

Aus der
Klinik für Zahnerhaltung und Parodontologie
Klinikdirektor: Prof. Dr. Hermann Lang



**Die Rolle von CD5-positiven B-Zellen in parodontalen Erkrankungen
- Eine immunhistologische und mikrobiologische Untersuchung -**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Zahnmedizin
der Zahnmedizinischen Fakultät
der Universitätsmedizin Rostock

vorgelegt von

Elisabeth Clara Gottschalk
aus Templin

Hamburg, 15.05.2025

Dekan: Prof. Dr. med. univ. Bernd Krause



Dieses Werk ist lizenziert unter einer
Creative Commons Namensnennung - Nicht kommerziell -
Keine Bearbeitungen 4.0 International Lizenz.

Jahr der Einreichung: 2025

Jahr der Verteidigung: 2026

Dekan: Prof. Dr. med. univ. Bernd Krause

1. Gutachter: Prof. Dr. Hermann Lang; Poliklinik für Zahnerhaltung und Parodontologie, Universität Rostock

2. Gutachter: Prof. Dr. Stefanie Scheu; Institut für Immunologie, Universität Rostock

3. Gutachter: Prof. Nadine Schlüter; Poliklinik für Zahnerhaltung, Parodontologie und Präventivzahnmedizin, Medizinische Hochschule Hannover

In dieser Arbeit wird aus Gründen der besseren Lesbarkeit das generische Maskulinum verwendet. Weibliche und anderweitige Geschlechteridentitäten werden dabei ausdrücklich mitgemeint, soweit es für die Aussage erforderlich ist.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Parodontale Gesundheit	2
1.2	Gingivitis.....	2
1.2.1	Initiale Läsion	2
1.2.2	Frühe Läsion	3
1.2.3	Etablierte Läsion.....	3
1.3	Parodontitis	4
1.4	Immunologischer Hintergrund	4
1.4.1	Angeborene Immunabwehr	4
1.4.2	Adaptive Immunabwehr.....	7
1.5	Mikrobieller Hintergrund	9
1.5.1	Sulkusflüssigkeit.....	9
1.5.2	Bakterien	9
2	Zielstellung und Hypothese.....	11
3	Material und Methoden	12
3.1	Patientenrekrutierung.....	12
3.2	Klinische Untersuchung	12
3.3	Vorbereitung der Proben.....	13
3.4	FACS Analyse der B-Zellen Oberflächenmarker	15
3.4.1	Probenvorbereitung.....	15
3.4.2	Bestimmung der absoluten Zellzahlen der PBMCs.....	16
3.5	Isolierung der bakteriellen DNA	17
	Bestimmung der Zytokine	19
3.6	19	
3.7	Statistik.....	21
4	Ergebnisse	22
4.1	Demographische Merkmale der Patienten.....	22
4.2	Klinische Werte	23
4.2.1	Sondierungstiefe (ST)	23
4.2.2	Klinischer Attachmentverlust (CAL).....	24
4.2.3	Modifizierter Sulkus-Blutungs-Index (mSBI).....	25

4.2.4	Approximaler Plaque Index (API).....	26
4.3	B-Zell-Analyse.....	27
4.4	Zytokinanalyse	29
4.5	Mikrobiomanalyse	31
4.5.1	α -Diversität.....	35
4.5.2	β -Diversität	35
4.5.3	Vergleich der Phänotypen	37
4.5.4	Unterschiedliche Häufungen nach Gattungen.....	38
5	Diskussion.....	41
5.1	Hintergrund und Hypothese	41
5.2	Zytokine.....	41
5.3	B-Zellen.....	42
5.4	Mikrobiom.....	43
5.5	Limitationen.....	44
6	Zusammenfassung	45
	Thesen	46
	Literaturverzeichnis.....	I
	Abbildungsverzeichnis	X
	Tabellenverzeichnis	XI
	Abkürzungsverzeichnis	XII
	Danksagungen.....	XIV
	Selbständigkeitserklärung.....	XV

1 Einleitung

Parodontitis ist eine multifaktorielle immunentzündliche und infektiöse Erkrankung des Parodontiums. Sie zählt gemeinsam mit der Gingivitis zu den häufigsten Parodontalerkrankungen (Trindade *et al.*, 2014). Laut der Mundgesundheitsstudie 2014 hat jeder fünfte junge Erwachsene (35-44 Jahre) und jeder zweite jüngere Senior (65-74 Jahre) in Deutschland eine mittelschwere chronische Parodontitis (Jordan and Micheelis, 2016). Chronische Parodontitis ist auch mit allgemeinmedizinischen Erkrankungen assoziiert, darunter neurologische, kardiovaskuläre, metabolische, chronische respiratorische, gastrointestinale und entzündliche Autoimmunerkrankungen, Tumorerkrankungen, Osteoporose, sowie Schwangerschaftskomplikationen (Martínez-García and Hernández-Lemus, 2021).

Der Übergang von einem gesunden zu einem fortgeschrittenen pathologischen Zustand ist ein komplexer Prozess, der häufig von einer Veränderung der Mundflora begleitet wird (Bui *et al.*, 2019). Die Taschenflora parodontal-gesunder Patienten besteht überwiegend aus aeroben grampositiven Mikroorganismen, während bei Parodontitispatienten auch anaerobe gramnegative Bakterien zu finden sind (Abusleme *et al.*, 2013; Hasan and Palmer, 2014). In diesen parodontalen Läsionen nimmt die Häufigkeit der mikrobiellen Nebenprodukte und Zellbestandteile allmählich zu (Madianos, Bobetsis and Kinane, 2005). Sobald diese Antigene von Wirtszellen erkannt werden, wird die Produktion von entzündungsfördernden Mediatoren gefördert (Yucel-Lindberg and Båge, 2013). Insbesondere die Freisetzung von Interleukin-1 beta (IL-1 β), Interleukin-6 (IL-6) und Interleukin-8 (IL-8, CXCL8) spielt dabei eine signifikante Rolle bei der immunologischen Reaktion. Die durch diese Zytokine ausgelöste Signalkaskade führt letztendlich zu irreversiblen Knochenverlust, dem Kennzeichen der Parodontitis (Könönen, Gursoy and Gursoy, 2019; Muñoz-Carrillo *et al.*, 2019).

Die Anfälligkeit eines Patienten für Parodontitis ist schwer vorhersagbar. Während einige bekannte Risikofaktoren wie Rauchen oder Diabetes mellitus für die Entwicklung einer Parodontitis mitverantwortlich sind (Ylöstalo *et al.*, 2004; Lalla *et al.*, 2007; Genco and Borgnakke, 2013), ist die kritische Determinante für das Fortschreiten der Krankheit wahrscheinlich das Ausmaß der Immunantwort auf die Dysbiose. Ein genauerer Blick auf den Entzündungsort zeigte eine signifikante Expansion von B-Zellen und Plasmazellen bei fortgeschrittener Parodontitis im Gegensatz zu einer stabilen Gingivitis-Läsion, die hauptsächlich aus T-Zellen besteht (Ohlrich, Cullinan and Seymour, 2009).

Diesbezüglich wurde die Rolle von CD5+ B-Zellen (auch bekannt als B-1a-Zellen) bei schwerer Parodontitis in den letzten zwanzig Jahren relativiert. Im Jahr 2002 zeigten Berglundh *et al.* eine beträchtlich erhöhte Population von B-1a-Zellen bei Patienten mit aggressiver lokaler Parodontitis (Berglundh *et al.*, 2002). Im Jahr 2009 gab die gleiche Forschungsgruppe an, dass fast 60 % der analysierten B-Zellen (einschließlich der B-1a-Zellfraktion) in schweren chronischen Parodontitisläsionen autoreaktive Eigenschaften aufwiesen (Donati *et al.*, 2009). Tatsächlich sind die CD5+ B-Zellen mit der Produktion von Anti-Kollagen-Antikörpern in entzündlich-veränderten parodontalen Geweben assoziiert, wie von Sugawara *et al.* im Jahr 1992 beschrieben (Sugawara *et al.*, 1992). Die Rolle von CD5+ B-Zellen wurde auch bei anderen Erkrankung mit pathologischer Knochenresorption untersucht (z.B. rheumatoide Arthritis (RA)), wo eine fehlregulierte Immunantwort

ebenfalls zu einer Gewebeerstörung führt (Deng *et al.*, 2016). Bei RA-Patienten fanden Engelmann *et al.* eine positive Korrelation zwischen der Häufigkeit von CD5+ B-Zellen in peripheren Blut- und Serumspiegel von carboxyterminalem Telopeptid des Typ-1-Kollagens (CTX-1), dass ein häufiger Biomarker der Knochenresorption ist (Engelmann *et al.*, 2015). Ebbers *et al.* untersuchten bei Mäusen mit kollagenindizierter Arthritis den Alveolarknochenverlust nach oraler Impfung mit *Fusobacterium nucleatum* (*F. nucleatum*), *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (*A. actinomycetemcomitans*) und *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*). Während die orale Impfung aller drei Pathobionten einen geringen Alveolarknochenverlust verursachte, gab es einen signifikant höheren Knochenverlust, wenn nur *P. gingivalis* geimpft wurde. (Ebbers *et al.*, 2018).

In Anbetracht der beschriebenen Autoreaktivität von CD5+ B-Zellen sowie ihres Potenzials, die Knochenresorption zu fördern, könnte das Ausmaß der B-1a-Zellexpansion möglicherweise den Verlauf einer Parodontitis beeinflussen. Im Zusammenhang mit parodontaler Gesundheit wurde die Beteiligung von CD5+ B-Zellen jedoch überwiegend in schweren Fällen von Parodontitis ohne breiten mikrobiologischen Hintergrund untersucht. Ziel dieser Studie war, die Beteiligung von B-1a-Zellen bei chronischer mittelschwerer Parodontitis, Gingivitis und gesunden Probanden in Bezug auf die CD5+-Zellreifung, die lokale Zytokinexpression sowie das vollständige orale Mikrobiota-Profil zu untersuchen.

1.1 Parodontale Gesundheit

Das Parodontium besteht aus verschiedenen Strukturen. Es beinhaltet die Gingiva, den Wurzelzement, das Desmodont und den Zahn umgebenden Alveolarknochen (Di Benedetto *et al.*, 2013). Das Saumepithel sorgt für Herstellung der epithelialen Integrität der Mundhöhle (Gingiva und Zahnhartsubstanz). Sie besitzt eine hohe Zellteilungsrate (4-6 Tage) und durch ihre gute Permeabilität bildet sie einen Diffusionsweg zwischen den Stoffwechselprodukten der Plaque (Antigene, Chemotaxine, Toxine) und auch für körpereigene Abwehrstoffe, wie bspw. Antikörper und Serumexudat (Herbert Wolf, 2004). Da sich praktisch jederzeit mikrobielle Plaque an der Zahnoberfläche befindet, weist selbst die gesunde Gingiva ein leukozytäres Infiltrat auf. Ein schwacher Leukozytenstrom wandert ständig vom subepithelialen Gefäßplexus durch das Saumepithel bis hin zum Gingivalrand, oder Sulkusboden, wo es die Mundhöhle erreicht (Schroeder, 1997). Dieser Leukozytenstrom beinhaltet hauptsächlich polymorphkernige neutrophile Granulozyten (PMN), welche die Bakterien phagozytieren, die durch das epitheliale Gewebe migrieren (Kinane, 2001). Zugleich wird er aber nicht von Plasmaexudaten aus der Sulkusflüssigkeit begleitet und stellt kein Zeichen der Entzündung dar (Schroeder, 1997).

1.2 Gingivitis

1.2.1 Initiale Läsion

Eine Gingivitis wird fast immer durch die bakterielle Plaque bzw. einen Biofilm verursacht (Loe, Theilade and Jensen, 1965; Williams *et al.*, 1997). Etwa vier Tage nach Beginn der Plaqueansammlung tritt die initiale Läsion in der Gingiva ein. Durch Substanzen der mikrobiellen Plaque und deren Abfallprodukte kommt es zu einer akuten exsudativen Entzündung (Page, 1986). Plaquemetaboliten wie

Lipopolysaccharide (LPS), Proteine aus bakteriellen Vesikeln und chemotaktisch aktive Stoffe stimulieren das Gewebe und die Gefäße, unterstützt durch perivaskuläre Mastzellen und Makrophagen. Diese exprimieren proinflammatorische Zytokine (IL-1, Matrixmetalloproteinasen (MMP), Prostaglandin E2 (PGE2), TNF- α , IL-8), sowie die Signalstoffe wie Histamin, Prostazyklin und Stickstoffmonoxid (NO) (Herbert Wolf, 2004). Letztere induzieren eine Erhöhung der Durchflussrate der Sulkusflüssigkeit im Sulkus und aus den postkapillären Alveolen treten verstärkt PMNs, sowie Serumproteine (Komplement, Akute-Phase-Proteine) in den subgingivalen Plexus. (Schroeder, 1997; Herbert Wolf, 2004). Im marginalen gingivalen Bindegewebe kommt es zu Kollagenabbau. Das infiltrierte marginale Bindegewebe umfasst dabei etwa fünf bis zehn Prozent (Page, 1986).

Der koronalmarginale Teil des Saumepithels wird durch die erhöhte Exsudation aufgelockert und der Epithelansatz teilweise aufgelöst. Infolge dessen kann sich die supragingivale Plaque, unter Voraussetzung, dass sie die humorale und zelluläre Abwehrbarriere durchdringt, apikalwärts ausdehnen (Schroeder, 1997).

1.2.2 Frühe Läsion

Die frühe Läsion beginnt etwa sieben Tage nach Beginn der bakteriellen Plaqueansammlung. Histologisch etabliert sie sich durch ein charakteristisches Infiltrat von Lymphozyten und Makrophagen mit einer kleinen Gruppe von Plasmazellen. Den Hauptanteil an Lymphozyten machen T-Zellen aus (Page, 1986). Die aktivierten T-Zellen sind für die Koordination der Immunantwort verantwortlich durch die Ausschüttung von Zytokinen (IL-2-6, IL 10, TNF α & β , Interferon gamma (IFN γ)). Auch aktivierte PMN exprimieren diverse Leukotriene und Zytokine. Die wenigen vorhandenen Plasmazellen reagieren mit der Produktionen von Immunglobulinen und Zytokinen (Schroeder, 1997). Der Kollagenzerfall im marginalen Gingivagewebe erreicht nun etwa 60-70 %. Die umliegenden Fibroblasten sezernieren Tissue inhibitors of MMP (TIMP) und MMP. Die Zunahme der gingivalen Sulkusflüssigkeit und die steigende Anzahl an Leukozyten erreicht ihr Maximum zwischen sechs und zwölf Tagen nach dem Entstehen einer klinischen Gingivitis. (Page, 1986; Schroeder, 1997).

1.2.3 Etablierte Läsion

Wenn sich die Anzahl an Plasma- und B- Zellen erhöht und sich eine gingivale Tasche mit einem Taschenepithel gebildet hat, geht die Gingivitis in eine etablierte Läsion über (Schroeder und Attsröm 1977). Eine große Anzahl an Neutrophilen tritt im Saum- und Taschenepithel auf und Makrophagen wandern in die bindegewebs- und faserreiche Lamina Propria, wobei das Typ-1 Kollagen bis auf wenige Reste abgebaut wird. Die Zellen im Infiltrat sind zu 54 % T-Lymphozyten, 33 % B-Lymphozyten und 8 % Makrophagen. Aktive Fibroblasten sezernieren zahlreiche Zytokine, wie TNF α , IL-1 β , IL-6, IL8 und PGE2, MMP und TIMP (Daly, Clancy and Cripps, 1983; Schroeder, 1997).

Die Lokalisation der bakteriellen Plaque reicht von supra- bis subgingival dicht an den Taschenboden. Nach Entfernung der Plaque ist die Gingivitis reversibel, es gibt also eine vollständige Rückbildung der Entzündung und die Synthese von neuen Kollagens (Schroeder, 1997).

Untersuchungen zeigten, dass es zwei Typen einer etablierten Gingivitis gibt. Die Gingivitis kann stabil

bleiben und sich über Monate und Jahre nicht ändern oder sie entwickelt sich in eine progressive gewebeschädigende Läsion (Schroeder & Lindhe 1975).

1.3 Parodontitis

Parodontitis ist eine multifaktorielle immunentzündliche und infektiöse Erkrankung des Parodontiums. Sie zählt gemeinsam mit der Gingivitis zu den häufigsten Parodontalerkrankungen (Trindade *et al.*, 2014). Histopathologisch ähnelt die Gingivitis der Parodontitis. Doch mit Fortschreitung der Plaque nach subgingival, siedeln sich, wegen des geringeren Sauerstoffpartialdrucks am Taschenboden, immer mehr gramnegative, fakultativ oder strikt anaerobe Spirochäten und Stäbchen an. Diese sind virulenter und pathogener als die zuvor hauptsächlich aeroben Bakterien aus der supragingivalen Plaque (Schroeder, 1997). Außerdem erhöht sich der Anteil der Plasmazellen auf über 50 %. Dabei überwiegt die Population der B-Zellen den der T-Zellen (Kinane, 2001). Im Folgenden ändert sich die Immunreaktion hin in eine B-Zell-Plasmazellantwort unter Bildung hoher IL-1, IL-6 und PGE2-Spiegel (Ohlrich, Cullinan and Seymour, 2009). Makrophagen werden durch die vermehrten bakteriellen Metabolite (z.B. LPS, Antigene, Lipoteichonsäuren (LTA)) aktiviert und schütten u.a. IL-1 β , TNF- α aus, das die umliegenden Fibroblasten zur Produktion von Kollagen abbaufördernden Mediatoren wie MMP und PGE2 angeregt. Beide Mediatoren fördern außerdem die Aktivierung von Osteoklasten und damit den Knochenabbau (Herbert Wolf, 2004).

Klinisch ist die Parodontitis durch eine Ausdehnung epithelialer Gewebe nach apikal entlang der Wurzeloberfläche, Bindegewebsverlust und krestalen Knochenabbau gekennzeichnet (Kinane, 2001). Diese Veränderungen sind irreversibel (Müller-Glauser and Schroeder, 1982).

1.4 Immunologischer Hintergrund

1.4.1 Angeborene Immunabwehr

Das angeborene Immunsystem bildet die erste Verteidigungslinie des Körpers gegen Krankheitserreger (Akira, Uematsu and Takeuchi, 2006). Es besitzt Rezeptoren, welche eindringende Pathogene anhand von sich wiederholenden Mustern erkennen können und darauf mit immer gleichen Verteidigungsmechanismen reagieren. Solche Muster können zum Beispiel LPS, LTA, oder doppelsträngige RNA von Bakterien sein. Manche dieser Rezeptoren aktivieren direkt die Phagozytose von Mikroorganismen, andere regen eine intrazelluläre Signalkaskade an, welche eine lokale Entzündung verursacht und nachfolgend neue Effektorzellen rekrutiert bzw. das erworbene Immunsystem aktiviert. Komponenten des Systems sind unter anderem Barrieren, wie Epithelzellen, die einen dichten Zellverband bilden, und so Pathogene vor dem Eindringen abwehren. Andere Komponenten stellen Moleküle zur Pathogenerkennung dar. Dazu gehören das Komplementsystem, die durch einen eindringenden Krankheitserreger entweder direkt oder durch an Krankheitserreger gebundene Antikörper indirekt aktiviert werden. Auch Toll-like-Rezeptoren gehören zu solchen Molekülen. Sie können einige spezifische Muster von Pathogenen erkennen und eine Signalkaskade in Gang setzen woraufhin die Synthese von inflammatorischen Chemokinen und Zytokinen induziert wird. Phagozyten stellen eine weitere Komponente der angeborenen Immunabwehr dar. Sie umfassen die Makrophagen, welche von Monozyten abstammen, PMNs und Neutrophile. Diese sind in der Lage

Pathogene zu phagozytieren und im aktiven Zustand auch Chemokine und Zytokine und andere Mediatoren zu sezernieren. Dadurch wird eine Inflammation im Gewebe ausgelöst. Es kommt lokal zu einer Erweiterung der Blutgefäße bzw. einer Proliferation, somit zu einer erhöhten Durchblutung. Endothelzellen setzen Adhäsionsmoleküle frei, die es den Leukozyten erlauben, an diesen zu haften und durch Wanderung durch die gelockerten Endothelzellen zum Infektionsort zu gelangen (Langefeld *et al.*, 2008).

Zytokine, Interleukine und Chemokine

Zytokine sind Peptide, die für die intrazelluläre Kommunikation und Signalübertragung zwischen Zellen verantwortlich sind. Sie treten bei der angeborenen und adaptiven Wirtsabwehr, bei Zellwachstum- und Differenzierung, beim Zelltod und Reparaturprozessen zur Wiederherstellung der Homöostase auf. Zytokine wirken auf Zellen, welche komplementäre Rezeptoren exprimieren und werden praktisch von jeder Zelle als Reaktion auf toxische Reize produziert (Oppenheim, 2001). Interleukine sind eine Untergruppe der Zytokine und ermöglichen die Signalübertragung von Leukozyten untereinander (Offenbacher, 1996). Chemokine sind eine große Unterfamilie der Zytokine und besitzen die Fähigkeit die Rekrutierung und Aktivierung von Leukozyten zu regulieren (Bonecchi *et al.*, 2009). Hauptverursacher für einen Entzündungsprozess im Parodont sind Bakterien, die Substanzen freisetzen, die das angeborene Immunsystem aktivieren. Es werden proinflammatorische Zytokine exprimiert, welche wiederum eine weitere Progression fördern. Es kommt zu der Aktivierung des erworbenen Immunsystems, die zum Fortschreiten einer Gingivitis bis hin zu der Parodontitis führen kann. Im Verlauf der Immunantwort sind die freigesetzten Zytokine und Chemokine als Mediatoren an der Schädigung der Gingiva, der dentoalveolären Faser des Desmodonts und des Alveolarknochen beteiligt (Ramadan *et al.*, 2020).

Das **Interleukin-1 β (IL-1 β)** wirkt proinflammatorisch und ist an immunregulatorischen, entzündungsbedingten Prozessen, sowie der Knochenresorption bei Parodontitis beteiligt. Es wird hauptsächlich von Makrophagen und dendritischen Zellen exprimiert, sowie in geringeren Konzentrationen von Osteoblasten und gingivalen Fibroblasten. Im Allgemeinen erhöht das Zytokin den lokalen Blutfluss im Gewebe, trägt zur Rekrutierung von Leukozyten bei und sorgt für die lokale Infiltration von Neutrophilen. IL-1 β fördert ebenfalls die Expression von MMPs, RANKL, sowie weiteren kollagenolytischen Enzymen (Cheng, Wu, Li, Scahoo, & Hu, 2020).

Das **Interleukin-2 (IL-2)** ist auch ein proinflammatorisches Zytokin, welches wachstumsstimulierend auf T-Zellen wirkt, außerdem trägt es zur Proliferation und Differenzierung von B- und natürlichen Killerzellen bei (Minami *et al.*, 1993).

Das **Interleukin-4 (IL-4)** ist ein überwiegend antiinflammatorisches Zytokin. Es verstärkt die T2-Helferzellproliferation, kontrolliert den spezifischen Klassenwechsel von Immunglobulinen und unterdrückt die Produktion von entzündungsfördernden Zytokinen wie IFN- γ (Nelms *et al.*, 1999).

Das **Interleukin-6 (IL-6)** ist ein proinflammatorisches Zytokin, das an der Regulation von Entzündungsprozessen beteiligt ist. Es spielt eine wichtige Rolle bei der Induktion der Akute-Phase-Reaktion, sowie bei der Immunglobulinsekretion, T-Zell-Aktivierung und der terminalen B-Zell-

Differenzierung. Durch diese Effekte ist es ein Modulator in der Übergangsphase von der akuten zur chronischen Entzündung (Kaur *et al.*, 2020).

Das **Interleukin 10 (IL-10)** ist ein antiinflammatorisches Zytokin. Es spielt eine wichtige Rolle bei der Begrenzung von Entzündungsreaktionen und trägt dazu bei, die Immuntoleranz aufrecht zu erhalten (Ouyang *et al.*, 2011).

Das proinflammatorische **Interleukin 8 (CXCL8/ IL-8)** wird von epithelialen Zellen, Monozyten, Lymphozyten, Makrophagen und auch von gingivalen Fibroblasten gebildet. Es ist ein wichtiges Interleukin, da es, im Gegensatz zu anderen entzündungsfördernden Zytokinen, früh produziert wird und einige Wochen im Gewebe persistieren kann (Mlachkova, Popova and Doseva, 2020). Das IL-8 reguliert viele Funktionen der PMNs. So ist es ein Attraktant für die Migration und Aktivierung von PMNs und erhöht die Adhäsion von Monozyten in den Blutgefäßen (Yoshimura *et al.*, 1997).

Das **Interleukin-12 (IL-12)-Heterodimer (IL12p70)** ist ein proinflammatorisches Zytokin, das überwiegend von B-Zellen, dendritischen Zellen und Makrophagen sezerniert wird. Es ist wichtig für die Abwehr von intrazellulären Krankheitserregern durch die Differenzierung von Th1-Zellen, Sezernierung von IFN- γ und die Aktivierung von zytotoxischen natürlichen Killerzellen (NKs) und T-Lymphozyten (O'shea and Paul, 2002; Trinchieri, 2003).

Die **Interleukin 17 (IL-17)** Familie setzt sich aus einer Subgruppe von Zytokinen zusammen, die an akuten und chronischen Entzündungsgeschehen beteiligt sind. IL-17A ist ein proinflammatorisches Zytokin und kann eine Vielzahl von Zytokinen, Akute-Phase-Proteinen, Chemokinen und MMPs produzieren. Diese dienen dann der Wirtsabwehr durch Neutrophilenrekrutierung und Entzündungsreaktion. (Chunfang, Ling and Xiaoxia, 2013).

Der **C-X-C modified Chemokine Ligand oder auch Interferon- γ -induzierbares Protein 10 (CXCL10/ IP-10)** wird als proinflammatorisches Chemokin kategorisiert, das durch IFN- γ induziert und von verschiedenen Zelltypen wie Endothelzellen, Monozyten, Fibroblasten Neutrophilen sezerniert wird. Es reguliert Immunantworten durch die Aktivierung und Rekrutierung von Leukozyten (Lee, Lee and Song, 2009).

