

Aus der Klinik mit Schwerpunkt
Rheumatologie und Klinische Immunologie- Campus Mitte
in Zusammenarbeit mit der
Abteilung für Parodontologie und Synoptische Zahnmedizin
der Medizinischen Fakultät Charité- Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Einfluss von *Porphyromonas gingivalis* auf primäre humane
Chondrozyten, *in vitro***

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité- Universitätsmedizin Berlin

von

Herrn Eric Röhner
aus Berlin

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. F. Buttgereit
2. Prof. Dr. med. B. Manger
3. Prof. Dr. med. T. Kocher

Datum der Promotion: 27.03.2009

In Liebe und Dankbarkeit meiner Familie gewidmet

Ziel der Arbeit

Die Bedeutung von parodontalpathogenen Bakterien, wie *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*), in der Pathogenese der Rheumatoiden Arthritis (RA) ist bisher nicht geklärt. Die vorliegende *in vitro* Arbeit wurde in Kooperation mit der Zahnmedizin durchgeführt, um nach einem möglichen Zusammenhang zwischen einer Parodontitis und einer RA zu suchen. In dieser Studie wurden die Adhäsion und Invasion von *P. gingivalis* in humane Chondrozyten sowie die daraus resultierenden Veränderungen auf den Zellzyklus, die Zellapoptose sowie -nekrose von infizierten Chondrozyten untersucht.

Es ist bereits bekannt, dass es eine enge Assoziation zwischen der Parodontitis und kardiovaskulären Erkrankungen gibt [Beck et al. 1996; Patel et al. 1998]. In weiteren Studien wurde eine 13%-ige Assoziation zwischen der RA und der Parodontitis durch die Mundhygiene erklärt [Pischon et al. 2008]. Sowohl die Parodontitis als auch die RA sind durch den Verlust von knöchernen und bindegewebigen Strukturen gekennzeichnet [Snyderman und McCarty 1982]. Einer der Schlüsselkeime bei der Entstehung einer Parodontitis ist *P. gingivalis*, ein orales, gramnegatives, anaerobes Stäbchen. Ein möglicher Anhaltspunkt für eine systemische Ausbreitung von oralen Bakterien konnte bereits durch vergangene Studien erkannt werden. Anders als bei Arthrose-Patienten, konnten bei RA-Patienten im Blut und in der Synovialflüssigkeit Antikörper (AK) gegen orale Bakterien nachgewiesen werden [Yoshida et al. 2001]. Basierend auf diesen Kenntnissen wurden in dieser Arbeit erste Versuche durchgeführt, um den Einfluss von oralen Bakterien auf humane Chondrozyten zu untersuchen, welcher einen möglichen Pathomechanismus bei Entstehung der RA darstellen könnte. Humane Chondrozyten wurden aus Kniegelenken isoliert und als Monolayer kultiviert. Anschließend wurden die Chondrozyten mit *P. gingivalis* infiziert. Die Ziele dieser Arbeit waren, mittels Scanning-Elektronenmikroskopie (SEM) die Lagebeziehung von *P. gingivalis* zu humanen Chondrozyten zu untersuchen. Eine mögliche Invasion des Keims in humane Chondrozyten wurde mittels Invasionsassays und konfokaler Lasermikroskopie (KLM) dargestellt. Zellzyklusveränderungen der infizierten Chondrozyten wurden mittels Durchflusszytometrie (FACS) analysiert. Die Apoptose wurde mittels TUNEL-Assays und Caspase 3-Western-Blot-Analyse dargestellt und die Zellnekrose wurde mittels Bestimmung der Laktatdehydrogenase (LDH)-Konzentration untersucht.

Inhaltsverzeichnis

Ziel der Arbeit

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen

1 Einleitung.....	10
1.1 Die Rheumatoide Arthritis.....	10
1.2 Die Rheumatoide Arthritis auf zellulärer Ebene.....	12
1.3 Knorpelgewebe und Chondrozyten.....	12
1.4 Die Parodontitis	14
1.5 <i>P. gingivalis</i> als ein Leitkeim der Parodontitis.....	16
1.6 Assoziation von Parodontitis und Rheumatoider Arthritis.....	17
1.7 Der Zellzyklus.....	19
1.8 Die Zellapoptose.....	21
1.9 Aktivierung von Caspasen.....	22
1.10 DNA- Fragmentierung.....	23
1.11 Die Zellnekrose.....	23
2 Materialien und Methoden.....	25
2.1 Verwendete Materialien.....	25
2.1.1 Isolierung primärer Chondrozyten aus artikulärem Knorpelgewebe.....	25
2.1.2 Anzucht von <i>P. gingivalis</i> ATCC 33277.....	25
2.1.3 Identifizierung von <i>P. gingivalis</i> (Bunte Reihe).....	25
2.1.4 Das Scanning- Elektronenmikroskop.....	26
2.1.5 Das Protection- Invasionsassay.....	26
2.1.6 Immunfluoreszenz und konfokale Lasermikroskopie	26
2.1.7 Durchflusszytometrische Analyse (FACS).....	26
2.1.8 Das Caspase 3- Western- Blot- Verfahren.....	27
2.1.9 Bestimmung der LDH- Konzentration.....	27
2.1.10 Chemikalien.....	28
2.2 Methoden.....	30
2.2.1 Isolierung von primären Chondrozyten aus artikulärem Knorpelgewebe..	30
2.2.2 Anzucht von <i>P. gingivalis</i> ATCC 33277.....	31
2.2.3 Darstellung der Wachstumskurve von <i>P. gingivalis</i>	32

2.2.4 Überprüfung auf Reinheit von <i>P. gingivalis</i>	33
2.2.4.1 Durchführung einer Gram- Färbung.....	33
2.2.4.2 Auswertung der Gram- Färbung.....	34
2.2.4.3 Identifizierung von <i>P. gingivalis</i> (Bunte Reihe).....	34
2.2.4.4 Auswertung der Bunten Reihe.....	35
2.2.5 Infektion von humanen Chondrozyten.....	36
2.2.6 Untersuchung der Lage mittels Scanning- Elektronenmikroskopie.....	36
2.2.7 Untersuchung der Invasion von <i>P. gingivalis</i> in humane Chondrozyten...	36
2.2.8 Immunfluoreszenzfärbung und konfokale Lasermikroskopie.....	37
2.2.9 Bestimmung des DNA- Gehalts von humanen Chondrozyten	40
2.2.10 Durchführung des Caspase 3- Western- Blot- Verfahrens	40
2.2.11 Untersuchung der Zellnekrose mittels LDH- Konzentrations- Assays....	42
2.2.12 Statistische Analyse.....	42
3 Ergebnisse.....	43
3.1 Adhäsion und Invasion von <i>P. gingivalis</i> in Chondrozyten	43
3.1.1 Scanning- Elektronenmikroskopischer Nachweis der Adhäsion.....	43
3.1.2 Darstellung der Adhäsion mittels konfokaler Lasermikroskopie.....	45
3.1.3 Nachweis der Invasion von <i>P. gingivalis</i> mittels Invasionsassays.....	45
3.1.4. Bestätigung der Invasion mittels konfokaler Lasermikroskopie.....	46
3.2 Einfluss von <i>P. gingivalis</i> auf den Zellzyklus von humanen Chondrozyten.....	48
3.2.1 Darstellung von Zellzyklusveränderungen mittels FACS- Analyse.....	48
3.3 Quantifizierung der Apoptose von infizierten humanen Chondrozyten	50
3.3.1 Darstellung von DNA- Fragmentierung mittels TUNEL- Färbung.....	50
3.3.2 Nachweis von Caspase 3 mittels Western- Blot- Verfahren	53
3.4 Untersuchung der Zellnekrose von infizierten humanen Chondrozyten.....	54
3.4.1 Bestimmung der LDH- Konzentration nach Infektion mit <i>P. gingivalis</i>	54
4 Diskussion.....	55
4.1 Kultivierung von humanen Chondrozyten.....	55
4.2 Kultivierung von <i>P. gingivalis</i> ATCC 33277.....	56
4.3 Assoziation von Parodontitis und Rheumatoider Arthritis.....	57
4.4 Interaktion von <i>P. gingivalis</i> mit humanen Chondrozyten.....	59
4.5 Einfluss von <i>P. gingivalis</i> auf den Zellzyklus von humanen Chondrozyten.....	61

4.6 Apoptose- induzierende Mechanismen von <i>P. gingivalis</i>	63
4.7 Caspase 3- Aktivierung und DNA- Fragmentierung.....	64
5 Zusammenfassung.....	67
6 Literaturverzeichnis.....	70
Erklärung an Eides Statt	89
Lebenslauf	90
Publikationen.....	91
Danksagung.....	92

Abkürzungen

2 D- Kultur	Zweidimensionale Zellkultur
3 D- Kultur	Dreidimensionale Zellkultur
A. actinomycetemcomitans	Aggregatibacter (Actinobacillus) actinomycetemcomitans
Abb	Abbildung
AK	Antikörper
Apaf	Apoptose- Protease- Aktivierungs- Faktor
ATCC	American Tissue Culture Collection
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Bovine serum albumin
Bcl- 2	B- Zell- Lymphom 2
B. forsythensis	Tannerella (Bacteroides) forsythensis
BHI	Brain Heart Infusion
BMI	Body Mass Index
CCP	Cyclic Citrullinated Peptide
CD	Cluster of differentiation
CFU	Colony Forming Unit
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
Cyt- C	Cytochrom C
DMEM	Dulbecco`s Modified Eagle`s Medium
DNA	Desoxyribonucleinsäure
ERK	Extracellular Signal Regulated Kinase
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FADD	Fas- associated death domain protein
Fas	CD95 (APO- 1)
FGF	Fibroblast Growth Factor
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FCS	Fetales Kälberserum
G0- Phase	Ruhephase
HDL	High Density Lipoprotein
HIV	Human Immunodeficiency Virus

HLA	Human Lymphocyte Antigen
ICAM	Intracellular adhesion molecule
ICE	Interleukin Converting Enzyme
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
LDL	Low Density Lipoprotein
MCV	Mutiertes Citrulliniertes Vimentin
M- Phase	Mitosephase
m RNA	Messenger- Ribonukleinsäure
NaCl	Natriumchlorid
NSAR	Nicht- Steroidale Antirheumatika
OD	Optische Dichte
<i>P. gingivalis</i>	<i>Porphyromonas gingivalis</i>
PI	Propidiumiodid
<i>P. intermedia</i>	<i>Prevotella intermedia</i>
PBS	Phosphate Buffered Saline
PFA	Paraformaldehyd
RA	Rheumatoide Arthritis
RF	Rheumafaktor
S- Phase	Synthesephase
TdT	Terminal desoxynucleotidyl transferase
TGF	Transforming Growth Factor
TNF	Tumornekrosefaktor
TUNEL	TdT- mediated d- UTP nick end labeling
UTPA	Urokinase Type Plasminogen Activator
VCAM	Vascular Cell Adhesion Molecule
VM	Verdünnungsmedium

1. Einleitung

1.1 Die Rheumatoide Arthritis

Die RA ist eine zumeist chronische und progredient verlaufende systemische Erkrankung des Bindegewebes. Zu beobachten sind destruierende Gelenkveränderungen sowie der fakultative Befall von Sehnen, Sehnenscheiden und Schleimbeuteln, wie auch eine Manifestation innerer Organe [Geiler 1996]. Die RA kann in jedem Lebensalter auftreten. Dabei erkranken Frauen drei- bis viermal häufiger als Männer [Lee ML et al. 2001]. Sie ist die häufigste entzündliche Gelenkerkrankung in Deutschland [Cimmino et al. 1998]. Der Altersgipfel liegt derzeit zwischen dem 35. und 50. Lebensjahr [Lipsky 1999]. Die RA wird klinisch nach dem American College of Rheumatology (ACR) diagnostiziert:

1. Anhaltende Morgensteifigkeit von mindestens einer Stunde
2. Arthritis in drei oder mehr Gelenkbereichen
3. Arthritis an mindestens einem der drei Bereiche der Hand (Karpus, Metakarpophalangealgelenke (MCP), proximale Interphalangealgelenke (PIP))
4. beidseitig symmetrische Arthritis
5. Rheumafaktornachweis
6. Nachweis von Rheumaknoten
7. Radiologische Veränderungen (gelenknahe Osteoporose u.a.).

Es werden momentan verschiedene Ätiologien diskutiert, welche zur RA führen. Untersuchungen sprechen für eine fehlgesteuerte und/ oder nicht ausreichende Immunantwort des Organismus auf einen Kontakt mit einem derzeit noch unbekanntem Antigen [Hein et al. 1999]. Etwa 70 Prozent der Erkrankten weisen das Erbmerkmal HLA- DR4 auf [Reveille et al. 1996; Turesson et al. 2006]. Dabei ist das relative Risiko an einer RA zu erkranken für einen HLA- DR4 positiven Merkmalsträger fünfmal höher als für einen HLA- DR4 negativen Träger [Turesson et al. 2006]. Vermutlich geht der RA eine inapparent verlaufende Erkrankung oder eine länger zurück liegende Infektion voraus. Auslöser der Erkrankung sind Störungen der immunologischen Verarbeitung von bestimmten viralen oder bakteriellen Antigenen. Häufige Begleiterscheinungen der RA sind viszerale Manifestationen und hämatologische Veränderungen, wie normochrome bis hypochrome Anämien. Bei einem aktiven Schub wird

häufig eine Leukozytose beobachtet. Weitere extraartikuläre Manifestationen sind unter anderem Splenomegalie, Rheumaknoten und Ulzera der Haut sowie entzündliche Augenveränderungen, reaktive Hepatitis, Perikarditis, Amyloidose und Kompressionssyndrome an Nerven. Die Prognose der RA ist schwer bestimmbar. Ein serologischer Marker der RA ist der Rheumafaktor (RF), der in 80 Prozent der Fälle nachgewiesen wird [Geiler 1996]. Bei Patienten mit positivem RF verläuft die Krankheit meist aggressiver als bei seronegativen Patienten. Jedoch korreliert die Höhe des RF nicht mit dem Schweregrad der Erkrankung. Ein Faktor, der eine spezifische Aussage über das Auftreten einer RA erlaubt, ist der Anti- CCP- AK (CCP = cyclic citrullinated peptide). Die Spezifität liegt bei 95 bis 98 Prozent in Patientenpopulationen mit einer manifesten Erkrankung [Hartung et al. 2007]. Eine Vorhersage über den Schweregrad der RA gibt möglicherweise der Autoantikörper gegen das Zytoskelettprotein Vimentin, MCV (Mutiertes Citrulliniertes Vimentin). Es konnte gezeigt werden, dass die Höhe dieses MCV- Titers mit dem Schweregrad der RA korreliert [Innala et al. 2008; Mathsson et al. 2008]. Neuere Marker, die zunehmend an Bedeutung bei der Diagnostik der RA gewinnen, sind die Adhäsionsmoleküle sICAM- 1, sVCAM- 1 und sE- Selectin. Auch bei diesen Markern konnte eine enge Korrelation zwischen der Höhe des Titers und dem Schweregrad des Verlaufs der RA beobachtet werden [Kuryliszyn- Moskal et al. 2004; Yildirim et al. 2005]. Des Weiteren wurden besonders hohe Serumtiters von sICAM- 1, sVCAM- 1 und sE- Selectin bei Patienten mit einer frühen RA beobachtet [Klimiuk et al. 2007]. Hauptproduktionsort dieser Autoantikörper gegen citrullinierte Proteine ist das entzündete Gelenk. Ebenso scheinen synoviale B- Zellen von RA- Patienten befähigt zu sein, verstärkt Anti- CCP- AK zu bilden [van Venrooij et al. 2002]. Die Citrullinierung von verschiedenen Proteinen wurde besonders bei Apoptosevorgängen oder bei Keratinozytendifferenzierung beobachtet [Asaga et al. 1998; Senshu et al. 1996]. In 50 bis 70 Prozent der Fälle verläuft die RA linear progressiv, davon bei 25 Prozent rasch progredient. In weniger als zehn Prozent tritt ein selbst limitierender Krankheitsprozess auf. Je später die Erkrankung behandelt wird und je länger diese besteht, desto seltener kann eine Spontanremission erwartet werden [Hettenkofer 2001].

1.2 Die Rheumatoide Arthritis auf zellulärer Ebene

Bei Patienten mit einer RA lassen sich sowohl im Gelenk, als auch systemisch im Blut verschiedene immunpathologische Prozesse nachweisen. So befinden sich in den Gelenken von RA- Patienten diffuse Ansammlungen lymphozytärer Zellen. Durch chronische Entzündungen im Gelenk und der daraus folgenden chondro- und osteolytischen Wirkung kommt es zur Destruktion von Knorpel- und Knochengewebe. Makrophagen fördern durch Zytokinfreisetzung eine Neovaskularisation, die anschließend zu einer verstärkten Adhäsion von Lymphozyten im Synovialgewebe führt. Diese lagern sich an Bindegewebsbestandteile wie Kollagen oder Fibronectin an. Nach verstärkter Freisetzung von IL- 2 aus CD- 4 positiven T- Zellen werden B- Lymphozyten angeregt, sich zu Plasmazellen zu differenzieren und verstärkt Antikörper zu produzieren [Harris 1990]. So entsteht auch der RF, ein Autoantikörper der IgM- Klasse, der sich gegen den Fc- Teil von IgG richtet. Durch eine verstärkte Expression von inflammatorischen Zytokinen wie IL- 1, IL- 6, TNF- a und TGF- β kommt es zu einer erhöhten Ausschüttung der Metalloproteasen Gelatinase, Kollagenase sowie Stromelysin und Urokinase Type Plasminogen Activator (UTPA). Diese induzieren einen verstärkten Bindegewebsumbau und führen zur strukturellen Zerstörung des Gelenkes.

1.3 Knorpelgewebe und Chondrozyten

Ein Gelenk besteht im Allgemeinen aus zwei knöchernen Gelenkkörpern, welche meist mit hyalinem Gelenkknorpel überzogen sind. Weitere Strukturen sind die Gelenkkapsel, welche mit der Gelenkschmiere (Synovia) ausgekleidet ist. Die Gelenkkapsel umschließt das Gelenk. Sie besteht aus zwei Schichten, dem Stratum fibrosum außen und dem Stratum synoviale innen. Oft wird die Gelenkkapsel von Bändern und Muskelsehnen verstärkt, die zur Stabilisierung des Gelenkes beitragen. Der hyaline Gelenkknorpel ist frei von Gefäßen und Nerven [Grande et al. 1989; Green 1971] und zeigt nur ein geringes proliferatives Verhalten [Kawasaki et al. 1999; Pullig et al. 2001]. Er stützt und schützt das knöcherne Gelenk vor Abnutzung und ermöglicht eine optimale Kräfteübertragung. Er fungiert als Stoßdämpfer und sorgt im Zusammenspiel mit der Gelenkflüssigkeit für ein reibungsfreies Gleiten der Gelenkflächen. Er überzieht die artikulierenden Knochenenden als eine wenige Millimeter starke Schicht. In der Histologie unterscheidet man verschiedene Zonen des hyalinen Knorpels:

Zone 1 Superfizielle Tangentialfaserzone

Zone 2 Transitionalzone

Zone 3 Radiärzone

Zone 4 Mineralisationszone/ Kalzifizierungszone.

Die Tangentialfaserzone hat den höchsten Kollagengehalt. Die spindelförmigen Chondrozyten sind parallel zum Kollagenfasergerüst aufgebaut. Die Tangentialfaserzone ist wenige 100 µm dick und dem Binnenraum des Gelenkes zugewandt. In dieser Übergangszone sind die Chondrozyten unregelmäßig angeordnet. Diese Zone hat den höchsten Proteoglykangehalt (PG). Die nächste Schicht ist die Radiärzone. Sie ist die dickste Schicht. Die Chondrozyten verlaufen senkrecht zur Gelenkfläche und sind säulenartig angeordnet. In der Mineralisationszone beobachtet man einen niedrigen Gehalt an PG. Die Chondrozyten sind degenerativ verändert. Danach folgt das subchondrale Knochengewebe. Den Chondrozyten kommt eine bedeutende Rolle zu. Neben Wasser, welches einen Volumenanteil von bis zu 80 Prozent hat, nehmen sie nur einen kleinen Teil, bis zu zehn Prozent des Knorpelgewebes, ein. Den Rest des Knorpelgewebes stellt die extrazelluläre Matrix dar, welche von den Chondrozyten synthetisiert wird. Ein wichtiger Bestandteil dieser Matrix sind Kollagene. Kollagen ist als Strukturprotein das häufigste tierische Protein. Zum jetzigen Zeitpunkt sind etwa 20 Kollagentypen bekannt [von der Mark 1999]. Kollagene erzeugen die Struktur des Knorpels. Sie verleihen dem Knorpel mechanische Festigkeit und Elastizität und stellen sich als Rahmenkonstruktion dar, welche in die amorphe Grundsubstanz der Matrix eingebettet ist. In normalem Gelenkknorpel befinden sich die Kollagene Typ 2, 9, 11, 6 und 10, wobei neben Kollagen Typ 9 und 11 das Kollagen Typ 2 den größten Stellenwert beim hyalinen Knorpel hat. Kollagen Typ 2 ist mit mehr als 90 Prozent Anteil am Kollagengesamtvolumen das wichtigste Hauptkollagen des hyalinen Knorpels [Mollenhauer und Kuettner 1997]. Es baut mit den Kollagenen Typ 9 und 11 die typischen Kollagenfibrillen auf. Kollagen Typ 2 besteht aus einer Reihe von Hydroxylysinmolekülen, welche die Tropokollagenmoleküle der dünnen Fibrillen untereinander verbinden. Übrige Bestandteile der extrazellulären Matrix sind Wasser und Glucosaminoglykane. Diese Glucosaminoglykane unterteilt man in 4 Hauptgruppen: 1. Hyaluronan, 2. Chondroitinsulfat und Dermatansulfan, 3. Keratansulfan, 4. Heparansulfan und Heparin. Sind nun diese Glucosamine an Proteine gebunden, bezeichnet man sie als Proteoglycane. Wenn man Knorpelzellen aus ihrem Verbund herauslöst und *in vitro* kultiviert, findet eine Dedifferenzierung der

Chondrozyten statt. Sie verändern ihren Phänotyp und ändern ihre spezifische Syntheseleistung. Chondrozyten *in vitro* exprimieren nicht- zellspezifisches Kollagen Typ 1 und stellen die Synthese von Kollagen Typ 2 und Typ 9 ein [Häuselmann et al. 1994]. Weiter konnte beobachtet werden, dass sie sich nach längerer Kultur *in vitro* wieder redifferenzieren und die Synthese von Kollagen Typ 2 wieder aufnehmen. Humane Chondrozyten in Monolayer- Kulturen redifferenzieren später, Chondrozyten in 3D- Kultur früher [Häuselmann et al. 1994; Fuss et al. 2000].

1.4 Die Parodontitis

Die Parodontitis ist eine entzündliche Erkrankung des Parodontiums, welche mit zunehmendem Verlust des Stützgewebes zum Zahnverlust führen kann [Haffajee et al. 1994]. Seit 1999 werden die Parodontalerkrankungen folgendermaßen klassifiziert [Armitage 1999]:

- Typ 1: lokalisierte oder generalisierte chronische Parodontitiden
- Typ 2: lokalisierte oder generalisierte aggressive Parodontitiden
- Typ 3: nekrotisierende Parodontalerkrankungen
- Typ 4: Parodontitiden assoziiert mit systemischen Erkrankungen.

Hinzu kommen Parodontitiden in Assoziation mit hämatologischen Störungen, genetischen Störungen, anderweitig klassifizierte Parodontitiden, Parodontalabzesse, Parodontitiden in Assoziation mit endodontalen Läsionen und entwicklungsbedingte oder erworbene parodontale Erkrankungen. Die Grundlage für die Etablierung einer Parodontitis ist das Vorhandensein einer Gingivitis. Hauptursache einer Gingivitis ist unter anderem eine Anhäufung von Plaque in Form eines Biofilms. Die Gingivitis wird nach der American Academy of Periodontology (1989) in vier Typen eingeteilt:

- Typ 1: ausschließlich plaqueinduzierte Gingivitis
- Typ 2: durch systemische Faktoren modifizierte Gingivitis
- Typ 3: durch Medikamente modifizierte Gingivitis
- Typ 4: durch Mangelernährung modifizierte Gingivitis.

Die Entstehung einer klinisch ausgeprägten Gingivitis verläuft in drei abgrenzbaren Phasen: der

Initialläsion, der Frühläsion und der etablierten Läsion. Jedoch ist der Übergang von der Gingivitis zur Parodontitis noch nicht ganz vollständig geklärt. Die Hauptkrankheitsursache einer Parodontitis ist die bakterielle Plaque, primär hervorgerufen durch gramnegative anaerobe Bakterien, wie zum Beispiel *A. actinomycetemcomitans*. Ein weiterer Schlüsselkeim, der mit einer Parodontitis assoziiert wird, ist *P. gingivalis* [Socransky et al. 1999]. Parodontalpathogene Keime bilden auf der Zahnoberfläche einen Bakterienfilm. Dieser Biofilm kann eine chronische, inflammatorische Reaktion induzieren, welche zur Gewebedestruktion führt. Durch die Persistenz der Keime kommt es zu einer Beeinträchtigung der Epithelintegrität und es wird die Entstehung von oberflächlichen und auch tiefen Ulzerationen begünstigt. Als Folge der Ulzerationen kann es zu einer direkten Invasion der Krankheitserreger in und durch das Epithel kommen. Auf diesem Weg gelangen die parodontalpathogenen Bakterien ins Blut und verschaffen sich einen systemischen Zugang [Dorn et al. 1998; Weinberg et al. 1997]. Aufgrund der ständigen Exposition gegenüber bakterieller Virulenzfaktoren unterhält der auf der Zahnoberfläche gelegene bakterielle Biofilm eine chronische Bakteriämie. Die Anfälligkeit einer Person, eine Parodontitis zu bekommen, steht in einem engen Zusammenhang mit der Stärke seines Immunsystems. Die Prävalenz der Parodontitis nimmt mit steigendem Alter zu [Okamoto et al. 1988]. Sowohl exogene als auch endogene Faktoren können die systemische Immunabwehr stören. Neben bekannten Risikofaktoren wie Rauchen, niedrigem sozial-ökonomischem Status, hohem BMI, Diabetes, Osteoporose, Osteopenie und HIV scheinen auch genetisch bedingte Erkrankungen (Papillon- Lefevre- Syndrom durch Fehlfunktion der polymorphkernigen Neutrophilen Granulozyten) einen Einfluss auf die Entstehung einer Parodontitis zu haben [Deinzer 2004; Genco et al. 1999; Grossi et al. 1994; Reinhardt et al. 1999; Ronderos et al. 2000; Tezal et al. 2000]. In den letzten Jahren konnte eine Assoziation zwischen einer Parodontitis und einem erhöhten Risiko für systemische Erkrankungen wie der koronaren Herzkrankheit, Herzinfarkt, der Artherosklerose und dem Schlaganfall gezeigt werden [Beck et al. 1998; Haraszthy et al. 1998; Offenbacher et al. 1999]. Die Parodontitis wird als chronischer Prozess angesehen, bei dem sich Phasen erneuter Exazerbation mit Phasen der Stagnation abwechseln. Entscheidend dafür sind das Zusammenspiel von Wirtsabwehr, Umweltfaktoren und Mikroorganismen.

