 280 μg Mycobacterium tuberculosis und 140 μg bovines Kollagen Typ II in zwei Fraktionen von jeweils 70 μL injiziert. Die Applikation erfolgte jeweils links und rechts der Schwanzbasis in das Subkutangewebe mittels 1 mL Spritze und 26G Kanüle. Das praktische Vorgehen erforderte die Entnahme der Versuchstiere aus ihrem Käfig und Fixierung in einem geeigneten Restrainter, um eine versehentliche Verletzung der Tiere durch ruckartige Bewegungen zu verhindern. Die Stichführung war parallel des Schwanzes zu vollziehen, eine leichte seitliche Verschieblichkeit der Kanüle signalisierte eine sichere Lage im Subkutangewebe. War dies sichergestellt, erfolgte die Injektion (Abb. 3 E). Nach der Injektion verblieb die Spritze wenige Sekunden im Gewebe und wurde unter Drehbewegungen entfernt, um zum einen der Emulsion nach der Komprimierung während der Injektion Zeit zu geben, sich wieder auszudehnen und zum anderen, damit an der Kanülenspritze anhaftende Lösung im Gewebe verblieb.

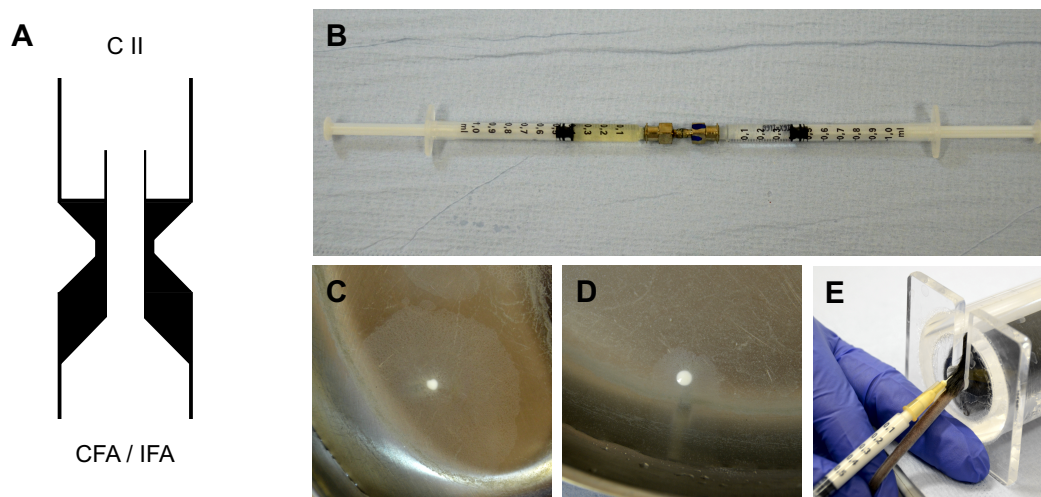


ABBILDUNG 3: ARTHRITISINDUKTION

A: Adapterstück zum Erstellen der Emulsion, das obere Ende mit dem inneren Zylinder wird mit der Spritze mit Kollagen (C II), das untere, welches konisch zuläuft, mit CFA bzw. IFA verbunden. **B:** zusammengesetzter Aufbau der Spritzen (li. CFA/IFA, re. C II mit Adapterstück. **C:** Tropfen einer instabilen Emulsion auf der Wasseroberfläche. **D:** stabiler Tropfen der fertigen Emulsion. **E:** Injektion der fertigen Emulsion in die Schwanzbasis einer im Restrainter fixierten Maus.

Im Anschluss wurden die Tiere in ihren Stall zurückgesetzt und auf Auffälligkeiten im Verhalten beobachtet. Die Dauer des Vorgangs betrug einige Sekunden bis wenige Minuten und wurde mit einer geringen Belastung für die Versuchstiere eingestuft.

Im letzten Schritt der CIA wurde den Versuchstieren analog dem oben beschriebenen Vorgehen 140 µL einer Kollagenemulsion mit IFA statt CFA im Zuge der Boost-Immunisierung an Tag 22 injiziert.

Um die Belastung der Tiere durch die Arthritis möglichst gering zu halten, wurde nach der Boost-Injektion eine Analgesie mittels Tramadol im Trinkwasser eingeleitet. In 400 mL Trinkwasser wurden 0,1 mL Tramal-Tropfen (100 mg / 1 mL) gelöst, dadurch entstand eine fertige Trinklösung mit einer Konzentration von 2,5 mg pro 100 mL, die den Versuchstieren ad libitum zur Verfügung stand.

4.6 INDUKTION DES ALVEOLÄREN KNOCHENVERLUSTES

Für die Untersuchung der Parodontitis wurde sich in dieser Arbeit einem Modell in der Maus zugewandt, welches zu einem entzündlich bedingten, alveolären Knochenverlust führt. Hier wurde orientierend dem Protokoll von Marchesan et al. gefolgt [47]. Die Versuchstiere wurden für zehn Tage mit einem Antibiotikum im Trinkwasser vorbehandelt. Danach sind die Tiere oral mit *Porphyromonas gingivalis* (*Pg*) oder *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (*Aa*) inokuliert worden. Dies erfolgte in Narkose an acht aufeinanderfolgenden Sitzungen im Abstand von zwei Tagen.

Die antibiotische Spülung der oralen Kavität erfolgte mit Cotrim K im Trinkwasser. Der Cotrim K-Saft wurde in einer Konzentration von 1 mL Saft pro 50 mL Trinkwasser verabreicht. Damit erhielten die Tiere eine Dosis von 100 mg Cotrim K pro 100 mL Trinkwasser, dies entspricht 17 mg Trimethoprim und 83 mg Sulfamethoxazol, die beiden Wirkstoffe des Kombinationspräparates Cotrim-K. Die so erstellte Trinklösung stand den Mäusen für zehn Tage (Tage 37 bis 46) ad libitum zur Verfügung, wobei diese an jedem zweiten Tag ausgetauscht wurde. Im Anschluss an die zehn Tage Antibiotikagabe wurde drei Tage normales Trinkwasser verabreicht, um eventuelle Rückstände des Antibiotikums aus der Mundhöhle zu beseitigen.

Für die Inokulation wurden die entsprechenden Aliquots mit den Bakterien (*Pg* / *Aa*) aus dem auf -80 °C gekühlten Gefrierschrank entnommen und im Thermomixer compact für drei Minuten bei 37 °C und 500 rpm aufgetaut. Im Anschluss wurden die Aliquots bei 10.000 rpm für 10

Minuten zentrifugiert. Der Überstand konnte verworfen werden, das zurückbleibende Pellet wurde mit 50 μL 2 % Carboxymethylcellulose (CMC) Lösung via Vortex sowie mehrmaligem „auf-und-ab-pipettieren“ resuspendiert.

Die CMC Lösung wurde im Vorfeld unter sterilen Bedingungen hergestellt, indem 0,1 mg pulverförmiges CMC in 5 mL PBS über Nacht gelöst und bei 4 °C gekühlt aufbewahrt wurde.

Die Lagerung des narkotisierten Tieres erfolgte in Rückenlage auf eine weiche Unterlage. Die Maulöffnung des Tieres wurde mit einer Pipettenspitze an den unteren Nagezähnen offengehalten. Mit einer Mikroliterpipette konnte in Fraktionen von zweimal 25 μL die Bakterienlösung auf Höhe des rechten Unterkiefers in das Vestibulum oris gegeben. Im Anschluss wurde das Tier für 2 Minuten auf die rechte Seite gelagert, danach mit einem Tuch die überstehende Lösung abgewischt und die Tiere auf einer schiefen Ebene auf den Bauch und mit erniedrigtem Kopf in den Stall zurückgelegt (Abb. 4). Diese Maßnahmen erfolgten, damit eine Aspiration der eventuell im Maul verbliebenen Lösung vermieden wird. Um ein zu frühes Auswaschen der Maulhöhle zu unterbinden, wurde den Tieren für eine Stunde nach der oralen Inokulation die Nahrung und das Trinkwasser verwehrt. Für die Durchführung der Inokulation wurde die Belastung der Tiere als gering eingeschätzt.

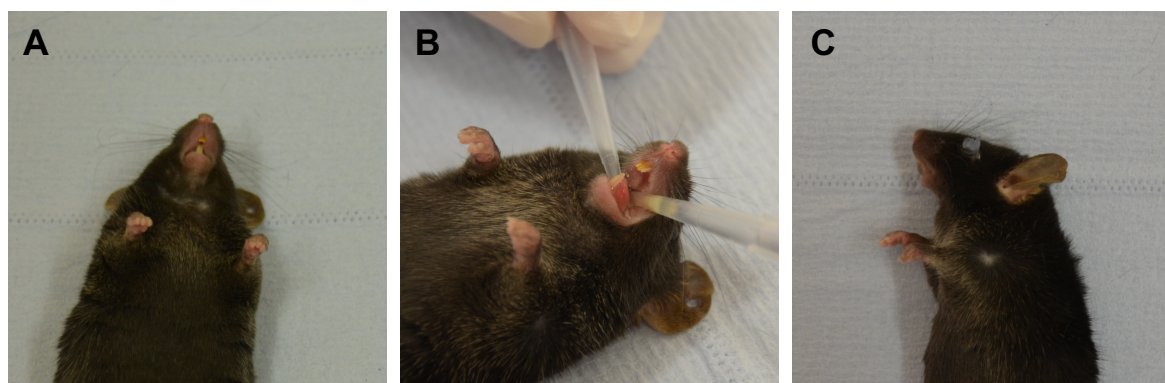


ABBILDUNG 4: DARSTELLUNG DER ORALEN INOKULATION

A: narkotisierte Maus in Rückenlage. **B:** orale Inokulation mittels 200 μL Pipette und einer zweiten Pipettenspitze zum Aufspreizen des Maules. **C:** Rechtsseitenlage nach der Inokulation, Inokulat im Maul, gegen Austrocknung gesalbte Augen.

4.7 BLUTENTNAHME

An drei Zeitpunkten wurde den Versuchstieren unter Allgemeinanästhesie Blut aus dem retrobulbären Venenplexus entnommen. Die erste Blutentnahme erfolgte am Tag 34 zwischen der Induktion der Arthritis und der Parodontitisinduktion, die zweite am Tag 72 nach der Parodontitisinduktion und die dritte am Tag 105 bei der Asservierung.

Das maximal zu entnehmende Volumen richtete sich zum einen nach dem Gewicht der Tiere und zum anderen nach dem zeitlichen Abstand der einzelnen Entnahmen. Hier wurde sich an die Vorgaben der Gesellschaft für Versuchstierkunde GV-SOLAS gehalten. Das Blutvolumen beträgt bei Mäusen 70 mL/kg Körpergewicht, davon dürfen bei Abnahmen im Abstand von mehreren Wochen maximal 10 % entnommen werden. Bei einer Maus mit einer Masse von 35 g entspricht dies unter den bereits genannten Vorgaben 245 μ L Vollblut. Für das Essay werden 50 μ L Serum benötigt. Um die Belastung zu minimieren, wurde das Volumen auf etwa 200 μ L Vollblut reduziert. Damit ist sichergestellt, dass nach der Weiterverarbeitung für die Analyse ausreichend Serum zur Verfügung steht.

Die Entnahme des Blutes erfolgte in Allgemeinanästhesie. In ausreichender Tiefe der Sedierung wurde mit Zeigefinger und Daumen die Nackenfalte gehalten, wodurch eine leichte Stauung der Jugularvenen resultierte. Mittels einer Glaskapillare wurde in den medialen Augenwinkel hinter den Bulbus gestochen und unter Drehbewegungen der venöse Plexus der Orbita punktiert. Das Blut wurde in einem 1,5 mL Reaktionsgefäß aufgefangen, bis das zuvor festgelegte und auf dem Gefäß markierte Volumen erreicht war. Die Entnahme wurde durch das Entfernen der Kapillare beendet. Durch anschließende leichte Kompression des Bulbus mittels eines mit Leitungswasser befeuchteten Tupfers konnte die Blutung gestillt werden. Dieser Eingriff wurde auf Grund der Narkose der Versuchstiere mit einer geringen Belastung eingestuft.

Nach der Abnahme wurde das Vollblut bei Raumtemperatur für 30 min aufrecht gelagert, wodurch es zu einer beabsichtigten Gerinnung der Probe kam. Im Anschluss wurde diese bei 1500 rpm für 10 Minuten zentrifugiert und das nun überstehende Serum in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Bis zur weiteren Analyse wurde das Serum bei -80 °C gelagert.

4.8 MAKROSKOPISCHES SCORING DER ARTHRITIS

Um die Inzidenz und die Schwere der Arthritis zu bestimmen, war es notwendig die Tiere nach der Boost-Injektion einem Assessment im Hinblick auf die Entzündung der Gelenke zu unterziehen. Hinweise auf Schwellungen ergaben sich bereits durch eine genaue Beobachtung der Fortbewegung der Versuchstiere. Hier erwies es sich als sinnvoll, den Gang durch einen leeren, durchsichtigen Käfig von unten zu betrachten.

Für das Scoring wurden die Versuchstiere dann jeden zweiten Tag wenige Sekunden im Zwangsgriff gehalten und die Pfoten begutachtet. Es erfolgte je nach geschwollenem Gelenk der Pfoten eine Verteilung von Punkten. Ein Punkt pro Zehe, zuzüglich jeweils fünf Punkte für die Zehengrund- (distale Pfotenfläche) und die Wurzelgelenke (proximale Pfotenfläche). Dabei wurde bei den Vorderpfoten auf das Scoring der ersten Zehe verzichtet, da sich herausstellte, dass eine isolierte Schwellung der ersten Zehe selten und schwer zu beobachten war. Die räumliche Nähe zwischen Pfotenwurzel und der ersten Zehe ist zu klein (Abb. 5).

So ergab sich je Hinterpfote ein maximaler Score von 15 Punkten und je Vorderpfote ein maximaler Score von 14 Punkten. Auf das ganze Tier bezogen, lag der Maximalscore bei 58 Punkten. Über die 15 Wochen des Versuches wurde von einer maximal mäßigen Belastung ausgegangen.

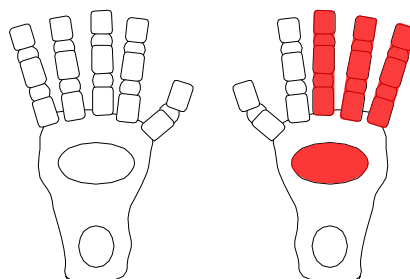


ABBILDUNG 5: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DES ARTHRITISSCORES DER HINTERLÄUFE

Vorlage zur Dokumentation der makroskopisch sichtbaren Arthritis in einem Schema der Hinterpfoten, links dargestellte Pfote ohne Symptome, rechte Pfote mit einem beispielhaften Score von 8 Punkten (Mittelpfote 5 Punkte und drei Zehen mit jeweils einem Punkt). Analog hierzu wurden die Vorderläufe dokumentiert, ohne Berücksichtigung der ersten Zehe.

4.9 ABBRUCHKRITERIEN

Während der antibiotischen Behandlung, der oralen Inokulation der Bakterien, die Woche nach der Primärimmunisierung und der Boost-Immunisierung wurden die Tiere täglich begutachtet. In allen anderen Versuchsphasen – außer der Zustand der Tiere hätte sich verschlechtert – erfolgte eine Kontrolle des Wohlbefindens an jedem zweiten Tag. Insgesamt war eine maximal mäßige Belastung für die Tiere vorgesehen, da jede höhergradige Belastung zu einem humanen Endpunkt für das Tier geführt hätte. In der Tabelle 9 sind die Abbruchkriterien des Versuches aufgeführt, die Summe ergibt sich aus den jeweils addierten höchsten Punktwerten einer jeden Kategorie. Entsprechende Maßnahmen sind am Ende der Tabelle beschrieben.

Im Verlauf dieses Versuches kam es bei einem Versuchstier in der Gruppe Sh- zu einem plötzlichen Versterben. Am Tag 35, der Folgetag des ersten Blutentnahmezeitpunktes, wurde das Tier tot im Käfig aufgefunden. Dies kündigte sich im Vorfeld nicht an, die Maus ist wie jede andere Maus aus der Narkose erwacht und verhielt sich bis zum letzten Kontakt normal.

TABELLE 9: ASSESSMENT DER VERSUCHSTIERBELASTUNG

BEOBACHTUNG	PUNKT- WERTUNG
Körpergewicht bezogen auf den Ausgangswert	
- unbeeinflusst oder Anstieg	0
- Gewichtsreduktion > 10 %	10
- Gewichtsreduktion > 20 %	20
Allgemeinzustand	
- Fell glatt, glänzend; Körperöffnungen sauber	0
- Fell stumpf, ungeordnet, ungepflegte Körperöffnungen, Augen trüb	5
- verklebte oder feuchte Körperöffnungen, anomale Haltung, Augen trüb; hoher Muskeltonus	10
- Krämpfe, Lähmungen; Tier fühlt sich kalt an	20
Spontanverhalten	
- normales Verhalten (Schlaf, Reaktion auf Anblasen oder Berührung, Neugier, Sozialkontakte)	0
- ungewöhnliches Verhalten, eingeschränkte Motorik, Hyperkinetik	5
- Selbstisolation, Lethargie; ausgeprägte Hyperkinetik bzw. Verhaltensstereotypen, Koordinationsstörungen	10
- Schmerzlaute beim Ergreifen; Selbstamputation (Autoaggression)	20
Versuchsspezifische Kriterien	
- keine Auffälligkeiten	0
- leichte Infektionszeichen (Rötung, Schwellung) im Bereich der Mundschleimhaut	5
- Anzeichen einer schweren Infektion der Mundschleimhaut (Ulcera)	20
- offene Wunden im Bereich der Gelenke oder Pfoten	20
Bewertung, Maßnahmen	Summe
- Belastungsgrad 0 – keine Belastung	0
- Belastungsgrad 1 – geringe Belastung, sorgfältig weiter beobachten (Verkürzung der Beobachtungsintervalle)	5 - 10
- Belastungsgrad 2 – mittelgradige Belastung, ggf. tierärztliche Versorgung einleiten (Analgesie)	10 - 20
- Belastungsgrad 3 – hochgradige Belastung, Tierschutzbeauftragten konsultieren, bei mehrtägigem Andauern (ggf. auch sofort) Versuch abbrechen	> 20

4.10 ASSERVIERUNG

Am Tag 105 des Tierversuches wurden die Versuchstiere aus dem Experiment genommen und Gewebeproben gesammelt. Die Asservierung erfolgte unter tiefer Narkose mit Xylazin und Ketamin. War eine ausreichende Tiefe der Narkose erreicht, wurde analog zu vorherigen Blutentnahmen vorgegangen. Zur finalen Blutentnahme konnte dieses Mal ein letales Volumen von 0,7 bis 1 mL Blut entnommen werden. Nach der Blutentnahme wurden die Versuchstiere mittels cervicaler Dislokation euthanasiert. Nun konnten alle Pfoten, die Kieferknochen sowie bei einigen Tieren die Synoviae der beiden Kniegelenke wie folgt gewonnen und konserviert werden: Die Unterkieferknochen wurden mittels bilateraler Durchtrennung der Processus articularia und des umgebenden Weichgewebes entnommen. Dabei war darauf zu achten, dass

die Zähne keine Beschädigung durch das Werkzeug erlitten. Überschüssiges Weichteilgewebe wurde entfernt. Die entnommenen Unterkiefer wurden in ein mit 4 % Paraformaldehyd (PFA) gefülltes Gefäß überführt sowie bei 4 °C fixiert und gelagert. Nach zwei Wochen waren die Kiefer für 30 Minuten mit Leitungswasser zu spülen und in 70 % Ethanol einzulegen. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Kiefer bei 4 °C verwahrt.