Das **Monozyten-Chemo-Attractant Protein-1 (MCP-1)**, auch als **CC Chemokin Ligand 2 (CCL-2)** bezeichnet, ist eines der stärksten Chemoattraktanten für Monozyten und hat somit eine proinflammatorische Funktion. Es wird von einer Vielzahl von Zelltypen als Reaktion auf verschiedene Signale wie TNF- α , IFN- γ und IL-1 β produziert (Colotta *et al.*, 1992; Gupta, Chaturvedi and Jain, 2013).

Der **Tumornekrosefaktor-alpha (TNF- α)** ist ein proinflammatorisches Zytokin und Modulator von Immunantworten, das in Makrophagen, Fibroblasten, Keratinozyten, Neutrophilen, NK-Zellen, T- und B-Zellen produziert wird. Studien haben gezeigt, dass der TNF- α -Spiegel maßgeblich zur Pathogenese der Parodontitis beiträgt, weil TNF- α molekulare Signale für Entzündung und Zelltod überträgt (Ding *et al.*, 2014).

Der **transformierende Wachstumsfaktor β 1 (engl. transforming growth factor β (TGF β))** ist ein Zytokin mit einer bedeutsamen regulatorischen Wirkung auf die Differenzierung, Zellproliferation und

Migration von Zellen und hat somit Einfluss auf biologische Prozesse wie Wundheilung, Entwicklung und Immunantwort. (Blobe GC, Schiemann WP, 2002). Es wird von B-Zellen, Th-Zellen und regulatorischen T-Zellen gebildet (Kasagi and Chen, 2013). TGF β -1 wird eine regulatorische Funktion der Osteogenese, sowohl beim Knochenaufbau als auch beim Knochenabbau zugeschrieben (Rosen, Stempien, Thompson, & Seyedin, 1988).

Das **Interferon-gamma (IFN- γ)** ist ein proinflammatorisches Zytokin und zählt zu den wichtigsten Aktivatoren der Makrophagen. Weitere wichtige Funktionen sind die Attraktion von Leukozyten, die Aktivierung von NKs und die Regulation von B-Zellfunktionen bezüglich der Produktion von Immunglobulinen (Finkelman *et al.*, 1991; Young and Hardy, 1995; Boehm *et al.*, 1997).

1.4.2 Adaptive Immunabwehr

Während die angeborene Wirtsreaktion durch Reaktionen auf generische Pathogenmuster gekennzeichnet ist, nutzt die adaptive Immunreaktion Strategien zur Antigen-Erkennung, des Gedächtnisses und der Antigen-Bindung, um die Effektorsysteme bei der Eliminierung von Pathogenen zu unterstützen (Wang *et al.*, 2024). Im Folgenden werden die verschiedenen Interaktionen der beteiligten B- und T-Zellen beschrieben.

B-Zellen

B-Zellen können durch die Produktion von Antikörpern dem Wirt dabei helfen Infektionen abzuwehren. Die Antikörper dienen der Opsonisierung von Pathogenen zur effizienten Phagozytose durch Makrophagen und der Virusneutralisation. Des weiteren regulieren sie die humorale Immunantwort durch Suppression von antiinflammatorischen und inflammatorischen Zytokinen. B-Zellen lassen sich in 3 Gruppen unterteilen. Zu der ersten Gruppe zählen die B-1 Zellen, zur zweiten die B-2 Zellen und zur dritten Gruppe die regulatorischen B-Zellen (Bregs).

Die B-1 Zellen werden vor allem in der fötalen Leber produziert und lassen sich nochmals in die Subpopulationen B-1a und B-1b Zellen unterscheiden. Eine wichtige Eigenschaft der B-1 Zellen ist, dass sie Antikörper der Klasse Immunglobulin M (IgM) produzieren, ohne die Hilfe von T-Zellen zu benötigen. Dadurch kann bereits in der frühen Infektionsphase eine starke Reaktion auf Pathogene erfolgen (Gunnarsson *et al.*, 2000; Tyrrell-Price, Lydyard and Isenberg, 2001). B-1 Zellen unterscheiden sich von B-2 Zellen bezüglich ihrer Oberflächenmarkerexpression, ihrem Entwicklungsursprung, ihrer Funktion und ihrer besonderen Fähigkeit zur Selbsterneuerung (Graf *et al.*, 2019). Als Oberflächenmarker besitzen sie CD43 (engl. Cluster of Differentiation, CD43). B-1a Zellen sind zudem CD5 positiv und B-1b Zellen CD5 negativ. Die CD5+ B- (1a) Zellen produzieren polyreaktive Antikörper mit niedriger Affinität, bilden Zytokine und können Antigene präsentieren. Viele genetische Studien konnten eine klare Verbindung zwischen CD5+ B-Zellen und Autoreaktivität zeigen. Vermutlich werden die B-1a Zellen durch eine Kreuzreaktion des niedrig affinen B-Zell-Rezeptors und Autoantigenen zum Wachstum und zur Bildung von Autoantikörpern angeregt. Die Vermehrung von B-1a Zellen wird wahrscheinlich durch eine dysregulierte B-Zellentwicklung ausgelöst (Duan and Morel, 2006). B-1a Zellen produzieren IL-10, das an der Regulation von T-Zellen beteiligt ist. Diese IL-10 bildenden B-Zellen werden aufgrund ihres antiinflammatorischen Charakters auch als Bregs bezeichnet. Nach

aktuellem Stand der Forschung lassen sich diese B-Zellen durch eine recht große Kombination an Oberflächenmarkern (CD19+CD5+CD1d++CD24++CD38++) durchflusszytometrisch charakterisieren und isolieren (Blair *et al.*, 2010; Vitale and Mion, 2014).

Die zweite Gruppe bilden die B-2 Zellen. Sie sind CD5-negativ und stellen den Großteil des adulten B-Zell-Repertoires dar (Sagaert and De Wolf-Peeters, 2003). Ihre Bildung erfolgt im Knochenmark und sie unterteilen sich in die folliculären und die marginalzonen-B-Zellen. Die folliculären B Zellen spielen eine entscheidene Rolle für einen anhaltenden Schutz gegen Pathogene. So unterstützen sie in Interaktion mit CD4+ T-Zellen die Bildung langlebiger, hochaffiner Antikörper und Gedächtniszellen, was die Grundlage für den Schutzmechanismus der meisten erfolgreichen Impfstoffe darstellt (Nutt *et al.*, 2015; Pollard and Bijker, 2021). B-2 Zellen haben die Fähigkeit sich in B-1 Zellen umzuwandeln (Graf *et al.*, 2019).

Die letzte Gruppe bilden die Bregs. Ihnen wird eine unterdrückende Rolle der inflammatorischen Antwort und eine Induktion der Immuntoleranz zugeordnet (Tretter and Lorenz, 2010; Wang, 2020).

Die B-Zellen durchlaufen verschiedene Entwicklungsstadien. In der ersten Phase werden im Knochenmark, in den Vorläufer-B-Zellen, die Gene für Immunglobuline umgelagert. Daraus entsteht eine unreife B-Zelle auf deren Oberfläche Antigenrezeptoren in Form von IgM präsentiert sind. Die zweite Phase dient dazu autoreaktive B-Zellen eliminieren. Die unreife B-Zelle kann nun mit Antigenen aus der Umgebung wechselwirken. Reagiert sie dabei stark auf die Stimulation durch ein Antigen, wird sie in einem negativen Selektionsprozess inaktiviert. In der dritten Entwicklungsphase gelangen die unreifen B-Zellen (transitorische B-Zellen) in die Peripherie und reifen zu Zellen heran, welche IgM und IgD exprimieren. Diese reifen B-Zellen werden auch naive B-Zellen genannt und können in sekundären lymphatischen Geweben durch den Kontakt mit Antigenen aktiviert werden. Anschließend proliferieren und differenzieren sie entweder zu Plasmazellen, die Antikörper sezernieren, oder zu Gedächtniszellen (Murphy and Weaver, 2018).

Alle B-Zellen im peripheren Blut besitzen den Oberflächenmarker CD19. Die B-Zellen können mittels des Immunglobulins G (IgG) und des Oberflächenmarkers CD27 in vier verschiedene Populationen eingeordnet werden. Dabei spiegeln die CD27-IgD+ B-Zellen die naiven B-Zellen wider, die CD27-IgD+ die Gedächtnis-B-Zellen ohne vollzogenen Klassenwechsel, CD27-IgD- die Gedächtnis-B-Zellen mit Klassenwechsel und abschließend die CD27-IgD- die doppelt negativen Gedächtnis-B-Zellen (Klein, Rajewsky and Küppers, 1998; Agematsu *et al.*, 2000; Fecteau, Côté and Néron, 2006; Sanz *et al.*, 2008). Zur Charakterisierung der unreifen (transitorischen) B-Zellen werden die Oberflächenmarker CD24 und CD38 herangezogen. Transitorische B-Zellen können dann nochmal in ihr unreifen Stadium T1/T2 und ihr etwas reiferes Stadium (T3) unterteilt werden. T1/T2 B-Zellen exprimieren die beiden Oberflächenmarker CD24 und CD38 sehr stark (CD38++CD24++) und lassen sich dadurch von T3 B-Zellen (CD38+CD24++), den naiven B-Zellen (CD38+CD24+), den Gedächtnis-B-Zellen (CD38-CD24+) und den Plasmazellen (CD38++CD24-) abgrenzen (Sims *et al.*, 2005).

T-Zellen

T-Zellen werden im Knochenmark gebildet und wandern dann weiter in den Thymus, wo sie heranreifen. Reife T-Zellen besitzen einen T-Zell Rezeptor, welcher potentiell antigene Peptide in Verbund mit den Haupt-Histokompatibilitäts-Komplexen (MHC) I und II identifiziert und bindet (Kaufmann, 2009).

CD8+ T-Zellen sind zytotoxische T-Zellen und besitzen das Potential nach einer Aktivierung schnell zu proliferieren und sich zu potenten Effektorzellen zu entwickeln. Somit können sie schnell Zytokine produzieren, um in virusinfizierten Zellen Apoptose zu induzieren (Ekkens *et al.*, 2007).

CD4+ T-Zellen lassen sich klassischerweise in Th1 und Th2 Zellen unterteilen. Th1 T-Zellen sind wichtig für die Abwehr von intrazellulären Pathogenen, während Th2 Zellen das Immunsystem bei der Bekämpfung von extrazellulären Krankheitserregern unterstützen (Ekkens *et al.*, 2007). T-Zellen können den Antikörperklassenwechsel von B-Zellen fördern (Abbas, Murphy and Sher, 1996).

Als weitere Untergruppe sind die T-Helferzellen beschrieben. Dabei handelt es sich um die TH-17 Zellen, welche die Zytokine IL-17, IL-17F und IL-22 produzieren und damit massive Gewebsreaktionen hervorrufen (Korn *et al.*, 2009).

1.5 Mikrobieller Hintergrund

1.5.1 Sulkusflüssigkeit

Die gingivale Sulkusflüssigkeit (GSF) ist ein Serumtransudat. Sie umspült den Zahn und kann somit aus dem Gingivalsulkus oder der parodontalen Tasche entnommen werden. Ähnlich wie der Speichel ist das Serumexsudat eine komplexe Flüssigkeit. Sie enthält im Hauptanteil Bestandteile aus der interstitiellen Flüssigkeit oder dem Serum, andere Komponenten stammen aus dem Bindegewebe und aus dem Knochen. Diese Bestandteile können zum Beispiel Entzündungsmediatoren, einschließlich Enzymen, Zytokinen und Interleukinen, sowie Antikörper und Abbauprodukte aus dem Parodont sein (Trindade *et al.*, 2014). Sie enthält außerdem Bestandteile oder Produkte aus Mikroorganismen der supra- und subgingivalen Plaque (Lamster and Ahlo, 2007). Die Menge der Sulkusflüssigkeit steigt mit dem Fortschreiten des gingivalen Entzündungsstatus durch die erhöhte Gefäßpermeabilität (Armitage, 1995). Der Sulkusflüssigkeitsstrom kann durch einen Isolationseffekt als mechanische Barriere dazu dienen, das Eindringen von Bakterien in das Gewebe zu verhindern. Gleichzeitig hat er eine Spülwirkung, die eindringende Substanzen schnell wieder auswäscht (Freedman, Listgarten and Taichman, 1968). Die GSF kann durch verschiedene Methoden entnommen werden. Zum einen durch Waschtechniken mittels Mikropipetten, durch die Verwendung von herkömmlichen Papierspitzen oder mit Filterpapierstreifen, welche für eine bestimmte Zeit in den Sulkus eingeführt werden (Oppenheim, 1970; Griffiths, 2003). Die Flüssigkeit, die durch diese Methoden gewonnen wird, kann gereinigt und analysiert werden (Lamster and Ahlo, 2007). So konnte das Verständnis der Mediatoren, die an der Initiierung, Pathogenese und Progression der Parodontitis beteiligt sind, in den letzten Jahren deutlich verbessert werden. Auch heute ermöglicht die GSF-Untersuchung einen nicht-invasiven Zugang zum Parodont und dient als gute Methode zur Bestimmung von Parodontitis fördernden Markern (Gupta, 2012).

1.5.2 Bakterien

In der oralen bakteriellen Mundflora kommen über 500 verschiedene bakterielle Spezies aus ungefähr 9 Stämmen vor. (Aas *et al.*, 2005). Einige Bakterienarten werden mit systemischen Krankheiten in Verbindung gebracht, wie zum Beispiel kardiovaskulären Krankheiten, pulmonale Erkrankungen, bakterielle Endokarditis und geringes Geburtsgewicht (Beck *et al.*, 1996; Berbari, Cockerill and

Steckelberg, 1997; Offenbacher *et al.*, 1998; Aas *et al.*, 2005). Andere Bakterien verursachen orale Erkrankungen, wie Parodontitis und Karies (Albandar, Brunelle and Kingman, 1999). Zu den wichtigen Mikroorganismen für die Parodontitis zählen *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola* und *Tanerella forsythia*. Sie werden seit 1998 als pathogener „roter Komplex“ bezeichnet (Socransky *et al.*, 1998).

P. gingivalis ist ein obligat anaerobes, gram negatives Bakterium (Holt *et al.*, 1999). Die gingivalen Fibroblasten können bei Parodontitisläsionen direkt mit *P. gingivalis*, einschließlich Lipopolysaccharid interagieren und somit hohe Mengen an proinflammatorischen Zytokinen, wie IL-6 und IL-1 β , ausschütten. *P. gingivalis* besitzt die Fähigkeit lange im parodontalen Gewebe zu persistieren und Abwehrmechanismen des Immunsystems gut zu umgehen (Wang and Ohura, 2002; Mysak *et al.*, 2014).

Das Bakterium *Treponema denticola* (*T. denticola*) ist ein obligat anerobes, gram-negatives Bakterium (Sela, 2001). Durch spezifische äußere Membrankomponenten, die proteolytische Aktivität, zytotoxische Wirkung und Adhärenz vermitteln, kann sich *T. denticola* an parodontales Gewebe anhaften und in es eindringen. (Fenno and McBride, 1998).

T. forsythia ist ein obligat anaerobes, gram negatives Bakterium (Tanner and Izard, 2006). Auch *T. forsythia* besitzt mehrere Virulenzfaktoren. Spezielle Glykoproteine an der Oberfläche sind für die Adhäsion und Invasion an und in Epithelzellen, sowie an der Coaggregation von *F. nucleatum* beteiligt (Murray, Kern and Winkler, 1988; Sabet *et al.*, 2003).

Aber auch der „orangene Komplex“ mit den Bakterien *F. nucleatum* sp., *Prevotella intermedia*, *P. nigrescens*, *Peptostreptococcus micros*, *Campylobacter rectus*, *Campylobacter gracilis*, *Campylobacter showae*, *E. nodatum* und *S. constellatus* wird mit Parodontitis in Verbindung gebracht (Socransky *et al.*, 1998).

Unter diesen Bakterien hat *Prevotella intermedia* (*P. intermedia*) eine Assoziation zur Parodontitis (Popova, Dosseva-Panova and Panov, 2013). *P. intermedia* ist ein strikt anaerobes, gram negatives Bakterium. Durch das Vorhandensein von Fimbrien und die Umordnung des eigenen Zytoskeletts ist es *P. intermedia* möglich in Epithelzellen einzudringen. Außerdem besitzt *P. intermedia* die Fähigkeit eine Wirtsantwort zu aktivieren und durch proteolytische Aktivitäten Gewebe zu zerstören.

Ein weiteres wichtiges pathogenes Bakterium ist das *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, (*A. actinomycetemcomitans*) welches bei der Parodontitis eine wichtige Rolle spielt und zum grünen Komplex gehört (Socransky *et al.*, 1998; Holt *et al.*, 1999). *A. actinomycetemcomitans* kann effektiv durch das Gingivaepithel wandern und so eine breite Entzündungsreaktion des Wirts auslösen. Es schüttet die Exotoxine cytolethal distending toxin (CDT) und Leukotoxin aus. Letztes verursacht den Zelltod von Monozyten, PMNs und T-Zellen (Herbert, Novince and Kirkwood, 2016).

2 Zielstellung und Hypothese

CD5+ B-Zellen zählen zu den B1a-Zellen des Körpers. Aufgrund ihrer autoreaktiven Eigenschaften stellen sie seit vielen Jahren ein interessantes Untersuchungsthema in vielen medizinischen Bereichen dar.

Berglundh et al. zeigten, dass bei Probanden mit fortgeschrittener und aggressiver Parodontitis eine erhöhte CD5+ B-Zellkonzentration, im Gegensatz zur gesunden Kontrollgruppe, vorliegt. Dazu wurden Gewebeproben der entzündeten Gingiva und Zellen aus dem peripheren Blut untersucht (Berglundh et al., 2002). Auch in der Rheumaforschung konnten Engelmann et al. (2015) zeigen, dass CD5+ B-Zellen bei der Rheumatischen Arthritis eine besondere Rolle spielen. Dabei wurde ein klarer positiver Zusammenhang zwischen CD5+ B-Zellen aus dem peripheren Blut und dem Knochenabbau hergestellt werden. (Engelmann et al., 2015).

Zielstellung dieser Arbeit war es, zirkulierende CD5+ B-Zellen als potenzielle Biomarker zur Vorhersage des Verlaufs der Parodontalerkrankungen zu untersuchen, um daraus neuartige Strategien zur Diagnostizierung und Therapie abzuleiten. Hierfür wurden die Blutspiegel und das Entwicklungsstadium der CD5+ B-Zellen bei an Gingivitis oder an moderater chronischer Parodontitis erkrankten Patienten im Vergleich zu gesunden Probanden untersucht.

Neben der klinischen Diagnostik zeichnet sich die vorliegende Arbeit durch Untersuchungen des Entzündungsgeschehens auf zytologischer Ebene im Speichel sowie durch umfangreiche bioinformatische Analysen des Mikrobioms aus. Somit konnte das klinische Krankheitsbild sowohl von immunologischer als auch von mikrobiologischer Sicht eingehend beurteilt werden.

Die Hypothese der Arbeit ist es, dass CD5+ B-Zellen in parodontalen Erkrankungen, wie Gingivitis und moderater chronischer Parodontitis in einem bestimmten B-Zellentwicklungsstadium vermehrt vorkommen könnten.

3 Material und Methoden

3.1 Patientenrekrutierung

Nachdem der Ethikantrag von der „Ethikkommission an der Medizinischen Fakultät der Universität Rostock“ (A 2014-0181) begutachtet und genehmigt wurde, konnte die Rekrutierung der Probanden beginnen. Diese erfolgte aus dem Patientenkontext der Abteilung für Zahnerhaltung und Parodontologie der Universitätsmedizin Rostock und fand zwischen den Jahren 2017 bis 2019 statt. Auswahlkriterien waren dafür Patienten ab dem Alter von 18 Jahren, bei denen kein Nikotin- oder Drogenkonsum, keine akuten oder chronisch entzündlichen Erkrankungen (wie z.B. rheumatische Erkrankungen) und keine Erkrankung des Immunsystems (Diabetes mellitus, HIV, etc.) vorlagen. Außerdem sollte die letzte Parodontaltherapie mehr als zwei Jahre und die letzte professionelle Zahnreinigung mehr als acht Wochen vor der Untersuchung durchgeführt worden sein. Auch die letzte Antibiotikaeinnahme sollte länger als sechs Monate zurückliegen und die Probandinnen sollten sich nicht in einer Schwangerschaft oder in der Stillzeit befinden.

Zur Auswahl der geeigneten Patienten wurde eine Anamnese erhoben.

Aufgrund der aufgezählten Kriterien wurden 60 Probanden ausgewählt und untersucht. Anschließend konnten sie anhand klinischer Beurteilung in drei verschiedene Gruppen eingeteilt werden. In die Gruppe der gesunden Patienten fielen Probanden, welche an allen Messstellen eine Sondierungstiefe von bis zu 3 mm umfassten, mit Ausnahme von maximal 4 Stellen mit einer Sondierungstiefe von < 4 mm, und einen modifizierten Sulkus-Blutungs-Index (mSBI) von ≤ 10 % aufwiesen.

Die Gruppe der Patienten, die an Gingivitis erkrankt waren, erfüllten dieselben Kriterien für die Sondierungstiefe, jedoch mit einem mSBI von > 10 %.

Und in die Gruppe, der an chronischer Parodontitis erkrankten Patienten fielen Probanden, die an mindestens vier Messstellen eine Sondierungstiefe von ≥ 4 mm und einen mSBI von > 10 % aufwiesen. Aus jeder Gruppe wurden $N = 20$ Probanden untersucht.

Die Aufklärung und Einwilligung der Patienten erfolgte vor Behandlungsbeginn und wurde schriftlich in einem Einwilligungs- und Aufklärungsbogen dokumentiert.

3.2 Klinische Untersuchung

Der Untersuchungsbeginn startete mit der Entnahme von Sulkusflüssigkeit. Dazu wurden die Parodontaltaschen mit der größten Sondierungstiefe ausgewählt. Die Plaque konnte nun zervikal am Zahn mit einem Scaler entfernt und anschließend die Sulkusflüssigkeit mit Hilfe von stumpfen, sterilen Papierspitzen (Roeko, Coltène, Langenau, D) entnommen werden. Für die Bakterienbestimmung erfolgte die Verwendung von vier Papierspitzen mit einer ISO-Größe von 35, welche anschließend in ein Mikroreaktionsgefäß (SafeSeal Microcentrifuge Tubes, 1,7 mL, Sorenson BioScience, USA) hineingegeben wurden. Um eine Analyse zur Zytokinbestimmung durchführen zu können, erfolgte die Entnahme von ca. 1 mL Speichel, welcher ebenfalls in ein separates Mikroreaktionsgefäß gefüllt wurde. Für die Untersuchung eines möglichen Entzündungszustandes der Gingiva wurde der mSBI unter vorsichtigem Ausstreichen der Taschen mittels einer WHO-Sonde erhoben. Dazu wurden die Blutungen

in den Interdentalräumen mithilfe eines dichotomen Index (Ja/Nein-Entscheidung) an bis zu 28 Stellen pro Patient beurteilt. Der Approximale Plaque Index (API) wurde zur Beurteilung der Mundhygiene unter Zunahme eines Elevators (Mira-2-Ton, Hager & Werken, Duisburg, D) bestimmt. Das Vorhandensein von Plaque wurde auf den oralen Oberflächen in den Quadranten 1 und 3 sowie auf den vestibulären Oberflächen in den Quadranten 2 und 4 mithilfe eines dichotomen Bewertungssystems (Anwesenheit/Abwesenheit von Plaque) beurteilt. Für die Erhebung des parodontalen Status wurde eine UNC-15-Parodontalsonde verwendet und jeder Zahn an sechs verschiedenen Stellen gemessen. Dabei wurde das klinische Attachment Level (CAL) und die Sondierungstiefe (ST) notiert. Von der Messung wurden alle Weisheitszähne ausgeschlossen, es sei denn sie standen an der Position der zweiten Molaren.

Vor der Untersuchung der Patienten erfolgte ein Matching der zwei Untersucher an zehn Messungen, um einen geringen Messfehler zu induzieren und eine Standardisierung zu erreichen. Bei der Blutabnahme wurden den Probanden 15 mL Vollblut (S-Monovette® EDTA + Serum, jeweils 7,5 mL, Sarstedt AG & Co, D) von verschiedenen approbierten Ärzten entnommen.

3.3 Vorbereitung der Proben

Im Labor (Institut für Immunologie, Universitätsmedizin Rostock) erfolgte als erstes die Umlagerung der Bakterien- und Speichelproben in einem bei -20 °C temperierten Gefrierschank (Liebherr, D). Danach wurde das Vollblut im Serum Röhrchen bei 1200*g für sieben Minuten zentrifugiert (Megafuge 1.0R, Heraeus Instruments, D). Anschließend wurde der Überstand des Erythrozyten-freien Serums abgenommen. Dieser konnte dann in vier 1,5 mL große Mikroreaktionsgefäße aufgeteilt und ebenfalls bei -20° C gelagert werden.

Aus dem EDTA-Blut erfolgte die Lymphozyten Zählung. Dazu wurden zu 2 µL anti-CD45:PerCP (Biolegend, San Diego, CA) Antikörper 8 µL PBS (pH 7,4), dazugegeben. Das Gemisch wurde dann in ein 5 mL FACS-Röhrchen (BD Falcon, Mexico) überführt und 100 µL EDTA-Blut dazugegeben. Daraufhin wurde die Suspension in einem Vortex Mischer durchgerüttelt (VF-2, IKA-Labortechnik, Staufen, D) und für 15 min bei Raumtemperatur (RT) im Dunkeln inkubiert. In der Zwischenzeit konnten die Leukozyten mit einer Bürker-Zählkammer (Hecht-Assistent, D) unter dem Mikroskop (CKX41SF, Olympus Corporation, Philippines) gezählt werden. Dazu wurden 90 µL Türkslösung mit 10 µL EDTA-Blut gemischt. Nach der Inkubationszeit des Blut-Antikörper-Gemisches wurden 2 mL Lyse-Puffer (High-Yield-Lyse, life-technologies, Spain) dazugegeben und dieser nach Durchmischung weitere 20 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Anschließend konnte der Lymphozyten Prozentsatz im Vergleich zu den Leukozyten mit dem Durchflusszytometer (FACS) (FACS Calibur, BD Biosciences, USA) gemessen werden (Abbildung (Abb.) 1).