1.5 *P. gingivalis* als ein Leitkeim der Parodontitis

Einer der Hauptkeime, der mit der Entstehung einer Parodontitis in Verbindung gebracht wird ist *P. gingivalis* [Genco et al. 1996; Haffajee und Socransky 1994]. Seit dem Jahre 1986 grenzt man die Gattung *Porphyromonas* von der Familie der *Bacteroidaceae* (welche anaerob wachsende, gramnegative Stäbchen umfasste) ab. Zur Gattung *Porphyromonas* zählt man unter anderem *P. endodontalis*, *P. asaccharolytica* und *P. gingivalis*. *P. gingivalis* ist ein Erreger, welcher auf der Zunge, im Speichel, auf der buccalen Mucosa, im gingivalen Sulkus und in parodontalen Zahnfleischtaschen zu finden ist. Der Keim ist gramnegativ, obligat anaerob, nicht beweglich und bildet keine Sporen. *P. gingivalis* gehört zu den sogenannten „schwarz pigmentierten Keimen“, da er auf Blutagar schwarz oder braun pigmentierte Kolonien bildet. *P. gingivalis* ist in der Lage die Epithelintegrität zu beeinträchtigen, in humane Endothelzellen zu invadieren und sich so einen möglichen systemischen Zugang zu verschaffen [Walter et al. 2004; Weinberg et al. 1997]. Um im Wirt zu überleben, lagern sich die Bakterien mittels Fimbrien an Endothelzellen oder Epithelzellen an. Mit Hilfe von Toxinen dringen die Keime in das Gewebe ein. Gramnegative Keime, wie der *P. gingivalis*, können Exotoxine und Endotoxine produzieren. Dabei dienen die Exotoxine zur Hämolyse in der Wirtszelle, und die Endotoxine blockieren die Abwehr des Wirtes. Es konnte gezeigt werden, dass *P. gingivalis* besonders häufig bei der Entstehung von schweren Parodontitiden beteiligt ist [Genco et al. 1996]. *P. gingivalis* kann aber auch bei gesunden Menschen nachgewiesen werden [Könönen 1999; van Winkelhoff et al. 2002]. Im Tierversuch gilt *P. gingivalis* als hoch virulent. Je nach *P. gingivalis*- Typstamm ist die Virulenz unterschiedlich ausgeprägt [Eick et al. 2002]. Diese Ausprägung von Virulenzfaktoren wird durch Umwelteinflüsse mit beeinflusst. Zu den Einflüssen zählt man die Temperatur, den osmotischen Druck sowie die Eisen-, Kalzium- und Magnesiumkonzentrationen. Speziell die Eisenkonzentration hat einen starken Einfluss auf die Membranproteinsynthese von *P. gingivalis*. In verschiedenen Studien konnte beobachtet werden, dass durch Eisenmangelstress das Wachstum von *P. gingivalis* zum Erliegen kommt [Barura et al. 1990; McKee et al. 1986; Bramanti et al. 1990]. Zu den Virulenzfaktoren von *P. gingivalis* zählt man eine Vielzahl von Proteasen (z.B. Gingipaine), den „fibroblast inhibitory factor“, den „bone resorption inducing factor“ und kollagenabbauende Enzyme. Hinzu kommen Fettsäuren, Endotoxine, Adhäsine, Hämolysine, Glykoproteine, Fimbrien und zahlreiche zytotoxische Stoffwechselprodukte [Desphande et al. 1999; Haffajee et al. 1994; Njoroge et al. 1997; Olsen et

al. 1999; Weinberg et al. 1997]. *P. gingivalis* verfügt über zahlreiche Schutzmechanismen. Seine Pigmentierung könnte ein Abwehrmechanismus gegen giftige, oxidative Sauerstoffmetabolite sein. Das schwarze und eisenporphyrinhaltige Hämatin bindet nicht nur Sauerstoff, sondern bietet auch Schutz vor Sauerstoff [Baehni et al. 1979]. Ein weiteres Enzym ist die Superoxiddismutase. Diese hat die Fähigkeit, Sauerstoffionen mit Protonen zu Wasserstoffperoxid und Sauerstoff zu reduzieren [Amano et al. 1990; 1992]. Die äußerst hitzestabilen (bis 121° C) Lipopolysaccharide von *P. gingivalis* stimulieren Zellen des Blutes und des Zahnfleischgewebes zur Expression von TNF, PGE und vor allem IL- 1. Dadurch wird eine Entzündung induziert und Osteoklasten werden verstärkt aktiviert. Diese setzen vermehrt intrazelluläres Kalzium frei, was zur verstärkten Weichteil- und Knochendestruktion führt, wie man es bei einer RA beobachten kann [Bockman et al. 1981; Chen et al. 2001; Saito et al. 1990].

1.6 Assoziation von Parodontitis und Rheumatoider Arthritis

Die RA ist eine systemische chronisch-entzündliche Erkrankung, die ähnlich wie die Parodontitis von dem Verlust von bindegewebigen und mineralisierten Strukturen gekennzeichnet ist [Snyderman und McCarty 1982]. In einer Querschnittsstudie konnte eine signifikant positive Assoziation zwischen der RA und der Parodontitis gezeigt werden. Nach Adjustierung für Risikofaktoren der Parodontitis wie Alter, Alkoholkonsum, BMI, Rauchen und sozialökonomischer Status wurde eine enge Assoziation zwischen der RA und der Parodontitis beobachtet. Dabei deuteten die Ergebnisse darauf hin, dass 13 Prozent der Assoziation durch die Mundhygiene erklärt werden konnte [Pischon et al. 2008]. Eine Schlüsselrolle bei der Entstehung einer Parodontitis stellen Parodontalpathogene wie *P. gingivalis* dar. Sie sind in der Lage die Epithelintegrität zu beeinträchtigen [Weinberg et al. 1997]. Es konnte gezeigt werden, dass *P. gingivalis* in humane Endothelzellen invadiert und die Transkription und Proteinsynthese beeinflusst [Walter et al. 2004]. Es besteht damit die Voraussetzung für Parodontalpathogene, wie dem *P. gingivalis*, sich einen direkten systemischen Zugang zum Blutkreislauf zu verschaffen und eine Bakteriämie zu unterhalten. Vergangene Studien zeigten, dass bei Patienten mit RA im Blut sowie in der Synovialflüssigkeit vermehrt AK und DNA gegen parodontale Pathogene nachgewiesen werden konnten [Moen et al. 2003; Yoshida et al. 2001]. Aufgrund dieser Tatsache verhärtet sich der Verdacht, dass parodontalpathogene Keime ihre Aktivität nicht nur auf das Parodont beschränken, sondern möglicherweise auch die Gelenke direkt schädigen

können. Ein Krankheitsbild, welches im Zusammenhang mit der RA und direkter Gelenksschädigung durch Bakterien steht, ist die Septische Arthritis (SA). Es konnte gezeigt werden, dass Patienten mit einer RA ein erhöhtes Risiko besitzen, eine SA zu bekommen [Favero et al. 2008]. SA-induzierende Bakterien, wie *Staphylococcus aureus* oder *Escherichia coli* haben die Fähigkeit, *in vitro* den Zelltod von humanen Chondrozyten zu induzieren und führen zum Abbau von Glykosaminoglykanen in der Knorpelmatrix [Lee MS et al. 2001; Smith et al 1982]. Des Weiteren konnte in den letzten Jahren gezeigt werden, dass die Parodontitis, ähnlich wie die RA, nicht nur auf lokale Entzündungsprozesse beschränkt ist, sondern systemischen Einfluss hat [Patel et al. 1998]. Verschiedene Strukturen, wie die Synovialmembran und der Gelenkknorpel, grenzen den Binnenraum eines Gelenkes ab. Die Synthese von hyaliner Knorpelmatrix erfolgt durch die Chondrozyten. Trotz der verschiedenen Ätiologien der Erkrankungen fallen jedoch die ähnlich ablaufenden pathologischen Prozesse auf. Sowohl die RA als auch die Parodontitis sind entzündliche Erkrankungen, welche die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen triggern. Dadurch können bei diesen Patienten im Vergleich zu gesunden Menschen, eine bis zu zehnfach höhere Menge an inflammatorischen Mediatoren ausgeschüttet und freigesetzt werden [Beck et al. 1996]. Zu den Entzündungsmediatoren gehören unter anderem TNF- α , IL-1 und IL-6. Ein gesteigerter lokaler Anstieg dieser Mediatoren kann systemisch zu einer Leukozytose führen [Kweider et al. 1993]. Des Weiteren konnte bei Patienten mit einer RA oder Parodontitis eine gesteigerte Synthese von Akute-Phase-Proteinen wie beispielsweise das C-reaktive-Protein (CRP) und Amyloid A beobachtet werden [Ebersole et al. 1997; Loos et al. 1998]. Außerdem wurde ein Anstieg des Lipidmetabolismus beschrieben. Es kommt zu einer Erhöhung von Cholesterin, Triglyzeriden, HDL und LDL [Mattila et al. 1998; Valtonen 1991]. Durch parodontalpathogene Bakterien kommt es weiterhin zu einer verstärkten Bildung von chemotaktischen Chemokinen wie IL-8 [Nassar et al. 2002; Pischon et al. 2001] sowie Adhäsionsmolekülen wie ICAM-1, VCAM-1 und Selektinen [Darveau et al. 1995]. Dieser Anstieg von Mediatoren in den Endothelzellen stimuliert eine Adhäsion, Transmigration und die leukozytäre Chemotaxis [Walter et al. 2004]. Eine fortlaufende Exposition mit inflammatorischen Mediatoren unterstützt und begünstigt letztendlich die Entstehung anderer systemischer Erkrankungen. So konnte gezeigt werden, dass Patienten mit einer Parodontitis oder mit Gelenk- und Wirbelsäulenerkrankungen ein erhöhtes Risiko für das Auftreten von atherosklerotischen Gefäßveränderungen haben. Gleiches gilt für kardiovaskuläre Komplikationen wie Herzinfarkt oder Schlaganfall [Patel et al. 1998]. Frühere

Untersuchungen zeigten, dass bei Patienten mit RA (anders als bei Arthrose- Patienten) im Blut und in der Synovialflüssigkeit vermehrt AK gegen *Prevotella intermedia* (*P. intermedia*) und *Bacteroides forsythus* (*B. forsythus*) gefunden wurden. Ebenso konnte im Blut von RA- Patienten ein erhöhtes Auftreten von IgG- AK gegen Hitzeschockproteine von *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (*A. actinomycetemcomitans*), nachgewiesen werden [Yoshida et al. 2001]. Weiterhin gibt es Hinweise dafür, dass parodontale Erreger die Gelenke auf direktem Wege schädigen können. Es konnte gezeigt werden, dass der schwarz- pigmentierte *P. gingivalis* in der Lage ist, Knorpelgewebe, speziell Proteoglykane, abzubauen [Klamfeldt 1986]. Es konnte nachgewiesen werden, dass die Synthese von Proteoglykanen in embryonalen Chondrozytenkulturen nur durch den Kulturüberstand des *P. gingivalis* inhibiert wurde [van Kampen et al. 1984]. Basierend auf diesen Tatsachen sollte in dieser *in vitro* Arbeit erstmalig der direkte Einfluss von parodontalen Leitkeimen wie *P. gingivalis* auf die Zellproliferation von humanen Chondrozyten untersucht werden. Weiterhin sollte untersucht werden, welchen Einfluss *P. gingivalis* auf die Zellvitalität, insbesondere der Apoptose von humanen Chondrozyten hat.

1.7 Der Zellzyklus

Um einen geregelten Ablauf des Lebens zu gewährleisten, müssen Zellen miteinander kooperieren. Den kontrollierten Prozess der Zellteilung mit der Replikation und Weitergabe von Zellkomponenten bezeichnet man als Zellzyklus. Dabei unterliegt der Zellzyklus verschiedenen Kontrollmechanismen, welche die Zellteilung fördern oder diese unterbinden. Die wichtigsten Moleküle zur Regulierung des Zellzyklus sind Zyklone, Zyklon- abhängige Kinasen (CDK) und CDK- Inhibitoren (CKI). Zyklone sind Proteine und besitzen eine aus zirka 100 Aminosäuren bestehende Homologie, welche „Zyklon- Box“ genannt wird. Mittels dieser Zyklon- Box binden die Zyklone die CDKs und werden von diesen aktiviert [Denhardt 1999; Puri et al. 1999]. CDKs sind zyklisch aktivierte Proteinkinasen und gehören zu den Serin- Threoninkinasen, welche Phosphate auf andere Proteine wie die Zyklone übertragen. Sie haben eine enzymatische Funktion. Die Zyklone besitzen keine enzymatische Aktivität. Ihre Aktivität wird durch die CDKs mittels Phosphorylierung gesteuert.

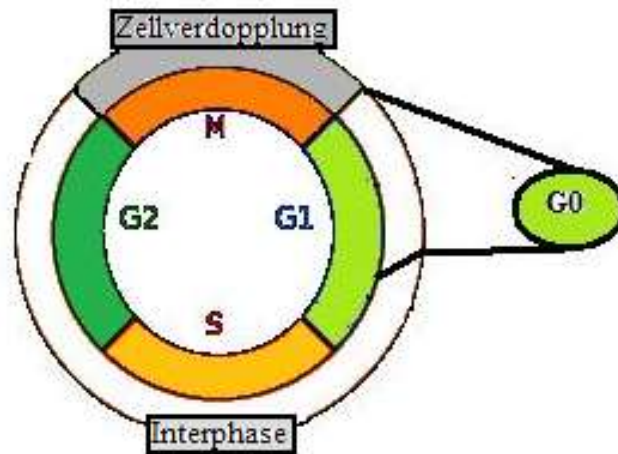


Abb.1: Zellzyklus (vereinfacht)

In der **G1- Phase** (Präsynthesephase) wächst die Zelle, erfüllt ihre Funktion und bereitet die nachfolgende Chromosomenverdopplung vor. Dauer: variabel, Stunden, Tage, Jahre.

In der G0- Phase verlässt die Zelle den Zellzyklus und teilt sich nicht mehr. Die Zellfunktion bleibt erhalten und die Zelle kann beliebig wieder in die G1- Phase übertreten.

In der **S- Phase** (DNA- Synthese) findet die Verdopplung der DNA statt. Dabei entstandene Fehler werden durch verschiedene Mechanismen repariert, damit jeder DNA- Abschnitt nur einmal verdoppelt wird. Dauer: konstant, weniger als zehn Stunden.

In der **G2- Phase** (Prämitosephase) wächst die Zelle weiter. Die DNA- Verdopplung wird noch einmal überprüft und Fehler korrigiert. Dauer: Stunden.

In der **M- Phase** (Mitosephase) finden die Mitose und die Zytokinese statt. Die Chromosomen mit dem nun doppelten DNA- Gehalt werden getrennt und auf zwei neue Kerne verteilt. Ebenso wird das Zytoplasma geteilt und auf zwei Tochterzellen verteilt. Dauer: Minuten.

Prophase: Die Zellorganellen verfallen und das Chromatin verdichtet sich. Die Chromosomen verkürzen sich und werden als Fadenknäule sichtbar. Die verdoppelten Zentrosomen wandern zu den entgegengesetzten Polen. Ausbildung von Mitosespindel und radiär verlaufender Mikrotubuli um Zentrosomen. Der Nukleolus verschwindet.

Metaphase: Die Chromosomen verkürzen sich weiter und ordnen sich in der Äquatorialebene an. Die Zentromere der Chromosomen richten sich zum Mittelpunkt aus und es entsteht das Bild eines Monasters (Mutterstern). Erste Mikrofilamente sammeln sich auf Höhe der Äquatorialebene.

Anaphase: Die Zentromerpaare der Chromosomen teilen sich in zwei Tochterchromosomen und wandern entlang der Spindelfasern zu den Spindelpolen. Die Chromosomen werden mit Hilfe der Mikrotubuli transportiert und es bilden sich zwei Tochtersterne an den Polen.

Telophase: Es bildet sich eine neue Kernhülle um die gewanderten Chromosomen und der Nukleolus erscheint wieder. Die Chromosomen verlängern und entspiralisieren sich. Der Spindelapparat wird abgebaut. Das Zytoplasma trennt sich an der Einschnürungsstelle. Es werden die Membranteile neu gebildet und die Zellorganellen werden aufgeteilt. Die kleinen Tochterzellen wachsen und differenzieren sich in der *Postmitosephase*.

1.8 Die Zellapoptose

Der physiologische Vorgang des Zellselbstmordes, die Apoptose (Schrumpfnekrose), gewinnt zunehmend an Bedeutung bei der Untersuchung von chronischen Erkrankungen, wie zum Beispiel der RA. Die wichtigsten Merkmale der Apoptose sind fehlende Entzündungsreaktion, Schrumpfung der Zellen, gesteigerte Endonukleaseaktivität, Anbindung des Chromatins an den Zellkern, eine intakte Zellmembran, Aktivierung von Caspasen sowie eine geordnete DNA-Fragmentierung (es entstehen je nach Zelltyp identisch lange Bruchstücke). Die bei der Apoptose entstehenden Apoptosekörper werden von Makrophagen phagozytiert oder von anderen Zellen aufgenommen. Während der Embryogenese, bei Zellerneuerungen oder bei der Regeneration von Gewebe findet eine gesteigerte Apoptose statt. Man unterscheidet einen intrinsischen und einen extrinsischen Weg. Der intrinsische Weg der Apoptose beginnt mit der Freisetzung von Cytochrom C (CYT- C) aus den Mitochondrien sowie der Aktivierung von Proteasen aus der ICE- Familie, den Caspasen, welche die Proteine von Zellbestandteilen (Zellkern, Mitochondrien, DNA) spalten. Aktiviert werden die Proteasen unter anderem durch Medikamente (z.B. Zytostatika), andere Proteasen oder Strahlung. Die extrinsische Aktivierung und Steuerung der Apoptose übernehmen Regulatorgene, wie die spezifischer Oberflächenrezeptoren der CD 95- Familie, Fas oder TNF R1. Für einen geregelten physiologischen Ablauf in Lebewesen ist es außerordentlich wichtig, dass apoptotische

Vorgänge gut gesteuert sind. Findet eine zu starke körpereigene Hemmung der Apoptose statt, so kann das zum Beispiel zu malignen Erkrankungen führen. Im Gegensatz dazu kann eine zu schwache oder fehlende Apoptose bei autoreaktiven Immunzellen zu Autoimmunkrankheiten wie zum Beispiel degenerative Gelenkserkrankungen führen. In dieser Arbeit wird eine mögliche Apoptose von humanen Chondrozyten nach Infektion mit *P. gingivalis* durch den Nachweis einer Aktivierung von Caspase 3 und der DNA- Fragmentierung untersucht.

1.9 Aktivierung von Caspasen

Eine zentrale Rolle bei der Apoptose nehmen die Caspasen ein. Sie gehören zur Familie der Cystein- Proteasen und spielen eine zentrale Rolle bei der Regulation der Apoptose. Es können zurzeit drei Hauptsignalwege zur Aktivierung von Effektor- Caspasen näher beschrieben werden [Hoppe et al. 2002]. Der erste Signalweg führt über Caspase 8 mittels FADD (Adapterprotein) unter Ausbildung eines „Death Inducing Signaling Complexes (DISC)“ und der anschließenden Aktivierung von Caspase 3. Ein weiterer Signalweg führt über das Endoplasmatische Retikulum (ER). Hier wird Caspase 12 über Stresstimulation, zum Beispiel im Rahmen deregulierter Entleerung des Kalzium- Speichers oder bei massiver Ansammlung von bestimmten Proteinen, wie bei Virus- Infektionen oder Amyloid- Protein beim M. Alzheimer, aktiviert. Der dritte Signalweg führt über die Mitochondrien. CYT C wird aus dem Intermembranraum freigesetzt und interagiert im Zytosol mit Adenosin- Triphosphat (ATP), Apoptose- Protease- Aktivierungs- Faktor (Apaf- 1) und der Procaspase 9, welche das Apoptosom bilden. Das Apoptosom aktiviert dann weiter die Caspase 9, welche anschließend die Effektorcaspase 3 aktiviert. Effektorcaspasen führen zur Schrumpfung der Zellen, welche anschließend als Apoptotic Bodies phagozytiert werden.

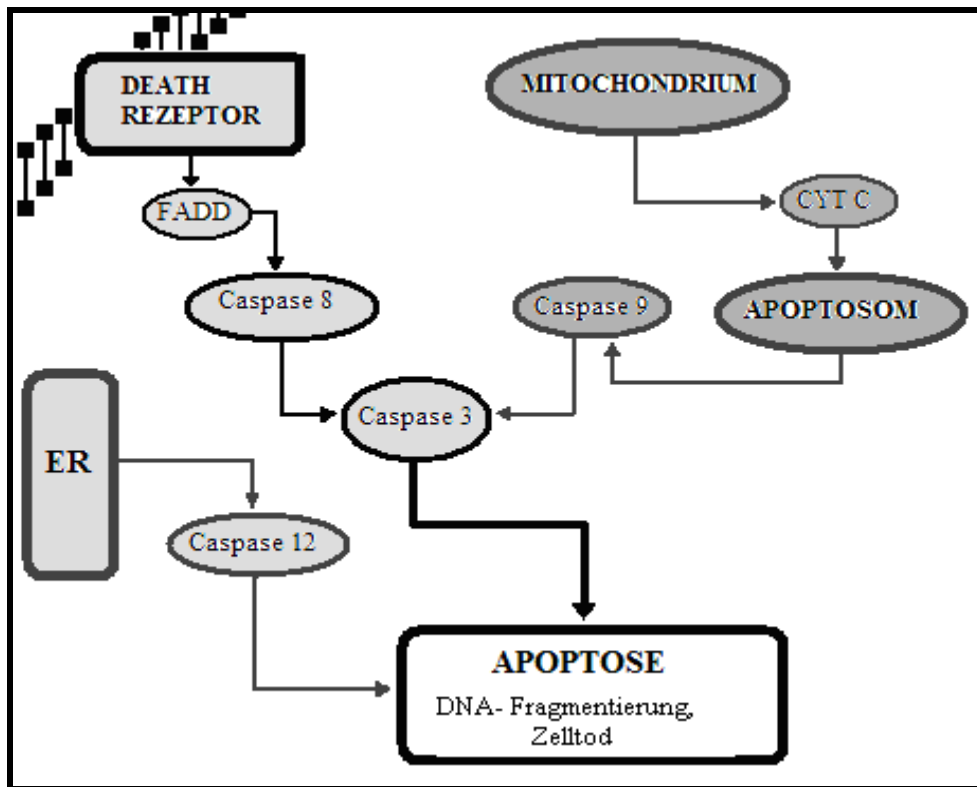


Abb.2: Signalwege der Apoptose über die Caspasenkaskade (vereinfacht)

1.10 DNA- Fragmentierung

Nach Caspasenaktivierung folgt die kontrollierte DNA- Fragmentierung durch Endonukleasen. Je nach Zelltyp benötigen diese verschiedene Cofaktoren wie zum Beispiel Kalzium- oder Magnesiumionen. Diese Endonukleasen trennen die DNA zwischen den Nukleosomen auf. Dabei entstehen identisch lange DNA- Bruchstücke. Bei der nekrotischen DNA- Fragmentierung findet eine unkontrollierte Spaltung der DNA mit unterschiedlich langen Bruchstücken statt. In einer DNA- Elektrophorese stellen sich diese DNA- Bruchstücke der Apoptose als Leiterstruktur da.

1.11 Die Zellnekrose

Die Nekrose ist die unphysiologische Form des Zelltodes. Sie ist die Folge schwerer Zellschädigung mit umliegender oder auch, im fortgeschrittenen Stadium, systemischer Entzündungsreaktion. Üblicherweise gehen der Nekrose reversible Zellveränderungen voraus (Schwellung, Verfettung). Eine Zellschädigung kann verschiedene Ursachen haben. Zu den

Ursachen gehören unter anderem extreme Hitze oder Kälte, Infektionen mit Viren, Sauerstoffmangel, toxische Substanzen, Strahlung sowie auch die Aktivierung des Komplementsystems. Wirkt ein schädigender Reiz lange und intensiv genug auf eine Zelle, kommt es zum provozierten Zelltod. Charakteristisches Merkmal ist das Anschwellen der Zelle (hydropische Schwellung), verursacht durch eine Schädigung der Plasmamembran. Durch die Schädigung der Membran verliert die Zelle ihr osmotisches Gleichgewicht bis zum totalen Verlust der Struktur und Form. Durch die geschädigte Membran tritt der Zellinhalt (Zellorganellen, Enzyme sowie Zellchromatin) in die Umgebung aus. Die lysosomalen Enzyme greifen im umliegenden Gewebe auch die anderen Zellen an, was zu einem nekrotischen Zelluntergang führt. Durch die anschließende Phagozytose der Zellbestandteile kommt es zu einer Entzündungsreaktion.

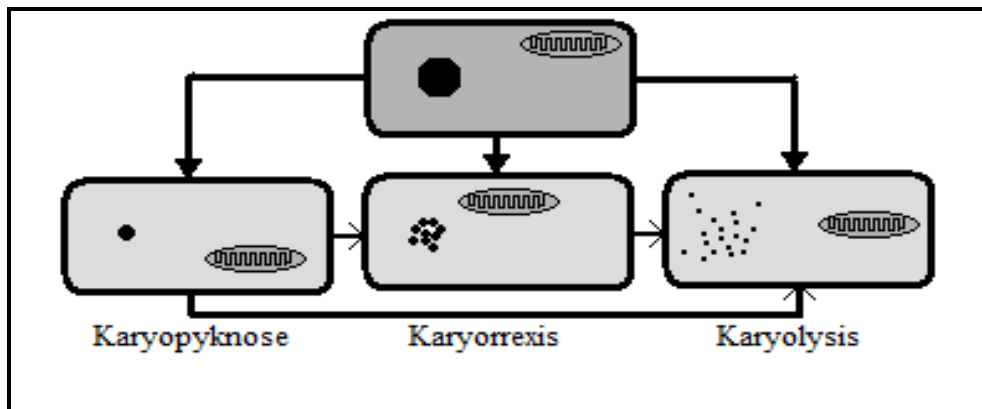


Abb.3: Stadien des Zellkernzerfalls beim provozierten Zelltod (veränderte Skizze nach Bühling, Lepenies, Witt: 2004, Intensivkurs Allgemeine und spezielle Pathologie)

2. Materialien und Methoden

2.1 Verwendete Materialien

Nachfolgend werden die Materialien aufgeführt, die bei den beschriebenen Experimenten verwendet worden sind.