Die Pfoten wurden durch möglichst proximale Durchtrennung der Extremitäten vom Rest des Körpers gelöst. Die Haut wurde auf Höhe der Knöchel mitsamt dem Fell zirkulär inzidiert, nach proximal abgezogen und entfernt. Das Weichteilgewebe wurde unter Berücksichtigung der knöchernen Strukturen und unter Aussparung der Pfoten vorsichtig reduziert, um die Dauer der späteren histologischen Aufbereitung zu verringern. Die Pfoten wurden anschließend in Histokassetten gelegt und in diesen in 4 % PFA für 14 Tage fixiert. Daraufhin wurden die Proben bis zur weiteren Verwendung nach einer gründlichen Spülung mit Leitungswasser in 70 % Ethanol überführt und bei Raumtemperatur verwahrt.

Zur Entnahme von Synovialgewebe aus den Kniegelenken wurde mit wenigen Modifikationen dem Protokoll von Valverde-Franco et al. [48] gefolgt. Es wurde unter Sicht mittels eines chirurgischen Mikroskops (Leica M715), unter Zuhilfenahme eines Skalpells Nr. 11 und einer feinen Pinzette gearbeitet. Das Versuchstier wurde auf den Rücken gelegt und die unteren Extremitäten auf der Unterlage in leichter Flexion im Knie mittels Pflasterband fixiert. Es wurde die Haut und das Subkutangewebe entfernt, sodass der Oberschenkel, das Knie und der proximale Unterschenkel bis auf den Muskel frei lagen (Abb. 6). Anschließend erfolgte eine mediale Athrotomie in U-Form.

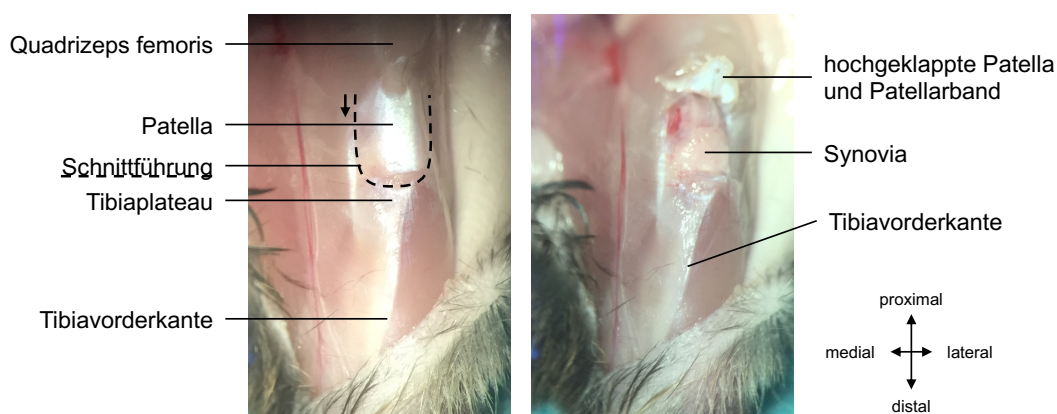


ABBILDUNG 6: DARSTELLUNG DER SYNOVIAENTNAHME

Vergrößerte Darstellung mittels Auflichtmikroskop. **Links:** Operationsgebiet nach Entfernung des Fells, der Haut und Subcutangewebes. Muskeln, Bänder und Sehnen intakt, Schnittführung eingezeichnet, der Schnitt erfolgte in Pfeilrichtung. **Rechts:** Operationsbefund nach dem Schnitt, die Synovia und die Trochlea des Oberschenkelknochens sind nun unter der zurückgeklappten Patella erkennbar.

Ausgehend vom proximalen Pol der Patella erfolgte die Schnittführung medial bis zum medialen Tibiaplateau. Die sichtbare Patellasehne wurde transversal durchtrennt und eine laterale Arthrotomie analog zur medialen durchgeführt. Daraufhin konnte die Kniescheibe mittels Pinzette hochgeklappt werden, sodass die Synovialmembran und die Gelenkkapsel einsehbar waren. Zwei kleine u-förmige Inzisionen wurden um die beiden Trochleae femorales durchgeführt, die abgetrennte Synovialmembran wurde mit einer feinen Pinzette gegriffen und distal herausgeschnitten. Das etwa 0,5 bis 1 mm messende Gewebestück wurde unmittelbar in ein Reaktionsgefäß überführt und mittels flüssigen Stickstoffs für 30 Sekunden schockgefroren und bis zur weiteren Verarbeitung bei -80 °C gelagert.

4.11 SERUMANALYSE

Aus dem Serum wurden in dieser Arbeit zum einen die Zytokinspiegel mittels eines Mouse Inflammation panels der Firma LEGENDplex™ bestimmt, zum anderen wurde ein Enzyme-linked Immunosorbant Assay (ELISA) auf Anti-*Pg*- und Anti-*Aa*-Antikörper durchgeführt.

Die Zytokinbestimmung erfolgte mittels eines Multiplex Kits (LEGENDplex™ Mouse Inflammation panel) der Firma BioLegend®. Damit können laut Hersteller 13 inflammatorische Zytokine (IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-12p70, IL-17A, IL-27, CCL2(MCP-1), IFN- β , IFN- γ , TNF- α und GM-CSF) bestimmt werden. Die Anwendung erfolgte nach den Vorgaben und Handlungsempfehlungen des Herstellers. Zur Quantifizierung der Proben wurde ein FACSVerse™ genutzt. Dabei ist zu beachten, dass vier Versuchstiere pro Gruppe mit jeweils drei Proben ausgewählt wurden, um die Anzahl der Analyte auf eine 96-Well-Platte auftragen zu können. Damit soll eine Vergleichbarkeit der Proben gewährleistet werden, welche bei Verwendung mehrerer Platten nur eingeschränkt möglich ist.

Mittels der in unserer Arbeitsgruppe etablierten ELISA wurden die IgG-Antikörper gegen *Pg* und *Aa* aus den Sera der Mäuse halbquantitativ bestimmt. Dabei gilt besonderer Dank Dr. Johann Volzke für seine freundliche Unterstützung bei der Planung und Durchführung der Analysen. Die Sera für diese Analyse stammen aus der finalen Blutentnahme an Tag 105 der Versuche.

In der Vorbereitung der Analysen wurden 96-Well-Platten mit *Pg*- und *Aa*-Antigenen beschichtet. Dazu wurden jeweils zwei Aliquots mit insgesamt 4×10^9 KBE/mL *Aa* und 2×10^{10} KBE/mL *Pg* bei 10.000 rpm zentrifugiert, der Überstand verworfen und die entstandenen Pellets mit 800 μ L Carbonatpuffer (50 mM, pH 9,4), 1 mM EDTA und einem Proteaseinhibitor (Ro-

che/Sigma Nr: 04693159001) resuspendiert. Anschließend wurden 250 µg Glasbeads hinzugefügt und dreimalig für jeweils 30 Sekunden bei 6.000 rpm homogenisiert. Zwischen den einzelnen Durchläufen wurden die Aliquots für wenige Minuten direkt auf ein Eisbett gelegt bis der Homogenisator (Precellys 24) wieder einsatzbereit war.

Anschließend erfolgte ein Bradford-Assay zur Bestimmung des Proteingehalts. 100 µL dieses Proteingemischs mit einer Proteinkonzentration von 1 µg/mL wurde auf die 96-Well Platten aufgebracht und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Im Anschluss an die 3-maligen Waschvorgänge mit 0,05 % TWEEN-20 in PBS am folgenden Tag wurden die restlichen nicht belegten Bindungsstellen der Platten mittels 2 % Bovinem Serumalbumin (BSA) in PBS für eine Stunde bei Raumtemperatur blockiert. Es folgten erneut drei Waschvorgänge wie oben beschrieben mit TWEEN-20 in PBS. Auf die so präparierten 96-Well Platten wurden daraufhin die 1:200 in 1 % BSA in PBS Lösung verdünnten Sera der jeweiligen Individuen gegeben. Als Positivkontrolle diente ein Pool aller Sera der mit einem Erreger inokulierten Tiere, die Negativkontrolle wurde mit 1 % BSA in PBS Lösung durchgeführt. Alle Proben wurden für 1,5 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert, bevor sie abermals dreimalig gewaschen wurden. Nun erfolgte die Applikation von Peroxidase-gekoppelten Detektionsantikörpern (Rabbit F(ab')₂ anti-Maus IgG:HRP, 1:2000) mit anschließender Inkubation bei Raumtemperatur für eine Stunde. Nach erneuter Waschung wurde die Detektionsreaktion mit TMB / H₂O₂ gestartet, bei dem ein blauer Farbumschlag zu beobachten war. Nach 12 Minuten wurde durch Zugabe von Schwefelsäure die Reaktion gestoppt und es wurde ein gelber Farbumschlag sichtbar. Mittels des Millenia Kinetic Analysers wurde die Extinktion mit Licht der Wellenlänge 450 nm quantifiziert.

4.12 BESTIMMUNG DES ALVEOLÄREN KNOCHENVERLUSTES

Zur Bestimmung des alveolären Knochenverlustes dienten die Protokolle von Dr. med. Meinolf Ebbers und Dr. med. Paul Lübcke als Orientierung [43, 49], denen an dieser Stelle ein besonderer Dank für die Einarbeitung in diese Methode gilt.

Die Entnahme und Verwahrung der Unterkiefer erfolgten wie in Kapitel 4.10 beschrieben. Vor der weiteren Analyse wurden die Kiefer mit klarem Wasser gewaschen und für 24 Stunden in 0,9 % NaCl-Lösung eingelegt.

Die Quantifizierung des alveolären Knochenverlustes erfolgte mit einem micro-Computertomographen (µCT). Dazu wurden die vorbereiteten Kiefer gruppiert in Trägerfolie gehüllt (4-5 Exemplare), auf Styroporschalen gebettet und auf dem Objektisch des µCT (Skyscan 1076) in das Gerät eingefahren.

TABELLE 10: EINSTELLUNGEN DER SOFTWARE SCYSCAN 1076

PARAMETER	EINSTELLUNG
image pixel size	9,22 μm
filter	Aluminium 0,5 mm
frame averaging	3
rotation steps	0,6 °
Spannung der Röntgenquelle	96 kV
Stromstärke der Röntgenquelle	102 μA

TABELLE 11: EINSTELLUNGEN DER SOFTWARE NRecon

PARAMETER	EINSTELLUNG
defect pixel masking	2 %
smoothing	2
beam hardening correction	30 %
ring artefact correction	6

Die Steuerung des μCT -Gerätes wurde durch die Software Skyscan 1076 Control übernommen, darüber wurden die in Tab. 10 eingetragenen Parameter eingestellt. Die Zeit des Scans eines Kiefers betrug etwa 55 Minuten. Am Ende eines Scans stand ein Datensatz aus 330 einzelnen Röntgenbildern pro Kiefer aus unterschiedlichen Winkeln. Aus diesen Bildern entstand mittels der Software NRecon ein neuer Datensatz aus Schichtbildaufnahmen (Tab. 11).

Für die weitere Analyse der Bilder war es einerseits notwendig die Bildgröße zu verringern und andererseits die Bildinformation so zu berechnen, dass die zweidimensionalen Schnittbilder des dreidimensionalen Körpers eine vergleichbare Ausrichtung im Raum erhalten. Dazu wurde die Software Data Viewer genutzt und folgendes Procedere durchgeführt:

Die Software erlaubte es, drei orthogonal aufeinander gestellte Schnittbilder des darzustellenden Objektes anzuzeigen und entsprechend im Raum zu drehen. Jeder Scan der Kiefer wurde so ausgerichtet, dass die Transversalebene parallel durch die koronalsten Anteile der Pulpaöhle, die Sagittalebene parallel zum Wurzelkanal und die Coronarebene parallel zur Linie zwischen mesialsten und dorsalsten Punkt der Zahnkronen standen. Anschließend konnte eine region of interest (ROI) festgelegt werden, welche die Datenmenge drastisch reduzierte. Es wurden jeweils nur die Molaren der rechten Hemimandibulae abgebildet. Dieser so erstellte

finale Datensatz bestand aus mehreren hundert Einzelbildern – fortlaufend nummeriert – in der Coronarebene.

Im letzten Schritt wurden die Messungen mit der Software CTAnalyzer durchgeführt. Dabei wurde der Abstand zwischen CEJ und ABC an sechs definierten Punkten pro Zahn vermessen, die sich in ventrodorsaler Ausrichtung jeweils auf dem Übergang von einem Viertel des Zahns zum nächsten Viertel befanden. Somit ergaben sich jeweils drei Punkte bukkal und lingual pro Zahn (Abb. 7). Anschließend wurde pro Versuchstier das arithmetische Mittel der gemessenen Werte berechnet.

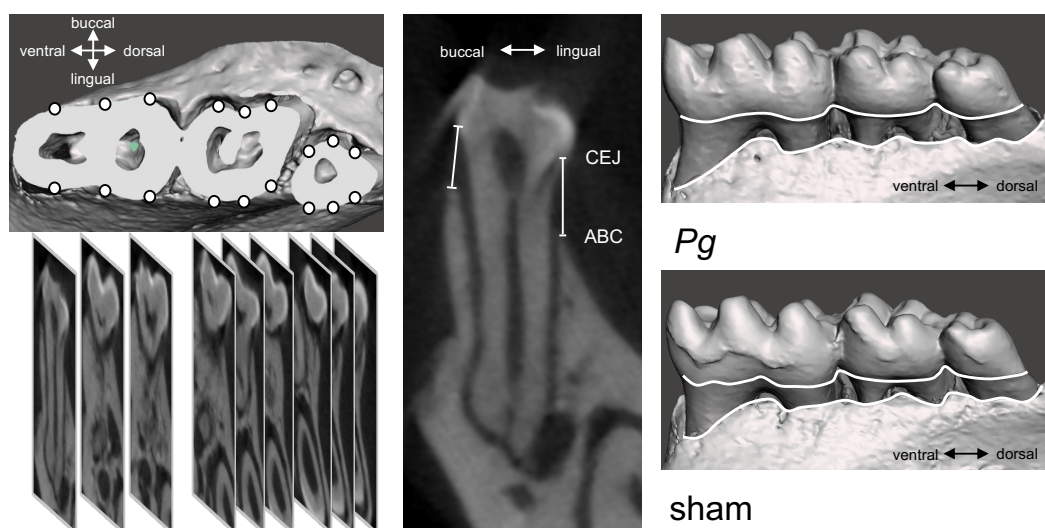


ABBILDUNG 7: MESSPUNKTE IN DER 3D-REKONSTRUKTION UND SCHICHTBILDAUFNAHMEN

Links: Messpunkte dargestellt am dreidimensional rekonstruiertem Modell mit Blick von oben. Darunter korrespondierende, ausgewählte Schnittbilder, an denen die Messungen vorgenommen wurden. **Mitte:** Exemplarische Darstellung eines Schnittbildes auf Höhe der mesialsten Messpunkte, markierter Abstand CEJ-ABC medial und bukkal. **Rechts:** Beispielhafte Darstellung des Bereiches zwischen CEJ und ABC an dreidimensional rekonstruierten Modellen mit Blick von medial. Oben *Pg*-inokuliert, unten sham-behandelt.

4.13 HISTOLOGIE

In dieser Arbeit wurden die Pfoten und die Kiefer histologisch aufgearbeitet. Die Entnahme der Kiefer und Pfoten erfolgte am Tag der Asservierung. Die Kiefer konnten erst im Anschluss an die Anfertigung der μ CT-Aufnahmen der histologischen Aufbereitung zugeführt werden.

Die Aufarbeitung der entnommenen Gewebe folgte einem festen Schema. Nach der Fixierung in 4 % PFA wurden die Proben in 70 % Ethanol gelagert. Daraufhin erfolgte das Herauslösen von Kalzium, das Einbetten in Paraffin mit anschließendem Erstellen der Schnitte und Aufbringen auf einen Objektträger. Dieser wurden von Paraffin befreit, mittels HE Färbung gefärbt und abschließend mit Kanadabalsam und einer Deckplatte konserviert.

Vor der Dekalzifikation wurden die Kiefer und Pfoten aus ihrem Aufbewahrungsmedium genommen und für 30 Minuten unter Leitungswasser gespült. Die Proben wurden in Usedecalc[®] überführt und für zwei Wochen abgedunkelt unter ständigem Schwenken bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Kontrolle der Dekalzifizierung wurde mittels Kanüle in die Tibia gestochen bzw. entlang der langen Röhrenknochen sanft gebogen und bei Bedarf für weitere drei Tage dekalzifiziert. War der Knochen ausreichend weich, wurden die Proben nochmals mit Leitungswasser gespült und in Paraffin eingebettet. Bei der Einbettung war auf die spätere Schnittebene zu achten. Die Pfoten wurden in parallelen Schnitten zur Pfotenaufstellfläche und die Kiefer in Sagittalebene geschnitten.

Daraufhin erfolgte die Anfertigung von Schnitten mit einer Schichtdicke von 5 μ m mithilfe eines Mikrotoms. Die Schnittführung war abhängig von der Probe: Die Pfoten wurden von plantar nach dorsal geschnitten, wobei eine Ebene gesucht wurde, in der möglichst alle Phalangen, der Talus und Calcaneus mit ihren korrespondierenden Gelenkflächen gesucht wurde. Die Kieferknochen wurden in der Sagittalebene geschnitten, dabei war darauf zu achten, dass die Zahnzwischenräume zur Abbildung gelangten und die angrenzenden Zähne möglichst in Gänze angeschnitten waren. Die HE-Färbung erfolgte nach dem in Tabelle 12 zusammengefassten Schema.

Im Anschluss an den Färbevorgang wurden die Schnitte mit ein bis zwei Tropfen Kanadabalsam unter das aufgelegte Deckgläschen bei Raumluft getrocknet. Für die Dauer der Trocknung wurden die Deckgläschen mit Bleiklötzen beschwert, um einem Verrutschen der Gläser vorzubeugen. Überschüssiger Kanadabalsam wurde nach dem Trocknen vorsichtig mit Waschbenzin entfernt.