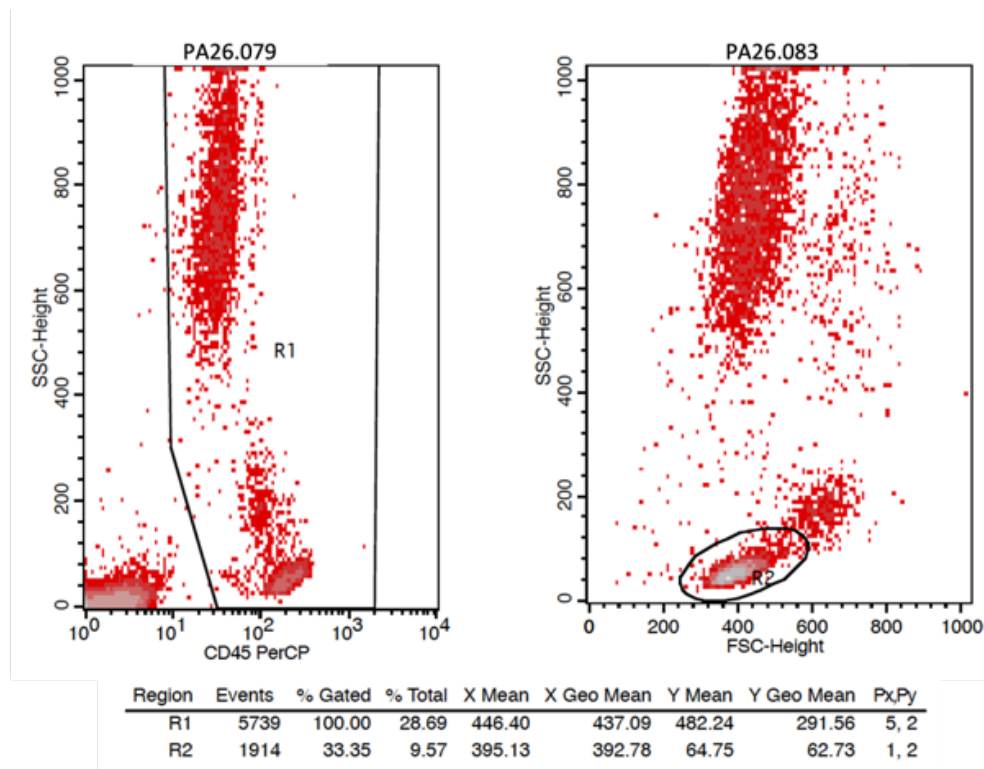


Abbildung 1: Prozentsätze von den Leukozyten und Lymphozyten anhand der Probe PA 26.
R1) Prozentsatz der Leukozyten in [%], R2) Prozentsatz der Lymphozyten [%].

Isolation der mononuklearen Zellen aus dem peripheren Blut

Für die Isolation der mononuklearen Zellen des peripheren Blutes (engl. Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMCs)) wurden 7 mL EDTA-Blut mit 14 mL Dulbeccos phosphatgepufferter Kochsalzlösung (DPBS) verdünnt und anschließend in einem 50 mL Röhrchen (Cellstar, Greiner Bio-One GmbH, D) auf 15 mL Ficoll-Paque (Ficoll-Paque™ Plus, Kat., GE Healthcare, Uppsala, Sweden) geschichtet. Um eine Phasentrennung zu erhalten, wurde die Suspension bei 400*g für 30 min bei RT ohne Bremse zentrifugiert (Abb. 2).

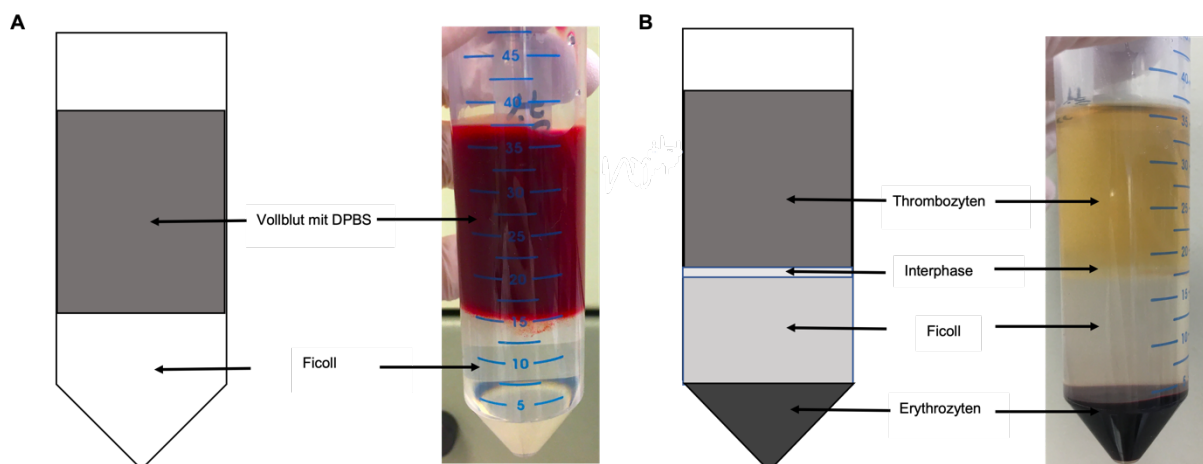


Abbildung 2: Isolation der PBMCs

A) Schichtung Vollblut mit DPBS auf Ficoll, B) Schichtung nach Zentrifugation: Thrombozyten, Interphase, Ficoll, Erythrozyten

Die durch Zentrifugation entstandene Interphase wurde in ein 50 mL Röhrchen übertragen. Es wurden 20 mL MACS-running-Puffer (Miltenyi Biotec, USA) dazugegeben und die Suspension bei 500*g für 7 min zentrifugiert. Nach dem Dekantieren des Überstandes wurden die Zellen in 10 mL MACS-running-Puffer resuspendiert. Zur Bestimmung der PBMC Konzentration wurden 15 µL der Suspension mit 15 µL Trypan Blau Lösung (Gibco, UK) versetzt. Die Zellen konnten nun mittels Neubauer-Kammer (Marienfeld GmbH, D) unter dem Mikroskop gezählt werden.

Anschließend erfolgte Bestimmung der Menge des Gefriermediums unter Berücksichtigung der Zellkonzentration. Dazu wurde die Zellsuspension erst bei 300*g für 7 min zentrifugiert und der Überstand ab dekantiert. Danach wurden unter sterilen Bedingungen 500 µL Dimethylsulfoxid (DMSO, Roth, D) und 5 mL fetales Kälberserum (FKS, Biochrome, D) gemischt, um die Zellen darin zu resuspendieren. Die Zellkonzentration betrug dabei $2 \cdot 10^6$ Zellen pro mL Gefrierlösung. Anschließend wurden 0,5 mL Zellsuspension in Gefrier Röhrchen (Cryo S.PP, Greiner bio-one, D) gefüllt und in einem Zell-Gefriercontainer (BioCision, USA) verstaut. Anschließend wurde der Container bei -80°C in einen Ultratiefkühlschrank (HFU 86 450, Heraeus, D) deponiert und nach ca. 24 h in einen Flüssigstickstofftank umgelagert.

3.4 FACS Analyse der B-Zellen Oberflächenmarker

3.4.1 Probenvorbereitung

Um die Oberflächenmarker der B-Zellen bestimmen zu können, mussten die PBMCs wieder aufgetaut werden. Dazu wurden die Gefrier Röhrchen mit den Zellen aus dem Stickstofftank genommen, in Stickstoff gelagert bis zum Labor transportiert und dort unter leichtem Schütteln in einem 37°C warmen Wasserbad (WB 20, Medingen, D) aufgetaut, bis alle Zellen in Lösung waren. Danach erfolgte die Überführung von 0,5 mL Zellsuspension in ein mit 14 mL MACS Buffer gefülltes 15 mL Zentrifugenröhrchen (Cellstar, Greiner Bio-One GmbH, D). Die Suspension wurde anschließend bei 200*g für 7 min bei 4° C zentrifugiert.

Der Überstand im Röhrchen wurde abpipettiert und die Zellen in 1 mL PBS resuspendiert. Danach erfolgte die Zugabe von 1 µL L/D Lösung (Lebend/Tot Diskriminierung, efluor 506 L/D, Invitrogen, USA) zu der Zellsuspension ($1 \cdot 10^6$ Zellen). Anschließend wurde die Suspension für 30 min bei RT im Dunkeln inkubiert, darauf mit einem Vortex Mischer durchgerüttelt und bei 800*g bei 4 °C für 7 min zentrifugiert (Biofuge fresco, Heraeus, D). Nach dem Abpipettieren des Überstandes konnten die Zellen in 50 µL MACS running buffer resuspendiert werden. Um unspezifische Bindungen zu reduzieren, wurden als erstes 5 µL Fc-block (human, Biolegend) dazugegeben und 5 min bei RT inkubiert. Dann wurden folgende Oberflächenmarker-Antikörperlösungen addiert (Tabelle (Tab.) 1):

Tabelle 1: Oberflächenmarker-Antikörperlösungen und deren Volumina [μL].

Marker	Volumen [μL]
IgD:FITC	5
CD138:PE	5
CD38:PerCP-Cy5.5	2,5
CD24:PE-Cy7	5
CD27:APC	5
CD19:BV785	3
CD5:BV421	2

Wenn mehrere Proben gleichzeitig gefärbt wurden, wurde vor der Färbung ein Antikörper-Mastermix hergestellt und bis zur Färbung bei 4°C , dunkel gelagert (<1 Stunde).

Nach der Addition der Oberflächenmarker-Antikörperlösungen, musste die Zellsuspension noch 15 min bei RT inkubieren. Folgend wurde die Probe bei $800 \times g$ bei 4°C für 7 min zentrifugiert. Nachdem der Überstand abpipettiert wurde, konnten die Zellen in $500 \mu\text{L}$ MACS Buffer resuspendiert und in ein FACS Röhrchen mit Filter (BD Falcon, Mexico) übertragen werden. Abschließend wurde die Messung der PBMCs am FACS (FACS Aria II, BD Biosciences, USA) durchgeführt. Anhand der Oberflächenmarker der PMBCs wurden diese in Lymphozyten, B-Zellen und die einzelnen Entwicklungsstadien von CD5 positiven B-Zellen eingeteilt.

3.4.2 Bestimmung der absoluten Zellzahlen der PBMCs

Die absolute Lymphozytenanzahl (N_{LP}) wurde gemäß Gleichung (1) bestimmt. Dafür wurde die Konzentration an Leukozyten ermittelt (C_{LK}), mit dem Probenvolumen multipliziert (V_P) und der vom Durchflusszytometer berechnete prozentuale Anteil an Lymphozyten gegen Leukozyten (X_{PK}) berücksichtigt.

$$N_{LP} = C_{LK} V_P \frac{X_{PK}}{100} \quad (1)$$

Anhand der Populationshierarchie (Abb. 3) der B-Zellpopulationen und der Anteile der verschiedenen Entwicklungsstadien konnten konsekutiv die absoluten Zellzahlen der Untergruppen für jede Probe individuell ermittelt werden.

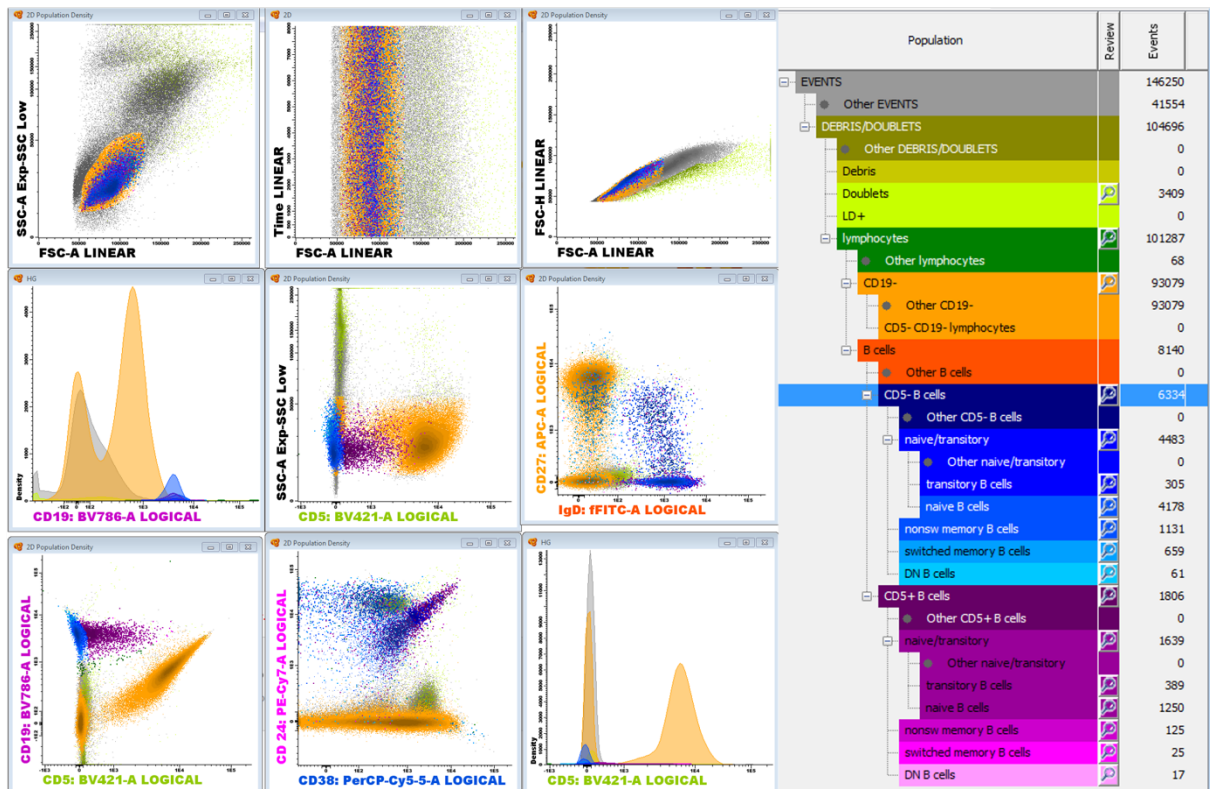


Abbildung 3: Stammbaum der B-Zell-Populationen. Einteilung anhand ihrer Oberflächenmarker am FACS am Beispiel der Probe PA 26.

3.5 Isolierung der bakteriellen DNA

Zur Isolation der bakteriellen DNA wurde das DNA/RNA Miniprep Kit (Zymo BIOMICS, USA) verwendet. Zu den Proben wurde je 1 mL DPBS gegeben und über Nacht bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Proben für 30 s in einem Vortex Mischer durchgerüttelt, 250 µL aus dem Mikroreaktionsgefäß entnommen und mit 250 µL DNA/RNA Lyse Buffer vermischt. Das Gemisch konnte dann in ein Sammelröhrchen auf einen Spin-away-Filter pipettiert werden und anschließend bei RT bei 11000*g für 1 Minute zentrifugiert werden. Nun erfolgte die Umlagerung des Spin-away-Filters auf ein neues Sammelröhrchen. Anschließend wurde 400 µL Prep-Puffer hinzugegeben und zentrifugiert (Fresco 17, Thermofisher scientific, Waltham/Massachusetts, USA). Der Durchfluss wurde verworfen. Es erfolgte die Hinzugabe von 700 µL DNA/RNA Wash-Puffer und eine anschließende Zentrifugation. Der Durchfluss wurde erneut verworfen. Es wurden 400 µL DNA/RNA Wash-Puffer hinzu pipettiert und 2 Minuten zentrifugiert, bis keine Flüssigkeit mehr auf dem Filter zu sehen war. Der Filter wurde auf ein beschriftetes 1,5 mL Mikroreaktionsgefäß übertragen. Anschließend wurden 50 µL destilliertes Wasser auf den Filter pipettiert und für 5 Minuten bei RT inkubiert. Dann erfolgte eine 2-minütige Zentrifugation. Die gefilterte DNA wurde bei -20 °C tiefgefroren.

Die Sequenzierung der DNA erfolgte durch eine PCR nach dem Illumina Protokoll im Institut für Mikrobiologie an der Universitätsmedizin Rostock. Als Primer wurden der V3/V4 und der V4 Primer verwendet.

Probenverarbeitung zur Charakterisierung des oralen Mikrobioms

Die mikrobielle DNA wurde aus GSF-Proben mit dem ZymoBIOMICS DNA/RNA Miniprep Kit (Zymo Research, USA) gemäß den Anweisungen des Herstellers zum DNA-Protokoll isoliert.

Die weitere Mikrobiomaufbereitung erfolgte durch Jana Bull im Institut für Medizinische Mikrobiologie, Virologie und Hygiene (Universität Rostock). Die DNA-Konzentration wurde mit dem im Handel erhältlichen Qubit „DNA BR Kit“ bestimmt. Für die PCR-Amplifikation wurden die DNA-Matrizen auf eine Konzentration von 5 ng/μL in 10 mM Tris-Puffer (pH 8,5) verdünnt. Die V3/V4-Region der bakteriellen 16S-ribosomalen RNA (rRNA)-Gene wurde unter Verwendung von 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-CCG-AGA-TGT-GTA-TAA-GAG-ACA-GGA-CTA-CNV-GGG-TAT-CTA-ATC-C) Primern in ~520 bp Amplicon. Weitere Schritte zur Bibliotheksvorbereitung wurden auf der Grundlage des Illumina-Protokolls „16S Metagenomic Sequencing Library Preparation“ durchgeführt. Kurz gesagt, PCR-Reinigung, INDEX-PCR, zweite PCR-Reinigung, Bibliotheksquantifizierung, Normalisierung und Pooling wurden durchgeführt. Der Bioanalyzer-Chip „DNA 1000“ und das Qubit-Kit wurden für Mengen- und Qualitätskontrollen jeder einzelnen Probenbibliothek und des endgültigen Bibliothekspools verwendet. 6 pM des endgültigen Bibliothekspools wurden einem einzelnen Sequenzierungslauf unter Verwendung eines 600-Zyklen-V3-Kits auf einem Illumina MiSeq-Gerät unterzogen. Während des Laufs wurden Cluster mit 946 K/mm² sequenziert, wodurch 21,4 Millionen Lesevorgänge generiert wurden, die die Filterspezifikationen bestanden. Über 74,3 % der Sequenzierungs- und Index-Reads wurden mit einem Qscore ≥ 30 gefunden.

16S-rRNA-Gensequenzierung und Datenanalyse

Die 16S-rRNA-Gensequenzierung und Datenanalyse wurde von Israel Barrantes am Institut für Systembiologie und Bioinformatik (Universität Rostock) durchgeführt. Die 16S-Amplikons wurden aus den Paired-End-Illumina-Sequenzierungsläufen mit VSEARCH (Version 2.7.0; Rognes et al. 2016) zusammengeführt. Zusammengeführte Fragmente wurden dann mit deblur (Version 1.1.0; Amir et al., 2017) entrauscht. Den entrauschten Fragmenten wurden mit dem sklearn-Klassifikator (Version 0.23.1; Pedregosa et al., 2011) operationelle taxonomische Einheiten (OTUs) zugewiesen und gegen 16S-rRNAs zu 99 % Identität aus der SILVA-Datenbankversion 138 (Quast et al. 2013) geclustert. Sowohl deblur als auch sklearn wurden in der QIIME2-Pipeline-Version 2020.11 verwendet (Estaki et al. 2020). Die erhaltene OTU-Tabelle wurde dann mit Phyloseq (Version 1.22.3; McMurdie und Holmes 2013), einem Bioconductor R-Paket, verarbeitet, um die Ordination, Häufigkeit und Zusammensetzung der Bakteriengemeinschaften in den Proben (Version 3.4.3; R Core Team 2013). Die statistische Signifikanz dieser Analysen wurde durch die Tests permanova (adonis) und Kruskal-Wallis bewertet, wie sie im vegan-Paket (Version 2.4.6; Oksanen et al. 2018) implementiert sind. Außerdem wurden mit dem DESeq2 R-Paket (Love, Huber und Anders 2014) statistisch signifikante Unterschiede zwischen Gemeinschaften aus den verschiedenen Stichprobengruppen auf Gattungsebene berechnet, wobei ein Wald-Test und die Benjamin-Hochberg-Korrektur für die p-Werte (falsche Erkennungsraten-Grenzwert: FDR < 0,01). Um die von den verschiedenen Gemeinschaften gemeinsam genutzten Gattungen zu beobachten, wurde dem im Microbiome R-Paket (Version 1.9.96) entwickelten Protokoll gefolgt, um die

Kernmikrobiome für jede Probengruppe zu berechnen (Salonen et al. 2012; Shetty et al. 2017). Darüber hinaus wurden die OTUs nach bakteriellen Phänotypen in jeder Probengruppe über den BugBase-Server zusammengefasst (abgerufen am 20.06.2021; Ward et al. 2017). Zu diesem Zweck wurden die OTUs gegen die Greengenes 16S-Datenbankversion 13.5 (McDonald et al. 2012) neu zugewiesen, da dies die neueste Version ist, die mit BugBase kompatibel ist. Anschließend wurde eine PICRUST-Analyse durchgeführt, um die relative Häufigkeit von Funktionswegen in den mikrobiellen Gemeinschaften vorherzusagen (Version 2.11; Langille et al. 2013). Hier wurden ebenso die den Greengenes 13.5 zugewiesenen OTUs verwendet, und die erhaltenen OTU-Tabellen wurden dann durch die 16S-rRNA-Kopienzahl normalisiert, um funktionelle Gene aus der Datenbank der Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) vorherzusagen (Kanehisa et al. 2008). Schließlich wurden auch die Ergebnisse der PICRUST-Analyse und der KEGG-Vorhersagen mit dem Paket phyloseq R verarbeitet.

3.6 Bestimmung der Zytokine

Zur Bestimmung der Zytokine wurden zwei Kits von der Firma Biolegend verwendet. Zum einen das Kit *Human Essential Immune Response Panel (13-plex)* (BioLegend, San Diego, California) mit V-Boden-Platte verwendet.

Zuerst wurden die Speichelproben aufgetaut und unverdünnt verwendet.

Human Essential Immune Response Panel

Mit dem *Human Essential Immune Response Panel* wurden 13 Zytokine: IL-4, IL-6, IL-2, IL-10, CXCL10 (IP-10), IFN- γ , IL-1 β , IL-20p70, TNF- α , CXL8 (IL-8), CCL2 (MCP-1), Free Active TGF- β 1, IL-17A untersucht.

Vorbereitung des Wasch Puffers

Der 20X Wasch-Puffer wurde so lange gemixt, bis eine klare Flüssigkeit erhalten wurde. Dann erfolgte die Vermischung von 25 mL 20X Wasch-Puffer mit 475 mL deionisiertem Wasser.

Vorbereitung des Standards

Der gefriergetrocknete Standard konnte mit 250 μ L Assay Puffer rekonstituiert werden. Nach ausreichendem Mixen und 10 Minuten Ruhe wurde der Standard in ein Mikroreaktionsgefäß übertragen. Dieser konnte als Top Standard C7 verwendet werden. Für die Herstellung von C6-C0 wurden in einzelne Mikroreaktionsgefäße 75 μ L Assay Buffer gefüllt. Nun konnte für eine 1:4 Verdünnung 25 μ L vom Standard C7 zu C6 übertragen und gut durchmischt werden. Diese Verdünnungsreihe wurde von C6-C1 fortgeführt (Tab. 2)

Tabelle 2: Verdünnungsreihe für den Standard mit seiner finalen Konzentration C7-C0 [pg/mL].

Mikroreaktions- gefäß / Standard ID	Verdünnungsfaktor	Assay Buffer zum Hinzufügen [µL]	Standard zum Hinzufügen	Finale Konzentration (pg/mL)
C7	--	--	--	10000,00
C6	4	75	25 µL von C7	2500,00
C5	16	75	25 µL von C6	625,00
C4	64	75	25 µL von C5	156,25
C3	256	75	25 µL von C4	39,01
C2	1024	75	25 µL von C3	9,77
C1	4096	75	25 µL von C2	2,44
C0	--	75	--	0,00

Durchführen des Assays mit einer V-Boden Platte

Alle Reagenzien wurden vor Benutzung auf RT gebracht. Für alle Inkubationszeiten wurde die Well-Platte mit Aluminium-Folie bedeckt.

Die ersten beiden Reihen der Well-Platte wurden in vertikaler Richtung mit den Standard-Lösungen befüllt. Dazu erfolgte das Pipettieren von 25 µL Assay Puffer und dann 25 µL Standard auf die Platte. Auf die darauffolgenden Reihen wurde in ein Well 25 µL Assay Buffer und 25 µL von jeder Probe gefüllt. Anschließend konnte auf jeden Well 25 µL Beads, welche zuvor 30 s in einem Vortex Mischer durchgerüttelt wurden, gegeben werden. In jedem Well befanden sich nun 75 µL Lösung. Die Well-Platte wurde mit einer Folie versiegelt, mit Alufolie bedeckt und auf einen Plattenschüttler gespannt. Es erfolgte eine zweistündige Inkubation bei 800 rpm bei RT. Nach der Inkubation wurde die Platte bei 1050 rpm (ca. 250 g) für 5 Minuten zentrifugiert. Nun wurde der Überstand mit einer kontinuierlichen und kraftvollen Umdrehung über einem Abfallbehälter dekantiert. Zum Waschen der der Platte wurde in jedes Well 200 µL 1X Wasch Buffer gegeben und für eine Minute inkubiert. Anschließend erfolgte wieder eine Zentrifugation mit 1050 rpm bei RT für 5 Minuten. Der Überstand wurde verworfen und dieser Waschschrift mit anschließender Verwerfung des Überstandes wiederholt. Nun konnten zu jedem Well 25 µL Detektions-Antikörper hinzugefügt werden. Auf die Platte wurde dann eine neue Versiegelungsfolie aufgetragen und mit Aluminiumfolie bedeckt. Es erfolgte eine Inkubation auf dem Plattenschüttler für eine Stunde, bei 800 rpm und RT. Danach wurde zu jedem Well 25 µL SA-PE hinzu pipettiert. Die Platte wurde dann mit einer neuen Folie versiegelt und für 30 min, mit Aluminium bedeckt, bei RT und 800 rpm geschüttelt. Es folgte das zweifache Waschen und Dekantieren des Überstandes. Abschließend wurden die Beads in 150 µL Wasch Puffer resuspendiert.

Die Messung der Well-Platte erfolgte am FACS Verse und die Auswertung über die Software von Biolegend.