2.1.1 Isolierung primärer Chondrozyten aus artikulärem Knorpelgewebe

- Kultur- Medium: DMEM F- 12, FCS inaktiviert (10 %), Penicillin/ Streptomycin (1 %)
- Verdau- Medium 1: DMEM F- 12, FCS inaktiviert (10 %), Penicillin/ Streptomycin (1 %), Pronase (1mg/ ml)
- Verdau- Medium 2: DMEM F- 12, FCS inaktiviert (10 %), Penicillin/ Streptomycin (1 %), Collagenase A (1mg/ ml)

2.1.2 Anzucht von *P. gingivalis* ATCC 33277

- Cocktail für Blutagar: Hemin (50 mg), NaOH (1 ml), dest. Wasser (100 ml), Vitamin K (2 Amp.)
- Brain- Heart- Cocktail: BHI (37 g/ l), Cystein (1 g), Hefe (5 g), Vitamin K (2,5 ml)

2.1.3 Identifizierung von *P. gingivalis* (Bunte Reihe)

- Suspensionsmedium: Demineralisiertes Wasser (2 oder 3 ml)
- JAMES Reagenz: Verbindung J 2183 (0,5 g) und HCl N (100 ml)
- NIT 1 Reagenz: Sulfanilsäure (0,8 g) und Essigsäure 5 N (100 ml)
- NIT 2 Reagenz: N- N- Dimethyl- 1- Naphtylamin (0,6 g) und Essigsäure (100 ml)
- FB Reagenz: Fast Blue BB (0,35 g) und Org. Lösungsmittel (100 ml)

2.1.4 Das Scanning- Elektronenmikroskop

- Karnowski- Lösung: PFA 4 %, PBS (pH 7,2) + Glutaraldehyd
- Aceton (10- 100 %)

2.1.5 Das Protection- Invasionsassay

- Metronidazol (0,1mg/ ml)
- Gentamycin (0,5 mg/ ml)

2.1.6 Immunfluoreszenz und konfokale Lasermikroskopie

Einfach - und Doppelfärbung

- Verdünnungsmedium (VM) 20 ml PBS; 0,2 g BSA; 0,01 g TWEEN 20
- prim. AK *a* Rabbit anti *P. gingivalis*
- sek. AK goat anti rabbit A 488
- sek. AK goat anti rabbit A 546
- Phalloidin A 546
- Phalloidin A 488

TUNEL- Färbung

- Verdünnungsmedium (VM): PBS (20 ml); BSA (0,2 g), TWEEN 20 (0,01 g)
- Enzym Lösung: Deoxynukleotidyl Transferase mit *E. coli*
- Label Lösung: Nukleotid Mixtur in Reaktionspuffer
- Reaktionsmischung: Enzym Lösung (50 µl) und Label Lösung (450 µl)
- Anti Fluorescein AK Alexa 488 anti FITC
- Phalloidin A 546

2.1.7 Durchflusszyometrische Analyse (FACS)

- RNaseA (0,5 mg) + Stammkonzentration (61 mg/ ml)
- Propidium Iodid (50 µg/ ml)

- Ethanol 100 %
- PBS + FCS 2 %

2.1.8 Das Caspase 3- Western- Blot- Verfahren

- Trenngel (Polyacryamidgel): H₂O dest. (4,1 ml); Trenngelpuffer (2,5 ml); Acryamid 40% (3,25 ml); SDS 10 % (100 µl); APS 10 % (50 µl); TEMED (5 µl)
- Sammelgel (Polyacryamidgel): H₂O dest. (2,426 ml) Sammelgelpuffer (1 ml); Acryamid 40 % (0,534 ml); SDS 10 % (40 µl); APS 10 % (40 µl); TEMED (10 µl)
- Laufpuffer (Stock): Tris (30 g); Glycin (144 g); SDS (10 g); H₂O dest. (2000 ml)
- Laufpuffer: Stock (200 ml); H₂O dest. (800 ml)
- Blotting Puffer (Stock): Tris (60 g); Glycin (288 g); H₂O dest. (2000 ml)
- Blotting Puffer: Stock (80 ml); H₂O dest. (720 ml); Methanol (200 ml)
- Blockpuffer: H₂O dest. : Rotiblock (1:10)
- Lysepuffer: Tris- HCl 50 mM (100 µl); EDTA 0,25 mM (1 µl); PMFS 1mM (10 µl); Antipain 10 µg/ ml (5 µl), Leupeptin 10 µg/ ml (5 µl); Pepstatin A 10 µg/ ml (5 µl); NP 40 1 % (50 µl) Phosphoproteinpuffer (824 µl)
- Bradford- Lsg.: Biorad- Lsg. (2 ml) + H₂O dist. (8 ml)
- Lämmli - Mercaptoethanolpuffer: Lämmli-puffer (475 µl) + Mercaptophethanol (25 µl)
- Caspase 3- AK anti rabbit
- sek. AK anti mouse IgG (CY5.5)
- sek. AK anti rabbit IgG (IRDye™ 800)
- ERK- AK anti mouse (sc 1647)

2.1.9 Bestimmung der LDH- Konzentration

- Katalysatorlösung (1 ml): Diaphonase/ NAD⁺ Mixtur, Lyophilisat + H₂O dist. (1 ml)
- Dye- Lösung(45 ml): Iodotetrazoliumchlorid (INT), Natriumlaktat
- LDH- Reaktionslösung: Katalysatorlösung + Dye- Lösung (46 ml)

2.1.10 Chemikalien

DMEM/ Hams F- 12	Biochrom
Hirn- Herz- Infusion (BHI)	Sifin
Fetales Kälberserum (FBS)	Biochrom
PBS	Biochrom
Trypsin EDTA	Biochrom
Tween 20	Sigma
Penicillin/ Streptomycin	Biochrom
Columbia- Agar	Sifin

Enzyme und Antikörper

Pronase	Sigma- Aldrich
Collagenase A	Sigma- Aldrich
RNase A	Sigma- Aldrich
Propidium Iodid	Sigma- Aldrich
Phalloidin Alexa FlourA 488, A 546	Molecular Probes
Prim. AK Alexa Flour	Molecular Probes
Sek. AK Alexa Flour A 488, A 546	Molecular Probes
Caspase 3- AK	Santa Cruz
ERK- AK	Santa Cruz
Sek. AK CY5.5	Rockland
Sek. AK IRDye™ 800	Rockland
Staurosporin	Sigma- Aldrich
Triton X100	Sigma- Aldrich

Material

Zellkulturflaschen	TPP
Nylon- Filter	BD Falcon
Permaflour	Beckman-Coulter, Fullerton, CA

Kits

API rapid ID 32 A	BioMerieux
Cytotoxicity Detection Kit (LDH)	Roche
In Situ Cell Death Detection Kit, AP	Roche

Firmen und Hersteller

Amersham, Dreieich, Deutschland
BD Falcon, Bedford, Deutschland
Beckman- Coulter, Fullerton, CA, USA
BioMerieux, Marcy l'Etoile, Frankreich
Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Boehringer Ingelheim GmbH, Ingelheim, Deutschland
DIFCO, Detroit, USA
GIBCO Invitrogen Corporation, Carlsbad, Kalifornien, USA
Immunotech, Marseille, Frankreich
LICOR Inc, Lincoln, USA
MERCK KGaA, Darmstadt, Deutschland
Molecular Probes, Eugene, USA
R&D System, Minneapolis, MN, USA
Roche, Mannheim, Deutschland
Rockland, PA, USA
Santa Cruz, CA, USA
Sigma- Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
Sifin, Berlin, Deutschland
Sigma, München, Deutschland
TPP, Trasadingen, Schweiz

2.2 Methoden

2.2.1 Isolierung von primären Chondrozyten aus artikulärem Knorpelgewebe

Primäre humane Chondrozyten wurden nach einer bereits etablierten Methode isoliert und kultiviert [Wohlrab et al. 2002, 2004]. Das Knochen-/ Knorpelgewebe stellte die Klinik für Orthopädie, Charité Universitätsmedizin Berlin, Campus Mitte, zur Verfügung. Nach Vorlage eines Ethikvotums sowie Aufklärung der Patienten wurde das Material aus den Knie- bzw. Hüftgelenken von Probanden gewonnen, die an einer Gelenksarthrose erkrankten und einen prothetischen Gelenkersatz erhielten. Nachdem das Gewebe unter sterilen Bedingungen mit PBS gewaschen worden ist, wurde mit einem Skalpell das Knorpelgewebe vom Knochen getrennt und in zirka einmal 1mm große Stücke zerkleinert. Danach wurden die Gewebestücke in das Verdau-Medium 1 (50 ml Falcon) überführt.

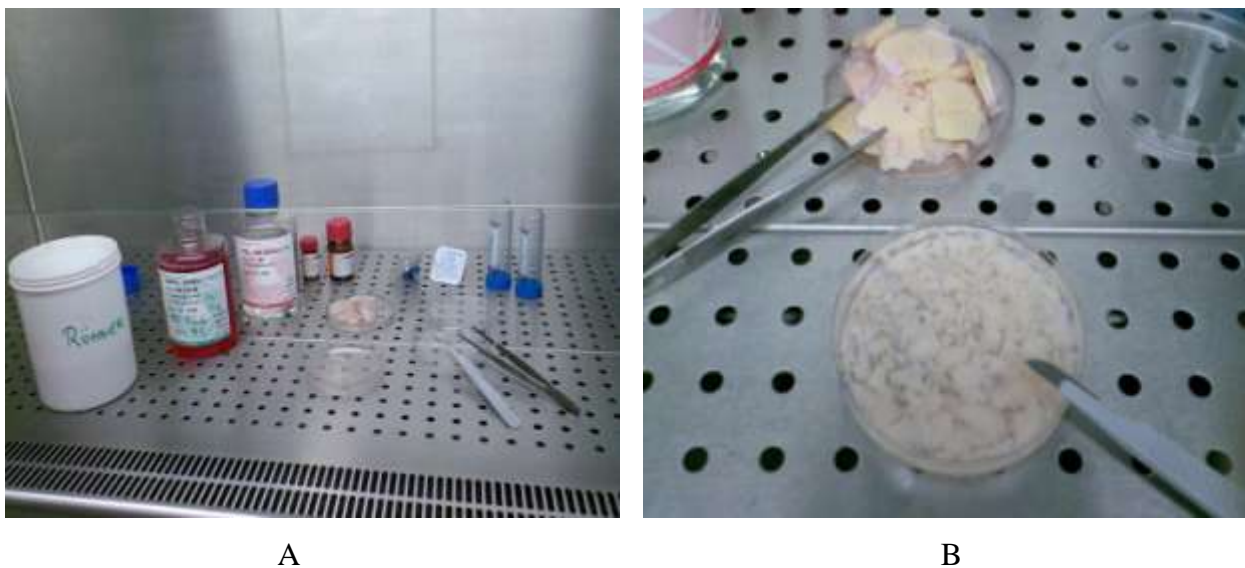


Abb.4: Isolierung von humanen Chondrozyten aus Gelenkknorpeln (A) und in der Nahaufnahme (B)

Anschließend wurde das Verdau-Medium 1 für 30 Minuten im Brutschrank bei 37° C inkubiert. Dann erfolgte das erneute Waschen der Gewebestücke und die Überführung in das steril filtrierte Verdau-Medium 2. Dieses inkubierte weitere 18 Stunden im Brutschrank bei 37° C. Danach wurde das Medium mittels Zellsieb (BD Falcon) filtriert und bei 1400 rpm für acht Minuten zentrifugiert. Nach dem Abgießen des Überstandes wurde das Pellet zweimal mit PBS gewaschen. Die gewonnenen Knorpelzellen wurden anschließend in Kulturflaschen überführt

und mit Kulturmedium Hams F- 12 plus 10%- igen FCS unter Zusatz von 1%- igen Antibiotikum (Penicillin, Streptomycin) bei 37° C im Brutschrank kultiviert. Der Wechsel des Kulturmediums erfolgte alle zwei bis drei Tage. Für die Versuche wurden ausschließlich Primärzellen und Zellen der ersten und zweiten Passage verwendet.

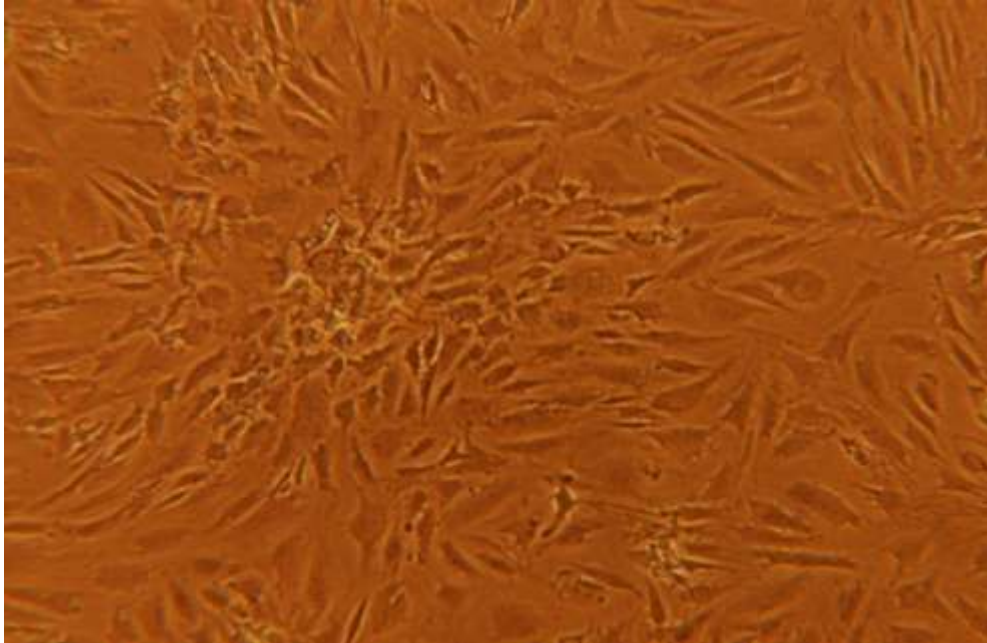


Abb.5: Humane Chondrozyten in Monolayerkultur nach zehn Tagen

2.2.2 Anzucht von *P. gingivalis* ATCC 33277

Herstellung des Nähr- Agars

Der Columbia- Agar (40g/ l) wurde abgewogen und in destilliertes Wasser gegeben. Dieses Gemisch wurde zum Kochen gebracht und bei 121° C für 15 Minuten autoklaviert. Anschließend wurde der Columbia- Agar auf 50° C abgekühlt. Danach erfolgte die Zugabe von 2,5 ml Vitamin K- Cocktail und 25 ml 5%- iges Schafsblut. Dann wurde der Columbia- Agar in Petrischalen ausgegossen.

Anzucht des Keims

Der Stock von *P. gingivalis* ATCC (American Type Culture Collection, Manassas, Va) wurde aufgetaut und jeweils 100 µl des Keims wurden auf den Blutagarplatten ausgestrichen. Die beimpften Agarplatten lagerten im Anaerobiertopf (mit AnaeroGen) bei 37° C im Brutschrank.

Nach zwei bis drei Tagen Verweildauer im Brutschrank wurden von der Hauptkultur des Keims Subkulturen angelegt. Die gekühlten Agarplatten wurden unter sterilen Bedingungen getrocknet und durchnummeriert. Von der Hauptkultur A wurde der Keim mit einer sterilen Öse aufgenommen und auf neue Agarplatten ausgestrichen, so dass eine Subkultur A entstand. Nach dem Prinzip Hauptkultur A zu Subkultur A, Hauptkultur B zu Subkultur B. Danach erfolgte die Lagerung der Subkulturen im Brutschrank bei 37° C. Es wurden alle zwei bis drei Tage erneute Subkulturen angelegt. Für die Versuche sind ausschließlich Stämmen von *P. gingivalis* ATCC 33277 benutzt worden.



Abb.6: Zellkultur von *P. gingivalis* auf Blutagar (A) ausgestrichen und (B) als Einzelkolonien

2.2.3 Darstellung der Wachstumskurve von *P. gingivalis*

Der Keim *P. gingivalis* wurde von den Agarplatten mittels steriler Öse in BHI- Medium überführt. Dann erfolgte die Bestimmung der optischen Dichte (OD) mit Hilfe eines Photometers (die OD sollte zwischen 0,9 und 1,2 bei 520 µm liegen). Danach wurde die Suspension mit dem Keim für 24 Stunden bei 37° C im Brutschrank gelagert. Anschließend wurden von dieser Bakteriensuspension 5 ml in 25 ml BHI überführt und im stündlichen Abstand die optische Dichte mittels Photometers bei 520 µm gemessen und protokolliert.

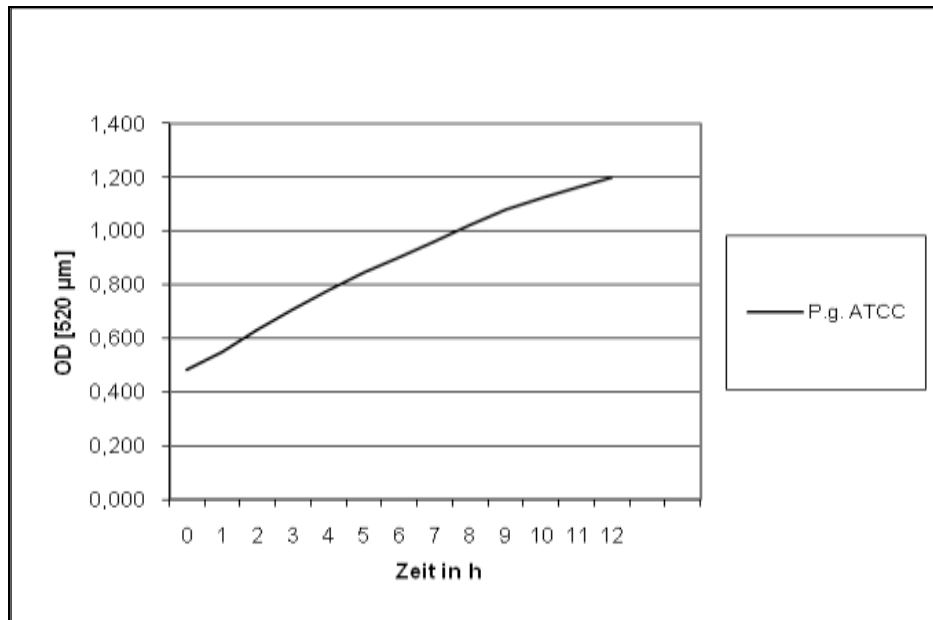


Abb.7: Grafische Darstellung des Wachstums von *P. gingivalis*

2.2.4 Überprüfung auf Reinheit von *P. gingivalis*

2.2.4.1 Durchführung einer Gram- Färbung

Zur Überprüfung der Reinheit des Keims wurden mikroskopische Präparate angefertigt und eine Gram- Färbung durchgeführt. Der Keim wurde mit einer Öse auf einem Objektträger aufgetragen und mit einem Tropfen NaCl auf dem Objektträger verrieben. Nachdem der Keim auf dem Objektträger an der Luft getrocknet war, erfolgte die Fixierung mittels Bunsenbrenners. Danach wurde der Objektträger für eine Minute vollständig mit Kristalviolettlösung bedeckt und anschließend mit Lugols- Lösung abgespült. Dann erfolgte die vollständige Bedeckung des Objektträgers mit Lugols- Lösung für eine Minute und die anschließende Spülung des Objektträgers mit destilliertem Wasser und Entfärbelösung. Dann wurde der Objektträger für eine Minute vollständig mit Safraninlösung bedeckt und anschließend wieder mit destilliertem Wasser abgespült. Abschließend erfolgte die Auswertung des Präparates unterm Lichtmikroskop.

2.2.4.2 Auswertung der Gram- Färbung

Bakterien lassen sich bezüglich des Zellhüllenaufbaus in zwei Gruppen unterteilen. Die Zellhülle der ersten Gruppe besteht aus einer mehrschichtigen Mureinschicht mit Teichonsäuren und einer inneren Zellmembran. Bakterien der zweiten Gruppe besitzen eine äußere Membran mit Lipopolysacchariden, einem dünnen, einschichtigen Mureinsacculus und einer inneren Zellmembran. Mittels Gram- Färbung lassen sich Rückschlüsse auf den Zellwandaufbau ziehen. Die grampositiven Bakterien mit der mehrschichtigen Mureinschicht färben sich mit Kristallviolettlösung und Lugolbeize blau und lassen sich nicht mit Alkohol entfärben. Die gramnegativen Bakterien, mit der einschichtigen Mureinschicht, entfärben sich unter Alkohol und färben sich nach Gegenfärbung mit Safraninlösung rot. Die getrockneten Präparate wurden mikroskopiert und ausgewertet. Man sah kleine rot- orange Bakterienkolonien. Da der Keim zu den gramnegativen Mikroorganismen gehört, war diese Methode hinweisend dafür, dass keine Verunreinigung durch grampositive Mikroorganismen stattgefunden hatte.

2.2.4.3 Identifizierung von *P. gingivalis* (Bunte Reihe)

Das API rapid ID 32 A bestand aus verschiedenen Suspensionen und einem Teststreifen mit verschiedenen Vertiefungen (siehe Abbildung 8). Im ersten Schritt erfolgte die Überführung des Keims in eine Biomerieux- Suspension (Mc Farland Nr. 4). Die Menge des zu überführenden Keims richtete sich nach der Trübung der Kontrollsuspension (Mc Farland Standards). Es wurden 55 µl Biomerieux- Suspension in jede Vertiefung des Teststreifens gegeben. Anschließend erfolgte die Bedeckung der Vertiefung 1.0 mit zwei Tropfen Paraffinöl und die Lagerung des Teststreifens für vier Stunden im Brutschrank bei 37° C. Danach wurde in die Vertiefung 0.0 ein Tropfen NIT 1 und ein Tropfen NIT 2 gegeben und in die Vertiefung 0.1 fügte man einen Tropfen JAMES- Reagenz hinzu. Im letzten Schritt erfolgte die Pipettierung von einem Tropfen FB- Reagenz in jede Vertiefung 0.2 (PAC) bis 0.E (SerA). Nach 15-minütiger Lagerung bei Raumtemperatur wurde das Ergebnis abgelesen und mit Hilfe eines Bakteriencodebuches der Profilindex (spezifische Reaktion der Bakterien mit den Suspensionen) der Erreger bestimmt.

2.2.4.4 Auswertung der Bunten Reihe

Das API rapid ID 32 A ermöglicht eine Identifizierung von anaeroben Erregern mittels standardisierter und miniaturisierter enzymatischer Reaktionen. Dieses System besteht aus 25 Streifen mit jeweils 32 Vertiefungen. 29 dieser Vertiefungen enthalten dehydratisierte Substrate für die Identifizierung. Alle Reaktionen auf dem Streifen sind in ein numerisches Profil codiert. Anhand der Farbreaktion ergibt das einen bestimmten Zahlencode, welcher mit Hilfe eines Ergebnisblattes bestimmt wird. Alle biochemischen Reaktionen sind auf diesem Ergebnisblatt in Dreier- Gruppen eingeteilt. Die positiven Reaktionen erhalten die Werte eins, zwei oder vier, je nach Stellung in der Dreier- Gruppe. Die negativen Reaktionen erhalten den Wert null. Dann werden die Werte jeder Gruppe addiert. Zum Schluss erhält man acht Zahlen (24 Reaktionen-acht Dreier- Gruppen), welche das numerische Profil ergeben. Mit Hilfe des Profilindexes für Bakterien wurden die Zahlen verglichen und dem Erreger *P. gingivalis* zugeordnet. Der Code war folgender: 0101 654 222.

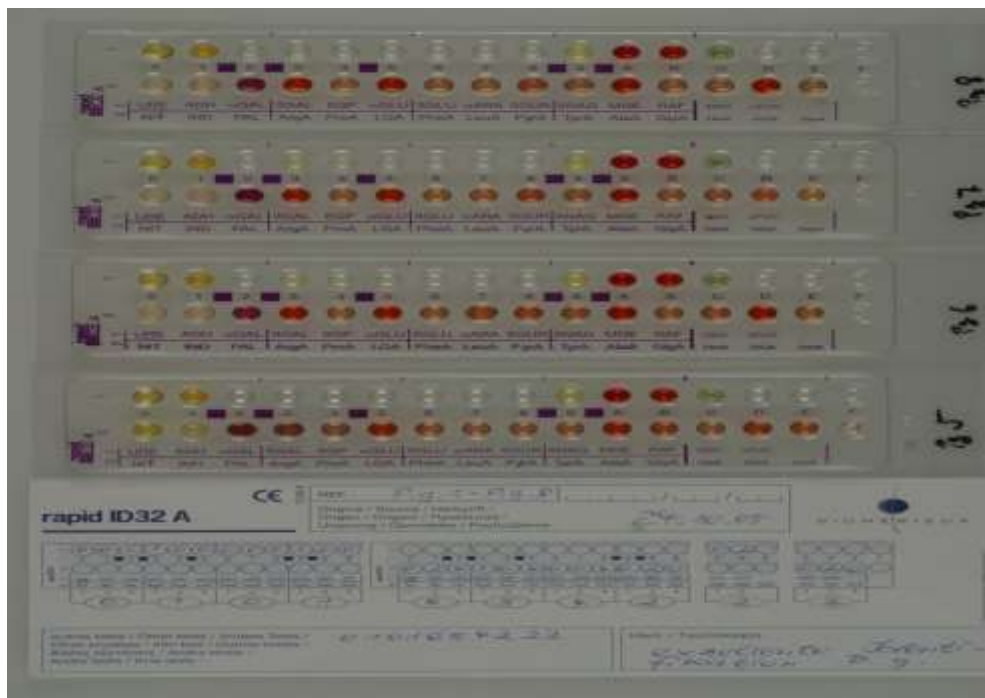


Abb.8: Teststreifen mit dem Zahlencode von *P. gingivalis*

2.2.5 Infektion von humanen Chondrozyten

Humane Chondrozyten wurden bis zur Subkonfluenz (80 Prozent Konfluenz) im Brutschrank bei 37° C und 5%- igen Kohlenstoffdioxid (CO₂) angezüchtet. *P. gingivalis* wurde von Columbia-Agar- Platten in Kulturmedium DMEM HAMS F- 12 überführt. Mittels Fotometers erfolgte die Bestimmung der OD. Mit einer OD von 0,5= 5x10⁷/ ml (MOI 100) wurden die humanen Chondrozyten mit *P. gingivalis* infiziert und im Brutschrank bei 37° C gelagert.

2.2.6 Untersuchung der Lage mittels Scanning- Elektronenmikroskopie

Die Interaktion und Adhäsion von *P. gingivalis* mit bzw. an humanen Chondrozyten wurde mittels SEM dargestellt. Humane Chondrozyten wurden auf Termanoxplättchen in 24- Well- Platten angezüchtet und mit *P. gingivalis* für zwei Stunden infiziert. Als Versuchskontrolle wurden Chondrozyten ohne Keimbeimpfung verwendet. Anschließend erfolgte die Fixierung der Zellen mit Karnowski- Lösung für 24 Stunden bei 4° C. Nach Dehydrierung der Proben in einer Ethanol- Serie (10, 30, 50, 70, 90, 100 %) auf Eis für jeweils zehn bis fünfzehn Minuten inkubierten die Zellen in 100%- igen Ethanol bei Raumtemperatur. Danach wurden alle Proben in flüssigem CO₂ getrocknet und mit einem etwa zehn nm dickem Goldfilm benetzt. Abschließend erfolgte die Auswertung mittels SEM (LEO 1530 Feld Emission Scanning- Elektronenmikroskop; LEO Elektronenmikroskopie GmbH, Oberkochen, Germany). Es wurden mindestens drei unabhängige Versuche durchgeführt, von denen repräsentative Bilder digital dokumentiert wurden.

2.2.7 Untersuchung der Invasion von *P. gingivalis* in humane Chondrozyten

Die Intrazellularität von *P. gingivalis* in humane Chondrozyten wurde mittels Invasionsassays untersucht. Die Durchführung der Methodik des Invasionsassays erfolgte nach einer bereits etablierten Methode [Walter et al. 2004]. Humane Chondrozyten wurden in 6- Well- Platten angezüchtet und mit *P. gingivalis* infiziert. Es wurden mindestens drei unabhängige Versuche durchgeführt, von denen repräsentative Daten digital dokumentiert sind.

Bestimmung der adhärierenden und intrazellulären Keime

Nach zweistündiger Infektion mit *P. gingivalis* wurde das Kulturmedium abgesaugt und anschließend zweimal mit PBS gewaschen. Anschließend erfolgte die Lyse der Chondrozyten mit sterilem Wasser für 30 Minuten und das Ausstreichen der Zellen auf Columbia- Agar-Platten. Abschließend wurden die Agar- Platten im Brutschrank bei 37° C unter anaeroben Bedingungen inkubiert. Nach sieben Tagen erfolgte die Auszählung der Colony forming units (CFU) von *P. gingivalis*.

