

Aus der Poliklinik für Zahnerhaltung und Parodontologie

der Ludwig - Maximilians - Universität München

Vorsitz: Prof. Dr. Reinhard Hickel

Untersuchungen zur Assoziation von Del-1, PTX3, LFA-1

und IL-17 α mit der chronischen Parodontitis

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Zahnmedizin

an der Medizinischen Fakultät

der Ludwig- Maximilians - Universität

zu München

vorgelegt von

Evangelia Karnesi

aus

Cholargos, Griechenland

2019

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München**

Berichterstatter: Prof. Dr.med. Dr. med. dent. Matthias Folwaczny

Mitberichterstatter: PD Dr. Markus Reinholtz
PD Dr. Sven Otto

Mitbetreuung durch
den promovierten Mitarbeiter: Dr. Tamara Berger

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhart Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 22.10.2019

Eidesstattliche Versicherung

Evangelia Karnesi

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,
dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

Untersuchungen zur Assoziation von Del-1, PTX3, LFA-1 und IL-17 α mit der chronischen Parodontitis

selbstständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, 22.10.2019

Evangelia Karnesi

Teile dieser Dissertation wurden publiziert:

Folwaczny M, Karnesi E, Berger T, Paschos E. Clinical association between chronic periodontitis and the leukocyte extravasation inhibitors developmental endothelial locus-1 and pentraxin-3. Eur J Oral Sci. 2017 Aug;125(4):258-264.

Meinem Sohn Christopher

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung.....	1
1.1 Klassifikation der Parodontalen Erkrankungen	1
1.2 Epidemiologie der Parodontitis.....	1
1.3 Ätiologie und Pathogenese der Parodontitis.....	2
1.3.1 Beteiligung von Bakterien bei der Parodontitis	2
1.3.2 Die Rolle der Immunantwort bei der Parodontitis.....	4
1.4 Funktionelle Markermoleküle.....	8
1.4.1 Developmental endothelial locus - 1 (Del-1).....	8
1.4.2 Pentraxin-related Protein 3 (PTX3).....	10
1.4.3 Interleukin 17 α (IL-17 α)	12
1.4.4 Lymphozytenfunktion-assoziiertes Antigen-1 (LFA-1).....	14
2 Studienziel	17
3 Material und Methoden	18
3.1 Studienpopulation	18
3.1.1 Ausschlusskriterien	18
3.1.2 Einschlusskriterien	18
3.2 Entnahme von Gewebeproben der marginalen Gingiva	19
3.3 Lagerung der Gingivaproben.....	20
3.4 RNA Isolierung.....	20
3.5 Konzentrationsbestimmung der RNA-Proben am Nanodrop.....	21
3.6 Reverse Translation und Produktion einer cDNA Sammlung (oder Bio-Bank) (RT-PCR)	21
3.6.1 Denaturierung der RNA.....	21
3.6.2 c-DNA Synthese.....	22
3.7 Sequenzierung der verwendeten Primer für das RT - PCR Verfahren.....	22
3.7.1 Primer Design	23
3.7.2 PCR	23
3.7.3 Elektrophorese	25

3.7.4	Reinigung des PCR Produkts.....	26
3.7.5	Sequenzierung.....	27
3.8	Real-Time-quantitative PCR mit Light Cycler 480®	30
3.9	Relative Quantifizierung der Genexpression mit Standardkurven und dem Light Cycler 480®	32
3.10	Statistische Auswertung	33
4	Ergebnisse.....	35
4.1	Charakteristika der Studienpopulationen	35
4.2	Expression des Markermoleküls Del-1	35
4.2.1	Expression des Markermoleküls Del-1 bei parodontal erkrankten Patienten und Kontrollindividuen	35
4.2.2	Expression des Markermoleküls Del-1 in Abhängigkeit vom Stadium der Parodontitis	37
4.2.3	Expression des Markermoleküls Del-1 in Abhängigkeit vom Geschlecht.....	38
4.2.4	Expression des Markermoleküls Del-1 in Abhängigkeit vom Alter	39
4.2.5	Multivariate Korrelationsanalyse der Ergebnisse	40
4.3	Expression des Markermoleküls PTX3	42
4.3.1	Expression des Markermoleküls PTX3 bei parodontal erkrankten Patienten und Kontrollindividuen	42
4.3.2	Expression des Markermoleküls PTX3 in Abhängigkeit vom Stadium der Parodontitis	43
4.3.3	Expression des Markermoleküls PTX3 in Abhängigkeit vom Geschlecht.....	44
4.3.4	Expression des Markermoleküls PTX3 in Abhängigkeit vom Alter	44
4.3.5	Multivariate Korrelationsanalyse der Ergebnisse	45
4.4	Expression des Markermoleküls IL-17α.....	46
4.4.1	Expression des Markermoleküls IL-17α bei parodontal erkrankten Patienten und Kontrollindividuen	46
4.4.2	Expression des Markermoleküls IL-17α in Abhängigkeit vom Stadium der Parodontitis	47
4.4.3	Expression des Markermoleküls IL-17α in Abhängigkeit vom Geschlecht	48
4.4.4	Expression des Markermoleküls IL-17α in Abhängigkeit vom Alter.....	49
4.4.5	Multivariate Korrelationsanalyse der Ergebnisse	50

4.5	Expression des Markermoleküls LFA-1	51
4.5.1	Expression des Markermoleküls LFA-1 in parodontal erkrankten Patienten und Kontrollindividuen	51
4.5.2	Expression des Markermoleküls LFA-1 in Abhängigkeit vom Stadium der Parodontitis	52
4.5.3	Expression des Markermoleküls LFA-1 in Abhängigkeit vom Geschlecht.....	53
4.5.4	Expression des Markermoleküls LFA-1 in Abhängigkeit vom Alter	54
4.5.5	Multivariate Korrelationsanalyse der Ergebnisse	55
5	Diskussion.....	56
5.1	Studiendesign und Methoden.....	56
5.1.1	Pathogenese der Parodontitis	56
5.1.2	Auswahl der Studienpopulationen	57
5.1.3	Validität der erhobenen Ergebnisse: Primer Design, Real-Time-quantitative-PCR	59
5.1.4	Validität der erhobenen Ergebnisse: Statistische Analyse	60
5.2	Expression von Molekülen mit regulatorischer Wirkung auf die Leukozytenextravasation	
	61	
5.2.1	Vergleich der Ergebnisse der Expression von Del-1 mit Daten aus der Literatur ..	61
5.2.2	Vergleich der Ergebnisse der Expression von IL-17 α mit Daten aus der Literatur	74
5.2.3	Vergleich der Ergebnisse der Expression von LFA-1 mit Daten aus der Literatur.	76
6	Anhang.....	81
6.1	Abbildungsverzeichnis.....	81
6.2	Tabellenverzeichnis.....	82
6.3	Abkürzungsverzeichnis	83
7	Zusammenfassung	86
8	Literaturverzeichnis	87
9	Veröffentlichungen	127
10	Danksagung	128

1 Einleitung

Parodontitis (griech. peri „um“, odons „Zahn“) gehört zu den parodontalen Erkrankungen und sie führt durch eine immunoinflammatorische Infiltration der tieferen Komponenten des Parodontiums (Zahnhalteapparates) zu einer progressiven Zerstörung des Bindegewebes und Knochengewebes, das die Zähne umgibt (Hajishengallis und Korostoff, 2017).

1.1 Klassifikation der Parodontalen Erkrankungen

Die amerikanische und die europäische parodontologische Fachgesellschaften (American Academy of Periodontology, AAP; European Federation of Periodontology, EFP) haben im Jahr 2017 eine Klassifikation des parodontalen Befundes erarbeitet (Caton *et al.*, 2017). Sie unterteilen in drei große Kategorien: (1.) parodontale Gesundheit und gingivale Erkrankungen, (2.) parodontale Erkrankungen sowie (3.) andere Erkrankungen, die den parodontalen Befund beeinflussen. Die parodontalen Erkrankungen umfassen drei Kategorien: die Parodontitis, die mit allgemeinen Erkrankungen assoziierte Parodontitis und die nekrotisierenden Parodontopathien.

1.2 Epidemiologie der Parodontitis.

Die Parodontitis ist die weltweit häufigste Krankheit, die zum Zahnverlust führt (Darveau, 2010) und sie weist in Nordamerika und Großbritannien von allen parodontalen Erkrankungen die höchste Prävalenz auf (Pihlstrom *et al.*, 2005; Albandar *et al.*, 1999; WHO, 2014; Eke *et al.*, 2015). In Deutschland nimmt die Prävalenz der Parodontitis seit 2005 ab, sie liegt aber immer noch bei 51,6% für Erwachsenen zwischen 35 und 44 Jahren und bei 64,8% für jüngere Senioren zwischen 65 und 74 Jahren (DMS V, 2014). Bei älteren Senioren (75-100 Jahre alt) erreicht sie sogar ca. 90%. Trotz der Senkung der Prävalenz der Parodontitis in Deutschland, kann aufgrund der demografischen Entwicklung (Alterung der Gesellschaft) ein erhöhter Behandlungsbedarf von Parodontalerkrankungen prognostiziert werden. Im Jahr 2030 wird laut 5. Deutscher Mundgesundheitsstudie der Großteil der Bevölkerung zur Gruppe der Senioren gehören. Die Parodontitis ist daher aktuell ein zentrales Objekt der Forschung innerhalb der Zahnmedizin.

1.3 Ätiologie und Pathogenese der Parodontitis

Obwohl die Parodontitis schon an Menschen der Antike beobachtet wurde, treten immer wieder neue Aspekte über die Ätiologie und die Pathogenese der Krankheit zu Tage, die die Therapiemöglichkeiten der Erkrankung beeinflussen können. Neben der bakteriellen Infektion als Auslöser der Parodontitis („Plaquehypothese“) befassen sich aktuelle Studien mit unterschiedlichen Funktionen des Immunsystems als Verursacher des parodontalen Attachmentverlusts.

1.3.1 Beteiligung von Bakterien bei der Parodontitis

Der primäre Auslöser der Parodontitis ist eine bakterielle Infektion. Eine der ältesten pathogenetischen Theorien, die mehrfach in der Literatur beschrieben ist, ist die Plaque-Hypothese (Socransky, 1977; Haffajee und Socransky, 1991; Socransky und Haffajee, 1994), wonach die Parodontitis durch eine Infektion mit Bakterien ausgelöst wird, die einen Biofilm bilden. Diese Hypothese wurde inzwischen durch neue wissenschaftliche Arbeiten weiterentwickelt. Bei diesen wurde festgestellt, dass zwar die Anwesenheit von Plaque zwingend zur reversiblen Entzündung der Gingiva führt, dass sich daraus aber nicht zwangsläufig eine Parodontitis entwickeln muss. Demzufolge stellt die Parodontitis – anders als es die Plaque-Hypothese nahegelegt hat – keine opportunistische Infektionserkrankung dar (Stabholz *et al.*, 2010; Laine *et al.*, 2011; Graves, *et al.* 2012). Des Weiteren konnte nachgewiesen werden, dass es durch mechanische und/oder antibiotische Elimination der Infektion regelhaft zur klinischen Ausheilung kommt, die Infektion allerdings auch nach primär erfolgreicher Beseitigung der Erkrankung auf Dauer eine hohe Rezidivneigung aufweist (Hasturk, 2012; Colombo *et al.*, 2012; Beikler und Flemmig, 2011).

Andere aktuelle Studien legen zudem nahe, dass die Parodontitis-assoziierte Mikrobiota hinsichtlich ihrer Bakterien-Zusammensetzung eine höhere Komplexität und Diversität aufweist, als bisher vermutet worden ist (Abusleme *et al.*, 2013; Dewhirst *et al.*, 2010; Duran-Pinedo *et al.*, 2014; Hajishengallis *et al.*, 2011).

1.3.1.1 Das PSD Modell

Zur Erklärung der auslösenden mikrobiellen Infektion wurde das pathogenetische Modell der polymikrobiellen Synergie und Dysbiose (PSD Modell) entwickelt (Hajishengallis und Lamont, 2012). Demnach sind im gesunden parodontalen Gewebe die Bakterien in physiologisch kompatiblen Gemeinschaften organisiert und sie kommunizieren durch komplexe Signalmechanismen (Lamont und Hajishengallis, 2015). Im Zuge von Veränderungen in der Zusammensetzung der parodontalen Mikroflora verändern sich die Wechselwirkungen zwischen Wirt und Biofilm, hierdurch wird die angeborene Immunität des Wirts aktiviert und pathologisch beeinflusst (Kawai *et al.*, 2005).

Im Rahmen dieses PSD Modells wird vor allem die verstärkte Besiedelung des Biofilms durch spezielle Bakterien (sogenannte „keystone pathogens“), wie beispielsweise *Porphyromonas gingivalis*, hervorgehoben, die auch in niedrigen Konzentrationen die Zusammensetzung und Virulenz des subgingival anzutreffenden Mikrobioms (quantitative Veränderung der subgingivalen Bakterienflora) nachhaltig beeinflussen und letztendlich die Parodontitis auslösen können (Hajishengallis, *et al.* 2011; Hajishengallis und Lamont, 2014). Diese dysbiotische, pathologisch veränderte Gemeinschaft kann die immunologische Antwort des Parodontiums stark und unkontrolliert stimulieren. Dies hat eine starke Entzündungsreaktion, einen raschen Gewebeabbau und den Zusammenbruch der Knochenhomöostase zur Folge (Abusleme *et al.* 2013, Hajishengallis *et al.* 2012).

Es ist von großer Bedeutung, dass diese mikrobiologische Gemeinschaft durch die Synergie mehrerer Bakterien Eigenschaften aufweist, die stärker sind als die Summe der einzelnen Mikroorganismen, die diese Kolonie bilden (Wright *et al.*, 2014). *Porphyromonas gingivalis*, das am besten charakterisierte parodontalpathogene gram-negative Bakterium des sogenannten roten Socransky-Komplexes ist nicht in der Lage, ohne die gemeinschaftliche Wirkung der gesamten Bakterien des Biofilms eine Parodontitis auszulösen, dies konnte in einer tierexperimentellen Studie an Mäusen nachgewiesen werden (Hajishengallis *et al.* 2011).

Man spricht daher von einer synergistischen Wirkung mehrerer pathogener Bakterien, die gezielt die Immunantwort negativ beeinflussen und zur Gewebezerstörung führen. Im Rahmen dieser Gewebedestruktion entstehen Abbauprodukte wie Kollagenpeptide, diese werden durch den Biofilm metabolisiert und begünstigen wiederum eine

„inflammophile“ Modifikation desselben (Hajishengallis, 2014, Darveau *et al.*, 2012, Jiao *et al.*, 2013). *Porphyromonas gingivalis* und *Prevotella intermedia* kooperieren beispielsweise durch die Produktion von Metaboliten, die gegenseitig als Ernährungssubstrate konsumiert werden. Durch ihre Präsenz im subgingivalen Biofilm zeigen sie eine synergistische Virulenz, die zum alveolären Knochenabbau führt (Frias-Lopez und Duran-Pinedo, 2012).

1.3.2 Die Rolle der Immunantwort bei der Parodontitis

Die mit der Parodontitis assoziierten Gewebedefekte sind aber nicht nur durch die Veränderung des bakteriellen Biofilms bedingt, sondern werden indirekt auch durch Komponenten des Immunsystems des Wirts vermittelt. Demzufolge spielt die Immunantwort des Wirts auf die bakterielle Intervention eine entscheidende Rolle auf den Krankheitsverlauf der Parodontitis (Page und Schroeder, 1976).

1.3.2.1 Die Rolle von Immunmediatoren bei der Parodontitis

RANKL, ein Tumornekrosefaktor, der unter anderem auch an der Pathogenese der rheumatoiden Arthritis beteiligt ist (Miossec, 2012), begünstigt in murinen und humanen Präparaten die Knochenresorption im Rahmen einer Parodontitis (Belibasakis und Bostanci, 2012). Prostaglandin E (Lamster und Ahlo, 2007), Interleukin-1 α und Interleukin-1 β (Orozco *et al.*, 2006), Interleukin-8 (Bickel, 1993), Interleukin-6 (D'Aiuto *et al.*, 2004), Interleukin-10 (Scarel-Caminaga *et al.*, 2004), Transforming growth factor- β (TNF- β) (Wahl *et al.*, 1993), monocyte chemoattractant protein-1 (Gemmelle *et al.*, 2001) und Tumornekrosefaktor- α (Salvi *et al.*, 1998) sind weitere Zytokine, die bei der Parodontitis eine wichtige Rolle spielen.

Interleukin-6 weist beispielsweise eine signifikant höhere Konzentration im Parodontium von erkrankten Patienten auf (Moreira *et al.*, 2009; Becerik *et al.*, 2012). Finoti *et al.* 2017 berichten über eine überregulierte Expression und Produktion von IL-8 bei Patienten mit chronischer Parodontitis, was im Einklang mit den Ergebnissen zahlreicher weiterer Studien steht (Andia *et al.*, 2011; Cesar-Neto *et al.*, 2007; Venza *et al.*, 2010). Darüber hinaus werden Polymorphismen der Gene für Interleukin 1 α und 1 β mit einer höheren Expression dieser Interleukine im Parodontium in Verbindung gebracht. Diese erhöhte Expression ist ebenfalls mit dem klinischen Bild der Parodontitis assoziiert (Shirodaria *et al.*, 2000; Gore *et al.*, 1998; Gabraith, 1998; Gabraith *et al.*, 1999;

Trombelli *et al.*, 2010; Engebretson *et al.*, 1999). Alle diese Studienergebnisse legen nahe, dass eine gestörte Expression immunologischer Komponenten an der Pathogenese der Parodontitis beteiligt ist.

1.3.2.2 Die Rolle der Neutrophilen Granulozyten bei der klinischen Manifestation von Parodontitis

Neutrophile Granulozyten (PMNs) sind differenzierte Leukozyten, die in hoher Zahl (10^9 Zellen pro kg Körpergewicht und Tag) im Knochenmark gebildet werden (von Vietinghoff and Ley, 2008). Sie werden dem angeborenen Teil des Immunsystems zugeordnet, haben eine Lebensdauer von 6–8 Stunden (von Vietinghoff und Ley, 2008) und besitzen zahlreiche antimikrobielle und pro-inflammatorische Eigenschaften (Kobayashi und DeLeo, 2009; Amulic *et al.*, 2012). Neutrophile Granulozyten scheinen zudem eine zentrale Rolle bei chronisch entzündlichen Erkrankungen wie der rheumatoïden Arthritis, Psoriasis, Atherosklerose, Diabetes zu spielen (Kolaczkowska *et al.*, 2013; Fournier und Parkos, 2012; Mayadas *et al.*, 2014; Tseng *et al.*, 2014).

Die neutrophilen Granulozyten sind die am häufigsten vorkommenden Leukozyten im Parodontium (>95%) (Delima und Van Dyke, 2003). Ihre Anzahl im parodontalen Gewebe weist eine positive Korrelation mit der Schwere der Parodontitis auf (Landzberg *et al.*, 2015). Schon früher wurde auf die Manifestation der marginalen Parodontitis als Folge einer Funktionsstörung der neutrophilen Granulozyten hingewiesen (Schenkein und Van Dyke, 1994).

So könnten neutrophile Granulozyten zu einem erheblichen Gewebeverlust im entzündeten und bakteriell infizierten Parontalgewebe beitragen, wenn beispielsweise deren Rekrutierung gestört wird (Hajishengallis und Korostoff, 2017).

1.3.2.3 Leukozytenextravasation im Parodontium

Damit sich die neutrophilen Granulozyten zum richtigen Moment und ausschließlich am Ort des mikrobiellen Angriffs befinden, wird eine komplexe, mehrstufige Kaskade in Gang gesetzt, bei der schwache und stärkere adhäsive Interaktionen stattfinden (Rekrutierung der neutrophilen Granulozyten) (Hajishengallis und Chavakis, 2013; Vestweber, 2015). Als Folge dieser Rekrutierung findet die Extravasation der neutrophilen Granulozyten aus dem Blut durch die Gefäßwand zum Entzündungsort

(z.B. marginales Parodontium) statt (Amulic *et al.*, 2012; Hajishengallis und Chavakis, 2013; Hajishengallis und Hajishengallis, 2013; Ryder, 2010).

Die neutrophilen Granulozyten befinden sich nach der Wanderung (Extravasation) im Saumepithel des Parodontiums in unmittelbarer räumlicher Nähe zum pathogenen bakteriellen Biofilm. Sie bilden somit die erste Linie der Verteidigung gegen die Bakterien. Histologisch findet dieses Stadium das Korrelat in einem entzündlichen Infiltrat (Schenkein, 2006; Ryder, 2010). Sie spielen dadurch eine wichtige Rolle beim Schutz des Parodontiums vor bakteriellen Infektionen (Meng *et al.*, 2007; Schenkein, 2006; Ryder, 2010; Deas *et al.*, 2003).

Die Rekrutierung der neutrophilen Granulozyten (Abbildung 1.3.2.1) beginnt mit dem sogenannten *rolling* der Zellen am Gefäßendothel. Das *rolling* wird durch die Aktivierung von Kinassen –wie Src- und Syk-Kinasen, Phosphoinositol-3-Kinase (PI3K) und p38 mitogen-activated-Proteinkinase - begünstigt (Yago *et al.*, 2010; Mueller *et al.*, 2010; Ley *et al.*, 2007). Am *rolling* sind Interaktionen zwischen P- und E-Selektinen (Mitgliedern der Integrin-Familie) mit ICAMs, zwischen Chemokinen des Endothels mit dem Glycoprotein P-selectin-glycoprotein-ligand-1 (PSGL-1) sowie mit L-selectin-glycoprotein-ligand-1 (L-SGL-1) der neutrophilen Granulozyten (Kansas, 1996; McEver und Cummings, 1997) beteiligt.

Das nächste Stadium der Extravasation von neutrophilen Granulozyten ist die durch β_2 -Integrine (Mac-1 und LFA-1) induzierte feste Adhäsion (Ley *et al.*, 2007, Campbell *et al.*, 1998; Constantin *et al.* 2000; Liu *et al.*, 2002) der PMNs. Danach erfolgt das sogenannte *crawling* der neutrophilen Granulozyten, bei dem sie nach einer geeigneten Stelle für die Diapedese durch das Endothel suchen.

Das letzte Stadium der Extravasation der PMNs bildet die Transmigration durch das Endothel (Ley *et al.*, 2007). Sie wird durch die Verbindung der β_2 -Integrine Mac-1 und LFA-1 – endothelialen Rezeptorstrukturen – mit ICAM-1 begünstigt (Goldfinger *et al.*, 2003; Xu *et al.*, 2003).

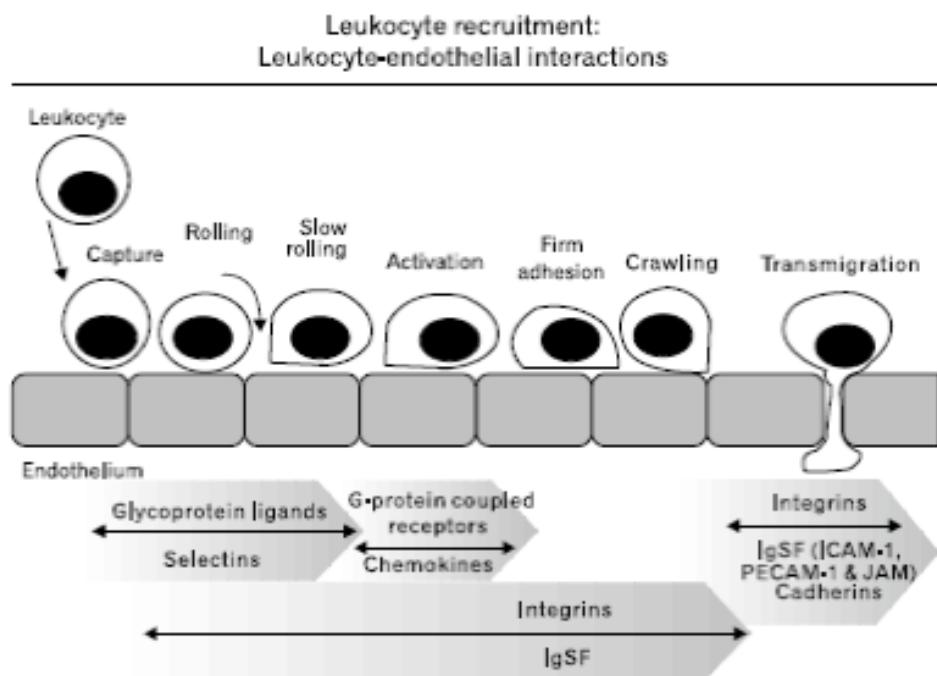


Abbildung 1.3.2.1: Schematische Darstellung der Leukozytenextravasion: (i) PMNs werden vom aktivierten Endothelium festgehalten (ii) Dann erfolgt das *rolling* und (iii) das *slow rolling* der Leukozyten auf dem Endothelium. Anschließend werden PMNs (iv) von Chemokinen des Endotheliums aktiviert (*Activation*), gefolgt von (v) der festen Adhäsion der PMNs ans Endothelium. Danach erfolgt (vi) das post-adhäsive *crawling* der PMNs (vii), die zum Ende der Extravasation transendothelial migrieren (Transmigration oder Diapedese). Spezifische Adhäsionsmoleküle sorgen dafür, dass die benötigten Zelltypen zur richtigen Zeit an den richtigen Ort rekrutiert werden. (Quelle: Choi EY.: Inhibition of leukocyte adhesion by developmental endothelial locus-1 (del-1). *Immune Netw.* 2009 Oct;9(5):153-7)

Obwohl die neutrophilen Granulozyten das Parodontium vor dem Eindringen von Bakterien schützen, können sie gleichzeitig aber auch die Entwicklung eines erkrankungsbedingten Gewebedefekts verstärken (Van Dyke und Serhan, 2003). Sowohl eine übermäßige als auch eine reduzierte Zahl an neutrophilen Granulozyten sowie eine Funktionsstörung der PMNs können den parodontalen Gewebeabbau begünstigen (Deas *et al.*, 2003; Ryder, 2010; Nussbaum und Shapira, 2011; Hasturk *et al.*, 2012; Hajishengallis und Chavakis, 2013; Hajishengallis und Hajishengallis, 2013; Ryder, 2010; Schenkein und Van Dyke, 1994; Hajishengallis *et al.*, 2013).

Die exzessive Rekrutierung der neutrophilen Granulozyten ins Parodontium führt zu einer pathologischen und verhältnismäßig großen Zerstörung des parodontalen Gewebes und somit zum Phänotyp einer Parodontitis (Hajishengallis *et al.*, 2016).

Im Gegensatz zu einer „normalen“ Anzahl an neutrophilen Granulozyten im Parodontium, die eine bakterielle Intervention im Bindegewebe blockiert (Sadallah *et al.*, 2011), erleichtert eine mangelhafte Aktivierung der PMNs und die daraus folgende verminderte Anzahl der neutrophilen Granulozyten im entzündeten Parodontium die gewebezerstörende Wirkung des Biofilms und begünstigt somit die klinische Manifestation der Parodontitis (Hajishengallis *et al.*, 2016). Dies kann besonders deutlich bei Patienten mit angeborenen Defekten der Funktion der neutrophilen Granulozyten, wie zum Beispiel bei der zyklischen Neutropenie, sowie bei Patienten mit Adhäsionsdefizienz der Leukozyten (LAD) festgestellt werden. Diese Individuen weisen regelmäßig eine höhere Prävalenz und Schweregrad der Parodontitis auf (Hajishengallis und Hajishengallis, 2014; Moutsopoulos *et al.*, 2014).

Die Regulation dieser sensiblen Kaskade der Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten scheint somit für eine angemessene Reaktion des Parodontiums auf den Biofilm von großer Bedeutung zu sein. Physiologisches Ziel sollte es sein, dass die Immunantwort weder zur Zerstörung des Gewebes durch die PMNs noch durch die Bakterien führt. Für diese Regulation werden sowohl Inhibitoren der Leukozytenextravasation als auch aktivierende Moleküle benötigt.

1.4 Funktionelle Markermoleküle

Die Expression von Markermolekülen wie Del-1 (Inhibitor der Extravasation der PMNs und der Osteoklastogenese sowie fördernder Faktor der Angiogenese) und PTX3 (Inhibitoren der Extravasation der PMNs) könnte mit dem Vorliegen und dem Schweregrad der Parodontitis assoziiert sein (Chavakis, 2012; Shin *et al.*, 2013; Fan *et al.*, 2008). Darüber hinaus gibt es Hinweise, dass die Expression von IL-17 α (proinflammatorisches Zytokin) und von LFA-1 (Leukozyten-Integrin und Antagonist von Del-1) mit der Manifestation der Parodontitis korreliert sein könnte (Kennedy *et al.*, 2017; Eskan *et al.*, 2012).

1.4.1 Developmental endothelial locus - 1 (Del-1)

Das Markermolekül Del-1 (Edil3) ist ein 52 kDa großes Glykoprotein von Endothelzellen, das während der embryologischen Gefäßentwicklung exprimiert und in der extrazellulären Matrix freigesetzt wird (Hidai *et al.*, 2007; Ho *et al.*, 2004; Hidai *et al.*, 1998). Choi *et al.* (2008) konnten Del-1 in adultem Mausgewebe nachweisen. Sie

zeigten mittels Immunhistochemie und Co-Färbung mit dem endothelialen Marker PECAM-1 sowie RT-PCR Analyse, dass sich murine Del-1-mRNA hauptsächlich in Gehirn, Augen und Lungen sowie in geringerer Menge in den Nieren befindet, nicht aber in Leber, Herz, Milz, Knochenmark oder Blut.

Humanes Del-1 ist zu mehr als 97% identisch mit dem murinen Del-1 und es besteht aus einer Signalsequenz an seinem N-Terminus, drei dem epidermalen Wachstumsfaktor (EGF) ähnlichen Repeats und zwei Discoidin-I-ähnlichen Domänen am C-Terminus (Abbildung 1.4.1.1) (Hidai *et al.* 1998). Das zweite EGF-Repeat (Abbildung 1.4.1.1) beinhaltet ein RGD-Motiv (Arg-Gly-Asp (RGD)-Peptid), das die Bindung von Del-1 an Integrin $\alpha\beta 3$ unterstützt (Hidai *et al.*, 1998) und dadurch die Adhäsion von Endothelzellen an Del-1 ermöglicht (Wu *et al.*, 1996; Germer *et al.*, 1998; Brooks *et al.*, 1994; Hynes, 1992; Hidai *et al.* 1998). Diese Bindung wurde als erste Funktion von Del-1 beobachtet. Sie hängt mit der angiogenetischen Wirkung von Del-1 zusammen (Hidai *et al.* 1998).



Abbildung 1.4.1.1: Domänenstruktur von Del-1. Das zweite EGF-Repeat (egf-2) beinhaltet ein RGD-Motiv (Arg-Gly-Asp (RGD)-Peptid), das die Bindung von Del-1 an Integrin $\alpha\beta 3$ unterstützt und dadurch die Adhäsion von Endothelzellen an Del-1 ermöglicht und die Angiogenese fördert (Quelle: Choi EY: Inhibition of leukocyte adhesion by developmental endothelial locus-1 (del-1). *Immune Netw.* 2009 Oct;9(5):153-7).

Del-1 weist des Weiteren eine zentrale immunologische Wirkung auf, da es das Integrin LFA-1 in Bezug auf die Bindung an ICAM-1 (intercellular adhesion molecule-1) antagonisiert und dadurch die Extravasation der Leukozyten in das entzündlich veränderte Gewebe verhindert (Hajishengallis und Sahingur, 2014). Dieser Antagonismus von Del-1 und LFA-1 könnte eine pathogenetische Rolle bei der Manifestation von chronisch entzündlichen Autoimmunerkrankungen spielen, denn eine mangelhafte Expression von Del-1 könnte die ICAM-1 / LFA-1 - Bindung verstärken und eine exzessive Leukozytenextravasation begünstigen. Eine mangelhafte Expression von Del-1 wurde in der Vergangenheit mit mehreren Erkrankungen wie Multipler Sklerose (Goris *et al.*, 2003), Alzheimer-Demenz (Ramanan *et al.*, 2014), ankylosierender

Spondylitis (Lin *et al.*, 2012), akuter Pneumonie (Choi *et al.*, 2008), Bleomycin-induzierter Lungenfibrose (Kang *et al.*, 2014), Sialadenitis (Baban *et al.*, 2013), systemischen inflammatorischen Response-Syndrom bei Nebennierenrindeninsuffizienz (Kanczkowski *et al.*, 2013) und der Atherosklerose in Verbindung gebracht (Kakino *et al.*, 2016).

Nach intranasaler Gabe von LPS (Lipopolysaccharid) an Del-1-defiziente Mäuse zur Induktion einer Pneumonie wurde eine stärkere Akkumulation von neutrophilen Granulozyten in der bronchoalveolären Lavage beobachtet als bei Kontrollmäusen (Choi *et al.*, 2008; Choi *et al.*, 2015; Eskan *et al.*, 2012). Diese Akkumulation von neutrophilen Granulozyten konnte durch die Verabreichung von Del-1-Fc (lösliches rekombinantes Del-1) verhindert werden (Choi *et al.*, 2015; Eskan *et al.*, 2012). Dieses könnte auf eine mögliche therapeutische Wirkung von Del-1 bei der Behandlung der Pneumonie hindeuten. Darüber hinaus zeigte sich, dass Del-1 allgemein homöostatisch wirkt und die Entzündung in verschiedenen Organen und Geweben, wie dem zentralen Nervensystem und den Schleimhäuten, supprimiert (Kanczkowski *et al.*, 2013).

Inzwischen befasst sich die Forschung auch mit der Rolle von Del-1 bei der Pathogenese der Parodontitis. Shin *et al.* (2015) haben in einem experimentellen Modell der Parodontitis die inhibierende Funktion von Del-1 bei der Osteoklastogenese gezeigt. Eskan *et al.* (2012) beobachteten erstmals, dass Del-1-mRNA und -Protein im murinen Gingivagewebe von Endothelzellen exprimiert werden kann. Immunohistochemische Analysen von Del-1 ergaben, dass es lokal in der Gingiva von Endothelzellen produziert wird, aber vermutlich durch Diffusion auch in extravaskulären Bereichen nachweisbar ist. Es wurde gezeigt, dass Del-1 als ein endogener Inhibitor der Leukozytenrekrutierung in der marginalen Gingiva wirkt (Eskan *et al.*, 2012; Chavakis *et al.*, 2012). Es ist zwar bekannt, dass viele Adhäsionsrezeptoren die Rekrutierung von Leukozyten fördern, es gibt aber nur sehr wenige Informationen über die endogenen Inhibitoren dieser Kaskade.

1.4.2 Pentraxin-related Protein 3 (PTX3)

Bei Pentraxinen (PTXs) handelt es sich um klassische Akut-Phase-Proteine, die seit über einem Jahrhundert bekannt sind (Pradeep *et al.*, 2011). Diese Superfamilie von Akut-Phase-Proteinen ist durch eine zyklische Multimerstruktur gekennzeichnet (Emsley

et al., 1994). PTXs sind ein wesentlicher Bestandteil der angeborenen Immunität (Pepys et al., 1983; Norata et al., 2009).

Das PTX3-Protein besteht aus 381 Aminosäuren, hat ein Molekulargewicht von 40.165 Da (Breviario et al., 1992) und wird auch als *TNF-inducible gene-14 - Protein* (TSG-14) bezeichnet. PTX3 spielt eine wichtige Rolle bei der angeborenen Immunität gegenüber Pathogenen, der Regulierung der Entzündungsreaktion und der Phagozytose apoptotischer Zellen (Gershov et al., 2000; Familian et al., 2001; Rovere et al., 2000; Baruah et al., 2006). Es wird von zahlreichen Zellen, die auch im parodontalen Gewebe vorkommen, exprimiert. Dazu gehören insbesondere neutrophile Granulozyten (Pradeep et al., 2011; Maina et al., 2009), Fibroblasten (Pradeep et al., 2011; Goodman, 2000), Monozyten/Makrophagen (Pradeep et al. 2011; Goodman 2000; Alles et al 1994), dendritische Zellen (Pradeep et al., 2011; Doni et al., 2006), Epithelzellen (Pradeep et al., 2011; Nauta et al., 2005), Endothelzellen (Garlanda et al., 2005; Emsley et al., 1994; Breviario et al., 1992; Jaillon et al., 2007; Mantovani et al., 2003; Pradeep et al., 2011; Gustin et al., 2008) und glatte Gefäßmuskelzellen (Pradeep et al. 2011). PTX3 bindet apoptotische Zellen und hemmt deren Erkennung durch dendritische Zellen (DCs) (Garlanda et al., 2005; Diniz et al., 2004; Garlanda et al., 2002; Bottazzi et al., 1997; Nauta et al., 2003; Salustri et al., 2004; Rovere et al., 2000; Baruah et al., 2006; Scarchilli et al., 2007). PTX3 bindet des Weiteren mit hoher Affinität an Mikroorganismen wie *Aspergillus fumigatus* und *Pseudomonas aeruginosa* (Dinizua, 2004; Bottazzi et al., 1997; Nauta et al., 2003; Roos et al., 2003). Diese Ergebnisse legen nahe, dass PTX3 eine doppelte Funktion hat: den Schutz vor Krankheitserregern durch die Eradikation von Mikroorganismen und die Kontrolle der Autoimmunität durch den Abbau der apoptotischen Zellen (Rovere et al., 2000; Baruah et al., 2006).

Darüber hinaus postulieren einige neuere Studien, dass eine mangelhafte Expression von PTX3 durch eine Kaskade, die die Akkumulation von neutrophilen Granulozyten beinhaltet, mit dem klinischen Bild der Atherosklerose (Salio et al., 2008) und der COPD (Chronisch obstruktive Lungenerkrankung) (Stockley et al., 2013) verbunden ist. PTX3 inhibiert zudem das P-Selektin-abhängige *rolling* der Leukozyten und dadurch deren Extravasation vom Endothel in das entzündete Gewebe (Deban et al. 2010). Bei einer erhöhten Expression von PTX3 steigt schließlich die Resistenz gegen die LPS-induzierte Toxizität, wodurch eine reperfusionsabhängige Entzündung und Gewebezerstörung attenuiert wird (Souza et al., 2002; Dias et al., 2001).

PTX3 kann somit – ebenso wie Del-1 – als ein wichtiger Entzündungshemmer und Inhibitor der Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten bezeichnet werden (Chavakis, 2012). Möglicherweise kann eine mangelhafte Expression von PTX3 eine exzessive Extravasation von PMNs in die Entzündungsstelle verursachen und die klinische Manifestation entzündlicher Erkrankungen, wie beispielsweise der Parodontitis, begünstigen.

1.4.3 Interleukin 17 α (IL-17 α)

Interleukin 17 α , das auch als zytotoxisches T-Lymphozyten Antigen 8 bezeichnet wird, ist ein Zytokin, das 1993 entdeckt wurde (Rouvier *et al.*, 1993). Es wirkt durch die Erhöhung der Chemokinproduktion in verschiedenen Geweben proinflammatorisch. Diese erhöhte Chemokinproduktion dient dazu, das Endothel zu stimulieren und die neutrophilen Granulozyten in das infizierte Gewebe zu rekrutieren (1.3.2.3).