3.7 Statistik

Die klinischen sowie die experimentellen Daten sind als Mittelwert ($\pm$ Standardabweichung) dargestellt. Die statistische Signifikanz wurde unter Verwendung des Kruskal-Wallis-Tests zum Vergleich unabhängiger Proben, gefolgt von einer Bonferroni-Korrektur, berechnet. Als statistisch signifikant angesehene Wahrscheinlichkeitsniveaus waren als $*p < 0,05$, $**p < 0,01$, $***p < 0,001$ definiert. Berechnungen und Diagrammanalysen wurden unter Verwendung von SPSS (Version 27), R-Statistikprogramm (Version 4.3.1) und Origin (Version 2022b (9.95)) durchgeführt.

4 Ergebnisse

4.1 Demographische Merkmale der Patienten

In einem Untersuchungszeitraum vom Februar 2017 bis Oktober 2019 wurden insgesamt 60 Probanden in der Universitätsklinik Rostock untersucht. Dabei waren 30 Frauen und 30 Männer beteiligt. In der Gesunden und Gingivitis Gruppe waren jeweils 11 Frauen und 9 Männer beteiligt. In der Parodontitis Gruppe waren es 8 Frauen und 12 Männer. Das Durchschnittsalter bei der gesunden Gruppe lag bei 32,45 ($\pm 10,62$), das der Gingivitis Gruppe bei 30,85 ($\pm 7,86$) und das der Parodontitis Gruppe bei 58,50 ($\pm 15,47$) Jahren.

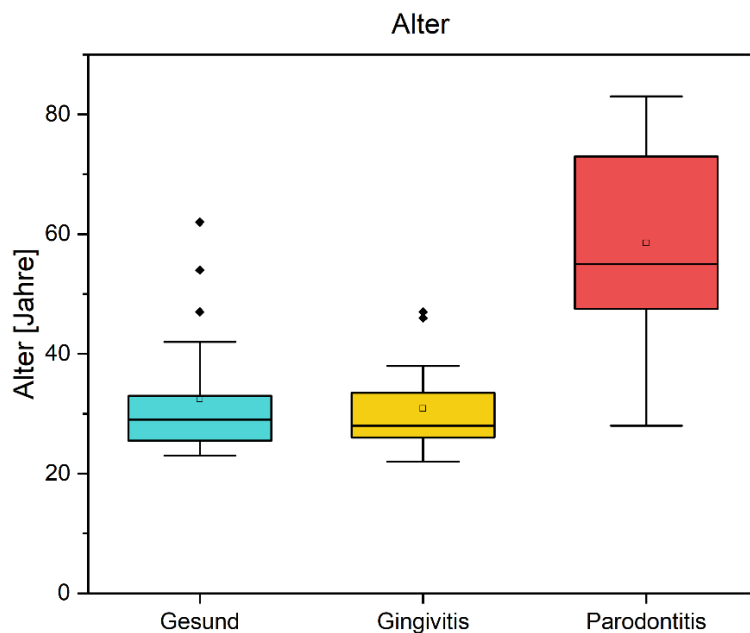


Abbildung 4: Quantitative Bewertung des Alters [Jahre].

Das Boxplot-Diagramm zeigt den Median (schwarzer Balken innerhalb der Box, Q2), das untere (Q1) und obere Quartil (Q3) – also die mittleren 50 % der Daten. Die Whisker markieren den kleinsten bzw. größten Wert innerhalb der interquartilären Spannweite ($1,5 \times \text{IQR}$ von Q1 bzw. Q3). Der arithmetische Mittelwert ist durch ein farbloses Quadrat dargestellt. Ausreißer, also Werte außerhalb der Whisker, sind als einzelne Punkte abgebildet. $N = 20$ in jeder Studiengruppe. Die Signifikanz wurde mithilfe des Kruskal-Wallis-Tests und anschließender Bonferroni-Korrektur bestimmt.

4.2 Klinische Werte

Nach Erheben der klinischen Werte, konnten die Probanden, basierend auf der Sondierungstiefe und dem modifizierten Sulkusblutungsindex, in die Gruppen Gesund, Gingivitis und Parodontitis eingeteilt werden.

4.2.1 Sondierungstiefe (ST)

Die Sondierungstiefe lag bei der Gesunden Gruppe mit einem Mittelwert von 1,75 mm ($\pm 0,30$) unter dem der Gingivitis Gruppe mit 1,94 mm ($\pm 0,33$) und dem der Parodontitis Gruppe mit 2,71 mm ($\pm 0,80$).

Eine statistische Signifikanz konnte man in den Gruppen Gesund-Parodontitis mit $p < 0,001$ und Gingivitis-Parodontitis mit $p = 0,001$ feststellen. Zwischen den Gruppen Gesund und Gingivitis lag kein statistisch signifikanter Unterschied vor ($p = 0,242$).

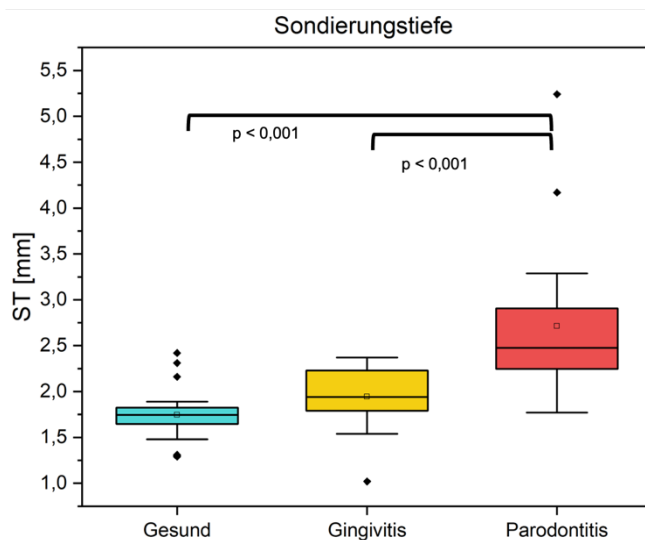


Abbildung 5: Quantitative Bewertung der Sondierungstiefe [mm].

Das Boxplot-Diagramm zeigt den Median (schwarzer Balken innerhalb der Box, Q2), das untere (Q1) und obere Quartil (Q3) – also die mittleren 50 % der Daten. Die Whisker markieren den kleinsten bzw. größten Wert innerhalb der interquartilen Spannweite ($1,5 \times \text{IQR}$ von Q1 bzw. Q3). Der arithmetische Mittelwert ist durch ein farbloses Quadrat dargestellt. Ausreißer, also Werte außerhalb der Whisker, sind als einzelne Punkte abgebildet. $N = 20$ in jeder Studiengruppe. Die Signifikanz wurde mithilfe des Kruskal-Wallis-Tests und anschließender Bonferroni-Korrektur bestimmt.

4.2.2 Klinischer Attachmentverlust (CAL)

Für den CAL wurden in den Gruppen die Mittelwerte berechnet und miteinander verglichen. Die Gesunde Gruppe hatte einen Mittelwert von 1,77 mm ($\pm 0,30$), dahinter kam die Gingivitis Gruppe mit 1,98 mm ($\pm 0,34$) und dahinter die der Parodontitis mit 3,13 mm ($\pm 1,34$).

Hier konnte auch ein höchst statistisch signifikanter Unterschied von $p = 0,000$ zwischen Gesund und Parodontitis festgestellt werden. Zwischen Gingivitis und Parodontitis konnte ein Signifikanzniveau von $p = 0,001$ ermittelt werden.

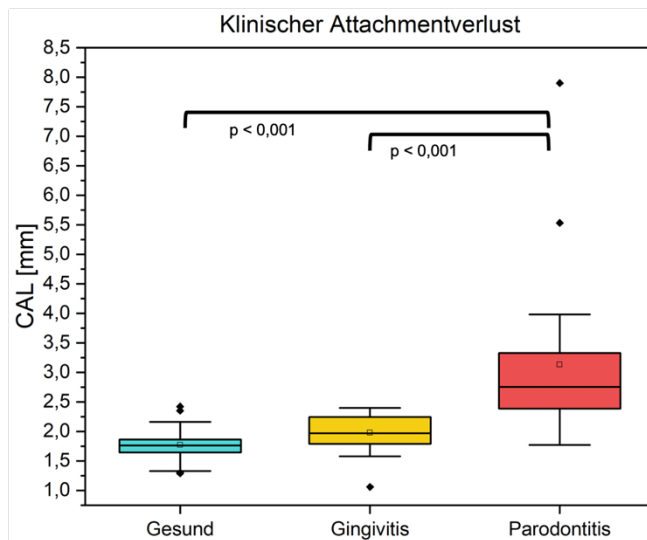


Abbildung 6: Quantitative Bewertung des klinischen Attachmentverlustes [mm].

Das Boxplot-Diagramm zeigt den Median (schwarzer Balken innerhalb der Box, Q2), das untere (Q1) und obere Quartil (Q3) – also die mittleren 50 % der Daten. Die Whisker markieren den kleinsten bzw. größten Wert innerhalb der interquartilen Spannweite ($1,5 \times \text{IQR}$ von Q1 bzw. Q3). Der arithmetische Mittelwert ist durch ein farbloses Quadrat dargestellt. Ausreißer, also Werte außerhalb der Whisker, sind als einzelne Punkte abgebildet. $N = 20$ in jeder Studiengruppe. Die Signifikanz wurde mithilfe des Kruskal-Wallis-Tests und anschließender Bonferroni-Korrektur bestimmt.

4.2.3 Modifizierter Sulkus-Blutungs-Index (mSBI)

In Abbildung 7 ist der mSBI der drei Gruppen aufgetragen. Sie zeigt, dass es einen statistisch signifikanten Unterschied zum einen zwischen den Gruppen Gesund und Gingivitis und zum anderen zwischen Gesund und Parodontitis gab. Bei beiden lag das Signifikanzniveau bei $p < 0,001$. Die Mittelwerte lagen bei der Gesunden Gruppe bei 5,25 % ($\pm 2,29$), bei der Gingivitis Gruppe bei 24,55 % ($\pm 11,21$) und in der Parodontitis Gruppe bei 35,6 % ($\pm 14,61$).

Zwischen den Gruppen Gesund-Gingivitis lag ein statistischer Unterschied von $p < 0,001$ und zwischen den Gruppen Gesund-Parodontitis einer von $p < 0,001$ vor.

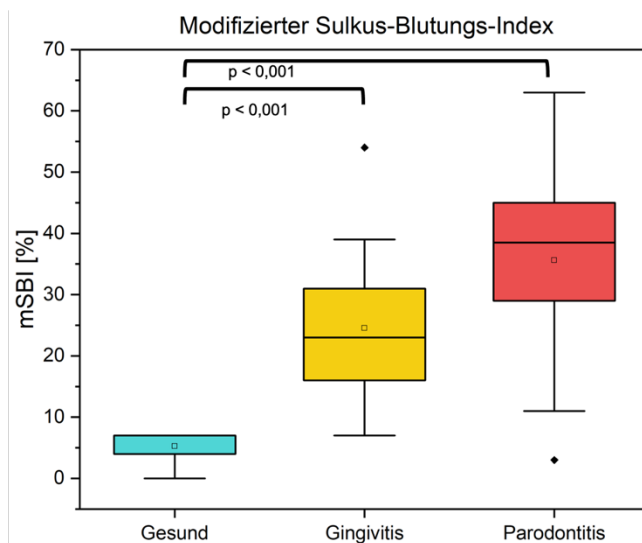


Abbildung 7: Quantitative Bewertung des modifizierten Sulkus-Blutungs-Indexes [%].

Das Boxplot-Diagramm zeigt den Median (schwarzer Balken innerhalb der Box, Q2), das untere (Q1) und obere Quartil (Q3) – also die mittleren 50 % der Daten. Die Whisker markieren den kleinsten bzw. größten Wert innerhalb der interquartilären Spannweite ($1,5 \times \text{IQR}$ von Q1 bzw. Q3). Der arithmetische Mittelwert ist durch ein farbloses Quadrat dargestellt. Ausreißer, also Werte außerhalb der Whisker, sind als einzelne Punkte abgebildet. $N = 20$ in jeder Studiengruppe. Die Signifikanz wurde mithilfe des Kruskal-Wallis-Tests und anschließender Bonferroni-Korrektur bestimmt.

4.2.4 Approximaler Plaque Index (API)

Der approximale Plaque Index ist in Abbildung 8 dargestellt. Der API war bei der Gesunden Gruppe am niedrigsten war. Dort lag der Mittelwert bei 33,35 % ($\pm 18,07$), in der Gingivitis Gruppe lag er bei 50,65 % ($\pm 19,74$) und in der Parodontitis Gruppe bei 56,40 % ($\pm 22,13$).

Anhand des paarweisen Vergleiches konnte gezeigt werden, dass es einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen der Gesunden und Gingivitis Gruppe mit $p = 0,044$ zum einen und zum anderen zwischen der Gesunden und Parodontitis Gruppe mit $p = 0,001$ gab.

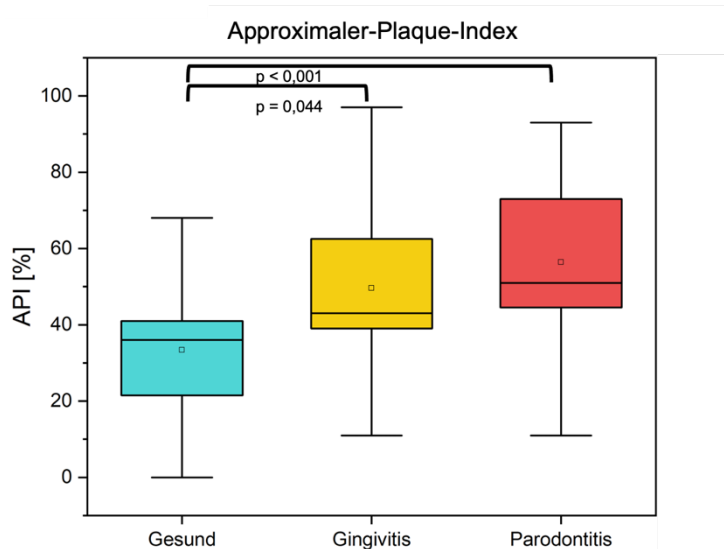


Abbildung 8: Quantitative Bewertung des Approximalen-Plaque-Indexes [%].

Das Boxplot-Diagramm zeigt den Median (schwarzer Balken innerhalb der Box, Q2), das untere (Q1) und obere Quartil (Q3) – also die mittleren 50 % der Daten. Die Whisker markieren den kleinsten bzw. größten Wert innerhalb der interquartilären Spannweite ($1,5 \times \text{IQR}$ von Q1 bzw. Q3). Der arithmetische Mittelwert ist durch ein farbloses Quadrat dargestellt. Ausreißer, also Werte außerhalb der Whisker, sind als einzelne Punkte abgebildet. $N = 20$ in jeder Studiengruppe. Die Signifikanz wurde mithilfe des Kruskal-Wallis-Tests und anschließender Bonferroni-Korrektur bestimmt.

4.3 B-Zell-Analyse

Anhand der Durchflusszytometrischen Daten konnten die Populationen der B-Zellen, der CD5+ und CD5- B-Zellen bestimmt werden und in den Gruppen Gesund, Gingivitis und Parodontitis untereinander verglichen werden.

Abbildung 9 zeigt die Konzentrationen der B-Zellen der Studiengruppen. Anhand der Daten konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede festgestellt werden.

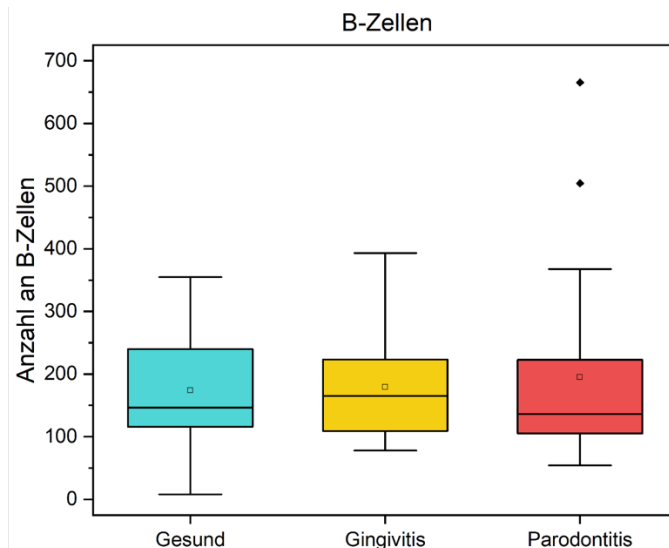


Abbildung 9: Analyse der B-Zellen.

Dargestellt sind die Konzentrationen [Zelltyp pro μL Blut] von B-Zellen in jeder Studiengruppe. Das Boxplot-Diagramm zeigt den Median (schwarzer Balken innerhalb der Box, Q2), das untere (Q1) und obere Quartil (Q3) – also die mittleren 50 % der Daten. Die Whisker markieren den kleinsten bzw. größten Wert innerhalb der interquartilären Spannweite ($1,5 \times \text{IQR}$ von Q1 bzw. Q3). Der arithmetische Mittelwert ist durch ein farbloses Quadrat dargestellt. Ausreißer, also Werte außerhalb der Whisker, sind als einzelne Punkte abgebildet. $N = 20$ in jeder Studiengruppe. Die Signifikanz wurde mithilfe des Kruskal-Wallis-Tests und anschließender Bonferroni-Korrektur bestimmt.

Anhand der beschriebenen Oberflächenmarker wurden die CD5+ in die einzelnen Entwicklungsstadien aufgeteilt. In den Entwicklungsstadien der CD5+ B-Zellen konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede festgestellt werden und es ist kein klarer Trend in den Populationen erkennbar. Die Zellzahl der Gesunden Gruppe lag bei $174,02 / \mu\text{L} (\pm 87,37)$, die der Gingivitis Gruppe bei $178,87 / \mu\text{L} (\pm 86,63)$ und die der Parodontitis Gruppe bei $195,04 / \mu\text{L} (\pm 155,76)$ (Abb. 10). Bei den CD5- B-Zellen konnten ebenfalls keine statistisch signifikanten Unterschiede bestimmt werden.

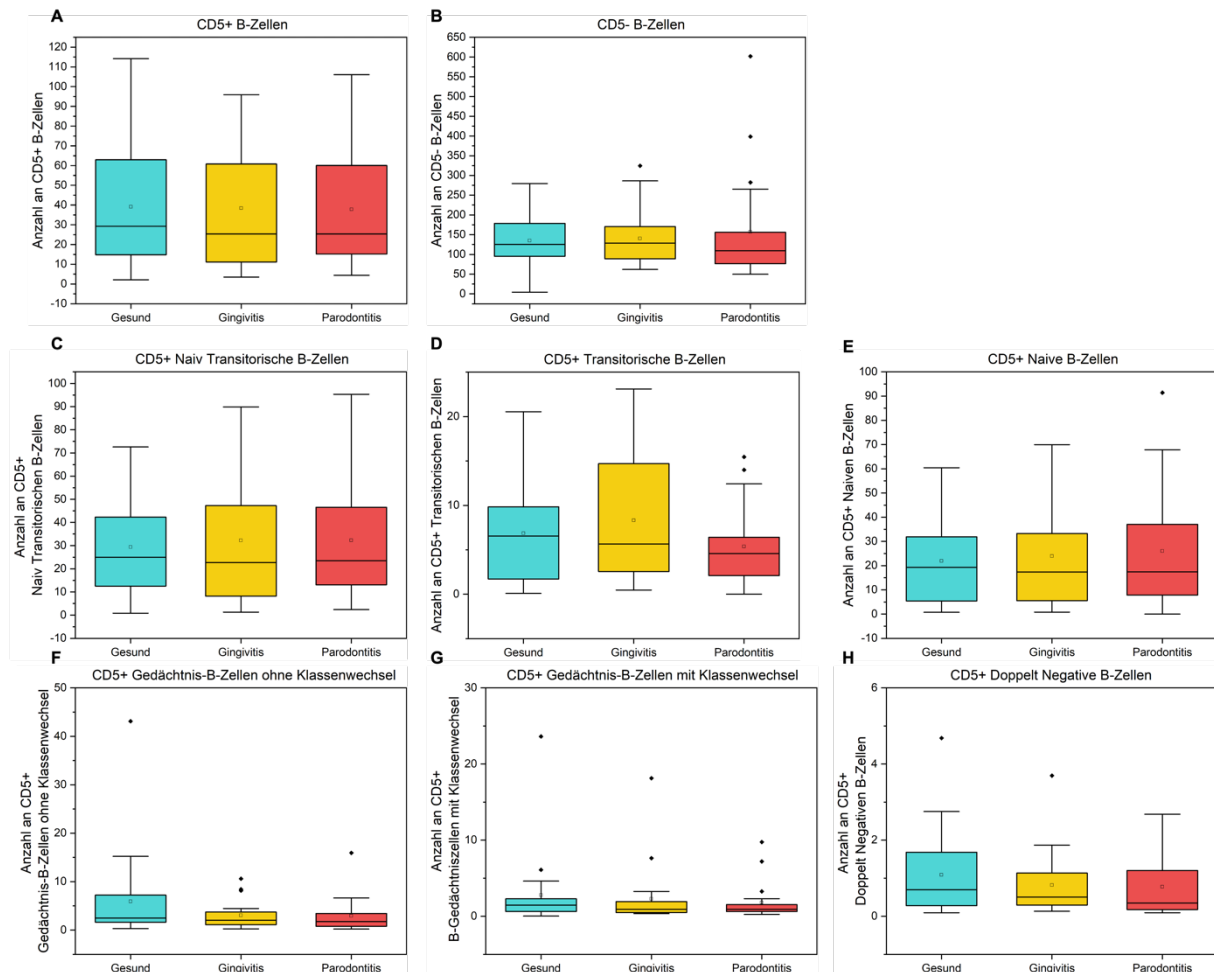


Abbildung 10: Analyse der CD5+ B-Zell-Untergruppen nach ihrem Differenzierungsstadium.

Dargestellt sind die Konzentrationen [Zelltyp pro µL Blut] von B-Zellen und ihren Subtypen in jeder Studiengruppe. A) CD5+ B-Zellen, B) CD5- B-Zellen, C) Anzahl von CD5+ naiven/transitorischen B-Zellen, D) Anzahl von CD5+ transitorischen B-Zellen, E) Anzahl von CD5+ naiven B-Zellen, F) Anzahl von CD5+ Gedächtnis-B-Zellen ohne Klassenwechsel, G) Anzahl von CD5+ Gedächtnis-B-Zellen mit Klassenwechsel, H) CD5+ doppelt negative Gedächtnis-B-Zellen. Die Boxplot-Diagramme zeigen den Median (schwarzer Balken innerhalb der Box, Q2), das untere (Q1) und obere Quartil (Q3) – also die mittleren 50 % der Daten. Die Whisker markieren den kleinsten bzw. größten Wert innerhalb der interquartilen Spannweite (1,5 × IQR von Q1 bzw. Q3). Der arithmetische Mittelwert ist durch ein farbloses Quadrat dargestellt. Ausreißer, also Werte außerhalb der Whisker, sind als einzelne Punkte abgebildet. N = 20 in jeder Studiengruppe. Die Signifikanz wurde mithilfe des Kruskal-Wallis-Tests und anschließender Bonferroni-Korrektur bestimmt. $p > 0,05$.

Basierend auf den absoluten Zellzahlen der Lymphozyten wurde der Prozentsatz der B-Zellen [CD19+ an lebenden Lymphozyten] und der Prozentsatz der CD5+ B-Zellen [CD19+CD5+ an vitalen Lymphozyten] berechnet. Anschließend wurde das Verhältnis der CD5+ B-Zellen [CD19+CD5+ an den CD19+] und die Entwicklungsstadien [naiv transitorischen CD5+ B-Zellen (CD19+CD5+CD27-IgD+CD38+D24+), transitorischen CD5+ B-Zellen (CD19+CD5+CD27-IgD+CD38++CD24++), naive CD5+ B-Zellen (CD19+CD5+CD27-IgD+), CD5+ Gedächtnis-B-Zellen ohne Klassenwechsel (CD19+CD5+CD27+IgD+), CD5+ Gedächtnis-B-Zellen mit Klassenwechsel (CD19+CD5+CD27+IgD-) und doppelt negative CD5+ B-Zellen (CD19+CD5+CD27-IgD-)] zu B-Zellen bestimmt. Es wurden keine Unterschiede in den einzelnen Populationen von B-Zellen und CD5+ B-Zellen festgestellt, noch im Verhältnis von CD5+ B-Zellen in Entwicklungsstadien zu B-Zellen (Tab. 3).

Tabelle 3: Menge [%] peripherer Blutlymphozyten, die unterschiedliche Zelloberflächenmarker exprimieren, die verschiedenen B-Zellen und ihren Entwicklungsstadien entsprechend zugewiesen sind, verglichen zwischen 3 Studiengruppen.

N = 20 in jeder Gruppe, dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichung ($\pm$).

Marker	Gesund (A)	Gingivitis (B)	Parodontitis (C)
	Verhältnis [%]	Verhältnis [%]	Verhältnis [%]
B-Zellen aller Lymphozyten	10,5 ($\pm$ 4,5)	10,8 ($\pm$ 3,9)	11,3 ($\pm$ 6,0)
CD5 ⁺ B-Zellen aller Lymphozyten	2,3 ($\pm$ 1,6)	2,4 ($\pm$ 2,1)	2,3 ($\pm$ 1,6)
CD5 ⁺ B-Zellen aller B-Zellen	21,8 ($\pm$ 12,3)	19,8 ($\pm$ 12,5)	20,5 ($\pm$ 9,3)
Naiv transitorische CD5 ⁺ B-Zellen aller B-Zellen	15,6 ($\pm$ 8,7)	16,7 ($\pm$ 12,1)	17,9 ($\pm$ 9,6)
transitorische CD5 ⁺ B-Zellen aller B-Zellen	3,7 ($\pm$ 2,4)	4,4 ($\pm$ 3,1)	3,6 ($\pm$ 3,3)
naive CD5 ⁺ B-Zellen aller B-Zellen	11,7 ($\pm$ 7,0)	12,3 ($\pm$ 9,4)	13,1 ($\pm$ 8,0)
keinen Klassenwechsel vollzogene CD5 ⁺ Gedächtnis- B-Zellen aller B-Zellen	3,8 ($\pm$ 5,4)	1,6 ($\pm$ 1,1)	1,4 ($\pm$ 1,0)
Klassenwechsel vollzogene CD5 ⁺ Gedächtnis- B-Zellen aller B-Zellen	1,7 ($\pm$ 2,3)	1,0 ($\pm$ 1,1)	0,8 ($\pm$ 0,5)
doppelt negative CD5 ⁺ B-Zellen aller B-Zellen	0,7 ($\pm$ 1,0)	0,4 ($\pm$ 0,3)	0,4 ($\pm$ 0,3)

4.4 Zytokinanalyse

Bei der Zytokinanalyse wurden 13 Zytokine aus dem Speichel untersucht: IL-4, IL-6, IL-2, IL-10, CXCL10 (IP-10), IFN- γ , IL-1 β , IL-20p70, TNF- α , CXL8 (IL-8), CCL2 (MCP-1), Free Active TGF- β 1, IL-17.