Untersuchung der invasiven Keimzahl

Nach zweistündiger Infektion mit *P. gingivalis* wurde das Kulturmedium abgesaugt und anschließend zweimal mit PBS gewaschen. Zur Bestimmung der intrazellulären Keime erfolgte die Zugabe von Kulturmedium als auch Metronidazol und Gentamycin (zwei ml pro Well), um die extrazellulären Keime abzutöten. Anschließend wurden die Zellen im Brutschrank für 2,5 Stunden bei 37° C inkubiert. Danach erfolgte die Lyse der Zellen mit sterilem Wasser. Anschließend wurden die Chondrozyten auf Columbia- Agar- Platten ausgestrichen und im Brutschrank bei 37° C unter anaeroben Bedingungen inkubiert. Nach den sieben Tagen erfolgt die Auszählung der CFU von *P. gingivalis*.

2.2.8 Immunfluoreszenzfärbung und konfokale Lasermikroskopie

Die Chondrozyten wurden auf Glasplättchen in 24- Well- Platten angezüchtet und mit *P. gingivalis* für eine, drei oder sechs Stunden infiziert. Als Kontrolle dienten Chondrozyten ohne Keimbeimpfung. Nach jedem Arbeitsschritt wurden die Zellen ein bis dreimal mit PBS gewaschen. Zur Auswertung mittels KLM (Carl Zeiss Laser Scanning System, LSM 5 Pascal, Objektiv: 63x NA:1.4 Plan- Aplanochromat Carl Zeiss, Jena, Deutschland), wurden die Glasplättchen mit den Chondrozyten mittels Permaflour (Eindeckmedium) auf dem Objektträger eingedeckelt und mit Nagellack versiegelt. Es wurden jeweils mindestens drei unabhängige Versuche durchgeführt, von denen repräsentative Bilder digital dokumentiert sind.

Einfachfärbung

Zur Darstellung der Interaktion von *P. gingivalis* mit humanen Chondrozyten wurde eine Immunfluoreszenzfärbung durchgeführt. Die infizierten Chondrozyten wurden mit frisch angesetztem 3%-igen Paraformaldehyd (PFA) mit einem pH-Wert von 7,6 für 20 Minuten bei Raumtemperatur fixiert. Anschließend erfolgte die 15-minütige Permeabilisierung der fixierten Zellen mit einprozentigem Triton X100 bei RT. Danach wurden die unspezifischen Bindungsstellen mittels einer 30-minütigen Blockade (fünf Prozent Ziegen-Serum in Verdünnungsmedium (VM)) bei RT abgebunden und es erfolgte die Inkubation mit dem primären AK im Verhältnis 1:200 in VM für 30 Minuten bei RT. Anschließend wurden die Zellen mit dem sekundären AK A 546 im Verhältnis 1:8000 in VM für 12 Stunden bei 4° C im Dunkeln inkubiert. Abschließend erfolgte die 30-minütige Inkubation der Zellen mit Phalloidin 488 in VM im Verhältnis 1:200 zur Visualisierung des Aktinzytoskelettes, bei RT im Dunkeln.

Doppelfärbung

Um die intra- und extrazelluläre Lokalisation von *P. gingivalis* zu unterscheiden, wurde eine doppelte Immunfluoreszenzfärbung nach einer bereits etablierten Methode durchgeführt [Hocke et al. 2008]. Infizierte Chondrozyten wurden mit frisch angesetztem 3%-igen PFA für 20 Minuten bei RT fixiert. Die unspezifischen Bindungsstellen wurden mittels einer 30-minütigen Blockade (siehe Einzelfärbung) bei RT abgebunden. Zunächst erfolgte die Anfärbung von extrazellulären Keimen, wobei keine Permeabilisierung stattfand. Die Zellen wurden mit dem primären AK im Verhältnis 1:200 in VM für 30 Minuten bei RT inkubiert. Die Detektion der adhärenierenden Bakterien erfolgte mittels grün fluoreszierenden sekundären AK A 488 in VM im Verhältnis 1:8000 für 12 Stunden bei 4° C im Dunkeln. Dann wurden die Zellen mit einprozentigem Triton X100 für 15 Minuten bei RT permeabilisiert, um die intrazellulären Keime nachzuweisen. Anschließend wurden die Zellen erneut mit dem primären AK in VM im Verhältnis 1:200 für 30 Minuten bei RT inkubiert und abschließend mit dem rot fluoreszierenden sekundären AK A 546 im Verhältnis 1:8000 in VM für 12 Stunden bei 4° C im Dunkeln inkubiert.

TUNEL-Färbung

Der Einfluss von *P. gingivalis* auf die Apoptose von humanen Chondrozyten wurde mittels TUNEL-Immunfluoreszenz untersucht. Mit Hilfe der terminalen Desoxynukleotidyltransferase (TdT), welche die Polymerisation von Nukleotiden an freien 3-OH DNA-Enden katalysiert, ist

es möglich, apoptosespezifische DNA-Strangbrüche nachzuweisen. Die Methodik der TUNEL-Färbung wurde nach einer bereits etablierten Methode durchgeführt [Hocke et al. 2008]. Die Chondrozyten wurden auf Glasplättchen angezchtet und mit *P. gingivalis* für zwei, vier oder sechs Stunden infiziert. Die Kontrolle der Apoptose erfolgte mittels Beimpfung mit Staurosporin (1 μ M). Die infizierten Chondrozyten wurden mit frisch angesetzttem 3%-igen PFA mit einem pH-Wert von 7,6 für 20 Minuten bei RT fixiert und anschließend mit 0,1%-igen Triton X100 in NaCitrat (0,1 M; pH 6,0) auf Eis für zwei Minuten permeabilisiert. Dann erfolgte die 60-minütige Inkubation der Chondrozyten mit der fluoreszierenden TUNEL-Reagenz bei 37° C im Brutschrank. Für eine Stabilisierung des Fluoreszenzsignals wurden die Zellen mit Alexa 488 gelabelten anti FITC AK für 60 Minuten bei 37° C im Brutschrank inkubiert. Abschließend wurden die Zellen mit Phalloidin 546 im Verhältnis 1:200 in VM zur Visualisierung des Aktinzytoskelettes für 30 Minuten bei RT im Dunkeln inkubiert.



Abb.9: Konfokales Lasermikroskop

2.2.9 Bestimmung des DNA- Gehalts von humanen Chondrozyten

Der Einfluss von *P. gingivalis* auf den Zellzyklus von humanen Chondrozyten wurde mittels FACS- Analyse untersucht. FACS- Geräte sind Laboranalytoren, die die Fluoreszenz von unterschiedlich großen Partikeln messen während diese durch ein Glasröhrchen fließen und von einem Laser bestrahlt werden. Um den DNA- Gehalt der Zellen zu bestimmen, wurden diese mit Propidium Iodid (PI) markiert. PI bindet unspezifisch an die DNA einer Zelle. Der DNA- Gehalt einer Zelle richtet sich nach dem Zyklusstadium. Während Zellen in der G1- Phase nur einen einfachen DNA- Gehalt besitzen, haben Zellen in der G2/ M- Phase einen doppelten DNA- Gehalt. Die RNase wurde benutzt um die unspezifischen Bindungen des PIs an der RNA zu unterbinden. Die Chondrozyten wurden in 6- Well- Platten kultiviert, mit *P. gingivalis* für zwei Stunden infiziert und anschließend zwei bis drei mal mit sterilem PBS gewaschen. Dann erfolgte das Ablösen der Chondrozyten vom Boden mittels Trypsin (zirka 500 µl/ Well) und die Überführung der Zellen in Falcon- Röhrchen. Danach wurden 2 ml Medium mit 10%- iges FCS hinzugegeben. Die abgelösten Zellen wurden bei 800 U/ Minute für etwa zehn Minuten und 4° C zentrifugiert und nochmals mit kaltem PBS mit 2%- igem FCS gewaschen. Die Fixierung der Zellen erfolgte mittels 300 µl kaltem PBS mit 2%- igem FCS sowie 700 µl kaltem 100%- igem Ethanol für 30 Minuten bei 4° C. Nach erneutem Waschen mit kaltem PBS mit 2%- igem FCS erfolgte die Zugabe von 600 µl kaltem PBS mit 2%- igem FCS sowie 4.86 µl RNase A und 6 µl PI. Als Kontrollen wurden Zellen ohne Infektion mit *P. gingivalis* verwendet sowie Chondrozyten ohne Zugabe von PI. Die Auswertung erfolgte mittels FACS- Gerät (BD Biosciences). Es wurden mindestens drei unabhängige Versuche durchgeführt, von denen repräsentative Daten digital dokumentiert sind.

2.2.10 Durchführung des Caspase 3- Western- Blot- Verfahrens

Das Western- Blot- Verfahren ist eine Methode, bei der mittels Gelelektrophorese spezifische Proteine getrennt und durch spezifische Antikörper die Proteine nachgewiesen werden. Die humanen Chondrozyten wurden in 6- Well- Platten kultiviert und mit *P. gingivalis* für 30 Minuten, eine, zwei oder sechs Stunden bei 37° C infiziert. Als Kontrolle dienten Chondrozyten ohne Keimbeimpfung. Zur Kontrolle für Apoptose wurden die Zellen mit Staurosporin (1µM) beimpft.

Es wurden mindestens drei unabhängige Versuche durchgeführt, von denen repräsentative Daten digital dokumentiert sind.

Herstellung der Proben

Die 6- Well- Platten wurden zentrifugiert und der Überstand wurde verworfen. Anschließend erfolgte die Lyse der Pellets mittels Lysepuffer auf Eis und die Überführung in Eppendorf-Röhrchen. Danach erfolgte die Proteinbestimmung nach Bradford. Es wurden je ein ml Bradfordreagenz (Biorad Lab.) zu je fünf µl des gelösten Pellets gegeben. Dabei bindet die Bradfordreagenz unspezifisch an Proteine und es erfolgt ein Farbumschlag von rot nach blau. Der Proteingehalt wurde mittels Fotometer bei einer OD von 595 nm bestimmt. Die Berechnung der benötigten Mengen für die Gel- Elektrophorese richtete sich nach dem Proteingehalt der Proben. Nach Zugabe des Lämmli- Puffers (Biorad Lab.) wurden die Proben bei 94° C für fünf Minuten erhitzt und auf das Gel aufgetragen.

Trennung der Proteine

Mittels der Elektrophorese wurden die Proteine getrennt. Dazu wurden die Proben auf ein Polyacrylamidgel aufgetragen. Das Gel besteht aus zwei Anteilen, einem Sammelgel zur Bündelung der Proteine und einem Trenngel zur Trennung der einzelnen Fraktionen. Nach der Herstellung der Gele wurden diese zwischen zwei Glasplatten gegossen, zuerst das Trenn- und darüber das Sammelgel. Nach dem Antrocknen der Gele wurden diese in eine Elektrophoresekammer mit Laufpuffer eingespannt und die Proben in die einzelnen Kammern aufgetragen. Die Trennung lief bei 100 bis 130 V für etwa 1,5 Stunden. Nach der Proteintrennung erfolgte die Überführung der Fraktionen auf eine Nitrozellulosemembran (Amersham). In einem elektrischen Feld wanderten die negativ geladenen Proteine vom Gel auf die Membran in Richtung Anode. Der Transfer lief bei 100 V für eine Stunde mittels eiskaltem Blottingpuffer. Zur Kontrolle des Transfers wurde die Membran nach Porceau gefärbt, anschließend mit destilliertem Wasser gespült und für eine Stunde mittels Odyssey Blocking Puffer (LICOR Inc.) geblockt. Danach erfolgte die Inkubation mit dem Caspase 3- AK und dem ERK- AK (Proteinbeladungskontrolle) im Verhältnis 1:2000 für ein bis zwei Stunden bei RT. Nach mehrmaligem Waschen der Membran mit PBS mit 0,1%- igen Tween erfolgte die Inkubation mit den fluochromgekoppelten sekundären Antikörpern im Verhältnis 1: 2000 für eine Stunde bei RT im Dunkeln. Anschließend wurde die Membran erneut mit PBS mit 0,1%- igen Tween gewaschen.

Die Auswertung der Proteinbanden erfolgte mittels Odyssey Infrarot Imaging System (LICOR Inc., Lincoln USA).

2.2.11 Untersuchung der Zellnekrose mittels LDH- Konzentrations- Assays

Zum Nachweis einer möglichen Nekrose wurde die LDH- Konzentration von humanen Chondrozyten nach Infektion mit *P. gingivalis* bestimmt. Die Chondrozyten wurden in 24- Well- Platten angezüchtet und mit *P. gingivalis* für zwei, vier oder sechs Stunden infiziert. Als Kontrolle dienten Chondrozyten ohne Keimbeimpfung. Die Kontrolle der Nekrose erfolgte durch Beimpfung der Zellen mit 2%- igem Triton X100. Nach der Infektion mit *P. gingivalis* wurde das Medium abgezogen und jeweils 100 µl/ Well in eine 96- Well- Platte überführt. Anschließend erfolgte die Zugabe der Reaktionslösung (100µl/ Well), so dass sich insgesamt 200 µl in jedem Well befanden. Danach wurden die Platten bei 800 U/ Minute für zehn Minuten zentrifugiert, der Überstand erneut abgezogen und in eine neue 96- Well- Platte überführt. Die zügige Auswertung der Proben erfolgte mittels Elisa Reader oder Fotometer bei 490nm. Es wurden mindestens drei unabhängige Versuche durchgeführt, von denen repräsentative Daten digital dokumentiert sind.

2.2.12 Statistische Analyse

Alle Versuche wurden mindestens dreimal durchgeführt und repräsentative Daten digital dokumentiert. Für die Auswertung der Statistik wurde ein paariger T- Test mit gleichen Variablen benutzt. Ein p- Wert < 0.05 gilt als signifikant.

3 Ergebnisse

3.1 Adhäsion und Invasion von *P. gingivalis* in Chondrozyten

3.1.1 Scanning- Elektronenmikroskopischer Nachweis der Adhäsion

Um eine Interaktion und Adhäsion von *P. gingivalis* mit bzw. an humanen Chondrozyten zu untersuchen, wurden SEM- Präparate angefertigt. Humane Chondrozyten wurden auf Termanoxplättchen in 24- Well- Platten bis zur Sub- Konfluenz angezchtet und anschließend mit *P. gingivalis* für zwei Stunden infiziert. Die Scanning- Elektronenmikroskopische Darstellung zeigt eine Adhäsion und eine enge Interaktion von *P. gingivalis* an bzw. mit humanen Chondrozyten.

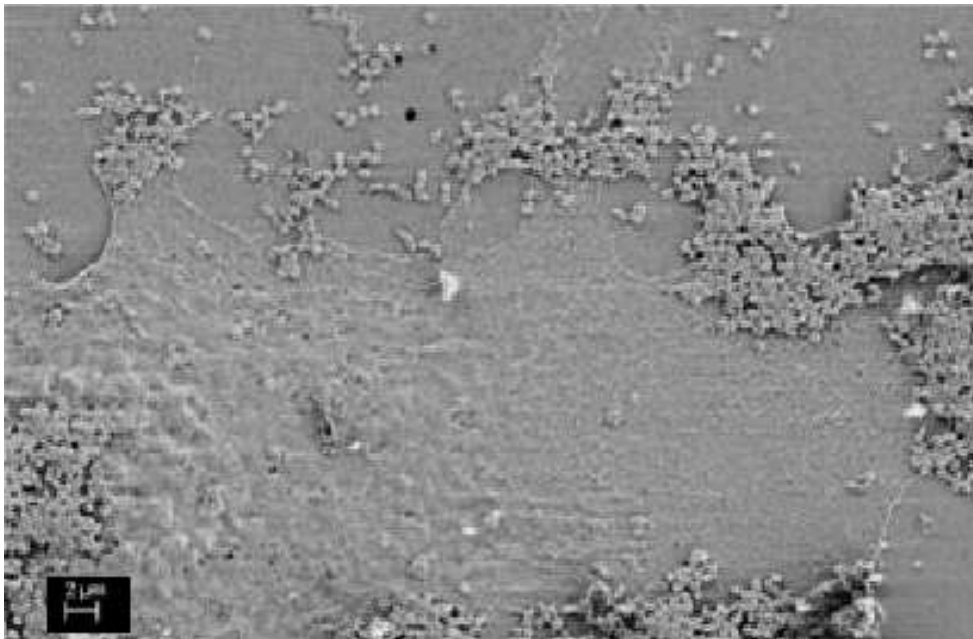


Abb.10: SEM- Übersichtsaufnahme eines humanen Chondrozyten mit adhätierendem *P. gingivalis*

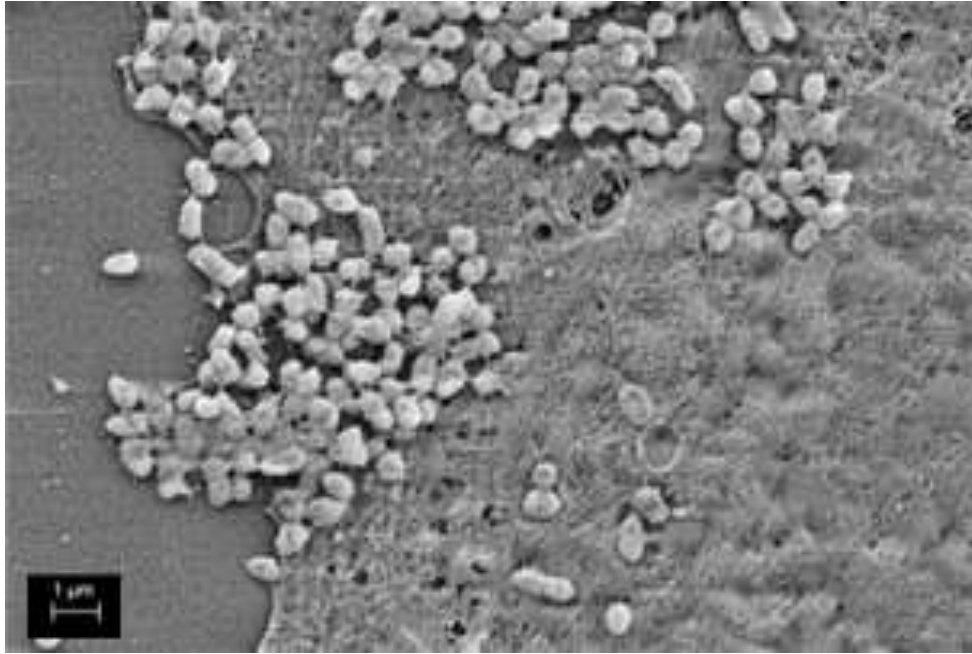


Abb.11: SEM- Nahaufnahme der Zelloberfläche von humanen Chondrozyten mit adhätierendem *P. gingivalis*

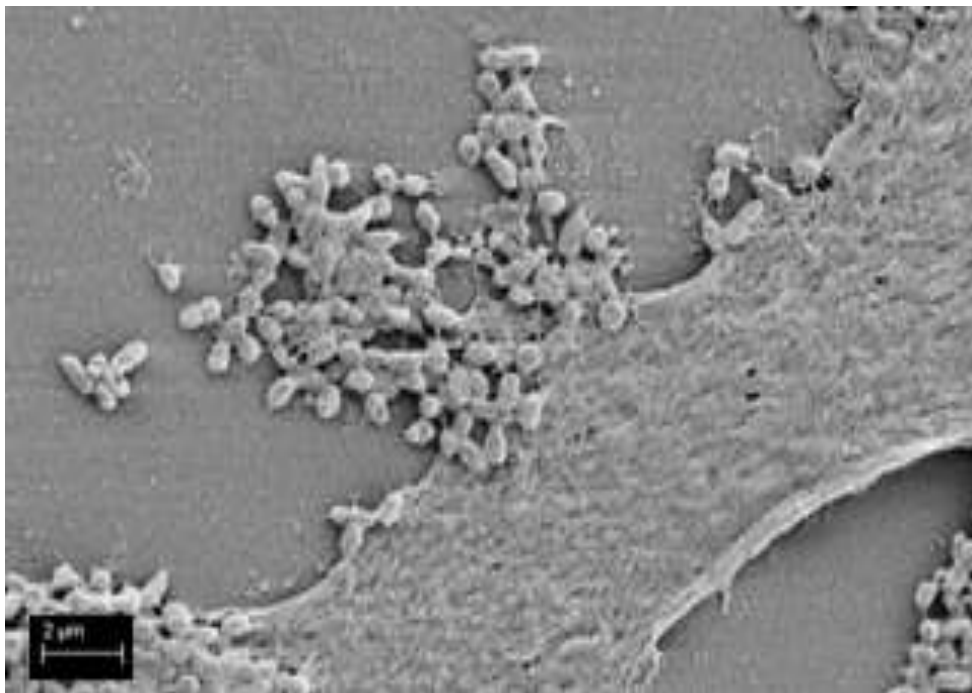


Abb.12: SEM- Nahaufnahme eines Chondrozytenausläufers mit einer Adhäsion und Interaktion von bzw. mit *P. gingivalis*

3.1.2 Darstellung der Adhäsion mittels konfokaler Lasermikroskopie

Zur weiteren Darstellung der Adhäsion und Interaktion von *P. gingivalis* an bzw. mit humanen Chondrozyten wurde eine Färbung und Analyse mittels KLM durchgeführt. Nach einer Infektion mit *P. gingivalis* erfolgte die Markierung des Erregers und der infizierten Chondrozyten mittels AK und Phalloidin. Die Chondrozyten stellen sich grün, *P. gingivalis* rot dar. Die Abbildung zeigt eine Adhäsion und Interaktion von *P. gingivalis* zu bzw. mit humanen Chondrozyten.

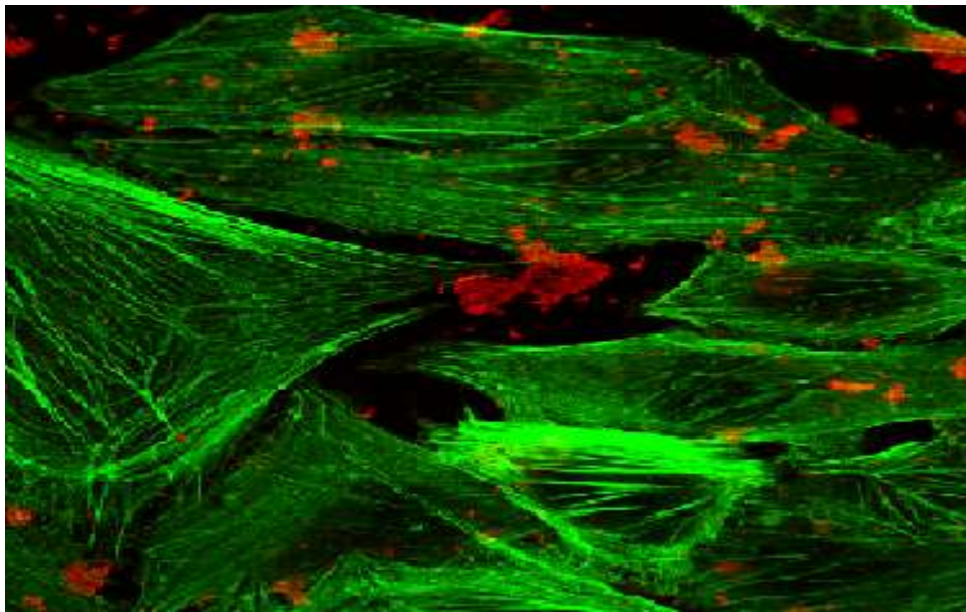


Abb.13: Interaktion zwischen *P. gingivalis* und humanen Chondrozyten

3.1.3 Nachweis der Invasion von *P. gingivalis* mittels Invasionsassays

Das modifizierte Antibiotika- Protection- und Invasionsassay untersucht quantitativ den Anteil an intra- und extrazellulären Keimen. Humane Chondrozyten wurden mit *P. gingivalis* infiziert. Die Bestimmung der intrazellulären Keimzahl erfolgte durch Zugabe von Antibiotika zur Tötung der extrazellulären Bakterien. Das Ergebnis zeigt eine Invasion von *P. gingivalis* in humane Chondrozyten mit einer CFU von $7,7 \times 10^4$.

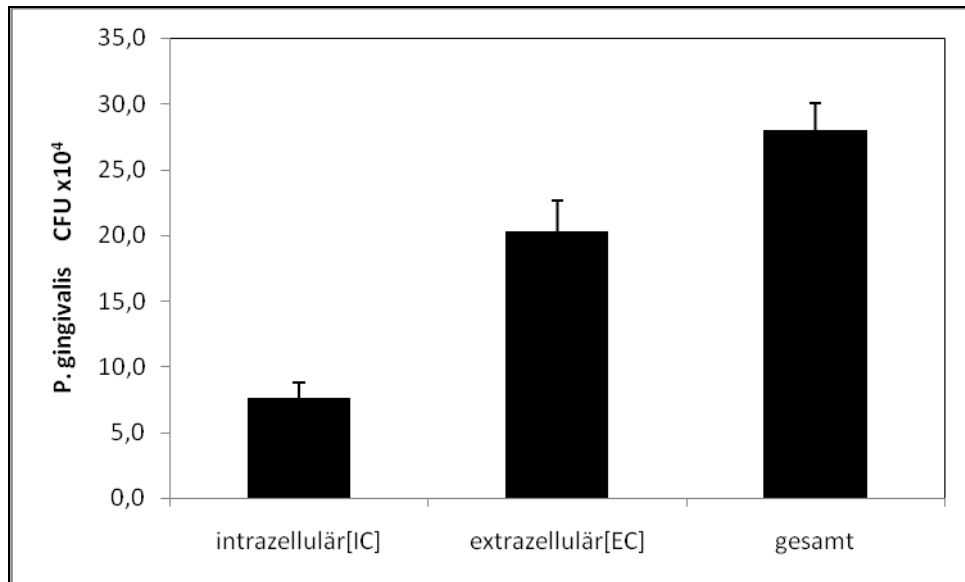


Abb.14: Grafische Darstellung der Invasion von *P. gingivalis* in humane Chondrozyten

3.1.4. Bestätigung der Invasion mittels konfokaler Lasermikroskopie

Die Darstellung von *P. gingivalis* in der Doppelfärbung mittels konfokaler Lasermikroskopie zeigt qualitativ die Invasion des Keims in humane Chondrozyten. Nach Infektion mit *P. gingivalis* wurden die extrazellulären Keime mit dem ersten Antikörper (grüner Kanal) markiert. Nach dem permabilisieren der Chondrozyten wurden die extra- und intrazellulären Bakterien mit dem zweiten Antikörper (roter Kanal) markiert. Um extrazelluläre Keime und intrazelluläre Keime voneinander zu unterscheiden, wurden beide Kanäle gleichzeitig dargestellt. Nach Überlagerung der Kanäle erschienen die extrazellulären Keime gelb und die intrazellulären Keime rot. Die Abbildung 17 zeigt eine Invasion von *P. gingivalis* (weißer Pfeil) in humane Chondrozyten.