TABELLE 12: ABLAUF DER HISTOLOGISCHEN FÄRBUNG

SCHRITT	REAGENZ	EINWIRKZEIT
1	Roti-Histol	10 Minuten
2	Roti-Histol	10 Minuten
3	Propranol	5 Minuten
4	Propranol	5 Minuten
5	96 % Ethanol	5 Minuten
6	80 % Ethanol	5 Minuten
7	70 % Ethanol	5 Minuten
8	Aquadest	5 Minuten
9	Aquadest	5 Minuten
10a	Hämalaun	Kiefer 45 Sekunden
10b	Hämalaun	Pfoten 30 Sekunden
11	Spülung unter laufendem Leitungswasser	25 Minuten
12	Aquadest	5 Minuten
13a	Eosin	Kiefer 80 Sekunden
13b	Eosin	Pfoten: 40 Sekunden
14	Aquadest	3 x eintauchen
15	70 % Ethanol + 1 Tropfen NH_3	3 x eintauchen
16	80 % Ethanol	3 x eintauchen
17	96 % Ethanol	3 x eintauchen
18	Propranol	3 x eintauchen
19	Propranol	3 x eintauchen
20	Roti-Histol	10 x eintauchen
21	Roti-Histol	über Nacht

Das Erstellen der Digitalfotos der histologischen Schnitte erfolgte mittels Axioskop 40 und dem Kameraaufsatz AxioCam MRc 5. Nachdem das Mikroskop gekühlt wurde, konnten mit der Software ZEN 2 lite die Aufnahmen erstellt werden. Die Belichtungszeit betrug 24 Millisekunden. Der Weißabgleich erfolgte automatisch durch die Software und erzielte vergleichbare Ergebnisse. Zudem wurde ein Maßstab entsprechend des gewählten Objektivs durch die Software berechnet und in das Bild eingefügt.

4.14 ANALYSE DES MIKROBIOMS

FrISChe Stuhlproben wurden zu fünf Zeitpunkten während des Experimentes an den Tagen 0, 32, 48, 70 und 105 gesammelt. Dazu wurden die Tiere einzeln bis zur Ausscheidung von zwei bis drei „Köttel“ pro Tier in einen sauberen Käfig ohne Einstreu gesetzt. Die Stuhlproben wurden möglichst ohne Kontamination in Reaktionsgefäße überführt und bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert.

Zur weiteren Analyse wurde die DNA des Stuhls aufgereinigt. In dieser Arbeit wurde der Anleitung des ZymoBIOMICS™ DNA Miniprep Kit gefolgt. Für jedes verwendete Tier und jeden Entnahmezeitpunkt wurde eine Stuhlprobe (etwa 100 bis 200 mg) in ZR BashingBead™ Lysiergefäßen gegeben, die werksseitig mit 0,1 und 0,5 mm großen Glasbeads versehen wurden. Den Gefäßen wurde jeweils 750 µL der mitgelieferten Lysierlösung zugefügt und mit einem mitgelieferten Drehverschluss fest verschlossen. Die Reaktionsgefäße wurden dann in den Precellys® Homogenisator platziert und dreimal mit je zwei Zyklen der Dauer 20 Sekunden mit 6500 rpm prozessiert. Zwischen den Durchgängen wurden diese aus dem Gerät genommen und für fünf Minuten direkt auf Eis gestellt, bis das Gerät für den nächsten Zyklus einsatzbereit war. Durch diesen Prozess wurde die Probe in der Lysierlösung homogenisiert. Die Reaktionsgefäße wurden im Anschluss bei 8.000 g zentrifugiert, 400 µL des Überstandes wurden in den Zymo-Spin™ IV Filter überführt und durch diesen bei 8.000 g für eine Minute in ein Auffanggefäß zentrifugiert. Dem Filtrat wurde 1,2 mL des ZymoBIOMICS™ DNA-Bindpuffer hinzugefügt. Im nächsten Schritt war dieses in zwei Fraktionen erneut bei 10.000 g für eine Minute durch den Zymo-Spin™ IIIC-Z Filter in ein frisches Auffanggefäß zu zentrifugieren. Die DNA verblieb dabei im Filter, sodass das Filtrat verworfen wurde. Es schlossen sich drei Waschvorgänge an, mit dem ZymoBIOMICS™ DNA-Waschpuffer 1 und 2, jeweils 10.000 g für eine Minute. Die Filter mit der darin enthaltenen DNA wurden anschließend mit ZymoBIOMICS™ DNase/RNase freiem Wasser für eine Minute bei Raumtemperatur inkubiert. Durch diesen Schritt löste sich die DNA im Wasser und wurde bei 10.000 g für eine Minute in ein frisches Auffanggefäß filtriert. Die DNA lag somit in dem Filtrat gelöst vor. Im letzten Schritt wurde die gelöste DNA mittels des Zymo-Spin™ IV-HRC Filters bei 8.000 g für eine Minute final filtriert.

Um die gelöste DNA später zu sequenzieren, war es notwendig, die Konzentration der Proben-DNA auf 5 ng/µL einzustellen. Dazu mussten zunächst die Ausgangskonzentration und die Reinheit der Proben bestimmt werden. Für diesen Vorgang wurde das Spektrofotometer NanoDrop® 2000 eingesetzt, welches die Konzentration mittels Absorption von Licht der Wellenlänge 260 nm misst. Die Reinheit der Proben kann durch die zusätzliche Lichtabsorption bei

280 nm bestimmt werden, indem man die Werte ins Verhältnis setzt (A_{260}/A_{280}). Hier zeigen Quotienten zwischen 1,8 und 2,0 eine reine Probe an.

Nach der Kalibrierung des Gerätes mittels DNase freiem Wasser wurden 1,2 µL einer jeden Probe auf den Messsockel pipettiert. Dabei galt es, die Bildung von Luftblasen in dem Tropfen zu verhindern, um Fehlmessungen zu vermeiden. Der gegenüberliegende Sockel des Gerätes wurde nun auf den Tropfen geklappt. Durch die Oberflächenspannung der Flüssigkeit wurde der Zwischenraum der beiden Sockel vollständig mit einer Flüssigkeitssäule gefüllt. Anschließend konnte die Messung gestartet werden. Mittels DNase- und RNase-freiem Wasser wurden anschließend alle Proben auf eine DNA-Konzentration von 5 ng/µL verdünnt und bis zur PCR bei -80 °C konserviert.

Die PCR sowie Sequenzierung der DNA wurde freundlicherweise von Jana Bull aus dem Institut der Medizinischen Mikrobiologie, Virologie und Hygiene der Universität Rostock durchgeführt. Zur Analyse des bakteriellen Mikrobioms wird der DNA-Abschnitt, der für die prokaryotische 16S rRNA kodiert, genutzt. Diese ist etwa 1500 Basenpaare lang und enthält neun hypervariable Regionen, die von hoch konservierten Regionen begrenzt werden. Es wurden die hypervariablen Regionen V3 und V4 sequenziert, die nach bioinformatischer Verarbeitung eine Zuordnung in die Taxonomie erlauben.

Dies geschah auf der Basis der Illumina MiSeq®-Plattform, dabei wurde dem “16S Metagenomic Sequencing Library Preparation”-Protokoll von Illumina gefolgt [50]. Zur Amplifikation der Regionen V3 und V4 der bakteriellen 16S rRNA Gens wurden folgende Primer mit sogenannten „overhang-adapter“ verwendet: 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). Das führte zu PCR-Produkten von etwa 550 Basenpaaren. Es folgten Aufreinigungsschritte und eine Index-PCR, um über die „overhang-adapter“ beidseitige Indices und Sequenzieradapter an den DNA-Strang anzuhängen (Abb. 8).

Die Indices dienen der Identifizierung der Proben nach der Sequenzierung, da die Proben anschließend gepoolt wurden. Zur Qualitäts- und Quantitätskontrolle wurden Bioanalyzer DNA 100 Chips and Qubit-Kits nach Herstellerangaben verwendet. Als interne Kontrolle der Sequenzierung wurde die so entstandene Probenbibliothek mit 5 % der Amplikonbibliothek von PhiX versetzt. PhiX ist ein Bakteriophag, dessen Genom bekannt ist. 5 pM der finalen Bibliothekenmischung wurde mittels der Illumina MiSeq® und mit zweimal 250-Zyklen sequenziert.

Die bioinformatische Analyse des Mikrobioms wurde freundlicherweise von Dr. Susanne Kneitz aus dem Theodor-Boveri-Institut für Biowissenschaften der Universität Würzburg durchgeführt.

Zur Analyse der Sequenzdaten wurde zunächst eine Qualitätsfilterung der Sequenzen gemacht. Es wurden nur Längen von 440-466 Basenpaaren und keine mehrdeutigen Basen erlaubt. Die duplizierten Sequenzen wurden zusammengeführt. Der Abgleich wurde mittels der Software Mothur und der Referenzdatenbank „SILVA reference“ der Version 128 durchgeführt [51, 52]. Dabei wurden nur operational taxonomic units (OTU) mit einer Gesamthäufigkeit ≥ 3 berücksichtigt. OTUs sind Sequenzcluster der 16S rDNA, die den Rückschluss auf die Bakterienspezies zulassen. Sequenzen von Archaeen, Chloroplasten, Eukaryonten und Mitochondrien wurden entfernt. Für deskriptive Statistik und Hauptkomponentenanalyse wurde das R-Paket "vegan" verwendet [53]. Es wurde der Jaccard-Index als Ähnlichkeitsmaß und der Bray-Curtis-Index als Maß der Verschiedenheit berechnet.

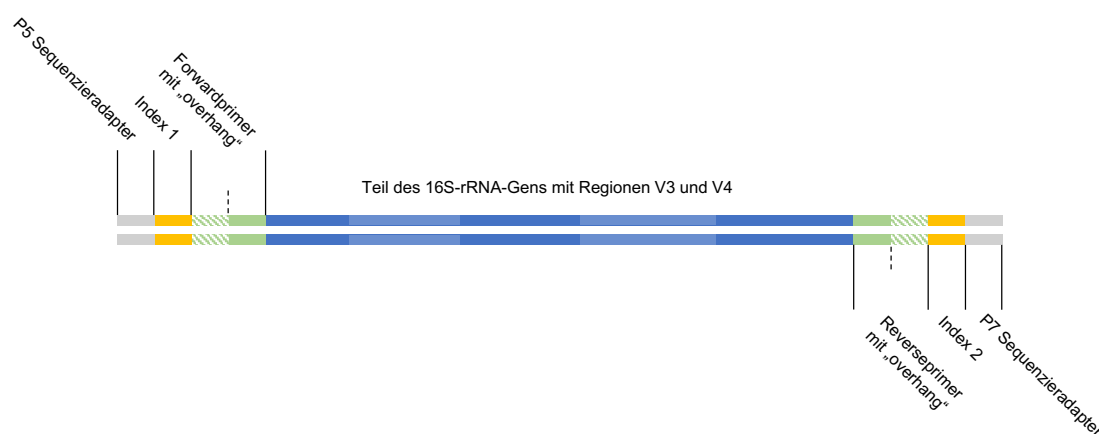


ABBILDUNG 8: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DES ZU SEQUENZIERENDEN DNA-ABSCHNITTES

Durch mehrere PCR-Schritte mit bekannten Basensequenzen verlängerter Teil des 16S-rRNA-Gens mit einer Länge von etwa 550 bp. Die Primer definieren den Abschnitt des 16S-rRNA-Gens, welcher aus der Probe isoliert wurde. Mittels des „Overhangs“ konnten die Indices und Sequenzieradapter angehängt werden. Durch die Indices ist eine Zuordnung des Gens zur Probe möglich, nachdem mehrere Proben gepoolt wurden. Die Sequenzieradapter ermöglichen die Bindung zur Illumina MiSeq® Plattform.

4.15 PROTEOMICS DER SYNOVIA

Die Analyse der Synovia wurde freundlicherweise von Stefan Mikkat aus der Core Facility Proteomanalytik im Zentrum für Medizinische Forschung der Universitätsmedizin Rostock durchgeführt.

Zur Probenvorbereitung für die nachfolgende Gesamtproteinanalyse wurde wie folgt vorgegangen: Mittels 20 µL Lysepuffer (2 % Natriumdodecylsulfat, 50 mM Dithiothreitol, 50 mM Tris/HCl pH 7,6), der auf die Gewebeproben aufgetragen wurde, nach fünfminütiger Inkubation bei 95 °C und anschließender fünfminütiger Ultraschallbehandlung konnten die Proteine aus den Gewebeproben extrahiert werden. Anschließend konnte die Quantifizierung des Proteingehalts mit dem Qubit Protein Assay Kit (Q33211) nach Herstelleranweisung und konsekutiver Messung mit einem Qubit Fluorometer durchgeführt werden. Für die Probenaufbereitung mittels filter aided sample preparation (FASP) wurden die Proben mit 200 µL Harnstofflösung (UA, 8 M Harnstoff, 100 mM Tris/HCl pH 8,5) versetzt. Die FASP wurde dann, wie zuvor von Wiśniewski und Zougman et al. [54] beschrieben, durchgeführt: Die Proben wurden durch einen Filter für 15 Minuten zentrifugiert, anschließend mit 100 µL UA gewaschen und mit 50 µL UA mit 50 mM Iodacetamid in kompletter Dunkelheit für 20 Minuten inkubiert, bis möglichst alle Cysteinreste alkyliert waren. Im Anschluss wurden die Filter zweimalig mit 100 oder 50 µL UA sowie dreimal mit je 100 µL, 75 µL oder 50 µL 50 mM Ammoniumhydrogenkarbonatlösung gewaschen. Der Verdau der Proben auf dem Filter wurde mit 1 µg Trypsin (V5111, Promega) in 40 µL einer 50 mM Ammoniumhydrogenkarbonatlösung für jede 50 µg der Proteinprobe über Nacht bei 37 °C und etwa 100 % relativer Luftfeuchte durchgeführt. Die so entstandenen Peptide wurden mittels Zentrifugation gesammelt, der Filter mit frischer, bereits oben beschriebener Trypsinlösung für einen zweiten Verdau der Proben über 90 Minuten inkubiert und erneut zentrifugiert. Die Proben aus den beiden kombinierten Verdauungsvorgängen wurden mittels 0,25 % Trifluoressigsäure angesäuert und im Anschluss mit einem Zentrifugalverdampfer aufkonzentriert und einer wässrigen Lösung mit 2 % Acetonitril und 0,1 % Ameisensäure verdünnt, sodass die Peptide in 40 µL Gesamtvolumen vorlagen. Die Quantifizierung der Peptide wurde mit einem Qubit Fluorometer durchgeführt.

Die weitere Analyse erfolgte mittels hochauflösender Tandemmassenspektrometrie (nanoLC-HDMS^E). Dazu wurde, wie von Pappesch et al. beschrieben, auf der Basis des nanoAcquity UPLC Systems gekoppelt an einen Synapt G2-S Massenspektrometer vorgegangen [55].

Anschließend wurden die Proteomdaten unter Zuhilfenahme der Software Progenesis QI for Proteomics prozessiert, die Proteine benannt und quantifiziert. Mit dem Programm wurden die Peptide und Proteine mit einer Datenbank für Mäuse (*Mus musculus*, UniProt Version

2019_02), die 17.006 Proteinsequenzen enthielt, verglichen. Dadurch wurde eine Identifizierung der gemessenen Peptide und eine Zuordnung zu einzelnen Proteinen möglich. Für die Quantifizierung wurde die Hi3-Methode auf der Basis des Hi3 ClpB_ECOLI Standards, ein Chaperonprotein von Escherichia coli bekannter Struktur und Peptidfolge, verwendet.

4.16 STATISTISCHE ANALYSE

Bei der Durchführung der Statistischen Auswertung und dem Erstellen der grafischen Darstellungen wurde auf die Programme SPSS Statistics® und Sigma Plot® zurückgegriffen. Zunächst wurden die gruppenweise erhobenen Werte auf Normalverteilung mittels Shapiro-Wilk-Test getestet. Im Falle einer Normalverteilung wurde der Mittelwert berechnet und zum Vergleich von zwei Gruppen ein t-Test oder bei mehr als zwei Gruppen ein ANOVA durchgeführt. Zeigte sich bei der Testung auf Normalverteilung ein negatives Ergebnis, wurde der Median dargestellt und im Falle von zwei Gruppen ein Mann-Whitney-U-Test durchgeführt. Wenn mehr als zwei Gruppen verglichen wurden, ist ein Kruskal-Wallis-Test berechnet und bei signifikantem Unterschied der Gruppen ein post-hoc-Test für den paarweisen Vergleich angeschlossen worden. Dieser beinhaltet die Bonferroni-Korrektur der p-Werte bei mehreren Tests.

Die Darstellung der Arthritisinzidenzen erfolgte mittels Kaplan-Meier-Kurven, mit dem Unterschied, dass diese klassischerweise das kumulative erkrankungsfreie Überleben darstellen würden. Hier wurde mit der Kurve die Inzidenz abgebildet. Die Vergleiche wurden mittels Log-Rank- (Mantel-Cox), Breslow- (Generalized Wilcoxon) sowie Tarone-Ware-Test berechnet.

Die Hauptkomponentenanalyse der Proteomdaten wurden mittels der Software R durchgeführt [56]. Das Clustering der Probanden wurde mit normalisierten Ellipsen und einem Konfidenzintervall von 0,95 berechnet.

Es wurden p-Werte unter 0,05 als signifikant angesehen. Die Diagramme enthalten eine Markierung nach folgendem Muster:

$p = 0,01 - 0,05$ (*)

$p = 0,001 - 0,01$ (**)

$p = 0,0001 - 0,001$ (***)

V. ERGEBNISSE

5.1 GEWICHTSVERLAUF

Um das Wohlbefinden und die Entwicklung der Versuchstiere über die Dauer des Versuches zu kontrollieren, diente unter anderem das Gewicht der Mäuse als objektive Messgröße. Die Gewichtsentwicklung ist zudem Teil der Abbruchkriterien (vgl. Tab. 9).

Die Tiere wurden zwischen den Lebenswochen acht und zwölf in das Experiment aufgenommen, die Spanne des Anfangsgewichtes reicht von 27,9 g bis 37,3 g mit einem Median von 32,2 g. Es gab keinen signifikanten Unterschied der Gewichte in den unterschiedlichen Gruppen. Das schwerste Tier sowie jenes mit dem geringsten Gewicht wurde der gemeinsamen Kontrollgruppe Sh- per Zufall zugewiesen. Bis zur Asservierung am Tag 105 stieg das Gewicht der Versuchstiere im Median auf 38,5 g an. Dies entspricht im Vergleich zum Startgewicht einem Zuwachs von 20,7 % (Abb. 9). Über die Versuchsdauer zeigten zwei Tiere eine Gewichtsabnahme, diese wurden den Gruppen +Pg und +Aa zugeordnet. Die Maus aus der Gruppe +Pg begann den Versuch als schwerstes Tier mit 37,3 g und wurde mit 33,2 g an Tag 105 aus dem Versuch genommen (11 % Gewichtsverlust). Das Versuchstier der Gruppe +Aa zeigte einen Gewichtsverlauf von anfangs 32,2 auf 30,2 g am Ende des Versuches (6,2 % Gewichtsverlust).