Dabei konnte bei CXL8 (IL-8) und IL-17A ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen Gesund und Parodontitis festgestellt werden (Abb. 11). Bei dem Zytokin CXL8 (IL-8) lag das Signifikanzniveau zwischen der Gesunden und Parodontitis Gruppe bei $p = 0,023$. Für das Zytokin IL-17A lag der Wert zwischen den gleichen Gruppen bei $p = 0,026$. Die Konzentration von IL-8 lag in der Gesunden Gruppe bei 731,81 pg/mL ($\pm$ 994,88), in der Gingivitis Gruppe bei 757,71 pg/mL ($\pm$ 691,44) und Parodontitis Gruppe bei 4427,86 pg/mL ($\pm$ 10661,97). Die Konzentration von IL-17A lag in der Gesunden Gruppe bei 0,45 pg/mL ($\pm$ 0,14), in der Gingivitis Gruppe bei 3,97 pg/mL ($\pm$ 14,80) und Parodontitis Gruppe bei 1,26 pg/mL ($\pm$ 2,39).

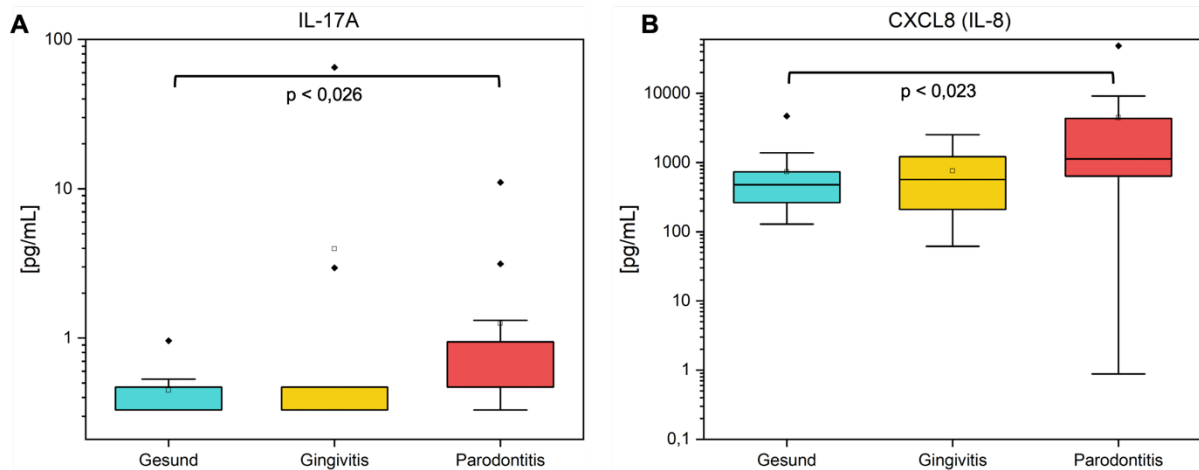


Abbildung 11: Speichel-Zytokin-Profil in den Studiengruppen. Die Konzentration [pg/mL] von Zytokinen im Speichel wurde mit dem LEGENDPlex Human Essential Immune Response Panel bestimmt:

A) IL-17A, B) CXCL8 (IL-8). Die Boxplot-Diagramme zeigen den Median (schwarzer Balken innerhalb der Box, Q2), das untere (Q1) und obere Quartil (Q3) – also die mittleren 50 % der Daten. Die Whisker markieren den kleinsten bzw. größten Wert innerhalb der interquartilären Spannweite ($1,5 \times \text{IQR}$ von Q1 bzw. Q3). Der arithmetische Mittelwert ist durch ein farbloses Quadrat dargestellt. Ausreißer, also Werte außerhalb der Whisker, sind als einzelne Punkte abgebildet. N = 20 in der Gesunden und Parodontitis Gruppe, N = 19 in der Gingivitis Gruppe. Die Signifikanz wurde mithilfe des Kruskal-Wallis-Tests und anschließender Bonferroni-Korrektur bestimmt. $p < 0,05$.

Bei den Zytokinen IL-1 β und TGF- β 1 wurde die Ausschlussgrenze des Signifikanzniveaus knapp verfehlt. IL-1 β lag bei $p = 0,051$ und TGF- β 1 bei $p = 0,055$. Die Konzentration von IL-1 β betrug in der Gesunden Gruppe 1100,83 pg/mL ($\pm 3677,18$), in der Gingivitis Gruppe 340,44 pg/mL ($\pm 241,00$) und Parodontitis Gruppe 1305,77 pg/mL ($\pm 1432,67$). Die Konzentration von TGF- β 1 lag in der Gesunden Gruppe bei 46,31 pg/mL ($\pm 52,53$), in der Gingivitis Gruppe bei 56,21 pg/mL ($\pm 49,31$) und in der Parodontitis Gruppe bei 101,41 pg/mL ($\pm 126,52$) (Abb. 12).

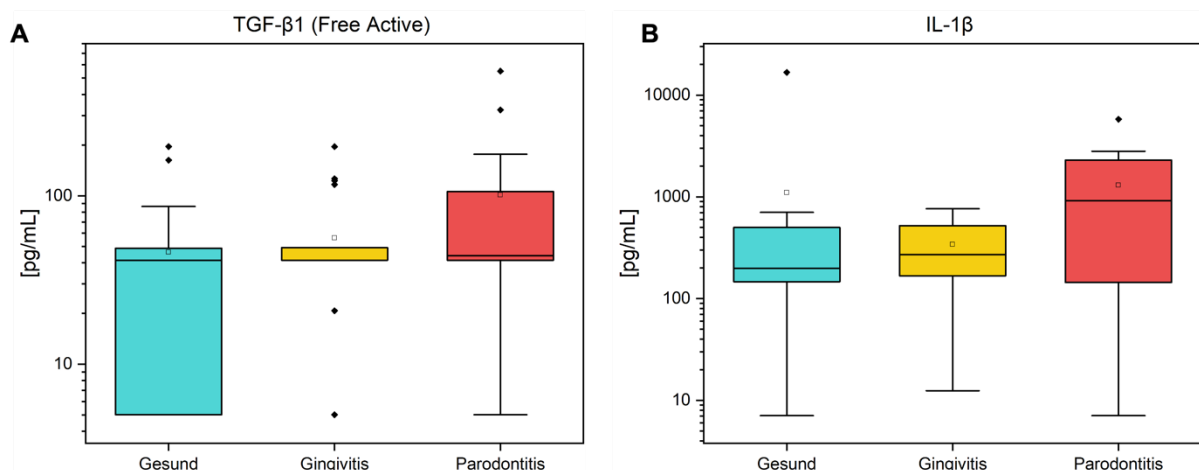


Abbildung 12: Speichel-Zytokin-Profil in den Studiengruppen.

Die Konzentration [pg/mL] von Zytokinen im Speichel wurde mit dem LEGENDPlex Human Essential Immune Response Panel bestimmt. A) TGF- β 1 (Free Active), B) IL-1 β . N = 20 in der Gesunden und Parodontitis Gruppe, N = 19 in der Gingivitis Gruppe. Die Box-and-Whisker-Diagramme zeigen den Medianwert (schwarzer Balken in der Box), den Mittelwert, 25 % und 75 % (unten bzw. oben in der Box) sowie Minimal- und Maximalwerte (unteres bzw. oberes Whisker-Diagramm) an. Die Signifikanz wurde mithilfe des Kruskal-Wallis-Tests und anschließender Bonferroni-Korrektur bestimmt. $p > 0,05$.

Bei dem Prüfen der anderen Zytokinen IL-6, IL-4, IL-2, CXCL10, IP-10, TNF- α , IL-10, CCL2 (MCP-1), IL-20p70 und IFN- γ konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede ermittelt werden. Bei diesen Zytokinen und Chemokinen lag der Signifikanzwert-Wert über 0,05 (Abb. 13).

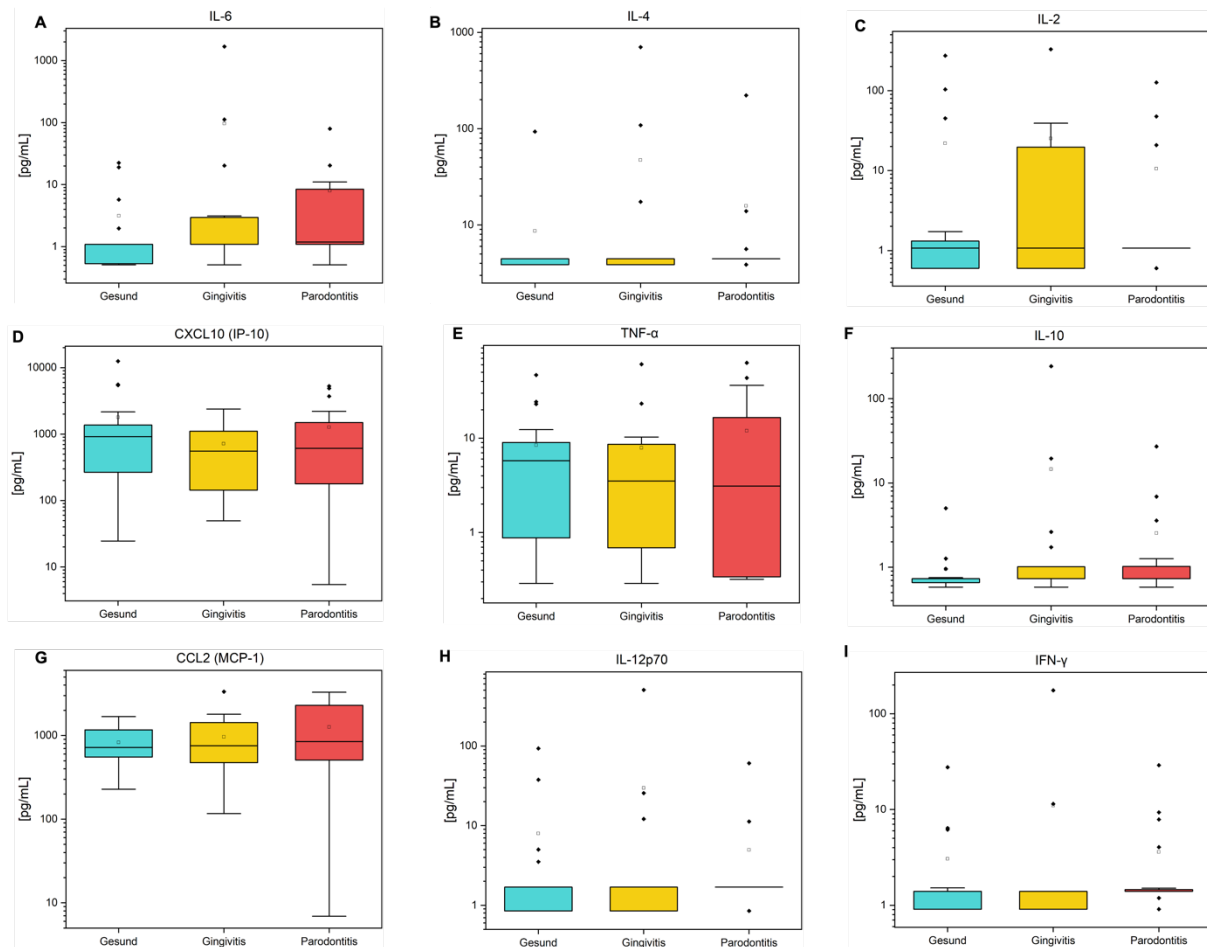


Abbildung 13: Speichel-Zytokin-Profil in den Studiengruppen.

Die Konzentration [pg/mL] von Zytokinen im Speichel wurde mit dem LEGENDPlex Human Essential Immune Response Panel bestimmt. A) IL-6, B) IL-4, C) IL-2, D) CXCL10 (IP-10), E) TNF- α , F) IL-10, G) CCL2 (MCP-1) H) IL-12p70, I) IFN- γ . Die Boxplot-Diagramme zeigen den Median (schwarzer Balken innerhalb der Box, Q2), das untere (Q1) und obere Quartil (Q3) – also die mittleren 50 % der Daten. Die Whisker markieren den kleinsten bzw. größten Wert innerhalb der interquartilären Spannweite ($1,5 \times \text{IQR}$ von Q1 bzw. Q3). Der arithmetische Mittelwert ist durch ein farbloses Quadrat dargestellt. Ausreißer, also Werte außerhalb der Whisker, sind als einzelne Punkte abgebildet. N = 20 in der Gesunden und Parodontitis Gruppe, N = 19 in der Gingivitis Gruppe. Die Signifikanz wurde mithilfe des Kruskal-Wallis-Tests und anschließender Bonferroni-Korrektur bestimmt. $p > 0,05$.

4.5 Mikrobiomanalyse

Die isolierte mikrobielle DNA wurde hinsichtlich der taxonomischen Ordnung auf Stamm-, Gattungs- und Speziesebene untersucht. Die Zuordnung der Sequenzdaten aller Proben (= operative taxonomische Einheit (engl. *operational taxonomic units* (OTUs)) zu den taxonomischen Gruppen erfolgte mit Hilfe der Datenbank SILVA (database version 138). Dabei wurden statistisch signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen aufgezeigt. Die Ergebnisse der gesamten 60 Proben sind in den folgenden Abbildungen dargestellt.

Zuerst sind die Ergebnisse der Stammanalyse aufgezeigt. Es konnten innerhalb der Gruppen 9 verschiedene Stämme nachgewiesen werden (Abb. 14)

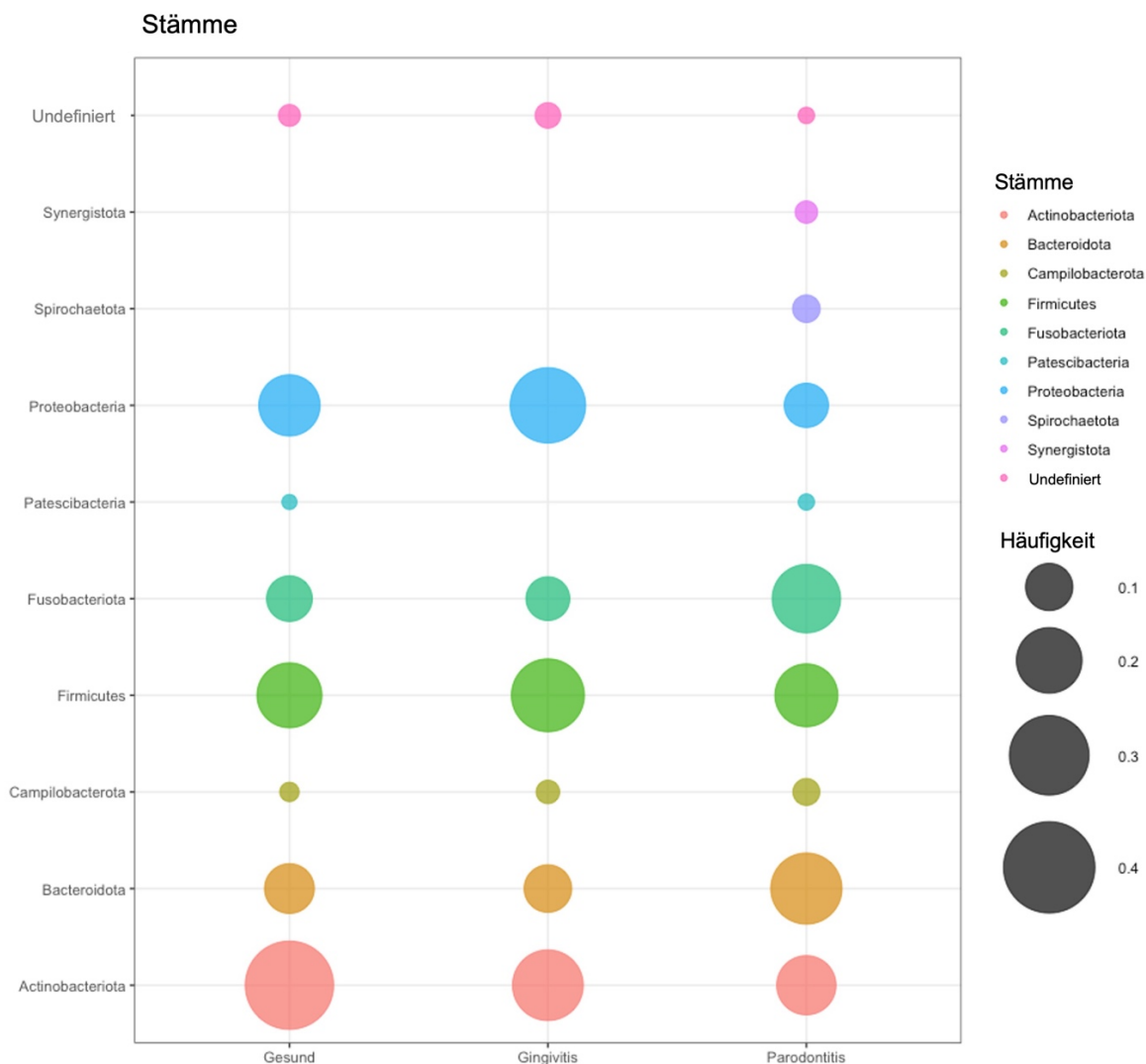


Abbildung 14: Punktediagramm der durchschnittlichen Häufigkeit von Bakterienstämmen in den Studiengruppen. Die Größe der Punkte stellt die Frequenz der Häufigkeit jeder Gattung dar. N = 20 in der Gesunden und Parodontitis Gruppe, N = 19 in der Gingivitis Gruppe.

Das Mikrobiom der parodontal Gesunden Gruppe wies eine hohe Zusammensetzung auf Stammebene von *Actinobakterien*, gefolgt von einer weniger hohen Zusammensetzung aus *Firmicutes*, *Proteobakterien*, *Bacteroidetes*, *Fusobakterien* und eine kleine Anzahl an *Campilobakter* und *Patescibakterien* auf.

Das Stamm-Mikrobiom der Gingivitis Gruppe setzte sich aus einem hohen Anteil von *Proteobakterien*, *Actinobakterien* und *Firmicutes* zusammen. Mit einem geringeren Teil wies das Mikrobiom die Stämme *Bacteroidota* und *Fusobakterien* auf. Zu einem kleinen Teil ließ sich der Stamm *Campilobacterota* nachweisen.

Die Zusammensetzung der Stämme in der Parodontitis Gruppe bestand aus einem hohen Anteil von *Bacteroidota*, *Firmicutes* und *Proteobacteriodota*. Die Häufigkeit von *Campilobacterota* und *Patescibacteria* war niedriger. Die Anwesenheit von *Spirochaetota* und *Synergistota* ist besonders bemerkenswert, da sie weder in der Gesunden noch in der Gingivitis Gruppe nachzuweisen war.

Anhand der 16S-rRNA konnte das Mikrobiom der Studiengruppen auf Gattungsebene aufgeschlüsselt werden. Dabei ließen sich 26 verschiedene Gattungen identifizieren (Abb. 15).

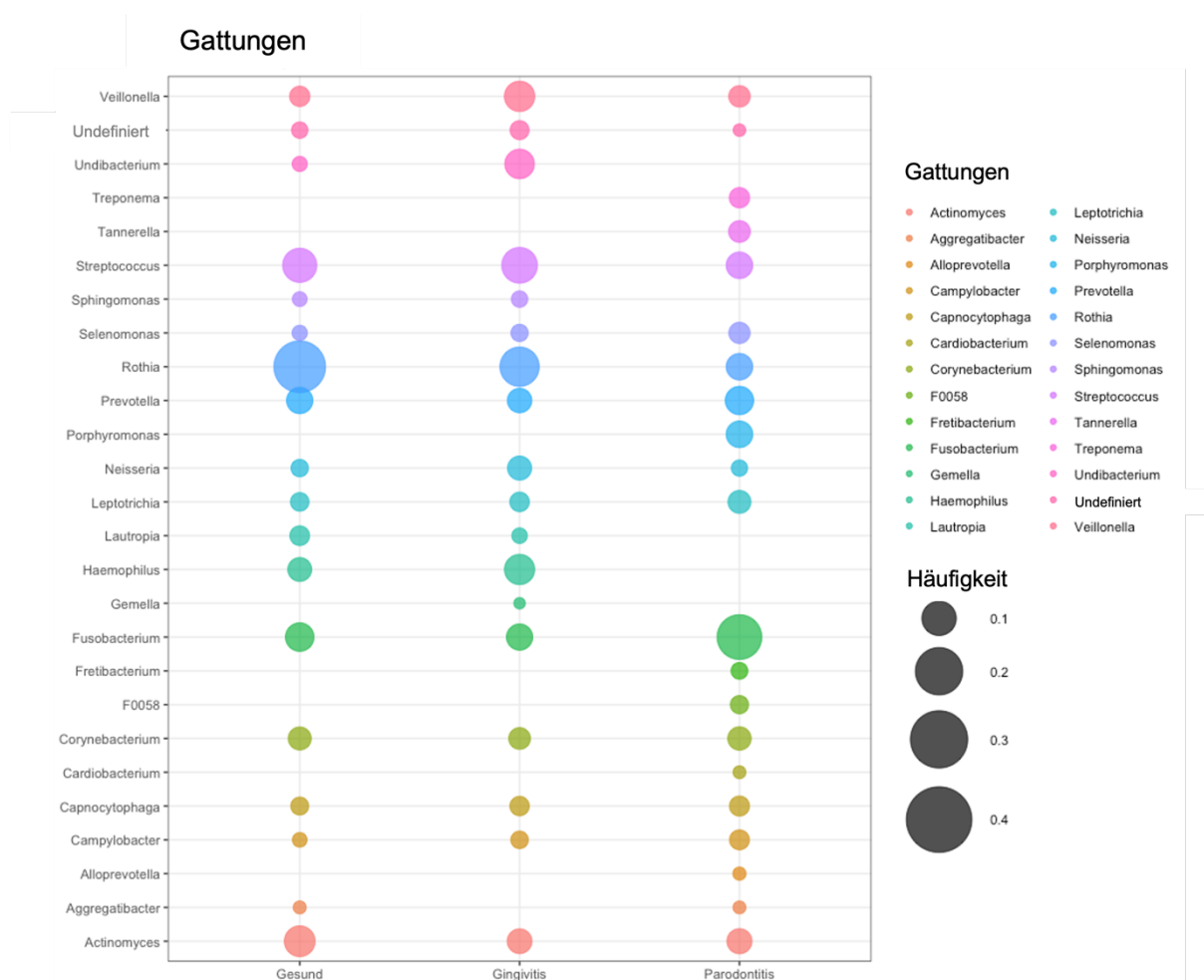


Abbildung 15: Punktediagramm der durchschnittlichen Häufigkeit von Bakteriengattungen in den Studiengruppen. Die Größe der Punkte stellt die Frequenz der Häufigkeit jeder Gattung dar. N = 20 in der Gesunden und Parodontitis Gruppe, N = 19 in der Gingivitis Gruppe.

Die Auflistung nach Gattungsebene in der Gesunden Gruppe zeigte 17 verschiedene Gattungen auf. Die Gattung *Rothia* war am stärksten vertreten. Ein weniger hohes Vorkommen hatte die Gattung *Streptococcus* und *Actinomyces* gefolgt von *Fusobacterium*, *Corynebacterium*, *Prevotella* und *Capnocytophaga*.

In der Gingivitis Gruppe konnten 19 verschiedene Gattungen nachvollzogen werden. Wie in der Gesunden Gruppe machte auch in dieser Gruppe die Gattung *Rothia* den größten Anteil aus, gefolgt von *Streptococcus*. In einer geringeren Häufigkeit waren die Gattungen *Veillonella undibacterium*, *Neisseria*, *Haemophilus*, *Fusobacterium* und *Actinomyces* vertreten. Dabei waren die Gattungen *Undibacterium*, *Pseudomonas* und *Gemella* nur in der Gingivitis Gruppe anwesend.

In der Gruppe Parodontitis konnten 22 Gattungen nachgewiesen werden. Zwischen den Häufigkeiten der Gattungen gab es keine hohen Unterschiede. Die Gattung *Fusobacterium* hatte nur eine gering höhere Häufigkeit als *Porphyromonas*, *Streptococcus* und *Rothia*. Kennzeichnend war die isolierte Anwesenheit von *Treponema*, *Tannerella*, *Porphyromonas*, *Cardiobacterium* sowie *Actinomyces*.

Weiterhin konnte das Mikrobiom der Studiengruppen bis auf Spezies-Ebene aufgeschlüsselt werden. Dabei ließen sich 19 verschiedene Spezies identifizieren (Abb. 16).