Es hat sich gezeigt, dass sich IL-17 α -produzierende Zellen des angeborenen Immunsystems vor allem in der Haut und der Schleimhaut befinden und dort für die initiale Immunantwort bei Infektionen zuständig sind (Sutton *et al.*, 2009; Aujla *et al.*, 2008; Takatori *et al.*, 2009; Khader *et al.*, 2009). Beispiele für IL-17 α -produzierende Zellen sind $\gamma\delta$ -T-Zellen (Sutton *et al.*, 2009; Ito *et al.*, 2009; Fenoglio *et al.*, 2009; Aujla *et al.*, 2007; Lockhart *et al.*, 2006), CD3+ invariant natürliche Killer-T- (iNKT) Zellen, lymphoide Gewebe-Induktor (LTi)-ähnliche Zellen, natürliche Killerzellen (NK), myeloischen Zellen (Takatori *et al.*, 2009; Michel *et al.*, 2007; Passos *et al.*, 2010; Sutton *et al.*, 2009; Buonocore *et al.*, 2010) und THy1hiSCA1+ Zellen (Sutton *et al.*, 2009; Takatori *et al.*, 2009; Buonocore *et al.*, 2010).

Die Ausschüttung von IL-17 α durch die erwähnten Zelltypen kann durch Bakterien oder andere Mikroorganismen gefördert werden. Oda *et al.* haben 2003 herausgefunden, dass die Oberflächenantigene von *P. gingivalis* eine signifikante IL-17 α -Expression in peripheren mononukleären Blutzellen induziert. Außerdem wurde gezeigt, dass das Lipopolysaccharid (LPS) von *P. gingivalis* bei Parodontitis die Knochenresorption fördert und die Produktion von IL-17 α induziert (Park *et al.*, 2012; Sutton *et al.*, 2009; Aujla *et al.*, 2007; Lockhart *et al.*, 2006; Takatori *et al.*, 2009; Buonocore *et al.*, 2010).

Ferner wurde festgestellt, dass IL-17 α selbst die Ausschüttung einer Vielzahl weiterer proinflammatorischer Mediatoren in verschiedenen Arten von Zellen bewirken kann.

Diese Mediatoren können die Entzündung des Gewebes verstärken und Krankheitsverläufe, beispielsweise der Parodontitis, begünstigen. IL-17 α fördert bei PMNs die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen wie zum Beispiel IL-6, IL-1 β , TNF- α (Meng *et al.*, 2012, Gu *et al.*, 2008, Beklen *et al.*, 2007; Jovanovic *et al.*, 1998), IL-8 (Beklen *et al.*, 2007, Mahanonda *et al.*, 2008), CXCL2 (Kawanokuchi *et al.*, 2008) und es erniedrigt im Rahmen der Knochendestruktion bei einer Parodontitis die Produktion der beiden Chemokine CXCL1 und CXCL5 (Yu und Gaffen, 2008).

Darüber hinaus erhöht IL-17 α die Ausschüttung des Chemokins CCL2 in humanen Makrophagen (Shahrara *et al.*, 2010) sowie die der Chemokine CCL4 und CCL5 in murinen Makrophagen (Barin *et al.*, 2012). IL-17 α stimuliert zudem die Produktion von Prostaglandin E2 in MC3T3-E1-Präosteoblasten (Zhang *et al.*, 2011) sowie die Generierung von Stickstoffmonoxid in MC3T3-E1-Zellen (Van Bezooijen *et al.*, 2001) und in murinen Astrozyten (Trajkovic *et al.*, 2001). Vor diesem Hintergrund wurde die IL-17 α -Familie mit mehreren Autoimmunkrankheiten wie der rheumatoiden Arthritis, Asthma bronchiale, Lupus erythematodes oder Psoriasis in Verbindung gebracht (Aggarwal und Gurney, 2002).

IL-17 α stimuliert auch die Proliferation von gingivalen Fibroblasten in parodontal erkranktem Gewebe (Kawanokuchi *et al.*, 2008; Beklen *et al.*, 2007; Hosokawa *et al.*, 2009), es fördert vermutlich zusätzlich die Proliferation der Saumepithelzellen und verhindert auf diese Weise die Knochenregeneration im Parodontium. Eine erhöhte IL-17 α - Expression im parodontal erkrankten Gewebe ist in zahlreichen Studien gut belegt (Wang *et al.*, 2017; Dutzan *et al.*, 2009; Dutzan *et al.*, 2012; Johnson *et al.*, 2004; Ohyama *et al.*, 2009; Okui *et al.*, 2012; Takahashi *et al.*, 2005; Vernal *et al.*, 2005; Allam *et al.*, 2011; Baker *et al.*, 1994; Cardoso *et al.*, 2009; Ito *et al.*, 2005; Dutzan *et al.*, 2012; Lester *et al.*, 2007; Moutsopoulos *et al.*, 2012; Shaker *et al.*, 2012; Zhao *et al.*, 2011). IL-17 α hat auch nachhaltigen Einfluss auf die Osteoklastogenese in entzündlich verändertem Gewebe wie zum Beispiel bei der Parodontitis, der rheumatoiden Arthritis und der Spondyloarthritis (Zenobia und Hajishengallis, 2015; Liao *et al.*, 2017). In einer aktuellen in-vitro Untersuchung an atherosklerotisch veränderten Gewebeproben konnte gezeigt werden, dass die IL-17 α Produktion ebenfalls in Abhängigkeit vom Alter des Patienten steht (Li *et al.*, 2017). Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass IL-17 α als proinflammatorisches Zytokin starken Einfluss auf die Pathogenese einer Vielzahl von autoimmunen und chronischen Erkrankungen einschließlich der

Parodontitis hat (Isailovic *et al.*, 2015; Suzuki *et al.*, 2014; Hemdan *et al.*, 2010; Kennedy *et al.*, 2017).

1.4.4 Lymphozytenfunktion-assoziiertes Antigen-1 (LFA-1)

Das Lymphozytenfunktion-assozierte Antigen-1 (LFA-1) gehört zur Familie der Leukozyten-Integrine, die sich durch eine gemeinsame $\beta 2$ -Kette ($\beta 2$, CD18) auszeichnen. Die $\beta 2$ -Integrin-Kette wird mit je einer α -Kette kombiniert (αL , αM und αX). Dadurch entstehen die Antigene LFA-1 ($\alpha L\beta 2$, CD11a / CD18), Mac-1 ($\alpha M\beta 2$, CD11b / CD18) und p150, 95 ($\alpha X\beta 2$, CD11c/CD18) (Anderson *et al.*, 1987; Watanabe *et al.*, 1990; Katsuragi *et al.*, 1994). Diese Moleküle werden ausschließlich in Leukozyten exprimiert und dienen der Rekrutierung von Leukozyten im infizierten Gewebe, weshalb sie auch als Leukozyten-Integrine bezeichnet werden (Smith *et al.*, 2007).

Der zytoplasmatische Anteil der α - und β -Kette von Integrinen kann bei der Inside-Out-Signal-Aktivierung, die beispielsweise nach der Stimulation der Chemokin-Rezeptoren auftritt, phosphoryliert werden (Fagerholm *et al.*, 2005; Fagerholm *et al.*, 2004; Fagerholm *et al.*, 2002). LFA-1 wird dabei an der αL -Kette Ser-1140 phosphoryliert, die für den Rap1-Weg der Integrin-Affinität-Regulation zuständig ist, was zu einer verstärkten Ligandenbindung führt (Fagerholm *et al.*, 2005). Im Gegensatz dazu tritt die Phosphorylierung der β -Kette der LFA-1 bei der Zellstimulation auf, z.B. wird die Phosphorylierung von T758 durch Phorbolester oder durch die Ligation des T-Zell-Rezeptors induziert (Hilden *et al.*, 2003). Diese Phosphorylierung kann zytoskelettale Interaktionen des Integrins mit einem multifunktionalen Adapterprotein der 14-3-3-Familie vermitteln, wobei LFA-1 die Zelladhäsion moduliert (Fagerholm *et al.*, 2005; Hibbs *et al.*, 1991; Choi *et al.*, 2008).

LFA-1 ist als klassisches Integrin an drei wichtigen Stadien der Aktivierung von neutrophilen Granulozyten beteiligt: dem *rolling*, der festen Adhäsion und der *Transmigration* (Abbildung 1.3.2.1). Die Bindung von PSGL-1 und E-Selektin während des *rollings* induziert die intermediär affine Konformation des LFA-1 (Salas *et al.*, 2004). Die PSGL-1-abhängige Aktivierung der LFA-1 Signalisierung wird von Fgr, DAP12, FcR γ und Syk-Kinase begünstigt (Zarbock *et al.*, 2007; Zarbock *et al.*, 2008).

Darüber hinaus gibt es Hinweise, dass LFA-1 auch an einem Zwischenstadium der Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten beteiligt ist, dem *slow rolling*. Zwischen

dem *rolling* und der Aktivierung der Leukozyten findet ein Prozess statt, der als „*slow rolling*“ bezeichnet wird, hierbei bewegen sich die Leukozyten langsam mit Hilfe der Integrine Mac-1 und LFA-1 über die Endotheloberfläche (Abbildung 1.3.2.1) (Schenkel *et al.*, 2004; Shaw *et al.*, 2004; Salas *et al.*, 2004; Zarbock *et al.*, 2007). Im Anschluss begünstigt LFA-1 die feste Adhäsion der neutrophilen Granulozyten an das Endothel (Ley *et al.*, 2007; Campbell *et al.*, 1998; Constantin *et al.*, 2000; Liu *et al.*, 2002). Um schlussendlich die Transmigration der PMNs zu realisieren, bindet sich LFA-1 an Endothelrezeptoren der Immunglobulin-Superfamilie, wie die interzellulären Adhäsionsmoleküle 1 und 2 (ICAM-1 und -2), an das vaskuläre Zelladhäsionsmolekül-1 (VCAM-1) und an den Rezeptor für Advanced-Glycation-Endprodukte (RAGE), die in der Regel im entzündeten Endothel hochreguliert werden (Ley *et al.*, 2007; Yonekawa *et al.*, 2005; Chavakis *et al.*, 2003).

Diese Bindung von LFA-1 an den ICAM-1 wurde bereits im Jahr 1981 beobachtet (Davignon *et al.*, 1981). LFA-1 bindet sich hierbei an die D1-Domäne von ICAM-1 und trägt nicht nur zur Transmigration bei, sondern ist auch am *rolling*, der festen Adhäsion und dem *crawling* der PMNs beteiligt (Ley *et al.*, 2007; Simon *et al.*, 2009). Diese frühe Beteiligung an der Aktivierung von neutrophilen Granulozyten liegt vermutlich an der besonders starken Bindung von LFA-1 an ICAM-1 im Vergleich zu der anderer Integrine (Dunne *et al.*, 2002; Phillipson *et al.*, 2006; Kuwano *et al.*, 2010; Yago *et al.*, 2010). Da LFA-1 durch den o.g. Mechanismus die Wanderung der neutrophilen Granulozyten an die Entzündungsstelle begünstigt, ist die mögliche Beteiligung einer erhöhten LFA-1 - Expression an der Pathogenese chronisch-entzündlicher Erkrankungen wie der Parodontitis von großer Bedeutung. Hinweise auf eine mögliche Rolle von LFA-1 in der Pathogenese der Parodontitis gibt unter anderem eine tierexperimentelle Studie an Mäusen (Eskan *et al.* 2012).

Ebenfalls Hinweise auf eine mögliche Rolle von LFA-1 in der Pathogenese der Parodontitis gibt unter anderem auch die erhöhte Prävalenz dieser Erkrankung bei Patienten mit angeborenen Störungen der LFA-1-Funktion. Der Leukozytenadhäsionsdefizienz Typ 1 (LAD-1) ist eine autosomal rezessiv vererbte Krankheit, die durch Defekte des CD18-Gens entsteht (Paller *et al.*, 1994; Springer *et al.*, 1994; Kishimoto *et al.*, 1987). Das CD18-Gen ist für die Expression von $\beta 2$ -Integrine, wie LFA-1, zuständig.

Patienten mit LAD-1 Syndrom weisen eine eingeschränkte Migration der Leukozyten in das Gewebe auf, was wegen mangelhafter Expression der $\beta 2$ -Integrine oder des fucosylierten Selektin-Liganden sowie aufgrund von beeinträchtigter Aktivierung der Leukozyten-Integrine nach Chemokin-Stimulation zu bakteriellen und mykotischen Infektionen oder zu einer peripheren Leukozytose führt (Kinashi *et al.*, 2004). Es gibt einige Studien, die eine Assoziation des LAD-1 Syndroms mit dem klinischen Bild der Parodontitis, insbesondere bei Kindern, zeigen (Moutsopoulos *et al.*, 2014; Deas *et al.*, 2003; Hanna *et al.* 2012; Schmidt *et al.*, 2012).

2 Studienziel

Studienziel war es, zu untersuchen, ob die Expression der Markermoleküle für die Rekrutierung von Leukozyten Del-1, PTX3, LFA-1 und Interleukin 17 α eine klinische Assoziation mit der chronischen Parodontitis zeigt. Des Weiteren sollte festgestellt werden, ob die Expression dieser Markermoleküle vom Alter oder dem Geschlecht abhängt.

3 Material und Methoden

3.1 Studienpopulation

Es wurden insgesamt 95 Patienten untersucht, die sich in der Poliklinik für Zahnerhaltung und Parodontologie der Universität München sowie einer privaten zahnärztlichen Praxis vorgestellt haben. Das Studienprotokoll stand in Übereinstimmung mit den Leitlinien der Helsinki Deklaration und wurde von der lokalen Ethikkommission genehmigt (Nr.: 138-05). Vor Aufnahme in die Studie mussten alle Patienten, nach der Aufklärung über die Ziele der Studie, schriftlich ihr Einverständnis zur Studienteilnahme erklären.

3.1.1 Ausschlusskriterien

Patienten mit schweren Allgemeinerkrankungen, unter anderem Diabetes mellitus, immunologischen Krankheiten und einem erhöhten Risiko für eine bakterielle Endokarditis, sowie Schwangere wurden aus der Studie ausgeschlossen.

3.1.2 Einschlusskriterien

3.1.2.1 Klinische und radiologische Untersuchung der Studienteilnehmer

Alle Studienteilnehmer wurden einer standardisierten parodontalen Untersuchung unterzogen. Im Rahmen dieser Untersuchung wurde an allen natürlichen Zähnen eine vertikale Sondierung des Parodontalsulkus bzw. der Parodontaltaschen an 6 Punkten pro Zahn (mesiobukkal, medibukkal, distobukkal, mesiolingual, medilingual, distolingual) durchgeführt. Die Sondierungstiefe wurde als die Distanz zwischen dem freien Gingivasaum und dem Boden der Parodontaltasche gemessen, wobei die Sonde parallel zur Zahnachse geführt wurde. Mehrwurzelige Zähne wurden zusätzlich mittels horizontaler Sondierung der Furkationseingänge mit einer Nabers-Sonde auf einen Furkationsbefall untersucht. Die Klassifikation des Furkationsbefall erfolgte nach dem Protokoll von Hamp *et al.*, 1975. Ergänzend wurde der alveoläre Knochenabbau an Hand einer radiologischen Panoramenschichtaufnahme bestimmt.

3.1.2.2 Auswahlkriterien für Patienten mit leichter Parodontitis

Patienten, die der Gruppe mit einer leichten Parodontitis zugeordnet wurden, mussten mindestens sieben Zähne mit einem Knochenverlust von mindestens 30% nach radiologischen Kriterien aufweisen. Zusätzlich mussten mindestens 15 Zähne *in situ* sein, davon mindestens 8 Zähne mit einer Sondierungstiefe von ≥ 5 mm und/oder einem Furkationsbefall \geq Grad II.

3.1.2.3 Auswahlkriterien für Patienten mit schwerer Parodontitis

Patienten, die der Gruppe mit einer schweren Parodontitis zugeordnet wurden, mussten mindestens sieben Zähne mit einem Knochenverlust von mindestens 50% nach radiologischen Kriterien aufweisen. Zusätzlich mussten mindestens 15 Zähne *in situ* sein, davon mindestens 8 Zähne mit einer Sondierungstiefe von ≥ 5 mm und/oder einem Furkationsbefall \geq Grad II.

3.1.2.4 Auswahlkriterien für Patienten der Kontrollgruppe

Bei Patienten der Kontrollgruppe durfte maximal ein Zahn eine pathologisch erhöhte Sondierungstiefe (> 3 mm) aufweisen und kein Zahn einen Furkationsbefall zeigen. Es mussten außerdem mindestens 22 Zähne *in situ* sein. In der Kontrollgruppe wurde nur dann eine röntgenologische Untersuchung durchgeführt, wenn dies aus sonstigen Gründen medizinisch indiziert war. Soweit eine Röntgenaufnahme zur Verfügung stand, durften keine Zeichen eines crestalen Knochenverlusts anzutreffen sein.

3.2 Entnahme von Gewebeproben der marginalen Gingiva

Die Probenentnahme erfolgte an der Poliklinik für Zahnerhaltung und Parodontologie der Universität München und in einer zahnärztlichen Praxis durch eine Biopsie der marginalen Gingiva in Lokalanästhesie. Dazu wurde eine Infiltrationsanästhesie mit Articain mit Adrenalinzusatz 1:200.000 durchgeführt. Das Präparat wurde in der Testgruppe durch vertikale Schnittführung ca. 3mm unter Gingivaniveau während der chirurgischen Parodontitistherapie entnommen. Jede Entnahmestelle musste bei leichter Parodontitis einen radiologischen Knochenverlust von mindestens 30%, bei schwerer Parodontitis von mindestens 50% sowie eine Blutung auf Sondierung aufweisen. Die Gingivaproben der Kontrollgruppe wurden während einer chirurgischen Behandlung, die aus nicht parodontalen Gründen medizinisch indiziert war, gesammelt. Alle

Gewebepräparate waren ca. 2 mm x 2 mm groß und enthielten Teile der befestigten Gingiva sowie des Bindegewebes der Lamina propria. Direkt nach der Entnahme wurden die Proben in RNase- und DNase-freie Gefäße mit flüssigem Stickstoff eingebbracht.

3.3 Lagerung der Gingivaproben

Die Proben aus der Poliklinik für Zahnerhaltung und Parodontologie wurden in Kryogefäßen, welche in mit Trockeneis (gefrorenem CO₂) gefüllten, isolierten Boxen gesammelt und bei -80° C in Tiefkühlschränken mit N₂- oder CO₂-Backups eingefroren wurden.

Die Proben aus der Praxis wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Proben wurden in vakuumisolierten Metalltanks in Kryogefäßen gesammelt. Nach dem Transport zur Zahnklinik wurden die Gefäße bei -80° C zur Langzeitlagerung eingefroren.

3.4 RNA Isolierung

Die RNA Isolierung erfolgte unter strikt sterilen Bedingungen.

Für die Homogenisierung der Proben wurde zunächst in jedes Gefäß 1ml RNAzol (Qiagen, Venlo, Niederlande) zugegeben, um das Gewebe und die Zellen zu lysieren. Direkt danach wurden die Proben für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Proben zweimal für 30s in einen Homogenisator (Roche) mit 3000 rpm eingebbracht. Anschließend wurde jeder Probe 0,2 ml Chloroform (Merck) zugegeben, danach wurden die Gefäße für 15 s gerüttelt (Vortex) und für 5 min bei Raumtemperatur gelagert. Nachfolgend wurden die Proben für 15 min mit 12000 rpm bei 4° C zentrifugiert und anschließend die obere Phase (RNA) abgenommen und diese in ein neues 1,5 ml Eppendorf-Gefäß überführt.

In jede homogenisierte Probe wurde ein einfaches Volumen von 70% Ethanol (Merck) gegeben und vorsichtig gemischt. 700 µl jeder Probe wurden auf RNeasy Mini Kit Säule gegeben und mit 10.000 rpm für 15 s bei Raumtemperatur zentrifugiert. Sobald das Volumen der Probe 700 µl überschritt, wurde die o.g. Prozedur so oft wiederholt, bis das gesamte Volumen der Probe aufbereitet war. Danach wurden die Durchflüsse

verworfen, und 350 µl RW1 vom Mini Kit zu jeder Säule zugegeben. Die Säulen wurden für 15 s mit 10.000 rpm zentrifugiert. Danach wurde der DNase-Mix (Qiagen, Venlo, Niederlande) auf jede Säule pipettiert und für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Säulen wurden nach der Wartezeit mit 350 µl RW1 gewaschen und für 15 s mit 10.000 rpm zentrifugiert. Für die weitere Reinigung des Produkts wurden zweimal jeweils 500 µl RPE-Puffer auf die Säule gegeben und die Säule wechselweise für 15 s oder 1 min zentrifugiert.

Zur Entnahme der RNA wurde anschließend eine neue Tube verwendet und direkt auf die Membran der Säule 50 µl RNase-freies Wasser gegeben. Die Gefäße wurden für 1 min bei Raumtemperatur vorinkubiert und für 1 min mit 10000 rpm bei Raumtemperatur zentrifugiert, um die RNA vollständig zu extrahieren. Abschließend wurden die Proben beschriftet und bis zur Bestimmung der Expression der Markermoleküle bei -80 °C eingelagert.

3.5 Konzentrationsbestimmung der RNA-Proben am Nanodrop

Direkt nach der RNA-Isolierung wurde die Menge der RNA jeder Probe mit Hilfe von Nanodrop (Thermo Scientific) bestimmt.

3.6 Reverse Translation und Produktion einer cDNA Sammlung (oder Bio-Bank) (RT-PCR)

Nach der Isolierung der RNA wurde die gesamte RNA in DNA umgeschrieben und eine cDNA-Sammlung produziert, um nachfolgend die Quantifizierung der RNA-Expression durch Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zu ermöglichen.

3.6.1 Denaturierung der RNA

Nach einem standardisierten Protokoll wurde für diesen Schritt ein Reaktionskit zur cDNA-Synthese (RT-PCR Transcriptor First Strand, Fa. Roche) genutzt. Für jede Probe wurde ein Volumen von 500 ng RNA eingesetzt. Daraufhin wurde die RNA-Lösung mit PCR-Grade H₂O (Qiagen, Venlo, Niederlande) bis auf ein Gesamtvolumen von 10 µl aufgefüllt. Anschließend kam es zur Denaturierung der RNA. Die RNA-Lösung (10 µl) jeder Probe wurde mit Hexamer-Primer in einem Volumen von 12 µl gemischt. Die Proben wurden in den Multicycler PTC220 Dyad (MJ Research/ BIO-RAD, Hercules,

CA, USA) eingesetzt und für 10 Minuten bei 65 °C erhitzt und für den nächsten Schritt der Bearbeitung in Eis gelagert.

3.6.2 c-DNA Synthese

Für die cDNA Synthese wurde ein Mastermix verwendet (Tabelle 3.6.2-1). Die Proben wurden in den Multicycler PTC220 Dyad (MJ Research/ BIO-RAD, Hercules, CA, USA) eingesetzt. Bei jedem cDNA-Ansatz wurde eine Negativkontrolle aus steriles Wasser mitgeführt. Die Proben wurden bei 25°C für 15 Minuten, bei 50°C für 60 Minuten, bei 85°C für 5 Minuten erhitzt und anschließend auf 4°C abgekühlt. Danach wurden die Proben in cDNA-Form bei –20°C gelagert.

Pxn-Puffer (8 mM MgCl ₂)	4 µl
dTNPs (10 mM) Mix	2 µl
RNAse-Inhibitor 40 U	0,5 µl
AMV-Reverse-Transkriptase	0,5 µl
PCR-Grade-H ₂ O	1 µl

Tabelle 3.6.2-1: Mastermix Ansatz für die c-DNA Synthese.

3.7 Sequenzierung der verwendeten Primer für das RT - PCR Verfahren

Für die quantitative PCR (Kapitel 3.9 und 3.10) wurden verschiedene Primer benutzt (Tabelle 3.71), die vorher ausgetestet und sequenziert worden waren. Die Proben mit der RNA Nr. 11 und 19 wurden wegen der hohen RNA-Konzentration und der dadurch hohen Genauigkeit der Ergebnisse für die Primer-Austestung verwendet.

Die Zielsequenzen der untersuchten Gene der cDNA-Proben wurden durch PCR selektiv (nur die Teile der DNA, die für die Expression eines jeden Gens zuständig sind) mit Hilfe der Primer mehrfach exponentiell multipliziert. Bei jedem cDNA-Ansatz wurde eine Negativkontrolle aus sterilem Wasser mitgeführt.

3.7.1 Primer Design

Alle Primer wurden von der Fa. TIB Molbiol, Berlin, Deutschland produziert. Für die untersuchten Gene wurden folgende Primer bei einer primer-spezifischen *Melting* Temperatur (TM) (Tabelle 3.7.1-1) verwendet:

Name des Genes	Primer for.	Primer rev.	Produktlänge, bp	TM, °C
hDel-1	5'-CCC gAg gAT TTA ATg ggA TT	5'-gTg ggC CTg AgC ATT TgT AT	162	55°C
hLFA1	5'- CAC gAA gTT CAA ggT CAg CA	5'-TTg Tgg TCT TCC Tgg gTT TC	201	50°C
IL-17 α	5'- ATg gCC CTg Agg AAT ggC AT	5'-ggg TTg TgT ggT gCC TTg AT	242	65°C
hPTX3	5'-gTg ggT ggA gAg gAg AAC AA	5'- TTC CTC CCT CAg gAA CAA Tg	175	57°C
GAPDH	5'- CAA CTA CAT ggT TTA CAT gTT C	5'- gCC AgT ggA CTC CAC gAC	181	55°C

Tabelle 3.7.1-1: Primer Design und verwendete *Melting* Temperatur

3.7.2 PCR

Für die PCR wurden die folgenden Komponenten eingesetzt: Die DNA, die den zu multiplizierenden Abschnitt enthält (Template), zwei Primer (Forward und Reverse), um jeweils den Startpunkt der DNA-Synthese auf den Einzelsträngen der DNA festzulegen,

DNA-Polymerase, um den festgelegten Abschnitt zu kopieren, Desoxynukleosidtriphosphate (dATPs, dTTPs, dGTPs, dCTPs) als Komponenten für die Amplifikation, Mg^{2+} -Ionen und Pufferlösung, damit die Polymerase funktionieren kann (Tabelle 3.7.2-1).

Bei jedem PCR-Ansatz wurde eine Negativkontrolle aus Wasser anstatt cDNA mitgeführt.

10x PCR-Puffer (Qiagen, Venlo, Niederlande)	2,0 μ l
Magnesiumchloridlösung ($MgCl_2$) 25mM (Qiagen, Venlo, Niederlande)	0,6 μ l
Desoxynukleotidtriphosphate (dNTP) 10mM (Sigma)	0,4 μ l
Primer-Mischung (Forward und Reverse) in gleicher Analogie 10 μ M (TIB Molbiol)	1,0 μ l
Hot Start Tag DNA Polymerase (Qiagen, Venlo, Niederlande) 5U/ μ l	0,2 μ l
Q Solution (Qiagen, Venlo, Niederlande)	4,0 μ l
cDNA	1,0 μ l
H_2O (Aqua ad Injectabila) Braun	10,8 μ l

Tabelle 3.7.2-1: PCR Ansatz der untersuchten Genen für die Elektrophorese.

Die Proben wurden in den Multicycler PTC220 Dyad (MJ Research/ BIO-RAD, Hercules, CA, USA) eingesetzt und wie folgt bearbeitet (Tabelle 3.7.2-2):

1. Initialisierung oder Präamplifikation: bei 94 °C für 10 min. Durch die Präamplifikation wurde die DNA für längere Zeit erhitzt, um erstens sicherzustellen, dass sich die cDNA und die Primer vollständig voneinander getrennt haben und nur Einzelstränge vorhanden sind, und zweitens, um die Hot-Start-DNA-Polymerase zu aktivieren.
2. Die Amplifikation, die aus 35 Zyklen besteht, beinhaltet die folgenden Phasen:
 - a) Denaturierung: bei 94°C für 30 s, um die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den beiden DNA-Strängen aufzubrechen.
 - b) Primerhybridisierung: bei Primerhybridisierungstemperatur (Tm) für 30 s, um eine Anlagerung der Primer an die DNA zu erlauben. Diese spezifische Temperatur wird durch die Länge und die Sequenz der Primer bestimmt.
 - c) Elongation oder Verlängerung: bei 72°C für 60s, um die Auffüllung der fehlenden Stränge mit freien Nukleotiden durch die DNA-Polymerase zu ermöglichen. Die DNA-Polymerase beginnt am 3'-Ende des Primers und folgt dem DNA-Strang.
 - d) Am Ende der Amplifikation wurde die DNA für 10 min bei 72 °C erhitzt (Endelongation) und anschließend bei 4°C gekühlt aufbewahrt.

PCR-Schritt	Zyklenzahl	Zyklendauer	Temperatur
Initialisierung	1	10 min	94 °C
Denaturierung	35	30 s	94 °C
Primerhybridisierung		30 s	Tm
Elongation		1 min	72 °C
Endelongation	1	10 min	72 °C

Tabelle 3.7.2-2: Ablauf des PCR Verfahrens für die Sequenzierung der Primer

3.7.3 Elektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese wurde verwendet, um die optimale Primerhybridisierungstemperatur zu bestimmen. Bei dieser Methode werden DNA-Stränge nach ihrer Größe getrennt. Das Agarosegel ist relativ großporig (ca. 500 nm)

und erlaubt die Wanderung der DNA Moleküle unter dem Einfluss eines elektrischen Feldes zur positiv geladenen Anode. Die Banden sind nachfolgend unter UV-Licht sichtbar, da Ethidiumbromid in der DNA interkalliert ist. Je kleiner die Moleküle sind, desto schneller bewegen sie diese im Gel. Durch den Vergleich mit der Wanderung eines Molekulargewichtstandards konnte die Größe der DNA-Moleküle ermittelt werden. Die Dicke der Banden ermöglichte eine ungefähre Schätzung der Konzentration der DNA-Moleküle.

Dazu wurde Agarose (Typ I-A, Sigma) in einer Menge von 1,08 g bei einem Volumen von 60 ml TBE-Puffer (10x TBE beinhaltet 890 mM Tris, 890 mM Borsäure, 20 mM EDTA pH8) durch 3-minütiges Kochen in der Mikrowelle gelöst. Danach wurden 3 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml, Sigma) zugegeben und die Lösung blasenfrei in einen Gelträger gegossen. In den Gelträger wurden zuvor ein bis zwei Gelkämme mit je 15 Zähnen gelegt. Die Gelkämme wurden nach dem Erstarren vorsichtig entfernt und der gesamte Gelträger in eine Gelkammer gestellt. Die Elektrophoresekammer (Sub-Cell GT, BioRad) beinhaltete 1x TBE-Puffer mit 0,3 µg/ml Ethidiumbromid. Danach wurden die DNA-Proben (je 20 µl) mit 3 µl DNA-Puffer (Fermentas Gene Ruler TM Low Range DNA Ladder, ready-to-use, 0,1 µg/µl) gemischt. Am Anfang jeder Reihe, die durch den Kamm entstanden ist, wurden als Molekulargewichtstandard 20 µl DNA Auftragspuffer (Gene Ruler TM DNA Ladder, Low Range SM 1191/2/3, pH 8,0) hinein pipettiert. Im weiteren Verlauf wurden die Taschen des Kamms mit den entsprechenden DNA-Proben belegt. Anschließend gab es einen Lauf bei 120 V / 11 W für ca. 30 min. Schließlich wurde das Agarosegel auf dem UV-Transilluminator (Infinity 3000, Vilber Lourmat) betrachtet und fotografisch dokumentiert.

3.7.4 Reinigung des PCR Produkts

Vor der Sequenzierung erfolgte die Reinigung der DNA-Produkte von Resten der Primer, freien Nukleotiden, Polymerasen und Salzen. Die Reinigung des PCR-Produkts wurde mit Hilfe des QIAquick PCR Purifikation Kit Protokolls (Qiagen, Venlo, Niederlande) vorgenommen. Es wurden 5 Volumen von PB-Puffer zu 1 Volumen jeder PCR-Probe zugegeben und gemischt. Der PB-Puffer wurde vorher durch die Zugabe von 1: 250 Volumen pH-Indikator I vorbereitet. Durch die gelbe Färbung der Lösung wurde bestätigt, dass sie einen pH-Wert von max. 7,5 aufwies. Danach wurde eine

QIAquick-spin-Säule auf ein 2 ml Gefäß platziert. Auf die Säule wurde die DNA appliziert und für 60 s bei 13.000 rpm bei Raumtemperatur zentrifugiert, um die DNA-Stränge zu verbinden. Daraufhin wurden die Durchflüsse verworfen und die Säule wieder auf dem Gefäß platziert. Um die DNA zu reinigen, wurden schließlich 750 µl PE-Puffer auf die Säule appliziert. Vorher wurde der PE-Puffer mit 100%iger Ethanol-Lösung gemischt. Das Gefäß wurde weiterhin für 60 s bei 13.000 rpm bei Raumtemperatur zentrifugiert und die Durchflüsse verworfen. Die Säule wurde erneut auf dem Gefäß platziert und eine zweite Zentrifugation für 60 s bei 13.000 rpm bei Raumtemperatur durchgeführt. Danach wurde für die Elution der DNA die Säule auf ein neues 1,5-ml-Gefäß platziert und 50 µl EB-Puffer (10 mM Tris Cl, pH 8,5) auf die Mitte der Membran gegeben. Das Gefäß wurde wieder für 60 s bei 13.000 rpm Raumtemperatur zentrifugiert und die gereinigte DNA entnommen.

3.7.5 Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierung bestimmt die Nukleotid-Abfolge in einem DNA-Molekül. Diese Methode wurde verwendet, um die Abfolge der genutzten Primer an der PCR-Probe zu identifizieren und dadurch zu bestätigen, dass die Gensequenz der Nukleotid-Abfolge die richtige Primersequenz aufweist. Die Sequenzierung erfolgte durch die Fa. Sequiserve (Vaterstetten, Deutschland). Die Primer, die für die PCR benutzt worden waren, wurden separat in Forward- und Reverse-Form in Konzentration von 10 µmol/ml verschickt, ebenso das gereinigte PCR-Produkt und die verwendeten- in cDNA-Form - Proben mit der RNA- Nr. 11 und 19 (siehe auch 3.7). Die Sequenzen aller Primer wurden an der PCR-Probe wie folgt bestätigt:

(hLFA1-forward)

GCTGCCGGGAATGCATCGAGTCGGGGCCGGCTGCACCTGGTGCCAGAAGCTGA
ACTTCACAGGGCCGGGGATCCTGACTCCATTGCTGCGACACCCGGCCACAGCT
GCTCATGAGGGCTGTGCGGCTGACGACATCATGGACCCCCACAAGCCTCGCTGAA
ACCCAGGAAGACCACAA

(hLFA1-reverse)

AGCGAGGCTTGTGGGGCCATGATGTCGTCAGCCGCACAGCCCCATGAGCAGC

TGTGGCCGGGTGTCGAGCGAATGGAGTCAGGATCCCCGGCCGTGAAGTTCA
GCTTCTGGCACCAGGTGCAGCCGGCCCCGACTCGATGCATTCCGGCAGCTGCT
GACCTTGAACCTCGTG

Gesamtsequenzen:

(hLFA1 -forward>><<reverse)

CACGAAGTTCAAGGTAGCAGCTGCCGGAAATGCATCGAGTCGGGGCCCGGCTG
CACCTGGTGCAGAAGCTGAACCTCACAGGGCCGGGGATCCTGACTCCATTGC
TGCGACACCCGGCCACAGCTGCTCATGAGGGCTGTGCGGCTGACGACATCATG
GACCCCACAAGCCTCGCTGAAACCCAGGAAGACCACAA

(hDEL -forward)

CACTGTCAGCACAAACATAATGAATGCGAAGTTGAGCCTGAAAAATGGTGGAAT
ATGTACAGATCTTGTGCTAACTATTCCGTGAGTGCCCAGGCGAATTATGGGAA
GAAATTGTCAATACAAATGCTCAGGCCAC

(hDEL – reverse)

TGACAATTCTCCCATAAATTGCGCTGGCACTCACAGGAATAGTTAGCAACAAGA
TCTGTACATATTCCACCATTTGCAAGGCTCAACTTCGCATTCAATTATGTTGTGCT
GACAGTGAATCCCATTAAATCCTCGGG

Gesamtsequenzen:

(hDEL-forward>><<reverse)

CCCGAGGATTAAATGGGATTCACTGTCAGCACAAACATAATGAATGCGAAGTTGAG
CCTTGCAAAAATGGTGGAATATGTACAGATCTTGTGCTAACTATTCCGTGAGTGC
CCAGGCGAATTATGGGAAGAAATTGTCAATACAAATGCTCAGGCCAC

(hIL-17A-forward)

GGGGAAAATGAAACCCCTCCCCAAAATACAAGAAGTTCTGGGAGGGAGACATTGTCTT
CAGACTACAATGTCCAGTTCTCCCTAGACTCAGGCTTCTTGGAGATTAAGGC
CCCTCAGAGATCAACAGACCAACATTTCTCTCAAGCAACACTCCTAGGGC
CTGGCTTCTGTGATCAAGGCACCACACAACCC

(hIL-17A-reverse)

GGAGTGGTGGCTGAGGAAGAGAAAAATGTTGGTCTGTTGATCTCTGAGGGGCCTTA
ATCTCCAAAGGAAGCCTGAGTCTAGGGGAGAAACTGGACATTGTAGTCTGAAGACA
ATGTCTCCTCCCAGAACCTTCTGTATTTGGGGAGGGTTCATTTCCCCATATGAT
CTTAATAATGACATGCCATTCTCAGGGCCAT

Gesamtsequenz:

(hIL-17A-forward>><<hIL-17A-reverse)

ATGGCCCTGAGGAATGGCATGTCATTATTAAAGATCATATGGGGAAAATGAAACCC
TCCCCAAAATACAAGAAGTTCTGGGAGGGAGACATTGTCTTCAGACTACAATGTCCA
GTTTCTCCCCTAGACTCAGGCTTCCTTGGAGATTAAGGCCCCTCAGAGATCAACA
GACCAACATTTCTCTCCTCAAGCAACACTCCTAGGGCCTGGCTCTGTCTGATC
AAGGCACCACACAACCC

(hPTX3 -forward)

TTGCTGAAGCCATGGTTCCCTGGGAAGGTGGACCCACCTGTGCGGCACCTGGAA
TTCAGAGGAAGGGCTCACATCCTGTGGTAAATGGTGAAGTGGCGGCTACCACT
GTTGAGATGGCACAGGTACATTGTTCTGAGGGAGGAA

(hPTX3-reverse)

TGACCTGTGGCCATCTAACAGTGGTAGCCGCCAGTTACCAATTACCCACAAGGA
TGTGAGCCCTCCTCTGAATTCCAGGTGCCGCACAGGTGGTCCACCTTCCCAGG
GAAACCATGGCTTCAGCAACCAGTTGTTCTCCTCTCCACCCAC

Gesamtsequenz:

(hPTX3-forward>><<reverse)

GTGGGTGGAGAGGAACAAACTGGTTGCTGAAGCCATGGTTCCCTGGGAAGGT
GGACCCACCTGTGCGGCACCTGGAATTCAAGAGGAAGGGCTCACATCCTGTGGGT
AAATGGTGAAGTGGCGGCTACCACTGTTGAGATGGCCACAGGTACATTGTTCTG
AGGGAGGAA

Abbildung 3.7.5.1 Sequenzen aller benutzen Primer (Forward, Reverse und Gesamtsequenz). Die Sequenzierung erfolgte durch die Fa. Sequiserve (Vaterstetten, Deutschland).