Besondere Berücksichtigung bedarf die Gruppe Sh-, da diese als gemeinsame Kontrollgruppe mit dem Parallelversuch verwendet wurde. Die orale Inokulation ging der Arthritisinduktion voraus. Damit ist ein direkter Vergleich der Gewichtsentwicklung nur bedingt möglich. Das Start-

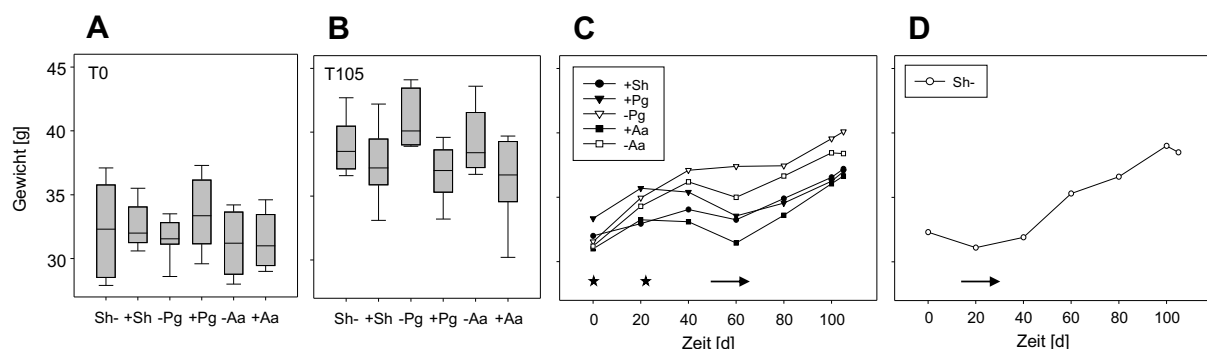


ABBILDUNG 9: ENTWICKLUNG DES ABSOLUTEN GEWICHTS

A: Gewicht nach Gruppen am Tag 0 des Versuches, Boxplot. **B:** Gewicht nach Gruppen am Versuchsende (Tag 105), Boxplot. **C:** Gewichtsverlauf aller Gruppen (mit Ausnahme Sh-), Mediane der Gruppen an jedem 10. Tag. **D:** Gewichtsverlauf der Kontrollgruppe Sh- mit der zeitlich früheren oralen Inokulation, ohne CIA, Mediane an jedem 10. Tag. - Sterne zeigen Zeitpunkte der Immunisierung bzw. Boost-Injektion, Pfeile signalisiert Zeitraum der oralen Inokulationen.

gewicht lag hier im Median bei 32,3 g. Danach stieg das mittlere Gewicht bis zum Endzeitpunkt kontinuierlich an, auf einen Median von 38,5 g, dies entspricht einer mittleren Gewichtszunahme von 19 % (Abb. 9).

Im Vergleich der Versuchstiere mit Arthritisinduktion (CIA) zu denen ohne CIA (ausgenommen der Gruppe Sh-) fällt auf, dass beide Gruppen zunächst einen Gewichtszuwachs verzeichnen. Doch bereits am Tag 40 zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen den beiden Gruppen, der Gewichtszuwachs ist in der Gruppe ohne CIA mit 16,3 % im Vergleich zu 7,4 % deutlicher ausgeprägt. Beide Gruppen zeigen über die Dauer der durchgeführten Narkosen zur oralen Inokulation (Tage 50 bis 58) einen leichten Abfall des Gewichtes, die Tiere ohne CIA verloren bis Tag 60 1,6 % und Tiere mit CIA im gleichen Zeitraum 3,9 %. Dem folgte in beiden Gruppen eine vergleichbare Gewichtszunahme bis zum Endzeitpunkt – die Mäuse ohne CIA 10,8 %, jene mit CIA 11,1 %. Es zeigte sich, dass die Tiere mit Arthritisinduktion insgesamt weniger an Gewicht zunahmen als die Tiere der Gruppe mit Arthritisinduktion (Abb. 10).

In der gemeinsamen Kontrollgruppe (Sh-) ergab sich durch die früher durchgeführten Narkosen im Zuge der oralen Inokulation eine konstante bis leicht abfallende Gewichtsentwicklung. Ab Tag 40 kam es zu einer deutlichen Zunahme des Körpergewichtes auf insgesamt 122,5 % des Ausgangsgewichtes (Abb. 10).

Zusammenfassend ist festzustellen, dass die CIA eine nachhaltig verringerte Gewichtszunahme verursacht hat, die orale Inokulation hingegen nur zu einem temporären Gewichtsverlust führte.

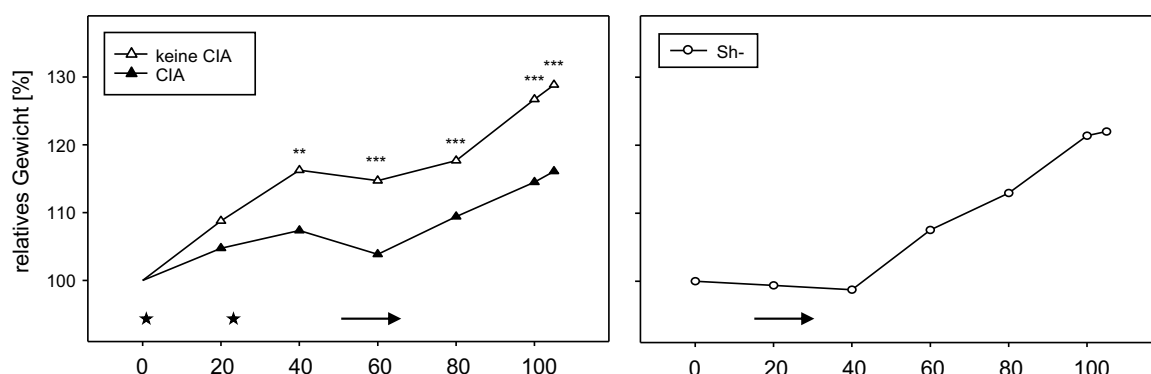


ABBILDUNG 10: ENTWICKLUNG DES RELATIVEN GEWICHTES ÜBER DIE ZEIT

Links: Relatives Gewicht bezogen auf das Ausgangsgewicht über die Zeit, Mediane der Tiere mit bzw. ohne CIA. **Rechts:** Relatives Gewicht bezogen auf das Ausgangsgewicht über die Zeit, Mediane der Gruppe Sh-, jeder 10. Tag.

5.2 ARTHRITISINZIDENZ / -SCHWERE

Die Quantifizierung der Gelenkschwellung erfolgte mittels o.g. Scorings, die makroskopisch sichtbare Schwellung der Pfoten wurde jeden zweiten Tag nach der Boost-Injektion dokumentiert, den maximalen Score von 58 Punkten erreichte keines der Tiere.

Von den 24 Tieren, die der Arthritisinduktion unterzogen wurden, zeigten 15 makroskopisch sichtbare Zeichen einer Arthritis (Abb. 11). Der früheste Erkrankungsbeginn war am Tag 5 und der späteste am Tag 40 nach Boost-Injektion. Zwischen den Gruppen +Sh, +Pg und +Aa zeigte sich kein signifikanter Unterschied hinsichtlich des Erkrankungszeitpunktes, der Höhe der summierten Arthritiscores über den Versuchszeitraum, noch des an dem Tag der schwersten Symptomlast gemessenen Scores (Abb. 12).

Die Tiere wurden in dieser Arbeit über einen Zeitraum von 83 Tagen nach der Boost-Injektion beobachtet. Bei Tieren mit erfolgreich ausgelöster Arthritis war die Gelenkschwellung im Median über 57 Tage zu beobachten. Sieben Tiere wiesen noch Symptome einer Arthritis am Tag der Asservierung auf.



ABBILDUNG 11: SYMPTOMATISCHE UND ASYMPTOMATISCHE PFOTEN IM RAHMEN DER CIA

Links: Fotografien rechter Hinterläufe von lateral. Oben ohne Symptome einer Arthritis, unten mit deutlicher Schwellung und leichter Rötung einzelner Zehen und im Bereich der Pfotenwurzel und -mittelknochen. **Rechts:** Fotografien der Vorderläufe von palmar. Oben ohne Symptome einer Arthritis, unten deutliche Schwellung der gesamten Pfote.

TABELLE 13: ARTHRITISSCORES IM GRUPPENVERGLEICH

PARAMETER		+Sh	+Pg	+Aa
Gesamtzahl der Tiere		8	8	8
Anzahl der Tiere mit Arthritis		4	6	5
Anzahl zweigipfliger Verläufe		2	1	2
Mittelwert maximaler Scores*	[Punkte]	17,8	23,3	28,4
Mittelwert summierter Scores*	[Punkte]	57,7	58,8	100,3
Median der Dauer der Arthritis*	[Tage]	36,5	52,5	62

* hier wurden nur Tiere mit Arthritisymptomen einbezogen

Es ist interessant, dass sich bei fünf Tieren ein zweigipfliger Verlauf des Arthritisscores zeigte (Tab. 13 und Abb. 13). Nach dem initialen Anstieg des Scores kam es bei diesen Mäusen zu einer zwischenzeitlichen Besserung der Symptome. Danach ließ sich eine erneute Verstärkung der makroskopisch sichtbaren Symptome bis zum Tag der Asservierung feststellen. Im Gegensatz dazu wurde bei Tieren mit einem eingipfligen Verlauf überwiegend ein kompletter Rückgang der Symptome bis zum Ende des Versuches beobachtet. Nur zwei der Tiere mit dem eingipfligen Verlauf zeigten zum Endpunkt noch eine Gelenkschwellung.

Bei Betrachtung des Verteilungsmusters der entzündlich veränderten Pfoten der Tiere, welche einen Wiederanstieg des Arthritisscores aufwiesen, konnte bei drei Tieren eine Entzündung einer vorher noch nicht betroffenen Pfote beobachtet werden. Bei zwei Mäusen war eine bereits im ersten „Gipfel“ geschwollene Pfote nach zwischenzeitlicher Besserung der Symptomatik erneut mit einem höheren Score zu bewerten.

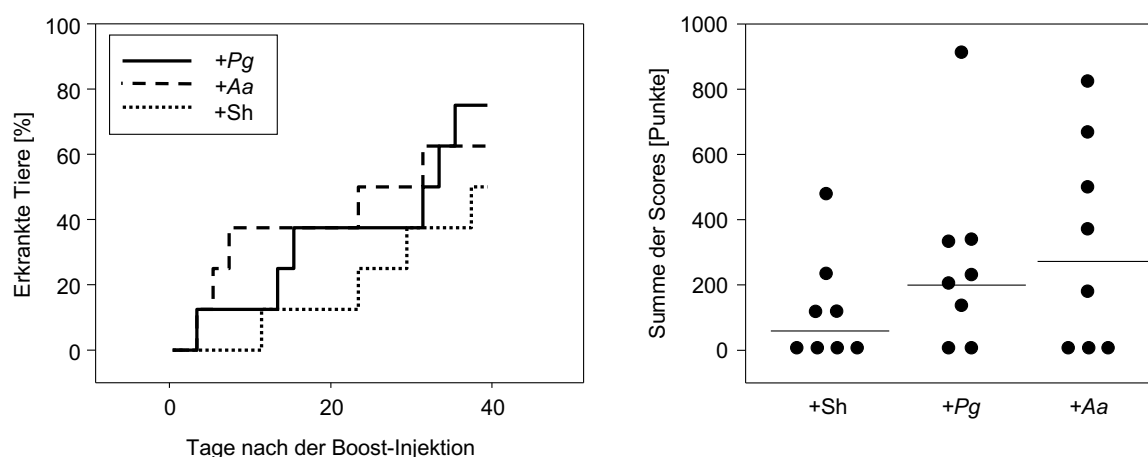


ABBILDUNG 12: ARTHRITISINZIDENZ UND SUMME DER ARTHRITISSCORES ZUM ENDZEITPUNKT

Links: Kaplan-Meier-Kurve der erkrankten Tiere über die Zeit nach der Boost-Injektion. **Rechts:** Summierte Scores, Messungen jeden zweiten Tag bis zum Endzeitpunkt (Tag 105). Jeder Punkt repräsentiert eine Maus, horizontale Linien zeigen den Median der jeweiligen Gruppe an.

In der Zusammenfassung konnte mit der hier durchgeführten Methode die Arthritis mit einer kumulativen Inzidenz von 62,5 % ausgelöst werden. Signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen zeigten sich nicht. Einige der symptomatischen Tiere zeigten einen zweipfligen Verlauf der Gelenkschwellung.

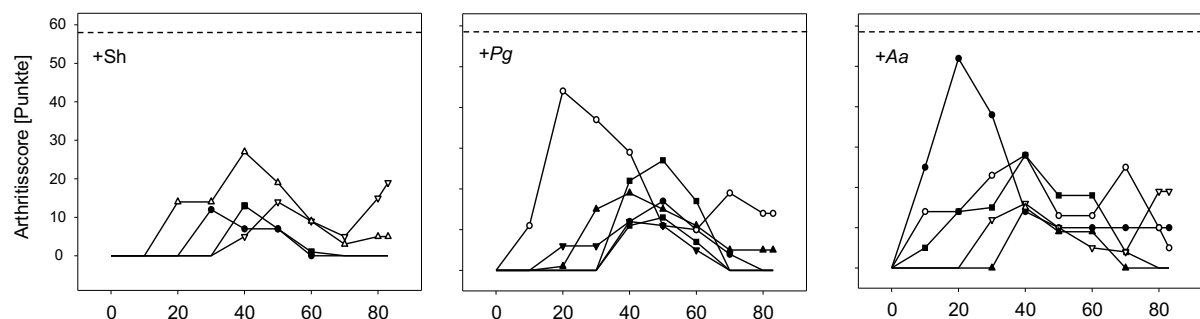


ABBILDUNG 13: EIN- UND ZWEIFPFLIGER VERLAUF

Darstellung einer jeden Maus mit Arthritis, aufgeteilt nach Gruppen. Offene Symbole repräsentieren Versuchstiere mit zweipfligem Verlauf, geschlossene zeigen eingipfligen Verlauf. Gestrichelte Linie markiert den maximal möglichen Score von 58 Punkten. Dargestellt sind Scores eines jeden 10. Tages nach der Boost-Injektion und der Endzeitpunkt.

5.3 ALVEOLÄRER KNOCHENVERLUST

Als Surrogatparameter für die Parodontitis wurde der alveoläre Knochenverlust gemessen. Die Quantifizierung erfolgte mittels Messungen des Abstandes zwischen alveolärem Knochenskamm (ABC) und der Dentinschmelzgrenze des Zahnes (CEJ) in μ CT-generierten Abbildungen. In diesem experimentellen Aufbau führte sowohl die orale Inokulation mit *Aa* als auch die Behandlung mit *Pg* in den jeweiligen Mäusen zu einem signifikantem Knochenverlust gegenüber den sham-behandelten Tieren. Es zeigte sich jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen den jeweilig inokulierten bakteriellen Erregern in Bezug auf den Knochenverlust. Auch eine zuvor induzierte Arthritis zeigte keinen signifikanten Einfluss auf die gemessene Kenngröße.

Die orale Inokulation beider Pathobionten führte zu einem deutlichen alveolären Knochenverlust vergleichbarer Schwere. Eine vorbestehende Arthritis hatte jedoch keinen Einfluss auf die Schwere des Knochenverlusts (Abb. 14).

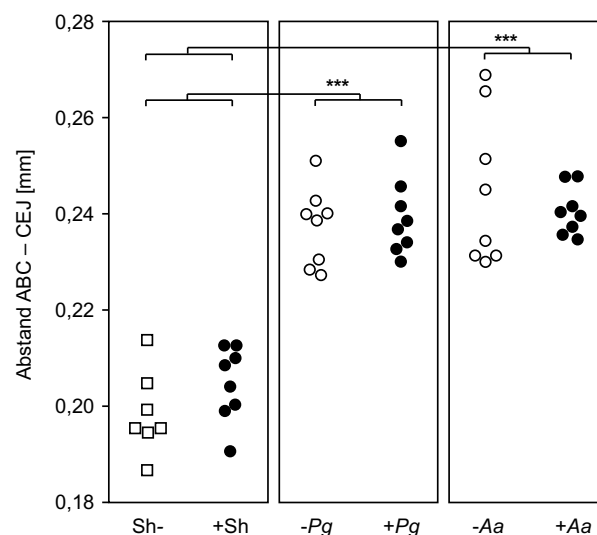


ABBILDUNG 14: μ CT-GESTÜTZTE MESSUNGEN DES ABC-CEJ-ABSTANDES NACH GRUPPEN

Scatterplots der gemessenen Abstände zwischen ABC und CEJ in Millimetern der einzelnen Gruppen. Offene Symbole repräsentieren Tiere ohne, geschlossene mit CIA. Quadrate sind Tiere der gemeinsamen Kontrollgruppe (Sh-) mit zeitlich früherer Sham-Behandlung. (Kruskal-Wallis-Test, bei nicht normalverteilten Werten und post-hoc im paarweisen Vergleich.)

5.4 BAKTERIELLE ANTIKÖRPER

Um eine systemische Reaktion auf die oral inokulierten Erreger zu quantifizieren, wurde ein ELISA für Antikörper gegen *Aa* und *Pg* durchgeführt. Die untersuchten Serumproben stammen aus der finalen Blutentnahme am Tag 105.

In den sham behandelten Gruppen (Sh-, +Sh) fiel das ELISA negativ aus, in den mit *Pg* bzw. *Aa* behandelten Gruppen zeigten sich jedoch deutlich signifikant positive Ergebnisse, sodass in den mit Pathogenen behandelten Gruppen davon ausgegangen werden konnte, dass eine spezifische, systemische Immunreaktion im Sinne einer Antikörperproduktion gegen Epitope der Erreger ausgelöst wurde. Einzig eine Probe, welche in der Gruppe +*Aa* zu finden war, lag mit der gemessenen Extinktion unterhalb der Nachweisgrenze (Abb. 15).

Konkludierend ließ sich feststellen, dass die orale Inokulation mit *Aa* und *Pg*, wie hier durchgeführt, eine systemische, humorale Immunreaktion auslösen konnte.