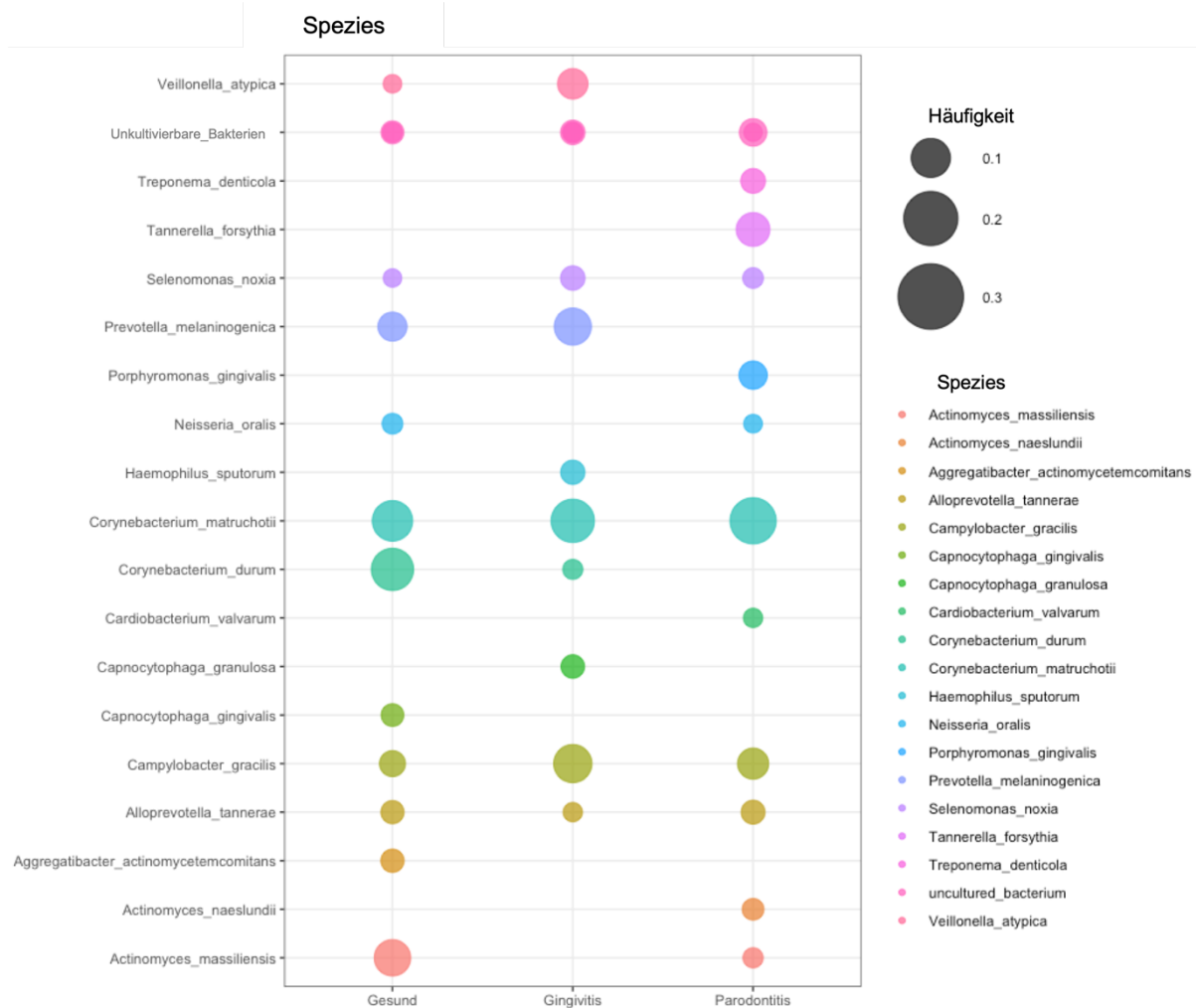


Abbildung 16: Punktediagramm der durchschnittlichen Häufigkeit von Bakterienspezies in den Studiengruppen. Die Größe der Punkte stellt die Frequenz der Häufigkeit jeder Gattung dar. N = 20 in der Gesunden und Parodontitis Gruppe, N = 19 in der Gingivitis Gruppe.

In der Gesunden Gruppe konnten 12 unterschiedliche Spezies ermittelt werden. Die häufigsten stellten *Corynebacterium matruchotii* und *Corynebacterium durum* dar. Mit einer geringeren Häufigkeit kamen die Spezies *Actinomyces massiliensis*, *Prevotella melaninogenica* und *Campylobacter gracilis* vor. Die Spezies *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* und *Capnocytophaga ginigvalis* waren nur in dieser Gruppe anwesend.

In der Gingivitis Gruppe konnten neun unterschiedliche Bakterienspezies aufgezeigt werden. Darunter stellte das *Corynebacterium matruchotii* die größte Population dar. Darauf folgte mit einem geringeren Vorkommen die Spezies *Campylobacter gracilis*, *Prevotella melaninogenica* und *Veillonella atypica*. Mit einer niedrigen Häufigkeit zeigten sich beispielsweise *Haemophilus sputorum*, *Selenomoas noxia* und *Alloprevotella tanneriae* auf. Das Bakterium *Capnocytophaga granulosa* war nur in der Gingivitis Gruppe anwesend.

In der Parodontitis Gruppe wurden 12 verschiedene Bakterienspezies ermittelt. Auch in dieser Gruppe machte die Spezies *Corynebacterium matruchotii* die größte Häufigkeit aus. Mit einer geringeren Population kamen beispielsweise die Spezies *Treponema denticola*, *Tanerella forsythia* und *Porphyromonas gingivalis* vor, welche nur in dieser Gruppe anwesend waren. Mit einer niedrigeren

Häufigkeit kamen die Spezies *Actinomyces naeslundii*, *Cardiobacterium valvarum* und *Neisseria oralis* vor.

4.5.1 α -Diversität

Zur Betrachtung der Bakterienvielfalt, unter Beachtung der Dominanz, wurde die α -Diversität ermittelt. Diese zeigt die bakterielle Diversität innerhalb einer Gruppe. Als Index wurde hierfür der Shannon-Wiener-Index erhoben. Es konnte gezeigt werden, dass die Individualität der einzelnen Gattungen mit fortschreitendem Krankheitsverlauf abnimmt.

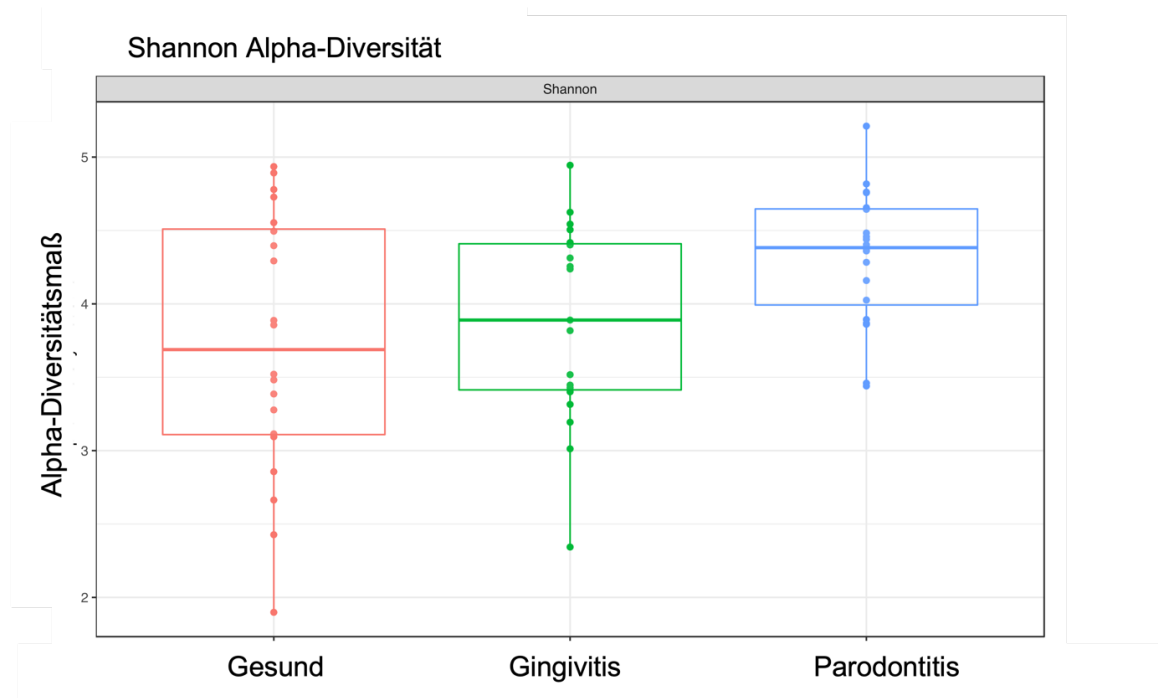


Abbildung 17: Analyse von Alpha-Diversität nach Gattungen in Mikrobiomproben, die aus der gingivalen Sulkusflüssigkeit der Patienten entnommen wurden.

Das Boxplot-Diagramm zeigt den Median (schwarzer Balken innerhalb der Box, Q2), das untere (Q1) und obere Quartil (Q3) – also die mittleren 50 % der Daten. Die Whisker markieren den kleinsten bzw. größten Wert innerhalb der interquartilen Spannweite ($1,5 \times \text{IQR}$ von Q1 bzw. Q3). Ausreißer, also Werte außerhalb der Whisker, sind als einzelne Punkte abgebildet. $N = 20$ in der Gesunden und Parodontitis Gruppe. $N = 19$ in der Gingivitis Gruppe. Die Signifikanz der α -Diversität wurde mithilfe des Kruskal-Wallis-Tests, gefolgt von einer Bonferroni-Korrektur und Permanova (Adonis), bestimmt. $p < 0,05$.

4.5.2 β -Diversität

Zum Vergleich der Bakterienvielfalt zwischen den Gruppen wurde die β -Diversität berechnet. Als Index wurde die ungewichtete und gewichtete unique fraction Distanz (UniFrac), berechnet. Unter Berücksichtigung der Distanzordnung zeigte die ungewichtete UniFrac-Berechnung (Anwesenheit/Fehlen von Taxa) Ähnlichkeit zwischen der Gesunden und der Gingivitis Gruppe. Im Gegensatz dazu schien die Vielfalt der Bakteriengemeinschaften in der Parodontitis Gruppe verringert zu sein. Der gewichtete UniFrac (relative Häufigkeit von Taxa) bestätigte die beobachtete Ähnlichkeit zwischen der Gesunden und der Gingivitis Gruppe, berücksichtigte jedoch ein höheres Vorkommen erkannter einzelner Taxa.

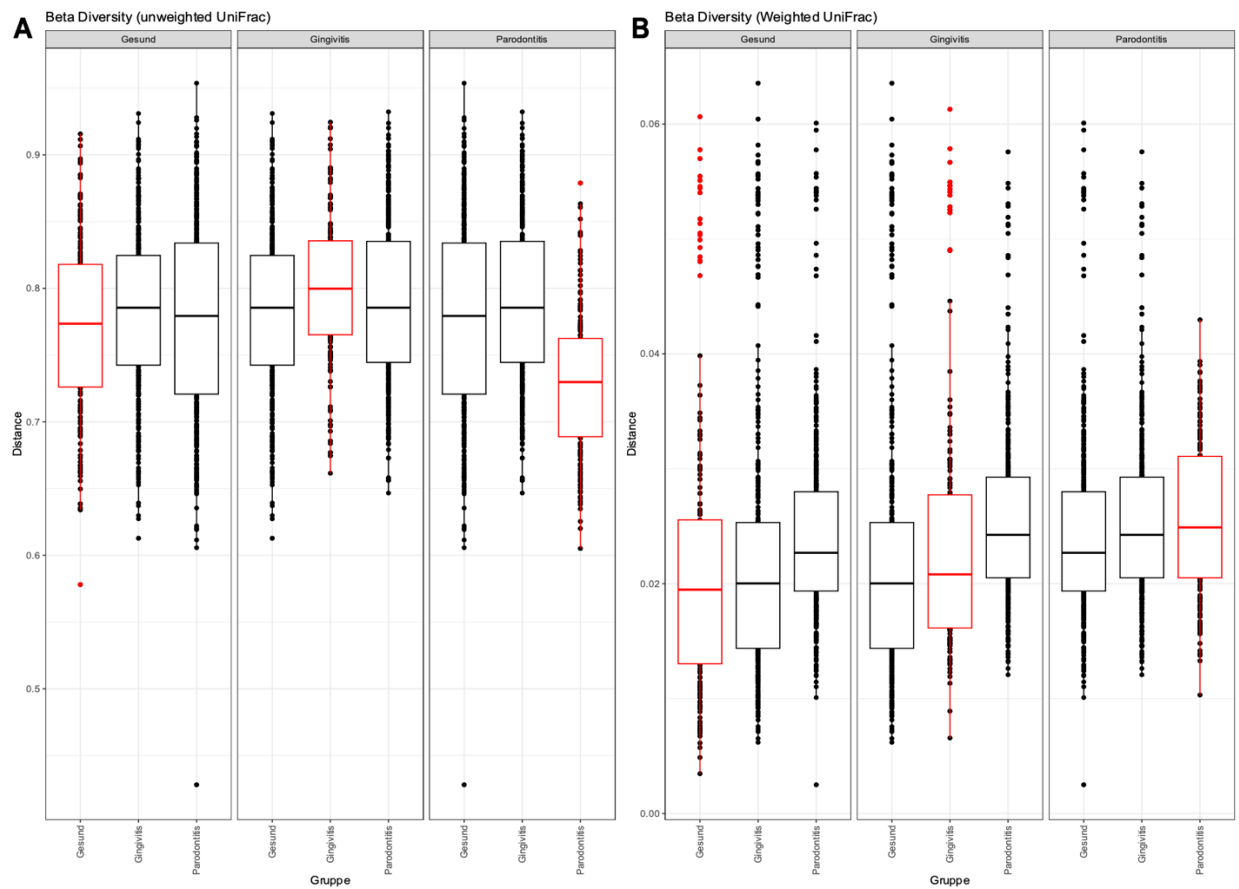


Abbildung 18: Analyse von Beta-Diversität nach Gattungen in Mikrobiomproben, die aus der gingivalen Sulkusflüssigkeit der Patienten entnommen wurden.

Als Index für die Beta Diversität wird das ungewichtete (A) und gewichtete (B) UniFrac-Maß gezeigt. Die Boxplot-Diagramme zeigen den Median (schwarzer Balken innerhalb der Box, Q2), das untere (Q1) und obere Quartil (Q3) – also die mittleren 50 % der Daten. Die Whisker markieren den kleinsten bzw. größten Wert innerhalb der interquartilären Spannweite ($1,5 \times \text{IQR}$ von Q1 bzw. Q3). Ausreißer, also Werte außerhalb der Whisker, sind als einzelne Punkte abgebildet. N = 20 in der Gesunden und Parodontitis Gruppe. N = 19 in der Gingivitis Gruppe. Die Signifikanz der β -Diversität wurde mithilfe des Kruskal-Wallis-Tests, gefolgt von einer Bonferroni-Korrektur und Permanova (Adonis), bestimmt. $p < 0,05$.

4.5.3 Vergleich der Phänotypen

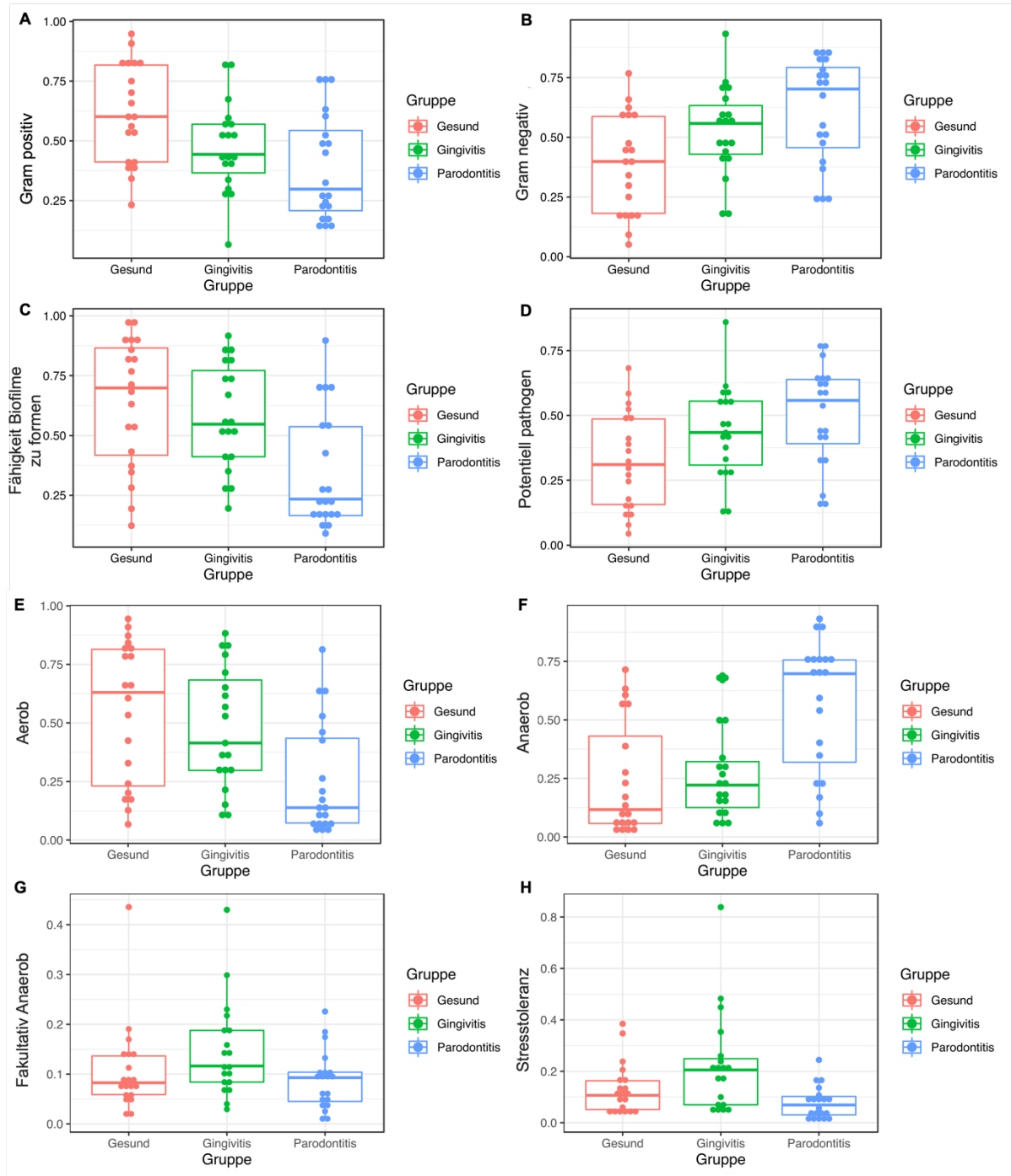


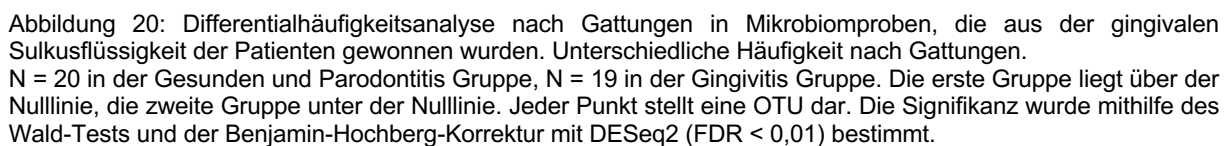
Abbildung 19: Analyse der Phänotypen nach Gattungen in Mikrobiomproben, die aus der gingivalen Sulkusflüssigkeit der Patienten gewonnen wurden.

Darstellung der (A) gram positiven und (B) gram negativen Bakterien. (C) Einteilung der Bakterien in Bezug auf die Fähigkeit einen stabilen Biofilm zu formen. (D) Pathogenität des Mikrobioms der einzelnen Gruppen. Häufigkeiten der (E) aeroben, (F) anaeroben und (G) fakultativ anaeroben Bakterien. (H) Stresstoleranz des jeweiligen Mikrobioms. Die Boxplot-Diagramme zeigen den Median (schwarzer Balken innerhalb der Box, Q2), das untere (Q1) und obere Quartil (Q3) – also die mittleren 50 % der Daten. Die Whisker markieren den kleinsten bzw. größten Wert innerhalb der interquartilen Spannweite ($1,5 \times \text{IQR}$ von Q1 bzw. Q3). Ausreißer, also Werte außerhalb der Whisker, sind als einzelne Punkte abgebildet. N = 20 in der Gesunden und Parodontitis Gruppe. N = 19 in der Gingivitis Gruppe.

In Abbildung 19 lässt sich anhand des Diagramms A ableiten, dass das Vorkommen Gram positiver Bakterien von der gesunden Gruppe bis hin zur Parodontitis Gruppe abgenommen hat. Hingegen befanden sich mehr gram negative Bakterien in der Parodontitis Gruppe als in der Gingivitis oder Gesunden Gruppe (Diagramm B). Das Diagramm C zeigt das Vorkommen von Gattungen, welche in der Lage waren einen stabilen Biofilm zu bilden. Diese überwogen in der Gesunden Gruppe, darauf folgte die Gingivitis und danach die Parodontitis Gruppe. Aus dem Diagramm D geht die Pathogenität der Bakterien hervor, welche in der Parodontitis Gruppe den größten Teil ausmachte, gefolgt von der Gesunden und Gingivitis Gruppe. Aus den Diagrammen E, F und G lässt sich ableiten, dass im Vergleich der Gruppen die Gesunde Gruppe am meisten aerobe Gattungen, die Gingivitis Gruppe am meisten fakultativ anaerobe Gattungen und die Parodontitis Gruppe am meisten anaerobe Gattungen aufwies. Die größte Stresstoleranz der Gattungen wies laut Diagramm H die Gingivitis Gruppe auf.

4.5.4 Unterschiedliche Häufungen nach Gattungen

Als Vergleich der Häufigkeiten der Gattungen in den einzelnen Studiengruppen wurde ein log2fold-Change visualisiert. Dabei wurden statistisch signifikante Unterschiede der einzelnen OTUs aufgetragen. Die erstgenannte Gruppe befindet sich über der Null-Linie und die zweitgenannte Gruppe befindet sich unterhalb der Null-Linie.



Aus dem Vergleich der Diagramme geht hervor, dass es in der Häufigkeit zwischen den OTUs der Gruppen Gingivitis und Gesund relativ wenig statistisch signifikante Unterschiede auf Gattungsebene gab. Im Gegensatz dazu lagen statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen Parodontitis und Gesund vor. Stark statistisch signifikante Unterschiede zeigten sich in der Gruppe Parodontitis und Gingivitis. Als Beispiel zwischen Gingivitis gegen Gesund kamen zwei OTUs mit einer hohen Häufigkeit von *Streptococcus* in der Gingivitis Gruppe vor. Hingegen gab es in der Gesunden Gruppe eine OTU mit einer hohen Häufigkeit bei der Gattung *Rothia*. Als Beispiel im Vergleich Parodontitis gegen Gesund kann das *Fusobacterium* herangezogen werden: Dort konnten in der Parodontitis Gruppe auf Gattungsebene vier OTUs mit einer statistisch signifikant höheren Häufigkeit als in der Gesunden Gruppe nachgewiesen werden. Insgesamt konnten zwischen den Gruppen Gingivitis gegen Gesund vier Gattungen, zwischen den Gruppen Parodontitis gegen Gesund 17 und zwischen den Gruppen Parodontitis gegen Gingivitis 25 Gattungen mit einem statistisch signifikanten Unterschied in den Häufigkeiten gefunden werden.

5 Diskussion

5.1 Hintergrund und Hypothese

Mehrere Studien berichteten über erhöhte Werte von CD5+ B-Zellen im zirkulierenden Blut von Patienten mit fortgeschrittener und aggressiver Parodontitis (Afar, Engel and Clark, 1992; Irwandi *et al.*, 2022). Die CD5+ B-Lymphozyten sind für ihre autoreaktiven Eigenschaften bekannt, da sie Autoantikörper gegen die extrazelluläre Matrix produzieren können, die indirekt den Knochenabbau erleichtern können, indem sie eine große Untergruppe von Immunzellen an den Ort der anfänglichen Entzündung locken (Sugawara *et al.*, 1992). Vorherige Studien schlossen Patientenkohorten mit hoher Schwere der Erkrankung ein und befassten sich nicht mit der B-Zell-Analyse in Bezug auf eine CD5+-Population in einem mittelschweren Erkrankungsstatus. Die vorliegende Arbeit untersuchte hingegen die Rolle bzw. das Vorkommen von CD5+ B-Zellen bei initialen bis moderaten parodontalen Erkrankungen wie Gingivitis und mittelschwerer Parodontitis im Vergleich zu gesunden Probanden. (Armitage, 1999)

5.2 Zytokine

Die Zytokinbestimmungen zeigten statistisch signifikant erhöhte IL-17A- und IL-8-Spiegel in Parodontitis-Speichelproben im Gegensatz zur Kontrollgruppe. Die Spiegel von IL-1 β und TGF- β 1 waren ebenfalls erhöht. Diese Ergebnisse stützen die Beobachtungen in mehreren anderen Untersuchungen, in denen ein höherer IL-17-Wert in Sulkusflüssigkeit und Zahnfleischbiopsien von entzündetem Parodontium nachgewiesen wurde (Takahashi *et al.*, 2005; Vernal *et al.*, 2005; Ohyama *et al.*, 2009). Azman *et al.* stellten in ihrer Studie fest, dass die IL-17A-Konzentration in Speichel, Serum und GCF bei Parodontitispatienten höher ist als bei gesunden Patienten (Azman *et al.*, 2014). Bemerkenswerterweise spielt IL-17A eine wichtige Rolle bei der Abwehr von Infektionen, da es die folgenden entzündungsfördernden und antimikrobiellen Eigenschaften aufweist: 1) Rekrutierung und Aktivierung von Neutrophilen (PMNs); 2) Freisetzung von Akute-Phase-Proteinen und Komplementfaktoren; 3) Förderung der Migration der Th-17-Zellen. Die rekrutierten Th-17-Zellen initiieren weitere Signalkaskaden, die nicht nur die Immunantwort verstärken, sondern durch einen Feedback-Mechanismus auch die weitere Freisetzung von IL-17 aus lokalen mesenchymalen Zellen stimulieren. Dadurch bleibt die Entzündungsreaktion erhalten (Noack, Ndongo-Thiam and Miossec, 2016). Darüber hinaus sorgt IL-17A für eine Induktion verschiedener Zytokine wie IL-8, IL-1, TNF- α und IL-6 (Onishi and Gaffen, 2010; Preshaw and Taylor, 2011). Im Vergleich zu anderen proinflammatorischen Zytokinen wird IL-8 früh produziert und kann mehrere Wochen im Gewebe persistieren (Mlachkova, Popova and Doseva, 2020). IL-8 wirkt hauptsächlich als Attraktor und Aktivator von PMNs, die nach dem Eintritt in parodontale Gewebe für die Produktion von TNF- α , IL-1 β , IL-6 und IL-8 sorgen. Diese Zytokine induzieren den Abbau von parodontalem Gewebe, indem sie die Knochenresorption stimulieren (Yoshimura *et al.*, 1997). Eine starke immunregulatorische Rolle bei entzündungsbedingten Prozessen wird auch IL-1 β zugeschrieben, das als Verstärker der lokalen Gewebedurchblutung wirkt und dadurch zur Leukozytenrekrutierung und Infiltration von Neutrophilen beiträgt. Darüber hinaus reguliert IL-1 β positiv die Expression von MMPs, RANKL und anderen

kollagenolytischen Enzymen. So zeigen sowohl IL-1 β als auch TGF- β 1 einen erheblichen Einfluss auf den Knochenabbau bei Parodontitis, wie an anderer Stelle beschrieben (Rosen *et al.*, 1988; Kinney *et al.*, 2014; Rangbulla *et al.*, 2017; Cheng *et al.*, 2020). Unter Berücksichtigung der Tatsache, dass die Sekretion anderer analysierter Zytokine (IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, CCL2, CXCL10, IFN- γ , IL-20p70, TNF- α) in der vorliegenden Studie in allen Gruppen unverändert war, ist davon auszugehen, dass die anfängliche Entzündung (wie sie bei Gingivitis oder beginnender Parodontitis zu sehen ist) primär durch eine verstärkte Produktion von IL-17A und IL-8 getrieben wird. Eine solche begrenzte Immunantwort würde auch die geringe systemische Proliferation von CD5+ B-Zellen bedingen.

