

Aus dem Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie,
Theoretische Medizin und Biowissenschaften
der Medizinischen Fakultät der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar

Rolle von Metalloproteinasen bei der Beurteilung von parodontalen Erkrankungen

**Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Zahnheilkunde
der Medizinischen Fakultät
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES**

2023

vorgelegt von:

Hakon Klaus Heiko Heinze
geb. am: 26.04.1992 in Berlin

Aus dem Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie, Molekulare Pharmakologie, Medizinische Fakultät der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar
Jun.-Prof. Dr. rer. nat. Daniela Yildiz

Tag der Promotion: 11.07.2024

Dekan: Prof. Dr. Michael D. Menger

1. Berichterstatter: Jun.- Prof. Dr. rer. nat. Daniela Yildiz

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Matthias Hannig

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|----------|--|-----------|
| 1 | ZUSAMMENFASSUNG | 1 |
| 1.1 | Deutsche Zusammenfassung | 1 |
| 1.2 | Abstract | 3 |
| 2 | EINLEITUNG | 5 |
| 2.1 | Parodontale Erkrankungen | 5 |
| 2.1.1 | Das Parodont | 5 |
| 2.1.2 | Parodontopathien | 5 |
| 2.1.3 | Epidemiologie | 6 |
| 2.1.4 | Ätiologie | 6 |
| 2.1.5 | Staging und Grading | 9 |
| 2.1.6 | Sulkusflüssigkeit | 9 |
| 2.2 | ADAM-Proteasen | 10 |
| 2.2.1 | Struktur von ADAM-Proteasen | 10 |
| 2.2.2 | Funktionen der Domänen | 12 |
| 2.2.3 | Regulation und Funktion von ADAM-Proteasen | 13 |
| 2.3 | Ziel der Arbeit / Fragestellung | 16 |
| 3 | MATERIAL UND METHODE | 17 |
| 3.1 | PatientInnen | 17 |
| 3.2 | Probenentnahme | 21 |
| 3.3 | BCA | 23 |
| 3.4 | SDS-Page und Westernblot | 23 |
| 3.5 | Aktivitätsassay | 26 |
| 3.6 | Statistik | 27 |
| 4 | ERGEBNISSE | 28 |
| 4.1 | Studienpopulation | 28 |
| 4.2 | Gewicht Papierspitzen | 29 |
| 4.3 | Proteinexpression von ADAM8, ADAM10 und ADAM17 | 29 |
| 4.3.1 | ADAM8 | 31 |
| 4.3.2 | ADAM10 | 32 |
| 4.3.3 | ADAM17 | 35 |
| 4.3.4 | Zelluläre Bestandteile und interne Ladekontrolle | 36 |
| 4.4 | Aktivitätsassay/PrAMA | 37 |
| 5 | DISKUSSION | 39 |
| 5.1 | PatientInnenkollektiv | 39 |
| 5.2 | Prüfmaterialien | 40 |
| 5.3 | Methodik | 41 |
| 5.3.1 | Elektrophorese/Westernblot | 41 |
| 5.3.2 | Aktivitätsmessungen | 42 |

| | | |
|----------|---|-----------|
| 5.4 | Einordnung der Ergebnisse in den wissenschaftlichen Hintergrund und weiterführende Experimente..... | 42 |
| 6 | LITERATURVERZEICHNIS | 46 |
| 7 | ANHANG | 55 |
| 7.1 | Materiallisten | 55 |
| 7.1.1 | ADAM-Lysepuffer | 55 |
| 7.1.2 | Laemmli-puffer..... | 55 |
| 7.1.3 | BCA | 55 |
| 7.1.4 | Westernblot..... | 56 |
| 7.1.4.1 | Gele | 56 |
| 7.1.4.2 | Antikörper | 56 |
| 7.1.4.3 | Marker..... | 57 |
| 7.1.4.4 | Kontrollen | 57 |
| 7.1.4.5 | Puffer..... | 57 |
| 7.2 | PrAMA | 58 |
| 7.3 | Datenblätter..... | 59 |
| 7.3.1 | Einwilligungserklärung Gemeinschaftspraxis/Klinik..... | 59 |
| 7.3.1.1 | Gemeinschaftspraxis | 59 |
| 7.3.1.2 | Klinik | 61 |
| 7.3.2 | Patienteninformationen Gemeinschaftspraxis/Klinik | 63 |
| 7.3.2.1 | Gemeinschaftspraxis | 63 |
| 7.3.2.2 | Klinik | 66 |
| 7.4 | Probenverarbeitungsschema | 69 |
| 8 | PUBLIKATION / DANKSAGUNG | 70 |
| 8.1 | Publikation..... | 70 |
| 8.2 | Danksagung | 70 |
| 9 | LEBENS LAUF | 71 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|-------------------------------------|--|
| ADAM | A disintegrin and metalloproteinase |
| APP | Amyloid-precursor-protein |
| Aβ-Fragment | Amyloid β -protein fragment |
| BACE1 | Beta-secretase1 |
| BCA | Bicinchoninic acid |
| BSA | Bovine serum albumin |
| CAL | Clinical attachment loss |
| DNA | Deoxyribonucleic acid |
| ECL | Elektrochemilumineszenz |
| EGFR-Ligand | Epidermal growth factor receptor-ligand |
| ELISA | Enzyme-linked immunosorbent assay |
| FRET | Förster-Resonanzenergietransfer |
| GAPDH | Glycerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase |
| GCF | Gingival crevicular fluid |
| HB-EGF | Heparin-binding epidermal growth factor |
| HRP | Horseradish peroxidase |
| Ig | Immunglobulin |
| IL | Interleukin |
| PAA | Polyacrylamid |
| PGE₂ | Prostaglandin E2 |
| PMN | polymorphonuclear leukocytes |
| PrAMA | Proteolytic activity matrix analysis |
| rpm | rounds per minute |
| SDS | Sodium dodecyl sulfate |
| TBS | Tris-buffered saline |
| TGFα | Transforming growth factor α |
| TNF-α | Tumornekrosefaktor- α |
| WB | Westernblot |
| ZHMB | Zentrum für Human- und Molekularbiologie |

1 Zusammenfassung

1.1 Deutsche Zusammenfassung

Parodontale Erkrankungen stellen mit einer Prävalenz von 20-50% eine Volkskrankheit dar, die bei einer großen Anzahl an Erkrankungen, wie bspw. Herz-Kreislauf-Erkrankungen, ein großes Risikopotenzial aufweisen. Die Erkrankung ist geprägt von entzündlichen Prozessen, die unter anderem durch die Infektion mit bakteriellen Erregern initiiert werden. Zentraler Bestandteil der Erkrankung ist die Umwandlung des umliegenden Gewebes und des Kieferknochens durch den Einfluss von Mediatoren wie Prostaglandinen, Leukotrienen, Bradykininen, und Zytokinen, die die Immunantwort und die Freisetzung von Proteinase steuern. Neben den Matrixmetalloproteinase spielen auch die *a disintegrin and metalloproteinases* (ADAM) eine bedeutende Rolle bei diesen Prozessen, in dem sie die Zellmigration, Diapedese, Freisetzung weiterer Zytokine und den Gewebeumbau steuern.

Im Rahmen dieser Studie sollte das Expressionsmuster und die Aktivität der Metalloproteinase ADAM8, -10 und -17 bei parodontal erkrankten Personen untersucht werden. Hierzu wurde die Sulkusflüssigkeit von 69 PatientInnen aus verschiedenen Stadien und Graden der Parodontitis analysiert, von denen 16 PatientInnen als parodontal gesund diagnostiziert wurden. Die parodontal gesunden PatientInnen dienten als ReferenzpatientInnen. Die Probenentnahme erfolgte im Rahmen einer gewöhnlichen zahnärztlichen Behandlung, so dass keine zusätzliche Belastung der PatientInnen entstand. Zur Detektion der in der Analyseflüssigkeit enthaltenen Proteinmenge wurde ein kolorimetrischer Proteinquantifizierungstest verwendet. Im Anschluss daran wurden Westernblots zur Bestimmung der Gesamtproteinexpression und Expression verschiedener Maturierungsformen von ADAM8, -10 und -17 durchgeführt. Auf Basis der identifizierten Unterschiede wurden zusätzlich Aktivitätsmessungen für ADAM8 mittels eines fluoreszierenden Substrates (FRET-Substrat) durchgeführt.

Parodontal gesunde PatientInnen zeigten im Vergleich zu parodontal erkrankten PatientInnen eine geringere Gesamtproteinmenge im Sulkusflüssigkeit. Im Westernblot war keine/kaum ADAM8, -10 und -17 Proteinexpression nachweisbar. ADAM8, -10, -17 zeigten über die verschieden nachgewiesenen Formen im Vergleich zu parodontal gesunden PatientInnen vermehrte Proteinexpressionen. Bei steigendem Stadium und Grad der Parodontitis war keine Veränderung von ADAM8 in der *remnant*-Form zu verzeichnen. Die pro-Form und die mature-Form von ADAM8 zeigten jedoch eine signifikante Zunahme in ihrer Expression. ADAM10 und -17 zeigten im Unterschied dazu über ihre pro-Form und mature-Form eine

Abnahme in ihrer Expression bei steigendem Stadium und Grad, wobei dieser Unterschied lediglich bei ADAM10 signifikant war. Des Weiteren konnte ein Anstieg der ADAM8-Aktivität mit Zunahme des Erkrankungsgrades detektiert werden. Aufgrund einer mangelnden Glycerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase (GAPDH)-Detektion kann geschlussfolgert werden, dass es sich hierbei um eine vesikel-assoziierte Expression oder um die lösliche Form der Proteasen handelt. Der Anstieg der ADAM8-Aktivität scheint dazu zu führen, dass ADAM10 und ADAM17 sowie andere Substrate vermehrt gespalten werden. ADAM8 könnte daher ein vielversprechender Anhaltspunkt zukünftiger Forschungen im Bereich der Therapie der Parodontitis darstellen. Auch könnte der Nachweis der verschiedenen ADAM-Proteasen im Bereich der Früherkennung und Kontrolle von antiinfektiösen Therapien im Bereich der Parodontitis von Bedeutung werden. Hierzu sind weitere Studien z.B. unter Einschluss von Speichelflüssigkeit, für die Diagnostik und zum Pathogenitätsmechanismus notwendig.

1.2 Abstract

With a prevalence of 20-50%, periodontal diseases represent a widespread disease that has a large risk potential in numerous diseases, such as cardiovascular diseases. The disease is characterized by inflammatory processes that are generated, by infection with bacterial pathogens. The central component of the disease is the transformation of the tissue through the influence of mediators such as prostaglandins, leukotrienes, bradykinins, cytokines and matrix metalloproteinases. In addition to these, the ADAM proteases also play an important role in these processes in terms of regulation of cell migration, diapedesis, release of other cytokines and tissue remodeling.

Within the scope of this study, the expression pattern and the activity of the metalloproteinases ADAM8, ADAM10 and ADAM17 in persons with periodontitis should be examined. For this purpose, the sulcus fluid of 69 patients with different stages and grades of periodontitis was examined, of which 16 patients were diagnosed as having a healthy periodontium. The periodontally healthy patients serve as reference patients. The samples were taken as part of a regular dental treatment, so that the patients were not subjected to any additional stress. A colorimetric protein quantification test was used to detect the amount of protein determined in the analysis liquid. Subsequently, Westernblots were performed to determine total protein expression and expression of different maturation forms of ADAM8, -10 and -17. Based on these data, activity measurements were carried out using a fluorescent substrate (FRET substrate) for ADAM8.

Periodontal healthy patients showed a lower total amount of protein in the sulcus fluid compared to periodontally diseased patients. No/hardly any ADAM8, -10 and -17 expression was detectable in the Westernblot. ADAM8, -10, -17 showed increased protein expressions across the various detected forms compared to periodontally healthy patients. With increasing stage and grade of the periodontitis, there was no change in the expression from ADAM8 remnant form. However, pro- and mature-form of ADAM8 showed a significant increase in their expression. In contrast, ADAM10 and -17 showed a decrease in their expression with increasing stage and grade via their pro- and mature-form, whereby only ADAM10 was significant. Due to a lack of GAPDH it can be concluded that this is a vesicle-associated expression. Furthermore, an increase in ADAM8 activity with an increase in the grade of disease could be detected. This increase in activity could lead to increased cleavage of ADAM10 and ADAM17. ADAM8 could therefore represent a promising starting point for future research in the field of

periodontitis therapy. The detection of various ADAM proteases could also be of importance in the field of early detection and control of anti-infective therapies of periodontitis. Further studies, e.g. including salivary fluid for diagnostics and the pathogenicity mechanism, are necessary for this.

2 Einleitung

2.1 Parodontale Erkrankungen

2.1.1 Das Parodont

Unter dem Begriff Parodont versteht man das Gewebe, welches den Zahn umgibt. Hierzu gehören die Gingiva, das Wurzelzement, das Desmodont (Wurzelhaut) sowie der Alveolarfortsatz (Abbildung 1). Mikroskopisch kann man die Gingiva noch weiter in die dem Zahn zugewandte Seite, das orale Sulkusepithel, und die der Mundhöhle zugewandte Seite, das Saumepithel, unterscheiden. Beide Epithelien sind mehrschichtige, verhornte Epithelien. Das Saumepithel dient der Anhaftung der Gingiva an den Zahn und reicht von der Schmelz-Zement-Grenze bis zum Sulkusboden.