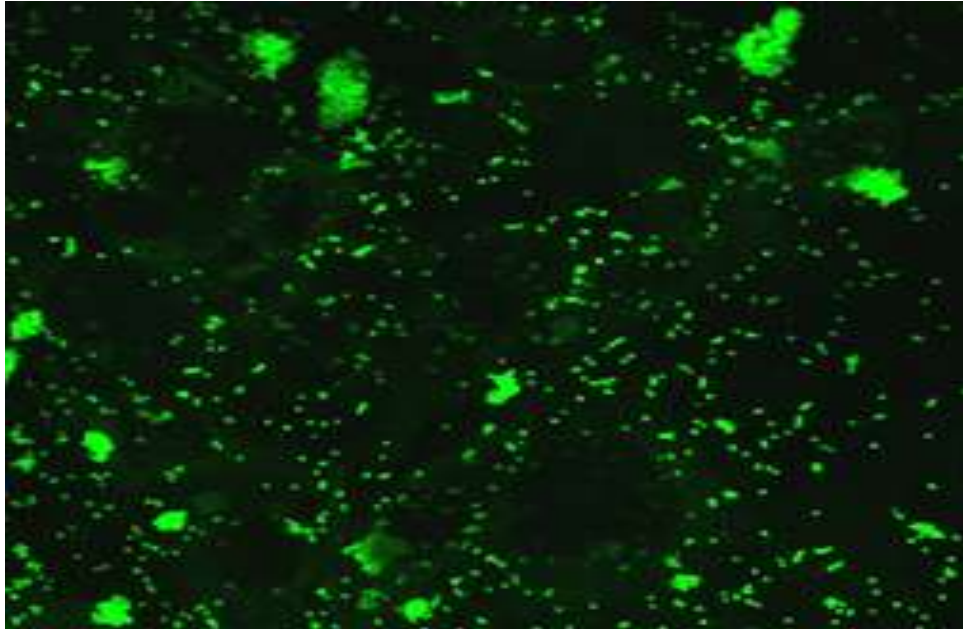


Abb.15: Extrazellulärer *P. gingivalis*, grün markiert ohne Permeabilisierung der Chondrozyten

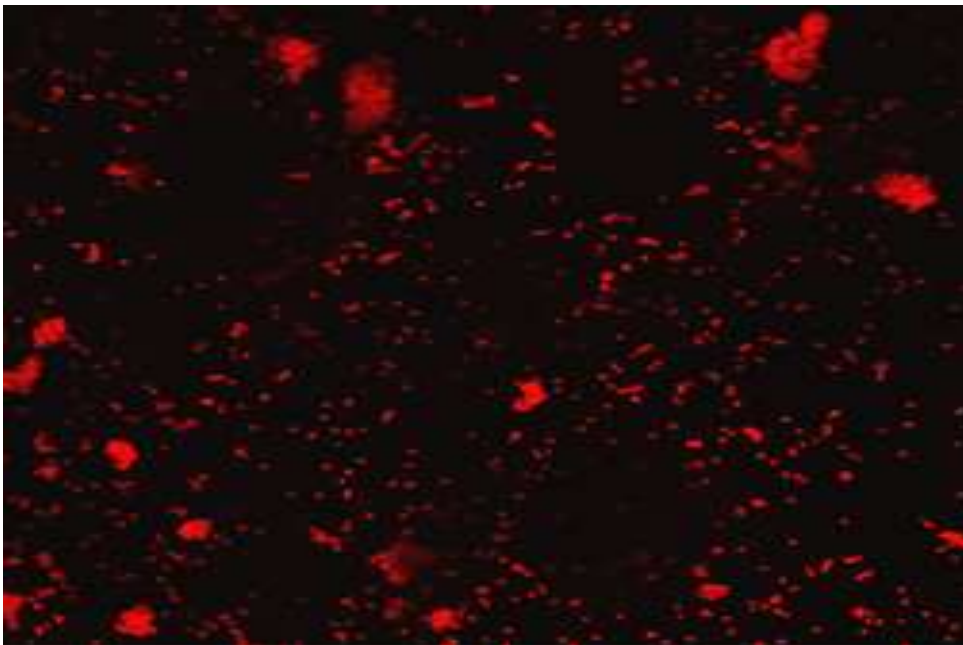


Abb.16: Extra- und intrazellulärer *P. gingivalis*, rot markiert nach Permeabilisierung der Chondrozyten

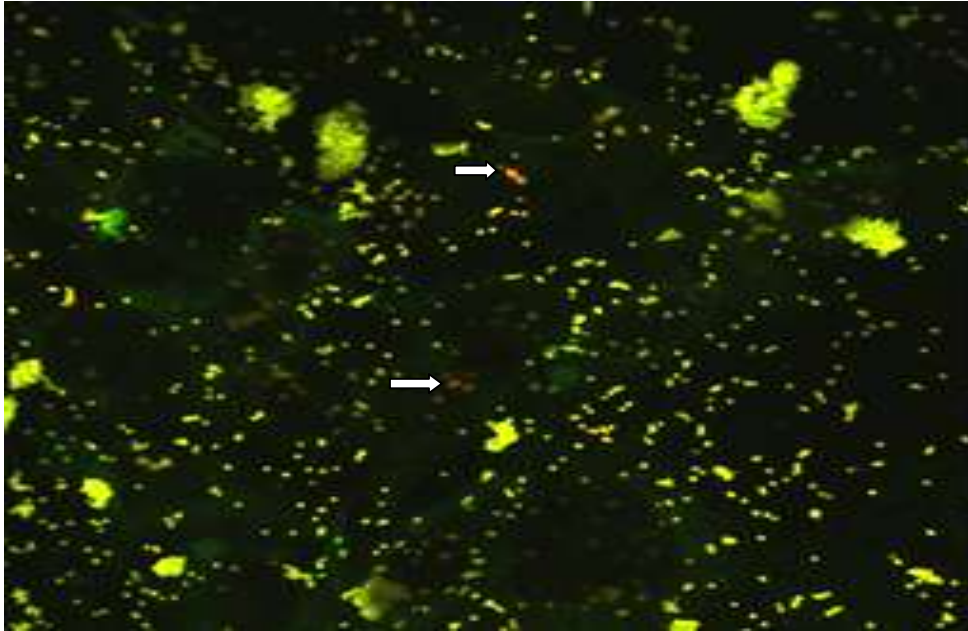


Abb.17: Extra- und intrazellulärer *P. gingivalis* nach Überlagerung der Kanäle, die intrazellulären Erreger sind rot markiert (siehe Pfeil)

3.2 Einfluss von *P. gingivalis* auf den Zellzyklus von humanen Chondrozyten

3.2.1 Darstellung von Zellzyklusveränderungen mittels FACS- Analyse

Die Abbildungen 18 bis 21 zeigen die Zellzyklusveränderungen von humanen Chondrozyten nach Infektion mit *P. gingivalis*. Die FACS- Analyse zeigt eine prozentuale Zunahme der in der G1- Phase befindlichen Zellen nach Infektion mit *P. gingivalis*, im Vergleich zu nicht infizierten Chondrozyten ($69,41 \pm 7,67$ gegen $61,41 \pm 1,62$) und eine prozentuale Abnahme der Chondrozyten in der S- Phase ($11,15 \pm 6,70$ gegen $12,51 \pm 2,26$) sowie eine deutliche Abnahme Chondrozytenanzahl in der G2/ M- Phase ($9,61 \pm 1,070$ gegen $26,08 \pm 3,76$) nach Infektion mit *P. gingivalis*.

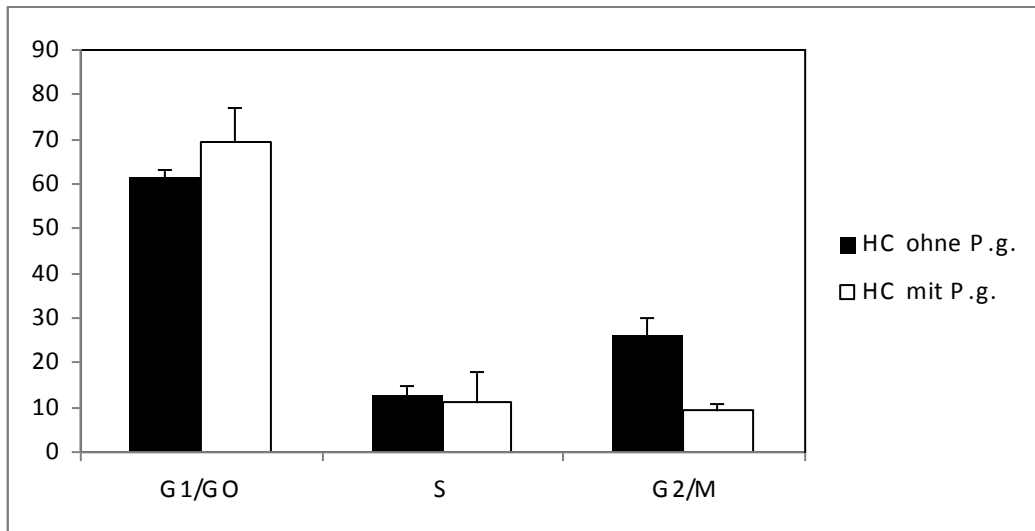


Abb.18: Grafische Darstellung der Mittelwerte der Zyklusphasen von infizierten Chondrozyten (in Prozent) im Vergleich zur nicht-infizierten Kontrollgruppe

Vergleichsgruppen	Zellzyklusphasen (MW±STABW)		
	G1/G0	S	G2/M
Chondrozyten ohne Infektion	61,41±1,62	12,51±2,26	26,08±3,76
Chondrozyten nach Infektion	69,24±7,67	11,15±6,70	9,61±1,070

Abb.19: Tabellarische Darstellung, Mittelwerte der verschiedenen Zellzyklusphasen von Chondrozyten mit und ohne Infektion mit *P. gingivalis*

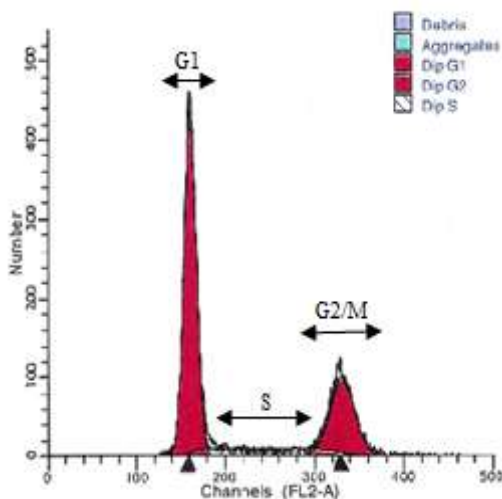


Abb.20: Grafische Darstellung der Zellzyklusphasen einer nicht- infizierten Kontrollgruppe (exemplarisches Beispiel)

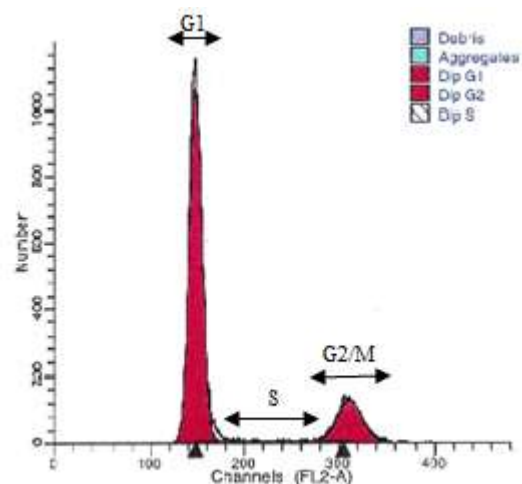


Abb.21: Zellzyklusphasen einer humanen Chondrozytenkultur nach Infektion mit *P.gingivalis* (exemplarisches Beispiel)

3.3 Quantifizierung der Apoptose von infizierten humanen Chondrozyten

3.3.1 Darstellung von DNA- Fragmentierung mittels TUNEL- Färbung

Während der Apoptose einer Zelle entstehen durch Nukleaseaktivität DNA-Strangbrüche. Die dabei entstehenden Enden werden mittels einer Terminalen Desoxyribosyl-Transferase mit einem Fluoreszin-markierten Nukleotid verbunden. Chondrozyten mit grünem Zellkern sind Apoptose-positive Zellen. Als Kontrolle der Apoptose diente das Zellgift Staurosporin (1 μ M), das Apoptose induziert. Als eine weitere Kontrolle wurden nicht-infizierte Zellen verwendet. Das Ergebnis zeigt, dass *P. gingivalis* nach Infektion von humanen Chondrozyten signifikant Apoptose in humanen Chondrozyten induziert. Es konnte ein schädigender Einfluss auf das Zytoskelett durch eine Zunahme von Stressfasern der infizierten Chondrozyten beobachtet werden.

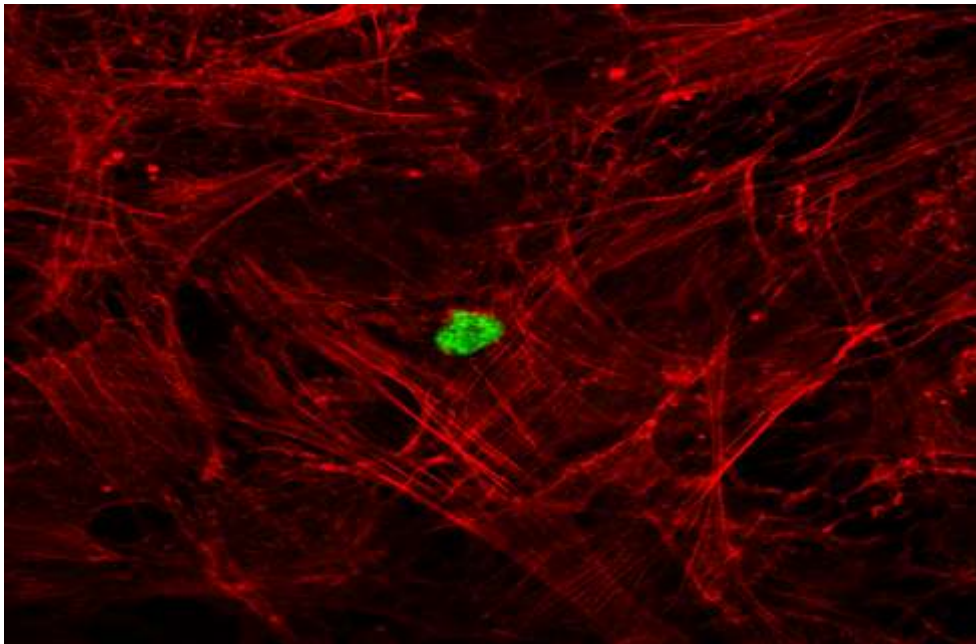


Abb.22: Chondrozyten mit intaktem Zytoskelett ohne Beimpfung mit *P. gingivalis*

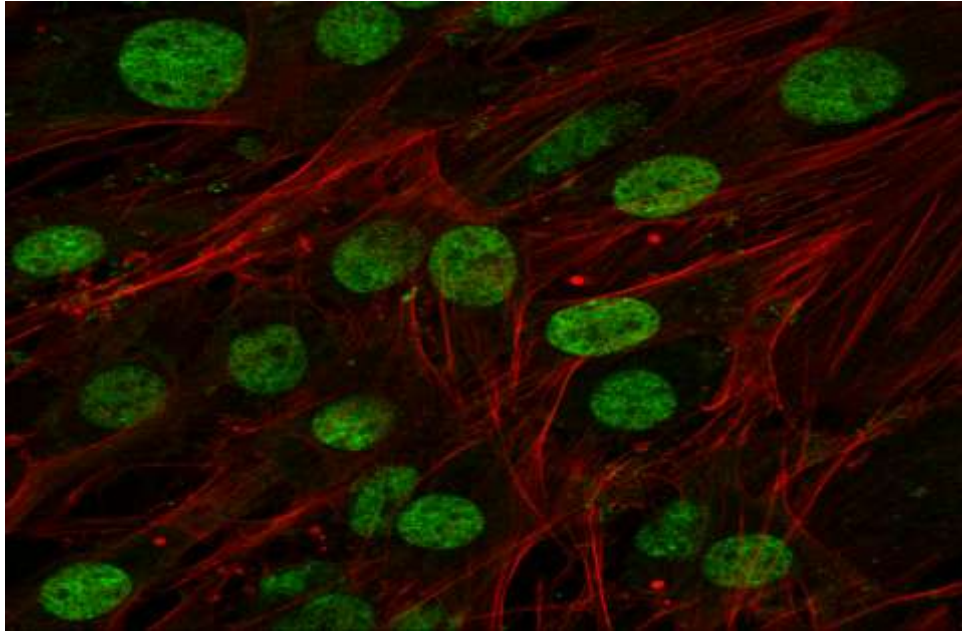


Abb.23: TUNEL- positive Chondrozyten mit Stressfasern und leicht geschädigtem Zytoskelett nach Beimpfung mit *P. gingivalis* für zwei Stunden

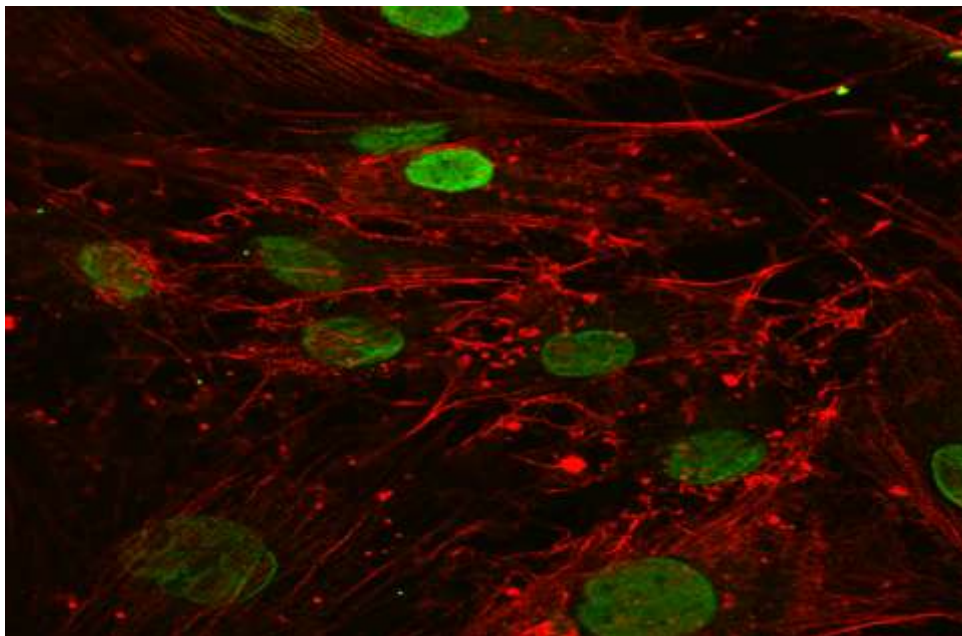


Abb.24: TUNEL- positive Chondrozyten mit vermehrten Stressfasern und unscharfen Zellmembranen nach Beimpfung mit *P. gingivalis* für vier Stunden

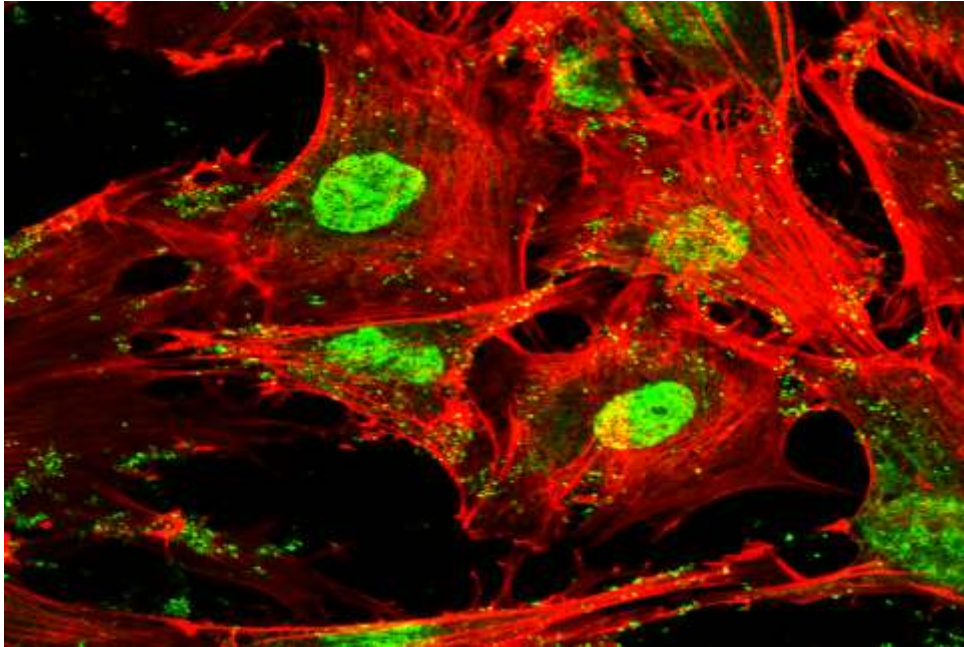


Abb.25: TUNEL- positive Chondrozyten mit stark geschädigtem Zytoskelett und vermehrten Stressfasern nach Beimpfung mit *P. gingivalis* für sechs Stunden

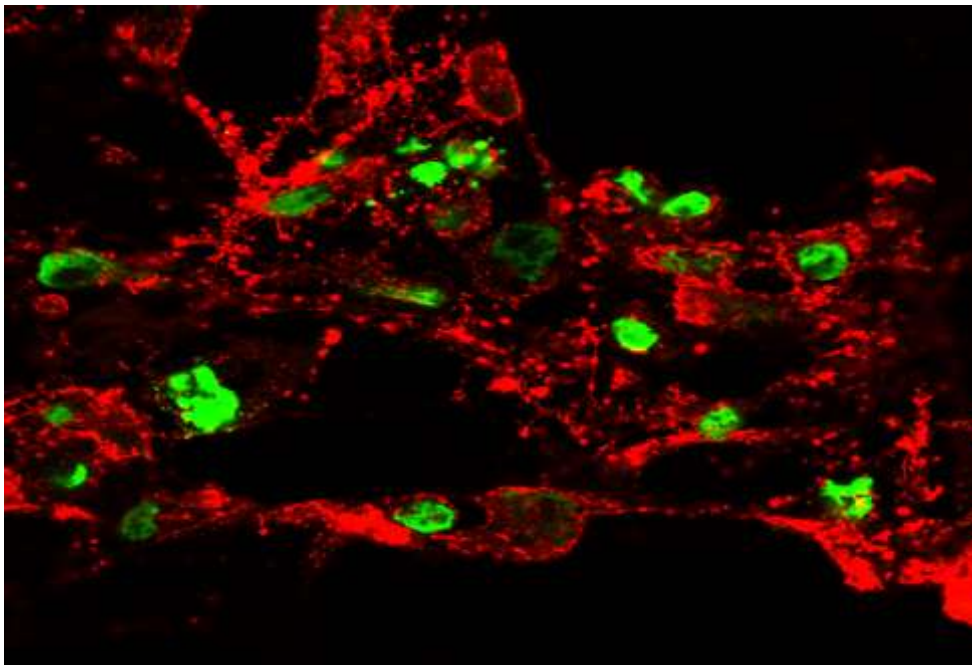


Abb.26: TUNEL- positive Chondozyten ohne erkennbare Zellstruktur mit total defektem Zytoskelett und deutlicher Zellschrumpfung nach Beimpfung mit Staurosporin (1 μ M) für zwei Stunden.

3.3.2 Nachweis von Caspase 3 mittels Western- Blot- Verfahren

Eine weitere Untersuchung der Apoptose ist der Nachweis von Caspase 3. Das Western- Blot- Verfahren ist eine Methode, bei der mittels Gelelektrophorese Proteine aufgetrennt und mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen werden. Nach Infektion der Chondrozyten mit *P. gingivalis* wurden die Zellproteine mittels Gelelektrophorese fragmentiert und die Caspase 3 gemessen. Als Positivkontrolle der Apoptose diente Staurosporin (1 μ M). Als weitere Kontrolle wurde die Caspase 3 von unbehandelten Chondrozyten bestimmt. Abbildung 27 zeigt keine erhöhte Caspase 3 in unbehandelten Zellen sowie in infizierten Zellen für 30 Minuten und sechs Stunden. Nach Infektionszeiten von einer sowie nach zwei Stunden konnte ein Anstieg der Caspase 3 beobachtet werden. Chondrozyten, die mit Staurosporin behandelt wurden, zeigen eine erhöhte Caspase 3.

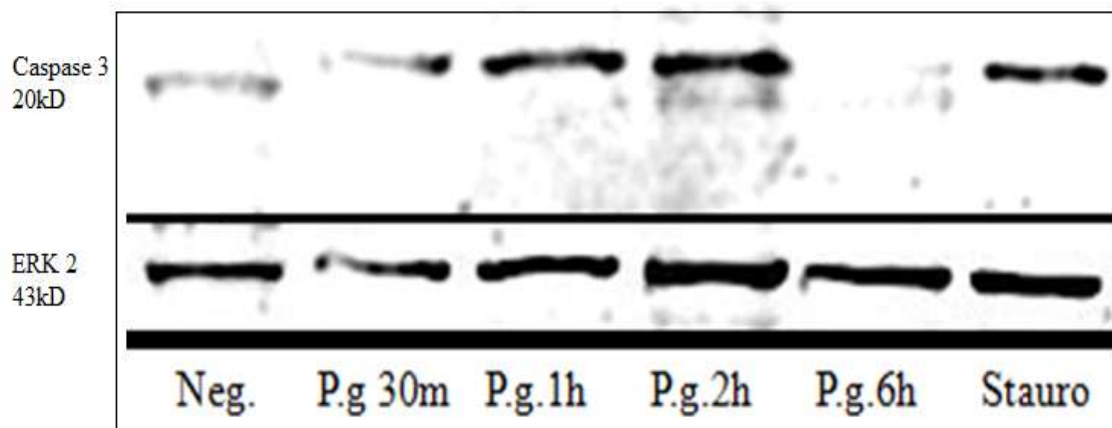


Abb.27: Darstellung der Caspase 3 von humanen Chondrozyten nach Infektion mit *P. gingivalis* und Staurosporin (exemplarisches Beispiel)

3.4 Untersuchung der Zellnekrose von infizierten humanen Chondrozyten

3.4.1 Bestimmung der LDH- Konzentration nach Infektion mit *P. gingivalis*

Die Bestimmung der LDH wurde als Nachweis für die Nekrose verwendet. Nach Infektion von humanen Chondrozyten mit *P. gingivalis* wurde die LDH- Konzentration in den Überständen gemessen. Als Positivkontrolle diente Triton X100. In Abbildung 28 sieht man einen deutlichen Anstieg der LDH nach Inkubation mit Triton X100 für zwei Stunden. Als Negativkontrolle wurde Staurosporin, als Marker der Apoptose verwendet. Als weitere Kontrolle wurde die LDH- Konzentration im Überstand von unbehandelten Chondrozyten bestimmt. Die Grafik zeigt, dass *P. gingivalis* nach Infektion für zwei Stunden keine signifikante Nekrose in humanen Chondrozyten induziert, jedoch nach vier Stunden ein Anstieg und nach sechs Stunden ein signifikanter Anstieg ($p < 0,05$) der LDH zu beobachten ist.