3.8 Real-Time-quantitative PCR mit Light Cycler 480®

Die RT-qPCR (Real-time-quantitative PCR) ist eine sehr sensible Methode zur präzisen Quantifizierung der Genexpression. Für diese Methode benötigt man ein Enzym. Das verwendete Enzym (SYBR Green LightCycler® 480 Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland) besitzt Fluoreszenzmarker an zwei verschiedenen Oligonukleotiden, die mit den Primern verbunden sind und sich während der Amplifikation auch mit dem DNA-Template verbinden. Diese Fluoreszenzmarker werden durch eine Lichtquelle angeregt und geben einen Teil ihrer Energie ab. Aufgrund dieser Eigenschaften kann SYBR-Green als Sonde für die Quantifizierung der PCR-Produkte eingesetzt werden. Die freigesetzte Lichtenergie wird ständig am Ende der Annealing-Phase bei jedem Zyklus durch einen Monitor beobachtet und gemessen.

Um sicher zu stellen, dass nur das gewünschte PCR-Produkt und keine anderen PCR-Produkte oder Primer-Dimere amplifiziert wurden, erfolgte nach der Amplifikation eine Schmelzkurven (Melting Curve)-Phase. Dabei wird das PCR Produkt aufgeschmolzen, indem die Temperatur langsam und kontinuierlich erhöht wird ($TM \rightarrow 95\text{ C}$). Daraufhin denaturieren die DNA-Doppelstränge, der Fluoreszenzfarbstoff des SYBR Green I wird freigesetzt und jede Änderung der Fluoreszenz registriert. Die Fluoreszenz durch Primer- Dimere kann ausgeschlossen werden, da die doppelsträngige DNA von spezifischen PCR-Produkten einen höheren Schmelzpunkt als unspezifische Primer-Dimere hat.

H ₂ O PCR Grade (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland)	3 µl
Primer Mischung (Forward und Reverse) in Analogie 10 µM (TIB Molbiol, Berlin, Deutschland)	2 µl
SYBR Green (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland)	10 µl

Tabelle 3.7.5-1: Mastermix für das RT-PCR Verfahren.

Für jedes Experiment wurde manuell ein Mastermix (PCR-Einsatz ohne DNA-Template) zusammengesetzt (Tabelle 3.7.5-1). PCR-Grade-Wasser wurde die Primer-Mischung zugefügt und leicht vermengt. Anschließend wurde SYBR-Green zugefügt und leicht vermischt. Mit der Thermo Matrix 384 Equalizer Pipette 2–125 µl (Thermo Fisher Scientific) wurden je 15 µl Mastermix-Einsatz auf Trägerplatten für 384 Proben (LightCycler® 480 Multiwell Plate 384 Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland) aufgebracht. Anschließend wurde manuell mit einer Fix-Vol.-Mikroliter-Pipette Reference 10 µl (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) je Einsatz eine 5 µl cDNA-Probe (Template cDNA) hineinpipettiert. Bei jedem Experiment wurde zur Sicherung des Ergebnisses jedes cDNA-Template in Triplikaten eingesetzt. Anschließend wurden die Trägerplatten in den Light Cycler 480® (Fa. Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland) zur Durchführung der PCR eingebracht. Danach erfolgte ein standardisierter Ablauf der PCR. Auf die 10-minütige Präinkubations- oder Denaturierungsphase bei 95 °C erfolgten 40 Amplifikationszyklen bei der jeweiligen TM des Primers. Anschließend folgte die Schmelzkurvenanalyse bei bis auf 95°C kontinuierlich steigender Temperatur (Tabelle 3.7.5-2).

Name des Programms	Zyklen	Zieltemperatur (°C)	Aquisition Modus	Hold (hh:mm:ss)	Ramp Rate (°C/s)	Aquisitions (per°C)
Präinkubation	1	40	None	00:00:30	2,50	
		95	None	00:10:00	4,80	
Amplifikation	40	95	None	00:00:10	4,80	
		TM	None	00:00:10	2,50	
		72	Single	00:01:00	4,80	
Schmelzkurve	1	95	None	00:00:05	4,80	
		TM-10	None	00:01:00		
		95	Continious		0,11	5

Cooling	1	40	None	00:00:30	2,50	
---------	---	----	------	----------	------	--

Tabelle 3.7.5-2: Ablauf der PCR durch entsprechende Programmierung des Light Cycler 480

Jedes cDNA-Template wurde in Triplikaten mindestens zweimal auf verschiedenen Platten bzw. Experimenten wiederholt. Haben die entstandenen Cp-Werte des Triplikats einen größeren Unterschied als 0,2 aufgewiesen, wurde die Prozedur wiederholt.

3.9 Relative Quantifizierung der Genexpression mit Standardkurven und dem Light Cycler 480®

Da die exakte Anzahl der Kopien des Zielgens im PCR-Produkt nicht bekannt war, wurde ein relatives Quantifikationsverfahren mit Hilfe der Ct-Methode ausgewählt. Dabei wurde nicht die absolute Anzahl der Kopien des Gens bestimmt, sondern es wurde die Expression des Zielgens auf ein Referenzgen (Housekeeping Gen, HKG) bezogen. Als Referenzgen wurde das Gen der GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase) benutzt. Die oben genannte Prozedur wird als „Normalisierung“ bezeichnet. Sie hat den Vorteil, dass sich die Varianz der Expressionsergebnisse reduziert.

Um eine relative Quantifizierung zu ermöglichen, ohne die Effizienz als Standard (=2) zu definieren, muss in jedes durchgeführte Experiment eine Standardkurve integriert werden. Um die Standardkurve zu erzeugen, wurde ein cDNA-Template als Standard definiert, und es wurden aus dieser Probe verschiedene Verdünnungen hergestellt. Alle Verdünnungen wurden als Triplikate eingesetzt und ebenfalls als Standard definiert. Die daraus grafisch entstandene Standardkurve wies eine hohe Amplifikationseffizienz (90-105%), Konsistenz innerhalb der Wiederholungen (Triplikate) und eine lineare Beziehung ($r^2 > 0.980$) auf.

Diese Grafik wurde mittels Light Cycler Software in das jeweilige Experiment integriert. Dafür musste die Probe, die für die Standardkurve benutzt wurde, in jedem Experiment identifiziert und auch dort als Standard definiert werden. Mittels der Standardkurve konnten die Cp-Werte jeder Probe in dieser Grafik dargestellt und dadurch über die Light Cycler Software die Konzentration des PCR-Produkts der Probe ermittelt werden. Anschließend erfolgte die sog. Normalisierung der relativen Expression zu der Menge des GAPDH (*Housekeeping Gen*) pro cDNA Probe mit Hilfe der Software SPSS im Rahmen der statistischen Auswertung.

3.10 Statistische Auswertung

Die Zufallsvariable X ist je nach Auswertung die Expression von einem der vier folgenden untersuchten Gene:

- a) hDel-1
- b) hPTX3
- c) IL-17 α
- d) hLFA1

Darüber hinaus wurde eine weitere Zufallsvariable Y einbezogen:

- a) Geschlecht
- b) Alter

Die statistische Auswertung erfolgte zum Teil univariat mit der Zufallsvariable X und zum Teil bivariat mit den Zufallsvariablen X und Y.

Jede Stichprobe bestand aus der Anzahl der Expressionsmessungen jeder Gingivaprobe, da jede Gingivaprobe mehrmals für die Expression eines Gens getestet wurde (Tabelle 3.8).

Für die Auswertung der Daten, die mit der o.g. Methode sortiert und dokumentiert wurden, wurde eine Datenanalyse der Einzelgruppen durchgeführt. Dafür wurde das Statistikprogramm SPSS Software Version 22.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) verwendet.

Alle Ergebnisse der PCR-Expression wurden mit dem Levene-Test auf Homogenität der Varianzen und mittels Kolmogoroff-Smirnov-Test auf die Normalverteilung getestet. Für den Vergleich der Expression der Markermoleküle zwischen gesunden Proben und Parodontitisproben wurden der Mann-Whitney- und der Kruskal-Wallis-Test verwendet. Die Analyse von kategorialen Daten erfolgte mittels Pearson-Chi-Quadrat-Test mit Yates-Korrektur. Für die Auswertung der Interaktionen zwischen den Variablen X (Expression der Markermoleküle) und Y (Parodontitis Ja/ Nein, Stadium der Erkrankung,

Alter und Geschlecht) wurde der Spearman-Rho-Koeffizient verwendet. Für alle Tests wurde ein p-Wert<0,05 als statistisch signifikant festgelegt.

4 Ergebnisse

4.1 Charakteristika der Studienpopulationen

Insgesamt wurden 82 Patienten mit chronischer Parodontitis aufgenommen. 42 davon hatten eine leichte Parodontitis, während 40 Patienten eine schwere Parodontitis aufwiesen. Außerdem gehörten 13 Probanden zur Kontrollgruppe. Alle Studienteilnehmer waren Kaukasier. Der Altersdurchschnitt betrug bei den Patienten mit leichter Parodontitis 54 Jahre, bei den Patienten mit schwerer Parodontitis 56,1 Jahre, und in der Kontrollgruppe lag er bei 44,5 Jahren. In der Gruppe mit leichter Parodontitis fanden sich mehr Männer (63%) als in der Gruppe mit schwerer Parodontitis (36%) sowie in der Kontrollgruppe (39%) (Tabelle 3.7.5-1).

	Kontrollgruppe (n=12)	Gruppe mit leichter Parodontiti s (n=42)	Gruppe mit schwerer Parodontiti s (n=40)	p-Wert
Alter (Jahre)	44,5	54,0	56.,1	p=0,001 (*)
Geschlecht (Männer: Frauen)	61% : 39%	37% : 63%	64% : 36%	p=0,001 (**)

Tabelle 3.7.5-1: Charakteristika der beiden Parodontitis-Testgruppen und der gesunden Kontrollgruppe. (*) p-Wert durch Kruskall-Wallis-Test ausgewertet, (**) p-Wert durch Pearsons-Chi-Square-Test mit Yales Korrelationen ausgewertet.

4.2 Expression des Markermoleküls Del-1

4.2.1 Expression des Markermoleküls Del-1 bei parodontal erkrankten Patienten und Kontrollindividuen

Die relative Expression von Del-1 bei den Patienten mit Parodontitis (gesamt) und der Kontrollgruppe wurde mittels RT-qPCR untersucht. Del-1 wurde in den Gingivaproben

der Parodontitisgruppe signifikant geringer exprimiert als bei parodontal gesunden Individuen ($p=0,015$).

	Kontrollgruppe (rel. Expression) (\pm SD)	Parodontitisgruppe (rel. Expression) (\pm SD)	p-Wert (Parodontitis vs. Kontrolle)
Del-1 (*)	5,68 (\pm 6,53)	1,38 (\pm 1,19)	0,015

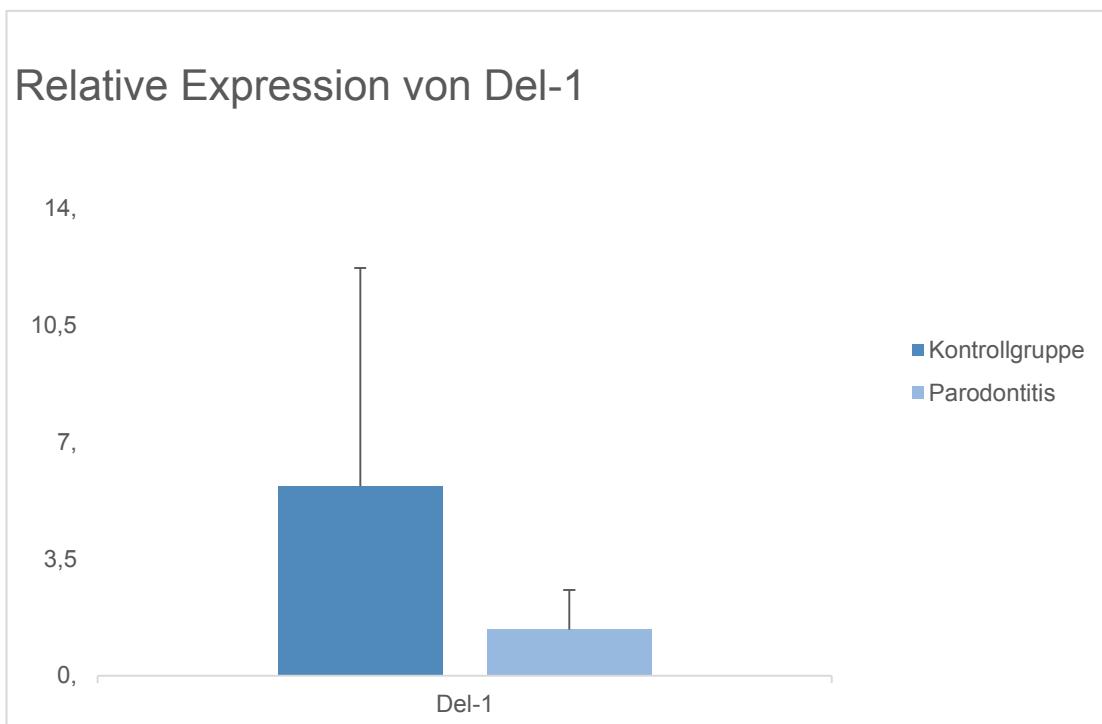


Tabelle und Diagramm 4.2.1-1: Relative Expression von Del-1 in Gingivaproben, normalisiert durch GAPDH, aus der Kontroll- und Parodontitisgruppe.

Die Auswertung erfolgte durch den Mann-Whitney-Test. Die Werte zeigten keine Normalverteilung zwischen den Gruppen (*).

4.2.2 Expression des Markermoleküls Del-1 in Abhängigkeit vom Stadium der Parodontitis

Die relative Expression von Del-1 war bei leichter Parodontitis (1,46 (\pm 1,24)) signifikant niedriger ($p=0,025$) als in der Kontrollgruppe (5,68 (\pm 6,53)). Darüber hinaus wurde Del-1 bei schwerer Parodontitis (1,30 (\pm 1,14)) im Vergleich zur Kontrollgruppe (5,68 (\pm 6,53)) geringer exprimiert ($p=0,019$).

	Kontrollgruppe (rel. Expression) (\pm SD)	Leichte Parodontitis (rel. Expression) (\pm SD)	p-Wert (leichte vs. Kontrolle)	Schwere Parodontitis (rel. Expression) (\pm SD)	p-Wert (schwere vs. Kontrolle)
Del-1 (*)	5,68 (\pm 6,53)	1,46 (\pm 1,24)	0,025	1,30 (\pm 1,14)	0,019

Relative Expression von Del-1 nach Schweregrad der Parodontitis

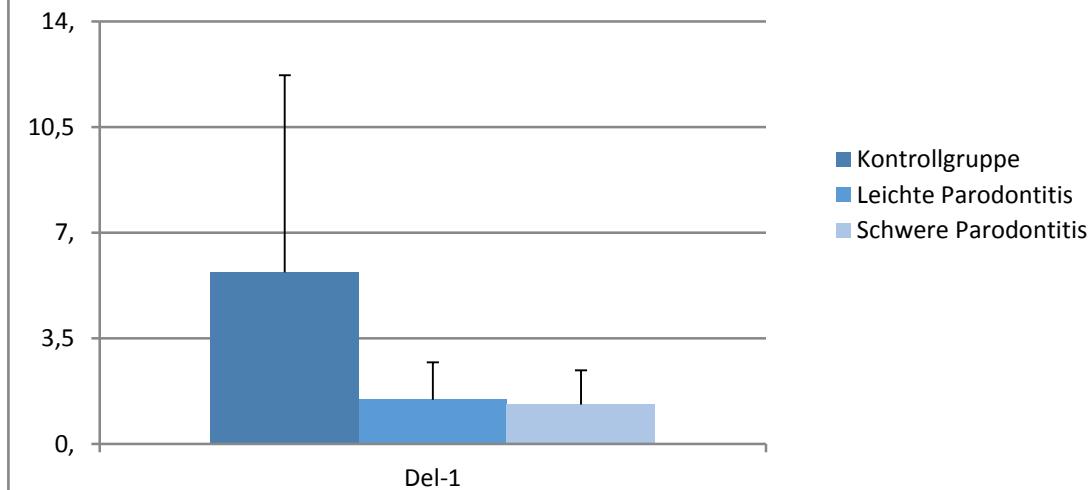


Tabelle und Diagramm 4.2.2-1: Expression von Del-1 in Gingivaproben von gesunden sowie parodontal kranken Probanden je nach Schwere der Parodontitis.

4.2.3 Expression des Markermoleküls Del-1 in Abhängigkeit vom Geschlecht

Nach Analyse der Ergebnisse mit Hilfe des Mann-Whitney-Tests konnte in der Parodontitisgruppe bezüglich des Geschlechts eine signifikant niedrigere Expression des Del-1-Gens bei Männern nachgewiesen werden ($p=0,0001$). Im Gegensatz dazu war bei Frauen kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen festzustellen ($p=0,313$) (Tabelle und Diagramm 4.2.4-1).

	Kontrollgruppe (rel. Expression) (\pm SD)	Parodontitisgruppe (rel. Expression) (\pm SD)	p-Wert (Parodontitis vs. Kontrolle)
Männer			
Del-1 (*)	7,08 (\pm 6,74)	1,30 (\pm 0,92)	0,0001
Frauen			
Del-1 (*)	3,55 (\pm 5,67)	1,46 (\pm 1,41)	0,313

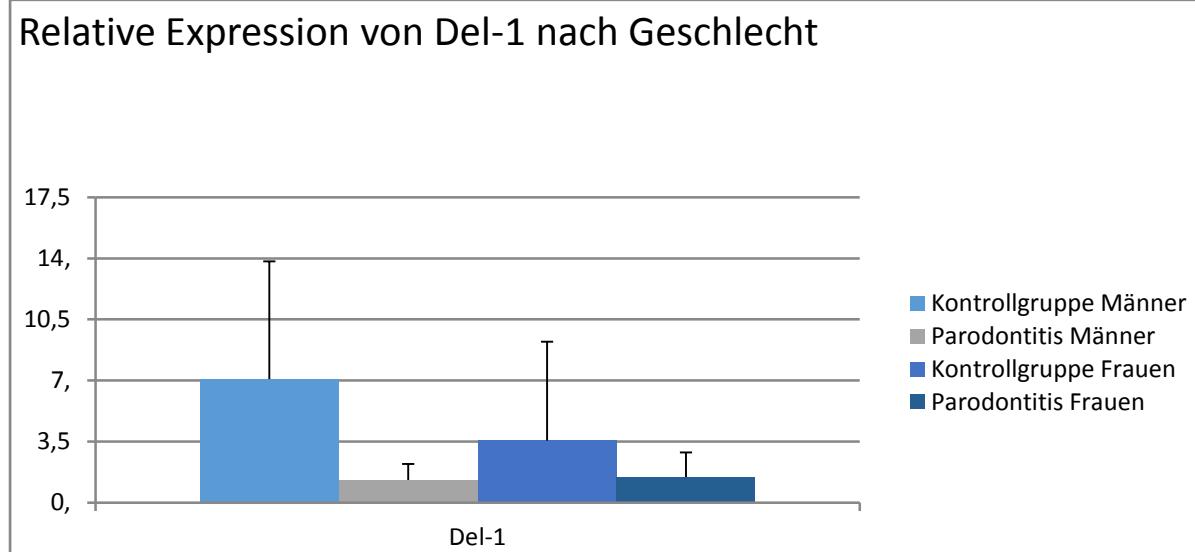


Tabelle und Diagramm 4.2.3-1: Expression von Del-1 in Gingivaproben von gesunden sowie parodontal kranken Probanden je nach Geschlecht.

Die Auswertung erfolgte durch den Mann-Whitney-Test.

4.2.4 Expression des Markermoleküls Del-1 in Abhängigkeit vom Alter

Bei älteren Individuen (> 50 Jahre) der Parodontitisgruppe war eine signifikant niedrigere Expression von Del-1 im Vergleich zur Kontrollgruppe zu beobachten. Bei jüngeren Individuen (< 50 Jahre) mit Parodontitis war ebenfalls eine signifikant niedrigere Expression von Del-1 im Vergleich zur Kontrollgruppe festzustellen.

	Kontrollgruppe (rel. Expression) (\pm SD)	Parodontitisgruppe (rel. Expression) (\pm SD)	p-Wert (Parodontitis vs. Kontrolle)
≤ 50 Jahre alt			
Del-1(*)	8,46 (\pm 6,90)	1,58 (\pm 1,52)	0,0001
> 50 Jahre alt			
Del-1(*)	1,42 (\pm 2,34)	1,29 (\pm 1,01)	0,0001

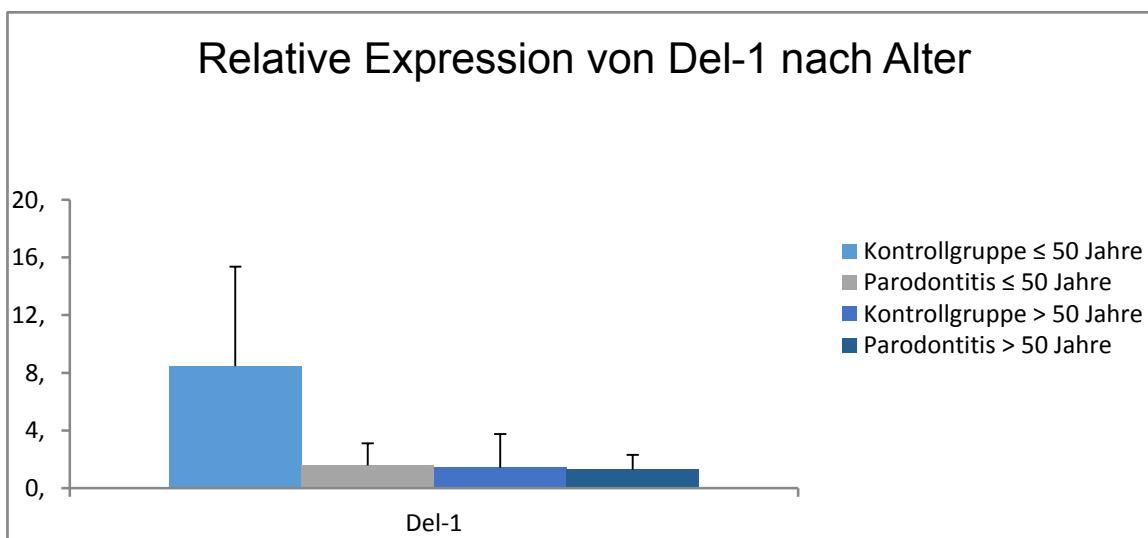


Tabelle und Diagramm 4.2.4-1: Expression des Markermoleküls Del-1 bei jüngeren (≤ 50 Jahre alt) und älteren Probanden (> 50 Jahre alt).

Allerdings zeigt sich ein altersabhängiger signifikanter Unterschied in der Expression von Del-1 je nach Erkrankungsschwere. Bei Probanden mit leichter Parodontitis und in der Kontrollgruppe war die Expression von Del-1 bei jüngeren Probanden (≤ 50 Jahre alt) signifikant höher als bei älteren Probanden (> 50 Jahre alt) ($p=0,0001$). Bei Patienten mit schwerer Parodontitis konnte bezüglich des Alters kein signifikanter Unterschied in der Expression von Del-1 nachgewiesen werden (Tabelle und Diagramm 4.2.4-1).

	Del-1 (p-Wert) (≤ 50 Jahre alt vs. > 50 Jahre alt)
Kontrollgruppe	0,0001
Leichte Parodontitis	0,054
Schwere Parodontitis	0,615

Tabelle 4.2.4-1: Vergleich der Del-1 Expression zwischen Probanden ≤ 50 Jahre alt und Probanden > 50 Jahre alt je nach Schwere der parodontalen Erkrankung. Die Auswertung erfolgte durch den Mann-Whitney-Test.

4.2.5 Multivariate Korrelationsanalyse der Ergebnisse

Für die bivariate Korrelationsanalyse wurden die Zufallsvariablen Parodontale Erkrankung, Stadium der Parodontitis, Alter und Geschlecht mit den Zufallsvariablen Relative Expression des Gens Del-1 korreliert. Es wurde dafür der Spearmans-Rho-Test verwendet.

Nach der Spearmans Rank-Korrelation (Tabelle 4.5.3) war die relative Expression von Del-1 signifikant mit dem Alter der Probanden korreliert ($p=0,001$). Im Detail liegt die Korrelation zwischen Alter und relativer Expression von Del-1 bei $r_s=-0,134$. Das negative Vorzeichen des Korrelationskoeffizienten lässt erkennen, dass es sich hierbei

um eine umgekehrt korrelierende Beziehung der beiden Variablen handelt. Es war eine signifikant niedrigere Expression von Del-1 bei älteren im Vergleich zu jüngeren Probanden zu beobachten. Bezuglich des Geschlechts waren keine signifikanten Ergebnisse nachzuweisen.

Des Weiteren war die Del-1 Expression signifikant mit dem Stadium der Parodontitis-Erkrankung ($p=0,006$) assoziiert. Es ist eine negative Korrelation festzustellen ($r_s = -0,116$), was darauf hindeutet, dass eine erniedrigte Del-1 Expression mit einem schwereren Stadium der Parodontitis assoziiert ist.

		Del-1
parodontale Erkrankung (ja/nein)	Korrelationskoeffizient	-0,103
	Signifikanz (2-seitig)	0,015
Stadium der parodontalen Erkrankung	Korrelationskoeffizient	-0,116
	Signifikanz (2-seitig)	0,006
Alter	Korrelationskoeffizient	-0,134
	Signifikanz (2-seitig)	0,001
Geschlecht	Korrelationskoeffizient	-0,048
	Signifikanz (2-seitig)	0,226

Tabelle 4.2.5-1: Bivariate Korrelationsanalyse des Einflusses von Erkrankung (ja/nein), Stadium der Erkrankung, Alter und Geschlecht auf die Expression von Del-1. Die Auswertung erfolgte durch den Spearmans-Rho-Test.

4.3 Expression des Markermoleküls PTX3

4.3.1 Expression des Markermoleküls PTX3 bei parodontal erkrankten Patienten und Kontrollindividuen

Die relative Expression von PTX3 bei den Patienten mit Parodontitis (gesamt) und der Kontrollgruppe wurde mittels RT-qPCR untersucht. PTX3 wurde in den Gingivaproben der Parodontitisgruppe signifikant geringer exprimiert als bei parodontal gesunden Individuen ($p<0,0001$).

	Kontrollgruppe (rel. Expression) (\pm SD)	Parodontitisgruppe (rel. Expression) (\pm SD)	p-Wert (Parodontitis vs. Kontrolle)
PTX3 (*)	4,75 (\pm 7,14)	0,17 (\pm 0,28)	0,0001

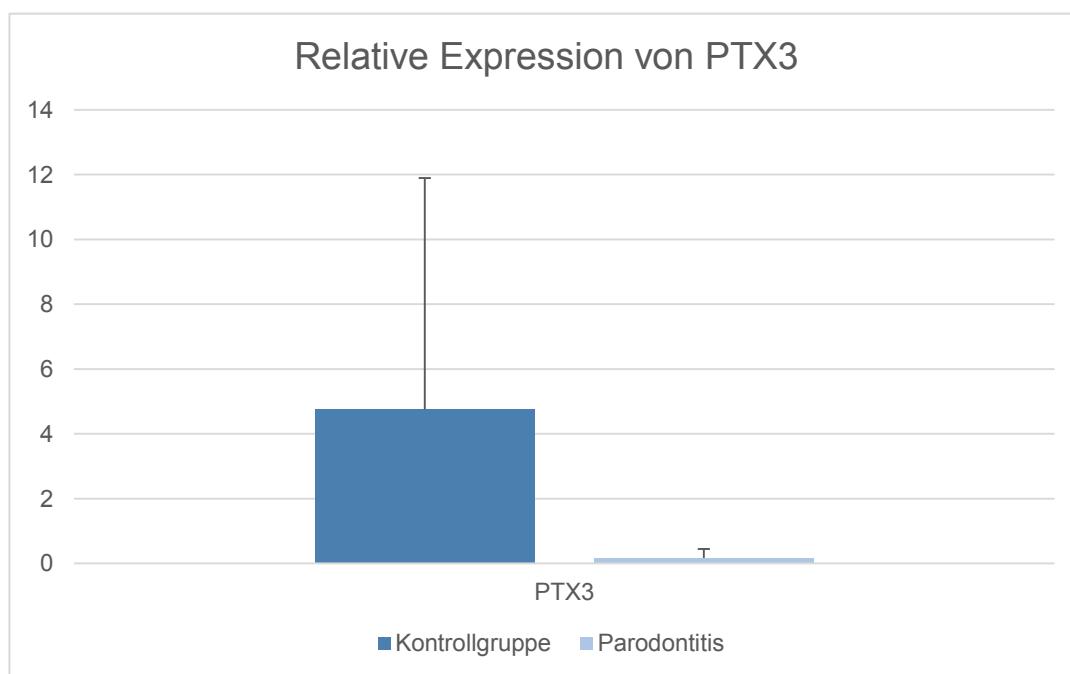


Tabelle und Diagramm 4.3.1-1: Relative Expression von PTX3 in Gingivaproben, normalisiert durch GAPDH, aus der Kontroll- und Parodontitisgruppe.

Die Auswertung erfolgte durch den Mann-Whitney-Test. Die Werte zeigten keine Normalverteilung zwischen den Gruppen (*).

4.3.2 Expression des Markermoleküls PTX3 in Abhängigkeit vom Stadium der Parodontitis

PTX3 war signifikant ($p=0,002$) in der Gruppe mit schwerer und leichter Parodontitis geringer ($0,17 (\pm 0,24)$ bzw. $0,17 (\pm 0,31)$) als in der Kontrollgruppe ($4,75 (\pm 7,14)$) exprimiert.

	Kontrollgruppe (rel. Expression) (\pm SD)	Leichte Parodontitis (rel. Expression) (\pm SD)	p-Wert (leichte vs. Kontrolle)	Schwere Parodontitis (rel. Expression) (\pm SD)	p-Wert (schwere vs. Kontrolle)
PTX3 (*) (**)	$4,75 (\pm 7,14)$	$0,17 (\pm 0,24)$	0,0001	$0,17 (\pm 0,31)$	0,0001

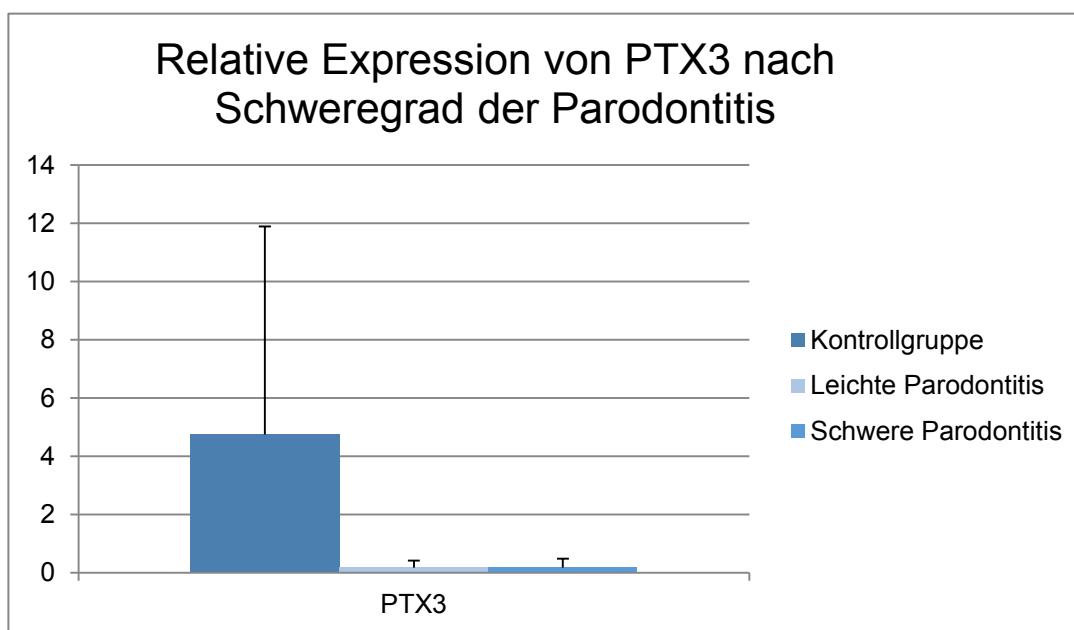


Tabelle und Diagramm 4.3.2-1: Expression von PTX3 in Gingivaproben von gesunden sowie parodontal kranken Probanden je nach Schwere der Parodontitis.

Die Auswertung erfolgte durch den Mann-Whitney-Test. Die Werte zeigten keine Normalverteilung (*) und/oder keine Homogenität der Varianz zwischen den Gruppen (**).

4.3.3 Expression des Markermoleküls PTX3 in Abhängigkeit vom Geschlecht

Nach Analyse der Ergebnisse mit Hilfe des Mann-Whitney-Tests ist in der Parodontitisgruppe bezüglich des Geschlechts eine signifikant niedrigere Expression des PTX3-Gens bei Männern nachgewiesen worden ($p=0,0001$). Im Gegensatz dazu war bei Frauen kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen festzustellen ($p=0,313$) (Tabelle 4.4.1).

	Kontrollgruppe (rel. Expression) (\pm SD)	Parodontitisgruppe (rel. Expression) (\pm SD)	p-Wert (Parodontitis vs. Kontrolle)
Männer			
PTX3 (*)	5,77 (\pm 7,65)	0,17 (\pm 0,28)	0,0001
Frauen			
PTX3 (*)	3,18 (\pm 6,09)	0,16 (\pm 0,28)	0,025

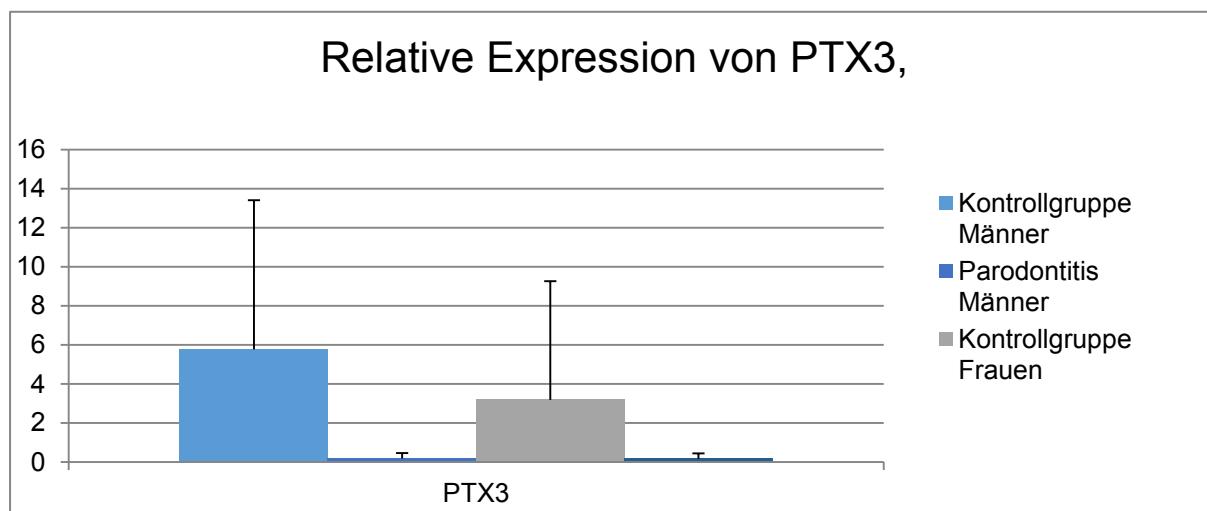


Tabelle und Diagramm 4.3.3-1: Expression von PTX3 in Gingivaproben von gesunden sowie parodontal kranken Probanden je nach Geschlecht.

Die Auswertung erfolgte durch den Mann-Whitney-Test.

4.3.4 Expression des Markermoleküls PTX3 in Abhängigkeit vom Alter

Bei älteren Individuen (> 50 Jahre) der Parodontitisgruppe war keine signifikant unterschiedliche Expression von PTX3 im Vergleich zur Kontrollgruppe zu beobachten.

Bei jüngeren Individuen (< 50 Jahre) mit Parodontitis war allerdings eine signifikant niedrigere Expression von PTX3 im Vergleich zur Kontrollgruppe festzustellen ($p=0,0001$).

	Kontrollgruppe (rel. Expression) (\pm SD)	Parodontitisgruppe (rel. Expression) (\pm SD)	p-Wert (Parodontitis vs. Kontrolle)
≤ 50 Jahre alt			
PTX3(*)	4,29 (\pm 4,89)	0,14 (\pm 0,19)	0,0001
> 50 Jahre alt			
PTX3(*)	4,77 (\pm 9,74)	0,17 (\pm 0,30)	0,053

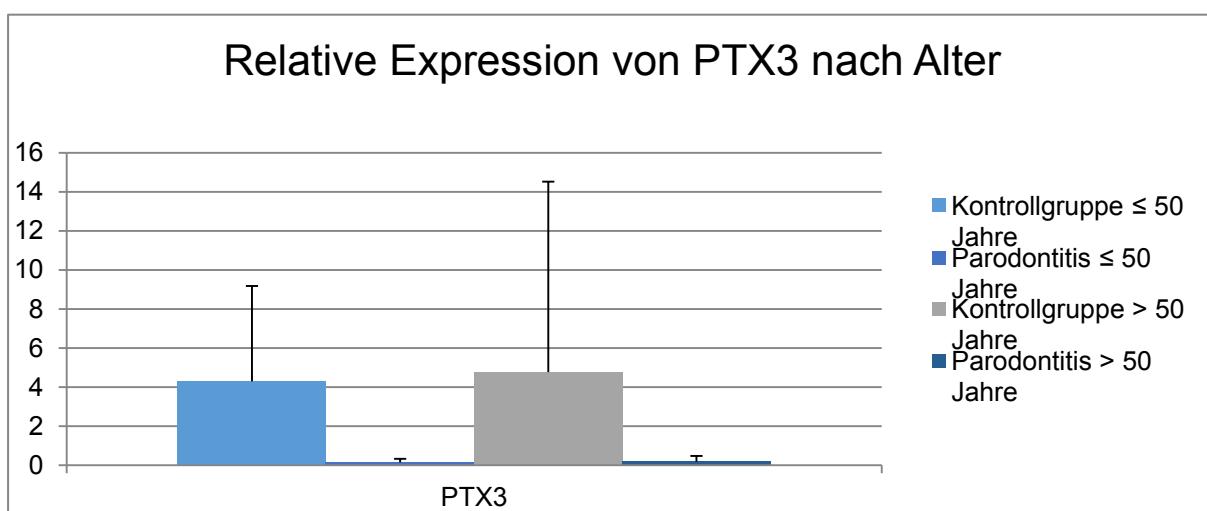


Tabelle und Diagramm 4.3.4-1: Expression des Markermoleküls PTX3 bei jüngeren (≤ 50 Jahre alt) und älteren Probanden (> 50 Jahre alt).

4.3.5 Multivariate Korrelationsanalyse der Ergebnisse

Für die bivariate Korrelationsanalyse wurden die Zufallsvariablen Parodontale Erkrankung, Stadium der Parodontitis, Alter und Geschlecht mit den Zufallsvariablen Relative Expression von PTX3 korreliert. Es wurde dafür der Spearmans-Rho-Test verwendet.

Nach der Spearmans Rank-Korrelation (Tabelle 4.3.5-1) war die relative Expression von PTX3 signifikant mit der Parodontitis bzw. mit dem Stadium der Parodontitis korreliert ($p=0,0001$). Im Detail liegt die Korrelation zwischen Parodontitis bzw. Stadium der

Parodontitis und relativer Expression von PTX3 bei $r_s=-0,354$ bzw. $r_s=-0,276$. Je vorgeschrittener die Parodontitis war, desto niedriger war die relative Expression des Gens PTX3. Allerdings wurde bezüglich des Alters und des Geschlechts keine signifikant unterschiedliche Expression nachgewiesen.