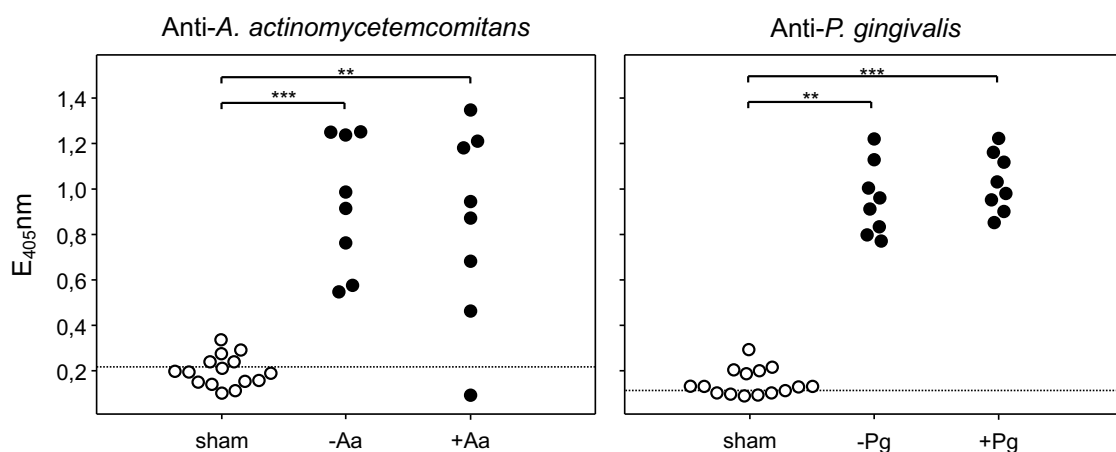


ABBILDUNG 15: ANTIKÖRPERMESSUNGEN IM SERUM MITTELS ELISA

Scatterplots der gemessenen Extinktion von Licht der Wellenlänge 450 nm. Jeder Punkt repräsentiert eine Messung in einer Maus zum Endzeitpunkt. Die gepunktete Linie zeigt die im Mittel gemessene Extinktion der mitgeführten Negativkontrollen.

5.5 HISTOLOGIE

Eine lokale Entzündungsreaktion sollte durch die histologische Aufarbeitung und mikroskopische Auswertung der Präparate dargestellt werden. Bei den Pfoten zeigten sich die Hinterpfoten als am stärksten durch die CIA betroffen. Daher wurde das Anfertigen von histologischem Material auf diese beschränkt. Als Beispiel sind eine Pfote ohne Arthritis und eine arthritische Pfote exemplarisch abgebildet. Im Falle der Arthritis ist eine deutliche Destruktion des Knorpel- und Knochengewebes erkennbar, dagegen wiesen die gesunden Pfoten glattes und klar voneinander abgrenzbares Gewebe auf (Abb. 16).

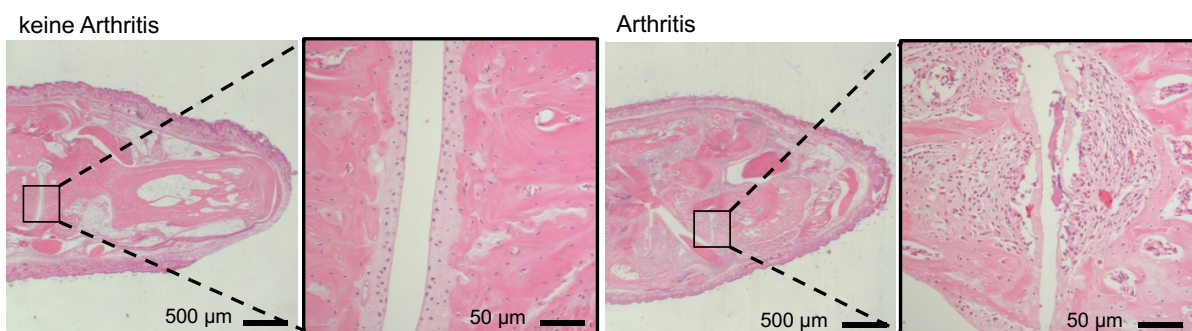


ABBILDUNG 16: HISTOLOGISCHEN UNTERSUCHUNG DER HINTERLÄUFE

Exemplarische, histologische Schnitte der Hinterläufe, Schnittführung parallel zur Plantarebene. **Links:** Schnitt einer asymptomatischen Pfote in der Übersicht. Gelenkfläche vergrößert dargestellt, glatt begrenzte Knorpelflächen, Knochen nicht destruiert. **Rechts:** Schnitt einer symptomatischen Pfote in der Übersicht, hier ist schon angedeutete Destruktion der Gelenke und ödematöse Schwellung sichtbar. In der Vergrößerung eines Gelenkspaltes deutlich unregelmäßige Knorpelflächen, zelluläre Infiltration des subchondralen Knochen.

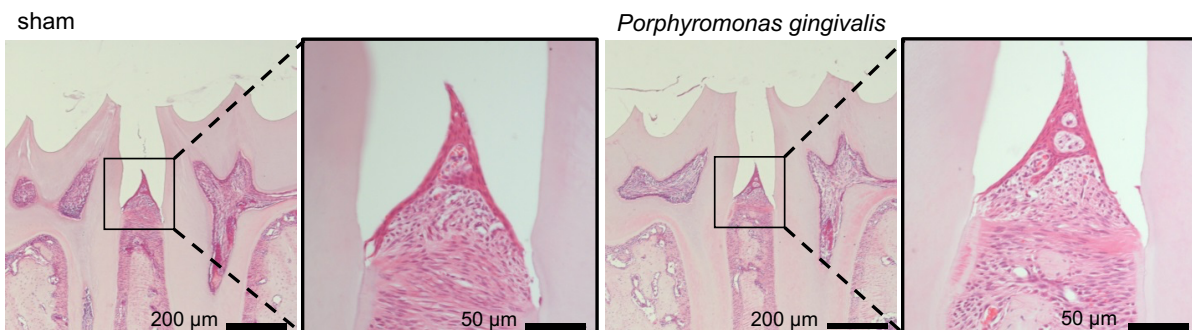


ABBILDUNG 17: HISTOLOGISCHE UNTERSUCHUNG DER KIEFER

Exemplarische, histologische Schnitte in Sagittalebene der Zahnreihe des rechten Unterkiefers. Durch Dekalzifizierung ist der Schmelz nicht vorhanden. Mesiale Molare dargestellt. **Links:** Exemplarischer Schnitt eines sham-behandelten Kiefers. **Rechts:** Exemplarischer Schnitt eines mit Bakterien inokulierten Kiefers (hier Pg).

Die rechten Kieferhälften, die Seite der oralen Inokulation, wurden ebenfalls histologisch aufbereitet mit dem Ziel, Entzündungsprozesse festzustellen. Durch die Dekalzifizierung der Präparate konnte der Zahnschmelz nicht erhalten bleiben, da dieser im Vergleich zum Dentin des Zahnes weniger organisches Material enthält. Damit war eine Untersuchung hinsichtlich des Abstandes von CEJ bis ABC anhand der histologischen Schnitte nicht möglich. Hierbei hätte sich zusätzlich die Schwierigkeit einer reproduktiven Schnittführung, die erst eine Vergleichbarkeit der Werte erlauben würde, gestellt. Es zeigte sich, dass in der durchgeführten HE-Färbung weder Entzündungsprozesse noch Bakterienanreicherungen oder Plaque sichtbar wurden (Abb. 17).

In der Zusammenfassung konnte exemplarisch in Gelenken, die von einer Arthritis betroffen waren, eine Destruktion nachgewiesen werden. Ein entzündliches Korrelat des Zahnhalteapparates nach Inokulation war zum Endzeitpunkt in einer HE-Färbung nicht zu beobachten.

5.6 MIKROBIOMANALYSE

Die während des Versuches gesammelten Stuhlproben wurden einer Mikrobiomanalyse unterzogen, um eine eventuelle Mikrobiomveränderung durch die Gabe des Antibiotikums und der Inokulation mit *Pg* und *Aa* zu quantifizieren. Das geschah unter der Vorstellung, das gastrointestinale Mikrobiom als Proxy oder Surrogatparameter für die orale Inokulation nutzen zu können. Vor diesem Hintergrund sollte eine Methode gewählt werden, die für das Versuchstier möglichst nichtinvasiv und stressfrei ist.

Die erste Probe (t1) wurde vor der Immunisierung der Versuchstiere am Tag 1 gesammelt, gefolgt von der zweiten (t2) und dritten (t3) jeweils unmittelbar vor und nach der Gabe von Cotrimoxazol am Tag 32 bzw. 48. Nach der oralen Inokulation bzw. sham-Behandlung erfolgte die vierte Probenentnahme (t4) am Tag 70. Zum Ende des Versuches am Tag 105 wurde das letzte Mal Stuhl gesammelt (t5) (vgl. Abb. 1).

Für die dem Protokoll in umgekehrter Reihenfolge unterliegenden Gruppe Sh-, also Inokulation gefolgt von der CIA, wichen folgende Entnahmezeitpunkte von denen der anderen Gruppen ab: t1 und t2 – vor und nach der Antibiotikagabe, t3 – zwischen oraler Inokulation und Immunisierung, t4 – nach Boost-Injektion (vgl. Abb. 2).

Aufgrund der methodischen Limitationen konnten keine absoluten Häufigkeiten der Mikroorganismen im Stuhl erfasst werden. Es war jedoch möglich, Aussagen über die relativen Häufigkeiten der Organismen zu treffen.

Auch Mikroorganismen unterliegen der Systematik der Lebewesen, demzufolge ist jeder Organismus in ein hierarchisches System, die Taxonomie, einzuordnen. Die Taxonomie lässt sich wie ein Stammbaum verstehen, der sich in immer feiner werdende Ränge verzweigt: Lebewesen, Domäne, Reich bis Gattung und Art. Am Beispiel von *Porphyromonas gingivalis* kann man dieses Lebewesen der Domäne der Prokaryoten und innerhalb dieser dem Reich der Bakterien zuordnen. Nachfolgend dem Phylum Bacteroidetes, der Klasse Bacteroidia, der Ordnung Bacteroidales und der Familie Porphyromonadaceae. Die Gattung *Porphyromonas* und die Art *P. gingivalis* sind schließlich namensgebend. In dieser Aufzählung sind feinere Zwischenstufen nicht berücksichtigt. Für *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* seien an dieser Stelle nur das Phylum der Proteobacteria und die Klasse der Gammaproteobacteria erwähnt. Die Taxonomie unterliegt ständiger Veränderungen, nicht zuletzt durch Bestrebungen diese anhand von DNA-Sequenzierungen neu zu strukturieren [57].

Die Familie der Porphyromonadaceae, zu der auch *Pg* zählt, konnte in diesem Versuch schon zu Beginn des Versuchszeitraumes mit einer relativen Häufigkeit von 25-45 % in allen Gruppen nachgewiesen werden. Diese zeigte sich mit Ausnahme des Zeitpunktes t3 mit einem Absinken auf 22-37 % verhältnismäßig konstant. Dem Zeitpunkt t3 ist unmittelbar zuvor die Antibiotikagabe vorausgegangen. Auch in den Gruppen -Pg und +Pg änderte sich die relative Häufigkeit der Porphyromonadaceae unmittelbar nach der oralen Inokulation von *Pg* nicht signifikant. Die Werte stiegen mit 40 % (-Pg) und 38 % (+Pg) wieder etwa auf das Ausgangsniveau von t2 (Abb. 18).

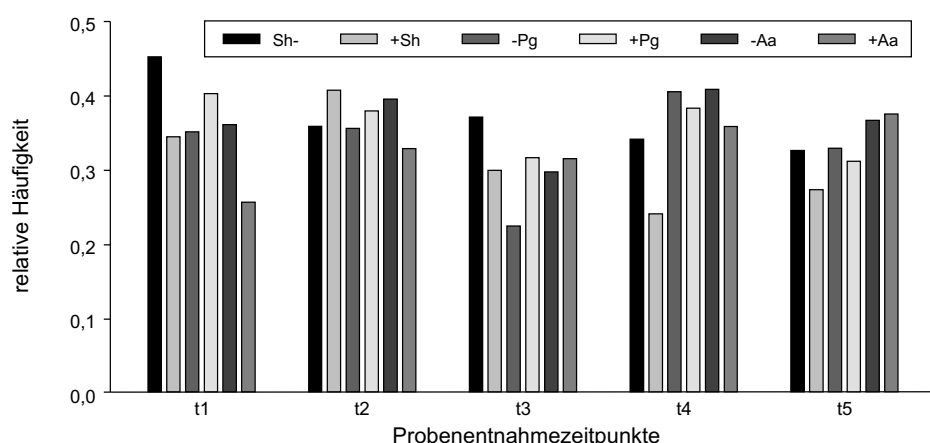


ABBILDUNG 18: DARSTELLUNG DER RELATIVEN HÄUFIGKEITEN VON PORPHYROMONADACEAE

Nach Zeitpunkt der Probenentnahme gruppiertes Säulendiagramm der relativen Häufigkeiten der Familie der Porphyromonadaceae. Antibiotikagabe liegt zwischen t2 und t3, orale Inokulation oder sham-Behandlung liegt zwischen t3 und t4. Eine Ausnahme bildet die Gruppe Sh- (s.o.).

Gammaproteobacteria, die Familie, zu der auch *Aa* zählt, konnten in den vorliegenden Proben nur sehr vereinzelt nachgewiesen werden und ließen sich nicht weiter klassifizieren.

Auf der Ebene der Phyla zeigte sich ein ebenso konstantes Bild der Verteilung im intestinalen Mikrobiom der Versuchstiere. Hauptvertreter sind Firmicutes mit relativen Häufigkeiten zwischen 33,1 bis 62,6 % und Bacteroidetes mit 35,6 bis 64,2 % (Abb. 19).

Zusammenfassend erbrachte die Analyse des gastrointestinalen Mikrobioms im Vergleich der unterschiedlichen Versuchszeitpunkte und im Vergleich der verschiedenen Gruppen keine statistisch signifikanten Veränderungen.

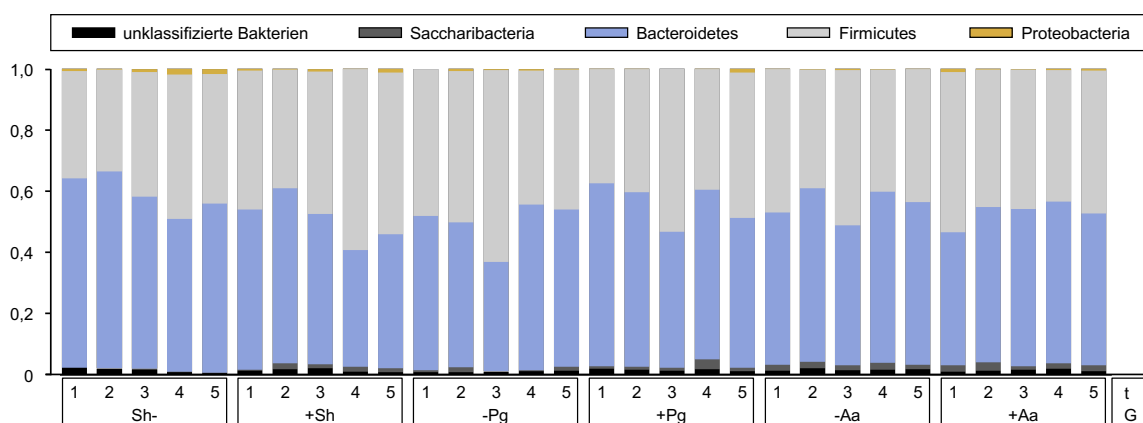


ABBILDUNG 19: DARSTELLUNG DES MIKROBIOMS AUF DER EBENE DER PHYLA

Gestapeltes Säulendiagramm der relativen Häufigkeiten der Phyla. Geordnet nach Gruppen und Zeitpunkten. G = Gruppe, t = Zeitpunkt. *Pg* Teil des Phylums Bacteroidetes, *Aa* Teil der Proteobacteria. Antibiotikagabe liegt zwischen t2 und t3, orale Inokulation oder sham-Behandlung liegt zwischen t3 und t4. Eine Ausnahme bildet die Gruppe Sh- (vgl. Text).

5.7 ZYTOKINANALYSE

Die Messung der Zytokinspiegel diente als Messgröße für die systemische Immunreaktion, die zu drei Zeitpunkten während der Beobachtungszeit des Versuches durchgeführt wurde: zwischen der CIA und oralen Inokulation am Tag 34, nach der Inokulation am Tag 72 und zum Versuchsende. Für die Analyse wurden aus Kapazitätsgründen der Methode vier Individuen pro Gruppe ausgewählt. Um einen möglichst großen Unterschied im Zytokinprofil zu sehen, fiel die Wahl auf Tiere, die einen hohen Arthritiscore beziehungsweise alveolären Knochenverlust aufwiesen.

Mittels des Multiplex Kits LEGENDplex™ Mouse Inflammation panel der Firma BioLegend®, konnten 13 inflammatorische Zytokine detektiert werden (Tab. 14). Zytokine sind Botenstoffe zwischen Zellen des Immunsystems. Anhand der Zusammensetzung von Zytokinen in einer Probe lassen sich Rückschlüsse auf die Lage des Immunsystems ziehen.

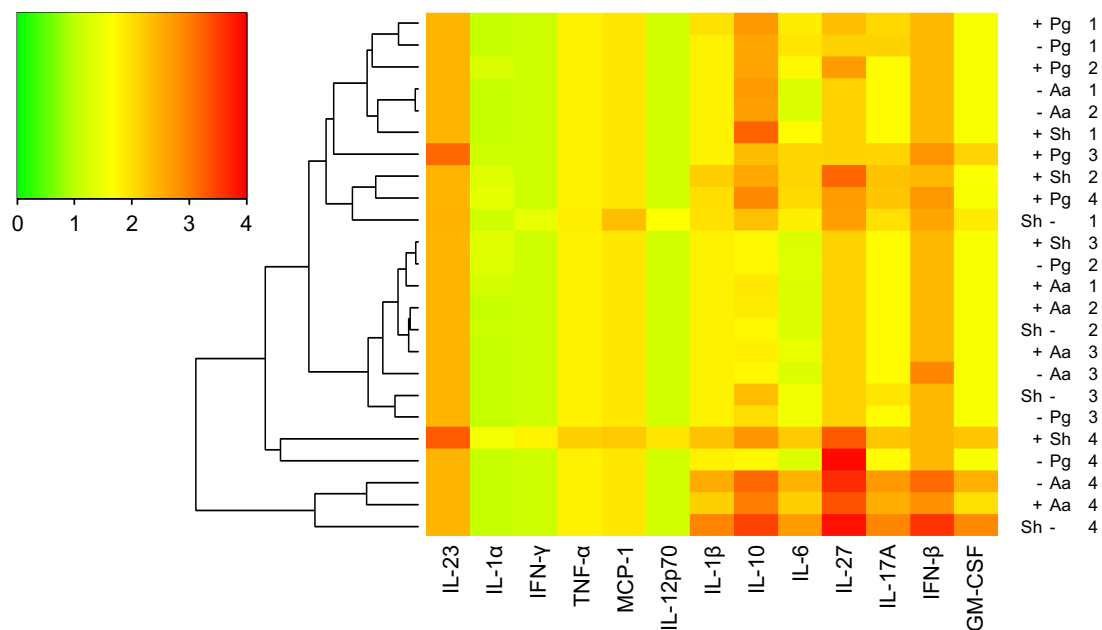


ABBILDUNG 20: HEATMAP DER ZYTOKINSPIEGEL JE INDIVIDUUM ZUM ENDZEITPUNKT

Die Heatmap zeigt die systemische Expression der unten aufgeführten, spaltenweise angeordneten, inflammatorischen Zytokine am Tag 105. Die Höhe der gemessenen Zytokine ist farbcodiert, links ist die Farbskala abgebildet. Die zugehörigen Tiere sind rechts aufgeführt, die verschiedenen Zytokinspiegel eines Tieres sind in Reihen angeordnet. Pro Gruppe wurden die Zytokinspiegel von vier Tieren analysiert. Das Baumdiagramm zeigt die Ähnlichkeit des Zytokinprofils der Individuen auf Basis der Likelihood.