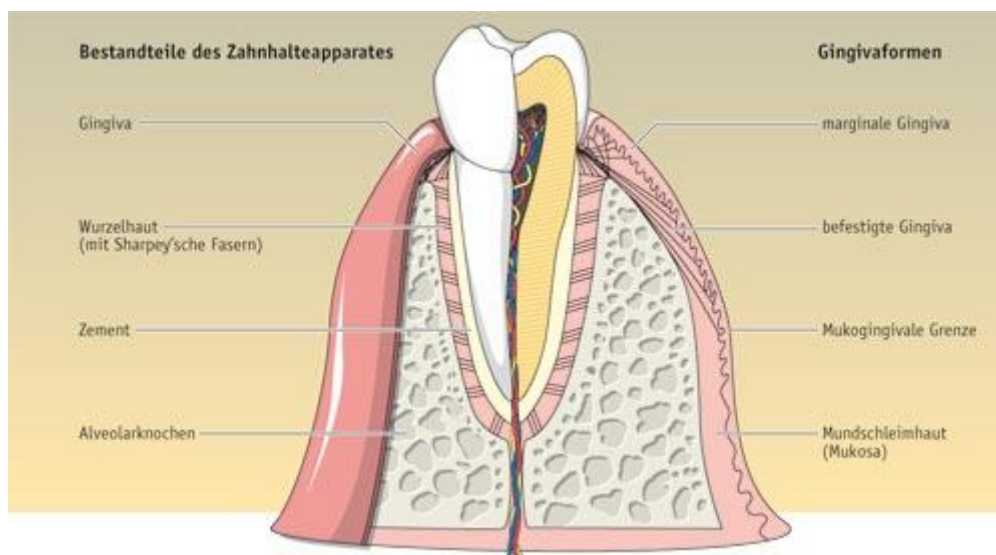


Abbildung 1 Bestandteile des Zahnhalteapparate [130]:

Die Aufgaben des Parodonts ist u.a. die Verankerung des Zahnes im Knochen, Dämpfung und Überleitung von Kaukräften, die Abwehr gegenüber äußeren Noxen sowie die Trennung zwischen der Mundhöhle und dem tiefer unterhalb der Schleimhaut befindlichen Gewebes. [40]

2.1.2 Parodontopathien

Unter dem Begriff werden im Allgemeinen entzündliche sowie nicht entzündliche Erkrankungen des Parodonts zusammengefasst [40]. Bei den entzündlichen Parodontopathien kann man je nach Lokalisation und Ausdehnung der Entzündung in Gingivitis, ein ohne klinischen Attachmentverlust auf die Schleimhaut begrenztes Geschehen [20], und Parodontitis, ein mit klinischem Attachmentverlust einhergehenden Geschehen, unterscheiden [40,50,73]. Unter *clinical attachment loss* (CAL) versteht man die Destruktion des Zahnhalteapparates. Gemes-

sen wird dieser als Distanz zwischen der Schmelz-Zement-Grenze am Zahn und dem Boden der Zahnfleischtasche.

2.1.3 Epidemiologie

Die Parodontitis gehört mit einer Prävalenz von 20-50% zu den häufigsten Krankheiten weltweit [86,98]. Die Ergebnisse der Fünften Deutschen Mundgesundheitsstudie von 2014 zeigen eine deutliche Verbesserung der parodontalen Gesundheit im Vergleich zur vorangegangenen Deutschen Mundgesundheitsstudie, obwohl der Behandlungsbedarf bei Parodontitis aufgrund des demografischen Wandels prognostisch steigen wird [28]. Bei der Einteilung in parodontale Erkrankungsklassen nach *Full-Mouth-Recording* wurde bei einer Studienkohorte von 2625 Personen in drei Altersgruppen unterteilt: Jüngere Erwachsene (35-44 Jährige), jüngere Senioren (65-74 Jährige) und ältere Senioren (75-100 Jährige). 32,4% der jüngeren Erwachsenen waren parodontal gesund oder zeigten milde Erkrankungszeichen, 53,4% zeigten eine moderate und 14,3% eine schwere Parodontitis. 9,9% der jüngeren Senioren zeigten keine bzw. nur milde Parodontitiszeichen, 54,2 zeigten eine moderate und 40,6% eine schwere Parodontitis. Bei den älteren Senioren zeigten 10% der Studienteilnehmer keine bis nur milde Parodontitiszeichen, 45,7% eine moderate Parodontitis und 44,3% eine schwere Parodontitis. Daraus zeigt sich nun auch, dass schwere Parodontitiden im jüngeren Erwachsenenalter deutlich seltener auftreten [63]. Hierbei wird der Schweregrad der Parodontitis anhand der Tiefe der interdentalen Stellen und Taschentiefe definiert: 1) schwere Parodontitis ab ≥ 6 mm CAL an zwei oder mehr interdentalen Stellen und ≥ 5 mm tiefen interdentalen Tasche definiert; 2) moderate Parodontitis ab ≥ 4 mm CAL an zwei oder mehr Stellen interdental oder mit zwei oder mehr ≥ 5 mm Taschen; 3) milde Parodontitis bei ≥ 2 Stellen mit ≥ 3 mm CAL und ≥ 2 Stellen interdental mit ≥ 4 mm Taschentiefe oder eine Seite mit ≥ 5 mm Taschentiefe [37].

2.1.4 Ätiologie

Man kann bei der Ätiologie zwischen einem primären sowie sekundären Ursachenkomplex einer Parodontitis unterscheiden. Der primäre Ursachenkomplex beschreibt die durch die im Plaque befindlichen Mikroorganismen einhergehende Entzündung, welche zu Läsionen des Parodonts führen [30,85]. Unter einer dentalen Plaque versteht man ein Konglomerat aus Bakterien, die in eine Plaquematrix eingebettet sind [7]. Über die Plaquematrix können sich Bakterien zusammenlagern und der Biofilm an den Zahn anhaften. Sie besteht aus vorwiegend anionisch geladenen oder auch neutralen Proteinen, Polysacchariden, Nukleinsäuren und Lipiden. Zahnplaque ist klinisch ab einer ausreichenden Dicke als weicher, strukturierter

Zahnbelag zu erkennen, welcher nicht mehr durch Wasserspray entfernbar ist. Klinisch hat sich gezeigt, dass bei 10-15% der Menschen aus einer Gingivitis bei länger andauernder erhöhter bakterieller Belastung eine schwere Parodontitis entsteht [40]. Man kann zwischen supragingivalen und subgingivalen Plaque, je nach Lokalisation oberhalb oder unterhalb der Gingiva, unterscheiden. Während sich in der supragingivalen Plaque vorwiegend Gram-positive, fakultativ anaerobe Kokken und Stäbchen befinden, setzt sich die subgingivale Plaque vermehrt aus anaeroben Keimen zusammen. Das Verhältnis von beweglichen zu unbeweglichen Keimen verschiebt sich im entzündeten Parodont in Richtung der beweglichen Keime [76]. Die Plaque kann als umso parodontal pathogener eingestuft werden, je mehr bewegliche, Gram-negative und anaerobe Erreger dort vorzufinden sind [76,77]. Virulenzfaktoren, die den Destruktionsgrad erhöhen, sind u.a. von den Mikroorganismen gebildete Enzyme, Ädhäsine, Lipopolysaccharide, Toxine sowie andere Stoffwechselprodukte [119]. Die unspezifische Plaquehypothese ließ lange Zeit vermuten, dass alleine die Menge des Plaques die Intensität der entzündlichen Parodontopathien bestimme [48,117]. Der Nachweis verschiedener Keime in Verbindung mit bestimmten Formen von Parodontopathien führte zur spezifischen Plaquehypothese. Diese geht davon aus, dass nicht unbedingt die Menge an Plaque, sondern die Zusammensetzung des Keimspektrums in der Plaque die Intensität der entzündlichen Parodontopathien bestimme [118]. Die Entstehung von Zahnplaque kann man in unterschiedliche Schritte einteilen. Auf einen azellulären Film (*acquired pellicel*), welcher unter anderem aus Bestandteilen des Speichels besteht, heften sich sog. Frühbesiedler (gram-positive Kokken und Aktinomyzeten) an. Die Plaque wächst durch Teilung sowie auch Akkumulation weiterer Bakterien. Typische Spätbesiedler sind Keime des orangenen Komplexes, wozu auch *Fusobacterium nucleatum* als koaggregierendes Verbindungsglied zwischen den Frühbesiedlern und den Spätbesiedlern zählt. Die Bakterien aus dem sog. roten Komplex (*Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* und *Treponema denticola*) sowie *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* zeigen nach den Socransky-Kriterien die am deutlichsten parodontal pathogenen Eigenschaften [53,85,90]. *Porphyromonas gingivalis* gilt als einer der Leitkeime der Parodontitis [115] und kann durch seine Virulenzfaktoren wie Fimbrien, Hämagglutinine, Enzyme und Lipopolysaccharide [3] den Organismus dazu veranlassen unter anderem Zytokine auszuschütten und damit Entzündungsreaktionen und Gewebeverlust zu fördern [57,59,94] (2.2.3 Regulation und Funktion von ADAM-Proteasen; Abbildung 4).

Histologisch kann man die plaquebedingte entzündliche Parodontitis in vier Schritte unterteilen [77]. Die initiale Läsion (zwei bis vier Tage), welche reversibel ist, ist durch eine akut entzündliche Reaktion mit erhöhter Sulkusflüssigkeitsproduktion und Migration von neutrophilen Granulozyten gekennzeichnet. Durch die Einwanderung von T-Lymphozyten sowie Kollagenverlust der dentogingivalen Fasern und Ausbreitung des Saumepithels in das laterale Bindegewebe entwickelt sich diese zur frühen Läsion (ca. zwei Wochen) weiter. Die etablierte Läsion (wenige Wochen) ist durch B-Lymphozyten, extravaskuläre Immunglobuline und ein fortschreitendes Auflösen des gingivalen Stützgewebes gekennzeichnet. Diese drei Stadien weisen im Gegensatz zu fortgeschrittenen Läsionen eine Reversibilität auf, welche durch das Einwandern von Plasmazellen, eine Destruktion des Alveolarknochens und eine weiterer Verlagerung des Saumepithels nach apikal erkennbar ist. Dadurch kommt es zur Ausbildung parodontaler Taschen.

Faktoren des sekundären Ursachenkomplexes lösen selbst keine entzündlichen Reaktionen aus, sondern begünstigen Mechanismen des primären Komplexes wie die Plaqueakkumulation. Man unterscheidet hier zwischen lokalen und systemischen Faktoren [54]. Zu den lokalen Faktoren gehören gebildeter Zahnstein, die Zahnanatomie inklusive des Mineralisierungsgrad, die Zahnstellung, Mundatmung, das Weichgewebe, Restaurationen [41], unphysiologische Kräfte [43], die Ernährung sowie der Speichel. Zahnstein ermöglicht eine vermehrte Ansiedlung von Bakterien. Auch kariöse Läsionen dienen als Bakterienreservoir, was eine anschließende mögliche Entzündung begünstigen kann. Mundatmung führt zu einem verminderten Angebot an Speichel und Sulkusflüssigkeit, in dem unter anderem Antikörper wie z.B. Immunglobulin (Ig)A und IgE fehlen. Daraus resultiert eine verminderte Immunabwehr gegen die vorhandenen Erreger. Auch die Spülfunktion ist bei der Mundatmung eingeschränkt. Durch das Austrocknen der Schleimhaut ist diese weniger widerstandsfähig gegenüber Pathogenen. Das Weichgewebe selbst kann durch Nischenbildung oder einer verminderten Keratinisierung dazu beitragen, dass Parodontopathien entstehen [25]. Auch verhaltensbedingte Risikofaktoren wie Rauchen oder allgemeine Erkrankungen wie Diabetes mellitus, Osteoporose, genetische Faktoren, wie Interleukin-I-Polymorphismus, Fettleibigkeit und andere chronischer Erkrankungen vergrößern das Risiko an Parodontopathien zu erkranken (siehe auch 3.1 PatientInnen) [40,62][14,62][128,131]. Des Weiteren zeigen genetische Faktoren wie Polymorphismen im Gencluster von Interleukin (IL)-1, v.a. von IL-1A und -B, in einer Metaanalyse aus dem Jahr 2012 einen signifikanten Zusammenhang zur chronischen Parodontitis.

Durch den Polymorphismus auf beiden Genen wird beim Vorhandensein von parodontalpathogenen Keimen der Körper veranlasst vermehrt IL-1 zu produzieren, was ein proinflammatorisches Zytokin darstellt [40,64].

2.1.5 Staging und Grading

Die Parodontitis wird seit dem EuroPerio9-Kongress im Jahr 2018 in „nekrotisierende Parodontitis“, „Parodontitis als Manifestation systemischer Erkrankungen“ und in eine weitere Kategorie „Parodontitis“ eingeteilt. Letztere vereint die Formen der Parodontitis, die bisher in „chronisch“ oder „aggressiv“ eingeteilt wurden und definiert sie in einer „Staging- und Grading“- Matrix [19]. Des Weiteren wird noch die Ausdehnung und Verteilung der betroffenen Regionen einbezogen. Man unterteilt in vier Stadien (Stadium I-IV) und drei Graden (Grad A-C) mit aufsteigenden Schwere- und Progressionsgrad der Erkrankungen. Für die Einteilung benötigt man klinische sowie röntgenologische Befunde. Der Schweregrad wird durch den CAL, den röntgenologischen Knochenabbau und den Zahnverlust definiert. Komplexitätsfaktoren wie die maximale Sondierungstiefe, Knochenabbaumuster, Zahnbeweglichkeit, Furkationsbefall und Zahnverlust helfen bei der Einteilung. Diese können das Staging jedoch nur verschlechtern und nicht in ein weniger gravierendes Stadium verändern. Das Grading geschieht durch die Ermittlung vom Knochenabbau in Prozent pro Alter, ob und wie viel Biofilm vorhanden ist, longitudinale Daten zum röntgenologischen Knochenabbau oder CAL über einen Zeitraum von fünf Jahren und weiteren Risikofaktoren wie Rauchen und Grunderkrankungen wie Diabetes mellitus. Der Grad der Erkrankung steht hierbei für die Höhe des Risikos für Krankheitsprogression.