		PTX3
parodontale Erkrankung (ja/nein)	Korrelationskoeffizient	-0,354
	Signifikanz (2-seitig)	0,0001
Stadium der parodontalen Erkrankung	Korrelationskoeffizient	-0,276
	Signifikanz (2-seitig)	0,0001
Alter	Korrelationskoeffizient	-0,060
	Signifikanz (2-seitig)	0,171
Geschlecht	Korrelationskoeffizient	-0,048
	Signifikanz (2-seitig)	0,241

Tabelle 4.3.5-1: Bivariate Korrelationsanalyse des Einflusses von Erkrankung (ja/nein), Stadium der Erkrankung, Alter und Geschlecht auf die Expression von PTX3. Die Auswertung erfolgte durch den Spearmans-Rho-Test.

4.4 Expression des Markermoleküls IL-17 α

4.4.1 Expression des Markermoleküls IL-17 α bei parodontal erkrankten Patienten und Kontrollindividuen

Die relative Expression von IL-17 α bei Patienten mit Parodontitis (gesamt) und der Kontrollgruppe wurde mittels RT-qPCR untersucht. Interleukin 17 α weist in der Parodontitisgruppe eine signifikant höhere Expression auf ($p=0,006$).

	Kontrollgruppe (rel. Expression) (\pm SD)	Parodontitisgruppe (rel. Expression) (\pm SD)	p-Wert (Parodontitis vs. Kontrolle)
Interleukin 17A (*)	0,32 (\pm 0,68)	0,54 (\pm 1,41)	0,006

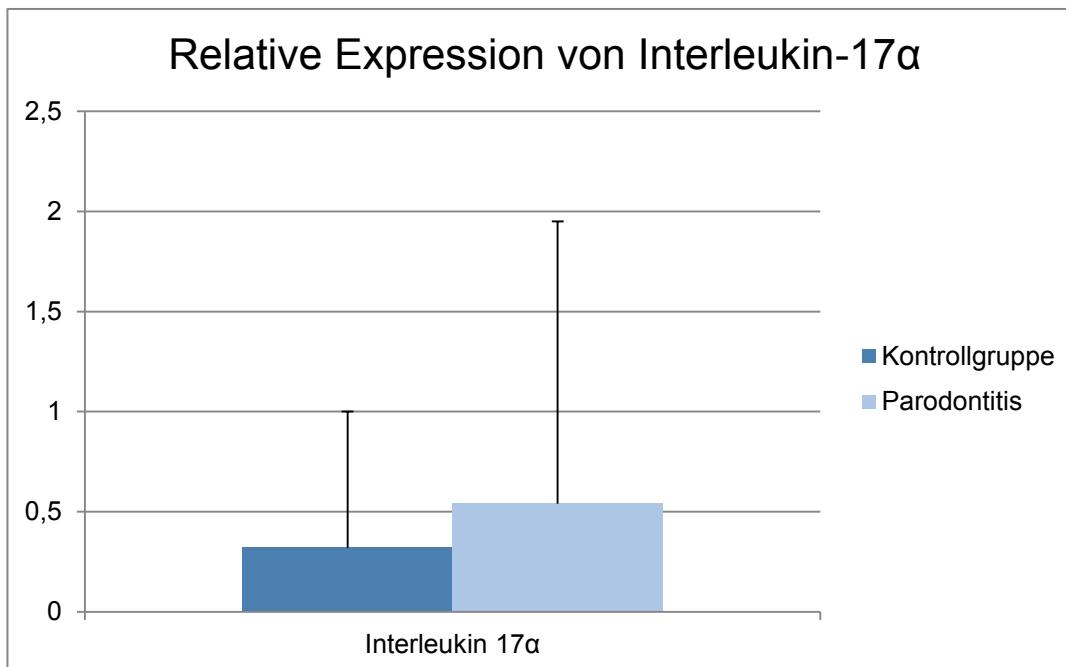


Tabelle und Diagramm 4.4.1-1: Relative Expression von Interleukin-17 α in Gingivaproben, normalisiert durch GAPDH, aus der Kontroll- und Parodontitisgruppe.

Die Auswertung erfolgte durch den Mann-Whitney-Test. Die Werte zeigten keine Normalverteilung zwischen den Gruppen (*).

4.4.2 Expression des Markermoleküls IL-17 α in Abhängigkeit vom Stadium der Parodontitis

Die relative Expression von IL-17 α war bei der Gruppe mit leichter Parodontitis (0,55 (\pm 1,27)) höher als in der Kontrollgruppe (0,32 (\pm 0,68)), eine signifikant höhere Expression konnte allerdings nicht nachgewiesen werden ($p = 0,012$). Darüber hinaus wurde bei schwerer Parodontitis ebenfalls keine signifikant höhere Expression ($p = 0,008$) im Vergleich zur Kontrollgruppe (0,52 (\pm 1,55)) festgestellt.

	Kontrollgruppe (rel. Expression) (\pm SD)	Leichte Parodontitis (rel. Expression) (\pm SD)	p-Wert (leichte vs. Kontrolle)	Schwere Parodontitis (rel. Expression) (\pm SD)	p-Wert (schwere vs. Kontrolle)
Interleukin 17 α (*)	0,32 (\pm 0,68)	0,55 (\pm 1,27)	0,012	0,52 (\pm 1,55)	0,008

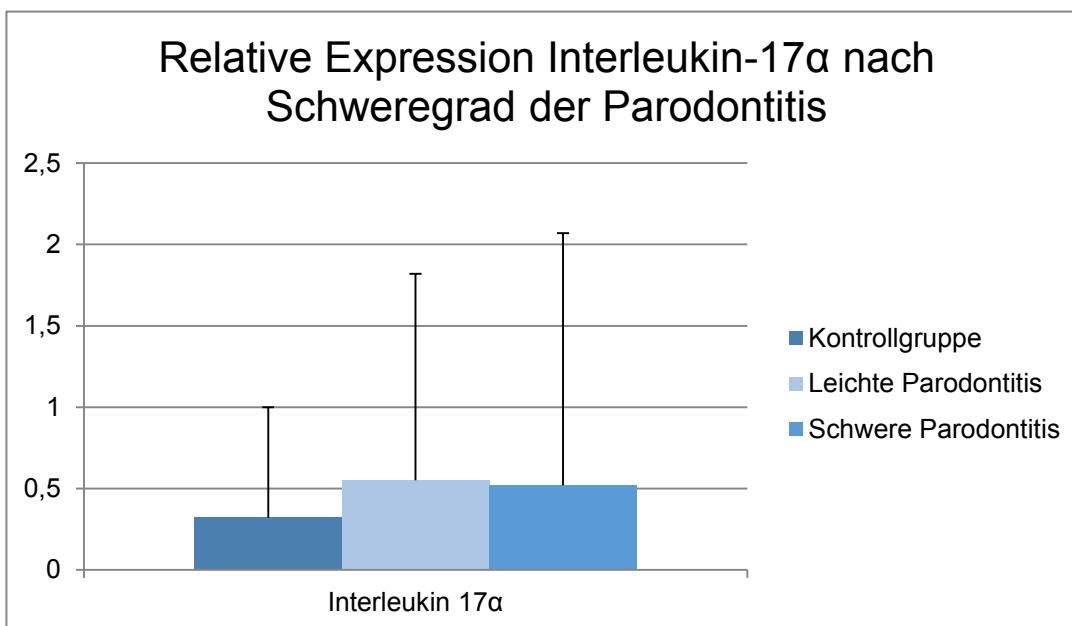


Tabelle und Diagramm 4.4.2-1: Expression von Interleukin-17A in Gingivaproben von gesunden sowie parodontal kranken Probanden je nach Schwere der Parodontitis.

Die Auswertung erfolgte durch den Mann-Whitney-Test. Die Werte zeigten keine Normalverteilung (*) und/oder keine Homogenität der Varianz zwischen den Gruppen (**).

4.4.3 Expression des Markermoleküls IL-17 α in Abhängigkeit vom Geschlecht

Nach Analyse der Ergebnisse mit Hilfe des Mann-Whitney-Tests ist in der Parodontitisgruppe bezüglich des Geschlechts eine signifikant höhere Expression des IL-17 α -Gens bei Frauen nachgewiesen worden ($p=0,003$). Im Gegensatz dazu war bei

Männern kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen festzustellen ($p=0,308$) (Tabelle und Diagramm 4.4.3-1).

	Kontrollgruppe (rel. Expression) (\pm SD)	Parodontitisgruppe (rel. Expression) (\pm SD)	p-Wert (Parodontitis vs. Kontrolle)
Männer			
Interleukin 17A (*)	0,42 (\pm 0,85)	0,46 (\pm 1,41)	0,308
Frauen			
Interleukin 17A (*)	0,16 (\pm 0,21)	0,61 (\pm 1,41)	0,003

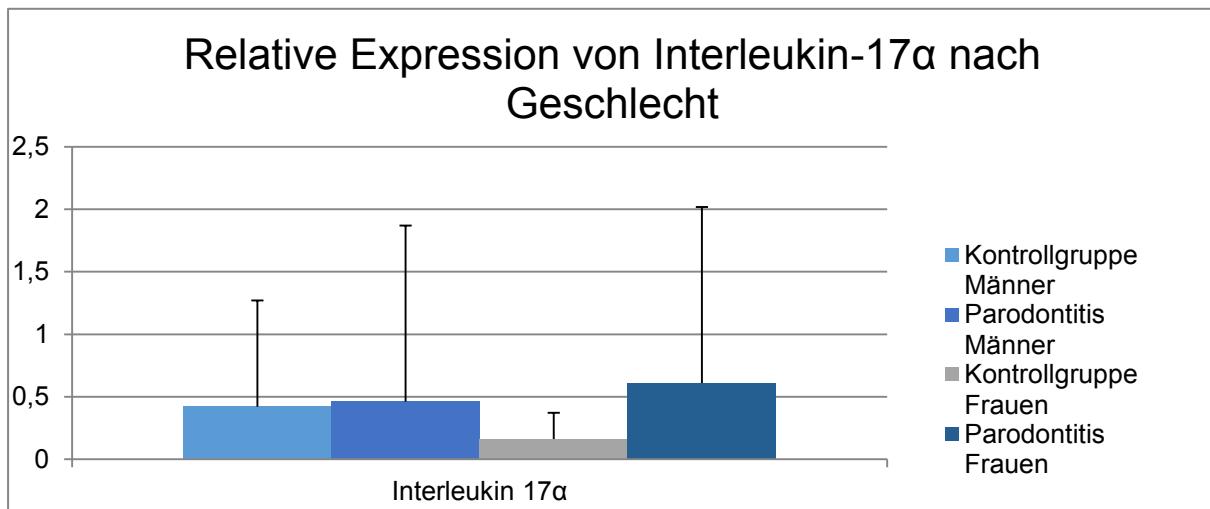


Tabelle und Diagramm 4.4.3-1: Expression von Interleukin-17A in Gingivaproben von gesunden sowie parodontal kranken Probanden je nach Geschlecht.

Die Auswertung erfolgte durch den Mann-Whitney-Test.

4.4.4 Expression des Markermoleküls IL-17 α in Abhängigkeit vom Alter

Bei älteren Individuen (> 50 Jahre) der Parodontitisgruppe war eine signifikant höhere Expression von IL-17 α im Vergleich zur Kontrollgruppe zu beobachten. Bei jüngeren Individuen (< 50 Jahre) mit Parodontitis war keine signifikant unterschiedliche Expression von IL-17 α im Vergleich zur Kontrollgruppe festzustellen ($p = 0,056$).

	Kontrollgruppe (rel. Expression) (\pm SD)	Parodontitisgruppe (rel. Expression) (\pm SD)	p-Wert (Parodontitis vs. Kontrolle)
\leq 50 Jahre alt			
Interleukin 17A(*)	0,23 (\pm 0,24)	0,67 (\pm 1,44)	0,056
$>$ 50 Jahre alt			
Interleukin 17A(*)	0,45 (\pm 1,04)	0,48 (\pm 1,40)	0,0001

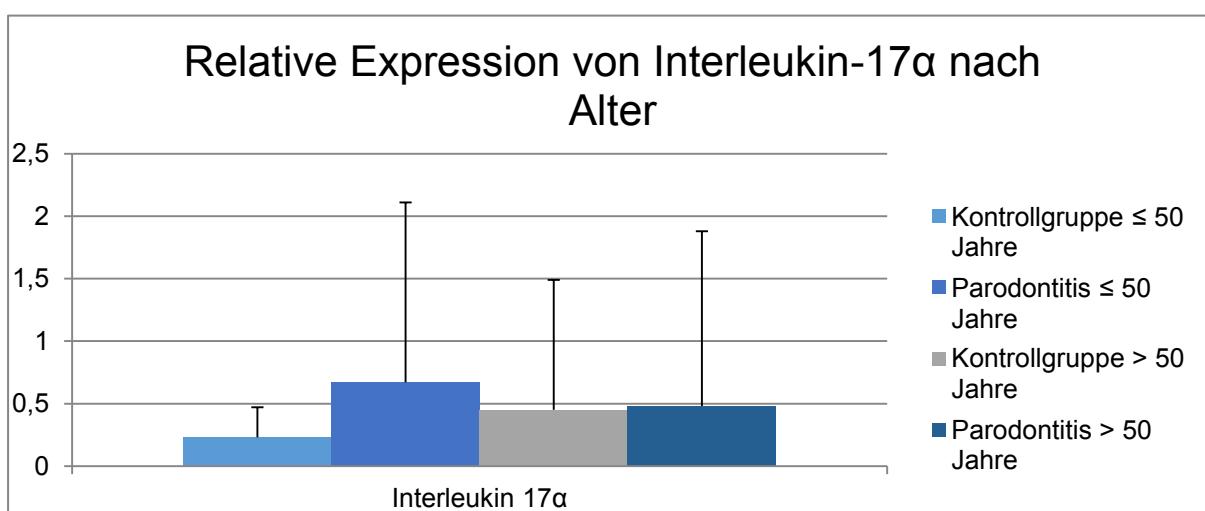


Tabelle und Diagramm 4.4.4-1: Expression des Markermoleküls IL-17 α bei jüngeren (\leq 50 Jahre alt) und älteren Probanden ($>$ 50 Jahre alt).

4.4.5 Multivariate Korrelationsanalyse der Ergebnisse

Für die bivariate Korrelationsanalyse wurden die Zufallsvariablen Parodontale Erkrankung, Stadium der Parodontitis, Alter und Geschlecht mit den Zufallsvariablen Relative Expression des Gens IL-17 α korreliert. Es wurde dafür der Spearmans-Rho-Test verwendet.

Es sind keine signifikanten Ergebnisse nachzuweisen. Allerdings ergibt sich bei der Parodontitis eine Tendenz ($p= 0,006$) zu einer positiven Korrelation ($r_s 0,115$) mit dem Gen IL17 α (Tabelle 4.4.5-1).

		IL-17 α
parodontale Erkrankung (ja/nein)	Korrelationskoeffizient	0,115
	Signifikanz (2-seitig)	0,006
Stadium der parodontalen Erkrankung	Korrelationskoeffizient	0,084
	Signifikanz (2-seitig)	0,045
Alter	Korrelationskoeffizient	-0,102
	Signifikanz (2-seitig)	0,015
Geschlecht	Korrelationskoeffizient	-0,025
	Signifikanz (2-seitig)	0,521

Tabelle 4.4.5-1: Bivariate Korrelationsanalyse des Einflusses von Erkrankung (ja/nein), Stadium der Erkrankung, Alter und Geschlecht auf die Expression von IL-17 α . Die Auswertung erfolgte durch den Spearmans-Rho-Test.

4.5 Expression des Markermoleküls LFA-1

4.5.1 Expression des Markermoleküls LFA-1 in parodontal erkrankten Patienten und Kontrollindividuen

Die relative Expression von LFA-1 bei den Patienten mit Parodontitis (gesamt) und der Kontrollgruppe wurde mittels RT-qPCR untersucht. LFA-1 wiesen in der Parodontitisgruppe eine signifikant höhere Expressionen auf ($p<0,0001$).

	Kontrollgruppe (rel. Expression) (\pm SD)	Parodontitisgruppe (rel. Expression) (\pm SD)	p-Wert (Parodontitis vs. Kontrolle)
LFA1 (*)	0,58 (\pm 0,55)	1,71 (\pm 2,70)	0,0001

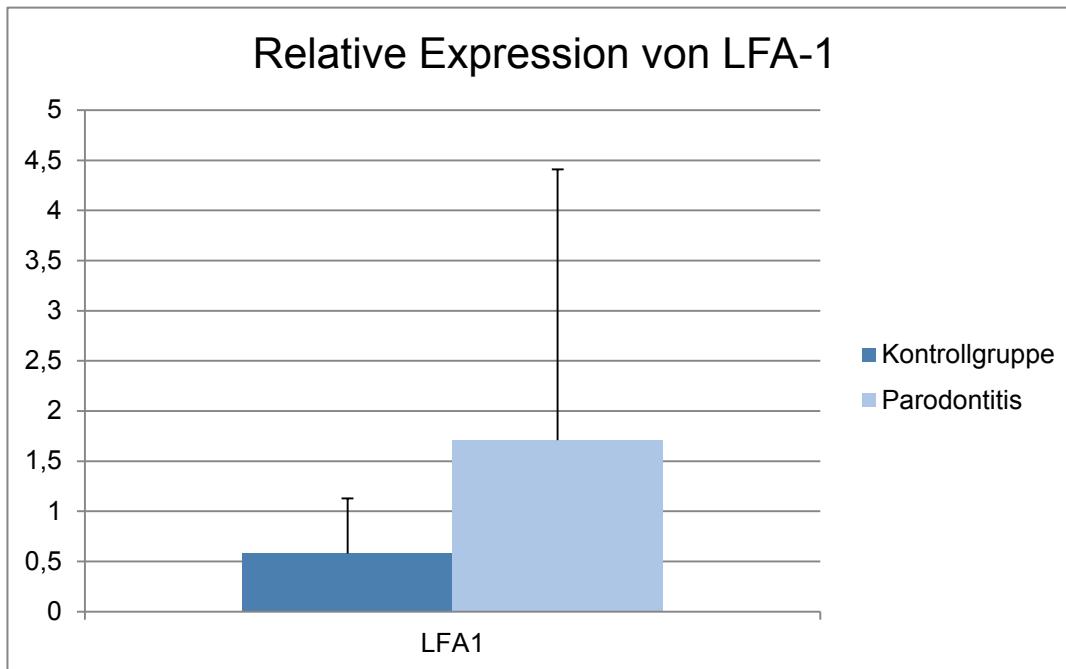


Tabelle und Diagramm 4.5.1-1: Relative Expression von LFA-1 in Gingivaproben, normalisiert durch GAPDH, aus der Kontroll- und Parodontitisgruppe.

Die Auswertung erfolgte durch den Mann-Whitney-Test. Die Werte zeigten keine Normalverteilung zwischen den Gruppen (*).

4.5.2 Expression des Markermoleküls LFA-1 in Abhängigkeit vom Stadium der Parodontitis

Die relative Expression von LFA-1 war bei leichter Parodontitis 1,99 (\pm 3,47) signifikant höher ($p=0,0001$) als in der Kontrollgruppe (0,58 (\pm 0,55)). Darüber hinaus wurde LFA-1 bei schwerer Parodontitis signifikant höher ($p=0,0001$) im Vergleich zur Kontrollgruppe (1,39 (\pm 1,44)) exprimiert.

	Kontrollgruppe (rel. Expression) (\pm SD)	Leichte Parodontiti s (rel. Expression) (\pm SD)	p-Wert (leichte vs. Kontrolle)	Schwere Parodontitis (rel. Expression) (\pm SD)	p-Wert (schwere vs. Kontrolle)
LFA1 (*)	0,58 (\pm 0,55)	1,99 (\pm 3,47)	0,0001	1,39 (\pm 1,44)	0,0001

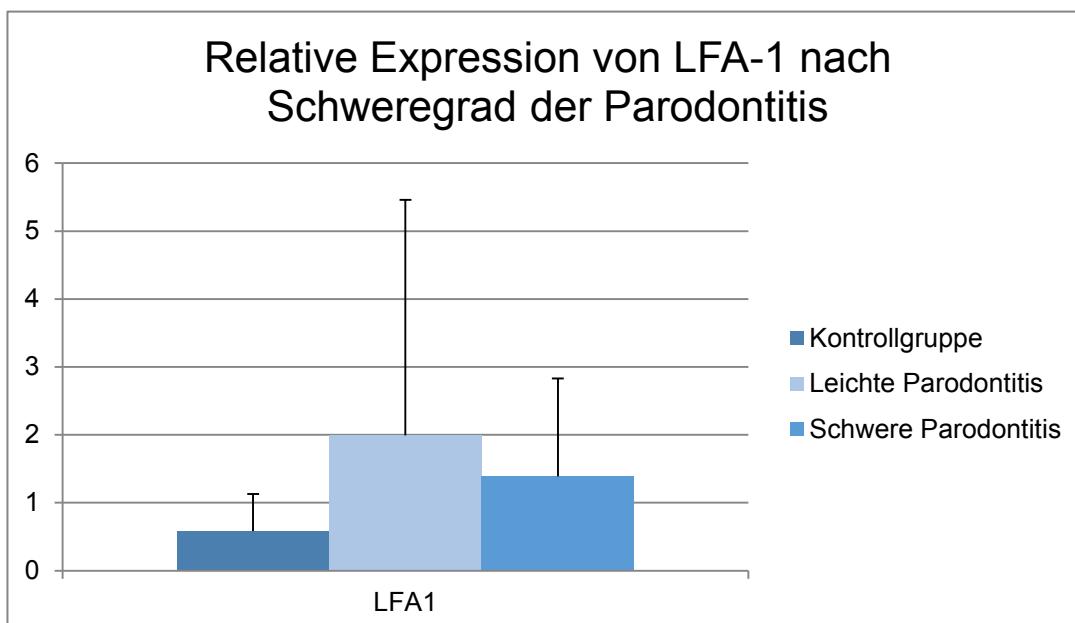


Tabelle und Diagramm 4.5.2-1: Expression von LFA-1 in Gingivaproben von gesunden sowie parodontal kranken Probanden, je nach Schwere der Parodontitis.

Die Auswertung erfolgte durch den Mann-Whitney-Test. Die Werte zeigten keine Normalverteilung (*) und/oder keine Homogenität der Varianz zwischen den Gruppen (**).

4.5.3 Expression des Markermoleküls LFA-1 in Abhängigkeit vom Geschlecht

Nach Analyse der Ergebnisse mit Hilfe des Mann-Whitney-Tests ist in der Parodontitisgruppe bezüglich des Geschlechts eine signifikant höhere Expression des LFA-1-Gens bei Frauen und bei Männer nachgewiesen worden ($p=0,0001$ bzw. $p=0,001$) (Tabelle und Diagramm 4.5.3-1).

	Kontrollgruppe (rel. Expression) (\pm SD)	Parodontitisgruppe (rel. Expression) (\pm SD)	p-Wert (Parodontitis vs. Kontrolle)
Männer			
LFA1(*)	0,66 (\pm 0,50)	1,44 (\pm 2,04)	0,001
Frauen			
LFA1 (*)	0,47 (\pm 0,60)	1,96 (\pm 3,21)	0,0001

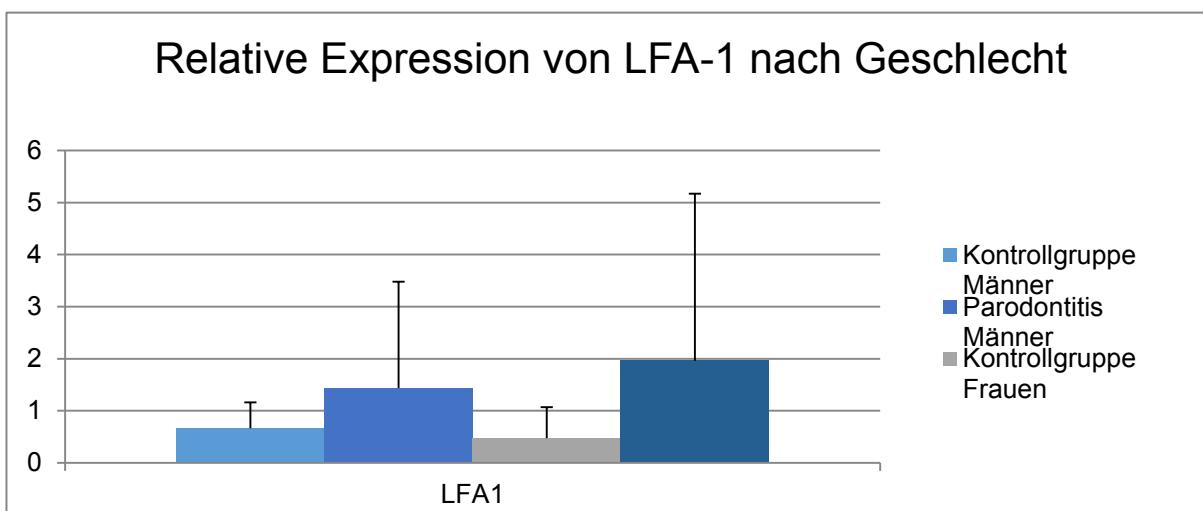


Tabelle und Diagramm 4.5.3-1: Expression von LFA-1 in Gingivaproben von gesunden sowie parodontal kranken Probanden je nach Geschlecht.

Die Auswertung erfolgte durch den Mann-Whitney-Test.

4.5.4 Expression des Markermoleküls LFA-1 in Abhängigkeit vom Alter

Bei älteren Individuen (> 50 Jahre) der Parodontitisgruppe war eine signifikant höhere Expression LFA-1 im Vergleich zur Kontrollgruppe zu beobachten. Bei jüngeren Individuen (< 50 Jahre) mit Parodontitis war ebenfalls eine signifikant höhere Expression von LFA-1 im Vergleich zur Kontrollgruppe festzustellen.

	Kontrollgruppe (rel. Expression) (\pm SD)	Parodontitisgruppe (rel. Expression) (\pm SD)	p-Wert (Parodontitis vs. Kontrolle)
\leq 50 Jahre alt			
LFA1(*)	0,69 (\pm 0,57)	2,19 (\pm 2,63)	0,0001
$>$ 50 Jahre alt			
LFA1(*)	0,42 (\pm 0,47)	1,49 (\pm 2,71)	0,0001

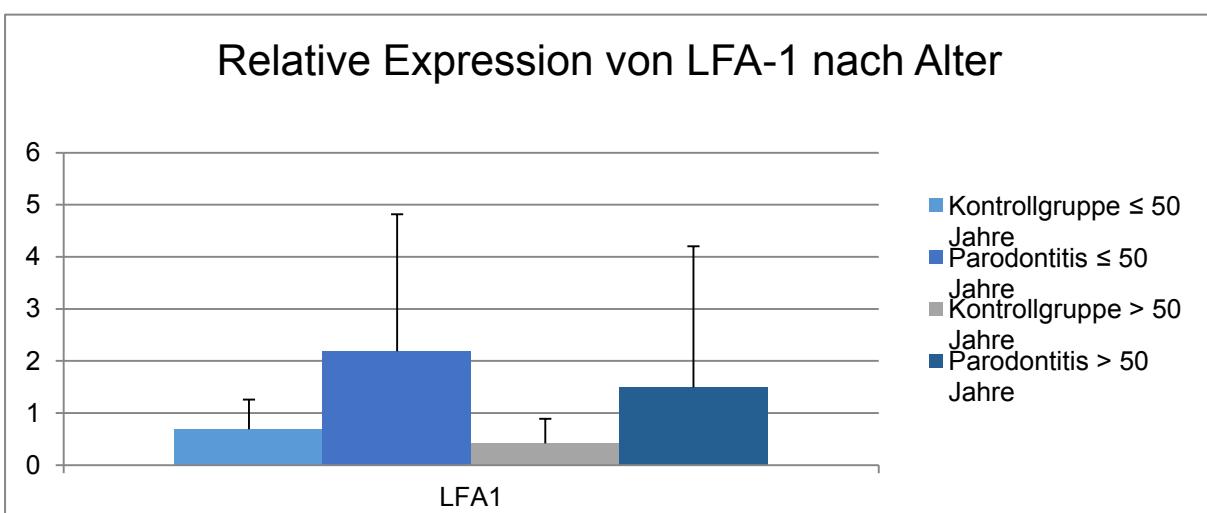


Tabelle und Diagramm 4.5.4-1: Expression des untersuchten Markermoleküls LFA-1 bei jüngeren (\leq 50 Jahre alt) und älteren Probanden (>50 Jahre alt).

4.5.5 Multivariate Korrelationsanalyse der Ergebnisse

Für die bivariate Korrelationsanalyse wurden die Zufallsvariablen Parodontale Erkrankung, Stadium der Parodontitis, Alter und Geschlecht mit den Zufallsvariablen Relative Expression des Gens LFA-1 korreliert. Es wurde dafür der Spearmans-Rho-Test verwendet.

Die Expression von LFA-1 weist eine signifikant positive Korrelation von $r_s = 0,255$ bzw. $r_s = 0,174$ mit der Parodontitis bzw. mit dem Stadium der Parodontitis auf ($p=0,0001$) (Tabelle 4.5.5-1). Bezuglich des Alters sind keine signifikanten Ergebnisse nachzuweisen.

		LFA-1
parodontale Erkrankung (ja/nein)	Korrelationskoeffizient	0,255
	Signifikanz (2-seitig)	0,0001
Stadium der parodontalen Erkrankung	Korrelationskoeffizient	0,174
	Signifikanz (2-seitig)	0,0001
Alter	Korrelationskoeffizient	-0,076
	Signifikanz (2-seitig)	0,072
Geschlecht	Korrelationskoeffizient	0,001
	Signifikanz (2-seitig)	0,984

Tabelle 4.5.5-1: Bivariate Korrelationsanalyse des Einflusses von Erkrankung (ja/nein), Stadium der Erkrankung, Alter und Geschlecht auf die Expression von LFA-1. Die Auswertung erfolgte durch den Spearmans-Rho-Test.

5 Diskussion

5.1 Studiendesign und Methoden

5.1.1 Pathogenese der Parodontitis

Die Parodontitis ist eine multifaktorielle Erkrankung des Zahnhalteapparates, die unweigerlich durch einen entzündlichen Prozess zum Rückgang von Weich- und

Hartgewebe führt. Eine wichtige Rolle spielen u.a. die Mundflora und der Biofilm, systemische Erkrankungen, aber auch die Immunantwort des Wirts. Ein wichtiger Aspekt der Immunantwort ist die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten zur Abwehr von in den Organismus eindringenden pathogenen Mikroorganismen. Eine übermäßige Rekrutierung kann zu einer extremen Anzahl von neutrophilen Granulozyten im Entzündungsgewebe und möglicherweise zu einer ausgedehnten alveolären Knochenresorption führen, die einer Autoimmunerkrankung ähnelt (Zhang et al., 2009; Gaffen & Hajishengallis, 2008).

Andererseits führt die mangelhafte oder fehlende Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten, zum Beispiel beim LAD-1-Syndrom, ebenfalls zu einer ausgeprägten Entzündung mit Knochenverlust, was mit dem klinischen Bild einer Parodontitis verbunden ist (Attström & Schröder, 1979; Sallay et al., 1984; Hemmerle et al., 1991; Yoshinari et al., 1994).

Die Suche nach Regulatoren der Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten ist daher sinnvoll, um zu prüfen, ob deren Expression mit dem Phänotyp einer chronischen Entzündung wie der Parodontitis assoziiert ist. Del-1, PTX3, IL-17 α und LFA-1 sind in die Regulation der Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten involviert.

5.1.2 Auswahl der Studienpopulationen

Für die Auswahl geeigneter Studienteilnehmer wurden in der vorliegenden Studie zur Definition der leichten Parodontitis die Obergrenze von maximal 50% Knochenverlust festgelegt, um Probanden und Proben auszuschließen, die sich im Anfangsstadium der Erkrankung befanden und einen nur mäßigen Knochenverlust aufwiesen. Zudem wurde die Untergrenze von 30% Knochenverlust festgelegt, weil die Diagnose der Parodontitis eindeutig sein sollte und klar von Patienten mit einer Gingivitis bzw. gesunden Patienten abgegrenzt werden sollte.

Nibali et al. (2016) bezogen mehrere Parameter zur Definition der Parodontitis ein: einen approximalen Attachmentverlust von mindestens 3 mm bei mindestens 2 nicht benachbarten Zähnen, eine Sondierungstiefe von mindestens 5 mm und einen radiologischen Knochenverlust von mindestens 20% bei mindestens einem Zahn aus mindestens zwei Quadranten. Ähnliche Einschlusskriterien unter Einbeziehung des radiologischen Attachmentverlustes haben Tonetti und Claffey (2005) verwendet.

In der vorliegenden Studie wurden sowohl radiologische als auch klinische Kriterien zur Diagnose der Parodontitis verwendet, d.h. der radiologische Knochenverlust und die Sondierungstiefe. Darüber hinaus – ähnlich der Klassifizierung von Tonetti und Claffey (2005) – wurden Patienten mit chronischer Parodontitis je nach Schwere der Erkrankung in 2 Kategorien unterteilt, die nach dem Ausmaß des Knochenverlustes definiert wurden. Die Kategorie der „leichten Parodontitis“ wurde in der vorliegenden Studie bei einem mindestens 30-prozentigen radiologischen Knochenverlust zugewiesen, bei Tonetti und Claffey (2005) wurden Patienten mit einem klinischen Attachmentverlust von 3 mm dieser Gruppe zugeordnet. Die Kategorie der „schweren Parodontitis“ wurde mit einem mindestens 50-prozentigem radiologischen Knochenverlust definiert und von Tonetti und Claffey (2005) mit einem klinischen Attachmentverlust von mindestens 5 mm. Es wurden in der vorliegenden Studie rein radiologische Kriterien für die Einstufung der Parodontitis verwendet, da diese besser objektivierbar sind und den tatsächlichen Knochenverlust, den die Parodontitis ausgelöst hat, zeigen.

Es wurden insgesamt 82 Parodontitis-Patienten untersucht, während die Kontrollgruppe aus 13 Probanden bestand. Diese geringe Anzahl an Kontrollpersonen kann zu systematischen Fehlern führen, ergab sich jedoch aus folgenden Gründen: Bei gesunden Individuen liegt keine Indikation für Parodontalchirurgie vor und häufig auch keine Indikation für die Entfernung von Zähnen oder anderen oralchirurgischen Therapieformen, die eine begleitende Entnahme einer gingivalen Gewebeprobe zulassen. Darüber hinaus weisen die meisten extraktionsreifen Zähne – mit Ausnahme der Zähne, die wegen Trauma oder kieferorthopädischer Behandlung extrahiert werden müssen – häufig gleichzeitig auch eine Parodontalerkrankung auf. Auch in anderen Studien war aus diesen Gründen die Kontrollgruppe kleiner als die Testgruppe (Dutzan et al., 2012; Ribeiro et al., 2011; Takeuchi et al., 1995, Lakshmanan et al., 2013). Die Gesamtgröße der Patientenpopulation scheint mit insgesamt 95 Individuen jedoch ausreichend groß zu sein, um eine wissenschaftlich zuverlässige Beantwortung der Fragestellung der vorliegenden Studie zu erlauben.

5.1.3 Validität der erhobenen Ergebnisse: Primer Design, Real-Time-quantitative-PCR

Die Quantifizierung der Genexpression wird für die Validität der Ergebnisse vorausgesetzt. Die angewendeten Methoden müssen auf ihre Zuverlässigkeit geprüft werden und für alle Gruppen vergleichbar sein.

Die Real-Time-quantitative-PCR (RT-qPCR) ist eine sichere und anerkannte Methode (Gold Standard) für die Amplifikation von kleinen mRNA-Mengen und die relative Bestimmung der Stärke der Gen-Expression (Wang et al., 1989; Nolan et al., 2006; Bustin et al., 2005; Derveaux et al., 2010; Pfaffl, 2010). Um Ungenauigkeiten bei der Bestimmung der Genexpression aufgrund der unterschiedlichen Menge an Gesamt-DNA in den Proben auszuschließen, wurde immer die gleiche Gesamtmenge an RNA in den Proben verwendet (Fleige und Pfaffl, 2006; Derveaux et al., 2010). Um darüber hinaus die Zuverlässigkeit bzw. die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zu sichern, wurde jede Probe in Triplikaten mindestens zweimal auf verschiedenen Platten bzw. Experimenten wiederholt (Derveaux et al., 2010). Um ein falsch positives Ergebnis auszuschließen, wurde bei jedem Experiment eine Negativ-Kontrolle, die statt cDNA steriles Wassers enthielt, mitgeführt (Nolan et al., 2006).

Da sehr geringe Mengen und kleine Unterschiede der Genexpression festgestellt werden mussten, wurde die LUX Technologie (Fluoreszenz) verwendet, die eine sehr hohe Sensitivität bei der Untersuchung von kleinen Probenmengen aufweist (Lowe et al., 2003; Kreuzer et al., 2001). In der vorliegenden Studie wurde die Methode einer nicht spezifischen Erkennung des amplifizierten DNA-Produkts durch einen Fluoreszenzmarker (dsDNA), der sich an die Zielsequenz bindet, angewandt. Dieser Marker amplifiziert sich exponentiell, wenn er sich mit der Zielsequenz bindet, und er ermöglicht dadurch eine sichere quantitative Messung der DNA-Amplifikation (Navarro et al., 2015).

Der verwendete Fluoreszenzmarker SYBR Green ist einer der am häufigsten verwendete Marker (Navarro et al., 2015). Er ist ein asymmetrischer Cyanin-Farbstoff-Marker (2-[N-(3-dimethylaminopropyl)-N-propylamino]-4-[2,3- dihydro-3-methyl-(benzo-1,3-thiazol-2-yl)-methylidene]-1-phenyl- quinolinium) mit zwei positiv geladenen Strängen, die während Standard-PCRs zu einer sehr hohen Affinität der amplifizierten Ziel-DNA (negativ geladen) beitragen. SYBR Green ermöglicht dadurch eine besonders

hohe Genauigkeit der Ergebnisse (Morrison et al., 1998; Wittwer et al., 1997; Zipper et al., 2004; Ahmad et al., 2007). Die Daten wurden darüber hinaus zu der Menge des GAPDH (housekeeping Gen) pro cDNA Probe normalisiert. Da nicht jede Probe nach Aufbewahrung und Bearbeitung die gleiche Qualität an DNA aufweist, muss diese Normalisierung stattfinden, um die Vergleichbarkeit der Proben zu gewährleisten (Bengtsson et al., 2005).

Da die genaue Menge der Ziel-DNA nicht definierbar war, musste eine relative Quantifizierung durchgeführt werden (Svec et al., 2015). Das heißt, dass die absoluten Expressionswerte nicht berechnet werden konnten und die Auswertung der Daten bzw. die Expression jedes Moleküls pro Probe nur relativ bzw. im Vergleich zu den anderen Proben erfolgen konnte. Um diese Methode zu verwenden, wurden statt endogener Referenzen die Methode der Standardkurve ausgewählt (Calibration), da diese eine signifikant höhere Reproduzierbarkeit der Ergebnisse aufweist (Larionov et al., 2005; Pfaffl et al., 2004; Bustin, 2000; Boeuf, 2005). Ein weiterer Grund, der für die Messung mit Hilfe einer Standardkurve spricht, ist die Tatsache, dass die Experimente dieser Studie häufig eine unterschiedliche Effizienz aufwiesen. Im Vergleich zu anderen Methoden, die von einer idealen Standardeffizienz von 2 ausgehen, ermöglicht die Calibration eine genauere Berechnung anhand tatsächlicher Effizienzen (Pfaffl, 2001).