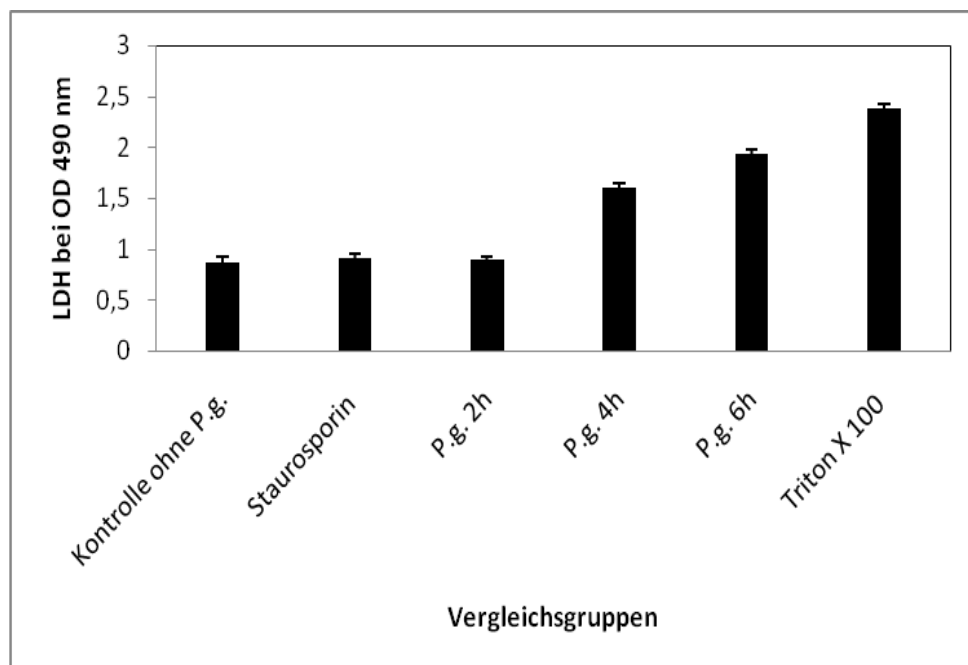


Abb.28: Grafische Darstellung der LDH- Konzentration von humanen Chondrozyten nach Infektion mit *P. gingivalis*, Triton X100 und Staurosporin

4 Diskussion

4.1 Kultivierung von humanen Chondrozyten

Humane Chondrozyten wurden aus Knie- bzw. Hüftgelenken von Arthrose- Patienten, die eine Total- Endoprothese erhielten, gewonnen. Nach enzymatischem Verdau und Isolierung der Chondrozyten wurden die Zellen als Monolayer kultiviert, wie bereits in zahlreichen Studien zuvor beschrieben [Choi et al. 1980; Green 1971; Manning und Bonner 1967; Wohlrab et al. 2002, 2004]. Die Vorteile der Monolayerkultur gegenüber Suspensionskulturen oder Zellkulturen in Agarosegel sind eine schnelle Zellvermehrung, da es zu einem Anstieg der Proliferation von humanen Chondrozyten in Monolayerkultur kommt [Elima und Vuorio 1989; Sittinger et al. 1997]. Des Weiteren ist die Technik der 2 D- Monolayerkultur leichter zu handhaben, als eine technisch aufwendigere Zellkultur in Agarose- oder Kollagengel [Delbrück et al. 1986; Gibson et al. 1982]. Zur Qualitätssicherung wurden die Zellen mittels Lichtmikroskopie auf Zelldichte, Zellform sowie auf Verunreinigungen durch Pilze kontrolliert.

In der vorliegenden Arbeit entsprach die Morphologie der Chondrozyten den Kriterien, wie sie bereits in verschiedenen Studien vorbeschrieben wurden. Die Zellen waren abgeflacht, erhielten zunehmend ein spindelförmiges Aussehen mit Zytoplasmaausläufern und zeigten eine verstärkte Neigung zur Adhäsion [Green 1971; Holtzer et al. 1960]. Bereits nach wenigen Stunden kam es zu einer Größenzunahme [Anderson et al. 1970; Holtzer et al. 1970]. Des Weiteren konnte ein chondrozytentypisches Wachstumsmuster [nach Sellner 1989] beobachtet werden. Nach einer Adaptionphase der Primärkultur zwischen 48- 72 Stunden erfolgte die logarithmische Wachstumsphase. Die Chondrozyten zeigten eine verstärkte mitotische Aktivität, die durch Kontakthemmung bei zunehmender Konfluenz gestoppt wurde. Anschließend kam es zur Wachstumsstagnation mit gleichbleibender Zellzahl [Sellner 1989]. Für die Versuche wurden nur Primärkulturen und Kulturen der ersten und zweiten Passage verwendet. Es wurden ausschließlich Kulturen aus mindestens 10^6 Zellen angelegt, da Chondrozyten in einem dichten Verband phänotypisch beständiger sind und bei Zellkontakt wieder redifferenzieren [Chacko et al. 1969].

Chondrozyten in Monolayerkulturen mit niedriger Zelldichte verlieren schneller ihren Phänotyp [Deshmukh und Kline 1976]. Wenn man humane Chondrozyten in Monolayerkulturen anlegt, kommt es zu einer phänotypischen Dedifferenzierung der Zellen. Diese Beobachtung wurde bereits in verschiedenen Studien gemacht [Fuss et al. 2000; Klagsbrun 1997; Rodriguez et al. 1998; Sellner 1989]. Chondrozyten in 2 D- Monolayerkultur nehmen bereits nach der ersten Passage eine fibroblastenähnliche Zellmorphologie an und verändern ihre Syntheseigenschaften. Sie stellen zunehmend die Synthese des knorpelspezifischen Kollagens Typ 2 ein und bilden fibroblastentypisches Kollagen Typ 1 und Typ 3. Trotz dieser phänotypischen Dedifferenzierung unterscheiden sich humane Chondrozyten von fibroblastischem Gewebe. Chondrozyten in 2 D- Monolayerkultur zeigen erst nach 48- 72 Stunden eine Adhäsion am Kulturflaschenboden [Manning und Bonner 1967]. Fibroblasten hingegen adhärieren bereits nach wenigen Stunden. Des Weiteren nehmen Fibroblasten in der Primärkultur sofort ein abgeflachtes, spindelförmiges Aussehen an, mit den typisch langen Zellausläufern [Manning und Bonner 1967]. Humane Chondrozyten behalten in der Primärkultur ihr leicht rundliches Aussehen und nehmen erst nach 48 Stunden eine fibroblastenähnliche Morphologie an [Mallein- Gerin et al. 1970]. Diese Fakten genügen bereits, um Chondrozyten eindeutig von Fibroblasten abzugrenzen [Manning und Bonner 1967]. In der vorliegenden Arbeit entsprachen die Zellen den bereits beschriebenen *in vitro* Kriterien [Manning und Bonner 1967] für humane Chondrozyten.

4.2 Kultivierung von *P. gingivalis* ATCC 33277

Es konnte gezeigt werden, dass *P. gingivalis* besonders mit schweren Parodontitiden assoziiert ist [Genco et al. 1996]. Für die vorliegenden *in vitro* Untersuchungen wurde der Stamm *P. gingivalis* ATCC 33277 verwendet, welcher bereits in vorherigen Studien als Referenzstamm benutzt worden ist [Lamont et al. 1995; Nassar et al. 2002; Walter et al. 2004]. Obwohl der *P. gingivalis*- Stamm als wenig invasiv beschrieben wurde, konnten vergangene Studien zeigen, dass *P. gingivalis* ATCC 33277 die Fähigkeit besitzt, humane Endothelzellen, Epithelzellen und Fibroblasten zu infizieren und in diese zu invadieren [Dorn et al. 2000; Murakami et al. 2008; Walter et al. 2004]. *P. gingivalis* ATCC 33277 gehört zu den hoch virulenten *P. gingivalis*- Stämmen [Dorn et al. 2000].

Weitere Studien zeigten, dass der *P. gingivalis*- Stamm ATCC 33277 trotz seiner Kapselbildung das Potential hat, in humane Epithelzellen zu invadieren [Cutler et al. 1995].

In der vorliegenden Untersuchung wurde erstmals der Einfluss von *P. gingivalis* auf primäre humane Chondrozyten untersucht, um einen möglichen Zusammenhang bei der Entstehung von destruktiven Gelenkserkrankungen zu erschließen. Unter anaeroben Bedingungen wurde *P. gingivalis* auf Blutagar- Platten ohne CO₂ im Brutschrank bei 37° C kultiviert. Um die OD zu bestimmen, wurde der Keim in HAMS F12 Kulturmedium mit 10 % FCS überführt. In den vorliegenden Versuchen stellten wir fest, dass *P. gingivalis* unter anaeroben Bedingungen im Kulturmedium für bis zu 16 Stunden vital und teilungsfähig ist. Hingegen kam es in PBS bereits nach 2 Stunden zu einer signifikanten Abnahme der Teilungsfähigkeit von *P. gingivalis* (Daten nicht gezeigt).

4.3 Assoziation von Parodontitis und Rheumatoider Arthritis

Die Bedeutung von bakteriellen Infektionen und Virulenzfaktoren in der Ätiologie der RA wird diskutiert [Alamanos et al. 2005; Lee MS et al. 2001; Smith et al. 1982]. Bakteriämien mit parodontalpathogenen Erregern ereignen sich gehäuft nach zahnärztlichen Behandlungen, aber auch während täglicher Routinemaßnahmen, wie bei der Zahnpflege oder bei der Mastikation [Forner et al. 2006]. Es konnte gezeigt werden, dass die Inzidenz und der Schweregrad einer Bakteriämie mit Parodontalkeimen bei Patienten mit Parodontitis im Vergleich zu gesunden Probanden erhöht ist [Forner et al. 2006]. Diese Tatsachen können möglicherweise dazu beitragen, dass Parodontitis- Patienten ein erhöhtes Risiko besitzen, eine systemische Ausbreitung einer Infektion mit peripherer Organbeteiligung einschließlich entzündlicher Gelenkserkrankungen zu erleiden [Moen et al. 2006]. Parodontalpathogene Erreger wie *P. gingivalis* sind in der Lage die Epithelintegrität zu beeinträchtigen [Weinberg et al. 1997]. Es wurde nachgewiesen, dass *P. gingivalis* humane Endothelzellen invadiert und die Transkription und Proteinsynthese beeinflusst [Walter et al. 2004]. Nur wenige Studien lassen vermuten, dass parodontale Keime möglicherweise zu einer direkten Schädigung der Gelenke führen können [Jasin 1983; Klamfeldt et al. 1986]. Eine Hypothese ist, dass *P. gingivalis* in der Lage ist, den Abbau von extrazellulärer Matrix und dabei insbesondere von Proteoglykanen zu induzieren [van Kampen et al. 1984; Klamfeldt et al. 1986]. *P. gingivalis* hat die Fähigkeit, Cysteinproteasen

zu produzieren, die als Gingipaine bezeichnet werden [Lantz et al. 1993]. Diese Gingipaine können verschiedene Immunglobuline wie IgG und IgA spalten [Kodowaki et al 1994] und eine Ansammlung und Adhäsion von Komplementfaktoren an der Bakterienoberfläche verhindern [Cutler et al. 1993]. Durch die Fähigkeit eine C3 und C5 aktivierte Chemotaxis zu unterbinden, hat *P. gingivalis* möglicherweise einen Weg gefunden, sich der natürlichen Abwehr des Wirtes, wie zum Beispiel der Phagozytose, zu entziehen und sich systemisch auszubreiten [Schifferle et al. 1993]. *P. gingivalis* besitzt das Endotoxin Lipopolysaccharid (LPS). Das LPS kann in Epithelgewebe eindringen und Knochengewebe resorbieren [Hausmann 1970]. Es besteht damit die Voraussetzung für Parodontalpathogene wie dem *P. gingivalis* sich einen direkten systemischen Zugang zum Blutkreislauf zu verschaffen und eine low level Bakteriämie zu unterhalten. Verschiedene Studien konnten ein vermehrtes Auftreten von AK gegen parodontale Pathogene sowie deren DNA bei RA- Patienten im Blut sowie in der Synovialflüssigkeit beobachten [Moen et al. 2003, 2006; Yoshida et al. 2001]. Der Nachweis von AK gegen gram-negativen parodontalpathogenen Bakterien in der Synovialflüssigkeit könnte darauf hinweisen, dass die Lokalisation und somit die Aktivität der Parodontalpathogene nicht nur auf das Parodont beschränkt ist. In einer weiteren Studie konnte ein Zusammenhang zwischen der Parodontitis und der RA bekräftigt werden. *P. gingivalis* hat die Fähigkeit mittels der Peptidylarginin-Deiminase (PAD) Proteine zu citrullinieren [Walker et al. 1999]. Es konnte erstmalig gezeigt werden, dass RA- Patienten, im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe, einen erhöhten AK-Titer gegen *P. gingivalis* im Blut haben und dass dieser AK- Titer mit der Höhe des AK- Titers gegen CCP- IgM und CRP korreliert [Mikuls et al. 2008]. RA- Patienten mit einem hohen CCP- AK- Titer und erhöhtem CRP haben einen signifikant höheren AK- Titer gegen *P. gingivalis*, einem der Leitkeime der Parodontitis [Mikuls et al. 2008]. In einer Studie von Hara et al. konnte gezeigt werden, dass Pathogene von *P. gingivalis*, wie zum Beispiel LPS die Expression von IgM und IgM- RF induzieren können. In einer immunologischen Studie konnten identische Sybtypen des HLA- DR- 4 Antigens bei RA- Patienten und Parodontitis- Patienten gefunden werden. Das HLA- DR- 4 ist ein Antigen, das verstärkt bei RA- Patienten beobachtet wird. Dabei lag die stärkste Assoziation auf der dritten hypervariablen Region des HLA- DRB 1- Gens. Die Subtypen 0401, 0404, 0405 und 0408 waren bei beiden Erkrankungen identisch [Bonfil et al. 1999]. Die zusammengetragenen Daten zeigen, dass die Parodontitis und die RA systemische Erkrankungen sind und ähnliche Ätiologien aufweisen. Sowohl die RA als auch die Parodontitis sind durch den Abbau von Knochen- und Knorpelgewebe gekennzeichnet. Es

konnte gezeigt werden, dass es bei einer Parodontitis zur systemischen Ausbreitung von *P. gingivalis* kommen kann. Weiter gibt es Anhaltspunkte, dass der parodontalpathogene *P. gingivalis* die Fähigkeit besitzt, durch Endo- und Exotoxine die Wirtsabwehr zu umgehen, in verschiedenen Gewebe zu invadieren und diese zu destruieren. Das könnte auf einen möglichen Pathomechanismus bei der Entstehung der RA hindeuten. In diesem Zusammenhang zeigen die vorliegenden Daten, dass *P. gingivalis* in der Lage ist, humane Chondrozyten zu infizieren und Proliferation und Apoptose zu beeinflussen, was möglicherweise auf eine Rolle von parodontalpathogenen Keimen in der Pathogenese von entzündlichen Gelenkerkrankungen hinweisen könnte.

4.4 Interaktion von *P.gingivalis* mit humanen Chondrozyten

Bakterien müssen die Fähigkeit zur Adhäsion an die Zellmembran besitzen, um Wirtszellen infizieren und in diese invadieren zu können. Die Fähigkeit von *P. gingivalis* an oralen Epithelzellen oder gingivalen Fibroblasten zu adhären und in diese zu invadieren, konnte bereits in verschiedenen Studien gezeigt werden [Dorn et al. 2001; Duncan et al. 1993; Lamont et al. 1995; Madianos et al. 1996]. In einer weiteren Studie konnte eine Invasion von *P. gingivalis* in humane Endothelzellen nachgewiesen werden [Walter et al. 2004]. Ein Hauptvermittler der Adhäsion und Invasion von *P. gingivalis* sind Fimbrien [Lamont und Jenkinson 1998]. Sie sind bis zu drei µm lang und zirka fünf nm dick. Mittels der Fimbrien bindet *P. gingivalis* an die Oberflächenrezeptoren der Wirtszellen und beginnt seine aktive Invasion in die Zellen [Njoroge et al. 1997; Weinberg et al. 1997]. Die Bakterien siedeln sich im perinukleären Gebiet der Wirtszellen an, wo sie dann Einfluss auf den Zellstoffwechsel des Wirtes nehmen [Lamont et al. 1995; Lamont und Yilmaz 2002; Walter et al. 2004]. Weiter gibt es Hinweise darauf, dass erst durch den Kontakt zwischen Bakterium und Wirtszelle, die Bildung virulenter Mediatoren angeregt wird [Park und Lamont 1998]. Einer der Hauptvirulenzfaktoren sind die Cysteinproteinasen. Diese Enzyme sind in der Lage, an Laminin, Fibrinogen und Fibronectin zu binden und diese Proteine abzubauen [Pike et al. 1996]. Von *P. gingivalis* produzierte Proteasen können Kollagen, elastische Fasern sowie Albumin und Haptoglobin abbauen [Holt und Bramanti 1991; Mayrand und Holt 1988; Travis et al. 1997]. Wie bereits in vergangenen Studien beschrieben, konnte eine Interaktion von *P. gingivalis* mit verschiedenen Geweben beobachtet werden. Es konnte gezeigt werden, dass *P. gingivalis* die

Fähigkeit besitzt, in Endothelzellen, Epithelzellen und Fibroblasten zu invadieren, diese zu infizieren und Einfluss auf deren Zellprozesse zu nehmen [Lamont et al. 1992,1995; Saglie et al. 1982, 1986, 1988; Walther et al. 2004].

In der vorliegenden Arbeit wurde *in vitro* die Interaktion von *P. gingivalis* mit primären, humanen Chondrozyten untersucht. Mittels SEM- und KLM- Analyse konnten wir zeigen, dass es nicht nur eine Adhäsion, sondern auch eine Interaktion von *P. gingivalis* mit humanen Chondrozyten gibt. Die Invasion von *P. gingivalis* in humane Chondrozyten wurde mittels Invasionsassays untersucht, eine Methode, die sich bereits in vergangenen Studien etabliert hat [Deshpande et al. 1998; Walter et al. 2004]. Es konnte gezeigt werden, dass der parodontalpathogene *P. gingivalis* die Fähigkeit besitzt, in humane Chondrozyten zu invadieren. Um die Intrazellularität von *P. gingivalis* mit einer weiteren Methode nachzuweisen, wurde eine doppelte Immunfluoreszenzfärbung nach Infektion der Chondrozyten durchgeführt. Die Auswertung erfolgte mittels KLM, wie sie bereits in vergangenen Studien etabliert wurde [Hocke et al. 2008; Slevogt et al. 2007]. Anhand der doppelten Immunfluoreszenzfärbung konnte eine Invasion von *P. gingivalis* in humane Chondrozyten, als spezifischer Nachweis der Intrazellularität, bestätigt werden. In unseren Versuchen konnten wir eine 27%- ige Invasion von *P. gingivalis* mittels Invasionsassays nachweisen. Der prozentuale Anteil der intrazellulären Erreger mittels konfokaler Lasermikroskopie (5 %) war deutlich geringer als im Protection-Invasionsassay. Eine mögliche Ursache für die unterschiedliche Intrazellularität könnte in der Methodik des Invasionsassays liegen. Es bleibt zu diskutieren, ob im Invasionsassay durch die Zugabe von Metronidazol und Gentamycin wirklich alle extrazellulären Bakterien getötet worden sind. Die erneute Anzucht der Erreger auf Columbia- Agar könnte jedoch eine mögliche Persistenz von *P. gingivalis* in Chondrozyten erklären, die schon in vergangenen Studien beschrieben worden ist [Madianoset et al. 1996]. In einer *in vitro* Untersuchung mit Epithelzellen konnte eine intrazelluläre Persistenz und Replikation von *P. gingivalis* beobachtet werden [Madianoset et al. 1996]. In weiteren Studien wurden verschiedene Invasionsraten von *P. gingivalis* in Endothelzellen oder Epithelzellen zwischen 2,9 % und 34 % beschrieben [Dorn et al. 2000; Walter et al. 2004; Unowey et al. 2006]. Dabei hing die Invasionsrate vom jeweiligen Zelltyp ab. Zurzeit werden verschiedene Wege der Invasion von *P. gingivalis* in das Gewebe diskutiert. In kardialen Mesenchymzellen wurde *P. gingivalis* in Phagosomen vorgefunden [Lamont et al. 1992]. Die Invasion in Epithelzellen wurde durch andere Endozytosevorgänge

erklärt. Dabei lag *P. gingivalis* frei im Zytoplasma vor, ohne die Struktur der Zellen zu beeinträchtigen [Lantz 1996]. In einer anderen Studie konnte eine Intrazellularität von *P. gingivalis* in Vakuolen beobachtet werden [Lamont et al. 1995]. In unserer Studie konnten wir vereinzelte Bakterien im Zytoplasma finden, ohne einen konkreten Mechanismus der Invasion zu definieren. Es wurden auch zwischen den verschiedenen *P. gingivalis*- Stämmen Unterschiede in der Invasionsrate beobachtet [Cutler et al. 1995]. *P. gingivalis*- Stämme mit starker Polysaccharid- Kapselausprägung zeigten eine deutlich geringere Adhäsions- und Invasionsrate als Stämme mit geringer Kapselbildung [Cutler et al 1995]. In unseren Versuchen benutzten wir einen *P. gingivalis*- Stamm mit geringer Kapselbildung. Trotz dieser geringen Kapselbildung wird der *P. gingivalis*- Stamm ATCC 33277 als gering invasiv beschrieben [Miyabe et al. 2004; Katz et al. 1996]. Ein weiterer Faktor, der Einfluss auf die Invasionsrate von *P. gingivalis* haben könnte, ist die Methodik der Chondrozyten- Infektion. Die Infektion der humanen Chondrozyten erfolgte unter mikroaerophilen Bedingungen. *P. gingivalis* ist ein obligater Anaerobier, so dass man *in vitro* von nicht optimalen Bedingungen für eine Infektion mit *P. gingivalis* ausgehen kann. In Anlehnung an die aufgeführten Daten, bestätigen unsere Versuche eine Adhäsion und Invasion von *P. gingivalis* in humane Chondrozyten als einen möglichen Pathomechanismus bei der Entstehung der RA.

4.5 Einfluss von *P. gingivalis* auf den Zellzyklus von humanen Chondrozyten

Im Laufe einer Zellteilung durchläuft die Zelle verschiedene Phasen, die den Zellzyklus bilden. Dabei spielt die G1- Phase eine entscheidende Rolle für die Regulierung der Zellteilung [Murray und Hunt 1993; Nurse 1975]. In der G1- Phase wird die Zelle auf die Zellteilung vorbereitet und die Chromosomenverdoppelung wird aktiviert oder sie verlässt den Zellzyklus, geht in die G0- Phase und stoppt die Zellteilung [Murray und Hunt 1993; Nurse 1975]. Aus der G0- Phase kann die ruhende Zelle jederzeit in den Zellzyklus zurück und wieder proliferieren [Stein et al. 1985]. Die Abläufe der Zellzyklusphasen sind präzise reguliert, um eine normale Zellteilung zu gewährleisten [Coqueret 2002]. In kürzlich durchgeführten Studien konnte gezeigt werden, dass *P. gingivalis* die Fähigkeit besitzt, den Zellzyklus von Epithelzellen und Osteoblasten zu manipulieren [Kuboniwa et al. 2008; Kato et al. 2008]. Dabei wurde beobachtet, dass *P. gingivalis* den Zellzyklus von infizierten Zellen blockieren oder stimulieren kann [Kuboniwa et al. 2008; Kato et al. 2008]. Eine Blockierung des Zellzykluses könnte eine Rolle bei

apoptotischen Zell- Prozessen spielen. Eine Stimulierung könnte auf eine wichtige Rolle bei der Pathogenese von Tumorerkrankungen hindeuten [Dephande et al. 2005]. In der Studie von Kuboniwa et al. konnte eine verstärkte Zellproliferation von infizierten gingivalen Epithelzellen beobachtet werden. Bereits nach 6- stündiger Infektion mit *P. gingivalis* kam es zu einem signifikanten prozentualen Anstieg der Zellen in der S- Phase. In der Studie von Kato et al. konnte nach Infektion mit *P. gingivalis* ein hemmender Einfluss auf den Zellzyklus von Osteoblasten beobachtet werden. Es kam nach 10- stündiger Infektion zu einer signifikanten Abnahme der lebenden Zellen. Die infizierten Osteoblasten verharrten in der G1- Phase und der prozentuale Anteil der infizierten Zellen in der S- Phase und G2- Phase nahm deutlich ab. Dadurch wurde der natürliche Zellzyklus in seinen Abläufen gestört. Da in der G1- Phase die Zelle auf die Zellteilung vorbereitet wird, kam es zu einer Blockierung der Zellteilung. Gleichzeitig konnte eine erniedrigte Expression von Zyklin- abhängigen Kinasen wie zum Beispiel Zyklin D1, D2 und D3 beobachtet werden. Diese Zykline sind wichtige Regulatoren beim Wechsel einer Zelle aus der G1/ G0- Phase in die G1/ S- Phase [Obaya and Sedivy 2002]. Durch die Hemmung der Expression der Zykline wird der Zellzyklus gestört und die Zelle kann nicht von der G1/ G0- Phase in die nächste Phase übertreten. In einer anderen Studie konnte gezeigt werden, dass Toxine vom parodontalpathogenen *A. actinomycetemcomitans* in der Lage sind, den Zellzyklus der Wirtszellen in der G2/ M- Phase zu blockieren und so einen hemmenden Einfluss auf die Zellteilung zu nehmen [Sugai et al. 1998].

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von *P. gingivalis* auf den Zellzyklus von humanen Chondrozyten untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass *P. gingivalis* einen signifikanten Einfluss auf Zellzyklusprozesse von humanen Chondrozyten nimmt. Nach Infektion mit *P. gingivalis* kam es zu einer prozentualen Zunahme der Chondrozyten in der G1/ G0- Phase und einer deutlichen prozentualen Abnahme der Chondrozyten in der S- und G2- Phase. In Anlehnung an die Studie von Kato et al. lässt dieses Ergebnis auf eine reduzierte Zellteilung der humanen Chondrozyten nach Infektion mit *P. gingivalis* schließen. Dadurch wurden die infizierten Chondrozyten gehindert, einen wichtigen Kontrollpunkt im Zellzyklus (G1/ S- Phase) zu passieren, was eine bedeutende Rolle für das Zellwachstum haben könnte. Die RA ist neben der Synovitis auch durch den Verlust von Knorpelgewebe gekennzeichnet [Snydermann und McCarty 1982].

Damit könnte eine Hemmung des Zellzyklus möglicherweise im Zusammenhang stehen mit destruktiven Gelenksveränderungen bei entzündlichen rheumatischen Erkrankungen.