TABELLE 14: GEMESSENE ZYTOKINE MIT JEWEILS WICHTIGSTER FUNKTION

ZYTOKIN	FUNKTION (WICHTIGSTE)
IL-1- α	Fieberentwicklung, T-Zellaktivierung, Makrophagenaktivierung
IL-1- β	Fieberentwicklung, T-Zellaktivierung, Makrophagenaktivierung
IL-6	Wachstum und Differenzierung von T-Zellen, Produktion von Akute-Phase-Proteine, Fieberentwicklung
IL-10	inhibiert Makrophagenfunktion
IL-12p70	Aktiviert NK-Zellen, induziert Differenzierung von CD4-T-Zellen zu T _H 1-Zellen
IL-17A	Proinflammatorisch (Zytokinproduktion)
IL-23	Induziert Proliferation von T _H 17-Gedächtniszellen, erhöhte IFN- γ -Produktion
IL-27	Induziert IL-10 und IL-12-Rezeptor auf T-Zellen
IFN- β	Antiviral, induziert MHC-I-Expression
IFN- γ	Makrophagenaktivierung, Erhöhung der MHC-Expression, Ig-Kassenwechsel, hemmt T _H 2- und T _H 17-Zellen
TNF- α	Fördert Entzündungsprozesse, Endothelaktivierung
GM-CSF	Stimuliert Proliferation und Differenzierung von Myelomonocyten, besonders dendritische Zellen
MCP-1 (CCL2)	Chemokin, lockt Monozyten, NK-, T-Zellen und dendritische Zellen an

aus Janeway, 2018 [58]

Grob lassen sich Zytokine in mehrere Gruppen unterteilen. Inflammatorische Zytokine, darunter IL-1 und IL-6 (letzteres gewinnt in der Labordiagnostik auch im klinischen Setting eine immer größere Bedeutung) und antiinflammatorische Zytokine, darunter IL-10 als bekanntester Vertreter. Der Übergang ist bei einer sehr großen Zahl an verschiedenen Zytokinen jedoch fließend. Hinsichtlich ihrer Funktionen lassen sich Zytokine auch in Familien aufteilen: Dazu zählen koloniestimulierende Faktoren, Interferone und Interleukine, die teilweise namensgebend sind. Die unterschiedlichen Zytokinprofile wurden mittels Likelihoodanalyse in Cluster mit Individuen ähnlicher Profile eingeteilt. In dieser Arbeit zeigten sich jedoch keine verwertbare Clusterbildung. Die gemessenen Zytokinprofile ähnelten sich stark, wodurch eine Unterscheidung der Gruppen anhand des Profils nicht möglich war.

In Abb. 20 ist exemplarisch der Endzeitpunkt in Form einer Heatmap dargestellt. Jedes Kästchen repräsentiert den Messwert eines Zytokins in einem Individuum. Dabei wurden die verschiedenen Zytokine spaltenweise und die Individuen zeilenweise angeordnet. Die Farbcodierung entspricht dem Wert in dem dargestellten Spektrum nach Logarithmierung. Der Baum auf der linken Seite repräsentiert die Ähnlichkeit eines jeden Individuums.

Je weiter rechts sich der Ast aufspaltet, desto ähnlicher sind sich die darunter geclusterten Individuen. Demnach scheinen sich in dieser Arbeit die gemessenen Zytokinprofile der Mäuse +Sh3 und -Pg2 stärker als die Tiere +Sh4 und -Pg4 zu ähneln.

Zusammenfassend zeigen die Zytokinprofile der Versuchstiere zu keinem Zeitpunkt Ähnlichkeiten innerhalb der Gruppen bzw. Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen. Damit scheinen die verschiedenen Behandlungspfade (Arthritis, keine Arthritis, orale Inokulation mit unterschiedlichen Erregern) sich nicht auf die systemische Zytokinproduktion auszuwirken. Es konnten somit keine Änderungen der Zytokinprofile in Abhängigkeit der Krankheitsphase abgeleitet werden.

5.8 PROTEOMICS

Um die Auswirkungen der oralen Inokulation unterschiedlicher Erreger auf die Arthritis weiter zu untersuchen, wurden einigen Versuchstieren zum Zeitpunkt der Asservierung die Synovia beider Kniegelenke entnommen und an diesen eine Proteomanalyse durchgeführt.

Tiere aus diesem Versuchsablauf und aus dem Parallelversuch wurden in diese Analyse ungeachtet der Reihenfolge der ausgelösten Erkrankungen einbezogen. Es wurden insgesamt 20 Proben von zehn Mäusen gewonnen, jeweils die Synovia des rechten und linken Kniegelenks. Bei den einbezogenen Versuchstieren handelt es sich um Tiere der gemeinsamen Kontrollgruppe (Sh-), sowie Tiere aus Gruppen mit induzierter CIA und oraler Inokulation mit entweder *Pg* oder *Aa*. Bei der Analyse zeigten sich vier Proben mit einer starken Überexpression von Proteinen aus Muskelgewebe und Blut (2x +Sh, 1x Sh+, 1x Aa+). Diese wurden verworfen, da es sich hier am ehesten um eine Verunreinigung oder fehlerhafte Präparation des Gewebes handelte. In den übriggebliebenen 16 Proben konnten 1275 verschiedene Proteine oder Proteingruppen nachgewiesen werden, diese zeigten sich in mindestens zwei der analysierten Proben und enthielten mindestens zwei eindeutige Peptide. Davon differierten 24 Proteine oder Proteingruppen signifikant zwischen den einzelnen Proben (Tab. 15).

Die Expression dieser 24 Proteine wurde einer Hauptkomponentenanalyse zugeführt. Die Analyse zeigte ein deutliches Clustering der einzelnen Versuchsgruppen, bei der die erste Hauptkomponente 41,3% der Varianz erklärte, inklusive der zweiten Hauptkomponente stieg die erklärte Varianz auf 69,6 %.

TABELLE 15: SIGNIFIKANT VERÄNDERTE PROTEINE DER PROTEOMANALYSE

PROTEINNAME	ABK.	CLUSTER
Acetyl-CoA Thioesterase 9 (mitochondrial)	ACOT9	+Aa
Gerinnungsfaktor XII	FA12	+Aa
Neurofilament polypeptid (medium)	NEFM	+Aa
Transmembranes p24 Trafficking Protein 3	TMED3	+Aa
IgG 2A-Kette C-Region (A allele)	IGHG	+Aa
IgG 2B-Kette C-Region	IGH-3	+Aa
Immunglobulin κ konstante Kette	IGKC	+Aa
IgG 1-Kette C-Region (sekretierte Form)	IGHG1	+Aa
Ras-assoziiertes Protein (Rab-6A)	RAB6A	+Aa
Ig schwere Kette V-Region (AC38 205.12)	HVM	+Aa
Ig κ Kette Region V-III (PC 2880/PC 1229)	KV3A	+Aa
Lysozym C-2	LYZ2	+Pg, Pg+
H-2 Klasse II Histokompatibilitätsantigen A-D β -Kette	H2-AB1	+Pg, Pg+
H-2 Klasse II Histokompatibilitätsantigen A-Q α -Kette	H2-AA	+Pg, Pg+
26S-Proteasom non-ATPase regulatorische Untereinheit 2	PSMD2	Sh+
Propionyl-CoA Carboxylase β -Kette (mitochondrial)	PCCB	Sh+
UDP-Glucose-Glycoprotein-Glucosyltransferase	UGGT1	Sh+
Carboanhydrase 2	CA2	Sh+
Lamin-B1	LMNB1	Sh+
Erythrozytenmembranprotein Band 4.2	EPB42	Sh+
Myosin-8	MYH8	Sh+
Cytochrome P450 (2E1)	CYP2E1	Sh-
Myelinprotein P0	MPZ	Sh-
Thyroidhormon-induzierbares hepatisches Protein	THRSP	Sh-

Aus den 24 differierenden Proteinen seien an dieser Stelle einige exemplarisch herausgegriffen. Versuchstiere aus den Gruppen Pg+ bzw. +Pg zeigten eine stärkere Expression der α - und β -Ketten der Histokompatibilitätsantigene, welche gemeinsam den Haupt-Histokompatibilitätskomplex (MHC) bilden. Dieser wird von antigenpräsentierenden Zellen (APC) exprimiert, die hierüber phagozytierte Proteinanteile in Form von Polypeptidketten präsentieren und eine Stimulation von T-Zellen bedingen können. Damit zeigen Pg inokulierte Tiere in diesem Versuch deutliche Hinweise auf eine verstärkte zelluläre Immunantwort.

In der Gruppe der mit *Aa* inokulierten Versuchstieren zeigt sich hingegen eine vermehrte Antikörperproduktion, exemplarisch zu erkennen an einer signifikant erhöhten κ -konstanten Kette der Immunglobuline (IGKC). Damit lässt sich hier auf ein Überwiegen der humorale Immunantwort schließen (Abb. 21).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass sich sowohl die Arthritis als auch die Inokulation mit *Aa* oder *Pg* im Proteom des Synovialgewebes widerspiegelt. Die verschiedenen inokulierten Erreger schienen verschiedene Formen der Immunantwort in der Maus hervorrufen. So zeigt *Pg* Hinweise auf eine zelluläre Immunantwort und *Aa* auf eine humorale Reaktion.

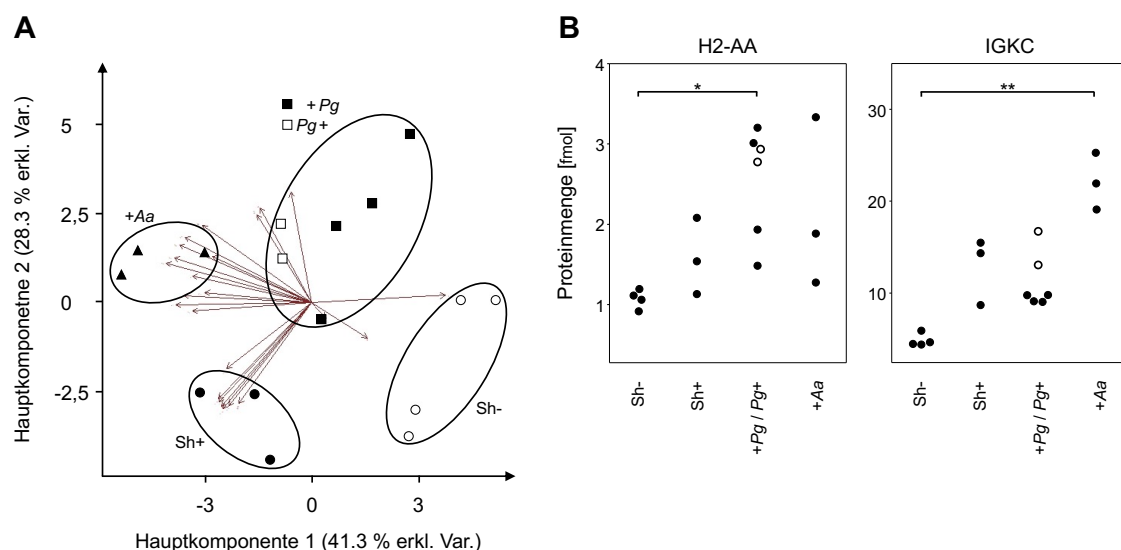


ABBILDUNG 21: PROTEOMICS HAUPTKOMPONENTENANALYSE

A: Hauptkomponentenanalyse mit Clustering basierend auf der Proteinexpression im Synovialgewebe zeigt, dass diese sich je nach Behandlung der Versuchstiere unterscheidet. **B:** Punktdiagramm der exemplarischen Expression der α -Kette des MHC-Klasse-II-Rezeptors und der κ -konstanten Kette von Immunglobulinen. Offene Kreise repräsentieren hier Tiere der Gruppe *Pg+*. Nichtparametrischer ANOVA (Kruskal-Wallis-Test).

VI. DISKUSSION

Die vorliegende Arbeit widmete sich einem Mausmodell, um die experimentell ausgelöste Arthritis und Parodontitis mit ihrem jeweiligen Effekt aufeinander näher zu untersuchen. Diesem Vorhaben wurden, wie eingangs bereits erwähnt, vier Hypothesen vorangestellt:

1. Beide Erkrankungen verstärken jeweils die Pathogenese der anderen.
2. *Porphyromonas gingivalis* und *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* zeigen jeweils unterschiedliche Wirkungen auf die Erkrankungen mitsamt ihrem Verlauf.
3. Die Zytokinspiegel verändern sich in Abhängigkeit der Krankheitsphase.
4. Das Proteom der Synovia unterliegt einer Veränderung im Zuge der unterschiedlichen Krankheitsexposition.

Im Folgenden werden die Ergebnisse dieser Arbeit vor dem Hintergrund dieser Hypothesen diskutiert.

Zu Beginn der Versuchsreihen fiel die Entscheidung im Sinne der Reduktion der Versuchstiere für eine gemeinsame Kontrollgruppe. Diese durchlief die Versuchsanordnung in der Reihenfolge, die in unserer Arbeitsgruppe bereits etabliert war und damit umgekehrt zu den Maßnahmen in den anderen Gruppen in dieser Arbeit. Sie bekam Cotrimoxazol über das Trinkwasser, gefolgt von sham-Inokulationen, ohne anschließende CIA (vgl. dazu Kapitel 4.1). In der Retrospektive stellte sich heraus, dass eine eigene Kontrollgruppe für diese Arbeit zum Vergleich sinnvoll gewesen wäre, auch wenn die Auswertung der Ergebnisse mit wenigen Hürden auch mit der reduzierten Anzahl der Tiere möglich war.

Die Wahl des entsprechenden Mausstammes fiel auf die F1-Generation aus DBA/1J und B10Q Mäusen, da diese sowohl für die CIA als auch den durch orale Inokulation mit Bakterien ausgelösten alveolären Knochenverlust empfänglich ist. Um einen möglicherweise protektiven Einfluss weiblicher Geschlechtshormone auszuschalten, wurden nur männliche Tiere in den Versuch aufgenommen [43, 49]. Die Arthritis konnte in diesem Versuch erfolgreich ausgelöst werden. Sie zeigte sich in einer makroskopisch sichtbaren Schwellung und Rötung der Extremitäten sowie in den histologischen Untersuchungen auf der mikroskopischen Ebene durch zelluläre Infiltrate sowie Knochen- und Knorpeldestruktion. Vergleicht man die kumulative Inzidenz der Arthritis mit denen der Vorversuche von Ebbers und Lübcke et al. (85 bis 100%), so konnten in diesem Versuch nur Inzidenzen von 50 bis 75 % verzeichnet werden. Da sowohl die Methodik als auch der Mausstamm mit denen der Vorversuche übereinstimmten, ist dies

durchaus verwunderlich. An dieser Stelle sei anzumerken, dass zu Beginn dieser Versuche die Arthritisinduktion erst nach einem Herstellerwechsel des verwendeten Kollagens erfolgreich war. Auch könnten kleine Abweichungen in der Verabreichung der Induktions- bzw. Boost-Injektionen für einen gewissen Unterschied der kumulativen Inzidenz gesorgt haben. In der Forschungsliteratur fanden sich auch weitere Spannbreiten der kumulativen Inzidenz nach CIA, beispielsweise bei Marchesan et al. Hier konnten Werte von 25 bis 60 % beobachtet werden. Die Vergleichbarkeit gestaltet sich hier jedoch noch schwerer, da in dieser Studie der Mausstamm (DBA1/J) und das verwendete Kollagen Typ II (Huhn) abwich [47].

Auffällig in dieser Arbeit ist der scheinbar zweigipflige Verlauf der Arthritisentwicklung bei einigen Tieren. Hier wären zwei Ursachen möglich: Zum einen ist der gewählte Beobachtungszeitraum von 84 Tagen nach Boost-Injektion im Vergleich zu anderen Arbeiten doppelt so lang [43, 49, 59, 60], sodass ein phasen- oder schubweiser Verlauf der CIA denkbar wäre, der bei kürzeren Versuchszeiten nicht beobachtet werden kann. Zum anderen wäre ein Verlauf möglich, bei dem zunächst einzelne Gelenke betroffen sind, die Inflammation in diesen Gelenken wieder abflaut und im Anschluss weitere – bisher nicht betroffene – Gelenke von der Entzündungsreaktion betroffen sind, was zu einem zweiten Anstieg des Arthritiscores führt.

Ein systemisches Korrelat der makroskopisch gut sichtbaren Arthritis konnte in dieser Arbeit, im Sinne einer Veränderung des Zytokinprofils, nicht gezeigt werden. Dies ist vor allem deshalb nicht nachvollziehbar, da es in der Parallelarbeit an einzelnen Zeitpunkten zu einer systemischen Erhöhung inflammatorischer Zytokine kam [42]. Hier zeigten sich besonders die Spiegel von IL-1- β , IL-10, IL-27 und IFN- β nach der Inokulation bei Tieren ohne Arthritisinduktion erhöht. Das Zytokinprofil der untersuchten Tiere ließ hier in der Likelihood-Analyse ein Clustering zum Endzeitpunkt zu, welches sich gut mit dem Status der Arthritisinduktion deckte. Sowohl Aa als auch Pg können diese Veränderungen der Zytokinspiegel durch ihre Virulenzfaktoren vermitteln [61, 62]. Dies passt auch auf die Darstellung von Noack et al., die einen Überblick über die Zytokinfunktion in der RA geben. Besonders IL-1, IL-6, IL-17 und TNF- α werden hier in Zusammenhang zu Knochen- und Gelenkdestruktion sowie gesteigerter Krankheitsaktivität gesetzt [63].

Vor diesem Hintergrund wäre auch in dieser Arbeit zu erwarten gewesen, dass Tiere einer Gruppe ein Cluster auf Grundlage des ähnlichen Zytokinprofils bilden, zumal mittels ELISA eine systemische Reaktion auf die inokulierten Erreger festgestellt werden konnte. Die Bildung von Antikörpern gegen Aa und Pg wurde als Indiz für eine erfolgreiche Inokulation in ausreichender Dosis gewertet, um eine systemische Reaktion im Sinne einer spezifischen, humoralen Abwehr zu erzielen. In diesem Kontext wurde eine Wiederholung der Analyse in Betracht gezogen. Das war jedoch nicht möglich, da dies ein neuerliches Auftauen der Proben bedürfe und noch unwahrscheinlicher zu verwertbaren Ergebnissen geführt hätte.