Aus diesem Grund wird im Verlauf dieser Arbeit auch bei der PatientInneneinteilung auf diese neue Klassifikation zurückgegriffen.

2.1.6 Sulkusflüssigkeit

Die Sulkusflüssigkeit stellt als ein Transsudat im physiologischen Zustand und als Exsudat im entzündlichen Zustand des Parodonts eine Spülflüssigkeit des Sulkus dar [12,121]. Es entstammt den subepithelialen Blutgefäßen der Lamina propria [121]. Die Sulkusflüssigkeit enthält je nach Entzündungszustand des Parodonts eine unterschiedliche Konzentration und Zusammensetzung von Serumbestandteilen wie Enzymen, Ionen, Antikörpern, Bakterien, Entzündungszellen, Biomarkern und Gewebeerfallsprodukten [11]. Selbst bei klinisch gesunden PatientInnen können Entzündungszellen wie *polymorphonuclear leukocytes* (PMNs) nachgewiesen werden, die Teil des Abwehrmechanismus des Körpers darstellen [8]. Das

Exsudat zeichnet sich im Vergleich zum Transsudat durch einen vermehrten Flüssigkeitsaustritt, erhöhte Proteinkonzentrationen und Zellreichtum, wie auch vermehrten Aufkommen an proinflammatorischen Mediatoren wie Prostaglandin E2 (PGE₂) aus, welches unter anderem zur erhöhten Permeabilität der Gefäße, wie auch Knochenresorption beiträgt [5,121]. Weitere proinflammatorische Zytokine wie Interleukin-1 α und Interleukin-1 β (IL-1 α und IL-1 β) und Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) konnten vermehrt im Exsudat nachgewiesen werden [5].

Die hier genannten proinflammatorischen Zytokine spielen eine zentrale Rolle bei der Parodontitis, da sie wie bereits beschrieben zum Verlust von parodontalen Gewebe führen, aber auch weitere Botenstoffe wie Interferon (IFN)- γ aktivieren. Sie selbst können zum einen zu einer gesteigerten Aktivität von ADAM-Proteasen führen, zum anderen sind sie selber oder ihre entsprechenden Rezeptoren Substrate der ADAM-Proteasen.

2.2 ADAM-Proteasen

2.2.1 Struktur von ADAM-Proteasen

ADAM-Proteasen sind Typ-I-Transmembranproteine, welche eine wichtige Rolle bei der Zelldifferenzierung, -adhäsion, -migration und Signalweiterleitung spielen. Es konnten 40 verschiedene ADAM-Proteasen identifiziert werden. Im menschlichen Genom wurden 22 ADAM-Proteasen beschrieben, wovon lediglich 12 proteolytisch aktiv sind [84]. Ihren Namen besitzen sie aufgrund ihrer strukturellen Ähnlichkeit zur Familie der *snake venom metalloproteinases* (SVMPs). Sie weisen beide eine Prodomäne, eine Metalloproteinase- und Disintegrindomäne sowie eine cysteinreiche Domäne auf. Zusätzlich besitzen die ADAM-Proteasen jedoch noch eine EGF-ähnliche Domäne, eine transmembrane Domäne sowie einen intrazellulären C-Terminus [49] (Abbildung 2). Eine Ausnahme bilden hier ADAM10 und ADAM17, welche lediglich eine membranproximale Domäne besitzen. Die proteolytische Aktivität, welche eine Zinkbindung benötigt, wird durch ein spezifisches Aminosäuremotiv in der Metalloproteinasedomäne der ADAM-Proteasen definiert [45,56].

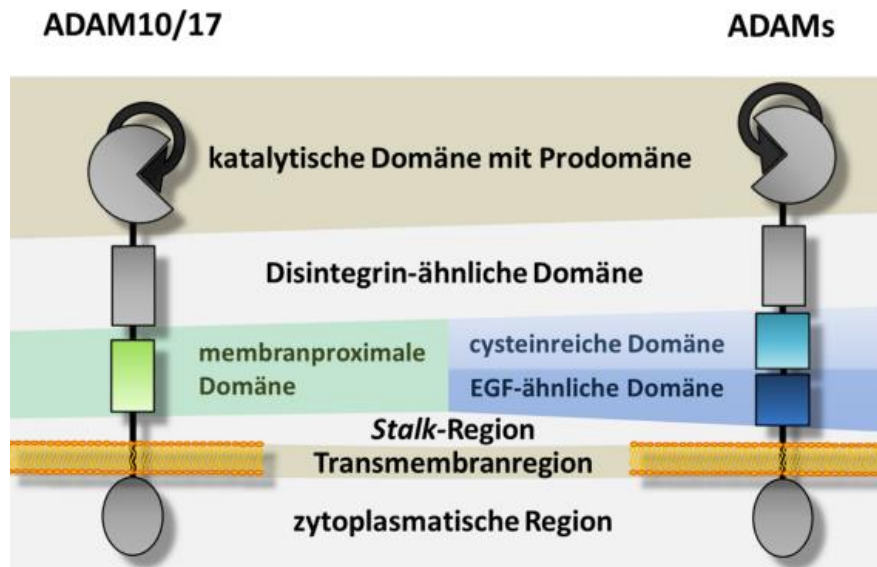


Abbildung 2 Schematische Darstellung der ADAM-Proteasen:

Die Abfolge der extrazellulären Domänen von ADAM10 und ADAM17 vom N-Terminus zum C-Terminus ist wie folgt: Prodomäne, katalytische Domäne, Disintegrin-ähnliche Domäne und membranproximale Domäne. Darauf folgen die Stalk-Region, die Transmembranregion und die zytoplasmatische Region. Alle anderen Mitglieder der ADAM-Proteasen besitzen statt der membranproximalen Domäne eine cysteinreiche sowie eine EGF-ähnliche Domäne [36].

Nach ihrer Synthese im endoplasmatische Retikulum und dem anschließenden Transport zum Golgi-Apparat durchlaufen ADAM-Proteasen verschiedene Reifungs- und Aktivierungsprozessen. In der Regel, wie auch für ADAM10 und ADAM17, erfolgen im Golgi-Apparat die Glykosylierung und die Abspaltung der inhibitorischen Prodomäne durch die Proprotein-Convertase Furin [4,101]. Eine Ausnahme stellt ADAM8 dar, welches durch autokatalytische Entfernung der Prodomäne im Trans-Golgi-Netzwerk aktiviert wird (Abbildung 3). Dies erfordert die homophile Multimerisierung von mindestens zwei ADAM8-Monomeren über ihre Disintegrindomäne [24,107]. Insbesondere neuere Studien weisen darauf hin, dass nicht nur ADAM8, sondern auch ADAM10 und ADAM17 selber an der Oberfläche abgespalten werden und somit in den Extrazellularraum freigesetzt werden [105]. Zusätzlich erfolgt eine Freisetzung in extrazellulären Vesikeln [10,52,120].

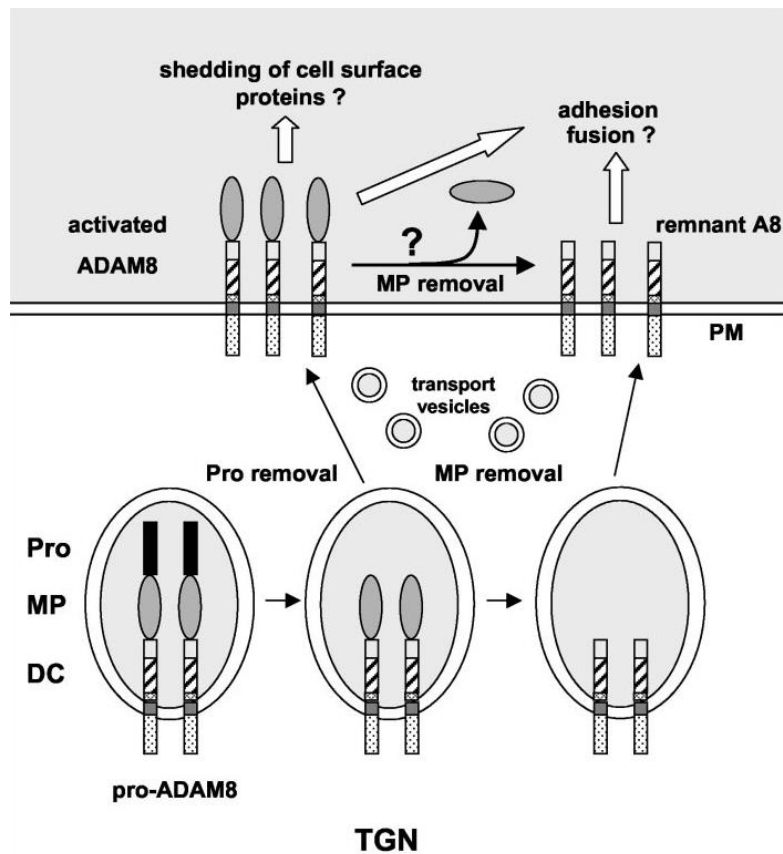


Abbildung 3 Vorgeschlagenes Modell für die ADAM8 Prozessierung und mögliche Funktionen [107]:

Nach Passage durch den medialen Golgi-Apparat wird pro-ADAM8 durch Autokatalyse in der Region zwischen der Prodomäne und der Metalloproteinasedomäne prozessiert. In dieser prozessierten Form wird ADAM8 zur Zelloberfläche transportiert, wo es als Sheddase wirken kann (*activated ADAM8*). Ein großer Teil von ADAM8 wird durch das Abspalten der MP-Domäne weiter prozessiert, wodurch es zur Entstehung der ebenfalls transmembranen *remnant* Form kommt. Diese vermittelt wie generell für die intrazelluläre und die Disintegrin-Domäne angenommen – die Zelladhäsion, Migration sowie möglicherweise auch der Zellfusion. (schwarze Pfeile: Prozessierung, weiße Pfeile: Funktion; trans-Golgi-Netzwerk (TGN), Metalloproteinasedomäne (MP), Disintegrindomäne (DC))

2.2.2 Funktionen der Domänen

Aktivierbare ADAM-Proteasen findet man sowohl auf den Membranen des Golgi-Apparats als auch auf der Plasmamembran [101]. Die Prodomäne selbst agiert als Chaperon und dient somit der korrekten Faltung der ADAM-Proteasen [82]. Zu ihrer Funktion gehört ebenfalls, die Proteinase in einem ruhenden Zustand zu halten [4,13]. Der ruhende Zustand wird über einen sogenannten *cysteine-switch* aufrechterhalten. Das in der Prodomäne enthaltene Cystein koordiniert das auf der aktiven Seite vorhandene Zink-Atom und kann so die Metalloproteinasedomäne in inaktiver Konformation binden. Wenn die Prodomäne wie oben beschrieben abgespalten wird, ändert das Zink-Atom seine Koordination zur Metalloproteinasedomäne und wird so aktiviert [109]. Die Disintegrindomäne hat eine große Bedeutung bei der Zell-

Zell-Interaktion über Integrine [66]. Außerdem dient sie der richtigen Positionierung der katalytischen Domäne zum jeweiligen Substrat [122]. Die cysteinreiche Domäne ist in der Lage, die ADAM-Aktivität über intramolekulare Verbindungen zur enzymatisch aktiven Domäne zu modulieren [109,110,116]. Des Weiteren erfolgen hierüber unabhängig von der Disintegrin-Integrin-Interaktion Bindungen an die extrazelluläre Matrix [22]. Die genaue Rolle der *epidermal growth factor* (EGF)-like Domäne ist noch unklar [84]. Diese Domäne ist jedoch unter anderem für die Verankerung des Proteins mit der Zellmembran mit verantwortlich [22]. Ebenso zeigt die membranproximale Domäne eine Bedeutung bei der Substraterkennung, wie auch beim *shedding* des IL-6R und IL-1R_{II} [78,100]. Die zytoplasmatische Domäne ist eine in ihrer Länge und Sequenz der aneinandergereihten Aminosäuren eine sehr variable Domäne. Durch ihre Anbindungen an das Zytoskelett sowie z.B. Phosphorylierungsstellen und Calmodulin-Bindestellen übt die zytoplasmatische Domäne wichtige Funktionen in der Signaltransduktion und Funktion von Zellen aus [66,103,132].

2.2.3 Regulation und Funktion von ADAM-Proteasen

Eine der wichtigsten biologischen Funktionen von ADAM-Proteasen ist die Spaltung anderer Transmembranproteine nahe der Zelloberfläche, das sogenannte *ectodomain shedding*. Hierbei weisen ADAM-Proteasen sowohl eine konstitutive als auch eine induzierbare Aktivität auf. Beispielsweise werden CXCL16 und CX3CL1 als Chemokine konstitutiv durch ADAM10 gespalten [92,111], wobei die induzierte Spaltung des CX3CL1 insbesondere durch ADAM17 vermittelt wird. Beide Chemokine sind essentiell für die Rekrutierung und Migration von Makrophagen und Lymphozyten [120].