4.6 Apoptose- induzierende Mechanismen von *P. gingivalis*

Die Apoptose ist ein fundamentaler Prozess bei der Aufrechterhaltung der Zell- Homöostase [Hengartner 2000]. In der vorliegenden Arbeit wurde erstmalig der Einfluss von *P. gingivalis* auf die Apoptose von humanen Chondrozyten beschrieben. Bereits in früheren Studien konnte gezeigt werden, dass parodontalpathogene Bakterien Apoptose- induzierende Eigenschaften haben, wie zum Beispiel die Aktivierung der Caspase 3, die DNA- Fragmentation und den Verlust der Membranintegrität in Leukozyten und T- Lymphozyten [Arakawa et al. 2000; Kato et al. 2000; Wang et al. 1999]. In weiteren Studien wurden der Einfluss von parodontalpathogenen Erregern auf die Apoptose in gewebeständigen Zellen wie Fibroblasten oder Epithelzellen beschrieben [Chen et al. 2001; De Carlo et al. 1998; Urnowey et al. 2006; Wang et al. 1999; Wilton et al. 1993]. Es konnte gezeigt werden, dass *P. gingivalis* die Aktivität und Freisetzung zelleigener Kollagenasen in Epithelzellen und Fibroblasten stimuliert und somit Apoptose- fördernde Mechanismen in Gang setzt [De Carlo et al. 1998]. In der Studie von Wang et al. wurden Fibroblasten mit isolierten Proteasen von *P. gingivalis* beimpft. Es konnte ein Anstieg der Apoptoserate von infizierten Fibroblasten bereits nach 12- stündiger Inkubation mit den Proteasen beobachtet werden. In der Studie von Wilton et al. konnte nachgewiesen werden, dass Bakterienstämme von *A. actinomycetemcomitans* und *P. gingivalis* Toxine bilden, die apoptotische Vorgänge in Leukozyten, Fibroblasten und Epithelzellen aktivieren. Einen weiteren Einfluss auf die Apoptose scheint die Infektionszeit zu haben, mit der eine Zelle infiziert wird. In einer Untersuchung mit gingivalen Epithelzellen wurde die DNA- Fragmentation nach verschiedenen Infektionszeiten mit *P. gingivalis* mittels Elisa bestimmt. Es konnte nach 2- stündiger Infektionszeit eine signifikante Apoptose in den infizierten Zellen beobachtet werden. Nach Infektionszeiten von 24 Stunden kam es zu einem signifikanten Abfall der Apoptose auf das Niveau der nicht- infizierten Kontroll- Gruppe. Die Destruktion des Gelenkknorpels gewinnt immer mehr an Bedeutung in der Pathogenese der RA. Bereits frühere Untersuchungen konnten einen Zusammenhang zwischen der RA und der Apoptose von Chondrozyten aufdecken [Kim und Song 1999]. In der Studie von Kim and Song verglich man Knorpelgewebe von RA- Patienten mit dem Knorpelgewebe von Probanden ohne RA. Es konnte eine doppelt so hohe

Anzahl an apoptotischen Zellen bei den RA- Patienten nachgewiesen werden. Einen Stellenwert bezüglich der Apoptose- induzierenden Eigenschaft von *P. gingivalis* scheinen neben verschiedenen Enzymen wie den Cysteinproteasen auch toxische Metabolite zu haben [Lamont und Jenkinson]. In Studien konnte gezeigt werden, dass Derivate organischer Säuren, wie Butyrate oder Propionate, von parodontalpathogenen Erregern, die Apoptose in B- und T- Zellen induzieren. Weiter konnte beobachtet werden, dass Ammoniak oder Schwefelwasserstoff sowie organische Säuren Einfluss auf die Immunabwehr des Wirtes haben und eine Destruktion von Alveolarknochen und Stützgewebe induziert wird [Lamont und Jenkinson 1998]. Die exakten Abläufe der Regulation von apoptotischen Vorgängen, die durch parodontalpathogene Keime induziert werden, sind noch nicht vollständig erschlossen. Verschiedene Studien zeigen, dass es sowohl auf zellulärer Ebene als auch erregerspezifische Unterschiede in der Regulation der Apoptose gibt.

In Anlehnung an die zuvor beschriebenen Studien wurde in dieser Arbeit das Apoptoseverhalten von humanen Chondrozyten nach Infektion mit *P. gingivalis* untersucht. Es konnte eine Apoptose von humanen Chondrozyten nach Infektion mit *P. gingivalis* nachgewiesen werden. Mittels Caspase 3- Western- Blot und TUNEL- Färbung wurden zwei verschiedene Pathomechanismen des programmierten Zelltodes dargestellt. Beide Methoden haben sich bereits in vergangenen Studien als Nachweis von Apoptose etabliert [Barcia et al. 2007; John et al. 2007; Kühn und Lotz 2001]. Über welche biochemischen Prozesse genau die Apoptose abläuft, wird in weiterführenden Studien untersucht werden.

4.7 Caspase 3- Aktivierung und DNA- Fragmentierung

Die Fähigkeit von oralen Bakterien wie *P. gingivalis* über verschiedene Mechanismen, einschließlich der Aktivierung von Caspasen, Apoptose in Endothelzellen oder Fibroblasten zu induzieren, konnte bereits in vergangenen Studien gezeigt werden [Nakhjiri et al. 2001; Urnowey et al. 2006; Zahlten et al. 2007]. Einer der Hauptmechanismen zur Induzierung von Apoptose ist die Aktivierung von Cysteinproteasen [Hengartner 2000]. Dabei stellt die Caspase 3 ein Schlüsselenzym der Apoptose dar. Als inaktivierte Proenzyme werden die Caspasen durch verschiedene Prozesse der Aktivierungskaskade in die aktivierte Form überführt und aktivieren Endonukleasen, welche Apoptose- typisch die DNA der Zelle fragmentieren [Hengartner 2000].

Verschiedene Studien zeigten, dass *P. gingivalis* über eine Aktivierung von Caspase 3 Apoptose in gingivalen Epithelzellen und Fibroblasten induziert [Brozovic et al. 2006; Urnowey et al. 2006].

In der vorliegenden Studie konnte gezeigt werden, dass nach Infektion mit *P. gingivalis* für eine und zwei Stunden eine erhöhte Caspase 3 in humanen Chondrozyten zu verzeichnen war. In weiteren Experimenten wurde zum Ausschluss einer eventuellen Nekrose die LDH-Konzentration von humanen Chondrozyten nach Infektion mit *P. gingivalis* bestimmt. Nach 2-stündiger Infektion mit *P. gingivalis* kam es zu keiner signifikanten LDH-Konzentration. Daraus lässt sich schließen, dass *P. gingivalis* nach einer Infektionszeit bis zu zwei Stunden Apoptose durch eine Aktivierung der Caspase 3 in humanen Chondrozyten induziert. In unserer Untersuchung konnte weiter gezeigt werden, dass nach einer längeren Infektionszeit von sechs Stunden die Caspase 3 von humanen Chondrozyten herunterreguliert wurde. Ähnliche Ergebnisse wurden in einer Studie von Nakhjiri et al. beschrieben. Es konnte nach 2-stündiger Infektion von gingivalen Epithelzellen mit *P. gingivalis* eine Apoptose nachgewiesen werden [Nakhjiri et al. 2001]. Nach längeren Infektionszeiten von bis zu 24 Stunden kam es zu keiner signifikanten Apoptose bei gingivalen Epithelzellen [Nakhjiri et al. 2001]. In der vorliegenden Arbeit konnte eine deutliche Zunahme der LDH-Konzentration von humanen Chondrozyten bereits nach 4-stündiger Infektion mit *P. gingivalis* nachgewiesen werden. Daher könnte man vermuten, dass es nach Infektionszeiten von mehr als zwei Stunden mit *P. gingivalis*, zu einer zunehmenden Nekrose in humanen Chondrozyten kommt. In Übereinstimmung mit den vorliegenden Ergebnissen konnte in einer Studie von Miyabe et al. ähnliche Ergebnisse beobachtet werden. Man verglich verschiedene *P. gingivalis*-Stämme auf Virulenz und Zytotoxizität. Nach 4-stündiger Infektion von Leukozyten konnte eine signifikant erhöhte Konzentration der LDH beim *P. gingivalis*-Stamm ATCC 33277 im Vergleich zum anderen *P. gingivalis*-Stamm 16-1 beobachtet werden [Miyabe et al. 2004]. Daraus könnte man schließen, dass die verschiedenen *P. gingivalis*-Stämme unterschiedlich ausgeprägt Zellnekrose induzieren. In der vorliegenden Studie wurde als ein weiterer Mechanismus der Apoptose die DNA-Fragmentierung untersucht. Eine etablierte Methode zum Nachweis der DNA-Fragmentierung ist der TUNEL- (TdT-mediated d-UTP nick end labeling terminal desoxynucleotidyl Transferase) Test [Barcia et al. 2007; Hein et al. 2006, Hocke et al. 2008, N'Guessan et al. 2005]. Die TUNEL-Reaktion markiert insbesondere DNA-Strangbrüche aufgrund apoptotischer

Mechanismen. In verschiedenen Studien konnte eine Apoptose- assoziierte DNA-Fragmentierung in Epithelzellen und aortalen Endothelzellen, nach Infektion mit *P. gingivalis*, beobachtet werden [Nakhjiri et al. 2001; Roth et al. 2007]. In dieser Arbeit konnte eine signifikante DNA- Fragmentierung, ab einer Infektionszeit von zwei Stunden mit *P. gingivalis* in humanen Chondrozyten nachgewiesen werden. Damit wird die These, dass *P. gingivalis* in humanen Chondrozyten Apoptose induziert bekräftigt.

Die Ergebnisse dieser Studie zeigen erstmalig, dass *P. gingivalis* in der Lage ist, primäre humane Chondrozyten zu infizieren und in diese zu invadieren. Die vorliegenden Daten zeigen weiterhin, dass *P. gingivalis* die Proliferation und die Apoptose humaner Chondrozyten beeinflusst, was möglicherweise auf eine Rolle von parodontalpathogenen Keimen in der Pathogenese der RA hinweist. Damit unterstützen unsere Ergebnisse die Hypothese einer möglichen Assoziation zwischen der Parodontitis und der RA.

5 Zusammenfassung

Das Ziel dieser Arbeit war es, die Rolle von oralen parodontalpathogenen Bakterien, wie *P. gingivalis*, als einen möglichen Pathogenitätsfaktor bei der Entstehung von entzündlichen Gelenkerkrankungen, wie der RA, zu ergründen. Es wurden die Adhäsion und Invasion von *P. gingivalis* in humane Chondrozyten sowie die daraus resultierenden Veränderungen auf den Zellzyklus, die Zellapoptose sowie Zellnekrose von infizierten Chondrozyten experimentell untersucht.

Die RA ist eine systemische und chronisch-entzündliche Erkrankung. Sie zeichnet sich unter anderem durch die Akkumulation eines pro-inflammatorischen Zellinfiltrates in der Synovialmembran aus. Die sogenannte Synovitis trägt zur Entstehung von Pannusgewebe bei, was letztendlich den Abbau von Knochen- und Knorpelgewebe im Gelenk induziert. Bis zum jetzigen Zeitpunkt ist die genaue Ätiologie der RA noch nicht geklärt. Es scheinen jedoch genetische sowie Umweltfaktoren, wie das Geschlecht, Alter, BMI, Zigarettenkonsum, HLA-Genotyp sowie Infektionen, eine Rolle zu spielen. Die Bedeutung von bakteriellen Infektionen und Virulenzfaktoren in der Ätiologie der RA werden zunehmend diskutiert. In unserer Arbeit haben wir die Bedeutung von oralpathogenen Bakterien als eine Möglichkeit in der Pathogenese von entzündlichen Gelenkerkrankungen untersucht. Es ist bereits bekannt, dass es eine enge Assoziation zwischen der Parodontitis und der RA gibt. Sowohl die Parodontitis als auch die RA sind durch den Verlust von knöchernen und bindegewebigen Strukturen gekennzeichnet. Einer der Schlüsselkeime bei der Entstehung einer Parodontitis ist *P. gingivalis*, ein orales, gramnegatives, anaerobes Stäbchen. Dieser Erreger ist in der Lage, die Epithelintegrität zu beeinträchtigen, in humane Endothelzellen und Fibroblasten zu invadieren und die Transkription und Proteinsynthese dieser Zellen zu beeinflussen. Es besteht damit die Voraussetzung für Parodontalpathogene, wie zum Beispiel *P. gingivalis*, sich einen direkten systemischen Zugang zum Blutkreislauf zu verschaffen und eine „low level“ Bakteriämie zu unterhalten.

Humane Chondrozyten wurden aus Gelenken von Arthrose-Patienten, die eine TEP erhielten isoliert, als Monolayer kultiviert und mit 5×10^7 *P. gingivalis* infiziert. Die Adhäsion von *P. gingivalis* in humanen Chondrozyten wurde mittels Scanning-Elektronenmikroskopie (SEM) dargestellt. Eine mögliche Invasion von *P. gingivalis* in humane Chondrozyten wurde

lasersmikroskopisch sowie mittels Invasionsassays untersucht. Veränderungen des Zellzyklus der infizierten Chondrozyten wurden mittels Durchflusszytometrie (FACS) analysiert. Die Apoptose der infizierten Chondrozyten wurde mittels Terminale- Desoxyribosyl- Transferase mediated dUTP Nick End Labeling (TUNEL)- Assays sowie der Caspase 3- Western- Blot- Analyse dargestellt. Abschließend wurde die Zellnekrose nach Infektion mit *P. gingivalis* mittels Bestimmung der Laktatdehydrogenase (LDH)- Konzentration der infizierten Zellen untersucht.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigten eine Adhäsion und Interaktion von *P. gingivalis* an bzw. mit humanen Chondrozyten. Das Invasionsassay und die konfokale Lasermikroskopie bestätigten eine Invasion von *P. gingivalis* in humane Chondrozyten. Die FACS- Analyse zeigte nach Infektion mit *P. gingivalis* eine prozentuale Zunahme der Chondrozyten in der G1- Phase ($69,41 \pm 7,67$ versus $61,41 \pm 1,62$), eine prozentuale Abnahme der infizierten Zellen in der S- Phase ($11,15 \pm 6,70$ versus $12,51 \pm 2,26$) sowie eine signifikante Abnahme der Chondrozyten in der G2/ M- Phase ($9,61 \pm 1,070$ versus $26,08 \pm 3,76$). Mittels TUNEL- Assays konnte eine signifikante Apoptose infizierter Chondrozyten nachgewiesen werden. Des Weiteren wurden Veränderungen des Zytoskelettes mit einer Zunahme von Stressfasern (Verdichtung von Aktin- Filamenten) in humanen Chondrozyten, nach Infektion mit *P. gingivalis*, beobachtet. Die Untersuchung mittels Caspase 3- Western- Blots zeigte nach Infektionszeiten von 1 h sowie nach 2 h einen Anstieg der Caspase 3 im Vergleich zur nicht- infizierten Kontrollgruppe. Die Untersuchung der LDH- Konzentration zeigte keinen LDH- Anstieg nach 2- stündiger Infektion mit *P. gingivalis*, jedoch war nach 4 h und 6 h eine Zunahme der LDH- Konzentration zu verzeichnen.

Patienten mit einer Parodontitis haben ein höheres Risiko eine RA zu bekommen als gesunde Personen und *vice versa*. Einer der Leitkeime bei der Entstehung einer Parodontitis ist *P. gingivalis*. Andere Autoren zeigten, dass *P. gingivalis* die Fähigkeit besitzt, die Immunabwehr zu umgehen, sich systemisch auszubreiten und in atheromatöse Endothelzellen zu invadieren. Weiter gibt es Untersuchungen, die auf eine mögliche Assoziation zwischen der Parodontitis und der RA hinweisen. *P. gingivalis* besitzt die Fähigkeit, IgM- RF zu induzieren und mittels seines Enzymes PAD Proteine zu citrullinieren. Patienten mit einer RA haben einen signifikant höheren AK- Titer gegen *P. gingivalis* im Blut als gesunde Personen.

Dabei korreliert die Höhe des *P. gingivalis*- AK- Titer mit der Höhe des AK- Titer gegen citrullinierte Proteine. Dieser AK- Titer gegen citrullinierte Proteine stellt einen wichtigen prognostischen Parameter der RA dar.

Anhand unserer Ergebnisse konnte gezeigt werden, dass *P. gingivalis* die Fähigkeit besitzt, humane Chondrozyten zu infizieren und in diese zu invadieren. Die vorliegenden Daten zeigen weiter, dass *P. gingivalis* die Proliferation und Apoptose humaner Chondrozyten beeinflusst, was möglicherweise auf eine Rolle von parodontalpathogenen Keimen, wie zum Beispiel *P. gingivalis*, in der Pathogenese von entzündlichen Gelenkerkrankungen, im speziellen der RA hinweist. Zusammenfassend unterstützen unsere Daten die Hypothese einer möglichen Assoziation zwischen der Parodontitis und der RA.

6 Literaturverzeichnis

- 1 Alamanos Y, AA Drosos. Epidemiology of adult rheumatoid arthritis. *Autoimmun Rev.* **4**, 130-136 (2005).
- 2 Arakawa S, T Nakajima, H Ishikura, S Ichinose, I Ishikawa, N Tsuchida. Novel apoptosis-inducing activity in *Bacteroides forsythus*: a comparative study with three serotypes of *actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Infect Immun.* **68**, 4611-4615 (2000).
- 3 Amano A, T Ishimoto, H Tamagawa, S Shizukuishi. Role of Superoxide Dismutase in Resistance of *Porphyromonas gingivalis* to Killing by Polymorphonuclear Leukocytes. *Infect. Immun.* **60**, 712-714 (1992).
- 4 Amano A, S Shizukuishi, H Tamagawa, K Iwakura, S Tsunasawa, A Tsunemitsu. Characterization of Superoxide Dismutases Purified from Either Anaerobically Maintained or Aerated *Bacteroides gingivalis*. *J. Bacteriol.* **172**, 1457-1463 (1990).
- 5 American Academy of Periodontology. Proceedings of the World Workshop in Clinical Periodontics. Chicago: *The American Academy of Periodontology I*, 23-24 (1989).
- 6 Anderson HC, S Chacko, J Abbott, H Holtzer. The Loss of Phenotypic Traits by Differential Cells in vitro. *Americ. J. of Pathology.* **60**, 285-311 (1970).
- 7 Armitage G. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Ann Periodontol* **4**, 1-6 (1999).
- 8 Asaga H, M Yamada, T Senshu. Selective deimination of vimentin in calcium ionophore-induced apoptosis of mouse peritoneal macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Comun.* **243**, 641-646 (1998).

- 9 Baehni P, CC Tsai, WP McArthur, BF Hammond, NS Taichman. Interaction of Inflammatory Cells and Oral Microorganisms. VIII. Detection of Leukotoxic activity of a Plaque-Derived gram-Negative Microorganism. *Infect. Immun.* **24**, 233-243 (1979).
- 10 Barcia RN, MR Dana, A Kazlauskas. Corneal graft rejection is accompanied by apoptosis of the endothelium and is prevented by gene therapy with bcl-xL. *Am J Transplant.* **7**, 2082-2089 (2007).
- 11 Barura PK, DW Dyer, ME Neiders. Effect of iron limitation on *Bacteroides gingivalis*. *Oral Microbiol. Immunol.* **15**, 27-32 (1990).
- 12 Beck J, J Garcia, G Heiss, P Vokonas, S Offenbacher. Periodontal disease and cardiovascular disease. *J Periodontol.* **67**, 1123-1137 (1996).
- 13 Beck J, S Offenbacher, R Williams, P Gibbs, R Garcia. Periodontitis: a risk for coronary heart disease? *Ann Periodontol.* **3**, 127-141 (1998).
- 14 Bockman RS, MA Repo. Lymphokine-mediated bone resorption requires endogenous prostaglandin synthesis. *J Exp Med.* **154**, 529-534 (1981).
- 15 Bonfil JJ, FL Dillier, P Mercier, et al. A "case control" study on the role HLA DR 4 in severe periodontitis and rapidly progressive periodontitis. *J. Clin. Periodontol.* **26**, 77-84 (1999).
- 16 Bramanti TE, SC Holt. Iron-regulated Outer Membrane Proteins in the Periodontopathic Bacterium, *Bacteroides gingivalis*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **166**, 1146-1154 (1990).
- 17 Brozovic S, R Sahoo, S Barve, et al. *Porphyromonas gingivalis* enhances FasL expression via up-regulation of NFkappaB-mediated gene transcription and induces apoptotic cell death in human gingival epithelial cells. *Microbiology.* **152**, 797-806 (2006).

- 18 Chacko S, J Abbott, S Holtzer, H Holtzer. **The Loss of Phenotypic traits by Differential Cells VI. Behavior of the Progeny of a Single Chondrocyte.** *J. Exp. Med.* **130**, 417-442 (1969).
- 19 Chen LL, J Yan. **Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide activated bone resorption of osteoclasts by inducing IL-1, TNF, and PGE1.** *Acta Pharmacol Sin.* **22**, 614-618 (2001).
- 20 Choi YC, GM Morris, FS Lee, L Sokoloff. **The Effect of Serum on Monolayer Cell Culture of Mammalian Articular Chondrocytes.** *Connective Tissue Research.* **7**, 105-112 (1980).
- 21 Cimmino MA, M Parisi, G Moggiana, GS Mela, S Accardo. **Prevalence of rheumatoid arthritis in Italy: the Chiavari study.** *Ann Rheum Dis.* **57**, 315-318 (1998).
- 22 Coqueret O. **Linking cyclins to transcriptional control.** *Gene.* **299**, 35-55 (2002).
- 23 Cutler WC, R Arnold and H Schenkein. **Inhibition of C3 and IgG proteolysis enhances phagocytosis of Porphyromonas gingivalis.** *J. Immunol.* **151**, 7016-7029 (1993).
- 24 Cutler WC, JR Kalmar, LA Genco. **Pathogenic strategies of the oral anaerobe, Porphyromonas gingivalis.** *Trends in Microbiology.* **3**, 45-51 (1995).
- 25 Darveau RP, MD Cunningham, T Bailey, et al. **Ability of bacteria associated with chronic inflammatory disease to stimulate E-selectin expression and promote neutrophil adhesion.** *Infect and Immun.* **63**, 1311-1317 (1995).
- 26 Deinzer R. **Stress und Parodontitis: Neue Erkenntnisse zu einer alten Vermutung.** *IDZ-Information.* **2** (2004).
- 27 Delbrück A, B Desow, R Gurr, et al. **In Vitro Culture of Human Chondrocytes form Adult Subjects.** *Con. Tissue Research.* **15**, 155-172 (1986).

- 28 Denhardt DT. Signal transduction pathways and regulation of the mammalian cell cycle: cell type-dependent intergration of external signals. In Stein GS, Baserga R, Giordano A und Denhardt DT. *The molecular basis of cell cycle and growth control*. Wiley-Liss, New York (1999).
- 29 Dephande A, P Sicinski and PW Hinds. Cyclins and cdks in development and cancer; a perspective. *Oncogene*. **24**, 2909-2915 (2005).
- 30 Desphande RG, MB Khan. Purifaction and characterization of hemolysin from Porphyromonas gingivalis A7436. *FEMS Microbiol. Lett.* **176**, 387-394 (1999).
- 31 Deshpande RG, MB Khan, CA Genco. Invasion of aortic and heart endothelial cells by Porphyromonas gingivalis. *Infect Immun.* **66**, 5337-5343 (1998).
- 32 Dibbert B, HU Simon. The molecular mechanism of apoptosis. Report of the 4th European Conference on Apoptosis. *Dtsch Med Wochenschr.* **122**, 523-526 (1997).
- 33 Dorn BR, K Leung, A Progulske-Fox. Invasion of human oral epithelial cells by Prevotella intermedia. *Infect. Immun.* **66**, 6054-6057 (1998).
- 34 Dorn BR, JN Burks, KN Seifert, A Progulske-Fox. Invasion of endothelial and epithelial cells by strains of Porphyromonas gingivalis. *FEMS Microbiol. Lett.* **187**, 139-44 (2000).
- 35 Dorn BR, WA Dunn Jr, A Progulske-Fox. Porphyromonas gingivalis traffics to autophagosomes in human coronary artery endothelial cells. *Infection and immunity.* **69**, 5698-5708 (2001).
- 36 Duncan MJ, S Nakao, Z Skobe, H Xie. Interaction of Porphyromonas gingivalis with epithial cells. *Infect Immun.* **61**, 2260-2265 (1993).
- 37 Ebersole J, R Machen, M Steffen. Systemic acute-phase reactants, C-reactive protein and haptoglobin in adult periodontitis. *Clin Exp Immunol.* **107**, 347-352 (1997).

- 38 Eick S, J Rödel, JW Einax, et al. Interaction of *Porphyromonas gingivalis* with KB cells: comparison of different clinical isolates. *Oral Microbiol. Immunol.* **17**, 201-208 (2002).
- 39 Elima K, E Vuorio. Expression of mRNAs for collagens and other matrix components in dedifferentiating and redifferentiating human chondrocytes in culture. *FEBS Lett.* **258**, 195-198 (1989).
- 40 Favero M, F Schiavon, L Riato, V Carraro, L Punzi. Rheumatoid arthritis is the major risk factor for septic arthritis in rheumatological settings. *Autoimmun Rev.* (2008).
- 41 Forner L, T Larsen, M Kilian, P Holmstrup. Incidence of bacteremia after chewing, tooth brushing and scaling in individuals with periodontal inflammation. *J Clin Periodontol.* **33**, 401-7 (2006).
- 42 Fuss M, EM Ehlers, M Russlies, J Rohwedel, P Behrens. Characteristics of human chondrocytes, osteoblasts and fibroblasts seeded onto a type I/III collagen sponge under different culture conditions. A light, scanning and transmission electron microscopy study. *Anat Anz.* **182**, 303-310 (2000).
- 43 Geiler G. Pathologie und Progression der intraartikulären Entzündung bei Rheumatoid-Arthritis. *Verh. Dtsch. Ges. Path.*; **80**, 46-57 (1996).
- 44 Genco RJ, AW Ho, SG Grossi, RG Dunford, LA Tedesco. Relationship of Stress, Distress and Inadequate Coping Behaviors to Periodontal Disease. *J. Periodontol.* **70**, 711-723. (1999).
- 45 Gibson GJ, SJ Schor ME Grant. Effects of Matrix Macromolecules on Chondrocyte Gene Expression: Syntheses of a Low Molecular Weight Collagenspecies by Cells Cultured within Collagen Gels. *J. of Cell Biology.* **93**, 767-774 (1982).

- 46 Grande PA, MI Pitman, L Peterson, et al. **The Repair of Experimentally Produced Defects in Rabbit Articular Cartilage by Autologous Chondrocyte Transplantation.** *J. of Orthopaedic Res.* **7**, 208-218 (1989).
- 47 Green WT. **Behavior of Articular Chondrocytes in Cell Culture.** *Clinical Orthopaedics and Related Research* **75**, 248-260 (1971).
- 48 Grossi SG, JJ Zambon, AW Ho, G Koch, RG Dunford, EE Machtai, et al. **Assessment of Risk for Periodontal Disease. I. Risk Indicators for Attachment Loss.** *J. Periodontol.* **65**, 260-267 (1994).
- 49 Hamada N, HT Sojar, MI Cho, RJ Genco. **Isolation and characterization of a minor fimbria from *Porphyromonas gingivalis*.** *Infect Immun.* **64**, 4788-4794 (1996).
- 50 Häuselmann HJ, RJ Fernandes, SS Mok, TM Schmid, JA Block, MB Aydekotte, et al. **Phenotypic stability of bovine articular chondrocytes after long-term culture in aligate beads.** *J Cell Science.* **107**, 17-27 (1994).
- 51 Haffajee AD, SS Socransky. **Microbial etiological agents of destructive periodontal diseases.** *Periodontol. 2000.* **5**, 78-111 (1994).
- 52 Hara Y, T Kanenko, A. Yoshimura and I Kato. **Serum rheumatoid factor induced by intraperitoneal administration of periodontic bacterial lipopolysaccharide in mice.** *J. Periodontol. Res.* **31**, 502-507 (1996).
- 53 Haraszthy VI, JJ Zambon, M Trevisan, R Shah, M Zeid, RJ Genco. **Identification of pathogens in atheromatous plaque.** *J. Dent. Res.* **77**, 666 (1998).
- 54 Harris EDJ. **Rheumatoid arthritis: pathophysiology and implications for therapy.** *N. Eng. J. Med.* **322**, 1277- 1289 (1990).