Damit ist die dritte Hypothese, welche dieser Arbeit vorangestellt wurde - „Die Zytokinspiegel verändern sich in Abhängigkeit der Krankheitsphase.“ - aus den Ergebnissen dieser Arbeit nicht anzunehmen und somit zunächst zu verwerfen.

In der vorliegenden Arbeit konnte bei jedem Tier, welches mit *Aa* oder *Pg* inokuliert wurde, CT-morphologisch ein alveolärer Knochenverlust im Vergleich zur Kontrollgruppe gemessen werden. Einen histologischen Anhalt für eine Inflammation der Gingiva konnte zum Endzeitpunkt nicht ausgemacht werden. Andere Arbeitsgruppen zeigten ähnlich heterogene Ergebnisse, beispielhaft seien an dieser Stelle zwei Arbeiten genannt. So konnten Arimatsu et al. ebenfalls keine gingivale Inflammation detektieren [64]. Hier wurde in der C57BL/6 Maus analog zu unserem Versuchsaufbau mit 10^9 KBE *Pg* in 100 μ L CMC zweimal pro Woche über einen Zeitraum von 5 Wochen inokuliert. Die histologischen Veränderungen des Kiefergewebes wurden ebenfalls nur mittels HE-Färbung quantifiziert. Dies widerspricht jedoch den Ergebnissen von Cantley et al., die in BALB/c Mäusen eine lokale Entzündung mit Knochenbeteiligung sehen konnten [65]. Hier wurde jedoch über 44 Tage täglich der Kiefer mit einer 24×10^{10} KBE *Pg* pro Milliliter CMC bestrichen und somit deutlich höhere Dosen über einen längeren Zeitraum als in dieser Arbeit aufgebracht. Auch die histologische Aufarbeitung ging mit einer immunhistochemischen Behandlung gegen RANKL über die in dieser Arbeit verwendeten HE-Färbung hinaus. Ein direkter Vergleich gestaltet sich dementsprechend schwierig.

Bereits 2012 konnten Marchesan et al. zeigen, dass eine orale Inokulation von mindestens 10^3 KBE *Pg* in CMC für eine nachhaltige Besiedelung der Mundhöhle ausreichte, die mindestens 42 Tage nach der Inokulation mittels oraler Abstriche nachweisbar blieb [66]. In dieser Arbeit wurde für die orale Inokulation das Mikrobiom des Darmes als Surrogatparameter verwendet in der Annahme, dass sich durch diese nicht invasive Methode die orale Inokulation nachweisen ließe. Porphyromonadaceae erwiesen sich jedoch als Teil der kommensalen Darmflora der Maus, wie bereits andere Veröffentlichungen zeigten [67, 68]. Dementsprechend konnte die orale Inokulation mit *Pg* nicht in einer signifikanten Veränderung des Mikrobioms gesehen werden. Gammaproteobacteria bzw. *Aa* konnten in den Stuhlproben nicht nachgewiesen werden. Nach einer oralen Gabe von Erregern ist es auch denkbar, dass es nicht im gesamten Intestinum zu einer Veränderung der Darmflora kommt. Arimatsu et al. konnten beispielsweise nur in den distalen drei Zentimetern des Ileums der Maus eine signifikante Steigerung der Bacteroidalespopulation nach oraler Inokulation mit *Pg* zeigen [64]. Damit wäre das Ileum als Nische zur Ansiedelung von Bacteroidales im Intestinum der Maus denkbar. In der Literatur sind die Ergebnisse in diesem Punkt nicht eindeutig. Im Gegensatz hierzu liegen einige Veröffentlichungen vor, in denen eine Veränderung des Mikrobioms anhand von Stuhlproben gesehen wurde [69, 70]. Zudem zeigen Rogier et al., dass sich nach der Arthritisinduktion die

relative Häufigkeit der Bacteroidetes zu Gunsten der Firmicutes und Proteobacteria verringert [71].

Auch die orale Gabe von Cotrimoxazol in Vorbereitung auf die orale Inokulation hat in dieser Arbeit keinen Effekt auf das Mikrobiom gezeigt. Dies passt zu den Erkenntnissen von Korte et al., darin wurden die Auswirkungen von oral verabreichtem Cotrimoxazol auf das Mikrobiom von Mäusen untersucht [72]. Als Erklärungsansatz wurde hier die frühe Resorption des Medikaments im oberen Gastrointestinaltrakt und damit konsekutiv verminderter lokaler Wirkung im unteren Gastrointestinaltraktes diskutiert [73].

In dieser Arbeit konnte ein signifikanter alveolärer Knochenverlust bei Tieren, die oral mit *Aa* oder *Pg* inokuliert wurden, beobachtet werden. Die Schwere des alveolären Knochenverlustes war jedoch unabhängig von einer vorbestehenden Arthritis oder der verwendete Erregerspezies. Die Ergebnisse des Parallelversuches zeigten ebenfalls einen alveolären Knochenverlust nach Inokulation der jeweiligen Erreger und unabhängig von der später induzierten Arthritis. Der alveoläre Knochenverlust war dort jedoch weniger schwerwiegend, trotz längerem Intervall zwischen Induktion und Assessment im μ CT als in der hier vorliegenden Arbeit. Dies ist interessant und suggeriert, dass Mäuse möglicherweise in der Lage sind, den Alveolarknochen zu regenerieren oder zu remodellieren. Für den Menschen wurde bereits eine transiente Gingivitis sowie eine limitierte Regeneration des Alveolargewebes beschrieben [74, 75]. Darüber hinaus ließe sich mutmaßen, dass die Versuchstiere über die längere Beobachtungszeit nach der Inokulation im Parallelversuch die Mundhöhle von den eingebrachten Pathogenen reinigen. Dies wurde für *Pg* bereits von Marchesan et al. gezeigt, hier wurden regelmäßig Abstriche aus der oralen Cavität der Versuchstiere genommen und mittels PCR auf Arginin-spezifisches Gingipain eine spezifische Proteinase von *Pg*, untersucht. Direkt nach der Inokulation von *Pg* zeigten fast alle Mäuse ein positives Ergebnis, dagegen fielen die Abstriche 58 Tage später ausnahmslos negativ aus [47].

In Bezug auf den Gewichtsverlauf zeigt sich eine Einschränkung der Gewichtszunahme im Verlauf des Versuches bei Tieren mit Arthritisinduktion. Das könnte auf ein reduziertes Wohlbefinden und eine beeinträchtigte Gesundheit während der CIA zurückzuführen sein. Die Arthritis hat einen großen Einfluss auf das Wohlbefinden der Tiere und findet somit auch Berücksichtigung in den Abbruchkriterien des Versuches. Zudem ist ein leichter Rückgang der Gewichtszunahme während der wiederholten Inokulationen zu beobachten. Diese scheinen jedoch eher durch die nötigen Narkosen erklärt, welche mit einer passageren Reduktion der Nahrungsaufnahme einhergehen, als durch die Parodontitisinduktion selbst. Tiere der sham behandelten Gruppen zeigten vergleichbare Gewichtsverläufe wie die Gruppen, welche mit *Pg* oder *Aa* behandelt wurden. In der Maus konnte von Mulukey et al. festgestellt werden, dass

Übergewicht in der experimentellen PD eine Rolle spielt. Insbesondere zeigte sich die Anreicherung der Nahrung mit unterschiedlichen Fettsäuren als Einflussgröße auf die PD Entwicklung [76]. In diesem Versuchsaufbau erhielten alle Tiere das gleiche Futter, um eine unterschiedliche Ernährung als Ursache für die Gewichtsunterschiede auszuschließen. Die im Parallelversuch beobachteten erhöhten Zytokinspiegel nach der oralen Inokulation könnten ursächlich für die negative Entwicklung des Körpergewichtes eine Rolle spielen. Mit Blick auf den Menschen zeigte sich bereits ein Zusammenhang zwischen einer Körpergewichtszunahme und PD bzw. systemischer Inflammation [77]. Bei der Korrelation von PD und Übergewicht im Menschen wird mechanistisch eine einseitige Ernährung und die mit Übergewicht vergesellschaftete Erhöhung der Zytokinspiegel diskutiert. Popko et al. zeigten, dass insbesondere eine Erhöhung von IL-6 und TNF in Kombination mit erhöhten CRP Werten, einem akute Phase Protein, mit Übergewicht korrelieren [78].

Die Hauptfragestellung dieser Arbeit, ob eine Parodontitis einen Einfluss auf die vorbestehende Arthritis zeigt, bedarf einer detaillierten Antwort. Der gemessene alveoläre Knochenverlust wird durch eine zuvor ausgelöste Arthritis nicht beeinflusst. Ebenso wurden im Parallelversuch keine Veränderung des alveolären Knochenverlustes durch die nachfolgend induzierte Arthritis erkennbar.

Die Reihenfolge der ausgelösten Erkrankungen in dieser Arbeit – erst CIA, dann experimentelle PD – wurde bisher in dieser Weise noch nicht untersucht. Einzig Jung et al. erwähnt in einem Mausexperiment, bei dem eine CIA der Inokulation von *Pg* vorausging, dass die Kombination gegenüber CIA allein einen signifikant stärkeren alveolären Knochenverlust nach sich zieht. Das Hauptaugenmerk lag dort jedoch auf den Auswirkungen verschiedener intraperitoneal eingebrachter Stämme von *Pg* [60]. Ein Vergleich zu anderen Arbeiten wird durch die abweichende Applikation der Erreger erschwert. Bezüglich des Einflusses der CIA auf den Zahnhalteapparat finden sich folgende Aussagen in der Forschungsliteratur: Park et al. konnten in männlichen DBA/1 Mäusen einen alveolären Knochenverlust durch experimentelle Arthritis zeigen und dies durch Hinweise auf eine gestörte Stoffwechselhomöostase des Knochens untermauern [59]. Auch Queiroz-Junior et al. sahen in der C57B/6 Maus einen alveolären Knochenverlust nach CIA unabhängig von einer experimentellen Parodontitis, dieser Effekt konnte durch eine orale Inokulation mit *Aa* verstärkt werden [79]. Die Diskrepanz zu den Ergebnissen dieser Arbeit lässt sich nur schwer in ein Verhältnis setzen. Möglicherweise spielen die verwendeten Mausstämme, die Art der Arthritisinduktion und die Zeiträume bis zur Datenerhebung, eine signifikante Rolle.

Auch die Schwere der Arthritis war in beiden Versuchsabläufen unbeeindruckt von der experimentellen PD. Hier zeigt die bereits erwähnte Arbeit von Jung et al., dass eine intraperitoneale Gabe von *Pg* die Schwere einer zuvor initiierten CIA im makroskopischen Scoring und in der Auswertung histologischer Analysen verstärkt [60]. Hier und in anderen Veröffentlichungen wurden neben einer längeren Anwendung der repetitiven Inokulationen auch ein deutlich kürzeres Intervall zwischen Inokulation und CIA gewählt oder sogar beide Erkrankungen zeitgleich ausgelöst [80, 81]. Das könnte möglicherweise eine größere Rolle spielen als vermutet. Dies ist aber erneut unter dem Vorbehalt unterschiedlicher Mausstämme, verschieden angewandter Inokulationsregime und Abweichungen in der Durchführung der CIA zu betrachten. Wie oben bereits beschrieben, ist in diesem und dem Parallelversuch von einem vorübergehenden alveolären Knochenverlust auszugehen. Es lässt sich nur spekulieren, ob in diesem Zusammenhang eine Induktion der experimentellen PD zum Zeitpunkt der stärksten Ausprägung einer symptomatischen Arthritis oder vice versa zu anderen Ergebnissen führt. In der Zusammenschau zeigt sich in dieser Arbeit, dass die PD und die CIA sich gegenseitig nicht zu beeinflussen scheinen. Damit ist am ehesten davon auszugehen, dass die epidemiologisch beim Menschen beobachtete Koinzidenz der beiden Erkrankungen auf gemeinsamen prädisponierenden Faktoren fußt. Eine sich bedingende Pathogenese beider Erkrankungen scheint vor dem Hintergrund dieser experimentellen Arbeit eher unwahrscheinlich. Die erste Hypothese, „Beide Erkrankungen verstärken jeweils die Pathogenese der anderen.“, erscheint damit eher wenig wahrscheinlich.

Die wichtigste Erkenntnis dieser Arbeit basiert auf der Proteomanalyse der entnommenen Synovia aus den Knien einzelner Versuchstiere. Hier zeigten sich interessante Signaturen des Proteoms der verschiedenen Gruppen (*Pg* oder *Aa*), ohne dass diese in der makroskopischen Arthritis, noch der histologischen Aufarbeitung des Gewebes sichtbar waren. Chukkapalli et al. haben bereits ein Homing von *Pg* in das von entzündlichen Prozessen betroffenen Gelenk im Zuge einer Arthritis mittels Immunfluoreszenz Mikroskopie beobachten können. Mittels PCR der 16s rRNA wurden zudem verschiedene Gewebe analysiert. Damit konnte in Herz, Leber und Nieren der Versuchstiere ein Nachweis von *Pg* erfolgen. Nach zusätzlich ausgelöster CIA war der Nachweis auch in Gelenken und der Lunge einzelner Tiere positiv [80]. Auch im Menschen ließ sich DNA oraler pathogener Keime in arthritischen Gelenken und Serum nachweisen [82]. In dem experimentellen Setup der hier vorliegenden Arbeit konnte mittels Hauptkomponentenanalyse des Proteoms festgestellt werden, dass die Synovia von Mäusen, die mit *Pg* behandelt wurden, eine höhere Expression von MHC Klasse II Proteinen aufwiesen. Damit wäre in diesem Falle eine Aktivität bei Antigenpräsentierenden Zellen und T-Lymphozyten an-

zunehmen. Im Gegensatz dazu zeigten Tiere, die mit *Aa* inokuliert wurden, in der Proteomanalyse eine erhöhte Expression von Immunglobulinen (IgG1, IgG2b) und Kappa-Leichtketten, was eine eher humorale Immunantwort suggeriert.

Dies bedarf jedoch weiterer Untersuchungen, da die Stichproben in dieser Arbeit relativ gering sind. Auch kann die Änderung auf der hier betrachteten molekularen Ebene auch durch das Homing unterschiedlicher Bakterien erklärt werden. Ebenso wären aber auch unterschiedliche Krankheitsentitäten denkbar, die durch die unterschiedlichen Erreger hervorgerufen werden. Damit lässt sich vermuten, dass die zweite und vierte Hypothese - „*Porphyromonas gingivalis* und *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* zeigen jeweils unterschiedliche Wirkungen auf die Erkrankungen mitsamt ihrem Verlauf“ und „Das Proteom der Synovia unterliegt einer Veränderung im Zuge der unterschiedlichen Krankheitsexposition.“ – vor diesem Hintergrund nicht verworfen werden müssen.

Falls sich zukünftig nach weiterführenden Forschungsbemühungen unterschiedliche Krankheitsentitäten abgrenzen lassen, hätte dies interessante Auswirkungen, wenn man es auf den Menschen übertragen würde. In diesem Falle wären unterschiedliche Therapieansätze in Bezug auf die Wahl des entsprechenden DMARD denkbar. Eine Krankheitsentität, die eher eine Antigenpräsentation und T-Zell-Aktivität aufweist, würde somit zielgerichteter mit einem TNF α -Blocker (z.B. Adalimumab) zu behandeln sein. Dagegen wäre eine Entität mit verstärkter humoraler Reaktion mit einer B-Zell-gerichteten Therapie (z.B. Rituximab) behandelbar. In diesem Falle hätte man mit der Proteomanalyse diagnostisch ein Werkzeug an der Hand, welches das heute mangels entsprechender Entscheidungshilfen praktizierte Trial-and-Error in der Therapie der rheumatoiden Arthritis reduzieren könnte [19]. Ressourcen wären zielgerichteter einsetzbar und der Leidensdruck der Patienten reduziert. Doch bedarf dies wesentlich weitergehender Forschungsbemühungen vor allem in Hinblick auf den Mechanismus, wie die Erreger das Proteom der Synovia beeinflussen. Auch ist das entsprechende Diagnostikum zur Gewinnung einer Gewebeprobe nach einer Risiko-Nutzen-Abwägung zu wählen.

In dieser Arbeit und in Zusammenschau mit der Parallelarbeit wurde der gegenseitige Einfluss der Parodontitis auf die experimentelle Arthritis und vice versa untersucht. Während die Auswirkungen der Erreger *Pg* und *Aa* auf der makroskopischen Ebene nur gering ausfielen, zeigte sich hier doch ein deutlicher Einfluss der Pathogene auf das Proteom der Synovia. Dies suggeriert die Hoffnung auf eine Unterscheidung von verschiedenen Krankheitsentitäten innerhalb der rheumatoiden Arthritis. Auf dieser Grundlage könnte man dann frühzeitig eine individualisierte und damit wirksame Therapie einleiten. So könnten schwerwiegende und progrediente Verläufe mit allen persönlichen und gesellschaftlichen Folgen der RA reduziert werden.

VII. LITERATURVERZEICHNIS

1. Rheumatoide Arthritis. www.rheuma-liga.de. Besucht 8. November 2021. <https://www.rheuma-liga.de/rheuma/krankheitsbilder/rheumatoide-arthritis>
2. Smolen JS, Aletaha D, Barton A, et al. Rheumatoid arthritis. *Nat Rev Dis Primers*. 2018;4:18001.
3. Cojocaru M, Cojocaru IM, Silosi I, Vrabie CD, Tanasescu R. Extra-articular Manifestations in Rheumatoid Arthritis. *Maedica (Bucur)*. 2010;5(4):286-291.
4. Myasoedova E, Crowson CS, Kremers HM, Therneau TM, Gabriel SE. Is the incidence of rheumatoid arthritis rising?: results from Olmsted County, Minnesota, 1955-2007. *Arthritis Rheum*. 2010;62(6):1576-1582.
5. Tobón GJ, Youinou P, Saraux A. The environment, geo-epidemiology, and autoimmune disease: Rheumatoid arthritis. *J Autoimmun*. 2010;35(1):10-14.
6. Peschken CA, Esdaile JM. Rheumatic diseases in North America's indigenous peoples. *Semin Arthritis Rheum*. 1999;28(6):368-391.
7. Ngo ST, Steyn FJ, McCombe PA. Gender differences in autoimmune disease. *Front Neuroendocrinol*. 2014;35(3):347-369.
8. Sokka T, Kautiainen H, Pincus T, et al. Work disability remains a major problem in rheumatoid arthritis in the 2000s: data from 32 countries in the QUEST-RA study. *Arthritis Res Ther*. 2010;12(2):R42.
9. Gregersen PK, Silver J, Winchester RJ. The shared epitope hypothesis. An approach to understanding the molecular genetics of susceptibility to rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 1987;30(11):1205-1213.
10. Hirschfeld J, Roberts HM, Chapple IL, et al. Effects of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* leukotoxin on neutrophil migration and extracellular trap formation. *J Oral Microbiol*. 2016;8:33070.
11. König MF, Abusleme L, Reinholdt J, et al. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*-induced hypercitrullination links periodontal infection to autoimmunity in rheumatoid arthritis. *Sci Transl Med*. 2016;8(369):369ra176.
12. Stack RJ, Sahni M, Mallen CD, Raza K. Symptom complexes at the earliest phases of rheumatoid arthritis: a synthesis of the qualitative literature. *Arthritis Care Res (Hoboken)*. 2013;65(12):1916-1926.
13. Gibofsky A. Overview of epidemiology, pathophysiology, and diagnosis of rheumatoid arthritis. *Am J Manag Care*. 2012;18(13 Suppl):S295-S302.
14. Herold et al., ed. *INNERE MEDIZIN*. Cologne, Germany. 2017:567-666.

15. Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA, et al. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 1988;31(3):315-324.
16. Aletaha D, Neogi T, Silman AJ, et al. 2010 Rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. *Arthritis Rheum.* 2010;62(9):2569-2581.
17. Edelman J, Russell AS. A comparison of patients with seropositive and seronegative rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int.* 1983;3(1):47-48.
18. van Riel PL, Renskers L. The Disease Activity Score (DAS) and the Disease Activity Score using 28 joint counts (DAS28) in the management of rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol.* 2016;34(5 Suppl 101):S40-S44.
19. Smolen JS, Landewé RBM, Bijlsma JWW, et al. EULAR recommendations for the management of rheumatoid arthritis with synthetic and biological disease-modifying antirheumatic drugs: 2019 update. *Ann Rheum Dis.* 2020;79(6):685-699.
20. Roder C, Thomson MJ. Auranofin: repurposing an old drug for a golden new age. *Drugs R D.* 2015;15(1):13-20.
21. Abbasi M, Mousavi MJ, Jamalzei S, et al. Strategies toward rheumatoid arthritis therapy; the old and the new. *J Cell Physiol.* 2019;234(7):10018-10031.
22. Startseite | DG PARO. www.dgparo.de. Besucht 8. November 2021. <https://www.dgparo.de/patientenportal>
23. Papapanou PN, Sanz M, Buduneli N, et al. Periodontitis: Consensus report of workgroup 2 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. *J Periodontol.* 2018;89 Suppl 1:S173-S182.
24. e.V. (BZÄK) B-A der DZ. Deutsche Mundgesundheitsstudie (DMS). Bundeszahnärztekammer - Arbeitsgemeinschaft der Deutschen Zahnärztekammern e.V. (BZÄK). Besucht 8. November, 2021. <https://www.bzaek.de/ueber-uns/daten-und-zahlen/deutsche-mundgesundheitsstudie-dms.html>
25. Eke PI, Dye BA, Wei L, et al. Update on Prevalence of Periodontitis in Adults in the United States: NHANES 2009 to 2012. *J Periodontol.* 2015;86(5):611-622.
26. Hajishengallis G. Periodontitis: from microbial immune subversion to systemic inflammation. *Nat Rev Immunol.* 2015;15(1):30-44.
27. Marsh PD. Microbial ecology of dental plaque and its significance in health and disease. *Adv Dent Res.* 1994;8(2):263-271.
28. Hajishengallis G, Darveau RP, Curtis MA. The keystone-pathogen hypothesis. *Nat Rev Microbiol.* 2012;10(10):717-725.
29. Whitmore SE, Lamont RJ. The pathogenic persona of community-associated oral streptococci. *Mol Microbiol.* 2011;81(2):305-314.

30. Nussbaum G, Shapira L. How has neutrophil research improved our understanding of periodontal pathogenesis?. *J Clin Periodontol*. 2011;38 Suppl 11:49-59.
31. Hernández M, Gamonal J, Tervahartiala T, et al. Associations between matrix metalloproteinase-8 and -14 and myeloperoxidase in gingival crevicular fluid from subjects with progressive chronic periodontitis: a longitudinal study. *J Periodontol*. 2010;81(11):1644-1652.
32. Zubery Y, Dunstan CR, Story BM, et al. Bone resorption caused by three periodontal pathogens in vivo in mice is mediated in part by prostaglandin. *Infect Immun*. 1998;66(9):4158-4162.
33. Laine ML, Crielaard W, Loos BG. Genetic susceptibility to periodontitis. *Periodontol 2000*. 2012;58(1):37-68.
34. Slots J. Periodontitis: facts, fallacies and the future. *Periodontol 2000*. 2017;75(1):7-23.
35. 1999 International International Workshop for a Classification of Periodontal Diseases and Conditions. Papers. Oak Brook, Illinois, October 30-November 2, 1999. *Ann Periodontol*. 1999;4(1):i-112.
36. Caton JG, Armitage G, Berglundh T, et al. A new classification scheme for periodontal and peri-implant diseases and conditions - Introduction and key changes from the 1999 classification. *J Clin Periodontol*. 2018;45 Suppl 20:S1-S8.
37. Heitz-Mayfield LJ, Lang NP. Surgical and nonsurgical periodontal therapy. Learned and unlearned concepts. *Periodontol 2000*. 2013;62(1):218-231.
38. Lundberg K, Wegner N, Yucel-Lindberg T, Venables PJ. Periodontitis in RA-the citrullinated enolase connection. *Nat Rev Rheumatol*. 2010;6(12):727-730.
39. Genco RJ, Van Dyke TE. Prevention: Reducing the risk of CVD in patients with periodontitis. *Nat Rev Cardiol*. 2010;7(9):479-480.
40. Kerschull M, Demmer RT, Papapanou PN. "Gum bug, leave my heart alone!"--epidemiologic and mechanistic evidence linking periodontal infections and atherosclerosis. *J Dent Res*. 2010;89(9):879-902.
41. Whitmore SE, Lamont RJ. Oral bacteria and cancer. *PLoS Pathog*. 2014;10(3):e1003933.
42. Buschhart AL, Bolten L, Volzke J, et al. Periodontal pathogens alter the synovial proteome. Periodontal pathogens do not exacerbate macroscopic arthritis but alter the synovial proteome in mice. *PLoS One*. 2020;15(12):e0242868.
43. Ebbers M, Lübcke PM, Volzke J, et al. Interplay between *P. gingivalis*, *F. nucleatum* and *A. actinomycetemcomitans* in murine alveolar bone loss, arthritis onset and progression. *Sci Rep*. 2018;8(1):15129.
44. TierSchG. www.gesetze-im-internet.de. Besucht 8. November 2021. <http://www.gesetze-im-internet.de/tierschg/>

45. TierSchVersV. [www.gesetze-im-internet.de](http://www.gesetze-im-internet.de/tierschversv/). Besucht 8. November 2021. <http://www.gesetze-im-internet.de/tierschversv/>
46. Brand DD, Latham KA, Rosloniec EF. Collagen-induced arthritis. *Nat Protoc.* 2007;2(5):1269-1275.
47. Marchesan JT, Gerow EA, Schaff R, et al. Porphyromonas gingivalis oral infection exacerbates the development and severity of collagen-induced arthritis. *Arthritis Res Ther.* 2013;15(6):R186.
48. Valverde-Franco G, Hum D, Matsuo K, et al. The in vivo effect of prophylactic subchondral bone protection of osteoarthritic synovial membrane in bone-specific Ephb4-over-expressing mice. *Am J Pathol.* 2015;185(2):335-346.
49. Lübcke PM, Ebbers MNB, Volzke J, et al. Periodontal treatment prevents arthritis in mice and methotrexate ameliorates periodontal bone loss. *Sci Rep.* 2019;9(1):8128.
50. Preparing 16S Ribosomal RNA Gene Amplicons for the Illumina MiSeq System. Besucht 8. November, 2021. https://emea.illumina.com/content/dam/illumina-support/documents/documentation/chemistry_documentation/16s/16s-metagenomic-library-prep-guide-15044223-b.pdf
51. Silva reference files. <https://mothur.org>. Besucht 8. November 2021. https://www.mothur.org/wiki/Silva_reference_files#Release_128.
52. Schloss PD, Westcott SL, Ryabin T, et al. Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Appl Environ Microbiol.* 2009;75(23):7537-7541.
53. CRAN - Package vegan. R-project.org. Veröffentlicht 2019. Besucht 8. November 2021. <https://cran.r-project.org/web/packages/vegan/index.html>
54. Wiśniewski JR, Zougman A, Nagaraj N, Mann M. Universal sample preparation method for proteome analysis. *Nat Methods.* 2009;6(5):359-362.
55. Pappesch R, Warnke P, Mikkat S, et al. The Regulatory Small RNA MarS Supports Virulence of Streptococcus pyogenes. *Sci Rep.* 2017;7(1):12241.
56. Fox J, Weisberg S. An R Companion to Applied Regression. 3rd ed. SAGE Publications Inc. 2018.
57. Olsen I, Shah HN, Gharbia SE. Taxonomy and biochemical characteristics of Actinobacillus actinomycetemcomitans and Porphyromonas gingivalis. *Periodontol 2000.* 1999;20:14-52.
58. Murphy K, Weaver C. *Janeway Immunologie*. Springer Berlin Heidelberg; 2018.
59. Park JC, Su C, Jung IH, et al. Mechanism of alveolar bone loss in a collagen-induced arthritis model in mice. *J Clin Periodontol.* 2011;38(2):122-130.
60. Jung H, Jung SM, Rim YA, et al. Arthritic role of Porphyromonas gingivalis in collagen-induced arthritis mice. *PLoS One.* 2017;12(11):e0188698.

61. Belibasakis GN, Maula T, Bao K, et al. Virulence and Pathogenicity Properties of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *Pathogens*. 2019;8(4):222.
62. Bostanci N, Belibasakis GN. Porphyromonas gingivalis: an invasive and evasive opportunistic oral pathogen. *FEMS Microbiol Lett*. 2012;333(1):1-9.
63. Noack M, Miossec P. Selected cytokine pathways in rheumatoid arthritis. *Semin Immunopathol*. 2017;39(4):365-383.
64. Arimatsu K, Yamada H, Miyazawa H, et al. Oral pathobiont induces systemic inflammation and metabolic changes associated with alteration of gut microbiota. *Sci Rep*. 2014;4:4828.
65. Cantley MD, Haynes DR, Marino V, Bartold PM. Pre-existing periodontitis exacerbates experimental arthritis in a mouse model. *J Clin Periodontol*. 2011;38(6):532-541.
66. Marchesan JT, Morelli T, Lundy SK, et al. Divergence of the systemic immune response following oral infection with distinct strains of Porphyromonas gingivalis. *Mol Oral Microbiol*. 2012;27(6):483-495.
67. Vida A, Kardos G, Kovács T, Bodrogi BL, Bai P. Deletion of poly(ADP-ribose) polymerase-1 changes the composition of the microbiome in the gut. *Mol Med Rep*. 2018;18(5):4335-4341.
68. Sun L, Ma L, Zhang H, et al. Fto Deficiency Reduces Anxiety- and Depression-Like Behaviors in Mice via Alterations in Gut Microbiota. *Theranostics*. 2019;9(3):721-733.
69. Jubair WK, Hendrickson JD, Severs EL, et al. Modulation of Inflammatory Arthritis in Mice by Gut Microbiota Through Mucosal Inflammation and Autoantibody Generation. *Arthritis Rheumatol*. 2018;70(8):1220-1233.
70. Sato K, Takahashi N, Kato T, et al. Aggravation of collagen-induced arthritis by orally administered Porphyromonas gingivalis through modulation of the gut microbiota and gut immune system. *Sci Rep*. 2017;7(1):6955.
71. Rogier R, Evans-Marin H, Manasson J, et al. Alteration of the intestinal microbiome characterizes preclinical inflammatory arthritis in mice and its modulation attenuates established arthritis. *Sci Rep*. 2017;7(1):15613.
72. Korte SW, Dorfmeier RA, Franklin CL, Ericsson AC. Acute and long-term effects of antibiotics commonly used in laboratory animal medicine on the fecal microbiota. *Vet Res*. 2020;51(1):116.
73. Kremers P, Duivivier J, Heusghem C. Pharmacokinetic studies of co-trimoxazole in man after single and repeated doses. *J Clin Pharmacol*. 1974;14(2):112-117.
74. Eberhard J, Grote K, Luchtefeld M, et al. Experimental gingivitis induces systemic inflammatory markers in young healthy individuals: a single-subject interventional study. *PLoS One*. 2013;8(2):e55265.

75. Kao RT, Nares S, Reynolds MA. Periodontal regeneration - intrabony defects: a systematic review from the AAP Regeneration Workshop. *J Periodontol.* 2015;86(2 Suppl):S77-S104.
76. Muluke M, Gold T, Kiefhaber K, et al. Diet-Induced Obesity and Its Differential Impact on Periodontal Bone Loss. *J Dent Res.* 2016;95(2):223-229.
77. Keller A, Rohde JF, Raymond K, Heitmann BL. Association between periodontal disease and overweight and obesity: a systematic review. *J Periodontol.* 2015;86(6):766-776.
78. Popko K, Gorska E, Stelmaszczyk-Emmel A, et al. Proinflammatory cytokines IL-6 and TNF- α and the development of inflammation in obese subjects. *Eur J Med Res.* 2010;15 Suppl 2(Suppl 2):120-122.
79. Queiroz-Junior CM, Madeira MF, Coelho FM, et al. Experimental arthritis exacerbates *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*-induced periodontitis in mice. *J Clin Periodontol.* 2012;39(7):608-616.
80. Chukkapalli S, Rivera-Kweh M, Gehlot P, et al. Periodontal bacterial colonization in synovial tissues exacerbates collagen-induced arthritis in B10.RIII mice. *Arthritis Res Ther.* 2016;18(1):161.
81. de Aquino SG, Abdollahi-Roodsaz S, Koenders MI, et al. Periodontal pathogens directly promote autoimmune experimental arthritis by inducing a TLR2- and IL-1-driven Th17 response. *J Immunol.* 2014;192(9):4103-4111.
82. Sandhya P, Danda D, Sharma D, Scaria V. Does the buck stop with the bugs?: an overview of microbial dysbiosis in rheumatoid arthritis. *Int J Rheum Dis.* 2016;19(1):8-20.

VIII. 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.

Otterndorf, den 15.01.2022

Lennart Bolten

IX. LEBENS LAUF

DER LEBENS LAUF IST IN DER ONLINE PUBLIZIERTEN VERSION NICHT VERFÜGBAR.

DER LEBENS LAUF IST IN DER ONLINE PUBLIZIERTEN VERSION NICHT VERFÜGBAR.

X. THESEN

Die hier vorliegende Arbeit hat zum Ziel die Auswirkungen der Parodontitis auf eine vorbestehende Arthritis in der Maus zu untersuchen. Hierbei wurden die Versuchstiere länger als in vergleichbaren Studien nach Induktion beider Erkrankungen beobachtet und sowohl makroskopische, mikroskopische und molekulare Parameter erhoben. Hieraus waren folgende Thesen abzuleiten:

1. Mittels makroskopischer Beobachtung der Versuchstiere und Anlegen eines entsprechenden Scoring-Systems ist eine Messung der Schwere und Inzidenz der Collagen-induzierten-Arthritis möglich. Bei längerer Beobachtung der Versuchstiere zeigte sich bei einigen Tieren ein zwei-gipfliger Verlauf der Arthritis mit intermittierend geringer ausgeprägter Symptomatik.
2. Alveolärer Knochenverlust, als Modell der Parodontitis in der Maus, unterliegt möglicherweise einer Regeneration des Knochengewebes. In der Parallelarbeit bestand die Parodontitis länger als in dieser Arbeit und zeigte dennoch einen geringeren Rückgang des Alveolarknochens.
3. Die Analyse des Mikrobioms ist nicht als verlässlicher Surrogatparameter für eine erfolgreiche orale Inokulation mit *Aa* und *Pg* geeignet, da *Pg* Teil der kommensalen Darmflora der Versuchstiere ist und *Aa* im Stuhl nicht gut nachweisbar war.
4. Der Antikörpernachweis im Serum zeigte eine systemische Immunreaktion gegen oral inokulierte Erreger und lässt vermuten, dass die Erreger in ausreichender Dosis appliziert wurden.
5. Die Proteomanalysen der Synovia erkrankter Mäuse lässt verschiedene Krankheitsentitäten der Arthritis schlussfolgern, dies im Sinne eines Überwiegens der humoralen oder zellulären Immunantwort, je nach verwendetem oralen Pathobionten. Nach weiterführenden Forschungsbemühungen könnten Therapieentscheidungen zukünftig hierdurch beeinflusst sein.

XI. DANKSAGUNG

Ich möchte mich an dieser Stelle bei allen beteiligten Personen bedanken, ohne sie wäre diese Schrift und die dahinterstehende Arbeit nicht möglich gewesen.

An erster Stelle gilt mein Dank Frau Professorin Dr. rer. nat. Brigitte Müller-Hilke, unter ihrer Leitung durfte ich meine Promotion erstellen. Ihre Motivation, Expertise und sehr gute Betreuung waren unerlässlich für das Gelingen dieser Arbeit.

Frau Dr. Anna-Lena Buschhart danke ich für die gute und partnerschaftliche Zusammenarbeit während unserer Experimente.

Herrn Dr. Johann Volzke danke ich für die einzigartige Unterstützung bei vielen Experimenten, für die Preisgabe seines großen Fachwissens und ein allzeit offenes Ohr.

Ich danke auch Dr. Paul Lübcke und Dr. Katharina Wenndorf für Ihre Bemühungen mir den Umgang mit den Versuchstieren, die μ CT-Analysen und Stuhlprobenaufbereitung zu lehren. Für die Proteomanalysen der Synovia gilt mein Dank Dr. Stefan Mikkat. Jana Bull und Dr. Katharina Ekat danke ich für die Anzucht der Bakterien und hier besonders Jana Bull für die Anfertigung der PCR zur Mikrobiomanalyse, welche dann von Frau Dr. Susanne Kneitz analysierte. Auch Ihr gilt mein Dank. Ich danke Ilona Klammuß und Karin Gerber für die Hilfe im Bezug auf die Versuchstiere, auch von ihnen konnte ich eine Menge über den Umgang mit den Mäusen lernen.

Marja Liisa Jagosch danke ich für Hilfe bei der Erstellung der dreidimensionalen Kieferdarstellungen.

Für die Durchsicht und sehr hilfreichen Anmerkungen zu dieser Dissertationsschrift danke ich herzlich Dipl. Ing. Guido Friederich, Dr. Kerstin von Schwerin, Dr. Wolfgang von Schwerin, Marja Liisa Jagosch sowie Sophie von Schwerin.

Ich möchte mich im besonderen Maße bei meinen Eltern, meinen Großeltern, der gesamten Familie sowie meiner Freundin bedanken. Ohne euch und eure Unterstützung hätte ich es nicht so weit gebracht! Nicht zuletzt gilt mein Dank auch allen Freunden, welche mich über meinen bisherigen Lebensweg - in Göttingen, Rostock, Lübeck und der Heimat - begleitet haben.