Es gibt verschiedenste Signaltransduktionswege, über welche ADAM-Proteasen aktiviert werden und ihre Funktion ausüben. Eine Aktivierung erfolgt beispielsweise über Bakterien, welche die angeborene und adaptive Immunantwort beeinflussen. Bakterien werden durch ihre pathogen-assoziierten molekularen Muster, wie Lipopolysaccharid, Lipoteichonsäure und Flagellin, vom Körper über keimbahnkodierte Mustererkennungsrezeptoren wie bspw. den Toll-like Rezeptoren, *nucleotide-binding oligomerization domain*- (NOD)-like Rezeptoren und Scavenger-rezeptoren erkannt (Abbildung 4). Dies hat zur Folge, dass unter anderem Zytokine wie IL-1 β , IL-6, TNF- α ausgeschüttet werden. Darauf folgend kommt es zur Chemotaxis und Aktivierung von neutrophilen Granulozyten, T-Zellen, Monozyten und dendritischen Zellen. Können sich die entzündungsauslösenden Keime, wie die für die Parodontitis bedeutenden Bakterien *Porphyromonas gingivalis* und *Fusobacterium nucleatum* der Immunant-

wort entziehen, wird die Entzündung weiter gefördert. Zusätzlich zu den Zytokinen fördern reaktive Sauerstoffspezies (ROS) die Expression von ADAM-Proteasen [2].

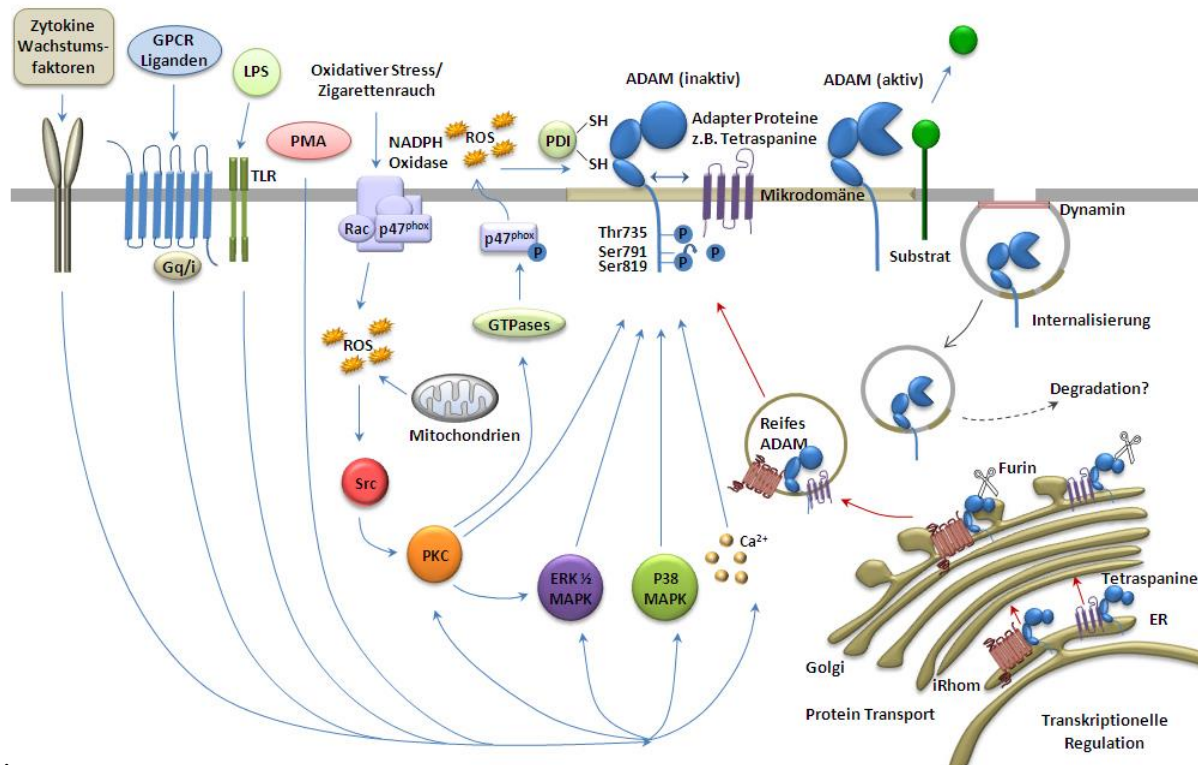


Abbildung 4 Mögliche Regulationswege von ADAM10 und ADAM17 [42]:

Das Substrat-Shedding durch ADAM10 und -17 kann durch Zellstimulation mit Wachstumsfaktoren, z. B. *vascular endothelial growth factor* (VEGF), Zytokinen (z.B. TNF- α und IFN- γ), *toll-like-receptor* (TLR)-Liganden (z.B. Lipopolysaccharide (LPS)), *protein-coupled receptor* (GPCR)-Liganden (z.B. Thrombin), Phorbolster (z.B. Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA)), Kalzium-Ionophoren (z.B. Ionomycin) oder oxidativem Stress (ROS) gesteigert werden. Dies resultiert in intrazellulären Signalkaskaden, an denen Proteinkinase C (PKC), *extracellular signal-regulated kinases* (ERK1/2), p38, Src-Kinase, intrazelluläres Kalzium oder die Nicotinadeninindinukleotidphosphat (NADPH)-Oxidase beteiligt sein können. Mögliche Regulationswege beinhalten die intrazelluläre Phosphorylierung, eine zelluläre Umverteilung innerhalb von Mikrodomänen (z.B. Lipid-Rafts und Tetraspaninreiche Mikrodomänen), eine Reifung der Proteasen von der pro-Form zur reifen Form, an deren Prozess Proprotein-Konvertasen (z.B. Furin) beteiligt sind, einen Transport aus intrazellulären Speichern zur Plasmamembran, Interaktion mit Adapterproteinen, Konformationsänderungen der Domänenstruktur oder eine Internalisierung der Proteasen.

Auf der Basis der Funktion von ADAM-Proteasen gibt es zahlreiche Möglichkeiten, wie diese in den pathophysiologischen Prozess der Parodontitis eingreifen könnten. Wie oben bereits beschrieben, gibt es die Möglichkeit der direkten Interaktion der Proteasen oder ihrer Substrate mit dem Pathogen bzw. dessen Virulenzfaktoren. Parodontitiden zeichnen sich des Weiteren durch eine Entzündung des Gewebes aus, welche mit der Infiltration von Entzündungszellen einhergeht. In zahlreichen Vorarbeiten konnte gezeigt werden, dass ADAM-Proteasen in allen Bereichen der Entzündung beteiligt sind. Hierzu gehören die initiale Freisetzung von

Zytokinen und anderen Botenstoffen, die Spaltungen von Zellverbindungen und die damit einhergehende Ödembildung, die Rekrutierung von Entzündungszellen und die letztliche Regeneration des Gewebes [126]. ADAM17 wurde ursprünglich als *tumor necrosis alpha converting enzyme* (TACE) beschrieben, da es hauptsächlich für die Freisetzung des löslichen TNF- α verantwortlich ist. Die Zellmigration wird nicht nur durch die Freisetzung von Zytokinen und Chemokinen sowie die Regulation von Adhäsions- und Junctionsmolekülen beeinflusst, sondern auch durch Veränderungen im Zytoskelett der Zellen und der extrazellulären Matrix. Es konnte gezeigt werden, dass beispielsweise ADAM10 die Zytoskelettlagerung von migrierenden Entzündungszellen verändert und ADAM8 essentiell für die Migration von neutrophilen Granulozyten ist [24,97]. ADAM-Proteasen besitzen nicht nur eine proteolytische Funktion, sondern können über ihre Disintegrindomäne mit Integrinen sowie Bestandteilen der extrazellulären Matrix interagieren. Gleichzeitig erfolgt eine Aktivierung anderer Metalloproteinasen, wie z.B. *matrix metalloproteinase* (MMP)9 im Falle von ADAM8, wodurch der Gewebeumbau und eine Fibrosierung gefördert wird [34]. Die Funktion von ADAM8, -10 und -17 in parodontalen Erkrankungen wurde bisher noch nicht systematisch untersucht. Es konnte bereits gezeigt werden, dass die *messenger ribonucleic acid* (mRNA)- und Proteinexpression von ADAM8 im Gewebe von PatientInnen, welche an chronischer Parodontitis litten, im Vergleich zum Gewebe parodontal gesunder PatientInnen erhöht ist. Ebenso wurde in Zellkulturversuchen in humanen epithelialen Zellen eine signifikant vermehrte ADAM8 mRNA-Expression verzeichnet, nachdem diese Zellen mit *Fusobacterium nucleatum* als parodontalpathogenem Keim, stimuliert wurden. Jedoch war in humanen gingivalen Fibroblasten bei gleicher Stimulation kein Anstieg der Expression zu erkennen [9]. Es konnte auch eine positive Korrelation zwischen dem Auftreten von ADAM8 und einer stärker werdender Parodontitis nachgewiesen werden, wobei nicht die Aktivität der Protease ermittelt wurde [87]. In Bezug auf ADAM10 und ADAM17 wurden ebenfalls nur Genexpressionsstudien durchgeführt [67,124] und keine eindeutigen Proteinexpressionsstudien [38,74], oder eine indirekte Verbindung über verwendete Inhibitoren in der Zellkultur hergestellt [55,99]. Die bisherigen Ausführungen bezogen sich überwiegend auf die Sulkusflüssigkeit oder das parodontale Gewebe. Es gibt Hinweise auf eine positive Korrelation des *receptor activator of NF- κ B ligand* (RANK-Liganden) und ADAM17 [15], was auf einen verstärkten Knochenabbau hinweisen könnte. Aber auch dieser Aspekt wurde nicht systematisch untersucht. Allen bisherigen Studien gemeinsam ist jedoch, dass a) häufig nur Genexpressionsstudien durchgeführt wurden,

obwohl ADAM-Proteasen nur bedingt auf Genexpressionsebene reguliert sind, b) die unterschiedlichen Aktivierungsformen nicht betrachtet wurden und c) nicht zwischen Expression und Aktivität unterschieden wurde.

2.3 Ziel der Arbeit / Fragestellung

Um ADAM-Proteasen hinsichtlich ihrer diagnostischen, prognostischen oder therapeutischen Parameter in parodontalen Erkrankungen betrachten zu können, sollten im Rahmen dieser Studie folgende Hauptfragestellungen adressiert werden:

- Wie ist die Protein- und Genexpression von ADAM8, ADAM10 und ADAM17 in parodontalen Erkrankungen verändert?
- In welcher Form liegen diese Proteasen vor (membrangebunden, löslich, aktiv, inaktiv)?
- Welche funktionellen Konsequenzen ergeben sich aus diesen Beobachtungen?
- Welcher Gesamteinfluss ergibt sich hieraus auf die Progression parodontaler Erkrankungen?

3 Material und Methode

3.1 PatientInnen

An der vorliegenden Studie nahmen 68 PatientInnen Teil, woraus sich aufgrund des Befalls mehrere Zähne pro PatientInn 176 Proben ergaben (Tabelle 1, Tabelle 2). Dabei wurden alle PatientInnen nach der 2018 auf dem EuroPerio9-Kongress eingeführten Einteilung der Parodontitis in Stadien (Stadium I-IV) und Grade (A-C) eingeteilt. Die Stadien zeigen hierbei den Schweregrad und die Grade die voraussichtliche Progression der Parodontitis an (2.1.5 Staging und Grading).

In dieser Studie haben wir die PatientInnen in gesund, Stadium I+II und III+IV eingeteilt. 18 PatientInnen wurden in die Stadien I+II und Grad A/B eingeteilt. PatientInnen des Stadium III teilten sich in elf Personen aus dem Grad B und 14 Personen des Grad C. Vier PatientInnen befanden sich im Stadium IV Grad B und sechs PatientInnen im Stadium IV Grad C.

Tabelle 1 PatientInnenanzahl

| PatientInnenmenge | Gesunde PatientInnen | Parodontitis PatientInnen |
|----------------------------------|----------------------|---------------------------|
| Alter, männlich (in Jahren) | 40 ± 19 | 51 ± 21 |
| Alter, weiblich (in Jahren) | 40 ± 22 | 50 ± 20 |
| Geschlecht, männlich, n (%) | 6 (40%) | 32 (60,4%) |
| Geschlecht, weiblich, n (%) | 9 (60%) | 21 (39,6%) |
| stage I/II, grad A/B, männlich | - | 15 (83,3%) |
| stage I/II, grad A/B, weiblich | - | 3 (16,7%) |
| stage III/IV, grad A/B, männlich | - | 7 (46,7%) |
| stage III/IV, grad A/B, weiblich | - | 8 (53,3%) |
| stage III/IV, grad C, männlich | - | 10 (50%) |
| stage III/IV, grad C, weiblich | - | 10 (50%) |

Tabelle 2 Probenanzahl

| Proben | Anzahl |
|------------------------|--------|
| gesund | 33 |
| stage I/II, grad A/B | 45 |
| stage III/IV, grad A/B | 54 |
| Stage III/IV, grad C | 44 |
| Gesamt | 176 |

Die Probenentnahme wurde zum einen in der Klinik für Zahnerhaltung, Parodontologie und präventive Zahnheilkunde (Gebäude 73) des Universitätsklinikums des Saarlandes und zum anderen in der zahnärztlichen Gemeinschaftspraxis Reinstädler und Hektor (Grubenstraße 5 66787 Wadgassen-Hostenbach) durchgeführt. Im Vorfeld wurde das für die Entnahme verantwortlichen medizinische Personal bezüglich der Entnahmetechnik und insbesondere der Probenlagerung geschult. Die Aufteilung zwischen den zwei Probenentnahmestellen diente der Erhöhung der Probenzahl in den verschiedenen Stadien parodontaler Erkrankungen. Die verwendeten Einschluss- und Ausschlusskriterien sind in (Tabelle 3) näher beschrieben. Die Probenanalyse selber wurde zentral im Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie (FR2.4), ZHMB-Gruppe Molekulare Pharmakologie durchgeführt, so dass es sich nicht um eine Multizentren-Studie handelte.