5.1.4 Validität der erhobenen Ergebnisse: Statistische Analyse

Der Mann-Whitney-Test, der für die univariaten Analysen in der vorliegenden Studie verwendet wurde (4), ist ein sehr verbreiteter und anerkannter Test, wenn es darum geht, zwei Gruppen zu vergleichen, die keine Normalverteilung der Werte aufweisen (Bergmann et al., 2000; Landers, 1981; Zimmerman, 1985). Da in der vorliegenden Studie immer zwei Gruppen (gesund vs. leichte Parodontitis, gesund vs. schwere Parodontitis, gesund vs. Parodontitis), deren Messwerte keine Normalverteilung aufweisen, verglichen worden sind, ist der nicht-parametrische Mann-Whitney-Test eine geeignete Methode, um die statistische Analyse dieser Studie durchzuführen.

Darüber hinaus hatte die Kontrollgruppe eine geringe Anzahl an Probanden, was eine Inhomogenität der Ergebnisse zur Folge hatte. Auch in solchen Fällen wird der Mann-Whitney-Test bevorzugt (Kasuya, 2001; Nachar, 2008). Des Weiteren weist der Mann-Whitney-Test ungefähr 95% der Stärke eines t-Tests auf (Landers, 1981) und hat ein geringeres Risiko eines falsch-positiven Ergebnisses (Siegel und Castellan, 1988).

Der Spearmans-Rho-Test ist ebenfalls ein nicht-parametrischer Test, der keine Normalverteilung der Daten fordert (Zar, 1998). Es ist belegt, dass dieser Test bei nicht normalverteilten Werten, wie diese in der vorliegenden Studie, besser abschneidet als bei normalverteilten (Cohen, 1988; Zar, 1998). Der Spearmans-Rho-Test wurde in der Arbeit für die bivariate Analyse der Parameter Parodontitis, Schwere der Erkrankung, Geschlecht und Alter mit der relativen Genexpression der Markermoleküle Del-1, PTX3, LFA-1 und IL-17 α verwendet.

5.2 Expression von Molekülen mit regulatorischer Wirkung auf die Leukozytenextravasation

5.2.1 Vergleich der Ergebnisse der Expression von Del-1 mit Daten aus der Literatur

In der vorliegenden Studie wurde in der Parodontitis-Gruppe eine signifikant niedrigere Expression von Del-1 als in der Kontrollgruppe nachgewiesen. Zudem zeigte sich eine niedrigere Expression von Del-1 bei Probanden, die über 50 Jahre alt waren.

Es ist die erste Studie, die bei humanen Probanden eine niedrigere Expression von Del-1 im Gingivagewebe von Parodontitispatienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen nachgewiesen hat. Eskan et al. (2012) haben lediglich erkranktes Gewebe mit gesundem Gewebe derselben Parodontitis-Patienten verglichen, aber keine gesunden Kontrollpatienten wie in der vorliegenden Studie inkludiert.

5.2.1.1 Einfluss der reduzierten Del-1 - Expression auf die Leukozytenextravasation und Entzündungshemmung

Ein aktuell sehr verbreitetes pathogenetisches Modell der Parodontitis führt den parodontalen Gewebeverlust auf eine insuffiziente oder exzessive Immunantwort gegen den dysbiotischen subgingivalen Biofilm (Pihlstrom et al., 2005) zurück. Vor diesem Hintergrund könnte die exzessive Rekrutierung der Leukozyten eine zentrale Rolle beim klinischen Ausbruch der Parodontitis spielen. Eskan et al. (2012) stellten nach Untersuchungen an Mäusen fest, dass Del-1 eine wichtige Komponente für die Homöostase der Leukozyten darstellt und am leukozytenabhängigen inflammatorischen parodontalen Knochenverlust beteiligt ist.

Del-1 inhibiert die Leukozytenextravasation nachweislich am Parodontium (Eskan et al., 2012) und wirkt entzündungshemmend (Kanczkowski et al., 2013).

Ein weiterer Mechanismus, durch den Del-1 die Entzündungsreaktion abschwächen kann, ist seine Fähigkeit, den Abtransport von platelet-derived Mikropartikeln am Endothelium zu fördern (Dasgupta et al., 2012). Platelet-derived Mikropartikel begünstigen die Zytokin-Produktion am Endothelium durch eine IL-1- abhängige Kaskade (Boillard et al., 2010). In einer weiteren Studie wiesen Mäuse mit Del-1-Defizienz (Edil3 knock-out Mäuse) einen stärkeren parodontalen Knochenverlust, eine höhere Inzidenz der Multiplen Sklerose (MS) sowie eine stärkere Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten in die Gingiva auf (Choi et al., 2014).

Auch eine weitere Arbeit von Choi et al. (2015) bringt die erniedrigte Del-1 Expression mit pathologischen Prozessen in Verbindung. Die Del-1-Expression war hier signifikant niedriger bei Mäusen mit experimenteller Enzephalitis sowie bei Patienten mit chronischen und aktiven Hirnläsionen im Rahmen einer multiplen Sklerose (MS), wobei keine mangelhafte Expression von Del-1 bei inaktiven MS Läsionen festzustellen war (Choi et al., 2015). Darüber hinaus postulierten einige Studien eine niedrigere Del-1 Expression bei Patienten mit akuter Lungenentzündung (Choi et al., 2008), bei Patienten mit Lungenfibrose (Kang et al., 2014) sowie bei Mäusen mit Speicheldrüsenentzündung (Baban et al., 2013) und entzündungsbedingter Speicheldrüseninsuffizienz (Kanzkowski et al., 2013). Del-1 ist darüber hinaus als Mutationsgen mit der Entstehung für Multiple Sklerose (Goris et al., 2003) und der Alzheimer-Neuroerkrankung (Ramanan et al., 2013) verbunden.

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie bestätigen die Ergebnisse der o.g. Studien. Es wurde eine um etwa 75% niedrigere Expression von Del-1 im parodontal erkrankten Gewebe gegenüber gesundem parodontalem Gewebe belegt.

Die Gabe von Del-1 könnte regulierend und entzündungshemmend wirken. Eskan et al. (2012) konnten in mehreren Experimenten zeigen, dass die Mikroinjektion von löslichem Del-1 (Del-1-Fc) die Entzündung unterdrücken kann. Die Autoren zeigten außerdem, dass die systemische oder lokale Infusion eines Fusionsproteins von Del-1 und von Del-1-Fc bei alten Mäusen im Hinblick auf die Hemmung des parodontalen Knochenverlusts viel effektiver als bei der Infusion anderer Inhibitoren war. Del-1 wirkt auch durch die Hemmung der Expression von inflammatorischen Markern wie TNF- α

(Tumornekrosefaktor), IL-1 β (Interleukin-1 β), IL-6 und IL-17 α sowie RANKL entzündungshemmend (Choi et al. 2015). Die vorliegende Studie konnte eine erhöhte Expression von Del-1 bei parodontal gesunden Patienten nachweisen. Möglicherweise wirkt Del-1 im Gingivagewebe entzündungshemmend und beugt somit dem klinischen Ausbruch der Parodontitis vor.

5.2.1.2 Del-1 als Antagonist der LFA-1 Expression und der mögliche Einfluss auf die Parodontitis

Del-1 konkurriert, wie bereits erwähnt, mit LFA-1 um die Bindung an ICAM-1 des Endotheliums und verhindert dadurch die Extravasation der PMNs und unterbindet deren Akkumulation im entzündeten Gewebe (Abbildung 5.2.1.1) (Choi et al., 2008, Hajishengallis und Sahingur, 2014). LFA-1 und Del-1 doppelt defiziente Mäuse zeigen bei einer durch LPS ausgelösten Pneumonie eine sehr niedrige Leukozyten-Rekrutierung, was darauf hinweist, dass der Phänotyp des Del-1-Mangels von der Anwesenheit von LFA-1 abhängt (Choi et al., 2008). Diese Funktion von Del-1 als kompetitiver Antagonist der LFA-1-Bindung wurde auch an Schleimhautzellen und an Zellen des zentralen Nervensystems nachgewiesen (Choi et al., 2015; Eskan et al., 2012; Mitroulis et al., 2014).

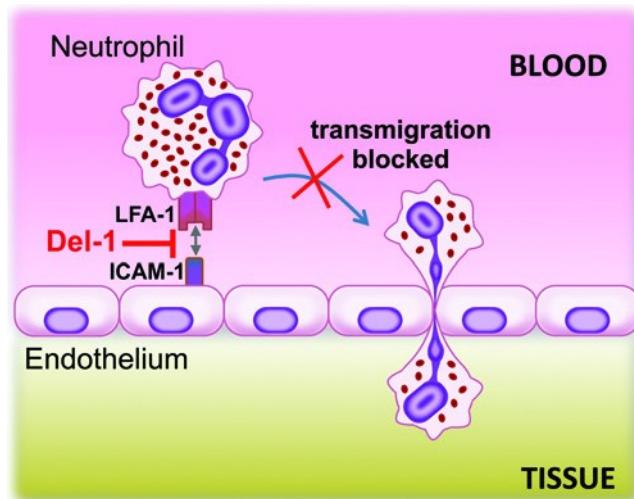


Abbildung 5.2.1.1: Del-1 wirkt als lokaler Kompetitor der Leukozytenrekrutierung. Del-1 blockiert die LFA-1/ICAM-1-Interaktion, die der Transmigration der Leukozyten durch die Endothelmembran dient (Choi et al., 2008; Eskan et al., 2012). (Bild: E. Hajishengallis and G. Hajishengallis, neutrophil homeostasis and periodontal health in children and Adults, J Dent Res. 2014; 93(3):231-237)

In einer aktuellen Studie wurde bei Patienten mit einer Parodontitis eine verstärkte Expression von LFA-1 zusammen mit einer verringerten Expression von Del-1

festgestellt und eine exzessive Extravasation von neutrophilen Granulozyten in entzündlich verändertes Gewebe sowie daraus resultierend eine verstärkte Gewebezerstörung beobachtet (Moutsopoulos et al., 2014).

Die vorliegende Studie hat zu vergleichbaren Ergebnissen geführt. Der Phänotyp der Parodontitis und die damit zusammenhängende Entzündung des parodontalen Gewebes war mit einer signifikant höheren Expression von LFA-1 bei gleichzeitig 75% erniedrigter Expression von Del-1 verbunden.

5.2.1.3 Einfluss der Del-1 Expression auf die Osteoklastogenese und auf die Expression des IL-17 α

Shin et al. (2015) berichten über die funktionelle Rolle von Del-1 bei der Osteoklastogenese. Es wurde eine niedrigere Expression des Del-1 durch RANKL-stimulierte Osteoklasten festgestellt. Darüber hinaus weisen Gewebe nach der Infusion von Del-1-Fc signifikant weniger Osteoklasten sowie eine geringere Knochenresorption auf, was darauf hinweist, dass Del-1 in vivo direkt auf die Osteoklasten einwirkt (Shin et al., 2015). Del-1 scheint besser als andere Antagonisten von LFA-1, wie beispielsweise LFA878 (ein experimenteller Antagonist von LFA-1), gegen den Knochenverlust zu wirken (Shin et al., 2015). Nach 5-tägiger experimenteller Parodontitis an Del-1-knockout Mäusen scheint Del-1-Fc (Del-1 als lösliches Protein exprimiert) auch am 3. Tag der Entzündung und 2 Tage nach dem Peak der Neutrophilenzahl effektiv gegen einen Knochenverlust zu wirken, im Gegensatz zu LFA878-Fc, das nur nach einer Verabreichung am 1. Tag der Entzündung einem Knochenverlust entgegenwirkt (Shin et al., 2015). Khader (2012) hat die Theorie entwickelt, wonach die Dysregulation der Expression von Del-1 zusammen mit einer Hochregulierung der IL-17 α Expression zur ausgeprägten Osteoklastogenese und somit zur Parodontitis führen. Nach dieser Theorie wird IL-17 α bei einem Del-1-Defizit zunächst von $\gamma\delta$ -T-Zellen, wichtigen Zellen der IL-17 α Expression, sowie nach Präsentation von Antigenen der oralen Mikroflora von antigenspezifischen TH17-Zellen produziert. Anschließend wirkt IL-17 α auf Stromazellen und es lockt neutrophile Granulozyten an die Infektionsstelle. Gleichzeitig bindet sich IL-17 α auch an die Endothelzellen über deren Rezeptor IL-17R und hemmt die Del-1-Expression, was die Extravasation von neutrophilen Granulozyten in das entzündete Zahnfleisch, die weitere IL-17-Produktion durch neutrophile Granulozyten sowie die Osteoklastogenese fördert (Abbildung 5.2.1.2). Zusammenfassend beeinflusst

die Del-1-Expression das klinische Bild der Parodontitis möglicherweise auch durch die Hemmung der IL-17 α -abhängigen Osteoklastogenese.

Im Gegensatz zur Del-1 /LFA-1 Theorie von Choi et al. (2008) wurde gezeigt, dass Del-1 die NFATc1-Expression durch Interaktion mit Mac-1 (CD11b/CD18), einem Leukozytenintegrin der gleichen Familie wie LFA-1, inhibiert und nicht durch LFA-1 (CD11a/CD18) (Shin et al., 2015). NFATc1 ist ein Transkriptionsfaktor, der durch die Bindung an die Promotorregion die Expression von Zytokinen, wie IL-17 α , aktiviert. Die NFATc1 Expression korreliert stark mit dem Phänotyp der Parodontitis und insbesondere mit dem klinischen Attachmentverlust (Belibasakis et al., 2011). Del-1 könnte durch die Hemmung der NFATc1 Expression die Manifestation der Parodontitis und die damit verbundene Knochenresorption und den Attachmentverlust verhindern.

Del-1 scheint außerdem auch an der durch Chemokine induzierten Entzündungsreaktion beteiligt zu sein. Humane, durch ICAM-1 aktivierte neutrophile Granulozyten, exprimieren CCL3 und CXCL2 (Eskan et al., 2012). Die Chemokine CXCL2 und CCL3 sind beide potentielle Mediatoren einer entzündlichen Knochenresorption, die mit einer bakteriellen Infektion assoziiert sind (Dapunt et al. 2014). So konnte in einem In-vitro-Experiment an einer humanen PMN-Zelllinie beobachtet werden, dass Del-1 die durch ICAM-1 induzierte Expression von CXCL2 und CCL3 inhibiert (Serhan et al., 2008). Die reduzierte Expression von Del-1 am entzündlich veränderten Parodontium kann durch die Chemokine CXCL2 und CCL3 zu einer verstärkten Aktivierung der Osteoklasten führen und dadurch eine intensivere Osteolyse - ähnlich wie bei der Parodontitis - auslösen.

Diese Beobachtungen wurden durch die vorliegende Studie bestätigt, da der Phänotyp der Parodontitis und der damit verbundene Knochenverlust mit einer verminderten Del-1 Expression zusammenhängen.

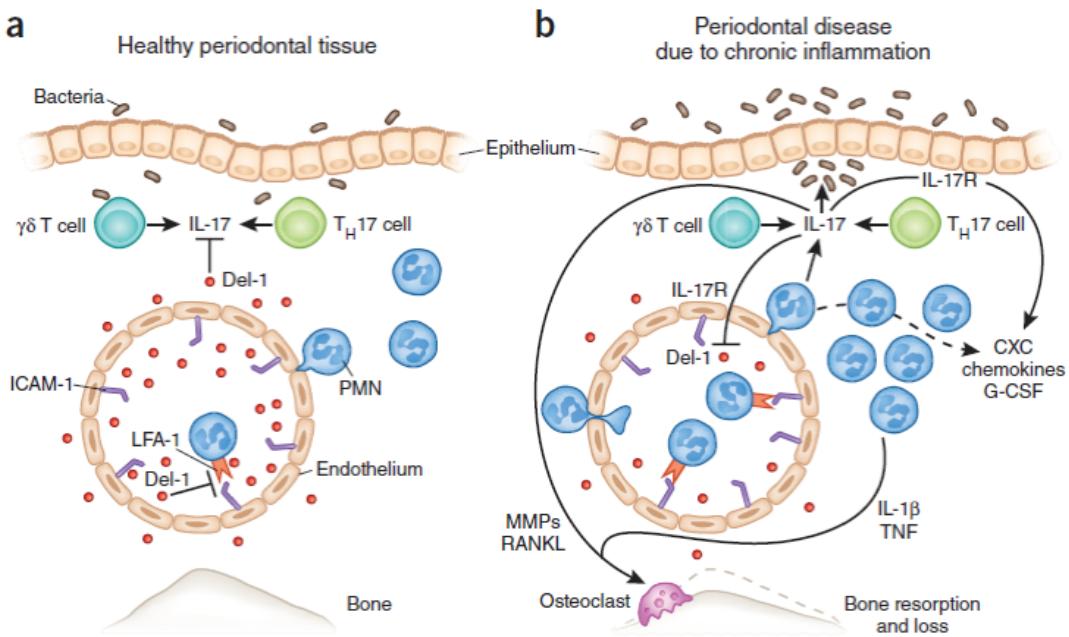


Abbildung 5.2.1.2: Del-1 hemmt die IL-17 α -Produktion, die Entzündung und den Knochenverlust bei Parodontitis. Die stärkere Expression von Del-1 im parodontalen Gewebe junger Mäuse hemmt die IL-17 α -Produktion sowie die Neutrophilenrekrutierung in das Gewebe (a). Bei alten Mäusen ist die Del-1 Expression während der Infektion herabreguliert, während die IL-17 α -Produktion heraufreguliert ist (b). IL-17 α induziert G-CSF und CXC-Chemokine und lockt neutrophile Granulozyten in das entzündete Gewebe. Gleichzeitig hemmt IL-17 α die Del-1-Expression und fördert die Extravasation von neutrophilen Granulozyten in das entzündete Gingivagewebe. Darüber hinaus wirkt IL-17 α synergistisch mit anderen Zytokinen, um die Produktion von Matrix-Metalloproteininasen (MMPs) und RANKL zu induzieren. Dies fördert die Osteoklastogenese (Quelle: Khader SA.: Restraining IL-17: Del-1 deals the blow. Nat Immunol. 2012 Apr 18; 13(5):433-5).

Weitere Studien konnten eine niedrige Del-1-Expression und gleichzeitig eine höhere IL-17-Expression für die Parodontitis und die Enzephalitis zeigen (Eskan et al. 2012; Choi et al., 2015). Del-1-defiziente Mäuse weisen eine höhere Inzidenz der multiplen Sklerose in Verbindung mit einer IL-17 α -abhängigen Entzündung auf („IL-17 Signatur“) (Choi et al., 2014).

Darüber hinaus konnten Baban et al. 2013 bei "non-obese diabetic" (NOD)-Mäusen, die eine Reduktion von Del-1 und eine höhere Ausschüttung von IL-17 α aufwiesen, eine signifikante Steigerung der Apoptose und Nekrose der Speicheldrüsenzellen beobachten.

IL-17 α $-/-$, Del-1 $-/-$ Mäuse weisen im Vergleich zu Del-1 $-/-$ Mäusen eine geringere Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten auf und zeigen eine erhöhte Resistenz

gegen die Manifestation der Parodontitis (Eskan et al. 2012). Vergleichbare Ergebnisse fanden sich bei IL-17 α - und Del-1-defizienten Mäusen im zentralen Nervensystem (Choi et al., 2014). Diese Beobachtungen weisen darauf hin, dass die Parodontitis aufgrund einer Del-1-Defizienz auch von der Expression von IL-17 α abhängt. Darüber hinaus weisen IL17 α -/-Mäuse eine höhere Expression von Del-1-mRNA auf, was zeigt, dass IL-17 α die Del-1-Expression hemmt (Choi et al., 2008). Die mangelhafte Expression von Del-1 kann vor dem Hintergrund der zitierten Studien ohne die Hilfe von IL-17 α nicht zur pathologischen Leukozytenakkumulation bei Parodontitis oder bei Enzephalitis führen.

5.2.1.4 Der Einfluss einer erhöhten Del-1 - Expression auf die Angiogenese und der mögliche Zusammenhang mit der Parodontitis

Del-1 weist unter anderem durch die Bindung seines RGD Motivs an die Integrine $\alpha\beta 3$ angiogenetische Eigenschaften auf (Zhong et al. 2003). Die Aktivierung von $\alpha\beta 3$ Rezeptoren ist für die vaskuläre Entwicklung erforderlich und mit einer Reduzierung der Apoptose von Endothelzellen verbunden (Varner et al., 1995; Stromblad et al., 1996; Pollman et al., 1999; Eliceiri et al., 1998; Schaffner-Reckinger et al., 1998). Penta et al. (1999) haben vermutet, dass Del-1 durch seine Bindung an Integrine $\alpha\beta 3$ die Angiogenese des embryonalen Endothels stimuliert, darüber hinaus wurde die Bedeutung der CAM Kaskade für die Gefäßentwicklung herausgestellt. Die Del1/Integrin $\alpha\beta 3$ -Bindung könnte somit die Angiogenese begünstigen und damit die parodontale Regeneration fördern.

Del-1 stimuliert schließlich auch die angiogenetische Funktion der Gewebe durch eine $\alpha\beta 5$ -Integrin-Signal-Kaskade (Gorski und Walsh, 2000). Es bindet an Integrin $\alpha\beta 5$ des Endotheliums und aktiviert dadurch den Transkriptionsfaktor HoxD3. HoxD3 induziert anschließend die Expression anderer proangiogenetischer Faktoren wie Integrin $\alpha\beta 35$ und Proteinase uPA/uPAR. Integrin $\alpha\beta 35$ fördert die Angiogenese durch Regulierung der Zelladhäsion und Migration (Carmeliet, 2002; Travis et al., 2003). Die Expression des Integrins $\alpha\beta 5$ verstärkt sich rasch in Anwesenheit von proangiogenetischen Zytokinen wie Del-1 (Penta et al., 1999; Sepp et al., 1994). Als Folge kann Del-1 durch eine Integrin $\alpha\beta 5$ -abhängige Kaskade indirekt die Angiogenese fördern. Fan et al. (2008) beobachteten eine Proliferation der Zellen des Endothels sowie eine Förderung der Angiogenese zerebraler Gewebe bei Überexpression des Del-1 Gens in einem murinen Modell.

Es gibt darüber hinaus zahlreiche weitere Studien, die eine angiogenetische Funktion von Del-1 klinisch nachweisen konnten(Ho et al. 2004; Penta et al.1999; Zhong et al. 2003; Rezaee et al. 2002; Hidai et al. 2007; Aoka et al. 2002; Fan et al. 2008). Diese Funktion von Del-1 könnte für den Verlauf der Parodontitis von Bedeutung sein, denn durch eine ungestörte angiogenetische Funktion könnte das Knochenremodelling des Gewebes gefördert und der Knochenverlust gehemmt werden.

Ciucurel et al. haben 2013 bei Mäusen, die aufgrund eines lentiviralen Konstrukts verstärkt Del-1 exprimieren, subkutane Implantate gesetzt, und fanden 7 Tage nach der Implantation eine höhere Produktion von Extrazellulärmatrix sowie eine größere Anzahl an Blutgefäßen. Weitere Studien deuten eine mögliche therapeutische Nutzung von Del-1 an(Ho et al., 2004; Zhong et al., 2003; Kown et al., 2003). Eine erhöhte Expression von Del-1 könnte mit dem schnellen *remodelling* des parodontalen Gewebes und somit mit der Verhinderung des klinischen Ausbruchs der Parodontitis zusammenhängen.

Hsu et al. (2008) haben bei Del-1-transgenen Mäusen, die das Markermolekül konstitutiv in basalen Keratinozyten exprimieren, eine signifikant höhere Regeneration der Haarfollikel bei Wundgeweben der Haut beobachtet und im Anschluss bewiesen, dass diese Regeneration durch die erhöhte Expression von Del-1 der Haut bedingt ist. Die Haarwurzeln weisen eine dem Parodontium ähnliche anatomische Architektur auf. Dies könnte bedeuten, dass die Verabreichung oder die verstärkte Expression von Del-1 die Regeneration des parodontalen Gewebes erleichtern könnte. Das Parodontalgewebe wird bei Präsenz von Biofilm an der Zahnoberfläche durch das Immunsystem, insbesondere durch die PMNs und parodontale Bakterien, angegriffen und zerstört. Eine möglichst rasche erneute Angiogenese und die Regeneration des Gewebes könnten diese Zerstörung kompensieren und die Heilung des erkrankten Gewebes fördern. Eine erhöhte Expression von Del-1 könnte auf diese Weise die klinische Manifestation der marginalen Parodontitis abschwächen.

5.2.1.5 Einfluss der Del-1- Expression auf der Atherosklerose und der mögliche Zusammenhang mit der Parodontitis

Die Atherosklerose ist mit der Parodontitis in den vergangenen Jahren häufig in Verbindung gebracht worden und es gibt beinahe 4000 Arbeiten, die über dieses Thema berichten (Teeuw et al., 2014). Die Parodontitis könnte demnach an der Pathogenese der Atherosklerose beteiligt sein (Chiu, 1999; Kinane und Lowe, 2000). Pinho et al.

(2013) beobachteten, dass die Parodontitis signifikant häufiger bei Patienten mit Atherosklerose auftritt. Mit der entgegengesetzten Fragestellung haben Bahekar et al. 2007 eine höhere Prävalenz der Atherosklerose bei Patienten mit einer Parodontitis festgestellt.

Die Atherosklerose ist ähnlich wie die Parodontitis eine entzündliche Erkrankung. Chronisch entzündliche Prozesse spielen eine wichtige Rolle bei der Entstehung der Atherosklerose (Nauom et al., 2006). Dabei sind Adhäsionsmoleküle beteiligt wie z.B. p-Selektine und Interzelluläre Adhäsionsmoleküle (ICAMs, Integrinliganden) und Entzündungsmediatoren wie IL-8 und MCP-1 (Khligatian et al., 2002). Del-1 bindet sich an ICAM-1 Rezeptoren und verhindert dadurch die Leukozytenextravasation im Rahmen einer Parodontitis (Choi et al., 2008), dies deutet auf seine entzündungshemmende Wirkung hin. Del-1 könnte auch bei der Atherosklerose durch eine Kaskade, die ICAM-1 beinhaltet, entzündungshemmend wirken (Khligatian et al., 2002). Eine mangelhafte Del-1 Expression könnte daher zugleich mit dem klinischen Bild der Parodontitis, wie in der vorliegenden Studie gezeigt, und dem der Atherosklerose zusammenhängen.

Darüber hinaus berichten Kakino et al. (2016), dass Del-1 die Atherosklerose durch eine Kaskade, die modifiziertes LDL (low density lipoprotein) beinhaltet, hemmt. Del-1 bindet an modifiziertes LDL und verhindert dessen Bindung an Rezeptoren des Endotheliums. Diese Del-1 Bindung an das Endothel könnte für die Entstehung eines Atheroms im Gefäß ursächlich sein (Steinberg, 1993; Epstein et al, 1999; Libby et al., 2000; Rufail et al., 2007). Del-1-transgene Mäuse hatten eine signifikant niedrigere Bindung der LDLs an LOX-1 Rezeptoren des Endotheliums (Kakino et al. 2016). Finn et al. (2013) beobachteten darüber hinaus einen höheren Anteil an freiem Del-1 bei Patienten mit koronarer Herzkrankheit (KHK) im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die schützende Rolle von Del-1 vor dem klinischen Ausbruch der Atherosklerose könnte auch auf die Parodontitis übertragen werden.

5.2.1.6 Alters- und geschlechtsabhängige Del-1-Expression

In der vorliegenden Arbeit wurde eine niedrigere Expression von Del-1 bei älteren Patienten (>50 Jahre alt) festgestellt. Der pathogenetische Mechanismus, durch den eine Del-1-Expression altersabhängig herabreguliert wird, ist bislang unbekannt. Makaewa et al. (2015) berichten über eine Hemmung der Expression von Del-1 durch eine von D-Solvin und IL-17 α abhängige Kaskade. D-Solvine hemmen die Produktion

von GSK-3β, das seinerseits die Bindung des Promoters C/EBPβ von Del-1 hemmt. Daraus folgt, dass D-Solvine die Del-1-Expression induzieren. Ältere Mäuse weisen signifikant niedrigere Konzentrationen von Proresolving Lipid Mediatoren, die D-Solvine enthalten, auf (Arnardottir et al., 2014). Die verringerte D-Solvin-Aktivität bei älteren Individuen kann zu einer verringerten Expression von Del-1 führen (Makaewa et al., 2015). Diese Beobachtung könnte eine mögliche Erklärung zur Altersabhängigkeit der Del-1 Expression darstellen.

Eke et al. (2012 und 2015) berichten über eine signifikant höhere Parodontitisrate bei Männern im Vergleich zu Frauen (56,4% zu 38,4%). Ebersole et al. (2008) beobachteten bei Menschenaffen ebenfalls eine unterschiedliche immunologische Reaktion von Männern und Frauen. In diesem Zusammenhang waren einige Entzündungsmediatoren bei Männern stärker exprimiert. In der vorliegenden Studie wurde in der Kontrollgruppe bei Männern eine höhere Expression des Gens Del-1 im Vergleich zur Testgruppe festgestellt – bei Frauen konnte dies nicht nachgewiesen werden. Pathologische Veränderungen der Immunantwort und insbesondere von Signalwegen, die mit der Leukozytenextravasation zusammenhängen, können den Ausbruch der Parodontitis beim männlichen Geschlecht begünstigen. Nach den vorliegenden Ergebnissen scheint bei Frauen die Stärke der Expression von Del-1 in Bezug auf die Parodontitis möglicherweise durch andere Faktoren überlagert zu werden.

5.2.1.7 Vergleich der Ergebnisse der Expression von PTX3 mit Daten aus der Literatur

In der vorliegenden Studie wurde eine signifikant niedrigere Expression von PTX3 im Gingivagewebe parodontal erkrankter Patienten im Vergleich zu gesunden Probanden beobachtet. Humanes PTX3 wurde, wie bereits erwähnt, neben Del-1 von Chavakis et al. (2012) sowie von Deban et al. (2010) als ein Inhibitor der Leukozytenextravasation und möglicher Schutzfaktor gegen die Parodontitis identifiziert (Abbildung 5.2.1.3). Deban et al. konnten beobachten, dass PTX3 durch P-Selektin / PSGL-1-Interaktion in vitro das neutrophilen Granulozyten-Rolling sowie in vivo die Rekrutierung der neutrophilen Granulozyten in akuten Inflammationsmodellen blockiert. PTX3-defiziente Mäuse haben eine höhere Rate an Akkumulation von neutrophilen Granulozyten bei Pleuritis sowie akut induziertem Lungentrauma (Deban et al. 2010). Des Weiteren wirkte in der Studie von Deban et al. (2010) die lokale Freisetzung von PTX3 und Del-1 als

negatives Feedback, das die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten verhindert. Daraus kann gefolgt werden, dass die relative Expression dieser negativen Regulatoren der Neutrophilenextravasation einen zentralen Einfluss auf die Schwere der parodontalen Entzündung und den Gewebeverlust haben (Hajischengallis und Korostoff, 2017). Die in der vorliegenden Arbeit beobachtete niedrigere PTX3-Expression in parodontal erkrankten Geweben kann zu einer überschießenden Einwanderung von neutrophilen Granulozyten in das parodontale Gewebe führen.

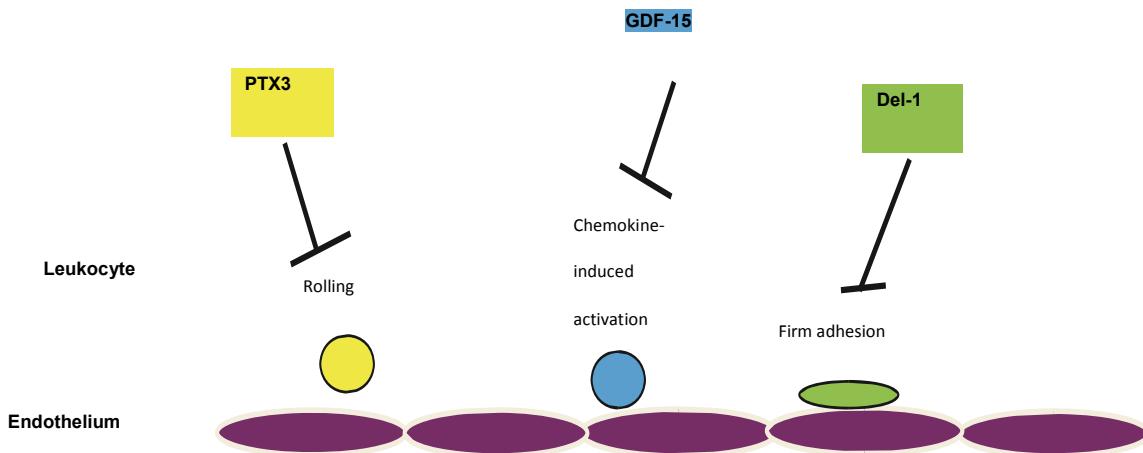


Abbildung 5.2.1.3: Die endogenen Inhibitoren der Leukozytenadhäsion: PTX3 hemmt das Rolling der Leukozyten, und Del-1 wirkt der LFA-1-abhängigen festen Adhäsion entgegen (Chavakis T.: Leucocyte recruitment in inflammation and novel endogenous negative regulators thereof. Eur J Clin Invest. 2012 Jun; 42(6):686-91).

5.2.1.8 Einfluss der PTX3 – Expression auf die COPD (Chronisch obstruktive Lungenerkrankung) und der mögliche Zusammenhang mit der Parodontitis

Nach den Beobachtungen einer Studie von van Pottelberge et al. (2012) war die PTX3-Expression in Lungengeweben von Patienten mit einer entzündlichen COPD ebenfalls deutlich reduziert.

Eine Metaanalyse von Zeng et al. (2012) an 3988 COPD-Patienten und 22.871 Kontrollen hat eine statistisch signifikante positive klinische Assoziation ($p<0,001$) zwischen der Parodontitis und der COPD-Erkrankung festgestellt. Sowohl die Parodontitis als auch die COPD sind Erkrankungen mit chronischem Verlauf, in deren Zentrum eine durch neutrophile Granulozyten verstärkte Entzündung und der proteolytische Abbau des Bindegewebes steht (Fokkema et al., 1998; Shen et al., 2015;

Stockley et al., 2013). Darüber hinaus wird bei der COPD, analog der Parodontitis, eine Störung der Immunhomöostase beobachtet. Die pathogenen Bakterien, die normalerweise von der Immunabwehr zerstört werden, proliferieren bei der COPD-Erkrankung und das Immunsystem scheint unfähig, diese Entzündung abschließend zu beheben. Dadurch entsteht - ähnlich wie bei der Parodontitis - eine mikrobiologische Dysbiose (Gleeson et al., 1997; Azarpazhooh und Leake, 2006; Prasanna und Causal, 2011). Schließlich sind pro-inflammatorische Zytokine, die mit der Parodontitis in Verbindung gebracht wurden, auch bei COPD-Patienten zu stark exprimiert (Preshaw und Taylor, 2011; Schols und Buurman, 1996; Eid et al., 2001; Karadag et al., 2008). Im Lungengewebe von COPD-Patienten wurde eine exzessive Akkumulation von neutrophilen Granulozyten beobachtet (Louhelainen et al., 2009; Gamble et al., 2007). Die Stärke der leukozytären Infiltration ist mit dem Stadium der COPD korreliert (He et al., 2010; Stanescu et al., 1996; Di Stefano et al., 1998; Vernooy et al., 2002; Higashimoto et al., 2009). Daraus kann der Schluss gezogen werden, dass eine exzessive Aktivierung neutrophiler Granulozyten und deren Extravasation zum klinischen Ausbruch der COPD führen, dies wäre eine Erklärung, warum die COPD und die Parodontitis epidemiologisch in einigen Studien eine deutliche Assoziation zeigen (Shen et al., 2015; Stockley et al., 2013).

5.2.1.9 PTX3 Expression in Zusammenhang mit der Geweberegeneration

PTX3 scheint ebenso wie Del-1 eine Rolle bei der Geweberegeneration (*tissue remodelling*) zu spielen. In experimentell traumatisiertem Gewebe zeigte sich eine signifikant schnellere Koagulation, eine Neubildung von Fibrin und eine Kollagen-Reposition im Zusammenhang mit einer deutlich höheren Expression von PTX3 (Doni et al., 2015). Weitere Studien bestätigen die Beteiligung des PTX3 an der Geweberegeneration, der Angiogenese und der Regeneration der extrazellulären Matrix (*tissue remodelling*) (Leali et al., 2012; Maina et al., 2009). Darüber hinaus begünstigt PTX3 die Fibrozyten-Differenzierung durch FcγRI in fibrotischen Läsionen (Pilling et al., 2015). PTX3 verhindert die übermäßige Aktivierung des angeborenen Immunsystems durch dessen Bindung an apoptotischen Zellen und die Inhibition der Abräumung apoptotischer Zellen durch die dendritischen Zellen (Vezzoli et al., 2016; Ortega-Hernandez et al., 2009). Dadurch begünstigt PTX3 selbst, wie bereits erwähnt, den apoptotischen Zelluntergang und fördert die Geweberegeneration. Eine höhere

Expression des PTX3 könnte damit auch in den entzündeten parodontalen Geweben die Geweberegeneration begünstigen und hierdurch die Zerstörung des Parodontiums und den klinischen Schweregrad der Parodontitis verringern. In der aktuellen Studie ist es gelungen, eine erhöhte PTX3 - Expression mit dem gesunden parodontologischen Zustand in Verbindung zu setzen.

5.2.1.10 Die antimikrobielle Wirkung von PTX3 und der mögliche Zusammenhang mit der Parodontitis

PTX3 entfaltet auch antimikrobielle und anti-inflammatorische Eigenschaften. Unter den ersten publizierten Funktionen von PTX3 war seine bindende Fähigkeit mit pathogenen Bakterien. PTX3 bindet an Komponenten von *A. fumigatus* sowie an wichtige gram-positive und gram-negative Bakterien wie *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella typhimurium* und *Paracoccidioides brasiliensis* (Bozza et al., 2006; Diniz et al., 2004; Garlanda et al., 2002; Jeannin et al., 2005; Reading et al., 2008). Murine Makrophagen, die PTX3 überexprimieren, weisen eine signifikant stärkere Phagozytose von *P. brasiliensis* im Vergleich zur Kontrollgruppe auf (Diniz et al. 2004). PTX3 begünstigt die Abwehr gegen bakterielle Infektionen mittels Opsonierung durch seinen Fcy-Rezeptor und die Komplementaktivierung (Bottazzi et al., 2010; Mantovani et al., 2013; Garlanda et al., 2016). Es steuert die Entzündung des Gewebes mit Hilfe von Komplement – Komponenten (Nauta et al., 2003; Deban et al., 2008; Csincsi et al., 2015; Braunschweig et al., 2011; Gout et al., 2011; Ma et al., 2009; Ma et al., 2011). PTX3 weist außerdem eine antiseptische Funktion auf. Es verhindert die Histon-abhängige endotheliale Zytotoxizität (Daigo et al., 2014).

Dias et al. (2001) und Souza et al. (2002) berichteten, dass PTX3-transgene Mäuse eine Resistenz gegen die Toxizität von Lipopolysacchariden wie LtxA aufweisen. LtxA sind Lipopolysacharide, die von parodontalen Bakterien wie *P. gingivalis* freigesetzt werden. Eine verminderte PTX3-Expression könnte nach diesen Studien mit einer exzessiven parodontalen Inflammation durch das Bakterium *P. gingivalis* in Zusammenhang stehen und zum Phänotyp der Parodontitis führen.

Im Gegensatz zu den genannten Ergebnissen haben Fujita et al. (2012) bei einer Studie mit 50 chronischen Parodontitis-Probanden eine erhöhte Expression von PTX3 festgestellt und PTX3 als diagnostischen Marker für die Parodontitis vorgeschlagen.