5.3 B-Zellen

Im Jahr 2002 untersuchten Berglundh *et al.* die Häufigkeit von CD5+ B-Zellen im peripheren Blut von Patienten mit diagnostizierter fortgeschrittener Parodontitis. In der gesunden Gruppe entfielen etwa 15 % der analysierten B-Zellen auf die CD5+-Fraktion, während im Blut von Parodontitispatienten der CD5+-Anteil fast dreimal höher war (40-50 %) (Berglundh *et al.*, 2002). Im Gegensatz dazu zeigten die vorliegenden Daten, dass das Verhältnis von CD5+ B-Zellen im zirkulierenden Blut bei gesunden Probanden durchschnittlich 20 % betrug und bei Patienten mit leichter oder mittelschwerer parodontaler Entzündung unverändert blieb. Ähnliche Ergebnisse wurden von Sugawara *et al.* beschrieben, die ca. 17 % CD5+ B-Zellen im Blut von Teilnehmern mit fortgeschrittener Parodontitis vs. ~14 % in der gesunden Gruppe nachwiesen (Sugawara *et al.*, 1992). Sugawara und Berglundh untersuchten auch die lokale Konzentration von CD5+ B-Zellen in Zahnfleischbiopsien und Blut. Im Vergleich zu den Befunden von Sugawara war das Verhältnis von CD5+ B-Zellen zu B-Zellen in den Zahnfleischproben etwas höher als in der Studie von Berglundh. Hingegen war der Blutanteil in den Proben von Berglundh im Vergleich zu den von Sugawara berichteten Werten dreimal höher. Ergebnisse der vorliegenden Studie entsprechen den Beobachtungen von Sugawara (Sugawara *et al.*, 1992; Berglundh *et al.*, 2001). Dies führt zur Annahme, dass eher eine schwere als eine mäßige Entzündungslast im parodontalen Bereich eine systemische Immunantwort auslöst, die sich in der Proliferation von CD5+ B-Zellen im Blut widerspiegelt, wie sie bei fortgeschrittener chronischer und aggressiver Parodontitis beobachtet wird. Der Zusammenhang zwischen Knochenresorption und systemischer Akkumulation von CD5+ B-Zellen ist auch im Fall von rheumatoider Arthritis offensichtlich, wo die Schwere der Entzündung und des Knochenabbaus sehr hoch ist. Leandro *et al.* beobachteten, dass bei Absetzen der Medikation von RA-Patienten der Anteil der CD5+ B-Zellen im Blut innerhalb weniger Monate nach Therapieende von 33,7 % auf 78,7 % angestiegen ist. Das Medikament Rituximab hat sich bei der Depletion maligner und normaler B-Lymphozyten als wirksam erwiesen und Leandro *et al.* haben gezeigt, dass die Repopulation von naiven CD5+ und CD38+ B-Zellen einige Monate nach der Behandlung auftrat (Leandro *et al.*, 2006). Eine weitere Studie von Engelmann *et al.* wies auf eine positive Korrelation zwischen dem Serumbiomarker der Osteoklastenaktivität CTX-1 und CD5+-Zellen im Blut von Patienten mit RA hin (Engelmann *et al.*, 2015). Die Entzündungslast bei mittelgradigen Parodontalerkrankungen reicht jedoch möglicherweise nicht aus, um systemische Immuneffekte zu induzieren. Zu diesem Zweck wurden in der vorliegenden Arbeit zusätzlich die Entwicklungsstadien von CD5+ B-Zellen basierend auf der Studie von Engelmann *et al.* untersucht. Im Allgemeinen zeigte die Analyse einen großen Anteil

naiver B-Zellen in der CD5+ Population (11-13 %). Hier war die Inzidenz naiver CD5+ B-Zellen in erkrankten Gruppen geringfügig erhöht. Zwischen unseren Studiengruppen konnte kein statistisch signifikanter Unterschied bezüglich der anderen analysierten B-Zell-Subtypen (transitorische, Gedächtnis-B-Zellen ohne Klassenwechsel, Gedächtnis-B-Zellen mit Klassenwechsel und doppelt negative B-Zellen) festgestellt werden. Vermutlich reicht die Entzündungslast bei mittelschweren Parodontalerkrankungen nicht aus, um systemische Immuneffekte auszulösen. Eine Positivkontrolle in Form von Patienten mit schwerer Parodontitis wurde in der vorliegenden Studie jedoch nicht erhoben.

5.4 Mikrobiom

Die Hauptursache der entzündlichen Belastung des Parodontiums ist ein gestörtes Gleichgewicht der oralen Mikrobiota. Diesbezüglich beschrieb Tonetti, dass die verstärkte Sekretion von IL-8 und PMNs-Infiltration in die oberen Schichten des Randepithels wahrscheinlich auf eine zunehmende Pathogenität bakterieller Plaque zurückzuführen ist (Tonetti, 1997). Ein Jahr später spezifizierten Socransky et al. die bakterielle Ätiologie und schlugen *P. gingivalis*, *T. forsythia* und *T. denticola* als zentrale parodontale Pathogene vor (Socransky et al., 1998). Anschließend wurde in Mausexperimenten ein Zusammenhang zwischen der Häufigkeit von *P. gingivalis* und der Freisetzung von IL-17A deutlich (Onishi and Gaffen, 2010). Kriebel et al. beschreiben, dass die durch *P. gingivalis* induzierte IL-8-Sekretion in gingivalen Epithelzellen statistisch signifikant höher war als in humanen mesenchymalen Stammzellen. Außerdem zeigten die Zelltypen in Gegenwart von *Fusobacterium nucleatum*- Stämmen eine hohe Sekretionsrate von IL-8. Die Beobachtungen dieser und weiterer Studien stimmen mit den Ergebnissen der vorliegenden Untersuchung überein, die ebenfalls eine statistisch signifikant höhere Konzentration von IL-8 und eine höhere Häufigkeit von *Porphyromonas* und *Fusobacterium* bei Parodontitispatienten im Vergleich zu den Gesunden und Gingivitis Gruppen zeigten (Kriebel et al., 2013).

Aus diesem Grund wurde eine mikrobiologische Untersuchung der Sulkusflüssigkeit mittels 16S-rRNA-Sequenzierung durchgeführt und die Parodontalflora untersucht. Die Auswertung zeigte repräsentative Bakterienspektren in Abhängigkeit vom Gesundheitszustand. Die erhobenen Daten stimmen mit den Ergebnissen mehrerer anderer Studien überein, die das orale Mikrobiom ähnlich profiliert haben (Socransky et al., 1998; Sela, 2001; Tatakis and Kumar, 2005; Abusleme et al., 2013; Kirst et al., 2015; Chen et al., 2018). Zusätzlich wurde die Alpha- und Beta-Diversität der Arten bestimmt. Der Biofilm von Gingivitisprobanden zeigte eine hohe Artenvielfalt und eine geringe Häufigkeit einzelner Gattungen, was mit Daten von gesunden Probanden vergleichbar war. Das Mikrobiom im mäßig entzündetem Parodontium war durch eine verringerte Diversität und eine erhöhte Häufigkeit einzelner Gattungen gekennzeichnet. Bemerkenswert ist, dass der Verlust der Diversität im oralen Mikrobiom zuvor mit Parodontitis in Verbindung gebracht wurde (Ai et al., 2017). Tatsächlich wird die bakterielle Diversität durch die Lebensbedingungen im Mikromilieu der Plaque bestimmt. Bei andauernder Mundhygiene kann sich die bakterielle Plaque von der sauerstoffreichen supragingivalen zur sauerstoffarmen subgingivalen Zone ausdehnen und vertiefen. Hier haben anaerobe Stämme einen Überlebensvorteil und können bakterielle Virulenzfaktoren sezernieren (Popova, Dosseva-Panova and Panov, 2013; Lasserre, Brex and Toma, 2018). Folglich steigt das Risiko eines lokalen pathogenen Ausbruchs im oralen Mikrobiom mit fortschreitender parodontaler Erkrankung (Schroeder, 1997). Unsere Analyse der

Phänotypen bestätigte die abnehmende aerobe grampositive Population zugunsten anaerober gramnegativer Mikroorganismen bei Patienten mit Gingivitis und stärker noch bei Patienten mit Parodontitis. So konnte eine korrekte Zuordnung der Probanden zu den Erkrankungsstadien validiert werden.

5.5 Limitationen

Die Leitlinie zur Klassifikation parodontaler Erkrankungen wurde nach Beginn der vorliegenden Studie verändert. Das derzeitige Klassifikationssystem definiert parodontale Erkrankungen andersartig, führt eine weitere Unterteilung der Klassen ein und ermöglicht eine individualisiertere Bestimmung des Erkrankungsstadiums bezüglich der Parodontitis. Die aktualisierten Begriffe beinhalten zudem auch eine erste Klassifikation periimplantären Erkrankungen (Papapanou *et al.*, 2018). In der vorliegenden Studie entspricht die klinische Untersuchung und Einteilung der Patienten den früheren Empfehlungen des „Classification System for Parodontal Diseases and Conditions“. (Armitage, 1999). Wodurch eine sinnvolle Angleichung an frühere Studien und die Vergleichbarkeit der Ergebnisse innerhalb der Literatur gewährleistet wird. Die erhobenen Mikrobiomdaten sind jedoch eindeutig mit dem Grad der Entzündung assoziiert, der bei den Patienten auch klinisch bewertet wurde. Eine Einschränkung ist, dass die 16S-rRNA-Sequenzierung selbst begrenzt ist, da sie die Gattungsebene zwar genau umfasst, auf Artenebene jedoch ungenau sein könnte (Liu *et al.*, 2021). Beispielsweise haben wir *A. actinomycetemcomitans* und *C. gingivalis* in einem gesunden Mikrobiom nachgewiesen, deren Vorhandensein eher typisch für einen Krankheitszustand ist. Es ist weiterhin zu beachten, dass es – wie in ähnlichen vergleichenden Parodontitisstudien - Unterschiede im Durchschnittsalter der Teilnehmenden zwischen den Gruppen gibt: jüngere Personen in der Gesunden Gruppe und der Gingivitis Gruppe und ältere Personen in der Parodontitisgruppe. Diese Verteilung spiegelt die Prävalenz der Krankheit bei Senioren wider (Jordan and Micheelis, 2016). Darüber hinaus erfassen Zytokine aus dem Speichel und CD+ B-Zellen im Blut nicht vollständig lokale parodontale immunologische Ergebnisse, was Sulkusflüssigkeitsproben und Gingivabiopsien erfordern würde. Daher enthüllen unsere Ergebnisse in erster Linie weiter entfernte, systemische Effekte.

6 Zusammenfassung

Faktoren, die die Anfälligkeit eines Patienten für Parodontitis genau vorhersagen würden, sind schwer zu definieren, obwohl sie klinisch eine große Bedeutung haben. CD5+ B-Zellen sind seit einigen Jahren von besonderem Interesse, da sie im Blut von Patienten mit schwerer Parodontitis erhöht gefunden wurden und mit Knochenschwund korrelieren (Berglundh *et al.*, 2002; Engelman *et al.*, 2015). In diesem Zusammenhang war es das Ziel der vorliegenden Studie, die Rolle von CD5+ B-Zellen und oralem Mikrobiom bei Patienten mit Gingivitis und mittelschwerer Parodontitis zu charakterisieren.

Zu diesem Zweck wurden die Studienkohorten, anhand von klinisch erhobenen Parametern, in Untersuchungsgruppen mit parodontaler Gesundheit, Gingivitis und mittelschwerer Parodontitis eingeteilt. Zusätzlich wurden bei ihnen Blut-, Speichel- und Sulkusflüssigkeitsproben entnommen.

In jeder Gruppe wurden unterschiedliche Populationen von CD5+ B-Zellen bestimmt, die charakteristische Reifestadien repräsentierten. Der Grad der Entzündung wurde durch Zytokinanalyse bewertet. Zusätzlich wurde ein umfangreiches mikrobiologisches Profiling der Probanden mittels 16S-rRNA-Sequenzierung durchgeführt (Mikrobiomanalyse).

Bei der Untersuchung der PBMCs aus dem peripheren Blut zeigten, dass in keiner Untersuchungsgruppe die CD5+ B-Zellen erhöht waren. Dies ist vermutlich dadurch verursacht, dass frühe Stadien der Parodontitis keine ausreichenden systemischen Wirkungen entfalten, um einen Anstieg von CD5+ B-Zellen im zirkulierenden Blut nachzuweisen.

Während im Blut keine Veränderungen der CD5+ B-Zellen bezüglich der analysierten Entwicklungsstadien beobachtet wurden, konnten dafür statistisch signifikante Unterschiede in der oralen IL-8-, IL-17A-Zytokin-Expression und der mikrobiellen Alpha- und Beta-Diversität beobachtet werden.

Insgesamt zeigt die vorliegende Arbeit, dass es nicht möglich ist, anhand der Anzahl und des Anteils von CD5+ B-Zellen im peripheren Blut zwischen parodontaler Gesundheit, Gingivitis und moderater Parodontitis zu unterscheiden. Die Gruppen konnten jedoch anhand ihrer mikrobiellen (16S-rRNA) und immunologischen (Zytokine) Eigenschaften korrekt in Erkrankungsstadien klassifiziert werden. Zukünftige Untersuchungen könnten CD5+ B-Zellfrequenzen in Gingivabiopsien einbeziehen, um die lokale Konzentration der CD5+ B-Zellen im parodontalen Gewebe zu ermitteln und möglicherweise auf diese Weise Unterschiede bezüglich der Zellfrequenz zu ermitteln.

Thesen

1. CD5-positive B-Zellen sind bei moderater Parodontitis nicht mit erhöhtem Knochenabbau assoziiert.
2. Die CD5-positiven B-Zellen, die möglicherweise mit vermehrtem parodontalen Knochenabbau vergesellschaftet sind, lassen sich nicht in ein bestimmtes Differenzierungsstadium klassifizieren.
3. Durch die Mikrobiomanalyse lassen sich die Untersuchungsgruppen einordnen.
4. Die Zytokinexpression spiegelt das lokale Entzündungsgeschehen während der Parodontitis wider.

Literaturverzeichnis

Aas, J. A. *et al.* (2005) 'Defining the normal bacterial flora of the oral cavity', *Journal of Clinical Microbiology*, 43(11), pp. 5721–5732. doi: 10.1128/JCM.43.11.5721-5732.2005.

Abbas, A. K., Murphy, K. M. and Sher, A. (1996) 'Functional diversity of helper T lymphocytes', 383, pp. 787–793.

Abusleme, L. *et al.* (2013) 'The subgingival microbiome in health and periodontitis and its relationship with community biomass and inflammation', *ISME Journal*, 7(5), pp. 1016–1025. doi: 10.1038/ismej.2012.174.

Afar, B., Engel, D. and Clark, E. A. (1992) 'Activated lymphocyte subsets in adult periodontitis'. Seattle, WA, USA: Journal of Periodontal Research, pp. 126–133.

Agematsu, K. *et al.* (2000) 'CD27: a memory B-cell marker', *Immunology Today*, 21(5), pp. 204–206. doi: [https://doi.org/10.1016/S0167-5699\(00\)01605-4](https://doi.org/10.1016/S0167-5699(00)01605-4).

Ai, D. *et al.* (2017) 'Integrated metagenomic data analysis demonstrates that a loss of diversity in oral microbiota is associated with periodontitis', *BMC Genomics*, 18. doi: 10.1186/s12864-016-3254-5.

Akira, S., Uematsu, S. and Takeuchi, O. (2006) 'Pathogen recognition and innate immunity', *Cell*, 124(4), pp. 783–801. doi: 10.1016/j.cell.2006.02.015.

Albandar, J. M., Brunelle, J. A. and Kingman, A. (1999) 'Destructive periodontal disease in adults 30 years of age and older in the United States, 1988-1994.', *Journal of periodontology*. United States, 70(1), pp. 13–29. doi: 10.1902/jop.1999.70.1.13.

Armitage, G. C. (1995) 'Clinical evaluation of periodontal diseases', *Periodontology 2000*, 7(1), pp. 39–53. doi: 10.1111/j.1600-0757.1995.tb00035.x.

Armitage, G. C. (1999) 'Development of a classification system for periodontal diseases and conditions.', *Annals of periodontology / the American Academy of Periodontology*, 4(1), pp. 1–6. doi: 10.1902/annals.1999.4.1.1.

Azman, R. *et al.* (2014) 'Clinical associations between IL-17 family cytokines and periodontitis and potential differential roles for IL-17A and IL-17E in periodontal immunity', *Inflammation Research*, 63(12), pp. 1001–1012. doi: 10.1007/s00011-014-0776-7.

Beck, J. *et al.* (1996) 'Periodontal disease and cardiovascular disease.', *Journal of periodontology*. United States, 67(10 Suppl), pp. 1123–1137. doi: 10.1902/jop.1996.67.10s.1123.

Di Benedetto, A. *et al.* (2013) 'Periodontal disease: Linking the primary inflammation to bone loss', *Clinical and Developmental Immunology*. Hindawi Publishing Corporation. doi: 10.1155/2013/503754.

Berberi, E. F., Cockerill, F. R. 3rd and Steckelberg, J. M. (1997) 'Infective endocarditis due to unusual or fastidious microorganisms.', *Mayo Clinic proceedings*. England, 72(6), pp. 532–542. doi: 10.4065/72.6.532.

- Berglundh, T. *et al.* (2001) 'Some local and systemic immunological features of prepubertal periodontitis', *Journal of Clinical Periodontology*, 28(2), pp. 113–120. doi: 10.1034/j.1600-051x.2001.028002113.x.
- Berglundh, T. *et al.* (2002) 'The presence of local and circulating autoreactive B cells in patients with advanced periodontitis', *Journal of Clinical Periodontology*, 29(4), pp. 281–286. doi: 10.1034/j.1600-051X.2002.290402.x.
- Blair, P. A. *et al.* (2010) 'CD19+CD24hiCD38hi B Cells Exhibit Regulatory Capacity in Healthy Individuals but Are Functionally Impaired in Systemic Lupus Erythematosus Patients', *Immunity*, 32(1), pp. 129–140. doi: 10.1016/j.immuni.2009.11.009.
- Blobe GC, Schiemann WP, L. H. (2002) 'Role of transforming growth factor β in human disease', *The New England Journal of Medicine*, 342, pp. 1350–58.
- Boehm, U. *et al.* (1997) 'Cellular responses to interferon-gamma.', *Annual review of immunology*. United States, 15, pp. 749–795. doi: 10.1146/annurev.immunol.15.1.749.
- Bonecchi, R. *et al.* (2009) 'Chemokines and chemokine receptors: an overview.', *Frontiers in bioscience (Landmark edition)*. Singapore, 14(2), pp. 540–551. doi: 10.2741/3261.
- Bui, F. Q. *et al.* (2019) 'Association between periodontal pathogens and systemic disease', *Biomedical Journal*. Elsevier Ltd, 42(1), pp. 27–35. doi: 10.1016/j.bj.2018.12.001.
- Chen, W. P. *et al.* (2018) 'Composition Analysis and Feature Selection of the Oral Microbiota Associated with Periodontal Disease', *BioMed Research International*, 2018. doi: 10.1155/2018/3130607.
- Cheng, R. *et al.* (2020) 'Interleukin-1 β is a potential therapeutic target for periodontitis: a narrative review', *International Journal of Oral Science*. doi: 10.1038/s41368-019-0068-8.
- Chunfang, G., Ling, W. and Xiaoxia, L. (2013) 'IL-17 family: cytokines, receptors and signaling', *Cytokine*, 64(2), pp. 477–485. doi: 10.1016/j.cyto.2013.07.022.IL-17.
- Colotta, F. *et al.* (1992) 'Expression of a monocyte chemotactic cytokine by human mononuclear phagocytes.', *The Journal of Immunology*, 148(3), pp. 760–765. doi: 10.4049/jimmunol.148.3.760.
- Daly, C. G., Clancy, R. L. and Cripps, A. W. (1983) 'Lymphocytes from chronically inflamed human gingiva. I. Cell recovery and characterization in vitro.', *Journal of periodontal research*. United States, 18(1), pp. 67–74. doi: 10.1111/j.1600-0765.1983.tb00336.x.
- Deng, J. *et al.* (2016) 'B1a cells play a pathogenic role in the development of autoimmune arthritis', *Oncotarget*, 7(15), pp. 19299–19311. doi: 10.18632/oncotarget.8244.
- Ding, C. *et al.* (2014) 'TNF- α gene promoter polymorphisms contribute to periodontitis susceptibility: Evidence from 46 studies', *Journal of Clinical Periodontology*, 41(8), pp. 748–759. doi: 10.1111/jcpe.12279.
- Donati, M. *et al.* (2009) 'B-1a cells and plasma cells in periodontitis lesions', *Journal of Periodontal*

Research, 44(5), pp. 683–688. doi: 10.1111/j.1600-0765.2008.01178.x.

Duan, B. and Morel, L. (2006) 'Role of B-1a cells in autoimmunity', *Autoimmunity Reviews*, 5(6), pp. 403–408. doi: 10.1016/j.autrev.2005.10.007.

Ebbers, M. *et al.* (2018) 'Interplay between *P. gingivalis*, *F. nucleatum* and *A. actinomycetemcomitans* in murine alveolar bone loss, arthritis onset and progression', *Scientific Reports*, 8(1), pp. 1–11. doi: 10.1038/s41598-018-33129-z.

Ekkens, M. J. *et al.* (2007) 'Th1 and Th2 cells help CD8 T-cell responses', *Infection and Immunity*, 75(5), pp. 2291–2296. doi: 10.1128/IAI.01328-06.

Engelmann, R. *et al.* (2015) 'Bone resorption correlates with the frequency of CD⁵⁺ B cells in the blood of patients with rheumatoid arthritis', *Rheumatology (United Kingdom)*, 54(3), pp. 545–553. doi: 10.1093/rheumatology/keu351.

Fecteau, J. F., Côté, G. and Neron, S. (2006) 'A new memory CD27-IgG⁺ B cell population in peripheral blood expressing VH genes with low frequency of somatic mutation.', *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*. United States, 177(6), pp. 3728–3736. doi: 10.4049/jimmunol.177.6.3728.

Fenno, J. C. and McBride, B. C. (1998) 'Virulence factors of oral treponemes', *Anaerobe*, 4(1), pp. 1–17. doi: 10.1006/anae.1997.0131.

Finkelman, F. D. *et al.* (1991) 'Regulation by interferon α of immunoglobulin isotype selection and lymphokine production in mice', *Journal of Experimental Medicine*, 174(5), pp. 1179–1188. doi: 10.1084/jem.174.5.1179.

Freedman, H. L., Listgarten, M. A. and Taichman, N. S. (1968) 'Electron microscopic features of chronically inflamed human gingiva', *Journal of Periodontal Research*, 3(4), pp. 313–327. doi: 10.1111/j.1600-0765.1968.tb01937.x.

Genco, R. J. and Borgnakke, W. S. (2013) 'Risk factors for periodontal disease', *Periodontology 2000*, 62(1), pp. 59–94. doi: 10.1111/j.1600-0757.2012.00457.x.

Graf, R. *et al.* (2019) 'BCR-dependent lineage plasticity in mature B cells', *Science*, 363(6428), pp. 748–753. doi: 10.1126/science.aau8475.

Griffiths, G. S. (2003) 'Formation, collection and significance of gingival crevice fluid', *Periodontology 2000*, 31(11), pp. 32–42. doi: 10.1034/j.1600-0757.2003.03103.x.

Gunnarsson, I. *et al.* (2000) 'Development of lupus-related side-effects in patients with early RA during sulphasalazine treatment-the role of IL-10 and HLA.', *Rheumatology (Oxford, England)*. England, 39(8), pp. 886–893. doi: 10.1093/rheumatology/39.8.886.

Gupta, G. (2012) 'Gingival crevicular fluid as a periodontal diagnostic indicator--I: Host derived enzymes and tissue breakdown products.', *Journal of medicine and life*, pp. 390–397. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3539845/pdf/JMedLife-05-390.pdf> (Accessed: 17 January 2021).