Tabelle 3 Ein- und Ausschlusskriterien bei der PatientInnenwahl

| Einschlusskriterien | Ausschlusskriterien |
|---|---|
| Parodontal gesunde PatientInnen | Akute virale und bakterielle Infektionskrankheiten |
| PatientInnen mit nachgewiesener Parodontitis unterschiedlicher Krankheitsstadien und – graden | Schwangere |
| PatientInnen zwischen 30. und 70. Lebensjahr | Minderjährige |
| Bereits begonnene Parodontitistherapie; <i>Status quo</i> wird als Stadium angesehen | Antibiotikaeinnahme innerhalb der letzten 3 Monate |
| Mindestzahl an vorhandenen Zähnen größer 20 | Anwendung von Mundspüllösungen (direkt vor der Behandlung) |
| | Systemische Grunderkrankungen wie: 1. Pankreas- und Prostatakarzinom 2. Gliome 3. Alzheimer 4. rheumatoide Arthritis 5. Multiple Sklerose 6. Diabetes mellitus 7. akute- und chronische Lungenerkrankun- |

| | |
|--|------------------------------------|
| | gen |
| | 8. kardiovaskuläre Erkrankungen |
| | 9. hepatische Erkrankungen |
| | PatientInnen mit Suchterkrankungen |
| | Fehlende Einverständniserklärung |

In die Studie eingeschlossen wurden ebenfalls parodontal gesunde PatientInnen, welche als Referenzwerte herangezogen wurden, um mögliche Expressions-, Maturierungs- und Aktivierungsunterschiede detektieren zu können. Das Alter der PatientInnen wurde auf das 30. bis 70. Lebensjahr beschränkt. Eine Studie aus den USA 2013 beschrieb die Parodontitisprävalenz bei über 30-Jährigen auf mehr als 47% welche mit dem Alter zunehmend ist [16]. Die obere Altersgrenze wurde auf 70 Jahre festgelegt, da mit Zunahme des Alters auch der Anteil an chronischen Vorerkrankungen steigt [31]. Eine Mindestzahl von 20 vorhandenen Zähnen wurde vorausgesetzt, da PatientInnen mit weniger als 20 vorhandenen Zähnen automatisch in Stage IV einzuordnen sind und in der Regel ein solch schlechter oraler Zustand vorliegt, dass eine saubere Entnahme von Sulkusflüssigkeit erschwert wird. PatientInnen aus der Spalte „Ausschlusskriterien“ (Tabelle 3) wurden aufgrund nachweislicher Effekte auf parodontale Erkrankungen und/oder die Expression von ADAM-Proteasen von der Studie ausgeschlossen. Zudem zeigt die Parodontitis z.T. mit den oben genannten Ausschlusskriterien gemeinsame pathogenetische Faktoren, sodass eine Veränderung der ADAM-Proteasen-Expression nicht eindeutig zuzuordnen wäre. Im Folgenden sind die Ausschlusskriterien kurz begründet.

1. Pankreas- Prostatakarzinom: Erhöhte Expression von ADAM8, -10, -17 [35,102] [23,108,125][68].
2. Gliome: Unter Gliomen versteht man Hirntumoren, welche sich aus Gliazellen entwickeln. Hierbei stellen die Glioblastome die häufigste Form von primär bösartigen Hirntumoren dar, welche eine erhöhte Expression von ADAM8, -10, und – 17 aufweisen [75,114].
3. Alzheimer: Kompetitive Spaltung des *amyloid-precursor-protein* (APP) durch Beta-Sekretase1 (BACE1) und ADAM10 [18,44][72,96]; verringerte Expression von ADAM10 auf Thrombozyten [80].
4. Rheumatoide Arthritis: chronisch entzündliche Erkrankung mit erhöhter Expression von ADAM8 und -17 [21,129]. Da bei der rheumatoiden Arthritis auch Knochenverlust charakte-

ristisch ist, zeigt sich hier ebenfalls wie beim Diabetes mellitus eine bidirektionale Beeinflussung zur Parodontitis [27,89].

5. Multiple Sklerose: ADAM17 zeigt eine erhöhte Expression im Gewebe von PatientInnen mit multipler Sklerose und aktiviert durch die Spaltung von TNF- α die Entzündungsreaktion im zentralen Nervensystem [93].

6. Diabetes mellitus: Der Zusammenhang zwischen der Parodontitis und Diabetes ist bidirektional [61]. Bei nicht gut eingestellten Diabetikern ist in Folge von Hyperglykämie ein vermehrtes Vorkommen von Endprodukten der Glykierung, sogenannte *advanced glycation end-products* (AGE), zu verzeichnen. Diese fördern unter anderem Entzündungsreaktionen, den Umbau der Extrazellulärmatrix und Knochendestruktion, was die Parodontitis vorantreibt [40,81,95]. Ebenso wurden in diabetischen Mausmodellen eine erhöhte Gen- sowie Proteinexpression von ADAM17 nachgewiesen [112,123,127].

7. Lungenerkrankungen: ADAM-Proteasen zeigen sowohl in akuten als auch in chronischen Erkrankungen eine erhöhte Expression und somit auch eine erhöhte Freisetzung von Entzündungsmediatoren [33].

8. Kardiovaskuläre Erkrankungen: Die Expression von ADAM8, -10 und -17 sind bei kardiovaskulären Erkrankungen erhöht und greifen durch die Spaltung von Cadherinen, Chemokinen und Zytokinen in die Pathogenese ein [17,32,106]. In den Plaques atherosklerotischer Gefäße konnte die *deoxyribonucleic acid* (DNA) der parodontalpathogenen Keimen *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Bacteroides forsythus*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, nachgewiesen werden [47].

9. Hepatische Erkrankungen: Erhöhte Expression und Freisetzung spezifischer Substrate wie *heparin-binding-EGF-like growth factor* (HB-EGF), *transforming growth factor- α* (TGF- α) durch ADAM17 oder Notch durch ADAM10. Damit ist hier ebenso die Wichtigkeit der ADAM-Proteasen bei Tumorentstehung und -progression zu beobachten [23,65].

Die Studie wurde von der Ethik-Kommission der Landesärztekammer des Saarlandes im Vorfeld genehmigt (Votum 345/20, Daniela Yildiz und Matthias Hannig). Vor Entnahme der Proben wurde den PatientInnen ein Informationsblatt bezüglich der Ziele der Arbeit, Hintergrundinformationen und mögliche Risiken der Abnahme ausgeteilt und im Anschluss besprochen. Des Weiteren wurde eine Einwilligungserklärung ausgehändigt. Auf dieser bestätigten die PatientInnen unter anderem die Zurverfügungstellung der Proben, dass sie über die Bedeutung und Tragweite der Studie aufgeklärt wurden, ausreichend Zeit für Rückfragen zur

Verfügung standen und zur Kenntnis genommen wurde, dass die freiwillige Mitwirkung jederzeit beendet werden kann. Außerdem willigten die PatientInnen damit ein, dass personenbezogene Daten von einem angehenden Zahnmediziner eingesehen werden dürfen (7.3.1 Einwilligungserklärung Gemeinschaftspraxis/Klinik, 7.3.2 Patienteninformationen Gemeinschaftspraxis/Klinik).

3.2 Probenentnahme

Vor der Probenentnahme wurden die Papierspitzen mittels Präzisionswaage abgewogen und vier Papierspitzen pro Reaktionsgefäß vorgelegt. Die Oberfläche der ausgewählten Zähne wurde zur Entfernung von Debridement mit Watterolle gereinigt und mittels sanften Luftstoß von Speichel befreit. Die relative Trockenlegung erfolgte im Oberkiefer durch Einbringen einer Watterolle vestibulär und im Unterkiefer durch Watterollen vestibulär und lingual. Die Papierspitzen wurden in die Zahnfleischtaschen eingeführt und dort für 30 Sekunden belassen. An bis zu drei weiteren Entnahmestellen des gleichen Zahnes wurde analog verfahren und alle Spitzen zusammen in ein Reaktionsgefäß transferiert, sodass sich immer die vier zuvor abgewogenen Spitzen wieder in dem Reaktionsgefäß befanden (Abbildung 5). Die Lagerung erfolgte bis zur Weiterverarbeitung bei 4°C für maximal sieben Tage.

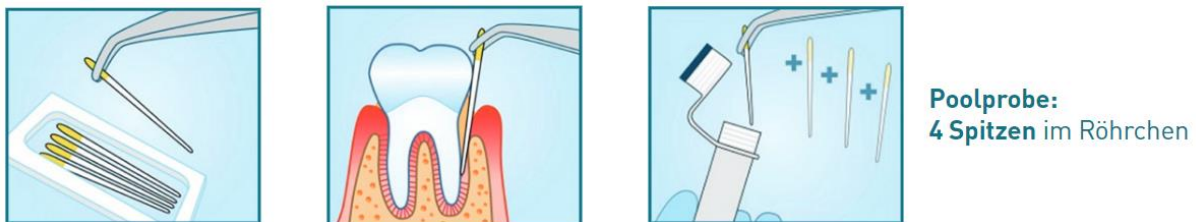


Abbildung 5 Probenentnahmeschema [133]:

Hier dargestellt ist die Entnahme der für die Aufnahme der Sulkusflüssigkeit notwendigen Papierspitzen, welche im Anschluss die Sulkusflüssigkeit aus dem Probengebiet aufnehmen und dann in die Teströhrchen gegeben werden.

Durch das erneute Wiegen der Papierspitzen wurde das Volumen des *gingival-crevicular-fluid* (GCF) ermittelt. Die Papierspitzen wurden zurechtgeschnitten, sodass der komplette Teil, welcher sich mit GCF vollgesogen hatte, sich im Reaktionsgefäß befindet. Der Rest wurde verworfen (Abbildung 6). Das Ziel des Zurechtschneidens ist a) das komplette Überschichten der Proben mittels der entsprechenden Probenpuffer und b) die Reduktion der Puffermenge und damit eine möglichst geringe Verdünnen der Probe.

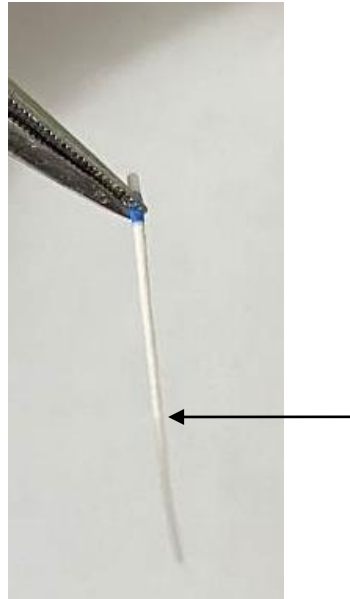


Abbildung 6 Mit Sulkusflüssigkeit vollgesogene Papierspitze:

Der Pfeil markiert die Grenze zwischen der mit GCF vollgesogenen Papierspitze sowie dem noch trockenem Rest der Papierspitze.

Für die Analyse der Proteinexpression mittels *sodium dodecyl sulfate – polyacrylamid gel electrophoresis* (SDS-Page) und Westernblot wurden die zurechtgeschnittenen Spitzen im Probengefäß mit 200µl ADAM-Lysepuffer (5 mM Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris-HCl), 1 mM Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-*N,N,N',N'*-tetraessigsäure (EGTA), 250 mM Saccharose, 0,1% (w/v) SDS, 1% TritonX-100, 1x Complete-Inhibitor (Roche), 1 mM Natriumorthovanadat (Na_3VO_4), 1mM Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF), 10 mM 1,10-Phenanthrolin) überschichtet und 15 Minuten unter mehrmaligem Schwenken auf Eis eluiert. Das Probengemisch wurde im Anschluss fünf Minuten bei 4°C und 16000xg zentrifugiert, der Überstand in ein neues Probengefäß überführt und anschließend bei -80°C gelagert. Für den Aktivitätsassay wurden die Spitzen mit 200 µl Aktivitätspuffer (1 mM Zinkchlorid (ZnCl_2), 20 mM Tris (pH 8.0), 10 mM Calciumchlorid (CaCl_2), 150 mM Natriumchlorid (NaCl), 0,0006% Brij-35) überschichtet und für 20 Minuten unter mehrmaligen Schwenken auf Eis zur Elution inkubiert. Im Anschluss daran wurde das Probengemisch für 10 Minuten bei 4°C und 4000xg zentrifugiert und der Überstand in neue Probengefäße aliquotiert (10 µl für die *bicinchoninic acid* (BCA)- Proteinbestimmung, 24 µl für die Aktivitätsmessung, 160 µl für weitere Messungen und Lagerung bei -80°C, um ein mehrfaches Auftauen der Proben zu verhindern [6].