5.2.2 Vergleich der Ergebnisse der Expression von IL-17 α mit Daten aus der Literatur

In der vorliegenden Studie wurde im Gewebe von parodontal erkrankten Zähnen eine im Vergleich zur gesunden Gingiva eine signifikant stärkere Expression von IL-17 α nachgewiesen. Die meisten Daten aus der Literatur bestätigen eine signifikant höhere Expression von IL-17 α bei der Parodontitis.

Zahlreiche Studien belegen, dass die Geneexpression von IL-17 α bei Parodontitis höher ist als in parodontal gesundem Gewebe (Ribeiro *et al.*, 2011; Takahashi *et al.*, 2005; Shenkein *et al.*, 2010; Duarte *et al.*, 2010; Adibrad *et al.*, 2012; Behfarnia *et al.* (2013). Vernal *et al.* (2005) ermittelten die Expression von IL-17 α in der Sulkusflüssigkeit von Parodontitis-Patienten und Kontrollpatienten und belegten eine Überexpression bei den Parodontitispatienten. Dutzan *et al.* (2009) verglichen die aktiven parodontalen Läsionen mit den inaktiven und fanden heraus, dass in aktiven Läsionen eine signifikante Überexpression von IL-17 α vorherrscht.

Diese Ergebnisse wurden durch zahlreiche Studien auf Proteinebene in parodontalen Geweben (Nussbaum und Shapira, 2011; Gaffen *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2012; Dutzan *et al.*, 2012) sowie in der Sulkusflüssigkeit (Shaker und Ghallab, 2012) bestätigt. Da Costa *et al.* (2015) und Allam *et al.* (2011) stellten eine starke Akkumulation von IL-17 α -positiven Zellen im Parodontitis-Gewebe fest. Fu *et al.* (2013) beobachteten des Weiteren, dass Parodontitis-Patienten posttherapeutisch eine Reduktion von IL-17 α in der Sulkusflüssigkeit aufweisen, was ebenfalls darauf hindeutet, dass IL-17 α eng mit dem Entzündungsprozess der Parodontitis assoziiert ist.

5.2.2.1 Einfluss der IL-17 α - Expression auf die Knochenhomöostase und die mögliche Assoziation zur Parodontitis

IL-17 α wird von speziellen Th17-Zellen produziert, die eine wichtige Rolle bei der Osteoklastogenese und der chronischen Entzündung zu spielen scheinen (Gaffen und Hajishengallis, 2008). Es fördert die RANKL Produktion und inhibiert die Osteoprotegerin-Expression im Parodontalligament, was zu einem Ungleichgewicht der Knochenhomöostase führt und die Osteoklastogenese begünstigt (Lin *et al.*, 2014; Kanzaki *et al.*, 2001 Nakashima und Takayanagi, 2009; Schenkein *et al.*, 2010; Miossec und Kolls, 2012).

Darüber hinaus kann IL-17 α mehrere Gene der Osteoklastogenese aktivieren und synergistisch mit anderen proinflammatorischen Zytokinen wie Tumornekrosefaktor α (TNF- α) und IL-1 β bei chronischer Entzündung eine Knochenzerstörung verursachen (Gaffen und Hajishengallis, 2008; Van Bezooijen et al., 1999). Auch an der Zerstörung des Bindegewebes durch die Induktion der Matrix-Metalloproteinase bei Fibroblasten kann Interleukin-17 beteiligt sein (Miossec und Kolls, 2012).

Ohyama et al. (2009), Takahashi et al. (2014) sowie Belken et al. (2007) haben beobachtet, dass die Expression von IL-17 α in parodontalen Geweben und insbesondere an Gewebekompartimenten, die eine enge räumliche Beziehung zu Knochenläsionen zeigen, höher als im gesunden Gewebe ist. Dies konnte auf Proteinebene bestätigt werden. Zahlreiche Th17-Zellen sowie IL-17 α konnten in parodontalen Knochendefekten beobachtet werden (Cardoso et al., 2009). T-Zellen wurden in parodontalen Knochenläsionen gefunden, die in IL-17 α produzierende Th-17-Zellen transformiert wurden (Okui et al., 2012). Eine Hemmung der IL-17 α Produktion führte in einer tierexperimentellen Studie sogar zur Hemmung der Osteoklastogenese im Parodontium (Eskan et al., 2012). Es gibt daher vermehrt Hinweise, wonach IL17- α den Krankheitsverlauf der Parodontitis über eine durch Osteoklastogenese induzierte Kaskade negativ beeinflusst.

5.2.2.2 Einfluss der IL-17 α -Expression bei der Leukozytenextravasation und die mögliche Assoziation zur Parodontitis

Stark et al. (2005) beschreiben eine IL-17 α -IL-23-G-CSF-Zytokin-Kaskade, wonach IL-17 α die Granulopoiese fördert. Darüber hinaus scheint IL-17 α die neutrophilen Granulozyten nicht nur zu rekrutieren, sondern auch zu aktivieren. Diese Aktivierung kann zur Infiltration des parodontalen Gewebes durch die neutrophilen Granulozyten und zu einer exzessiven Entzündung des Parodontiums führen (Sugama et al., 2012; Witowski, et al. 2000).

Des Weiteren fördert IL-17 α die Neutrophilenrekrutierung durch Induktion von CXC-Chemokinen wie CXCL1, CXCL2 und CXCL8 sowie von G-CSF und stimuliert so die Entzündung des parodontalen Gewebes (Gaffe, 2009; Iwakura et al., 2011; von Vietinghoff und Ley, 2008). Eskan et al. (2012) sowie Maekawa et al. (2015) zeigten, dass IL-17 α , wie bereits erwähnt, auch die Expression von Del-1 hemmen und dadurch indirekt die Extravasation von PMNs steigern kann.

Eine exzessive Akkumulation von neutrophilen Granulozyten, die eventuell mit einer übermäßigen IL-17 α -Expression verbunden ist, passt zum klinischen Bild der Parodontitis. In der vorliegenden Studie ist tatsächlich eine erhöhte IL-17 α -Expression bei Parodontitis-Patienten beobachtet worden.

5.2.2.3 Altersabhängige Expression von IL-17 α

IL-17 α scheint auch mit zunehmendem Alter eine höhere Expression aufzuweisen und dies ist wiederum mit einer Störung der Immunhomöostase verbunden. Liang et al. (2010) stellten fest, dass Mäuse mit einem gealterten Immunsystem nicht in der Lage sind, ihre eigene Mundflora zu kontrollieren und aufgrund dessen eine Parodontitis entwickeln. Sie verglichen dazu junge Mäuse (8–10 Wochen alt) mit alten Mäusen (≥ 18 Monate alt). Alte Mäuse zeigten einen signifikant stärkeren parodontalen Knochenverlust und eine erhöhte Expression des Interleukin-17 α .

Mit zunehmendem Alter wird die Expression nicht nur von IL-17 α , sondern auch von anderen proinflammatorischen Zytokinen wie IL-1 β , TNF- α und Rezeptoren des angeborenen Immunsystems wie TLR2, CD14, CD11b/CD18, Komplement C5a-Rezeptor (C5aR) und TREM-3, die am Ausbruch der Inflammation beteiligt sind, verstärkt (Gaffen und Hajishengallis, 2008; Graves et al., 2008).

Liang et al. (2009) haben die Expression der „Signature“-Moleküle IFN- γ , IL-4, IL-17 α und „forkhead box“ P3 untersucht und sie konnten eine altersbedingte Überexpression von IL-17 α beweisen. Diese Beobachtung konnten Eskan et al. (2012) im Mausmodell bestätigen. In der vorliegenden Studie wurde kein signifikanter altersabhängiger Unterschied der Expression von IL-17 α festgestellt.

5.2.3 Vergleich der Ergebnisse der Expression von LFA-1 mit Daten aus der Literatur

In der vorliegenden Studie wurde in der Parodontitisgruppe eine signifikant höhere Expression von LFA-1 als in der Kontrollgruppe nachgewiesen. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit zahlreichen früheren Studien. Procházkova et al. (1996) stellten fest, dass die Expression von LFA-1 β -Molekülen in peripheren Blutzellen von 20 Patienten mit aggressiver Parodontitis signifikant höher war als bei 10 gesunden Patienten.

Obwohl die verstärkte Expression von LFA-1 wiederholt mit der Parodontitis in Verbindung gebracht wurde, sind die pathogenetischen Mechanismen, die dieser Beobachtung zugrunde liegen, bislang kaum untersucht. Jedoch konnten Untersuchungen zeigen, dass in der Sulkusflüssigkeit von Parodontitispatienten mehr und stärker gefärbte CD11a-positive Zellen als im peripheren Blut vorhanden waren (Takeuchi et al. 1995) sowie größere Mengen an LFA-1 im parodontalen Epithel und in den Zahnfleischtaschen bei Parodontitispatienten als bei Gesunden (Yan et al. 1999). Bei parodontal gesunden Kontrollen konnten keine CD11a-positiven Zellen nachgewiesen werden (Takeuchi et al. 1995). Dies deutet darauf hin, dass die Ausschüttung von LFA-1 lokal im entzündenden Parodontium signifikant höher ist. LFA-1 scheint positiv mit der Parodontitis korreliert zu sein.

5.2.3.1 Einfluss der LFA-1 Expression auf die Leukozytenextravasation und die mögliche Assoziation zur Parodontitis

LFA-1 ist bei der Rekrutierung der neutrophilen Granulozyten (Feste Adhäsion und Transmigration) in den Entzündungsbereich beteiligt (1.4.4) (Luster et al., 2005; Springer, 1994; Ley et al.. 2007; Rao et al., 2007; Keiper et al., 2005; Carlos et al., 1994; Schenkel et al., 2004; Müller et al., 2002; Imhof und Aurrand-Lions, 2004; Kinashi, 2005; Shaw et al., 2004; Salas et al., 2004; Zarbock et al., 2007). LFA-1 interagiert dabei mit ICAM-1 und dient dadurch der Aktivierung von neutrophilen Granulozyten. LFA-1 kann die Extravasation von T- Lymphozyten in das entzündete Gewebe auch durch eine LFA-1 /ICAM-1 Kaskade begünstigen und dadurch autoimmunologische Mechanismen, wie z.B. bei der Multiplen Sklerose, aktivieren (Rudolph et al., 2016; Verma und Kelleher, 2017). Die Rekrutierung der PMNs führt zur exzessiven Infiltration von neutrophilen Granulozyten am Entzündungsort, beispielsweise dem Parodontium.

Darüber hinaus scheint Del-1 die LFA-1 Expression in einer ICAM-1 abhängigen Kaskade zu inhibieren. Del-1 antagonisiert LFA-1 um die Bindung an ICAM-1 und verhindert dadurch die Leukozytenextravasation (Choi et al., 2008). Tatsächlich ist eine erhöhte LFA-1 Expression zusammen mit einer mangelhaften Del-1 Expression bei parodontal erkranktem Gewebe zu beobachten (Eskan et al. 2012). Auch in der vorliegenden Studie ist es gelungen, im Gewebe von Parodontitispatienten eine mangelhafte Expression von Del-1 in Verbindung mit einer gleichzeitig übermäßigen LFA-1 Expression nachzuweisen.

Ferner verbindet eine weitere Studie eine verminderte LFA-1 Expression im Rahmen des LAD-1 Syndroms mit einer erhöhten IL-17 α Expression. Dies hatte eine ausgeprägte Parodontitis mit einer exzessiven Granulopoese und einem ausgeprägten Knochenverlust zufolge. Durch eine IL-17 α -Antikörpertherapie konnte das klinische Bild der Parodontitis rückgängig gemacht und die mikrobielle Belastung minimiert werden (Moutsopoulos et al., 2014). Diese Daten legen nahe, dass eine verminderte LFA-1 und IL-17 α -Expression mit der parodontalen Gesundheit verbunden ist, was auch in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden konnte.

Es stellt sich darüber hinaus die Frage, warum es im Rahmen des LAD-1-Syndroms durch Senkung der IL-17 α -Level dennoch zur parodontalen Heilung kommt. Bei gleichzeitig niedrigen Spiegeln von IL-17 α und LFA-1 wird die Neutrophilenakkumulation behindert. Dieses spricht gegen der Theorie, dass die Abwesenheit von neutrophilen Granulozyten zu einer vermehrten bakteriellen Belastung und zum Ausbruch der Parodontitis führt (Hajishengallis und Korostoff, 2017). Auch die Tatsache, dass Individuen mit einer chronischen Granulomatose (CGD), d.h. einer gestörten Abwehrfunktion der Granulozyten, kein erhöhtes Risiko für eine Parodontitis aufweisen, spricht gegen diese Theorie (Nussbaum und Shapira, 2011; Sima und Glogauer, 2014). Die ungestörte Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten im Parodontium scheint wichtiger zu sein, als die Fähigkeit des Parodontiums, die Bakterien zu eliminieren. Die aktuelle Studie hat eine niedrige LFA-1 und IL-17 - Expression mit dem Phänotyp des gesunden Parodontiums in Verbindung gebracht.

5.2.3.2 Zusammenhang zwischen LFA-1 - Expression und mikrobiellen Komponenten

LFA-1 scheint mit Hilfe von LPS (Lypopolysaccharide) des *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Leitkeims der Parodontitis) überexprimiert zu sein. Zwei Studien zeigten, dass nach einer zwölfstündigen Inkubation mit LPS die Expression von LFA-1 in murinen Makrophagen-Zelllinien deutlich gesteigert war (Tsutsumi et al., 2010). Diese erhöhte Expression von LFA-1 könnte somit eine Rolle beim pathogenetischen Beitrag von *A. actinomycetemcomitans* durch diese LPS-Kaskade zur Parodontitis spielen. In der vorliegenden Studie ist es gelungen, eine erhöhte Expression von LFA-1 bei Patienten mit einer Parodontitis nachzuweisen. Darüber hinaus bindet sich LFA-1 an LtxA und begünstigt dadurch die Eliminierung der Leukozyten. Leukotoxin (LtxA) ist ein

großes, porenbildendes Protein der RTX-Familie, und es wird von *A. actinomycetemcomitans* und *P. gingivalis* produziert (Lally et al., 1989; Kraig et al., 1990). Die Interaktion zwischen Toxin (LtxA) und Rezeptor (LFA-1) führt zum Zelltod der PMNs (Morova et al. 2008) (Abbildung 5.2.1.4). Die Konformation von LtxA ändert sich nach der Interaktion mit den LFA-1-Rezeptoren der Leukozyten signifikant und führt zur Membraninsertion des Toxins (Morova et al., 2008). Anschließend kommt es bei niedriger Konzentration der LtxA zur Apoptose der Leukozyten. Bei hohen Konzentrationen ($> 5 \mu\text{g/ml}$) hingegen nekrotisiert LtxA die Leukozyten sehr schnell. LtxA tötet primär Zellen, die aktiviertes LFA-1 besitzen (Kachlany et al., 2010). Daher kann LtxA die diversen Zellen des Parodontiums nicht ohne die Hilfe von LFA-1 eliminieren.

Vermutlich beschleunigen somit mikrobielle Komponenten des Biofilms (beispielsweise LtxA) zeitgleich mit einer exzessiven Expression von LFA-1 die Zerstörung des parodontalen Gewebes und begünstigen damit den Ausbruch einer Parodontitis, was in der vorliegenden Studie bestätigt worden ist.

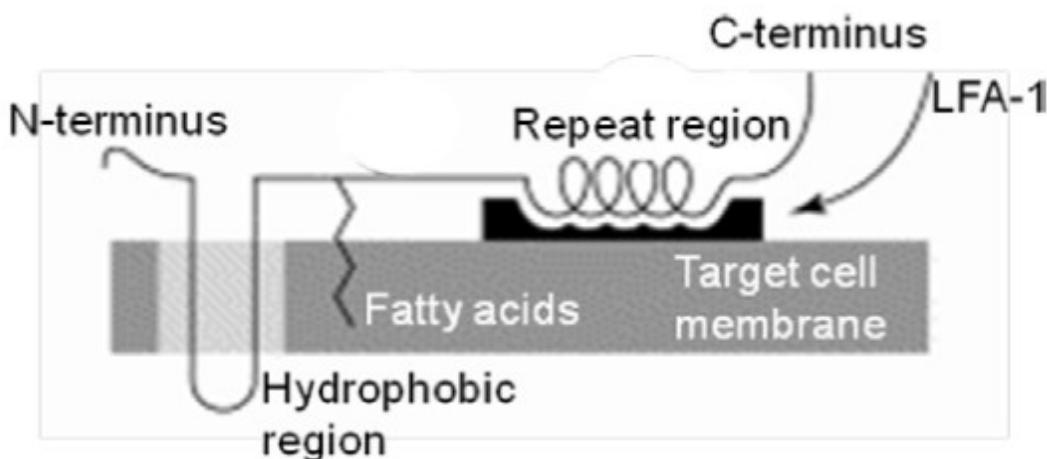


Abbildung 5.2.1.4: Schematische Darstellung der Molekularstruktur der Interaktion zwischen Leukotoxin und Zellmembran. Der Zielrezeptor LFA-1 bindet sich an der repeat region der RTX, und diese Interaktion ist verantwortlich für die Affinität der LtxA an den Leukozyten (Quelle: Lally, E.T.; Hill, R.B.; Kieba, I.R.; Korostoff, J. The interaction between RTX toxins and target cells. Trends Microbiol. 1999, 7, 356–361, modifiziert durch Johansson A.: Aggregatibacter actinomycetemcomitans leukotoxin: a powerful tool with capacity to cause imbalance in the host inflammatory response. Toxins (Basel). 2011 Mar;3(3):242-59 und).

Zusammenfassend wurde LFA-1 in mehreren Studien mit der Parodontitis in Verbindung gebracht (Choi et al., 2015; Eskan et al., 2012; Mitroulis et al., 2014). Diese Ergebnisse konnten durch die vorliegende Studie bestätigt werden.

5.2.3.3 Altersbedingte Expression von LFA-1

Ma et al. (2008) haben eine altersbedingte Überregulierung von LFA-1 in einem experimentellen Modell zur Atherosklerose ermittelt. Da die Atherosklerose ebenfalls eine chronische Entzündungserkrankung wie Parodontitis darstellt (Abbildung 5.2.1.5), wurde in der vorliegenden Studie untersucht, ob auch LFA-1 mit zunehmendem Alter überexprimiert wird und ob diese veränderte Expression mit dem Phänotyp der Parodontitis verbunden ist. Es ist in dieser Studie jedoch nicht gelungen, eine altersbedingte Korrelation von LFA-1 mit der Parodontitis aufzuzeigen.

6 Anhang

6.1 Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1.2.2.1: Schematische Darstellung der Leukozytenextravastion: (i) PMNs werden vom aktivierte Endothelium festgehalten (ii) Dann erfolgt das *rolling* und (iii) das *slow rolling* der Leukozyten auf dem Endothelium. Anschließend werden PMNs (iv) von Chemokinen des Endotheliums aktiviert (*Activation*), gefolgt von (v) der festen Adhäsion der PMNs ans Endothelium. Danach erfolgt (vi) das post-adhäsive *crawling* der PMNs (vii), die zum Ende der Extravasation transendothelial migrieren (Transmigration oder Diapedese). Spezifische Adhäsionsmoleküle sorgen dafür, dass die benötigten Zelltypen zur richtigen Zeit an den richtigen Ort rekrutiert werden. (Quelle: Choi EY.: Inhibition of leukocyte adhesion by developmental endothelial locus-1 (del-1). Immune Netw. 2009 Oct;9(5):153-7) 7
- Abbildung 1.3.1.1: Domänenstruktur von Del-1. Das zweite EGF-Repeat (egf-2) beinhaltet ein RGD-Motiv (Arg-Gly-Asp (RGD)-Peptid), das die Bindung von Del-1 an Integrin $\alpha v\beta 3$ unterstützt und dadurch die Adhäsion von Endothelzellen an Del-1 ermöglicht und die Angiogenese fördert (Quelle: Choi EY: Inhibition of leukocyte adhesion by developmental endothelial locus-1 (del-1). Immune Netw.2009 Oct;9(5):153-7). 9
- Abbildung 4.2.5.1: Bivariate Korrelationsanalyse des Einflusses von Erkrankung (ja/nein), Stadium der Erkrankung, Alter und Geschlecht auf die Expression von Del-1. Die Auswertung erfolgte durch den Spearmans-Rho-Test. 41
- Abbildung 5.2.1.1: Del-1 wirkt als lokaler Kompetitor der Leukozytenrekrutierung. Del-1 blockiert die LFA-1/ICAM-1-Interaktion, die der Transmigration der Leukozyten durch die Endothelmembran dient (Choi *et al.*, 2008; Eskin *et al.*, 2012). (Bild: E. Hajishengallis and G. Hajishengallis, neutrophil homeostasis and periodontal health in children and Adults, J Dent Res. 2014; 93(3):231-237) 63
- Abbildung 5.2.1.2: Del-1 hemmt die IL-17 α -Produktion, die Entzündung und den Knochenverlust bei Parodontitis. Die stärkere Expression von Del-1 im parodontalen Gewebe junger Mäuse hemmt die IL-17 α -Produktion sowie die Neutrophilenrekrutierung in das Gewebe (a). Bei alten Mäusen ist die Del-1 Expression während der Infektion herabreguliert, während die IL-17 α -Produktion heraufreguliert ist (b). IL-17 α induziert G-CSF und CXC-Chemokine und lockt neutrophile Granulozyten in das entzündete Gewebe. Gleichzeitig hemmt IL-17 α die Del-1-Expression und fördert die Extravasation

von neutrophilen Granulozyten in das entzündete Gingivagewebe. Darüber hinaus wirkt IL-17 α synergistisch mit anderen Zytokinen, um die Produktion von Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) und RANKL zu induzieren. Dies fördert die Osteoklastogenese (Quelle: Khader SA.: Restraining IL-17: Del-1 deals the blow. <i>Nat Immunol.</i> 2012 Apr 18; 13(5):433-5).....	66
Abbildung 5.2.2.1: Die endogenen Inhibitoren der Leukozytenadhäsion: PTX3 hemmt das Rolling der Leukozyten, und Del-1 wirkt der LFA-1-abhängigen festen Adhäsion entgegen (Chavakis T.: Leucocyte recruitment in inflammation and novel endogenous negative regulators thereof. <i>Eur J Clin Invest.</i> 2012 Jun; 42(6):686-91).....	71
Abbildung 5.2.4.1: Schematische Darstellung der Molekularstruktur der Interaktion zwischen Leukotoxin und Zellmembran. Der Zielrezeptor LFA-1 bindet sich an der <i>repeat region</i> der RTX, und diese Interaktion ist verantwortlich für die Affinität der LtxA an den Leukozyten (Quelle: Lally, E.T.; Hill, R.B.; Kieba, I.R.; Korostoff, J. The interaction between RTX toxins and target cells. <i>Trends Microbiol.</i> 1999, 7, 356–361, modifiziert durch Johansson A.: <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> leukotoxin: a powerful tool with capacity to cause imbalance in the host inflammatory response. <i>Toxins (Basel).</i> 2011 Mar;3(3):242-59 und).....	79

6.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 3.6.2-1: Mastermix Ansatz für die c-DNA Synthese.....	22
Tabelle 3.7.1-1: Primer Design und verwendete <i>Melting</i> Temperatur.....	23
Tabelle 3.7.2-1: PCR Ansatz der untersuchten Genen für die Elektrophorese.....	24
Tabelle 3.7.2-2: Ablauf des PCR Verfahrens für die Sequenzierung der Primer	25
Tabelle 3.7.5-1: Mastermix für das RT-PCR Verfahren.....	30
Tabelle 3.7.5-2: Ablauf der PCR durch entsprechende Programmierung des Light Cycler 480	32
Tabelle 3.7.5-1: Charakteristika der beiden Parodontitis-Testgruppen und der gesunden Kontrollgruppe. (*) p-Wert durch Kruskall-Wallis-Test ausgewertet, (**) p-Wert durch Pearson's-Chi-Square-Test mit Yales Korrelationen ausgewertet.	35
Tabelle 4.2.4-1: Vergleich der Del-1 Expression zwischen Probanden \leq 50 Jahre alt und Probanden $>$ 50 Jahre alt je nach Schwere der parodontalen Erkrankung. Die Auswertung erfolgte durch den Mann-Whitney-Test.	40

Tabelle 4.2.5-1: Bivariate Korrelationsanalyse des Einflusses von Erkrankung (ja/nein), Stadium der Erkrankung, Alter und Geschlecht auf die Expression von Del-1. Die Auswertung erfolgte durch den Spearmans-Rho-Test	41
Tabelle 4.3.5-1: Bivariate Korrelationsanalyse des Einflusses von Erkrankung (ja/nein), Stadium der Erkrankung, Alter und Geschlecht auf die Expression von PTX3. Die Auswertung erfolgte durch den Spearmans-Rho-Test	46
Tabelle 4.5.5-1: Bivariate Korrelationsanalyse des Einflusses von Erkrankung (ja/nein), Stadium der Erkrankung, Alter und Geschlecht auf die Expression von IL-17a. Die Auswertung erfolgte durch den Spearmans-Rho-Test	51
Tabelle 4.4.5-1: Bivariate Korrelationsanalyse des Einflusses von Erkrankung (ja/nein), Stadium der Erkrankung, Alter und Geschlecht auf die Expression von LFA-1. Die Auswertung erfolgte durch den Spearmans-Rho-Test	56

6.3 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
AAP	American Academy of Periodontology
C5aR	Komplement C5a-Rezeptor
COPD	Chronisch obstruktive Lungenerkrankung
DEL-1	developmental endothelial locus-1
Del-1-Fc	lösliches rekombinantes developmental endothelial locus1
DMS V	Fünfte Deutsche Mundgesundheitsstudie
DNA	Deoxyribunucleic Acid
EFP	European Federation of Periodontology
EGF	epidermalen Wachstumsfaktor
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GSK-3	Glykogensynthase-Kinase 3
ICAM-1	Interzelluläres Zelladhäsionsmolekül 1
IFN-γ	Interferon gamma

IL-1	Interleukin 1
IL-17 α	Interleukin 17 alpha
IL-1 α	Interleukin 1 α
IL-1 α	Interleukin 1 alpha
IL-1 β	Interleukin 1 betta
IL-6	Interleukin 6
IL-8	Interleukin 8
Kg	kilogram
LAD-1	Leukozytenadhäsionsdefizienz Typ 1
LFA-1	lymphocyte function-associated antigen-1
LPS	Lipopolysaccharid
LSGL-1	L-selectin-glycoprotein-ligand-1
Mac-1	Macrophage-1 antigen
mm	millimeter
mRNA	Messenger Ribonucleic Acid
MS	Multiplen Sklerose
NFATC1	Nuclear Factor Of Activated T Cells 1
NOD-Mäuse	non-obese diabetic Mäuse
P. gingivalis	Porphyromonas gingivalis
PCR	Polymerasen Ketten Reaktion
PMN	Polymorphkernige Granylozyten
PMNs	Neutrophile Granulozyten
PSD Modell	Modell der polymikrobiellen Synergie und Dysbiose
PSGL-1	P-selectin-glycoprotein-ligand-1
PTX3	Pentraxin-related protein
PTXs	Pentraxinen
RAGE	Rezeptor für Advanced-Glycation-Endprodukte

RANKL	Receptor Activator of Nuclear Factor κ B
r_s	Korrelationskoeffizient
RT-PCR	Real time Polymerasen Ketten Reaktion
RT-qPCR	Real-time-quantitative PCR
TNF- α	Transforming growth factor alpha
TNF- β	Transforming growth factor betta
TREM-3	Triggering receptor expressed on myeloid cells 3
TSG-14	<i>TNF-inducible gene-14 – Protein</i>
VCAM-1	vaskuläre Zelladhäsionsmolekül-1
vs.	Versus
WHO	World Health Organisation
β 2-Integrine	betta-2 Intergine

7 Zusammenfassung

Die Parodontitis ist eine chronische Infektionserkrankung. An der Pathogenese dieser Krankheit könnte nach aktuellen ätiologischen Modellen unter anderem eine ineffektive und überschießende Reaktion des Immunsystems beteiligt sein. Del-1 und PTX3 gelten als Regulatoren der Leukozytenrekrutierung, die eine wichtige Rolle bei der Immunantwort während der Entzündung spielen.

Ziel der vorliegenden Studie war die Bestimmung der Expression von Del-1, PTX3, LFA-1 und IL-17 α bei der klinischen Manifestation der Parodontitis.

Dazu wurden gingivale Gewebeproben von insgesamt 95 Individuen untersucht, 42 mit leichter Parodontitis, 40 mit schwerer Parodontitis und 13 parodontal gesunde Probanden. Die Bestimmung der Stärke der Expression erfolgte durch RT-PCR mit anschließender Schmelzkurvenanalyse.

Es zeigte sich, dass die Expression der Moleküle PTX3 und Del-1 in der Untersuchungsgruppe signifikant niedriger und die von IL-17A und LFA-1 signifikant höher als in der Kontrollgruppe war.

Darüber hinaus war die Expression von Del-1 signifikant negativ mit dem Schweregrad der Parodontitis und auch dem Alter, aber nicht mit dem Geschlecht der Probanden korreliert. Des Weiteren zeigte PTX3 eine signifikante negative Korrelation mit der Parodontitis, IL-17 α und LFA-1 hingegen waren positiv mit der Parodontitis assoziiert.

Die vorliegenden Ergebnisse deuten darauf hin, dass eine zum Teil altersabhängige Fehlregulation der PMN-Extravasation von LFA-1, IL-17 α , PTX3 und Del-1 an der Entstehung der Parodontitis beteiligt sein könnte. Diese Hypothese muss noch in weiteren Studien bestätigt werden und könnte dann zur Entwicklung neuer spezifischer Therapieoptionen der Parodontitis herangezogen werden.

8 Literaturverzeichnis

1. Abusleme L, et al. The subgingival microbiome in health and periodontitis and its relationship with community biomass and inflammation. *ISME J.* 2013; 7:1016–1025.
2. Adibrad, M., Deyhimi, P., Ganjalikhani Hakemi, M., Behfarnia, P., Shahabuei, M. and Rafiee, L.: Signs of presence of Th17 cells in chronic periodontal disease. *J. Periodontal Res* 2012; 47: 525-531.
3. Aggarwal S, Gurney AL.:IL-17: prototype member of an emerging cytokine family.
4. Ahmad AI, Ghasemi JB.: New unsymmetrical cyanine dyes for real-time thermal cycling. *Anal Bioanal Chem.* 2007 Oct;389(3):983-8.
5. Albandar JM, Brunelle JA, Kingman A. Destructive periodontal disease in adults 30 years of age and older in the United States, 1988–1994. *J Periodontol* 1999; 70: 13–29.
6. Allam JP1, Duan Y, Heinemann F, Winter J, Götz W, Deschner J, Wenghoefer M, Bieber T, Jepsen S, Novak N. IL-23-producing CD68(+) macrophage-like cells predominate within an IL-17-polarized infiltrate in chronic periodontitis lesions. *J Clin Periodontol.* 2011 ;38(10):879-86.
7. Alles V. V., B. Bottazzi, G. Peri, J. Golay, M. Introna, A. Mantovani: Inducible expression of PTX3, a new member of the pentraxin family, in human mononuclear phagocytes, *Blood* 1994, vol. 84, no. 10, pp. 3483–3493.
8. Amulic B, Cazalet C, Hayes GL, Metzler KD, Zychlinsky A (2012). Neutrophil function: from mechanisms to disease. *Annu Rev Immunol.* 2012; 30:459-489.
9. Anderson DC, Springer TA. Leukocyte adhesion deficiency: an inherited defect in the Mac-1, LFA-1, p150, 95 glycoproteins. *Annu Rev Med.* 1987;38:175-94.
10. Andia DC, de Oliveira NF, Letra AM, et al.: Interleukin-8 gene promoter polymorphism (rs4073) may contribute to chronic periodontitis. *J Periodontol* 2011;82:893–9.

11. Arnardottir, H. H., Dalli, J., Colas, R. A., Shinohara, M. & Serhan, C. N. Aging delays resolution of acute inflammation in mice: reprogramming the host response with novel nano-proresolving medicines. *J. Immunol.* 2014; 19: 4235–424.
12. Attström R, Schroeder HE. Effect of experimental neutropenia on initial gingivitis in dogs. *Scand J Dent Res.* 1979 Feb;87(1):7-23.
13. Aujla SJ, Dubin PJ, Kolls JK.: Interleukin-17 in pulmonary host defense. *Exp Lung Res.* 2007 Dec;33(10):507-18.
14. Aujla SJ, Dubin PJ, Kolls JK.: Th17 cells and mucosal host defense. *Semin Immunol.* 2007 Dec;19(6):377-82
15. Azarpazhooh A, Leake JL. Systematic review of the association between respiratory diseases and oral health. *J Periodontol.* 2006;77(9): 1465–1482.
16. Baban B., J. Y. Liu, R. Abdelsayed, M. S. Mozaffari, Reciprocal relation between GADD153 and Del-1 in regulation of salivary gland inflammation in Sjögren syndrome. *Exp. Mol. Pathol.* 2013; 95: 288–297.
17. Baker PJ, Evans RT, Roopenian DC. Oral infection with *Porphyromonas gingivalis* and induced alveolar bone loss in immunocompetent and severe combined immunodeficient mice. *Arch Oral Biol* 1994; 39: 1035–1040.
18. Barin JG, Baldeviano GC, Talor MV, Wu L, Ong S, Quader F, Chen P, Zheng D, Caturegli P, Rose NR, Ciháková D.: Macrophages participate in IL-17-mediated inflammation. *Eur J Immunol.* 2012 Mar;42(3):726-36.
19. Baruah P, Propato A, Dumitriu IE, Rovere-Querini P, Russo V, Fontana R, Accapezzato D, Peri G, Mantovani A, Barnaba V, Manfredi AA. The pattern recognition receptor PTX3 is recruited at the synapse between dying and dendritic cells, and edits the cross-presentation of self, viral and tumor antigens. *Blood.* 2006; 107:151–158.
20. Becerik S, Öztürk VO, Atmaca H, Atilla G, Emingil G. Gingival crevicular fluid and plasma acute-phase cytokine levels in different periodontal diseases. *J Periodontol.* 2012; 83(10):1304-13.

21. Behfarnia P, Birang R, Pishva SS, Hakemi MG, Khorasani MM: Expression levels of th-2 and th-17 characteristic genes in healthy tissue versus periodontitis. *J Dent (Tehran)*. 2013 Jan; 10(1):23-31.
22. Beikler, T. & Flemmig, T. F. Oral biofilm-associated diseases: trends and implications for quality of life, systemic health and expenditures. *Periodontol. 2000*. 2011; 55, 87–103
23. Beklen, A., Ainola, M., Hukkanen, M., Gurgan, C., Sorsa, T. and Konttinen, Y. T.: MMPs, IL-1, and TNF are regulated by IL-17 in periodontitis. *J. Dent. Res* 2007. 86, 347-351.
24. Belibasakis GN, Bostanci N. The RANKL-OPG system in clinical periodontology. *J Clin Periodontol*. 2012; 39:239–248
25. Belibasakis GN1, Emingil G, Saygan B, Turkoglu O, Atilla G, Bostanci N. Gene expression of transcription factor NFATc1 in periodontal diseases. 2011 Mar; 119(3):167-72
26. Bengtsson M¹, Ståhlberg A, Rorsman P, Kubista M.: Gene expression profiling in single cells from the pancreatic islets of Langerhans reveals lognormal distribution of mRNA levels. *Genome Res*. 2005 Oct;15(10):1388-92
27. Bergmann, Ludbrook and Will P. J. M. Spooren. Different Outcomes of the Wilcoxon-Mann-Whitney Test from Different Statistics Packages. *The American Statistician*, Vol. 54, No. 1 (Feb., 2000), pp. 72-77
28. Bickel M. The role of interleukin-8 in inflammation and mechanisms of regulation. *J Periodontol*. 1993; 64:456–460
29. Boeuf P. CyProQuant- PCR : a real time RT-PCR technique for profiling human cytokines, based on external RNA standards, readily automatable for clinical use. *BMC Immunol*. 2005; 6:5.
30. Boillard E, Nigrovic PA, Larabee K, Watts GF, Coblyn JS, Weinblatt ME, Massarotti EM, Remold-O'Donnell E, Farndale RW, Ware J, Lee DM. Platelets amplify inflammation in arthritis via collagen-dependent microparticle production. *Science*. 2010; 327:580 –583.

31. Bottazzi B, Doni A, Garlanda C, Mantovani A. An integrated view of humoral innate immunity: pentraxins as a paradigm. *Annu Rev Immunol.* 2010;28: 157-83.
32. Bottazzi B, Vouret-Craviari V, Bastone A, De Gioia L, Matteucci C, Peri G, Spreafico F, Pausa M, D'Ettorre C, Gianazza E, Tagliabue A, Salmona M, Tedesco F, Introna M, Mantovani A: Multimer formation and ligand recognition by the long pentraxin PTX3. Similarities and differences with the short pentraxins C-reactive protein and serum amyloid P component, *J. Biol. Chem.* 1997. 272 (52): 32817–23.
33. Bozza S, Bistoni F, Gaziano R, Pitzurra L, Zelante T, Bonifazi P, Brage, M.; Holmlund, A.; Johansson, A. Humoral immune response to Aggregatibacter actinomycetemcomitans leukotoxin. *J. Periodontal Res.* 2011, 46, 170–175.
34. Braunschweig A, Józsi M. Human pentraxin 3 binds to the complement regulator C4b-binding protein. *PLoS One.* 2011;6(8):e23991
35. Breviario F, d'Aniello EM, Golay J, Peri G, Bottazzi B, Bairoch A, Saccone S, Marzella R, Predazzi V, Rocchi M, et al.: Interleukin-1-inducible genes in endothelial cells. Cloning of a new gene related to C-reactive protein and serum amyloid P component. *J Biol Chem.* 1992 Nov 5;267(31):22190-7.
36. Brooks PC, Clark RA, Cheresh DA. Requirements of vascular integrin alpha v beta 3 for angiogenesis. *Science.* 1994;264: 569 –571.
37. Brooks PC, Montgomery AM, Rosenfeld M, et al. Integrin alpha v beta 3 antagonists promote tumor regression by inducing apoptosis of angiogenic blood vessels. *Cell.* 1994; 79: 1157–1164.
38. Buonocore S1, Ahern PP, Uhlig HH, Ivanov II, Littman DR, Maloy KJ, Powrie F.: Innate lymphoid cells drive interleukin-23-dependent innate intestinal pathology. *Nature* 2010, 464, 1371–1375
39. Bustin S.A. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol.* 2000;25(2):169–193
40. Bustin SA, Benes V, Nolan T, Pfaffl MW. Quantitative real-time RT-PCR—a perspective. *J Mol Endocrinol.* 2005;34(3):597–601.