- 55 Hartung K, HP Seelig. Labordiagnostik der systemischen Autoimmunerkrankungen. *Z. Rheumatol.* **66**, 225- 238 (2007).
- 56 Hausman E, L Raisz and W Miller. Endotoxin: Stimulation of bone resorption in tissue culture. *Science* **168**, 862-864 (1970).
- 57 Hein G, P Oelzner, H Sprott, B Manger. Rheumatology update. Current knowledge of etiology, pathophysiology, diagnosis and therapy of selected arthritic disorders. *Med. Klin.* **94**, 485-495 (1999).
- 58 Hein S, S Kostin, J Schaper. Adult rat cardiac myocytes in culture: 'Second-floor' cells and coculture experiments. *Exp Clin Cardiol.* **11**, 175-82 (2006).
- 59 Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature.* **407**, 770-6 (2000).
- 60 Hettenkofer HJ. Entzündliche rheumatische Erkrankungen. In: *Rheumatologie.* **4. Aufl.** Thieme, 52-70 (2001).
- 61 Hocke AC, IK Hartmann, J Eitel, et al. Subcellular expression pattern and role of IL-15 in pneumococci induced lung epithelial apoptosis. *Histochem Cell Biol.* **130**, 165-176 (2008).
- 62 Holt SC, TE Bramanti. Factors in virulence expression and their role in periodontal disease pathogenesis. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* **2**, 177-281 (1991).
- 63 Holtzer H, S Chacko, J Abbott, S Holtzer, H Anderson. Variable Behavior of Chondrocytes in Vitro. *Chemistry and Molecular Biology of the Intercellular Matrix.* **3**, 1471-1484 (1970).
- 64 Holtzer H, J Abbott, J Lash, S Holtzer. The Loss of Phenotypic Traits by Differentiated Cells in Vitro I. Dedifferentiation of Cartilage Cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* **46**, 1533-1542 (1960).

- 65 Hoppe J, M Kilic, V Hoppe, A Sachinidis and U Kagenhuber. **Formation of caspase- 3 complexes and fragmentation of caspase- 12 during Anisomycin induced apoptosis in AKR- 2B cells without aggregation of Apaf- 1.** *Eur J Cell Biol.* **2.8** (2002).
- 66 Iatropoulos MJ, GM Williams. **Proliferation Markers.** *Exp. Toxic Pathol.* **48**, 175-181 (1996).
- 67 Innala L, H Kokkonen, C Eriksson, et al. **Antibodies against mutated citrullinated vimentin are a better predictor of disease activity at 24 months in early rheumatoid arthritis than antibodies against cyclic citrullinated peptides.** *J Rheumatol.* **35**, 1002-1008 (2008).
- 68 Jasin HE. **Bacterial lipopolysaccharides induce in vitro degradation of cartilage matrix through chondrocyte activation.** *J Clin Invest.* **72**, 2014-2019 (1983).
- 69 Johansson A, A Bergenholtz, SE Holm. **Strong cytotoxicity to human gingival fibroblasts by Porphyromonas gingivalis ATCC 33277.** *J Periodont Res.* **31**, 477-482 (1996).
- 70 John T, B Kohl , A Mobasheri, W Ertel, M Shakibaei M. **Interleukin-18 induces apoptosis in human articular chondrocytes.** *Histol Histopathol.* **22**, 469-82 (2007).
- 71 Kato S, K Nakashima, M Inoue, et al. **Human epithelial cell death caused by Actinobacillus actinomycetemcomitans infection.** *J Med Microbiol.* **49**, 739-745 (2000).
- 72 Kato T, T Tsuda, H Inaba, et al. **Porphyromonas gingivalis gingipains cause G(1) arrest in osteoblastic/stromal cells.** *Oral Microbiol Immunol.* **23**, 158-64 (2008).
- 73 Katz J, Ward DC, Michalek SM. **Effect of host responses on the pathogenicity of strains of Porphyromonas gingivalis.** *Oral Microbiol Immunol.* **5**, 30 (1996).

- 74 Kawasaki K, M Ochi, Y Uchio, et al. **Hyaluronic acid enhances proliferation and chondroitin sulfate synthesis in cultured chondrocytes embedded in collagen gels.** *J. Cell. Physiol.* **179**, 142-148 (1999).
- 75 Kim HA and YW Song. **Apoptotic Chondrocyte death in Rheumatoid Arthritis.** *ArthritisRheumatism.* **42**, 1528-1537 (1999).
- 76 Klagsbrun M. **Large-Scale Preparation of Chondrocytes.** In: Colowick, S.P., Kaplan, N.O. *Methods in Enzymology Vol. LVIII.* 560-564 (1997).
- 77 Klamfeldt A. **Degradation of bovine articular cartilage proteoglycans in vitro. The effect of bacteroides gingivalis.** *Scand J Rheumatol.* **15**, 297-301 (1986).
- 78 Klimiuk PA, M Fiedorczyk, S Sierakowski, J Chwiecko. **Soluble cell adhesion molecules (sICAM-1, sVCAM-1, and sE-selectin) in patients with early rheumatoid arthritis.** *Scand J Rheumatol.* **36**, 345-350 (2007).
- 79 Kodowaki T, M Yoneda, K Okamoto, et al. **Purification and characterisation of a novel arginin- specific cystein proteinase (Arginpain) involved in the pathogenesis of periodontal disease from cultured supernatant of Porphyromonas gingivalis.** *J. Biol. Chem.* **269**, 21371-21378 (1994).
- 80 Könönen E. **Oral colonization by anaerobic bacteria during childhood: role in health and disease.** *Oral diseases.* **5**, 278-285 (1999).
- 81 Kuboniwa M, Y Hasegawa, S Mao, et al. **P. gingivalis accelerates gingival epithelial cell progression through the cell cycle.** *Microbes Infect.* **10**, 122-128 (2008).
- 82 Kühn K, M Lotz. **Regulation of CD95 (Fas/APO-1)-induced apoptosis in human chondrocytes.** *Arthritis Rheum.* **44**, 1644-1653 (2001).

- 83 Kuryliszyn-Moskal A, PA Klimiuk, S Sierakowski. Serum soluble adhesion molecules--sICAM-1, sVCAM-1, sE-selectin--in patients with systemic rheumatoid arthritis. *Pol Merkur Lekarski*. **17**, 353-356 (2004).
- 84 Kweider M, GD Lowe, GD Murray, DF Kinane, DA McGowan. Dental disease, fibrinogen and white cell count; links with myocardial infarction? *Scott Med J*. **38**, 73-74 (1993).
- 85 Lamont RJ, D Oda, RE Persson, GR Persson. Interaction of Porphyromonas gingivalis with gingival epithelial cells maintained in culture. *Oral Microbiol. Immun.* **7**, 364-367 (1992).
- 86 Lamont RJ, A Chan, CM Belton, KT Izutsu, D Vasel, A Weinberg. Porphyromonas gingivalis invasion of gingival epithelial cells. *Infect. Immun.* **63**, 3878-3885 (1995).
- 87 Lamont RJ, HF Jenkinson. Life Blow the Gun Line: Pathogenetic Mechanisms of Porphyromonas gingivalis. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**, 1244-1263 (1998).
- 88 Lamont RJ, Yilmaz. In or out: the invasiveness of oral bacteria. *Periodontol 2000*. **30**, 61-69 (2002).
- 89 Lantz M. New insights into mechanisms of bacterial pathogenesis in periodontitis. *Curr. Opin. Periodontol.* **3**, 10-18 (1996).
- 90 Lantz M, R Allen, P Cibrowski et al. Purification and immunolocalisation of cysteine protease from Porphyromonas gingivalis. *J. Periodont. Res.* 467-469 (1993).
- 91 Lee MS, SWN Ueng, CH Shih, CC-K Chao. Primary cultures of human chondrocytes are susceptible to low inocula of staphylococcus aureus infection and undergo apoptosis. *Scand J Infect Dis.* **33**, 47-50 (2001).
- 92 Lee ML, ME Weinblatt. Rheumatoid arthritis. *The Lancet* **358**, 903-911 (2001).

- 93 Lipsky PE. **Rheumatoid Arthritis**. In: Isselbacher KJ, Braunwald E, Wilson J, Martin JB, Fauci AS, Hauser SL, Longo DL, Kasper DL (Hg.) *Harrisons Innere Medizin*. **14. Aufl.** McGraw-Hill, Inc., New York, 2211-2220 (1999).
- 94 Loos B, J Hutter, H Varoufaki. **Levels of C-reactive in periodontitis patients and healthy controls**. *J Dent Res*. **77**, 666 (1998).
- 95 Madianos PN, PN Papapanou, U Nannmark, G Dahlen, J Sandos. **Porphyromonas FDC 381 multiplies and persists within human oral epithelial cells in vitro**. *Infect. Immun.* **64**, 660-664 (1996).
- 96 Mallein-Gerin F, F Ruggiero, R Garrone. **Proteoglycan Core Protein and Type II Collagen Gene Expression are Not Correlated with Cell Shape Changes during Low Density Chondrocyte Culture**. *Ontogeny and Neoplasia*, Springer Verlag (1990).
- 97 Manning WK, WM Bonner. **Isolation and Culture of Chondrocytes from Human Adult Articular Cartilage**. *Arthritis and Rheumatism*. **10**, 235-239 (1967).
- 98 Mathsson L, M Mullazehi, MC Wick, et al. **Antibodies against citrullinated vimentin in rheumatoid arthritis: higher sensitivity and extended prognostic value concerning future radiographic progression as compared with antibodies against cyclic citrullinated peptides**. *Arthritis Rheum.* **58**, 36-45 (2008).
- 99 Mattila K, V Valtonen, M Nieminen. **Role of infection as a risk factor for atherosclerosis, myocardial infarction, and stroke**. *Clin Infect Dis*. **26**, 719-734 (1998).
- 100 Mayrand D, SC Holt. **Biology of asaccharolytic black-pigment Bacteroides species**. *Microbiol. Rev.* **52**, 134-152 (1988).
- 101 McKee AS, AS McDermid, A Baskerville, AB Dowsett, DC Ellwood, PD Marsh. **Effect of Hemin on the Physiology and Virulence of Bacteroides gingivalis W 50**. *Infect. Immun.* **52**, 349-355 (1986).

- 102 Mikulus TR, JB Payne, RA Reinhardt, et al. Antibody responses to Porphyromonas gingivalis in subjects with rheumatoid arthritis and periodontitis. *Int. Immunopharmacol.* Page 5 (2008).
- 103 Miyabe H, K Ishihara, T Kigure and K Okuda. Anti- Phagocytic role of surface fibrous structure of an invasive Porohyromonas gingivalis strain. *Bull. Tokyo dent. Coll.* **45**, 47-57 (2004).
- 104 Moen K, JG Brun, TM Madland, T Tynning, R Jonsson. Immunoglobulin G and A antibody responses to Bacteroidesd forsyhtus and Prevotella intermedia in sera and synovial fluids of arthritis patients. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology.* **10**, 1043-1050 (2003).
- 105 Mollenhauer J und Kuettner KE. Articular Cartilage. In: Dee R. Hrsg. *Principles of orthopaedic practice*. Second edition. New York: McGrawHill, 85-98 (1997).
- 106 Murakami J, T Kato, S Kawai, S Akiyama, A Amano, I MorisakiI. Cellular motility of Down syndrome gingival fibroblasts is susceptible to impairment by Porphyromonas gingivalis invasion. *J Periodontol.* **79**, 721-727 (2008).
- 107 Murray A, T Hunt. *The Cell Cycle : an introduction*. N.Y. Freeman (1993).
- 108 Nakhjiri SF, Y Park, O Yilmaz, et al. Inhibition of epithelial cell apoptosis by Porphyromonas gingivalis. *FEMS Microbiol Lett.* **200**, 145-149 (2001).
- 109 Nassar H, H Chou, M Khlgatian, FC Gibson, TE Van Dyke, CA Genco. Role for fimbriae and lysine-specific cycteine proteinase gingipain K in expression of interleukin-8 and monocyte chemoattractant protein in Porphyromonas gingivalis-infected endothelial cells. *Infect and Immun.* **70**, 268-276 (2002).

- 110 N'Guessan PD, B Schmeck, A Ayim, et al. **Streptococcus pneumoniae** R6x induced p38 MAPK and JNK-mediated caspase-dependent apoptosis in human endothelial cells. *Thromb Haemost.* **94**, 295-303 (2005).
- 111 Njoroge T, RJ Genco, HT Sojar, N Hamada, CA Genco. A Role of fimbriae in *Porphyromonas gingivalis* Invasion of Oral Epithelial Cells. *Infect. Immun.* **65**, 1980-1984 (1997).
- 112 Nurse P, Genetic control of cell size at cell division in yeast. *Nature.* **256**, 547-551 (1975).
- 113 Obaya AJ and JM Sedivy. Regulation of cyclin- Cdk activity in mammalian cells. *Cell. Mol. Life Sci.* **59**, 126-142 (2002).
- 114 Olsen I, HN Shah, SE Gharbia. Taxonomy and biochemical characteristics of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis*. *Periodontol.* **2000.** **20**, 14-52 (1999).
- 115 Offenbacher S, PN Madianos, CME Champagne, et al. Peridontitis-atherosclerosis syndrome: an expanded model of pathogenesis. *J Periodont Res.* **34**, 346-352 (1999).
- 116 Okamoto H, T Yoneyama, J Lindhe, A Haffajee, S Socransky. Methods of evaluating periodontal disease data in epidemiological research. *J. Clin. Periodontol.* **15**, 430-439 (1988).
- 117 Ozaki K, S Hanazawa. *Porphyromonas gingivalis* fimbriae inhibit caspase-3- mediated apoptosis of monocytic THP-1 cells under growth factor deprivation via extracellular signal-regulated kinase-dependent expression of p21 Cip/WAF 1. *Infect Immun.* **69**, 4944-4950 (2001).
- 118 Park Y, RJ Lamont. Contact-dependent protein secretion in *Porphyromonas gingivalis*. *Infect Immun.* **66**, 4777-4782 (1998).

- 119 Patel S, R Thiagarajan, J Willerson, et al. Inhibition of integrin and ICAM-1 markedly attenuate macrophage homing to atherosclerotic plaques in ApoE-deficient mice. *Circulation*. **97**, 75-81 (1998).
- 120 Pike R, J Potempa, W McGraw, et al. Characterization of the binding activities of proteinase- adhesion complexes from Porphyromonas gingivalis. *J. Bacteriol.* **178**, 2876-2882 (1996).
- 121 Pischon N, K Krüll, N Suttorp, J Bernimoulin. Periodontal pathogens induce expression of IL-8 and cellular adhesion molecules. *J. Dent Res.* (2001).
- 122 Pischon N, N Heng, J-P Bernimoulin, B Kleber, S Willich, T Pischon. Obesity, inflammation, and periodontal disease. *J Dent Res.* **86**, 400-409 (2007).
- 123 Pischon N, T Pischon, J Kroeger, et al. Rheumatoid arthritis, oral hygiene, and risk of periodontitis. *J Periodontol.* (2008). accepted Dec. 2007
- 124 Pullig O, D Pfander, B Swoboda. Molekulare Grundlagen der Arthroseinduktion und -progression. *Orthopäde* **30**, 825-833 (2001).
- 125 Puri PL, TK MacLachlan, M Levrero, A Giordano. The intrinsic cell cycle: from yeast to mammals In Stein GS, Baserga R, Giordano A und Denhardt DT. *The molecular basis of cell cycle and growth control*. Wiley-Liss, New York (1999).
- 126 Reinhardt RA, JB Payne, CA Maze, KD Patil, SJ Gallagher, JS Mattson. Influence of Estrogen and Osteopenia/Osteoporosis on Clinical Periodontitis in Postmenopausal Woman. *J. Peridontol.* **70**, 823-828 (1999).
- 127 Reveille JD, GS Alarcon, SE Fowler, et al. HLA-DRB1 genes and disease severity in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* **39**, 1802-1807 (1996).

- 128 Rodriguez A, S Pap, CA Vacanti. **The Effect of Long-term Culture on the Ability of Human Auricular Chondrocytes to Generate Tissue Engineered Cartilage.** In: Stark, G.B., Horch, R., Tanczos, E. *Biological Matrices and Tissue Reconstruction*, Springer Verlag Berlin-Heidelberg. 163-168 (1998).
- 129 Ronderos M, DR Jacobs, JH Himes, BL Pihlstrom. **Associations of periodontal disease with femoral bone mineral density and estrogen replacement therapy: cross-section evaluation of US adults from NHANES III.** *J. Clin. Periodontol.* **27**, 778-786 (2000).
- 130 Roth GA, HJ Ankersmit, VB Brown, et al. **Porphyromonas gingivalis infection and cell death in human aortic endothelial cells.** *FEMS Microbiol Lett.* **272**, 06-113 (2007).
- 131 Saglie FR, FA Carranza, MG Newman, et al. **Identification of tissue- invasive bacteria in human periodontal disease.** *J. Periodontal Res.* **17**, 452-455 (1982).
- 132 Saglie FR, CT Smith, MG Newman, et al. **The presence of bacteria in oral epithelium in periodontal disease II. Immunohistochemical identification of bacteria.** *J. Periodontol.* **57**, 492-499 (1986).
- 133 Saglie FR, A Marfany, P Camargo. **Intragingival occurrence of Actinobacillus actinomycetemcomitans and Bacteroides gingivalis in active destructive periodontal lesions.** *J. Periodontol.* **59**, 259-265 (1988).
- 134 Saito S, TJ Rosol, M Saito, PW Ngan, J Shanfeld, Z Davidovitch. **Bone-resorbing activity and prostaglandin E produced by human periodontal ligament cells in vitro.** *J. Bone Miner Res.* **5**, 1013-1018 (1990).
- 135 Schifferle R, P Chen, L Davern, et al. **Modification of experimental Porphyromonas gingivalis murine infection by immunisation with a polysaccharide protein conjugate.** *Oral. Microbiol. Immunol.* **8**, 266-271 (1993).

- 136 Sellner W. Gewebe- und Zellkultur, Wachstumsphasen. In: Böck, P. *Romeis Mikroskopische Technik*, Urban & Schwarzenberg München-Wien-Baltimore, 17. Aufl. 54 (1989).
- 137 Senshun T, S Kan, H Ogawa, et al. Preferential deimination of keratin K1 and filaggrin during the terminal differentiation of human epidermis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **225**, 712-719 (1996).
- 138 Slevogt H, J Seybold, KN Tiwari, et al. *Moraxella catarrhalis* is internalized in respiratory epithelial cells by a trigger-like mechanism and initiates a TLR2- and partly NOD1-dependent inflammatory immune response. *Cell Microbiol.* **9**, 694-707 (2007).
- 139 Smith RL, TC Merchant, DJ Schurman. In vitro cartilage degradation by *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Arthritis and Rheumatism.* **25**, 441-446 (1982).
- 140 Sittinger M, J Braunling, E Kastenbauer, C Hammer, GR Burmester, J Bujia. Proliferative potential of nasal septum chondrocytes for in vitro culture of cartilage transplants. *Laryngorhinootologie* **76**, 96-100 (1997).
- 141 Snyderman R, G McCarty. Analogous mechanisms of tissue destruction rheumatoid arthritis and periodontal disease. *Host-parasite interactions in periodontal disease*. Washington, DC: American Society for Microbiology, Genco RJ, SE Mergeghagen. 354-362 (1982).
- 142 Socransky SS, AD Haffajee, LA Ximenez-Fyvie, M Feres, D Mager. Ecological considerations in the treatment of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* periodontal infections. *Periodontology 2000.* **20**, 341-362 (1999).
- 143 Stein GH, M Namba, CM Corsaro. Relationship of finite proliferative lifespan, senescence and quiescence in human cells. *J. Cell. Physiol.* **122**, 343-349 (1985).

- 144 Sugai M, T Kawamoto, SY Peres, et al. **The cell cycle-specific growth-inhibitory factor produced by Actinobacillus actinomycetemcomitans is a cytolethal distending toxin.** *Infect Immun.* **66**, 5008-5019 (1998)
- 145 Tezal M, J Wactawski-Wende, SG Grossi, AW Ho, R Dunford, RJ Genco. **The Relationship Between Bone Mineral Density and Periodontitis in Postmenopausal Women.** *J.Periodontol.* **71**, 1492-1498 (2000).
- 146 Travis J, R Pike, T Imamura, J Potempa. **Porphyromonas gingivalis** proteinases as virulence factors in the development of periodontitis. *J. Periodontal Res.* **32**, 120-125 (1997).
- 147 Turesson C, EL Matteson. **Genetics of rheumatoid arthritis.** *Mayo Clin. Proc.* **81**, 94- 101 (2006).
- 148 Urnowey S, T Ansai, V Bitko, K Nakayama, T Takehara, S Barik. **Temporal activation of anti- and pro-apoptotic factors in human gingival fibroblasts infected with the periodontal pathogen, Porphyromonas gingivalis: potential role of bacterial proteases in host signalling.** *BMC Microbiol.* **6**, (2006).
- 149 Valtonen V. **Infection as a risk factor for infarction and atherosclerosis.** *Ann Med.* **23**, 539-543 (1991).
- 150 van Kampen GP, TJ van Steenberg, CA Schipper, J de Graaff, JP Veldhuijzen. **Proteoglycan production by chick embryonic chondrocytes is inhibited by culture filtrate of bacteroides gingivalis.** *J. Period. Res.* **19**, 483-488 (1984).
- 151 Van Venrooij W, JM Hazes, H Visser. **Anticitrullinated protein/ peptide antibody and its role in the diagnosis and prognosis of early rheumatoid arthritis.** *N J Med.* **60**, 383- 388 (2002).

- 152 Van Winkelhoff AJ, BG Loos, WA van der Reijden, U van der Velden. **Porphyromonas gingivalis**, *Bacteroides forsythus* and other putative periodontal pathogens in subjects with and without periodontal destruction., *J Clin Periodontol.* **29**, 1023-1028 (2002).
- 153 von der Mark K. **Structure, Biosynthesis, and Gene Regulation of Collagens in Cartilage and Bone.** In: Seibel M, Robins S, Bilezikian J, Hrsg. *Dynamics of Bone and Cartilage Metabolism.* New York: Academic Press, 3-29 (1999).
- 154 Walker T, J Potempa, D Farley and J Travis. **Purification, Characterisation, and Sequence Analysis of Potential Virulence Factor from *Porphyromonas gingivalis*, Peptidylarginine Deiminase.** *Infect Immun.* **67**, 3248-3256 (1999).
- 155 Walter C, J Zahlten, B Schmeck, et al. **Porphyromonas gingivalis strain-independent activation of human endothelial cells.** *Infect Immun.* **72**, 5910-5918 (2004).
- 156 Wang PL, S Shirasu, M Shinohara, et al. **Induction of apoptosis in human gingival fibroblasts by a *Porphyromonas gingivalis* protease preparation.** *Arch Oral Biol.* **44**, 337-342 (1999).
- 157 Weinberg A, CM Belton, P Yoonsuk, RJ Lamont. **Role of fimbriae in porphyromonas gingivalis invasion of gingival epithelial cells.** *Infect and Immun.* **65**, 313-316 (1997).
- 158 Wilton JM, TJ Hurst, EE Scott. **Inhibition of polymorphonuclear leucocyte phagocytosis by *Porphyromonas gingivalis* culture products in patients with adult periodontitis.** *Arch Oral Biol.* **38**, 285-289 (1993).
- 159 Yildirim K, K Senel, S Karatay. **Serum E-selectin and erythrocyte membrane Na⁺K⁺ ATPase levels in patients with rheumatoid arthritis.** *Cell Biochem Funct.* **23**, 285-289 (2005).

- 160 Yoshida A, Y Nakano, Y Yamashita, et al. Immunodominant region of actinobacillus actinomycescomitans 40-kilodalton heat shock protein in patients with rheumatoid arthritis. *J Dent Res.* **80**, 346-350 (2001).
- 161 Zuhlten J, B Riep, FC Nichols, et al. Porphyromonas gingivalis dihydroceramides induce apoptosis in endothelial cells. *J Dent Res.* **86**, 635-40 (2007).

Erklärung an Eides Statt

Hiermit erkläre ich, Eric Röhner, dass die Dissertation mit dem Thema: „Einfluss von *Porphyromonas gingivalis* auf primäre humane Chondrozyten, *in vitro*“, von mir selbst und ohne unzulässige Hilfe Dritter verfasst wurde, auch in Teilen keine Kopie anderer Arbeiten darstellt und die benutzten Hilfsmittel sowie die Literatur vollständig angegeben sind.

Berlin, den

Eric Röhner

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus Datenschutzgründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht mit veröffentlicht.

Publikationen

Nicole Pischon, Eric Röhner, Andreas Hocke, Philippe N'Guessan, Holger Christian Mueller, Georg Matziolis, Verena Kanitz, Peter Purucker, Bernd- Michael Kleber, Jean- Pierre Bernimoulin, Gerd Burmester, Frank Buttgereit, and Jacqueline Detert. Effects of *Porphyromonas gingivalis* on Cell Cycle Progression and Apoptosis of Primary Human Chondrocytes. *Ann Rheum Dis.* 2008; Epub ahead of print.

Abstract Publikationen

E. Röhner, N. Pischon, J. Detert. Einfluss von *Porphyromonas gingivalis* auf primäre, humane Chondrozyten. *DZZ.* **63**, D27- D28 (2008).

J. Detert, E. Röhner, A. Hocke, et al. Intracellular Localization of *Porphyromonas gingivalis* in Human Chondrocytes and Effect on Cell Cycle Progression. *Ann Rheum Dis.* **67** (Suppl II): 153 (2008).

Abstracts

N. Pischon, E. Röhner, A. Hocke, et al. *Porphyromonas gingivalis* Effects Cell Cycle and Apoptosis of Chondrocytes, Pan European Federation (PEF) of the International Association of Dental Research (IADR), London, England, 10-12 September 2008, Abstract 863.

N. Pischon, E. Röhner, A. Hocke, et al. Invasion and Increased Apoptosis in *Porphyromonas gingivalis* infected Human Chondrocytes, International Congress of Periodontal Research (ICPR), Ljubljana, Slovenien 4-7 Juni 2008, 13th.

N Pischon, E Röhner, A Hocke, et al. Intrazellularität von *Porphyromonas gingivalis* in humanen Chondrozyten und sein Einfluss auf den Zellzyklus und Apoptose. 36. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Rheumatologie (DGRh), Berlin, Deutschland, 24. bis 27. September 2008.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Frank Buttgereit, sowie meinen beiden Betreuerinnen, Frau Dr. Jacqueline Detert und Frau Dr. Nicole Pischon, für die gemeinsame Wahl des Themas und die hervorragende Betreuung.

Ich danke der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Rheumatologie und Klinische Immunologie der Charité mit ihrem Direktor, Prof. Dr. Gerd- Rüdiger Burmester, sowie der Abteilung für Parodontologie und Synoptische Zahnmedizin der Charité mit ihrem derzeitigen Direktor, Prof. Dr. Bernd- Michael Kleber und dem ehemaligen Direktor, Prof. Dr. Dr. Jean- Pierre Bernimoulin, für die Ermöglichung und Durchführung dieser experimentellen Arbeit.

Herrn Dr. Andras Hocke, Herrn Dr. Philippe N´Guessan, Herrn Dr. Georg Matziolis, Herrn Dr. Michael Laue und Holger Müller danke ich für die hervorragende wissenschaftliche Zusammenarbeit.

Mein ganz besonderer Dank gilt Frau Verena Kanitz für die Einführung in die experimentelle Medizin, die mich während meiner gesamten Laborarbeit jederzeit mit Rat und Tat liebevoll unterstützte.