3.3 BCA

Der BCA-Assay dient der Bestimmung des Gesamtproteingehalts des Probengemisches. Es wurde der ProteinPierce™ BCA™ Protein-Assay von ThermoFisher # 23227 genutzt. Die verwendeten Materialien sind im Anhang aufgelistet (7.1.3 BCA). Dieser Test ist ein kolorimetrischer Test, in welchem Kupferionen an Proteine in der Probe binden und anschließend nach Reduktion im alkalischen Milieu einen hellblauen Komplex bilden. In einer zweiten Reaktion bildet sich ein Chelatkomplex durch die Zugabe von Bicinchoninsäure-Molekülen, wodurch es zu einer Violettverfärbung kommt. Mit steigender Proteinkonzentration nimmt die Violettverfärbung in ihrer Intensität zu, was ebenso in der Zunahme der Extinktionswerte zu erkennen ist. Zunächst wurde aus der *bovinen serumalbumin* (BSA)-Standardlösung (2 mg/ml) eine Kalibrierungsgerade aus folgenden Konzentrationen hergestellt: 0, 10, 20, 40, 60, 80, und 100 µg/ml hergestellt. Die vorbereiteten Proben (3.2 Probenentnahme) wurden ebenso mit destilliertem Wasser 1:100 und 1:200 verdünnt. 50 µl der Probe/Standardverdünnung wurden mit 300 µl BCA-Reagenzgemisch für 30 Minuten bei 60°C inkubiert. Die Messung der Extinktion erfolgte im Anschluss in einer Mikrotiterplatte bei einer Wellenlänge von 562 nm. Anhand der Kalibrierungsgerade wurden die Proteinkonzentrationen ermittelt und entsprechend für die Auftragung der gleichen Proteinmenge im Westernblot sowie zur Normalisierung im Aktivitätsassay verwendet.

3.4 SDS-Page und Westernblot

Die verwendeten Materialien und Pufferzusammensetzungen sind im Anhang aufgelistet (7.1.4.5 Puffer). Für die Durchführung der Elektrophorese wurde das Mini-PROTEAN® Electrophoresis System (Bio-Rad Laboratories) verwendet. Das Gießen der Polyacrylamidgele (PAA) mit einer Dicke von 1,5 mm und 10 Taschen erfolgte mit dem Mini-PROTEAN® Tetra Cell Casting Module #1658019 und den zugehörigen Glasplatten. Das Trenn- sowie Sammelgel wurden nach Anleitung gegossen (7.1.4.5 Puffer). Nach Einbringen des Trenngels, wurde dieses mit Isopropanol überschichtet und für 20 Minuten auspolymerisiert. Das Isopropanol wurde restlos entfernt, das Sammelgel aufgeschichtet und der entsprechende Kamm eingesetzt. Die Gele wurden sofort verwendet oder bei 4°C in einem feuchten Milieu gelagert.

Die zuvor durchgeführte Proteinbestimmung zeigte eine schwache, aber zwischen den Proben gleiche Proteinkonzentration. Daher wurden die Proben 1:5 mit 5x reduzierendem Laemmli-Puffer versetzt, für 30 Minuten bei 60°C denaturiert und 45 µl pro Geltasche aufgetragen.

Durch den Denaturierungsschritt werden mittels des enthaltenen beta-Mercaptoethanols die intra- und intermolekularen Disulfidbindungen gespalten. Das ebenfalls enthaltene SDS dient der Entfaltung der Proteine und verleiht ihnen eine negative Ladung, sodass alle Proteine ein gleiches Ladungs-Masse-Verhältnis aufweisen und die Auftrennung alleine anhand der Molekülgröße erfolgt [71]. Bromphenolblau wird zur optischen Sichtbarmachung verwendet, um unter anderem ein Herauslaufen der Probe aus dem Gel im Gleichstromfeld zu verhindern. Als Lauf-Puffer wurde für die Elektrophorese 1xSDS-Puffer verwendet. Als Größenmarker wurde der *prestained-marker* Fisher BioReagents™ EZ-Run™ verwendet. Die Proben, der Marker und die Kontrollen wurden nach dem in (Abbildung 7) dargestellten Schema aufgetragen.

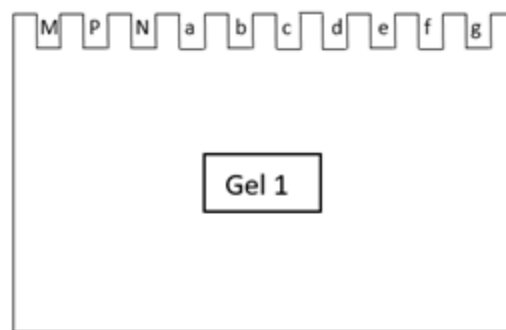


Abbildung 7 Probenauftragungsschema auf Polyacrylamidgelen für den Westernblot:

Als Marker (M) wurde Fisher BioReagents™ EZ-Run™ verwendet. (P) stellt die Positivkontrolle mit ADAM überexprimierenden Zellen, (N) die Kontrolle mit A549 Wildtypzellen dar. (a-g) zeigt die Probenverteilung auf den Gelen. Es wurden 5 µl des Markers und 10 µl der Kontrollen verwendet.

Damit sich die Proteine am Übergang von Sammel- zu Trenngel zu einer scharfen Trennlinie konzentrieren können, wurde eine Spannung von 80V über 20 Minuten angelegt und danach zur Auftrennung auf 160V erhöht.

Westernblot

Der *Blotting*-Vorgang dient dem Transfer der aufgetrennten Proteine aus dem PAA-Gel auf eine Membran. Nachdem die Gele aus den Glasplatten entnommen wurden und das Sammelgel vorsichtig von dem Trenngel entfernt wurde, führte man die Gele nach dem Sandwich-Prinzip (Abbildung 8) mit Vlies, Whatman-Filterpapiere und einer Nitrocellulose-Membran in eine Gelhalterkassette zusammen. Hierbei ist es wichtig darauf zu achten, dass a) alle Bestandteile puffergetränkt sind und b) keine Luftblasen entstehen, welche den Transfervorgang behindern würden.

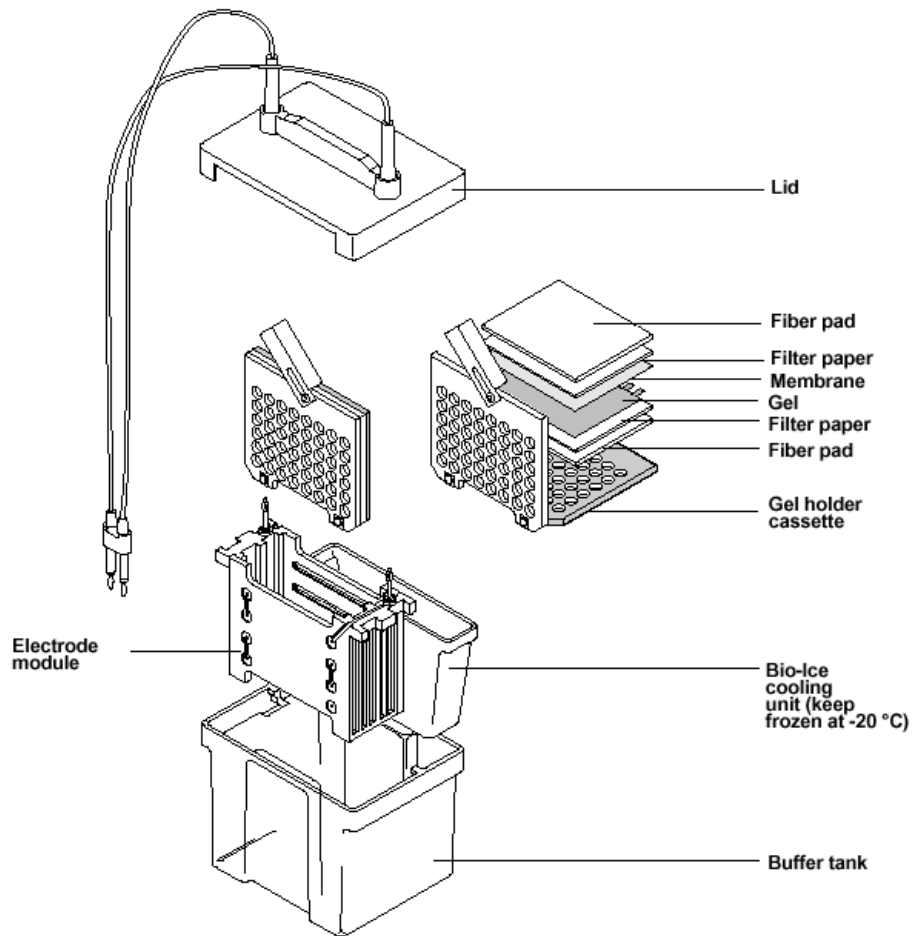


Abbildung 8 Aufbau des *Blotting*-Moduls [134]:

Schematische Darstellung eines *Blotting*-Moduls bestehend aus einem Puffertank, einer Kälteeinheit, einem Elektrodenmodul, der Gelhalterkassette inklusive zweier *Fiber pads*, zwei Filterpapieren, dem mit den Proben versehenem Gel und einer Membran, auf welche die Proben übertragen werden.

Es ist darauf zu achten, dass das *Blotting*-Modul komplett mit *Blotting*-Puffer überschichtet ist und zusätzlich noch mit einer Kühleinheit versehen wird. Der eigentliche *Blotting*-Vorgang findet dann in einem Kühlraum bei 4 °C für 1½ Stunden bei konstant 350 mA statt. Im Anschluss wird die Membran eine Stunde mit einer Lösung aus 5% Magermilch in *tris-buffered saline* (TBS) inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen für den Antikörper auf der Membran zu blockieren. Die Magermilchlösung wird verworfen und die Membran anschließend mit 1xTBS abgespült, um verbliebende Überstände der Lösung zu entfernen. Die Inkubation erfolgt mit dem jeweiligen Primärantikörper über Nacht bei 4 °C unter konstantem Schwenken. Folgende Konzentrationen wurden verwendet: *goat polyclonal anti-human (ectodomain) ADAM8* 0,2 µg/ml, *rabbit polyclonal (C-terminus) anti-human ADAM10* 0,1 µg/ml und *rabbit polyclonal anti-human ADAM17* 0,1 µg/ml sowie *rabbit polyclonal anti-human GAPDH* 0,4 µg/ml. Die Antikörperlösungen wurden in einer Lösung aus 1% BSA+ 0.05% Natriuma-

zid (NaN_3) in TBS angesetzt. Die Inkubation gegen GAPDH erfolgte als interne Ladekontrolle und zur Detektion zellulären Materials.

Die Membran wurde drei Mal 10 Minuten mit 1x TBS mit 0,1% Tween20 (TBST) gewaschen und im Anschluss für eine Stunde mit dem jeweils passenden Sekundärantikörper in 5% Magermilch inkubiert (1:50.000 *anti-rabbit-IgG-HRP* und 1:20.000 *anti-goat-IgG-HRP*). Nach dreimaligem Waschen (zwei Mal 10 Minuten mit 1x TBST und ein Mal 10 Minuten mit 1x TBS) wurde die Membran in *enhanced chemiluminescence* (ECL) zur Detektion der HRP-Aktivität als Nachweis der Antikörperbindung entwickelt und im Fujifilm LAS-3000 Luminescent Image Analyzer Bildanalysesystem gemessen. Die ECL-Methode basiert auf dem Prinzip, dass das Diacylhydrazid Luminol durch eine Peroxidase katalysierte Oxidation auf ein höheres Energieniveau angehoben wird und beim Absinken auf das ursprüngliche Energieniveau Chemilumineszenz durch das Luminol freigesetzt wird. Man nennt diese Methode *enhanced*, also verstärkt, da durch Zugabe von Phenol die Oxidation von Luminol, welche durch die Peroxidase vermittelt wird, um den Faktor 1000 verstärkt wird. Die Auswertung und Quantifizierung der Bandenstärke erfolgte mit dem Programm AIDA Image Analyzer v.4.14. Die Exposition erfolgte für 1, 5 und 60 Minuten mit einer Expositionszeit von 1/100 sec. Zusätzlich wurde ein Weißbild zur Größenbestimmung aufgenommen.

Stripping

Aufgrund der begrenzten Probenmenge wurden die Membranen gegen verschiedene Zielproteine entwickelt. Hierzu wurden die Membranen für 5 Minuten in 1x TBST gewaschen und zur Entfernung der Antikörper für 10 Minuten bei RT im sogenannten Strippingpuffer (7.1.4.5 Puffer) unter ständigem Schwenken inkubiert. Nach dreimaligem Waschen der Membranen für jeweils 10 Minuten in TBST wurde die Membran erneut in 5% Milchpulver in TBS inkubiert und wie oben bereits beschrieben fortgefahren.

3.5 Aktivitätsassay

Proteolytic activity matrix analysis (PrAMA) dient der Bestimmung der Aktivität von proteolytisch aktiven Proteinen in komplexen Proben durch Verwendung spezifischer FRET-Polypeptid-Substrate [83]. Das speziell auf ADAM8 abgestimmte Substrat besitzt eine fluoreszierende Gruppe, *fluorescence resonance energy transfer donor*, und eine fluoreszenzlöschende Gruppe, *quencher fluorophore*. Diese beiden Gruppen sind über einen Aminosäureverbinder zusammengehalten, welche die Proteaseschnittstelle darstellt. Wenn ADAM8 in der

Probe vorhanden ist, kann die Protease an der Schnittstelle den *fluorophore-donor* vom *quencher* spalten, so dass die Fluoreszenz freigesetzt werden kann.