41. Campbell JJ, Hedrick J, Zlotnik A, Siani MA, Thompson DA, Butcher EC. Chemokines and the arrest of lymphocytes rolling under flow conditions. *Science* 1998; 279:381–84
42. Cardoso C. R., Garlet G. P., Crippa G. E., et al.: Evidence of the presence of T helper type 17 cells in chronic lesions of human periodontal disease. *Oral Microbiology and Immunology*. 2009;24(1):1–6.
43. Carlos TM, Harlan JM.: Leukocyte-endothelial adhesion molecules. *Blood* 1994, 84: 2068–2101.
44. Carmeliet, P. Integrin indecision. *Nat Med*. 2002; 8, 14–16.
45. Caton JG, Armitage G, Berglundh T, Chapple ILC, Jepsen S, Kornman KS, Mealey BL, Papapanou PN, Sanz M, Tonetti MS: A new classification scheme for periodontal and peri-implant diseases and conditions - Introduction and key changes from the 1999 classification. *J Periodontol*. 2018 Jun;89 Suppl 1:S1-S8.
46. Cesar-Neto JB, Duarte PM, de Oliveira MC, et al. Smoking modulates interleukin-6: interleukin-10 and RANKL: osteoprotegerin ratios in the periodontal tissues. *J Periodontal Res* 2007; 42:184–91.
47. Chavakis T, Bierhaus A, Al-Fakhri N, et al.: The pattern recognition receptor (RAGE) is a counterreceptor for leukocyte integrins: a novel pathway for inflammatory cell recruitment. *J Exp Med* 2003; 198: 1507–1515.
48. Chavakis T.: Leucocyte recruitment in inflammation and novel endogenous negative regulators thereof. *Eur J Clin Invest*. 2012 Jun;42(6):686-91
49. Chiu B. Multiple infections in carotid atherosclerotic plaques. *Am Heart J* 1999; 138:534–536.
50. Choi EY, Chavakis E, Czabanka MA, Langer HF, Fraemohs L, Economopoulou M, Kundu RK, Orlandi A, Zheng YY, Prieto DA, Ballantyne CM, Constant SL, Aird WC, Papayannopoulou T, Gahmberg CG, Udey MC, Vajkoczy P, Quertermous T, Dimmeler S, Weber C, Chavakis T. Del-1, an endogenous leukocyte-endothelial adhesion inhibitor, limits inflammatory cell recruitment. *Science*. 2008; 322:1101–1104.

51. Choi EY, Lim JH, Neuwirth A, Economopoulou M, Chatzigeorgiou A, Chung KJ, Bittner S, Lee SH, Langer H, Samus M, Kim H, Cho GS, Ziemssen T, Bdeir K, Chavakis E, Koh JY, Boon L, Hosur K, Bornstein SR, Meuth SG, Hajishengallis G, Chavakis T. Developmental endothelial locus-1 is a homeostatic factor in the central nervous system limiting neuroinflammation and demyelination. *Mol Psychiatry*. 2015; 20:880–888.
52. Choi EY: Inhibition of leukocyte adhesion by developmental endothelial locus-1 (del-1). *Immune Netw*. 2009 Oct;9(5):153-7
53. Cohen, J.: *Statistical Power Analysis for the Behavioral Sciences*, 2nd Ed. Lawrence Earlbaum, Hillsdale. 1988.
54. Colombo AP, Bennet S, Cotton SL, Goodson JM, Kent R, Haffajee AD, Socransky SS, Hasturk H, Van Dyke TE, Dewhirst FE, Paster BJ. Impact of periodontal therapy on the subgingival microbiota of severe periodontitis: comparison between good responders and individuals with refractory periodontitis using the human oral microbe identification microarray. *J Periodontol*. 2012 Oct;83(10):1279-87.
55. Constantin G, Majeed M, Giagulli C, Piccio L, Kim JY, et al.: Chemokines trigger immediate β 2 integrin affinity and mobility changes: differential regulation and roles in lymphocyte arrest under flow. *Immunity*. 2000; 13:759–69.
56. Csincsi ÁI, Kopp A, Zöldi M, Bánlaki Z1, Uzonyi B, Hebecker M, Caesar JJ, Pickering MC, Daigo K, Hamakubo T, Lea SM, Goicoechea de Jorge E, Józsi M7. Factor H-related protein 5 interacts with pentraxin 3 and the extracellular matrix and modulates complement activation. *J Immunol*. 2015 May 15;194(10):4963-73.
57. D'Aiuto F, Parkar M, Andreou G, Suvan J, Brett PM, Ready D, Tonetti MS. Periodontitis and systemic inflammation: control of the local infection is associated with a reduction in serum inflammatory markers. *J Dent Res*. 2004; 83:156–160.
58. Da Costa TA, Silva MJ, Alves PM, Chica JE, Barcelos EZ, Giani MA, Garlet GP, da Silva JS, Rodrigues Júnior V, Rodrigues DB, Cardoso CR.

Inflammation Biomarkers of Advanced Disease in Nongingival Tissues of Chronic Periodontitis Patients. *Mediators Inflamm.* 2015; 2015: 983782.

59. Daigo K, Nakakido M, Ohashi R, Fukuda R, Matsubara K, Minami T, Yamaguchi N, Inoue K, Jiang S, Naito M, Tsumoto K, Hamakubo T. Protective effect of the long pentraxin PTX3 against histone-mediated endothelial cell cytotoxicity in sepsis. *Sci Signal.* 2014 Sep 16;7(343):ra88.
60. Dapunt U¹, Maurer S², Giese T², Gaida MM³, Hänsch GM².: The macrophage inflammatory proteins MIP1 α (CCL3) and MIP2 α (CXCL2) in implant-associated osteomyelitis: linking inflammation to bone degradation. *Mediators Inflamm.* 2014;2014:728619.
61. Darveau RP.: Periodontitis: a polymicrobial disruption of host homeostasis. *Nat Rev Microbiol.* 2010 Jul;8(7):481-90.
62. Dasgupta SK, Le A, Chavakis T, Rumbaut RE, Thiagarajan P. Developmental endothelial locus-1 (Del-1) mediates clearance of platelet microparticles by the endothelium. *Circulation.* 2012;125(13):1664–1672.
63. Davignon D, Martz E, Reynolds T, Kürzinger K, Springer TA: Lymphocyte function-associated antigen 1 (LFA-1): a surface antigen distinct from Lyt-2,3 that participates in T lymphocyte-mediated killing. *Proc. Natl. Acad. Sci. 1981 U.S.A.* 78 (7): 4535–9.
64. Deas DE, Mackey SA, McDonnell HT. Systemic disease and periodontitis: manifestations of neutrophil dysfunction. *Periodontol 2000* 2003; 32: 82–104.
65. Deban L, Jarva H, Lehtinen MJ, Bottazzi B, Bastone A, Doni A, Jokiranta TS, Mantovani A, Meri S. Binding of the long pentraxin PTX3 to factor H: interacting domains and function in the regulation of complement activation. *J Immunol.* 2008 Dec; 181(12):8433-40.
66. Deban L, Russo RC, Sironi M, Moalli F, Scanziani M, Zambelli V, Cuccovillo I, Bastone A, Gobbi M, Valentino S, Doni A, Garlanda C, Danese S, Salvatori G, Sassano M, Evangelista V, Rossi B, Zenaro E, Constantin G, Laudanna C,

- Bottazzi B, Mantovani A.: Regulation of leukocyte recruitment by the long pentraxin PTX3. *Nat Immunol.* 2010 Apr;11(4):328-34.
67. Delima AJ, Van Dyke TE. Origin and function of the cellular components in gingival crevice fluid. *Periodontol 2000* 2003; 31: 55–76.
68. Derveaux S, Vandesompele J, Hellemans J. How to do successful gene expression analysis using real-time PCR. *Methods.* 2010;50(4):227–30.
69. Dewhirst FE, Chen T, Izard J, Paster BJ, Tanner AC, Yu WH, Lakshmanan A, Wade WG. The human oral microbiome. *J Bacteriol* 2010; 192: 5002–5017.
70. Di Stefano A, Capelli A, Lusuardi M, et al.: Severity of airflow limitation is associated with severity of airway inflammation in smokers. *Am J Respir Crit Care Med.* 1998;158(4):1277–1285.
71. Dias AA, Goodman AR, Dos Santos JL, Gomes RN, Altmeyer A, Bozza PT, et al.: TSG-14 transgenic mice have improved survival to endotoxemia and to CLP-induced sepsis. *J Leukoc Biol.* 2001;69(6):928–36.
72. Diniz SN, Nomizo R, Cisalpino PS, Teixeira MM, Brown GD, Mantovani A, Gordon S, Reis LF, Dias AA: PTX3 function as an opsonin for the dectin-1-dependent internalization of zymosan by macrophages. *J. Leukoc. Biol.* 2004, 75 (4): 649–56.
73. Doni A, Michela M, Bottazzi B, Peri G, Valentino S, Polentarutti N, Garlanda C, Mantovani A.: Regulation of PTX3, a key component of humoral innate immunity in human dendritic cells: stimulation by IL-10 and inhibition by IFN- γ . *Journal of Leukocyte Biology* 2006, vol. 79, no. 4, pp. 797–802.
74. Doni A, Musso T, Morone D, Bastone A, Zambelli V, Sironi M, et al.: An acidic microenvironment sets the humoral pattern recognition molecule PTX3 in a tissue repair mode. *J Exp Med.* 2015; 212(6):905–25.
75. Duarte, P. M., da Rocha, M., Sampaio, E., Mestnik, M. J., Feres, M., Figueiredo, L. C., Bastos, M. F. and Faveri, M. (2010): Serum levels of cytokines in subjects with generalized chronic and aggressive periodontitis before and after non-surgical periodontal therapy: a pilot study. *J. Periodontol.* 81, 1056-1063.

76. Dunne, J. L., C. M. Ballantyne, A. L. Beaudet, and K. Ley. Control of leukocyte rolling velocity in TNF- α -induced inflammation by LFA-1 and Mac-1. *Blood*. 2002; 99: 336–341.
77. Duran-Pinedo AE, Chen T, Teles R, Starr JR, Wang X, Krishnan K, Frias-Lopez J. Community-wide transcriptome of the oral microbiome in subjects with and without periodontitis. *ISME J* 2014; 8: 1659–1672.
78. Dutzan N, Gamonal J, Silva A, Sanz M, Vernal R.: Over-expression of forkhead box P3 and its association with receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand, interleukin (IL) -17, IL-10 and transforming growth factor-beta during the progression of chronic periodontitis. *J Clin Periodontol*. 2009 May;36(5):396-403.
79. Dutzan N, Vernal R, Vaque JP, Garcia-Sesnich J, Hernandez M, Abusleme L, Dezerega A, Gutkind JS, Gamonal J. Interleukin-21 expression and its association with proinflammatory cytokines in untreated chronic periodontitis patients. *J Periodontol* 2012; 83: 948–954.
80. Ebersole JL, Steffen MJ, Gonzalez-Martinez J, Novak MJ. Age and oral disease effects on systemic inflammatory and immune parameters in nonhuman primates. *Clin Vaccine Immunol*. 2008; 15:1067–1075
81. Ebersole JL, Steffen MJ, Reynolds MA, Branch-Mays GL, Dawson DR, Novak KF, Gunsolley JC, Mattison JA, Ingram DK, Novak MJ. Differential gender effects of a reduced-calorie diet on systemic inflammatory and immune parameters in nonhuman primates. *J Periodontal Res*. 2008;Oct;43(5):500-7.
82. Eid AA, Ionescu AA, Nixon LS, et al.: Inflammatory response and body composition in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001;164(8 Pt 1):1414–1418.
83. Eke PI, Dye BA, Wei L, Thornton-Evans GO, Genco RJ, and CDC Periodontal Disease Surveillance Workgroup: Prevalence of periodontitis in adults in the United States: 2009 and 2010. *J Dent Res* 2012; 91(10): 914–20.
84. Eke PI, Dye BA, Wei L, Slade GD, Thornton-Evans GO, Borgnakke WS, Taylor GW, Page RC, Beck JD, Genco RJ. *J Periodontol*. Update on Prevalence of

Periodontitis in Adults in the United States: NHANES 2009 to 2012. 2015 May;86(5):611-22.

85. Eliceiri BP, Klemke R, Strombald S, et al.. Integrin alpha v beta 3 requirement for sustained mitogen-activated protein kinase activity during angiogenesis. *J Cell Biol.* 1998;140: 1255–1263.
86. Emsley J, White HE, O'Hara BP, Oliva G, Srinivasan N, Tickle IJ, Blundell TL, Pepys MB, Wood SP. Structure of pentameric human serum amyloid P component. *Nature.* 1994;367:338–45.
87. Engebreton SP, Lamster IB, Herrera- Abreu M et al.: The influence of interleukin gene polymorphism on expression of interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha in periodontal tissue and gingival crevicular fluid. *J Periodontol* 1999;70:567–573.
88. Epstein, Y. F. Zhou, and J. Zhu, "Potential role of cytomegalovirus in the pathogenesis of restenosis and atherosclerosis," *The American Heart Journal*, vol.138,no.5,pp. S476–S478, 1999.
89. Eskan MA, Jotwani R, Abe T, Chmelar J, Lim JH, Liang S, Ciero PA, Krauss JL, Li F, Rauner M, Hofbauer LC, Choi EY, Chung KJ, Hashim A, Curtis MA, Chavakis T, Hajishengallis G.: The leukocyte integrin antagonist Del-1 inhibits IL-17-mediated inflammatory bone loss. *Nat Immunol.* 2012; Mar 25;13(5):465-73
90. Fagerholm S, Morrice N, Gahmberg CG, et al.: Phosphorylation of the cytoplasmic domain of the integrin CD18 chain by protein kinase C isoforms in leukocytes. *J Biol Chem* 2002; 277: 1728–1738.
91. Fagerholm SC, Hilden TJ, Gahmberg CG. P marks the spot: site-specific integrin phosphorylation regulates molecular interactions. *Trends Biochem Sci* 2004; 29: 504–512.
92. Fagerholm SC, Hilden TJ, Nurmi SM, Gahmberg CG: Specific integrin alpha and beta chain phosphorylations regulate LFA-1 activation through affinity-dependent and -independent mechanisms. *J Cell Biol* 2005; 171: 705–715.

93. Familian A, Zwart B, Huisman HG, Rensink I, Roem D, Hordijk PL, Aarden LA, Hack CE: Chromatin-independent binding of serum amyloid P component to apoptotic cells. *J. Immunol.* 2001, 167(2): 647–54
94. Fan Y, Zhu W, Yang M, et al.: Del-1 gene transfer induces cerebral angiogenesis in mice. *Brain Res* 2008; 1219: 1–7.
95. Fenoglio D, Poggi A, Catellani S, Battaglia F, Ferrera A, Setti M, Murdaca G, Zocchi MR.: V δ 1 T lymphocytes producing IFN- γ and IL-17 are expanded in HIV-1-infected patients and respond to *Candida albicans*. *Blood* 2009, 113, 6611–6618
96. Finn NA¹, Eapen D, Manocha P, Al Kassem H, Lassegue B, Ghasemzadeh N, Quyyumi A, Searles CD.: Coronary heart disease alters intercellular communication by modifying microparticle-mediated microRNA transport. *FEBS Lett.* 2013 Nov 1;587(21):3456-63. doi: 10.1016/j.febslet.2013.08.034. Epub 2013 Sep 13.
97. Finoti LS¹, Nepomuceno R, Pigossi SC, Corbi SC, Secolin R, Scarel-Caminaga RM. Association between interleukin-8 levels and chronic periodontal disease: A PRISMA-compliant systematic review and meta-analysis. *Medicine (Baltimore)*. 2017 Jun;96(22):e6932.
98. Fleige S, Pfaffl MW. RNA integrity and the effect on the real-time qRT-PCR performance. *Mol Aspects Med.* 2006 Apr-Jun;27(2-3):126-39.
99. Fokkema SJ, Timmerman MF, van der Weijden FA, Wolffe GN, Renggli HH. A possible association of alpha1-antitrypsin deficiency with the periodontal condition in adults. *J Clin Periodontol.* 1998;25(8): 617–623.
100. Fournier BM, Parkos CA. The role of neutrophils during intestinal inflammation. *Mucosal Immunol* 2012;5:354–366.
101. Frias-Lopez J, Duran-Pinedo A.: Effect of periodontal pathogens on the metatranscriptome of a healthy multispecies biofilm model. *J Bacteriol.* 2012; 194:2082–2095.

102. Fu QY, Zhang L, Duan L, Qian SY, Pang HX.: Correlation of chronic periodontitis in tropical area and IFN- γ , IL-10, IL-17 levels. *Asian Pac J Trop Med.* 2013 Jun; 6(6):489-92.
103. Fujita Y, Ito H, Sekino S, Numabe Y.: Correlations between pentraxin 3 or cytokine levels in gingival crevicular fluid and clinical parameters of chronic periodontitis. *Odontology.* 2012 Jul;100(2):215-21.
104. Gaffen SL, Hajishengallis G. A new inflammatory cytokine on the block: re-thinking periodontal disease and the Th1/Th2 paradigm in the context of Th17 cells and IL-17. *J Dent Res.* 2008; 87:817–828
105. Gaffen SL.: Structure and signalling in the IL-17 receptor family. *Nat Rev Immunol.* 2009 Aug;9(8):556-67.
106. Galbraith GM, Hendley TM, Sanders JJ, Palesch Y, Pandey JP.: Polymorphic cytokine genotypes as markers of disease severity in adult periodontitis. *J Clin Periodontol.* 1998 Oct;25(10):781-5.
107. Gamble E, Grootendorst DC, Hattotuwa K, et al.: Airway mucosal inflammation in COPD is similar in smokers and ex-smokers: a pooled analysis. *Eur Respir J.* 2007;30(3):467–471.
108. Garlanda C, Bottazzi B, Bastone A, Mantovani A: Pentraxins at the crossroads between innate immunity, inflammation, matrix deposition, and female fertility. *Annu. Rev. Immunol.* 2005; 23: 337–66.
109. Garlanda C, Hirsch E, Bozza S, Salustri A, De Acetis M, Nota R, Maccagno A, Riva F, Bottazzi B, Peri G, Doni A, Vago L, Botto M, De Santis R, Carminati P, Siracusa G, Altruda F, Vecchi A, Romani L, Mantovani A. Non-redundant role of the long pentraxin PTX3 in anti-fungal innate immune response. *Nature.* 2002 Nov 14;420(6912):182-186.
110. Garlanda C, Jaillon S, Doni A, Bottazzi B, Mantovani A. PTX3, a humoral pattern recognition molecule at the interface between microbe and matrix recognition. *Curr Opin Immunol.* 2016 Feb;38:39-44.

111. Gemmell E¹, Carter CL, Seymour GJ.: Chemokines in human periodontal disease tissues. *Clin Exp Immunol.* 2001 Jul;125(1):134-41.
112. Germer M, Kanse SM, Kirkegaard T, et al.: Kinetic analysis of integrin-dependent cell adhesion on vitronectin: the inhibitory potential of plasminogen activator inhibitor-1 and RGD peptide. *Eur J Biochem.* 1998;253:669 – 674.
113. Gershov D, Kim S, Brot N, Elkon KB: C-Reactive Protein Binds to Apoptotic Cells, Protects the Cells from Assembly of the Terminal Complement Components, and Sustains an Antiinflammatory Innate Immune Response: Implications for Systemic Autoimmunity. *J. Exp. Med.* 2000. 192 (9): 1353–64
114. Gleeson K, Egli DF, Maxwell SL. Quantitative aspiration during sleep in normal subjects. *Chest.*1997;111(5):1266–1272.
115. Goldfinger LE, Han J, Kiosses WB, Howe AK, Ginsberg MH. 2003. Spatial restriction of $\alpha 4$ integrin phosphorylation regulates lamellipodial stability and $\alpha 4\beta 1$ -dependent cell migration. *J. Cell Biol.* 2003; 62:731–41
116. Goodman A. R.,D. E. Levy, L. F. L. Reis, and J. Vilcek: Differential regulation of TSG-14 expression in murine fibroblasts and peritoneal macrophages. *Journal of Leukocyte Biology* 2000, vol. 67, no. 3, pp. 387–395
117. Gore EA, Sanders JJ, Pandey JP, Palesch Y, Galbraith GM. Interleukin-1 β +3953 allele 2: association with disease status in adult periodontitis. *J Clin Periodontol* 1998; 25:781–785.
118. Gore EA1, Sanders JJ, Pandey JP, Palesch Y, Galbraith GM.: Interleukin-1 β +3953 allele 2: association with disease status in adult periodontitis. *J Clin Periodontol.* 1999 Nov;26(11):705-9.
119. Goris A, Sawcer S, Vandebroeck K, Carton H, Billiau A, Setakis E, et al.: New candidate loci for multiple sclerosis susceptibility revealed by a whole genome association screen in a Belgian population. *J Neuroimmunol.* 2003; 143(1-2):65–69.
120. Gorski, D.H., Walsh, K.. The role of homeobox genes in vascular remodeling and angiogenesis. *Circ Res.* 2000; 87, 865–872.

121. Gout E, Moriscot C, Doni A, Dumestre-Pérard C, Lacroix M, Pérard J, Schoehn G, Mantovani A, Arlaud GJ, Thielens NM. M-ficolin interacts with the long pentraxin PTX3: a novel case of cross-talk between soluble pattern-recognition molecules. *J Immunol.* 2011 May 15; 186(10):5815-22.
122. Graves DT, Fine D, Teng YT, Van Dyke TE, Hajishengallis G. The use of rodent models to investigate host-bacteria interactions related to periodontal diseases. *J. Clin. Periodontol.* 2008. 35, 89–105
123. Graves DT, Kang J, Andriankaja O, Wada K, Rossa C Jr.: Animal models to study host-bacteria interactions involved in periodontitis. *Front Oral Biol.* 2012;15:117-32.
124. Gu Y, Hu X, Liu C, Qv X, Xu C.: Interleukin (IL)-17 promotes macrophages to produce IL-8, IL-6 and tumour necrosis factor-alpha in aplastic anaemia. *Br J Haematol.* 2008 Jul;142(1):109-14.
125. Gustin C., E. Delaive, M. Dieu, D. Calay, and M. Raes: Upregulation of pentraxin-3 in human endothelial cells after lysophosphatidic acid exposure. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 2008. 28(3): 491–497
126. Haffajee AD, Socransky SS, Smith C, Dibart S. Relation of baseline microbial parameters to future periodontal attachment loss. *J Clin Periodontol.* 1991 Nov; 18(10):744-50.
127. Hajishengallis and G. Hajishengallis, neutrophil homeostasis and periodontal health in children and Adults, *J Dent Res.* 2014; 93(3):231-237
128. Hajishengallis G, Abe T, Maekawa T, Hajishengallis E, Lambris JD.: Role of complement in host-microbe homeostasis of the periodontium. *Semin Immunol.* 2013 Feb;25(1):65-72.
129. Hajishengallis G, Chavakis T. Endogenous modulators of inflammatory cell recruitment. *Trends Immunol* 2013; 34: 1–6.

130. Hajishengallis G, Korostoff JM.: Revisiting the Page & Schroeder model: the good, the bad and the unknowns in the periodontal host response 40 years later. *Periodontol 2000*. 2017 Oct;75(1):116-151
131. Hajishengallis G, Lamont RJ. Beyond the red complex and into more complexity: The Polymicrobial Synergy and Dysbiosis (PSD) model of periodontal disease etiology. *Mol Oral Microbiol*. 2012; 27:409–419.
132. Hajishengallis G, Lamont RJ. Breaking bad: Manipulation of the host response by *Porphyromonas gingivalis*. *Eur J Immunol*. 2014; 44:328–338.
133. Hajishengallis G, Liang S, Payne MA, Hashim A, Jotwani R, Eskan MA, McIntosh ML, Alsam A, Kirkwood KL, Lambris JD, Darveau RP, Curtis MA. Low-abundance biofilm species orchestrates inflammatory periodontal disease through the commensal microbiota and complement. *Cell Host Microbe* 2011; 10: 497–506.
134. Hajishengallis G, Sahingur SE. Novel inflammatory pathways in periodontitis. *Adv Dent Res*. 2014 May;26(1):23-9
135. Hajishengallis, G., Moutsopoulos, N.M., Hajishengallis, E. & Chavakis, T. (2016). Immune and regulatory functions of neutrophils in inflammatory bone loss. *Seminars in Immunology*, 28(2),146-158.
136. Hamp SE, Nyman S, Lindhe J.: Periodontal treatment of multirooted teeth. Results after 5 years. *J Clin Periodontol*. 1975 Aug;2(3):126-35.
137. Hanna S, Etzioni A. Leukocyte adhesion deficiencies. *Ann N Y Acad Sci* 2012; 1250: 50–55.
138. Hasturk, H., Kantarci, A. & Van Dyke, T. E. Paradigm shift in the pharmacological management of periodontal diseases. *Front. Oral Biol*. 2012; 15, 160–176.
139. He Z, Chen Y, Chen P, Wu G, Cai S. Local inflammation occurs before systemic inflammation in patients with COPD. *Respirology*.2010; Apr;15(3):478-84.

140. Hemdan NY, Birkenmeier G, Wichmann G, Abu El-Saad AM, Krieger T, Conrad K, Sack U. Interleukin-17-producing T helper cells in autoimmunity. *Autoimmun Rev.* 2010 Sep;9(11):785-92.
141. Hemmerle, J. & Frank, R. M. Bacterial invasion of periodontal tissues after experimental immunosuppression in rats. *J. Biol. Buccale* 1991. 19, 271–282
142. Hibbs ML, Jakes S, Stacker SA, et al.: The cytoplasmic domain of the integrin lymphocyte functionassociated antigen 1 beta subunit: sites required for binding to intercellular adhesion molecule 1 and the phorbol ester-stimulated phosphorylation site. *J Exp Med* 1991; 174: 1227–1238.
143. Hidai C, Kawana M, Kitano H, Kokubun S.: Discoidin domain of Del1 protein contributes to its deposition in the extracellular matrix. *Cell Tissue Res.* 2007 Oct;330(1):83-95.
144. Hidai C, Zupancic T, Penta K, Mikhail A, Kawana M, Quertermous EE, Aoka Y, Fukagawa M, Matsui Y, Platika D, Auerbach R, Hogan BL, Snodgrass R, Quertermous T: Cloning and characterization of developmental endothelial locus-1: an embryonic endothelial cell protein that binds the alphavbeta3 integrin receptor. *Genes Dev* 12;21-33, 1998
145. Higashimoto Y, Iwata T, Okada M, Satoh H, Fukuda K, Tohda Y. Serum biomarkers as predictors of lung function decline in chronic obstructive pulmonary disease. *Respir Med.* 2009;103(8):1231–1238.15(3):478–484.
146. Hilden TJ, Valmu L, Karkkainen S, Gahmberg CG: Threonine phosphorylation sites in the beta 2 and beta 7 leukocyte integrin polypeptides. *J Immunol* 2003; 170: 4170–4177.
147. Ho HK, Jang JJ, Kaji S, Spektor G, Fong A, Yang P, Hu BS, Schatzman R, Quertermous T, Cooke JP: Developmental endothelial locus-1 (Del-1), a novel angiogenic protein: its role in ischemia. *Circulation* 2004; 109: 1314–1319.

148. Hosokawa Y¹, Hosokawa I, Ozaki K, Nakanishi T, Nakae H, Matsuo T.: Catechins inhibit CCL20 production in IL-17A-stimulated human gingival fibroblasts. *Cell Physiol Biochem*. 2009;24(5-6):391-6.
149. Hsu Gloria, M.D., Jonathan A. Mathy, M.D., Zhen Wang, M.D., Wei Xia, M.D., Gordon Sakamoto, M.D., Ramendra Kundu, Ph.D., Michael T. Longaker, M.D., M.B.A., Thomas Quertermous, M.D., and George P. Yang, M.D., Ph.D. Increased Rate of Hair Regrowth in Mice with Constitutive Overexpression of Del1 *Journal of Surgical Research*. 2008; 146, 73–80.
150. Hynes RO. Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell*. 1992;69: 11–25.
151. Imhof BA, Aurrand-Lions M. Adhesion mechanisms regulating the migration of monocytes. *Nat Rev Immunol* 2004; 4: 432–444.
152. Isailovic N, Daigo K, Mantovani A, Selmi C. Interleukin-17 and innate immunity in infections and chronic inflammation. *J Autoimmun*. 2015 Jun;60:1-11.
153. Ito Y, Usui T, Kobayashi S, Iguchi-Hashimoto M, Ito H, Yoshitomi H, Nakamura T, Shimizu M, Kawabata D, Yukawa N, Hashimoto M, Sakaguchi N, Sakaguchi S, Yoshifiji H, Nojima T, Ohmura K, Fujii T, Mimori T: $\gamma\delta$ T cells are the predominant source of interleukin-17 in affected joints in collagen-induced arthritis, but not in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2009. 60, 2294–2303
154. Iwakura Y, et al.: Functional specialization of interleukin-17 family members. *Immunity*. 2011; 34:149–162.
155. Jaillon S, Peri G, Delneste Y, Frémaux I, Doni A, Moalli F, Garlanda C, Romani L, Gascan H, Bellocchio S, Bozza S, Cassatella MA, Jeannin P, Mantovani A. The humoral pattern recognition receptor PTX3 is stored in neutrophil granules and localizes in extracellular traps. *J Exp Med*. 2000, 204(4):793–804.
156. Jeannin P, Bottazzi B, Sironi M, Doni A, Rusnati M, Presta M, Maina Jeannin P, Jaillon S, Delneste Y. Pattern recognition receptors Jeannin P1, Bottazzi B, Sironi M, Doni A, Rusnati M, Presta M, Maina V, Magistrelli G, Haeuw

- JF, Hoeffel G, Thieblemont N, Corvaia N, Garlanda C, Delneste Y, Mantovani A. Complexity and complementarity of outer membrane protein A recognition by cellular and humoral innate immunity receptors. *Immunity*. 2005 May;22(5):551-60.
157. Johnson RB, Wood N, Serio FG.: Interleukin-11 and IL-17 and the pathogenesis of periodontal disease. *J Periodontol* 2004, 75:37-43.
158. Jovanovic DV, Di Battista JA, Martel-Pelletier J, Jolicoeur FC, He Y, Zhang M, Mineau F, Pelletier JP.: IL-17 stimulates the production and expression of proinflammatory cytokines, IL-beta and TNF-alpha, by human macrophages. *J Immunol*. 1998 Apr 1;160(7):3513-21.
159. Kachlany, S.C.; Schwartz, A.B.; Balashova, N.V.; Hioe, C.E.; Tuen, M.; Le, A.; Kaur, M.; Mei, Y.; Rao, J.: Anti-leukemia activity of a bacterial toxin with natural specificity for LFA-1 on white blood cells. *Leukemia Res*. 2010, 34, 777–785.
160. Kakino A, Fujita Y, Nakano A, Horiuchi S, Sawamura T.: Developmental Endothelial Locus-1 (Del-1) Inhibits Oxidized Low-Density Lipoprotein Activity by Direct Binding, and Its Overexpression Attenuates Atherogenesis in Mice. *Circ J*. 2016 Nov 25;80(12):2541-2549.
161. Kanczkowski W, Chatzigeorgiou A, Grossklaus S, Sprott D, Bornstein SR, Chavakis T. Role of the endothelial-derived endogenous anti-inflammatory factor Del-1 in inflammation-mediated adrenal gland dysfunction. *Endocrinology*. 2013; 154:1181–1189.
162. Kang YY, Kim DY, Lee SH, Choi EY: Deficiency of developmental endothelial locus-1 (Del-1) aggravates bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. *Biochem Biophys Res Commun*. 2014; 445:369–374
163. Kanzaki H, Chiba M, Shimizu Y, Mitani H. Dual regulation of osteoclast differentiation by periodontal ligament cells through RANKL stimulation and OPG inhibition. *J Dent Res* 2001; 80: 887–891.

164. Karadag F, Karul AB, Cildag O, Yilmaz M, Ozcan H. Biomarkers of systemic inflammation in stable and exacerbation phases of COPD. *Lung.* 2008;186(6):403–409.
165. Kasuya, E. (2001). Mann-Whitney U test when variances are unequal. *Animal Behavior*, 61, 1247-1249. All Souls College.
166. Katsuragi K, Takashiba S, Kurihara H, Murayama Y.: Molecular basis of leukocyte adhesion molecules in early-onset periodontitis patients with decreased CD11/CD18 expression on leukocytes. *J Periodontol* 1994, 65:949-57.
167. Kawanokuchi, J., Shimizu, K., Nitta, A., Yamada, K., Mizuno, T., Takeuchi, H. and Suzumura, A.: Production and functions of IL-17 in microglia. *J. Neuroimmunol.* 2008, 194, 54-61.
168. Keiper T, Santoso S, Nawroth PP, Orlova V, Chavakis T.: The role of junctional adhesion molecules in cell-cell interactions. *Histol Histopathol* 2005; 20: 197–203.
169. Kennedy R, Lappin DF, Dixon PM, Bennett D, Riggio MP. Gingival Toll-like receptor and cytokine messenger RNA levels in equine periodontitis and oral health. *Equine Vet J.* 2017 May;49(3):294-299.
170. Khader SA, Gaffen SL, Kolls JK: Th17 cells at the crossroads of innate and adaptive immunity against infectious diseases at the mucosa. *Mucosal Immunol* 2009, 2:403-411.
171. Khlgatian M, Nassar H, Chou HH, Gibson FC 3rd, Genco CA. Fimbria-dependent activation of cell adhesion molecule expression in *Porphyromonas gingivalis*-infected endothelial cells. *Infect Immun.* 2002; 70(1):257–267.
172. Kinane DF, Lowe GD. How periodontal disease may contribute to cardiovascular disease. *Periodontol 2000* 2000;23:121–126.
173. Kinashi T. Intracellular signalling controlling integrin activation in lymphocytes: *Nat Rev Immunol* 2005; 5: 546–559.

174. Kinashi, T., Aker M, Sokolovsky-Eisenberg M, Grabovsky V, Tanaka C, Shamri R, Feigelson S, Etzioni A, Alon R. LAD-III, a leukocyte adhesion deficiency syndrome associated with defective Rap1 activation and impaired stabilization of integrin bonds. *Blood* 2004, 103, 1033–1036
175. Kishimoto TK, Hollander N, Roberts TM, Anderson DC, Springer TA.: Heterogeneous mutations in the beta subunit common to the LFA-1, Mac-1, and p150,95 glycoproteins cause leukocyte adhesion deficiency. *Cell* 1987;50:193-202.
176. Kobayashi SD, DeLeo. Role of neutrophils in innate immunity: a systems biology-level approach. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med.* 2009;1:309-333.
177. Kolaczkowska E, Kubes P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat Rev Immunol.* 2013;13:159-175.
178. Kown, M.H., Suzuki, T., Koransky, M.L., Penta, K., Sakamoto, G., Jahncke, C.L., Carter, A.J., Quertermous, T., Robbins, R.C. Comparison of developmental endothelial locus-1 angiogenic factor with vascular endothelial growth factor in a porcine model of cardiac ischemia. *Ann Thorac Surg.* 2003; 76, 1246–1251.
179. Kraig, E.; Dailey, T.; Kolodrubetz, D. Nucleotide sequence of the leukotoxin gene from *Actinobacillus actinomycetemcomitans*: homology to the alpha-hemolysin/leukotoxin gene family. *Infect. Immun.* 1990, 58, 920–929.
180. Kreuzer, A. Bohn, J. Lupberger, J. Solassol, P. le Coutre, and C.A. Schmidt, 2001. Simultaneous absolute quantification of target and control templates by real-time fluorescence reverse transcription-PCR using 4-(4'-dimethylaminophenylazo) benzoic acid as a dark quencher dye. *Clin. Chem.* 47:486-490
181. Kuwano Y¹, Spelten O, Zhang H, Ley K, Zarbock A.: Rolling on E- or P-selectin induces the extended but not high-affinity conformation of LFA-1 in neutrophils. *Blood.* 2010 Jul 29;116(4):617-24. doi: 10.1182/blood-2010-01-266122. Epub 2010 May 5.

182. Laine ML, et al.: Genetic susceptibility to periodontitis. *Periodontol 2000*. 2012; 58:37–68.
183. Lakshmanan R, Jayakumar ND, Sankari M, Padmalatha O, Varghese S.: Estimation of Pentraxin-3 Levels in the Gingival Tissues of Chronic And Aggressive Periodontitis Participants-An in vivo Study. *J Periodontol*. 2014 Feb;85(2):290-7
184. Lally, E.T.; Hill, R.B.; Kieba, I.R.; Korostoff, J. The interaction between RTX toxins and target cells. *Trends Microbiol*. 1999, 7, 356–361.
185. Lamont RJ, Hajishengallis G.: Polymicrobial synergy and dysbiosis in inflammatory disease. *Trends Mol Med*. 2015 Mar;21(3):172-83.
186. Lamster IB, Ahlo JK. Analysis of gingival crevicular fluid as applied to the diagnosis of oral and systemic diseases. *Ann N Y Acad Sci*. 2007; 1098:216–229
187. Landers, J.: Quantification in History, Topic 4 : Hypothesis Testing II- Differing Central Tendency . Oxford. 1981; 1388–1392. *Intuitive Biostatistics*, Oxford University Press, 1995.
188. Landzberg M, Doering H, Aboodi GM, Tenenbaum HC, Glogauer M. Quantifying oral inflammatory load: oral neutrophil counts in periodontal health and disease. *J Periodontal Res* 2015; 50: 330–336.
189. Larionov A, Krause A, Miller W. A standard curve based method for relative real time PCR data processing. *BMC Bioinformatics*. 2005 Mar 21;6:62.
190. Leali D, Inforzato A, Ronca R, Bianchi R, Belleri M, Coltrini D, et al.: Long pentraxin3/tumor necrosis factor-stimulated gene-6 interaction: a biological rheostat for fibroblast growth factor 2-mediated angiogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2012; 32(3):696-703.
191. Lester SR, Bain JL, Johnson RB, Serio FG. Gingival concentrations of interleukin-23 and -17 at healthy sites and at sites of clinical attachment loss. *J Periodontol* 2007; 78: 1545–1550.

192. Ley K, Laudanna C, Cybulsky MI, Nourshargh S. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat. Rev. Immunol.* 2007;7:678–89
193. Li Q, Ding S, Wang YM, Xu X, Shen Z, Fu R, Liu M, Hu C, Zhang C, Cao Q, Wang Y: Age-associated alteration in Th17 cell response is related to endothelial cell senescence and atherosclerotic cerebral infarction. *Am J Transl Res.* 2017 Nov 15;9(11):5160-5168.
194. Liang S, Hosur KB, Domon H, Hajishengallis G.: Periodontal inflammation and bone loss in aged mice. *J Periodontal Res.* 2010 Aug; 45(4):574-8.
195. Liao C, Zhang C, Yang Y. Pivotal roles of Interleukin-17 as the Epicenter of Bone Loss Diseases. *Curr Pharm Des.* 2017 May 19.
196. Libby, P. M. Ridker, Maseri, “ Inflammation and atherosclerosis,” *Circulation*, vol.105,no.9,pp.1135–1143,2002.
197. Lin J, Bi L, Yu X, Kawai T, Taubman MA, Shen B, Han X.: Porphyromonas gingivalis exacerbates ligature-induced, RANKL-dependent alveolar bone resorption via differential regulation of Toll-like receptor 2 (TLR2) and TLR4. *Infect Immun.* 2014 Oct;82(10):4127-34. doi: 10.1128/IAI.02084-14
198. Lin, J.-X. Bei, M. Shen, Q. Li, Z. Liao, Y. Zhang, Q. Lv, Q. Wei, H.-Q. Low, Y.-M. Guo, S. Cao, M. Yang, Z. Hu, M. Xu, X. Wang, Y. Wei, L. Li, C. Li, T. Li, J. Huang, Y. Pan, O. Jin, Y. Wu, J. Wu, Z. Guo, P. He, S. Hu, H. Wu, H. Song, F. Zhan, S. Liu, G. Gao, Z. Liu, Y. Li, C. Xiao, J. Li, Z. Ye, W. He, D. Liu, L. Shen, A. Huang, H. Wu, Y. Tao, X. Pan, B. Yu, E. S. Tai, Y.-X. Zeng, E. C. Ren, Y. Shen, J. Liu, J. Gu, A genome-wide association study in Han Chinese identifies new susceptibility loci for ankylosing spondylitis. *Nat. Genet.* 2012; 44: 73–77
199. Liu S, Kiosses WB, Rose DM, Slepak M, Salgia R. A fragment of paxillin binds the a4 integrin cytoplasmic domain (tail) and selectively inhibits a4-mediated cell migration. *J. Biol. Chem.* 2002; 277:20887–94

200. Lockhart E¹, Green AM, Flynn JL.: IL-17 production is dominated by gammadelta T cells rather than CD4 T cells during *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J Immunol.* 2006 Oct 1;177(7):4662-9.
201. Louhelainen N, Rytila P, Haahtela T, Kinnula VL, Djukanovic R. Persistence of oxidant and protease burden in the airways after smoking cessation. 2009; 9:25.
202. Lowe, B., H.A. Avila, F.R. Bloom, M. Gleeson, and W. Kusser. 2003. Quantitation of gene expression in neural precursors by reverse-transcription polymerase chain reaction using self-quenched, fluorogenic primers. *Anal. Biochem.* 315:95-105.
203. Luster AD, Alon R, von Andrian UH. Immune cell migration in inflammation: present and future therapeutic targets. *Nat Immunol* 2005; 6: 1182–1190.
204. Ma Y, Malbon CC, Williams DL, Thorngate FE. Altered gene expression in early atherosclerosis is blocked by low level apolipoprotein E. *PLoS One.* 2008 Jun 18;3(6):e2503
205. Ma YJ, Doni A, Hummelshøj T, Honoré C, Bastone A, Mantovani A, Thielens NM, Garred P. Synergy between ficolin-2 and pentraxin 3 boosts innate immune recognition and complement deposition. *J Biol Chem.* 2009 Oct 9;284(41):28263-75.
206. Ma YJ, Doni A, Skjoedt MO, Honoré C, Arendrup M, Mantovani A, Garred P. Heterocomplexes of mannose-binding lectin and the pentraxins PTX3 or serum amyloid P component trigger cross-activation of the complement system. *J Biol Chem.* 2011 Feb 4;286(5):3405-17.
207. Maekawa T, Briones RA, Resuello RR, Tuplano JV, Hajishengallis E, Kajikawa T, Koutsogiannaki S, Garcia CA, Ricklin D, Lambris JD, Hajishengallis G. Inhibition of preexisting natural periodontitis in non-human primates by a locally administered peptide inhibitor of complement C3. *J Clin Periodontol* 2016; 43: 238–249.