- Gupta, M., Chaturvedi, R. and Jain, A. (2013) 'Role of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) as an immune-diagnostic biomarker in the pathogenesis of chronic periodontal disease', *Cytokine*, 61(3), pp. 892–897. doi: <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2012.12.012>.
- Hasan, A. and Palmer, R. M. (2014) 'A clinical guide to periodontology: Pathology of periodontal disease', *British Dental Journal*. Nature Publishing Group, 216(8), pp. 457–461. doi: 10.1038/sj.bdj.2014.299.
- Herbert, B. A., Novince, C. M. and Kirkwood, K. L. (2016) 'Aggregatibacter actinomycetemcomitans, a potent immunoregulator of the periodontal host defense system and alveolar bone homeostasis.', *Molecular oral microbiology*. NIH Public Access, 31(3), pp. 207–27. doi: 10.1111/omi.12119.
- Herbert Wolf, E. und K. R. (2004) *Farbatlant der Zahnmedizin 1*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag. doi: 10.1055/b-002-44923.
- Holt, S. C. ; *et al.* (1999) 'Virulence factors of Porphyromonas gingivalis Title', *Periodontology 2000*, 20, pp. 168–238.
- Irwindi, R. A. *et al.* (2022) 'Circulating inflammatory cell profiling and periodontitis: A systematic review and meta-analysis', *Journal of Leukocyte Biology*, (January 2021), pp. 1069–1096. doi: 10.1002/JLB.5RU1021-524R.
- Jordan, A. R. and Micheelis, W. (2016) 'Fünfte Deutsche Mundgesundheitsstudie (DMS V)', *Dtsch Zahnärzteverlag DÄV GmbH*, (Dms V), p. 617.
- Kasagi, S. and Chen, W. (2013) 'TGF-beta1 on osteoimmunology and the bone component cells', *Cell and Bioscience*. BioMed Central, p. 4. doi: 10.1186/2045-3701-3-4.
- Kaufmann, S. H. E. (2009) 'T-Zellen', pp. 76–90. doi: 10.1007/978-3-540-46362-7_13.
- Kaur, S. *et al.* (2020) 'A panoramic review of IL-6: Structure, pathophysiological roles and inhibitors.', *Bioorganic & medicinal chemistry*. England, 28(5), p. 115327. doi: 10.1016/j.bmc.2020.115327.
- Kinane, D. F. (2001) 'Causation and pathogenesis of periodontal disease', *Periodontology 2000*, 25(1), pp. 8–20. doi: 10.1034/j.1600-0757.2001.22250102.x.
- Kinney, J. S. *et al.* (2014) 'Crevicular fluid biomarkers and periodontal disease progression', *Journal of Clinical Periodontology*, 41(2), pp. 113–120. doi: 10.1111/jcpe.12194.
- Kirst, M. E. *et al.* (2015) 'Dysbiosis and alterations in predicted functions of the subgingival microbiome in chronic periodontitis', *Applied and Environmental Microbiology*, 81(2), pp. 783–793. doi: 10.1128/AEM.02712-14.
- Klein, U., Rajewsky, K. and Küppers, R. (1998) 'Human immunoglobulin (Ig)M+IgD+ peripheral blood B cells expressing the CD27 cell surface antigen carry somatically mutated variable region genes: CD27 as a general marker for somatically mutated (memory) B cells.', *The Journal of experimental medicine*, 188(9), pp. 1679–1689. doi: 10.1084/jem.188.9.1679.

- Könönen, E., Gursoy, M. and Gursoy, U. K. (2019) 'Periodontitis: A multifaceted disease of tooth-supporting tissues', *Journal of Clinical Medicine*, 8(8). doi: 10.3390/jcm8081135.
- Korn, T. *et al.* (2009) 'IL-17 and Th17 cells', *Annual Review of Immunology*, 27, pp. 485–517. doi: 10.1146/annurev.immunol.021908.132710.
- Kriebel, K. *et al.* (2013) 'Anaerobic co-culture of mesenchymal stem cells and anaerobic pathogens - A new in vitro model system', *PLoS ONE*, 8(11). doi: 10.1371/journal.pone.0078226.
- Lalla, E. *et al.* (2007) 'Diabetes mellitus promotes periodontal destruction in children', *Journal of Clinical Periodontology*, 34(4), pp. 294–298. doi: 10.1111/j.1600-051X.2007.01054.x.
- Lamster, I. B. and Ahlo, J. K. (2007) 'Analysis of gingival crevicular fluid as applied to the diagnosis of oral and systemic diseases', *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1098, pp. 216–229. doi: 10.1196/annals.1384.027.
- Langefeld, T. W. *et al.* (2008) 'Das Immunsystem (Teil 1 - 7) - Teil 1: Das angeborene Immunsystem', *Anesthesiologie und Intensivmedizin*, 49(11), pp. 556–564.
- Lasserre, F. J., Brex, M. and Toma, S. (2018) 'Oral microbes, biofilms and their role in periodontal and peri-implant diseases', *Materials*, 11(10), pp. 1–17. doi: 10.3390/ma11101802.
- Leandro, M. J. *et al.* (2006) 'Reconstitution of peripheral blood B cells after depletion with rituximab in patients with rheumatoid arthritis', *Arthritis and Rheumatism*, 54(2), pp. 613–620. doi: 10.1002/art.21617.
- Lee, E. Y., Lee, Z. H. and Song, Y. W. (2009) 'CXCL10 and autoimmune diseases', *Autoimmunity Reviews*. Elsevier, 8(5), pp. 379–383. doi: 10.1016/J.AUTREV.2008.12.002.
- Liu, Y. X. *et al.* (2021) 'A practical guide to amplicon and metagenomic analysis of microbiome data', *Protein and Cell*. Higher Education Press, 12(5), pp. 315–330. doi: 10.1007/s13238-020-00724-8.
- Loe, H., Theilade, E. and Jensen, S. B. (1965) 'EXPERIMENTAL GINGIVITIS IN MAN.', *The Journal of Periodontology*. American Academy of Periodontology, 36(3), pp. 177–187. doi: 10.1902/jop.1965.36.3.177.
- Madianos, P. N., Bobetsis, Y. A. and Kinane, D. F. (2005) 'Generation of inflammatory stimuli: How bacteria set up inflammatory responses in the gingiva', *Journal of Clinical Periodontology*, 32(SUPPL. 6), pp. 57–71. doi: 10.1111/j.1600-051X.2005.00821.x.
- Martínez-García, M. and Hernández-Lemus, E. (2021) 'Periodontal Inflammation and Systemic Diseases: An Overview', *Frontiers in Physiology*, 12(October), pp. 1–26. doi: 10.3389/fphys.2021.709438.
- Minami, Y. *et al.* (1993) 'The IL-2 receptor complex: its structure, function, and target genes.', *Annual review of immunology*. United States, 11, pp. 245–268. doi: 10.1146/annurev.iy.11.040193.001333.
- Mlachkova, A., Popova, C. and Doseva, V. (2020) 'Presence of IL-8 Gene Polymorphism and IL-8

Serum Levels in Patients with Chronic Periodontitis - Literature Review', *Folia medica*, 62(2), pp. 253–257. doi: 10.3897/folmed.62.e47722.

Müller-Glauser, W. and Schroeder, H. E. (1982) 'The pocket epithelium: a light- and electronmicroscopic study.', *Journal of periodontology*. J Periodontol, 53(3), pp. 133–44. doi: 10.1902/jop.1982.53.3.133.

Muñoz-Carrillo, J. L. *et al.* (2019) 'Pathogenesis of Periodontal Disease', in Yussif, N. M. A. (ed.) *Periodontal Disease*. Rijeka: IntechOpen. doi: 10.5772/intechopen.86548.

Murphy, K. and Weaver, C. (2018) *Die Entwicklung der B- und T-Lymphocyten, Janeway Immunologie*. Springer-Verlag GmbH. doi: 10.1007/978-3-662-56004-4.

Murray, P. A., Kern, D. G. and Winkler, J. R. (1988) 'Identification of a galactose-binding lectin on *Fusobacterium nucleatum* FN-2.', *Infection and immunity*, 56(5), pp. 1314–1319. doi: 10.1128/iai.56.5.1314-1319.1988.

Mysak, J. *et al.* (2014) 'Porphyromonas gingivalis: Major periodontopathic pathogen overview', *Journal of Immunology Research*, 2014. doi: 10.1155/2014/476068.

Nelms, K. *et al.* (1999) 'The IL-4 receptor: Signaling mechanisms and biologic functions', *Annual Review of Immunology*, 17, pp. 701–738. doi: 10.1146/annurev.immunol.17.1.701.

Noack, M., Ndongo-Thiam, N. and Miossec, P. (2016) 'Interaction among activated lymphocytes and mesenchymal cells through podoplanin is critical for a high IL-17 secretion', *Arthritis Research & Therapy*, 18(1), p. 148. doi: 10.1186/s13075-016-1046-6.

Nutt, S. L. *et al.* (2015) 'The generation of antibody-secreting plasma cells', *Nature Reviews Immunology*. Nature Publishing Group, 15(3), pp. 160–171. doi: 10.1038/nri3795.

O'shea, J. J. and Paul, W. E. (2002) 'Regulation of T H 1 differentiation-controlling the controllers'. doi: 10.1126/science.1070884.

Offenbacher, S. (1996) 'Periodontal Diseases : Pathogenesis', 1(1), pp. 821–878.

Offenbacher, S. *et al.* (1998) 'Potential pathogenic mechanisms of periodontitis associated pregnancy complications.', *Annals of periodontology*. United States, 3(1), pp. 233–250. doi: 10.1902/annals.1998.3.1.233.

Ohlrich, E. J., Cullinan, M. P. and Seymour, G. J. (2009) 'The immunopathogenesis of periodontal disease', *Australian Dental Journal*, pp. S2–S10. doi: 10.1111/j.1834-7819.2009.01139.x.

Ohyama, H. *et al.* (2009) 'The involvement of IL-23 and the Th 17 pathway in periodontitis', *Journal of Dental Research*, 88(7), pp. 633–638. doi: 10.1177/0022034509339889.

Onishi, R. M. and Gaffen, S. L. (2010) 'Interleukin-17 and its target genes: Mechanisms of interleukin-17 function in disease', *Immunology*, 129(3), pp. 311–321. doi: 10.1111/j.1365-2567.2009.03240.x.

Oppenheim, F. G. (1970) 'Preliminary observations on the presence and origin of serum albumin in human saliva.', *Helvetica odontologica acta*, 14(1), pp. 10–17.

Oppenheim, J. J. (2001) 'Cytokines: Past, present, and future', *International Journal of Hematology*, 74(1), pp. 3–8. doi: 10.1007/BF02982543.

Ouyang, W. *et al.* (2011) 'Regulation and functions of the IL-10 family of cytokines in inflammation and disease', *Annual Review of Immunology*, 29, pp. 71–109. doi: 10.1146/annurev-immunol-031210-101312.

Page, R. C. (1986) 'Gingivitis', *J Clin Periodontol*, 13, pp. 345–355.

Papapanou, P. N. *et al.* (2018) 'Periodontitis: Consensus report of workgroup 2 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions', *Journal of periodontology*, 89(March), pp. S173–S182. doi: 10.1002/JPER.17-0721.

Pollard, A. J. and Bijker, E. M. (2021) 'A guide to vaccinology: from basic principles to new developments', *Nature Reviews Immunology*. Springer US, 21(2), pp. 83–100. doi: 10.1038/s41577-020-00479-7.

Popova, C., Dosseva-Panova, V. and Panov, V. (2013) 'Microbiology of periodontal diseases. A review', *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, 27(3), pp. 3754–3759. doi: 10.5504/BBEQ.2013.0027.

Preshaw, P. M. and Taylor, J. J. (2011) 'How has research into cytokine interactions and their role in driving immune responses impacted our understanding of periodontitis?', in *Journal of Clinical Periodontology*, pp. 60–84. doi: 10.1111/j.1600-051X.2010.01671.x.

Ramadan, D. E. *et al.* (2020) 'Cytokines and Chemokines in Periodontitis', *European Journal of Dentistry*, 14(3), pp. 483–495. doi: 10.1055/s-0040-1712718.

Rangbulla, V. *et al.* (2017) 'Salivary IgA, Interleukin-1 β and MMP-8 as Salivary Biomarkers in Chronic Periodontitis Patients', *The Chinese Journal of Dental Research*, pp. 43–51.

Rosen, D. M. *et al.* (1988) 'Transforming growth factor-beta modulates the expression of osteoblast and chondroblast phenotypes in vitro', *Journal of Cellular Physiology*, 134(3), pp. 337–346. doi: 10.1002/jcp.1041340304.

Sabet, M. *et al.* (2003) 'The surface (S-) layer is a virulence factor of *Bacteroides forsythus*.', *Microbiology (Reading, England)*. England, 149(Pt 12), pp. 3617–3627. doi: 10.1099/mic.0.26535-0.

Sagaert, X. and De Wolf-Peeters, C. (2003) 'Classification of B-cells according to their differentiation status, their micro-anatomical localisation and their developmental lineage', *Immunology Letters*, 90(2–3), pp. 179–186. doi: 10.1016/j.imlet.2003.09.007.

Sanz, I. *et al.* (2008) 'Phenotypic and functional heterogeneity of human memory B cells.', *Seminars in immunology*, 20(1), pp. 67–82. doi: 10.1016/j.smim.2007.12.006.

Schroeder, H. E. (1997) *Pathobiologie oraler Strukturen Zähne, Pulpa, Parodont*. 3. überarb. S. Karger. Available at: <http://www.karger.com/?ISBN=978-3-8055-6286-7>.

Sela, M. N. (2001) 'Role of *Treponema denticola* in periodontal diseases', *Critical Reviews in Oral*

Biology and Medicine, 12(5), pp. 399–413. doi: 10.1177/10454411010120050301.

Sims, G. P. *et al.* (2005) 'Identification and characterization of circulating human transitional B cells.', *Blood*, 105(11), pp. 4390–4398. doi: 10.1182/blood-2004-11-4284.

Socransky, S. S. *et al.* (1998) 'Microbial complexes in subgingival plaque', *Journal of Clinical Periodontology*, 25(2), pp. 134–144. doi: 10.1111/j.1600-051X.1998.tb02419.x.

Sugawara, M. *et al.* (1992) 'Detection of, and anti-collagen antibody produced by, CD5-positive B cells in inflamed gingival tissues', *Journal of Periodontal Research*. *Journal of Periodontal Research*, 27(5), pp. 489–498. doi: 10.1111/j.1600-0765.1992.tb01822.x.

Takahashi, K. *et al.* (2005) 'The potential role of interleukin-17 in the immunopathology of periodontal disease', *Journal of Clinical Periodontology*, 32(4), pp. 369–374. doi: 10.1111/j.1600-051X.2005.00676.x.

Tanner, A. C. R. and Izard, J. (2006) 'Tannerella forsythia, a periodontal pathogen entering the genomic era', *Periodontology 2000*, 42(1), pp. 88–113. doi: 10.1111/j.1600-0757.2006.00184.x.

Tatakis, D. N. and Kumar, P. S. (2005) 'Etiology and pathogenesis of periodontal diseases', *Dental Clinics of North America*, 49(3 SPEC. ISS.), pp. 491–516. doi: 10.1016/j.cden.2005.03.001.

Tonetti, M. S. (1997) 'Molecular factors associated with compartmentalization of gingival immune responses and transepithelial neutrophil migration', *Journal of Periodontal Research*, pp. 104–109. doi: 10.1111/j.1600-0765.1997.tb01389.x.

Tretter, T. and Lorenz, H. M. (2010) 'Regulatorische B-Zellen und ihre Funktion im Erhalt der peripheren Toleranz', *Zeitschrift für Rheumatologie*, 69(9), pp. 813–817. doi: 10.1007/s00393-010-0713-2.

Trinchieri, G. (2003) 'Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity', *Nature Reviews Immunology*, 3(2), pp. 133–146. doi: 10.1038/nri1001.

Trindade, F. *et al.* (2014) 'Uncovering the molecular networks in periodontitis', *Proteomics - Clinical Applications*, pp. 748–761. doi: 10.1002/prca.201400028.

Tyrrell-Price, J., Lydyard, P. M. and Isenberg, D. A. (2001) 'The effect of interleukin-10 and of interleukin-12 on the in vitro production of anti-double-stranded DNA antibodies from patients with systemic lupus erythematosus.', *Clinical and experimental immunology*, 124(1), pp. 118–125. doi: 10.1046/j.1365-2249.2001.01466.x.

Vernal, R. *et al.* (2005) 'Levels of interleukin-17 in gingival crevicular fluid and in supernatants of cellular cultures of gingival tissue from patients with chronic periodontitis', *Journal of Clinical Periodontology*, 32(4), pp. 383–389. doi: 10.1111/j.1600-051X.2005.00684.x.

Vitale, G. and Mion, F. (2014) *Regulatory B Cells: Methods and Protocols*. New York: Springer-Verlag GmbH.

Wang, J. (2020) *B Cells in Immunity and Tolerance*. Edited by J.-Y. Wang. Singapore: Springer. doi:

<https://doi.org/10.1007/978-981-15-3532-1>.

Wang, P.-L. and Ohura, K. (2002) 'Porphyromonas gingivalis Lipopolysaccharide Signaling in Gingival Fibroblasts—CD14 and Toll-like Receptors', *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*. SAGE Publications Inc, 13(2), pp. 132–142. doi: 10.1177/154411130201300204.

Wang, R. *et al.* (2024) 'The interaction of innate immune and adaptive immune system', *MedComm*, 5(10). doi: 10.1002/mco2.714.

Williams, D. M. *et al.* (1997) *Pathologie der parodontalen Erkrankungen*. München: Hanser. Available at: <https://d-nb.info/949044563/04> (Accessed: 22 January 2021).

Ylöstalo, P. *et al.* (2004) 'The relation of tobacco smoking to tooth loss among young adults', *European Journal of Oral Sciences*, 112(2), pp. 121–126. doi: 10.1111/j.0909-8836.2004.00111.x.

Yoshimura, A. *et al.* (1997) 'Secretion of IL-1 β , TNF- α , IL-8 and IL-1ra by human polymorphonuclear leukocytes in response to lipopolysaccharides from periodontopathic bacteria', *Journal of Periodontal Research*, pp. 279–286. doi: 10.1111/j.1600-0765.1997.tb00535.x.

Young, H. A. and Hardy, K. J. (1995) 'Role of interferon-gamma in immune cell regulation.', *Journal of leukocyte biology*. England, 58(4), pp. 373–381.

Yucel-Lindberg, T. and Båge, T. (2013) 'Inflammatory mediators in the pathogenesis of periodontitis.', *Expert reviews in molecular medicine*, 15, pp. 1–22. doi: 10.1017/erm.2013.8.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Prozentsätze von den Leukozyten und Lymphozyten anhand der Probe PA 26.....	14
Abbildung 2: Isolation der PBMCs	14
Abbildung 3: Stammbaum der B-Zell-Populationen. Einteilung anhand ihrer Oberflächenmarker am FACS am Beispiel der Probe PA 26.	17
Abbildung 4: Quantitative Bewertung des Alters [Jahre].	22
Abbildung 5: Quantitative Bewertung der Sondierungstiefe [mm].	23
Abbildung 6: Quantitative Bewertung des klinischen Attachmentverlustes [mm].	24
Abbildung 7: Quantitative Bewertung des modifizierten Sulkus-Blutungs-Indexes [%].	25
Abbildung 8: Quantitative Bewertung des Approximalen-Plaque-Indexes [%].	26
Abbildung 9: Analyse der B-Zellen.....	27
Abbildung 10: Analyse der CD5+ B-Zell-Untergruppen nach ihrem Differenzierungsstadium.	28
Abbildung 11: Speichel-Zytokin-Profil in den Studiengruppen. Die Konzentration [pg/mL] von Zytokinen im Speichel wurde mit dem LEGENDPlex Human Essential Immune Response Panel bestimmt:.....	30
Abbildung 12: Speichel-Zytokin-Profil in den Studiengruppen.....	30
Abbildung 13: Speichel-Zytokin-Profil in den Studiengruppen.....	31
Abbildung 14: Punktediagramm der durchschnittlichen Häufigkeit von Bakterienstämmen in den Studiengruppen.....	32
Abbildung 15: Punktediagramm der durchschnittlichen Häufigkeit von Bakteriengattungen in den Studiengruppen.....	33
Abbildung 16: Punktediagramm der durchschnittlichen Häufigkeit von Bakterienspezies in den Studiengruppen.....	34
Abbildung 17: Analyse von Alpha-Diversität nach Gattungen in Mikrobiomproben, die aus der gingivalen Sulkusflüssigkeit der Patienten entnommen wurden.	35
Abbildung 18: Analyse von Beta-Diversität nach Gattungen in Mikrobiomproben, die aus der gingivalen Sulkusflüssigkeit der Patienten entnommen wurden.	36
Abbildung 19: Analyse der Phänotypen nach Gattungen in Mikrobiomproben, die aus der gingivalen Sulkusflüssigkeit der Patienten gewonnen wurden.....	37
Abbildung 20: Differentialhäufigkeitsanalyse nach Gattungen in Mikrobiomproben, die aus der gingivalen Sulkusflüssigkeit der Patienten gewonnen wurden. Unterschiedliche Häufigkeit nach Gattungen.	39

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Oberflächenmarker-Antikörperlösungen und deren Volumina [μL].....	16
Tabelle 2: Verdünnungsreihe für den Standard mit seiner finalen Konzentration C7-C0 [pg/mL].....	20
Tabelle 3: Menge [%] peripherer Blutlymphozyten, die unterschiedliche Zelloberflächenmarker exprimieren, die verschiedenen B-Zellen und ihren Entwicklungsstadien entsprechend zugewiesen sind, verglichen zwischen 3 Studiengruppen.	29

Abkürzungsverzeichnis

API	Approximaler-Plaque-Index
Abb.	Abbildung
C	Celsius
CAL	clinical attachment level
CCL	CC Chemokin Ligand
CD	Clusters of Differentiation (Unterscheidungsgruppen)
CTX	carboxyterminales Telozeptid
CXCL	C-X-C modified Chemokine Ligand
DMSO	Dimethylsulfoxid
DPBS	Dulbeccos phosphatgepufferte Kochsalzlösung
EDTA	Ethylendiamintetraacetat acid
FACS	fluorescence-activated cell sorting, Durchflusszytometrie
FcR-Block	Fragment crystallizable Receptor-Blocking Agent
FITC	Fluorescein Isothiocyanat
FKS	fetales Kälber Serum
GSF	gingival sulcus fluid
h	hour(s), Stunde(n)
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
LPS	Lipopolysaccharide
LTA	Lipoteichonsäure
MACS	Magnetic Activated Cell Sorting
MCP	Monozyten-Chemo-Attractant Protein
MHC	Major Histocompatibility Complex
mL	Milliliter
MMP	Matrixmetalloproteinasen
mSBI	modifizierter Sulkus-Blutungs-Index
NK	natürliche Killerzellen
NO	Stickstoffmonoxid
PBMC	peripheral blood mononuclear cell(s), Mononukleare Zelle(n) aus peripherem Blut
PBS	phosphate buffered saline, phosphatgepufferte Salzlösung
PGE	Prostaglandin
PMN	polymorphkernigen neutrophile Granulozyten
RA	Rheumatische Arthritis
RANKL	Receptor Activator of NF- κ B Ligand
RT	Raumtemperatur
SD	standard deviation, Standardabweichung

SLE	systemischer Lupus erythematodes
ST	Sondierungstiefe
Tab.	Tabelle
TGF	transforming growth factor
TIMP	Tissue inhibitor of MMP
TNF	Tumornekrosefaktor
V	Volumen
µL	Mikroliter

Danksagungen

Ich möchte diesen Abschnitt der Arbeit dafür nutzen, Allen zu danken, die zur Fertigstellung dieses Projekts beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt meinem Betreuer Prof. Hermann Lang, der mir nicht nur das Thema, sondern auch die Unterstützung und Ermutigung gegeben hat diese Arbeit abzuschließen.

Die Anfänge dieser Arbeit hat Dr. med. dent. Anne Köntges sehr gefördert. Ich möchte mich für die Entwicklung, Inspiration, Hilfestellung und Einführung in die Doktorarbeit bedanken. Mein besonderer Dank gilt auch Dr. rer. nat. Robby Engelmann für die Entwicklung dieses Projekts, die Einführung in die FACS-Analyse und Hilfe bei der Auswertung der B-Zell-Daten.

Die späteren Hilfestellungen und Unterstützung im Labor bei der Zytokinanalyse zu dieser Arbeit hat Dr. rer. hum. Praveen Vasudevan gegeben. Dafür möchte ich mich sehr bedanken.

Bedanken möchte ich mich auch bei Prof. Brigitte Müller-Hilke. Dafür, dass ich in Ihrem Labor die Probenanalysen durchführen konnte, und sie mich mit Rat und Zuspruch unterstützt hat. Zudem möchte ich mich bei M.Sc. Wendy Bergmann und Michael Müller bei der Unterstützung am FACS bedanken.

Außerdem möchte ich Prof. Bernd Kreikemeyer und Dr. rer. nat. Israel Barrantes danken, welche mir in Zoommeetings Einblicke und Verständnis in die Themen der Mikrobiologie und Statistik geben konnten. Ferner möchte ich mich bei Jana Bull bedanken, welche die Mikrobiomanalyse durchgeführt hat.

Danke an Prof. Bernhard Frerich und seine Mitarbeiter, welche die Blutentnahme an den Studienteilnehmern durchgeführt haben.

Bei der DAMP Stiftung (2018-04) möchte ich mich für die Finanzierung dieser Arbeit bedanken.

Ein besonders großer Dank geht an Hardy Harloff, welcher mich sehr bei der Rekrutierung und Untersuchung von Studienteilnehmern und im Labor unterstützt hat.

Zudem möchte ich mich sehr bei Oleksandra Chabanovska bedanken. Welche mich bei der inhaltlichen Ausarbeitung der Publikation unterstützt, diese Arbeit sorgfältig gelesen und wertvolle Rückmeldungen gegeben hat. Ihre motivierenden Worte und ihre fachliche Begleitung haben mir sehr geholfen.

Von Herzen möchte ich mich auch bei meiner Familie, insbesondere meinen vier Geschwistern und meinem Freund bedanken. Ohne eure Unterstützung, Geduld und Ermutigung wäre diese Arbeit in dieser Form nicht möglich gewesen.

Ebenso danke ich meinen Freund:innen, die mich in stressigen Phasen aufgefangen, motiviert und darin bestärkt haben, trotz einer Vollzeit- Arbeitsstelle nicht den Mut zu verlieren und diese Arbeit fertig zu stellen.

Abschließend möchte ich einen aufrichtigen Dank an alle Patient:innen aussprechen, die bereit waren, an der Studie teilzunehmen. Durch ihre Offenheit und Mitwirkung wurde diese Forschung überhaupt erst möglich. Ich schätze ihr Vertrauen und ihre Bereitschaft, einen Beitrag zur wissenschaftlichen Arbeit zu leisten, sehr.

Selbständigkeitserklärung

Ich erkläre, dass ich die eingereichte Dissertation selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und den benutzten Werken wörtlich und inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Hamburg, den

Elisabeth Clara Gottschalk