Die verwendeten Materialien sind im Anhang aufgelistet (7.2 PrAMA). Die wie aus dem vorherig beschriebenen aliquotieren Proben (3.2 Probenentnahme) wurden mittels Aktivitätspuffer 1:5 verdünnt. Von der 1:5 Verdünnung wurden 50 µl in Duplikaten auf eine Mikrotiterplatte vorgelegt. Als Positivkontrolle für das FRET-Polypeptid Substrat wurden 49 µl Aktivitätspuffer mit 1 µl 1:100 verdünntem Trypsin verwendet. Als Negativkontrolle fungierten 50 µl Aktivitätspuffer ohne Probenzugabe. In einer zweiten Mikrotiterplatte wurden 60 µl einer 1:500 Verdünnung des FRET-Polypeptid-Substrats in Aktivitätspuffer in entsprechender Anzahl vorgelegt. Von dieser Substratverdünnung wurden dann für die Messung 50 µl auf die bereits auf der ersten Mikrotiterplatte befindlichen Proben gegeben und sofort die Messung gestartet. Alle Schritte wurden auf Eis durchgeführt. Die Messung erfolgte bei 37°C für fünf Stunden, wobei alle 10 Minuten die Fluoreszenz bei einer Exzitationswellenlänge von 485 nm und einer Emissionswellenlänge von 530 nm mittels Multimode-Mikroplattenlesegerät Fluostar BMG Optima gemessen wurde.

3.6 Statistik

Zur grafischen Darstellung der Einteilung der PatientInnen, Gewicht der Papierspitzen sowie Quantifizierung der Westernblots wurden die Mittelwerte bestimmt und in Balkendiagrammen angezeigt. Die Streuung der Werte wurde als Standardabweichung angegeben. Die durchgeführten Aktivitätsmessungen wurden als Liniendiagramm dargestellt.

Die statistische Prüfung erfolgte mittels One-way ANOVA und Tukey Post-test. Das Signifikanzniveau wurde als $p < 0,05$ festgelegt.

4 Ergebnisse

4.1 Studienpopulation

Die Studienpopulation bestand aus 68 Personen, was aufgrund der Begutachtung mehrerer Zähne 176 Proben ergab. Das Geschlechterverhältnis war mit einem Verhältnis von 43,5% Frauen und 56,5% Männern relativ ausgeglichen. Das Durchschnittsalter lag bei 48,2 Jahren, bei Frauen 48,1 Jahre und bei Männer 47,8 Jahre. Neun Frauen und sechs Männer befanden sich in keiner parodontalen Behandlung und wurden klinisch als „gesund“ eingeteilt. Sieben Frauen und 11 Männer kamen als Neubefund ohne vorherige parodontale Behandlung. Acht Frauen und sieben Männer befanden sich in einer parodontalen Therapie, und sechs Frauen und 14 Männer des Studienkollektivs hatten bereits eine parodontale Behandlung durchlaufen. Für die übersichtliche Darstellung der PatientInnenmengen wurden die Stadien I und II, die Stadien III und IV sowie Grad A und B zusammengefasst. Grad C wurde separat betrachtet. In Stadium I/II Grad A/B befanden sich drei Frauen und 15 Männer. Acht Frauen und sieben Männer befanden sich in Stadium III/IV Grad A/B und je zehn Frauen und zehn Männer in Stadium III/IV Grad C (Abbildung 9).

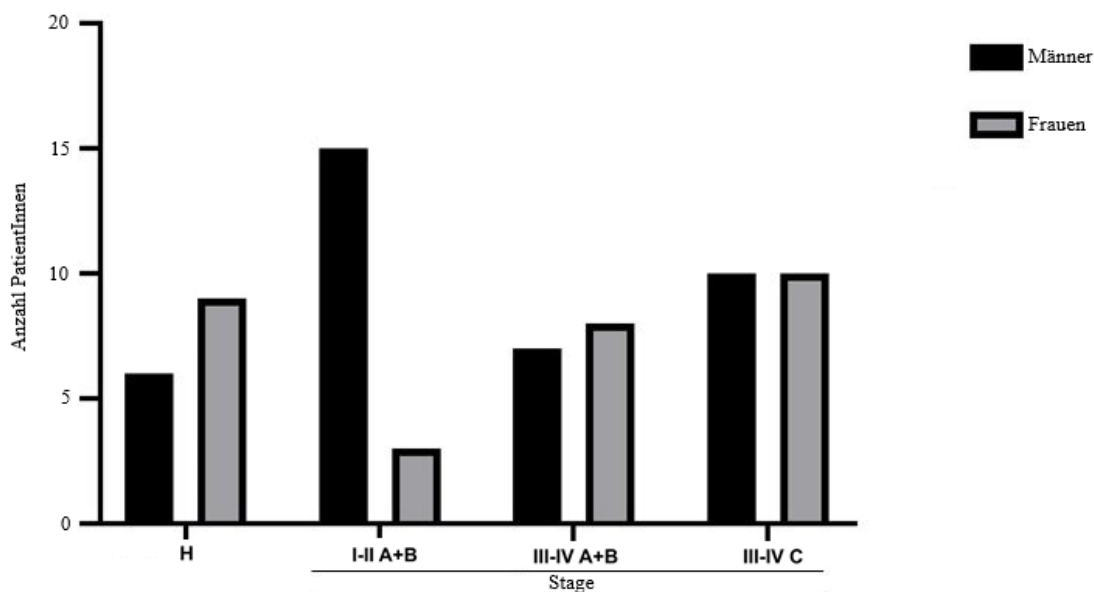


Abbildung 9 Einteilung der PatientInnen nach Geschlecht und Stadium/Grad:

Die PatientInnen wurden anhand des CAL, des röntgenologischen Knochenabbaus in Prozent, Zahnbeweglichkeit, Furkationsbeteiligung und Zahnverlust in die Stadien I bis IV eingeteilt. A+B und C bezeichnet hierbei den Grad der Erkrankung, wobei C die rascheste Progressionsrate darstellt. Ermittelt wird der Grad v.a. durch den Knochenabbau in %/Alter und Modifikationsfaktoren wie das Rauchen oder einem möglichen vorhandenen Diabetes mellitus.

4.2 Gewicht Papierspitzen

Die Messung des Gewichts der Papierspitzen vor und nach Probenentnahme zeigte eine Tendenz zur Zunahme an Sulkusflüssigkeitsproduktion bei parodontal Erkrankten im Vergleich zu parodontal gesunden PatientInnen. Diese Unterschiede waren jedoch nicht signifikant (Abbildung 10).

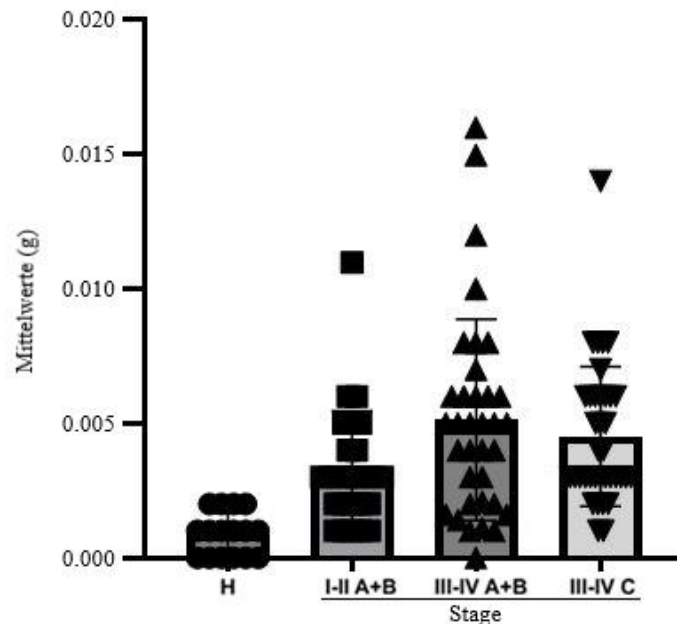


Abbildung 10 Abgenommene Menge an Sulkusflüssigkeit:

Das Gewicht der vier sich im Reaktionsgefäß befindlichen Papierspitzen wurde vor und nach Abnahme der Sulkusflüssigkeit gemessen. Die Differenz hieraus ergab die abgenommene Menge an Sulkusflüssigkeit. Die Daten sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung (SD) dargestellt. Statistische Unterschiede wurden mittels One-way ANOVA und Tukey Post-Test bestimmt. Es konnten keine signifikanten Unterschiede ermittelt werden.

4.3 Proteinexpression von ADAM8, ADAM10 und ADAM17

Um die Proteinexpression sowie das Vorkommen unterschiedlicher Prozessierungsformen der ADAM-Proteasen zu untersuchen, wurden Westernblot-Analysen durchgeführt. Für die bessere Identifizierung der entsprechenden Fragmente wurden Vorversuche mit dentalen Keratinozyten durchgeführt, welche mit $\text{TNF-}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$ und Interferon- γ entzündlich stimuliert wurden (Abbildung 11). Für ADAM8 konnten mit dem verwendeten Antikörper die drei verschiedenen Formen detektiert werden: die 60 kDa *remnant*-Form, die 80/90 kDa mature-Form nach autokatalytischer Abspaltung der inhibitorischen Prodomäne und die 120 kDa pro-Form (Abbildung 11, A). Bei der *remnant*-Form handelt es sich um das Proteinfragment, das nach Abspaltung der extrazellulären Domäne in der Membran zurückbleibt. Für ADAM10 wurde sowohl die mature-Form (70 kDa) als auch die pro-Form (100 kDa) detektiert

(Abbildung 11, B). Für ADAM17 zeigten sich Banden bei 130 kDa und 100 kDa, welche die pro-Form und die mature-Form darstellen (Abbildung 11, C).

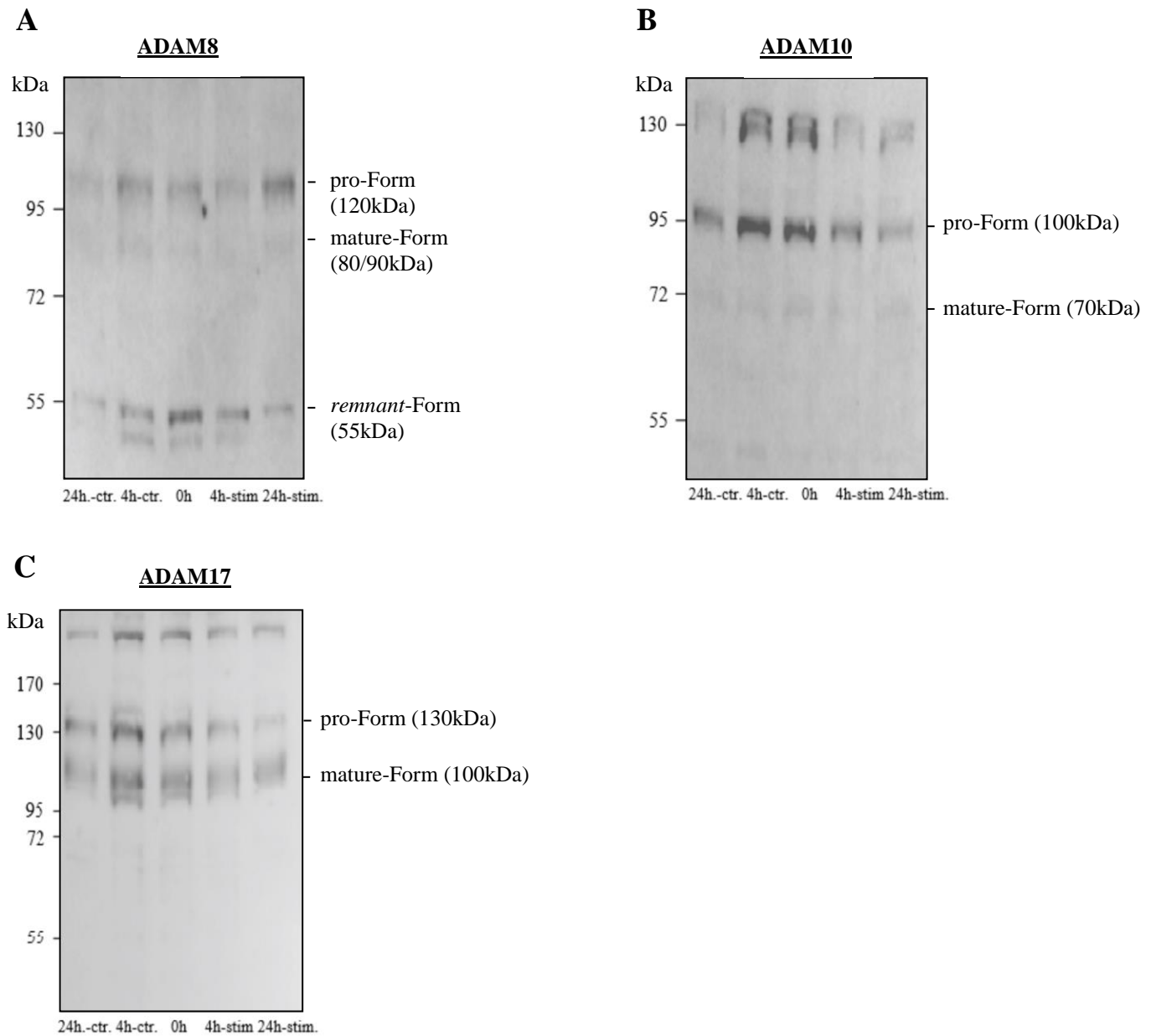


Abbildung 11 Zytokinregulierte Expression von ADAM8, ADAM10 und ADAM17 in oralen Keratinozyten:

A-C: Orale Keratinozyten wurden für vier bzw. 24 Stunden mit einer Zytokinkombination aus TNF- α , IL-1 β und Interferon- γ stimuliert. Als Kontrolle wurden unstimulierte orale Keratinozyten verwendet. Die Gesamtproteinlysate wurden auf 8%igen SDS-Gelen aufgetrennt und auf Nitrocellulose-Membranen übertragen. Der Nachweis von ADAM8 (A) erfolgte durch Inkubation mit 0,2 μ g/ml Primärantikörper bzw. für ADAM10 (B) und ADAM17 (C) mit 0,1 μ g/ml Primärantikörper in 5% Milchpulver sowie anschließender Inkubation mit einem HRP-gekoppelten Zweitantikörper. Die Entwicklung erfolgte mittels ECL im Fujifilm LAS-3000 Luminescent Image Analyzer Bildanalyse-System. Die Bandenintensität wurde anschließend mittels Densitometrie unter Zuhilfenahme der Software AIDA Image Analyzer v.4.14 bestimmt.