208. Maekawa T, Hajishengallis G. Topical treatment with probiotic *Lactobacillus brevis* CD2 inhibits experimental periodontal inflammation and bone loss. *J Periodontal Res* 2014; 49: 785–791.
209. Maina V., Coten a A, Doni A, Nebuloni M, Pasqualini F, Milner CM, Day AJ, Mantovani A, Garlanda C. : Coregulation in human leukocytes of the long pentraxin PTX3 and TSG-6. *Journal of Leukocyte Biology* 2009, 86 (1):123–132,
210. Mantovani A, Garlanda C, Bottazzi B.: Pentraxin 3, a nonredundant soluble pattern recognition receptor involved in innate immunity. *Vaccine*. 2003, 21 (2):43–7.
211. Mantovani A, Valentino S, Gentile S, Inforzato A, Bottazzi B, Garlanda C. The long pentraxin PTX3: a paradigm for humoral pattern recognition molecules. *Ann N Y Acad Sci*. 2013 May; 1285:1-14.
212. Mayadas TN, Cullere X, Lowell CA. The multifaceted functions of neutrophils. *Annu Rev Pathol* 2014; 9: 181–218.
213. Meng H, Xu L, Li Q, Han J, Zhao Y. Determinants of host susceptibility in aggressive periodontitis. *Periodontol 2000*. 2007; 43:133–59.
214. Meng, F., Wang, K., Aoyama, T., Grivennikov, S. I., Paik, Y., Scholten, D., Cong, M., Iwaisako, K., Liu, X., Zhang, M., Osterreicher, C. H., Stickel, F., Ley, K., Brenner, D. A. and Kisseeleva, T.: Interleukin-17 signaling in inflammatory, Kupffer cells, and hepatic stellate cells exacerbates liver fibrosis in mice. *Gastroenterology* 2012, 143, 765-776.
215. Michel ML, Keller AC, Paget C, Fujio M, Trottein F, Savage PB, Wong CH, Schneider E, Dy M, Leite-de-Moraes MC.: Identification of an IL-17-producing NK1.1(neg) iNKT cell population involved in airway neutrophilia. *J Exp Med*. 2007 May 14;204(5):995-1001.
216. Miossec P, Kolls JK. Targeting IL-17 and TH17 cells in chronic inflammation. *Nat Rev Drug Discov*. 2012; 11:763–776
217. Miossec P, Korn T, Kuchroo VK: Interleukin-17 and type 17 helper T cells. *N. Engl. J. Med.* 2009, 361 (9): 888-98.

218. Mitroulis I., Y.-Y. Kang, C. G. Gahmberg, G. Siegert, G. Hajishengallis, T. Chavakis, E.-Y. Choi, Developmental endothelial locus-1 attenuates complement-dependent phagocytosis through inhibition of Mac-1-integrin. *Thromb. Haemost.* 2014; 111: 781–1006
219. Moreira PR, Costa JE, Gomez RS, Gollob KJ, Dutra WO. TNFA and IL10 gene polymorphisms are not associated with periodontitis in Brazilians. *Open Dent J.* 2009;3(1):184-90.
220. Morova, J.; Osicka, R.; Masin, J.; Sebo, P. RTX cytotoxins recognize beta2 integrin receptors through N-linked oligosaccharides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2008, 105, 5355–5360.
221. Morrison T., Weis,J.J. and Wittwer,C.T.: Quantification of low-copy transcripts by continuous SYBR Green I monitoring during amplification. *Biotechniques.* 1998; 24, 954–962
222. Moutsopoulos NM, Kling HM, Angelov N, Jin W, Palmer RJ, Nares S, Osorio M, Wahl SM. *Porphyromonas gingivalis* promotes Th17 inducing pathways in chronic periodontitis. *J Autoimmun* 2012; 39: 294–303.
223. Moutsopoulos NM, Konkel J, Sarmadi M, Eskan MA, Wild T, Dutzan N, et al. Defective neutrophil recruitment in leukocyte adhesion deficiency type I disease causes local IL-17–driven inflammatory bone loss. *Sci Transl Med.* 2014;6: 229ra240
224. Mueller H, Stadtmann A, Van Aken H, Hirsch E, Wang D, et al.: Tyrosine kinase Btk regulates E-selectin-mediated integrin activation and neutrophil recruitment by controlling phospholipase C (PLC) γ 2andPI3Kpathways. *Blood* 2010; 115:3118–27
225. Muller WA. Leukocyte-endothelial cell interactions in the inflammatory response. *Lab Invest* 2002; 82: 521–533.
226. Nachar.The MannWhitney U: A Test for Assessing Whether Two Independent Samples Come from the Same Distribution13.Tutorials in Quantitative Methods for Psychology 2008, vol. 4(1), p. 13-20.

227. Nakashima T., Takayanagi H.: Osteoimmunology: crosstalk between the immune and bone systems. *Journal of Clinical Immunology* 2009, 29, 555–567.
228. Nauom JJ, Chai H, Lin PH, Yao Q, Lumsden AB, Chen C. Lymphotoxin-alpha and cardiovascular disease: clinic association and pathogenic mechanisms. *Med Sci Monit* 2006;12(7):121–124.
229. Nauta A. J, de Hajj S, Bottazzi B, Mantovani A, Borrias MC, Aten J, Rastaldi MP, Daha MR, van Kooten C, Roos A.: Human renal epithelial cells produce the long pentraxin PTX3. *Kidney Int.* 2005 Feb;67(2):543-53.
230. Nauta AJ, Bottazzi B, Mantovani A, Salvatori G, Kishore U, Schwaeble WJ, Gingras AR, Tzima S, Vivanco F, Egido J, Tijssma O, Hack EC, Daha MR, Roos A.: Biochemical and functional characterization of the interaction between pentraxin 3 and C1q. *Eur. J. Immunol.* 2003, 33 (2): 465–73
231. Navarro E, Serrano-Heras G, Castaño MJ, Solera J.: Real-time PCR detection chemistry. *Clin Chim Acta.* 2015 Jan 15;439:231-50. doi: 10.1016/j.cca.2014.10.017. Epub 2014 Oct 22.
232. Nibali L, Sun C, Akcalı A, Meng X, Tu YK, Donos N. A retrospective study on periodontal disease progression in private practice. *J Clin Periodontol.* 2016 Nov 24.
233. Nolan T, Hands RE, Bustin SA. Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. *Nat Protoc.* 2006; 1(3):1559–82.
234. Norata G. D., P. Marchesi, V. K. Pulakazhi Venu, Pasqualini F, Anselmo A, Moalli F, Pizzitola I, Garlanda C, Mantovani A, Catapano AL.: Deficiency of the long pentraxin ptx3 promotes vascular inflammation and atherosclerosis. *Circulation.* 2009 Aug 25, 120(8): 699-708.
235. Nussbaum G, Shapira L: How has neutrophil research improved our understanding of periodontal pathogenesis? *J Clin Periodontol* 2011; 38(11): 49–59.

236. Ohyama H, Kato-Kogoe N, Kuhara A, Nishimura F, Nakasho K, Yamanegi K, Yamada N, Hata M, Yamane J, Terada N.:The involvement of IL-23 and the Th17 pathway in periodontitis. *J Dent Res.* 2009 Jul, 88(7):633-638.
237. Okui T, Aoki Y, Ito H, Honda T, Yamazaki K.The presence of IL-17+/FOXP3+ double-positive cells in periodontitis. *J Dent Res.* 2012;91(6):574-9
238. Orozco A, Gemmell E, Bickel M, Seymour GJ: Interleukin-1beta, interleukin-12 and interleukin-18 levels in gingival fluid and serum of patients with gingivitis and periodontitis. *Oral Microbiol Immunol.* 2006; 21:256–260
239. Ortega-Hernandez OD, Bassi N, Shoenfeld Y, Anaya JM; The long pentraxin 3 and its role in autoimmunity. *Seminars in arthritis and rheumatism.* 2009; 39(1):38-54.
240. Page RC, Schroeder HE. Pathogenesis of inflammatory periodontal disease. A summary of current work. *Lab Invest* 1976; 34: 235–249.
241. Paller AS, Nanda V, Spates C, O Gorman M. Leukocyte adhesion deficiency: recurrent childhood skin infections. *J Am Acad Dermatol* 1994; 31:316-9
242. Park YD, Kim YS, Jung YM, Lee SI, Lee YM, Bang JB, Kim EC.: *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide regulates interleukin (IL)-17 and IL-23 expression via SIRT1 modulation in human periodontal ligament cells. *Cytokine.* 2012 Oct;60(1):284-93.
243. Passos S. T., Silver JS, O'Hara AC, Sehy D, Stumhofer JS, Hunter CA.: IL-6 promotes NK cell production of IL-17 during toxoplasmosis. *J. Immunol.* 2010, 184, 1776–1783
244. Penta K, Varner JA, Liaw L, et al.et al. Del1 induces integrin signaling and angiogenesis by ligation of alphaVbeta3. *J Biol Chem.* 1999; 274: 11101–11109
245. Pepys M. B. and M. L. Baltz: Acute phase proteins with special reference to C-reactive protein and related proteins (pentaxins) and serum amyloid A protein. *Advances in Immunology* 1983, 34, 141–212

246. Pfaffl Michael Walter: Real-time RT-PCR: Neue Ansätze zur exakten mRNA Quantifizierung. 2004 In: Biospektrum.
247. Pfaffl MW. The ongoing evolution of qPCR. *Methods*. 2010;50(4):215–6.
248. Pfaffl. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*. 2001 May 1;29(9):e45. *Nucleic Acids Res*. 2001 May 1;29(9):e45.
249. Phillipson M, Heit B, Colarusso P, Liu L, Ballantyne CM, Kubes P.: Author information : Intraluminal crawling of neutrophils to emigration sites: a molecularly distinct process from adhesion in the recruitment cascade. *J Exp Med* 2006; 203: 2569–2575.
250. Pihlstrom, B.L., Michalowicz, B.S. and Johnson, N.W.: Periodontal diseases. *Lancet* 2005, 366: 1809–1820.
251. Pilling D, Cox N, Vakil V, Verbeek JS, Gomer RH. The long pentraxin PTX3 promotes fibrocyte differentiation. *PLoS One*. 2015; 10(3) :e0119709.
252. Pinho M, Faria-Almeida R, Azevedo E, Manso MC, MartinsL. Periodontitis and atherosclerosis: an observational study. *Periodontitis and atherosclerosis: an observational study*. *J Periodont Res* 2013; 48: 452–457
253. Pollman, M.J., Naumovski, L., Gibbons, G.H. Endothelial cell apoptosis in capillary network remodeling. *J Cell Physiol*. 1999 ; 178, 359–370.
254. Pradeep AR, Kathariya R, Raghavendra NM, Sharma A.: Levels of pentraxin-3 in gingival crevicular fluid and plasma in periodontal health and disease. *J Periodontol*. 2011 May; 82(5):734-41.
255. Prasanna SJ. Causal relationship between periodontitis and chronic obstructive pulmonary disease. *J Indian Soc Periodontol*.2011; 15(4):359–365.
256. Preshaw PM, Taylor JJ. How has research into cytokine interactions and their role in driving immune responses impacted our understanding of periodontitis? *J Clin Periodontol*.2011;38 (Suppl 11):60–84.

257. Procházková J1, Bártová J, Bílková A, Kruzík P, Krejsa O, Dusková J, Mrklas L., The effect of dental plaque bacteria on LFA-1 beta expression on peripheral blood leukocytes was studied in 20 patients with early-onset periodontitis and in 10 healthy controls. Stimulation of PMN with selected dental plaque bacteria which play a role in the pathogeny of periodontitis significantly increased the expression of LFA-1 beta in the group of patients as compared with the controls, *Folia Microbiol (Praha)*. 1996;41(5):441-3.
258. Ramanan VK, Risacher SL, Nho K, Kim S, Swaminathan S, Shen L., et al.: APOE and BCHE as modulators of cerebral amyloid deposition: a florbetapir PET genome-wide association study. *Mol Psychiatry*. 2013
259. Rao RM, Yang L, Garcia-Cardena G, et al.: Endothelial- dependent mechanisms of leukocyte recruitment to the vascular wall. *Circ Res* 2007; 101: 234–247.
260. Reading PC, Bozza S, Gilbertson B, Tate M, Moretti S, Job ER, Crouch Reading PC, Bozza S, Gilbertson B, Tate M, Moretti S, Job ER, Crouch EC, Brooks AG, Brown LE, Bottazzi B, Romani L, Mantovani A. Antiviral activity of the long chain pentraxin PTX3 against influenza viruses. *J Immunol*. 2008 Mar 1;180(5):3391-8.
261. Rezaee M, Penta K, Quertermous T.: Del1 mediates VSMC adhesion, migration, and proliferation through interaction with integrin alpha(v)beta(3). *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2002 May;282(5):H1924-32.
262. Ribeiro FV, Santos VR, Bastos MF, De Miranda TS, Vieira AR, De Figueiredo LC, Duarte PM.: A preliminary study on the FAM5C expression in generalized chronic periodontitis. *Oral Dis*. 2012 Mar;18(2):147-52.
263. Roos A. Biochemical and functional characterization of the interaction between Pentraxin 3 and C1q. *Eur J Immunol*. 2003; 33:465– 473.
264. Rouvier E, Luciani MF, Mattéi MG, Denizot F, Golstein P. CTLA-8, cloned from an activated T cell, bearing AU-rich messenger RNA instability sequences, and homologous to a herpesvirus saimiri gene. *J Immunol*. 1993 Jun 15;150(12):5445-56.

265. Rovere P, Peri G, Fazzini F, Bottazzi B, Doni A, Bondanza A, Zimmermann VS, Garlanda C, Fascio U, Sabbadini MG, Rugarli C, Mantovani A, Manfredi AA: The long pentraxin PTX3 binds to apoptotic cells and regulates their clearance by antigen-presenting dendritic cells. *Blood* 2000, 96(13): 4300–6
266. Rudolph H, Klopstein A, Gruber I, Blatti C, Lyck R, Engelhardt B. Postarrest stalling rather than crawling favors CD8(+) over CD4(+) T-cell migration across the blood-brain barrier under flow in vitro. *Eur J Immunol.* 2016 Sep;46(9):2187-203.
267. Rufail, H. A. Schenkein, T. E. Koertge et al., "Atherogenic lipoprotein parameters in patients with aggressive periodontitis," *Journal of Periodontal Research*, vol. 42, no. 6, pp. 495–502, 2007.
268. Ryder MI. Comparison of neutrophil functions in aggressive and chronic periodontitis. *Periodontol 2000.* 2010; 53:124–137.
269. Sadallah S, Eken C, Schifferli JA. Ectosomes as immunomodulators. *Semin Immunopathol* 2011; 33: 487– 495.
270. Salas A, Shimaoka M, Kogan AN, et al.: Rolling adhesion through an extended conformation of integrin alpha₁beta₂ and relation to alpha₁ and beta₁-like domain interaction. *Immunity* 2004; 20: 393–406.
271. Salio M, Chimenti S, De Angelis N, Molla F, Maina V, Nebuloni M, Pasqualini F, Latini R, Garlanda C, Mantovani A.: Cardioprotective function of the long pentraxin PTX3 in acute myocardial infarction. *Circulation* 2008, 117:1055–64.
272. Sallay, K., Listgarten, M., Sanavi, F., Ring, I., Nowotny A: Bacterial invasion of oral tissues of immunosuppressed rats. *Infect. Immun* 1984, 43, 1091–1093
273. Salustri A, Garlanda C, Hirsch E, De Acetis M, Maccagno A, Bottazzi B, Doni A, Bastone A, Mantovani G, Beck Peccoz P, Salvatori G, Mahoney DJ, Day AJ, Siracusa G, Romani L, Mantovani A: PTX3 plays a key role in the

- organization of the cumulus oophorus extracellular matrix and in in vivo fertilization. *Development* 2004; 131 (7): 1577–86.
274. Salvi GE, Beck JD, Offenbacher S. PGE2, IL-1 beta, and TNF-alpha responses in diabetics as modifiers of periodontal disease expression. *Ann Periodontol*. 1998; 3:40–50
275. Scarchilli L, Camaioni A, Bottazzi B, Negri V, Doni A, Deban L, Bastone A, Salvatori G, Mantovani A, Siracusa G, Salustri A. PTX3 Interacts with inter- $\{\alpha\}$ -trypsin inhibitor: implications for hyaluronan organization and cumulus oophorus expansion. *J Biol Chem*. 2007; 282:30161–30170.
276. Scarel-Caminaga RM, Trevilatto PC, Souza AP, Brito RB, Camargo LE, Line SR. Interleukin 10 gene promoter polymorphisms are associated with chronic periodontitis. *J Clin Periodontol*. 2004; 31:443–448
277. Schaffner-Reckinger E, Gouon V, Melchior C, et al.: Distinct involvement of beta 3 integrin cytoplasmic domain tyrosine residues 747 and 759 in integrin-mediated cytoskeletal assembly and phosphotyrosine signaling. *J Biol Chem*. 1998; 273:12623–12632.
278. Schenkein HA, Koertge TE, Brooks CN, Sabatini R, Purkall DE, Tew JG.: IL-17 in sera from patients with aggressive periodontitis. *J Dent Res*. 2010 Sep;89(9):943-7.
279. Schenkein HA, Van Dyke TE. Early-onset periodontitis: systemic aspects of etiology and pathogenesis. *Periodontol* 2000. 1994; 6:7–25
280. Schenkein HA. Host responses in maintaining periodontal health and determining periodontal disease. *Periodontol* 2000. 2006; 40:77–93.
281. Schenkel AR, Mamdouh Z, Muller WA. Locomotion of monocytes on endothelium is a critical step during extravasation. *Nat Immunol* 2004; 5: 393–400.
282. Schmidt S, Moser M, Sperandio M. The molecular basis of leukocyte recruitment and its deficiencies. *Mol Immunol* 2012; 55: 49–58

283. Schols AM, Buurman WA, Staal van den Brekel AJ, Dentener MA, Wouters EF. Evidence for a relation between metabolic derangements and increased levels of inflammatory mediators in a subgroup of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax*. 1996;51(8):819–824.
284. Sepp, N.T., Li, L.J., Lee, K.H., Brown, E.J., Caughman, S.W., Lawley T.J, Swerlick, R.A. Basic fibroblast growth factor increases expression of the alpha v beta 3 integrin complex on human microvascular endothelial cells. *J Invest Dermatol*. 1994; 103,295–299.
285. Serhan CN, Chiang N, Van Dyke TE.: Resolving inflammation: dual anti-inflammatory and pro-resolution lipid mediators. *Nat Rev Immunol*. 2008 May;8(5):349-61.
286. Shahrara S, Pickens SR, Mandelin AM 2nd, Karpus WJ, Huang Q, Kolls JK, Pope RM.: IL-17-mediated monocyte migration occurs partially through CC chemokine ligand 2/monocyte chemoattractant protein-1 induction. *J Immunol*. 2010 Apr 15;184(8):4479-87.
287. Shaker OG, Ghallab NA. IL-17 and IL-11 GCF levels in aggressive and chronic periodontitis patients: relation to PCR bacterial detection. *Mediators Inflamm* 2012; 2012: 174764.
288. Shaw SK, Ma S, Kim MB, Rao RM, Hartman CU, Froio RM, Yang L, Jones T, Liu Y, Nusrat A, Parkos CA, Luscinskas FW.: Coordinated redistribution of leukocyte LFA-1 and endothelial cell ICAM-1 accompany neutrophil transmigration. *J Exp Med* 2004; 200: 1571–1580.
289. Shen TC, Chang PY, Lin CL, et al.: Risk of periodontal diseases in patients with chronic obstructive pulmonary disease: a nationwide population-based cohort study. *Medicine (Baltimore)*. 2015; 94(46): e2047.
290. Shin J, Hosur KB, Pyaram K, Jotwani R, Liang S, Chavakis T, et al. Expression and function of the homeostatic molecule Del-1 in endothelial cells and the periodontal tissue. *Clin Dev Immunol*. 2013

291. Shin J, Maekawa T, Abe T, Hajishengallis E, Hosur K, Pyaram K, Mitroulis I, Chavakis T, Hajishengallis G.: DEL-1 restrains osteoclastogenesis and inhibits inflammatory bone loss in nonhuman primates. *Sci Transl Med.* 2015 Sep 30;7(307):307ra155.
292. Shirodaria S, Smith J, McKay IJ, Kennett CN, Hughes FJ. Polymorphisms in the IL-1A gene are correlated with levels of interleukin-1alpha protein in gingival crevicular fluid of teeth with severe periodontal disease. *J Dent Res* 2000;79: 1864–1869.
293. Siegel, S., & Castellan, N. J. (1988). Nonparametric statistics for the behavioral sciences (2nd ed.) New York: McGraw-Hill.
294. Sima C, Glogauer M. Neutrophil dysfunction and host susceptibility to periodontal inflammation: current state of knowledge. *Curr Oral Health Rep* 2014; 1: 95–103.
295. Simon, S. I., M. R. Sarantos, C. E. Green, and U. Y. Schaff: Leucocyte recruitment under fluid shear: mechanical and molecular regulation within the inflammatory synapse. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 2009; 36: 217–224.
296. Smith A1, Stanley P, Jones K, Svensson L, McDowall A, Hogg N. The role of the integrin LFA-1 in T-lymphocyte migration. *Immunol Rev.* 2007 Aug;218:135-46.
297. Socransky SS, Haffajee AD: Evidence of bacterial etiology: a historical perspective. *Periodontol 2000.* 1994; 5:7-25.
298. Socransky SS, Haffajee AD: Implications of periodontal microbiology for the treatment of periodontal infections. *Compend Suppl.* 1994;(18):S684-5, 688-93; quiz S714-7.
299. Socransky: Microbiology of Periodontal Disease, Present Status and Future Considerations *Journal of Periodontology.* 1977; 48 (9): 497-504
300. Souza DG, Soares AC, Pinho V, Torloni H, Reis LF, Teixeira MM, Dias AA. Increased mortality and inflammation in tumor necrosis factorstimulated gene-14

- transgenic mice after ischemia and reperfusion injury. *Am J Pathol.* 2002; 160:1755–1765.
301. Springer TA.: Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell* 1994; 76: 301–314.
302. Stabholz A et al.: Genetic and environmental risk factors for chronic periodontitis and aggressive periodontitis. *Periodontol 2000.* 2010; 53:138–153.
303. Stanescu D, Sanna A, Veriter C, et al. et al. Airways obstruction, chronic expectoration, and rapid decline of FEV1 in smokers are associated with increased levels of sputum neutrophils. *Thorax.* 1996;51(3):267–271.
304. Stark MA, Huo Y, Burcin TL, Morris MA, Olson TS, Ley K.: Phagocytosis of apoptotic neutrophils regulates granulopoiesis via IL-23 and IL-17. *Immunity.* 2005 Mar;22(3):285-94.
305. Steinberg, “Modified forms of low-density lipoprotein and atherosclerosis,” *Journal of Internal Medicine* vol. 233,no.3,pp. 227–232, 1993.
306. Stockley JA, Walton GM, Sapey E. Aberrant neutrophil functions in stable chronic obstructive pulmonary disease: the neutrophil as an immunotherapeutic target. *Int Immunopharmacol.* 2013;17(4):1211–1217.
307. Stromblad S, Becker JC, Yebra M, et al.: Suppression of p53 activity abd p21WAF1/CIP1 expression by vascular cell integrin alpha V beta 3 during angiogenesis. *J Clin Invest.* 1996;98: 426 – 433.
308. Sugama, K., Suzuki, K., Yoshitani, K., Shiraishi, K. & Kometani T: IL-17, neutrophil activation and muscle damage following endurance exercise. *Exercise Immunology Review.* 2012; 18, 116-127.
309. Sutton CE, Lalor SJ, Sweeney CM, Brereton CF, Lavelle EC, Mills KH.: Interleukin-1 and IL-23 induce innate IL-17 production from gammadelta T cells, amplifying Th17 responses and autoimmunity. *Immunity.* 2009 Aug 21;31(2):331-41.

310. Suzuki E, Mellins ED, Gershwin ME, Nestle FO, Adamopoulos IE. The IL-23/IL-17 axis in psoriatic arthritis. *Autoimmun Rev.* 2014 Apr-May;13(4-5):496-502.
311. Svec, Ales Tichopad, Vendula Novosadova, Michael W. Pfaffl, and Mikael Kubista. How good is a PCR efficiency estimate : Recommendations for precise and robust qPCR efficiency assessment. *Biomol Detect Quantif.* 2015 Mar; 3: 9–16.
312. Takahashi S, Fukuda M, Mitani A, Fujimura T, Iwamura Y, Sato S, Kubo T, Sugita Y, Maeda H, Shinomura T, Noguchi T.: Follicular dendritic cell-secreted protein is decreased in experimental periodontitis concurrently with the increase of interleukin-17 expression and the Rankl/Opg mRNA ratio. *J Periodontal Res.* 2014 Jun;49(3):390-7
313. Takahashi, K., Azuma, T., Motohira, H., Kinane, D. F. and Kitetsu, S.: The potential role of interleukin-17 in the immunopathology of periodontal disease. *J. Clin. Periodontol.* 2005, 32, 369-374.
314. Takatori H, Kanno Y, Watford WT, Tato CM, Weiss G, Ivanov II, Littman DR, O'Shea JJ.: Lymphoid tissue inducer-like cells are an innate source of IL-17 and IL-22. *J Exp Med.* 2009 Jan 16;206(1):35-41.
315. Takeuchi Y, Sakurai K, Ike I, Yoshie H, Kawasaki K, Hara K: ICAM-I-expressing pocket epithelium, LFA-1-expressing T cells in gingival tissue and gingival crevicular fluid as features characterizing inflammatory cell invasion and exudation in adult periodontitis. *J Periodont Res* 1995, 30:426-435.
316. Teeuw, D.E.Slot, H.Susantoetal.Treatment of periodontitis improves the atherosclerotic profile: a systematic review and meta-analysis. *Journal of Clinical Periodontology*, vol. 41, no. 1, pp. 70–79, 2014.
317. Tonetti MS, Claffey N; European Workshop in Periodontology group C: Advances in the progression of periodontitis and proposal of definitions of a periodontitis case and disease progression for use in risk factor research. Group C consensus report of the 5th European Workshop in Periodontology. *J Clin Periodontol.* 2005;32 Suppl 6:210-3.

318. Trajkovic V, Stosic-Grujicic S, Samardzic T, Markovic M, Miljkovic D, Ramic Z, Mostarica Stojkovic M.: Interleukin-17 stimulates inducible nitric oxide synthase activation in rodent astrocytes. *J Neuroimmunol.* 2001 Oct 1;119(2):183-91
319. Travis, M.A., Humphries, J.D., Humphries, M.J. An unraveling tale of how integrins are activated from within. *Trends Pharmacol Sci.* 2003; 24, 192–197.
320. Trombelli L, Scapoli C, Carrieri A, Giovannini G, Calura G, Farina R. Interleukin-1 beta levels in gingival crevicular fluid and serum under naturally occurring and experimentally induced gingivitis. *J Clin Periodontol* 2010; 37:697–704.
321. Tsutsumi T, Nakashima K, Isoda T, Yokota M, Nishihara T.: Involvement of adhesion molecule in in vitro plaque-like formation of macrophages stimulated with *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* lipopolysaccharide. *J Periodontal Res.* 2010 Aug;45(4):550-6.
322. Van Bezooijen RL¹, Papapoulos SE, Löwik CW.: Effect of interleukin-17 on nitric oxide production and osteoclastic bone resorption: is there dependency on nuclear factor-kappaB and receptor activator of nuclear factor kappaB (RANK)/RANK ligand signaling? *Bone.* 2001 Apr;28(4):378-86.
323. Van Dyke TE, Serhan CN. Resolution of inflammation: a new paradigm for the pathogenesis of periodontal diseases. *J Dent Res.* 2003; 82:82–90
324. Van Pottelberge, G.R., Bracke, K.R., Pauwels, N.S., Vermassen, F.E., Joos, G.F. & Brusselle, G.G. (2012). COPD is associated with reduced pulmonary interstitial expression of pentraxin-3. *European Respiratory Journal*, 39(4), 830-838.
325. Varner JA, Brooks PC, Cheresh DA. Review: the integrin alpha V beta 3: angiogenesis and apoptosis. *Cell Adhes Commun.* 1995;3: 367–374.
326. Venza I, Visalli M, Cucinotta M, et al.: Proinflammatory gene expression at chronic periodontitis and peri-implantitis sites in patients with or without type 2 diabetes. *J Periodontol* 2010; 81:99–108.

327. Verma, Kelleher, Not Just an Adhesion Molecule: LFA-1 Contact Tunes the T Lymphocyte Program. *J Immunol.* 2017 Aug 15;199(4):1213-1221
328. Vernal R¹, Dutzan N, Chaparro A, Puente J, Antonieta Valenzuela M, Gamonal J: Levels of interleukin-17 in gingival crevicular fluid and in supernatants of cellular cultures of gingival tissue from patients with chronic periodontitis. *J Clin Periodontol.* 2005 Apr;32(4):383-9.
329. Vernooy JH, Kucukaycan M, Jacobs JA, et al.: Local and systemic inflammation in patients with chronic obstructive pulmonary disease: soluble tumor necrosis factor receptors are increased in sputum. *Am J Respir Crit Care Med.* 2002;166(9):1218-1224.
330. Vestweber D. How leukocytes cross the vascular endothelium. *Nat Rev Immunol* 2015; 15: 692-704.
331. Vezzoli M, Sciorati C, Campana L, Monno A, Doglio MG, Rigamonti E, et al. et al. et al. et al. The clearance of cell remnants and the regeneration of the injured muscle depend on soluble pattern recognition receptor PTX3. *Molecular medicine.* 2016; 22.
332. von Vietinghoff S, Ley K.: Homeostatic regulation of blood neutrophil counts. *J Immunol.* 2008 Oct 15;181(8):5183-8. Review.
333. Wahl SM, Costa GL, Mizel DE, Allen JB, Skaleris U, Mangan DF. Role of transforming growth factor beta in the pathophysiology of chronic inflammation. *J Periodontol.* 1993; 64:450-455
334. Wang AM¹, Doyle MV, Mark DF.: Quantitation of mRNA by the polymerase chain reaction. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1989 Dec;86(24):9717-21.
335. Wang ZX, Yang L, Tan JY, Chen LL: Effects of T helper 1 cells and T helper 17 cells secreting cytokines on rat models of experimental periodontitis]. *Zhonghua Kou Qiang Yi Xue Za Zhi.* 2017 Dec 9;52(12):740-747.
336. Watanabe K. Prepubertal periodontitis: a review of diagnostic criteria, pathogenesis, and differential diagnosis. *J Periodontal Res* 1990;25:31-48.

337. Witowski J, Pawlaczek K, Breborowicz A, Scheuren A, Kuzlan-Pawlaczek M, Wisniewska J, Polubinska A, Friess H, Gahl GM, Frei U, Jörres A.: IL-17 stimulates intraperitoneal neutrophil infiltration through the release of GRO alpha chemokine from mesothelial cells. *J Immunol.* 2000 Nov 15;165(10):5814-21.
338. Wittwer CT, Herrmann MG, Moss AA, Rasmussen RP.: Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. *Biotechniques.* 1997 Jan;22(1):130-1, 134-8
339. Word Health Organisation (WHO), Country / Area Profile Projects, 2014. URL: http://www.who.int/oral_health/databases/en/
340. Wright CJ, et al.: Disruption of heterotypic community development by *Porphyromonas gingivalis* with small molecule inhibitors. *Mol Oral Microbiol.* 2014; 29:185–193
341. Wu C, Hughes PE, Ginsberg MH, et al.: Identification of a new biological function for integrin alpha v beta 3: initiation of fibronectin matrix assembly. *Cell Adhes Commun.* 1996;4:149 –158
342. Xu J, Wang F, Van Keymeulen A, Herzmark P, Straight A, et al.: Divergent signals and cytoskeletal assemblies regulate self-organizing polarity in neutrophils. *Cell.* 2003; 114:201–14
343. Yago, T., B. Shao, J. J. Miner, L. B. Yao, A. G. Klopocki, K. Maeda, K. M. Coggeshall, and R. P. McEver. E-selectin engages PSGL-1 and CD44 through a common signaling pathway to induce integrin α –mediated slow leukocyte rolling. *Blood.* 2010;116: 485–494.
344. Yan P1, Yue J, Jiang H., Expression of ICAM-1/LFA-1 in the pocket area of adult periodontitis, *Zhonghua Kou Qiang Yi Xue Za Zhi.* 1999 Mar;34(2):106-8.
345. Yonekawa K, Harlan JM. Targeting leukocyte integrins in human diseases. *J Leukoc Biol* 2005; 77: 129–140.
346. Yoshinari, N., Kameyama, Y., Aoyama, Y., Nishiyama, H. & Noguchi, T.: Effect of long-term methotrexateinduced neutropenia on experimental periodontal lesion in rats. *J. Periodont. Res.* 1994, 29, 393–400

347. Yu, J. J. & Gaffen, S. L.: Interleukin-17: a novel inflammatory cytokine that bridges innate and adaptive immunity. *Frontiers in Bioscience* 2008, 13, 170–177.
348. Zar, Spearman Rank Correlation, *Encyclopedia of Biostatistics*, 1998
349. Zarbock A, Abram CL, Hundt M, Altman A, Lowell CA, Ley K: PSGL-1 engagement by E-selectin signals through Src kinase Fgr and ITAM adapters DAP12 and FcR gamma to induce slow leukocyte rolling. *J Exp Med* 2008; 205: 2339–2347.
350. Zarbock A, Lowell CA, Ley K.: Spleen tyrosine kinase Syk is necessary for E-selectin-induced alpha(L) beta (2) integrin-mediated rolling on intercellular adhesion molecule-1. *Immunity* 2007; 26: 773–783.
351. Zeng XT, Tu ML, Liu DY, Zheng D, Zhang J, Leng W.: Periodontal disease and risk of chronic obstructive pulmonary disease: a meta- analysis of observational studies. *PLoS One*. 2012;7(10): e46508.
352. Zenobia C, Hajishengallis G. Basic biology and role of interleukin-17 in immunity and inflammation. *Periodontol 2000* 2015: 69: 142–159.
353. Zhang F¹, Tanaka H, Kawato T, Kitami S, Nakai K, Motohashi M, Suzuki N, Wang CL, Ochiai K, Isokawa K, Maeno M: Interleukin-17A induces cathepsin K and MMP-9 expression in osteoclasts via celecoxib-blocked prostaglandin E2 in osteoblasts. *Biochimie*. 2011 Feb;93(2):296-305.
354. Zhang, Q., Shi, S., Liu, Y., Uyanne, J., Shi, Y. & Le, A. D.: Mesenchymal stem cells derived from human gingiva are capable of immunomodulatory functions and ameliorate inflammation-related tissue destruction in experimental colitis. *Journal of Immunology* 2009, 183, 7787–7798.
355. Zhao L, Zhou Y, Xu Y, Sun Y, Li L, Chen W. Effect of nonsurgical periodontal therapy on the levels of Th17/Th1/ Th2 cytokines and their transcription factors in Chinese chronic periodontitis patients. *J Clin Periodontol* 2011; 38: 509–516.

356. Zheng J, Eliceiri B, Stupack D, et al.: Neovascularization of ischemic tissues by gene delivery of the extracellular matrix protein Del-1. *J Clin Invest.* 2003, 112:30 – 41.
357. Zheng, Y. Valdez PA, Danilenko DM, Hu Y, Sa SM, Gong Q, Abbas AR, Modrusan Z, Ghilardi N, de Sauvage FJ, Ouyang W.I: nterleukin-22 mediates early host defense against attaching and effacing bacterial pathogens. *Nature Med.* 2008, 14, 282–289
358. Zhong, J., Eliceiri, B., Stupack, D., Penta, K., Sakamoto, G., Quertermous, T., Coleman, M., Boudreau, N.J., Varner, J.A. Neovascularization of ischemic tissues by gene delivery of the extracellular matrix protein Del-1. *J Clin Invest.* 2003;112, 30–41.
359. Zimmerman.: Power functions of the t test and Mann-Whitney U test under violation of parametric assumptions. *Perceptual and Motor Skills.* 1985; 61, 467
360. Zipper H, Brunner H, Bernhagen J, Vitzthum F.: Investigations on DNA intercalation and surface binding by SYBR Green I, its structure determination and methodological implications. *Nucleic Acids Res.* 2004 Jul 12;32(12):e103.

9 Veröffentlichungen

Folwaczny M, Karnesi E, Berger T, Paschos E. Clinical association between chronic periodontitis and the leukocyte extravasation inhibitors developmental endothelial locus-1 and pentraxin-3. *Eur J Oral Sci.* 2017 Aug;125(4):258-264.

10 Danksagung

Besonders danken möchte ich Herrn Prof. Dr. Dr. Matthias Folwaczny für die freundliche Überlassung des Dissertationsthemas und die hervorragende wissenschaftliche sowie methodische Unterstützung während der gesamten Bearbeitungsphase meiner Dissertation.

Außerdem gilt mein Dank Frau Dr. Tamara Berger und Frau Brigitte Hackl für die kompetente Einweisung in die Laborarbeit und tatkräftige Unterstützung im Rahmen des experimentellen Teils dieser Dissertation.

Besonders möchte ich an dieser Stelle auch meinen Eltern Stella Mavrofrydi und Yannis Karnesis, meiner Schwester Dimitra Karnesi sowie meinem Ehemann Benjamin Summa für die unermüdliche Stärkung und Motivierung während der vergangenen Jahre danken – ohne deren Hilfe wäre das Projekt nicht möglich gewesen.