Im Folgenden sind die Analysen zur Regulation der ADAM-Proteasen in parodontalen Erkrankungen für ADAM8, ADAM10 und ADAM17 getrennt beschrieben.

4.3.1 ADAM8

In Proben parodontal gesunder PatientInnen konnte keine der drei ADAM8-Prozessierungsformen detektiert werden (Abbildung 13, A-D). Parodontal erkrankte PatientInnen zeigten ein vermehrtes Vorkommen der *remnant*-Form, jedoch war kein Unterschied zwischen den einzelnen Erkrankungsgraden detektierbar (Abbildung 13, C). Die pro-Form war nur in den Stadien III-IV Grad A+B und III-IV Grad C nachweisbar (Abbildung 13, A). Sowohl die mature-Form als auch die pro-Form zeigten bei steigendem Stadium und Grad der Parodontitis eine signifikante Erhöhung der Proteinexpression (Abbildung 13 A, B, exemplarischer Westernblot Abbildung 12). Die Maturation von ADAM8 als *relative expression*, ist als Verhältnis zwischen mature- und pro-Form dargestellt. Es wird eine signifikante Maturation bei steigendem Stadium und Grad der Parodontitis gezeigt (Abbildung 13, D).

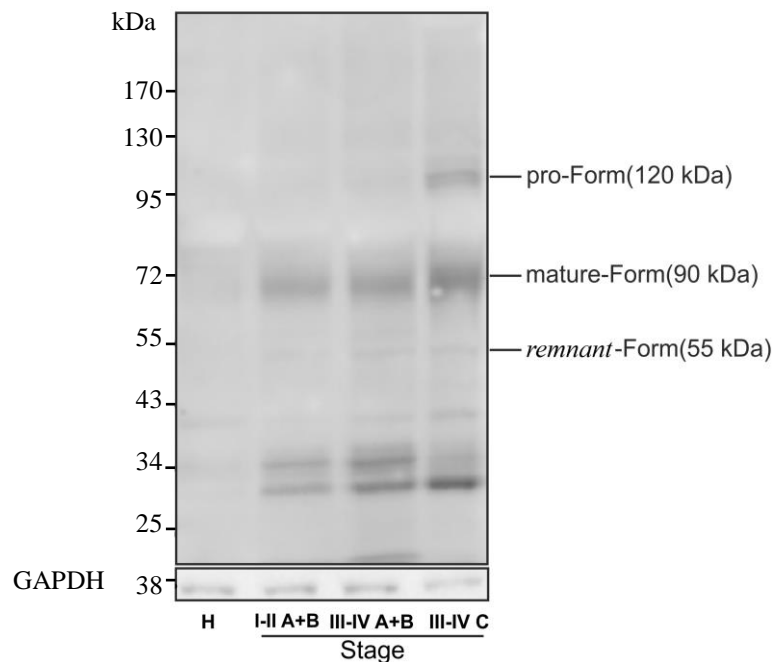


Abbildung 12 Repräsentativer Blot zum Nachweis von ADAM8 im Sulkusfluid:

Die Gesamtproteinlysate wurden auf 8%igen SDS-Gelen aufgetrennt und auf Nitrocellulose-Membranen übertragen. Der Nachweis von ADAM8 erfolgte durch Inkubation mit 0,2 µg/ml Primärantikörper in 5% Milchpulver und anschließender Inkubation mit einem HRP-gekoppelten Zweitantikörper. GAPDH wurde als interne Ladekontrolle verwendet. Die Entwicklung erfolgte mittels ECL im Fujifilm LAS-3000 Luminescent Image Analyzer Bildanalyse-System. Die Proben wurden fortwährend analysiert. Ein repräsentativer Blot zur Visualisierung der einzelnen Stadien ist gezeigt.

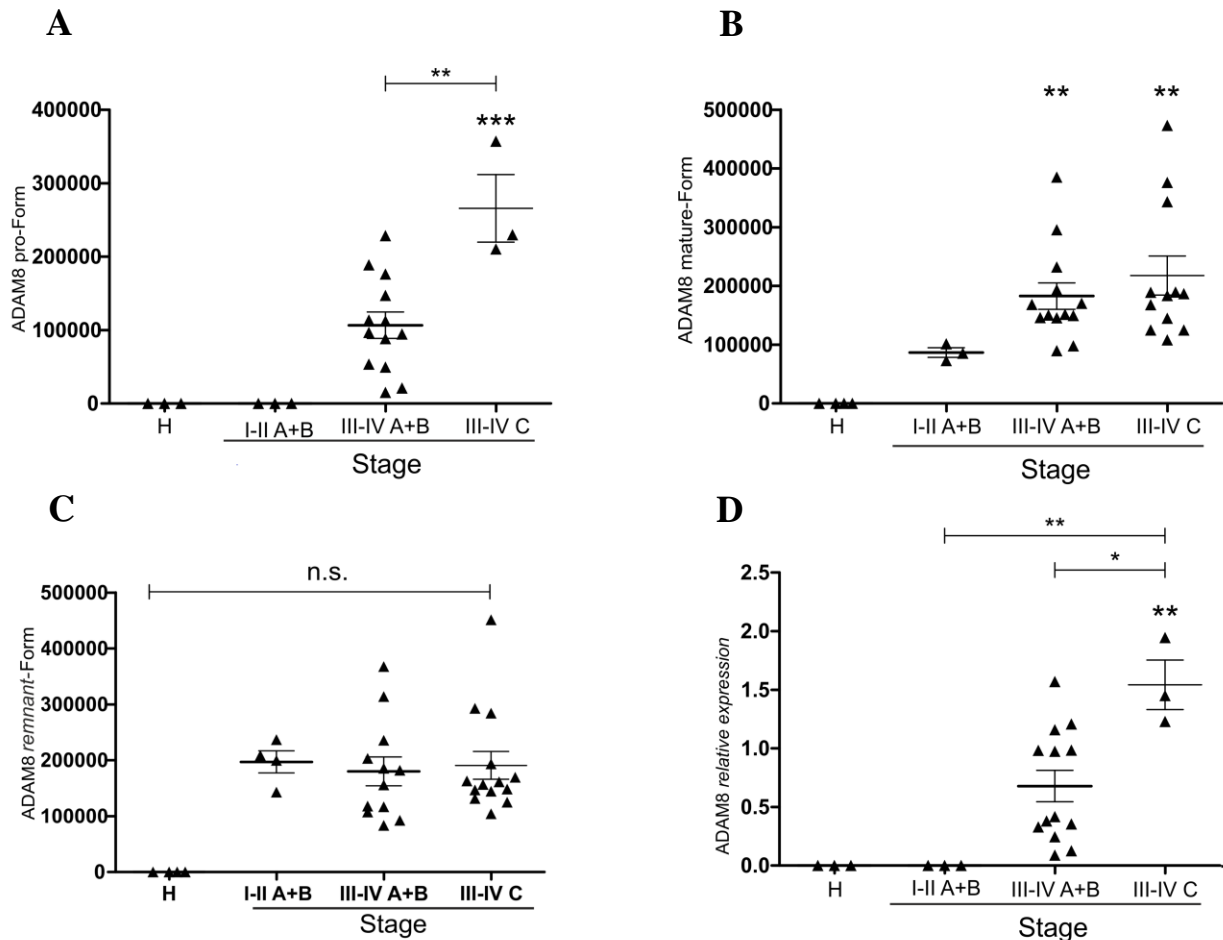


Abbildung 13 Quantifizierung der ADAM8 Proteinexpression im Sulkusfluid:

A-D: Die Gesamtproteinlysate wurden auf 8%igen SDS-Gelen aufgetrennt und auf Nitrocellulose-Membranen übertragen. Der Nachweis von ADAM8 erfolgte durch Inkubation mit 0,2 µg/ml Primäntikörper in 5% Milchpulver und anschließender Inkubation mit einem HRP-gekoppelten Zweitantikörper. Die Entwicklung erfolgte mittels ECL im Fujifilm LAS-3000 Luminescent Image Analyzer Bildanalysesystem. Die Bandenintensität wurde anschließend mittels Densitometrie unter Zuhilfenahme der Software AIDA Image Analyzer v.4.14 bestimmt. A: pro-Form, 120 kDa; B: mature-Form, 80/90 kDa; C: *remnant*-Form, 55 kDa; D: relative Expression: Verhältnis von mature- und pro-Form. Dargestellt sind die Mittelwerte +/- SD. Die entsprechenden n-Zahlen sind der (Tabelle 1) zu entnehmen. Die statistische Prüfung erfolgte mittels One-way ANOVA und Tukey Post-test. n.s.: nicht signifikant, **p<0.01; ***p<0.001.

4.3.2 ADAM10

Wie auch für ADAM8 beschrieben, war in der Sulkusflüssigkeit von gesunden PatientInnen keine Proteinexpression der membranassoziierten Formen von ADAM10 nachweisbar (Abbildung 15, A-E), exemplarischer Westernblot Abbildung 14). Im Gegensatz zu ADAM8 wurde für ADAM10 eine signifikante Abnahme der Expression der pro-Form mit steigendem Stadium und Grad der Erkrankung detektiert (Abbildung 15, A). Die mature-Form zeigte eine Tendenz der Abnahme, welche jedoch nicht signifikant war (Abbildung 15, B). Zusätzlich zu

diesen bekannten Formen wurden Banden bei 44 kDa und 55 kDa detektiert, welche Spaltprodukte von ADAM10 sein könnten (Abbildung 15, D-E). Aufgrund dessen wurden diese Banden in die Quantifizierung mit aufgenommen, zeigten jedoch ebenfalls keine signifikanten Änderungen. Die Maturation von ADAM10 als *relative expression*, ist als Verhältnis zwischen mature- und pro-Form dargestellt. Es ist keine signifikante Maturation erkennbar (Abbildung 15, C).

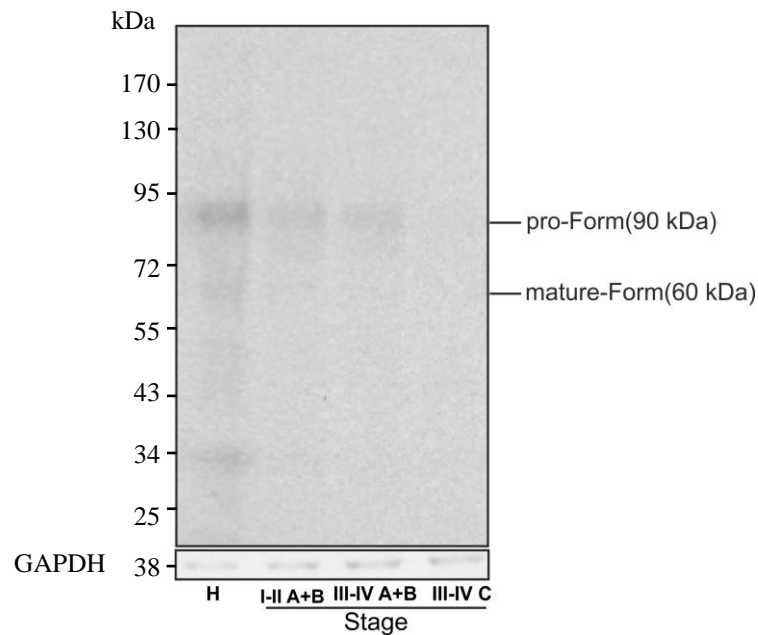


Abbildung 14 Repräsentativer Blot zum Nachweis von ADAM10 im Sulkusfluid:

Die Gesamtproteinlysate wurden auf 8%igen SDS-Gelen aufgetrennt und auf Nitrocellulose-Membranen übertragen. Der Nachweis von ADAM10 erfolgte durch Inkubation mit 0,1 µg/ml Primärantikörper in 5% Milchpulver und anschließender Inkubation mit einem HRP-gekoppelten Zweitantikörper. GAPDH wurde als interne Ladekontrolle verwendet. Die Entwicklung erfolgte mittels ECL im Fujifilm LAS-3000 Luminescent Image Analyzer Bildanalyse-System. Die Proben wurden fortwährend analysiert. Ein repräsentativer Blot zur Visualisierung der einzelnen Stadien ist gezeigt.

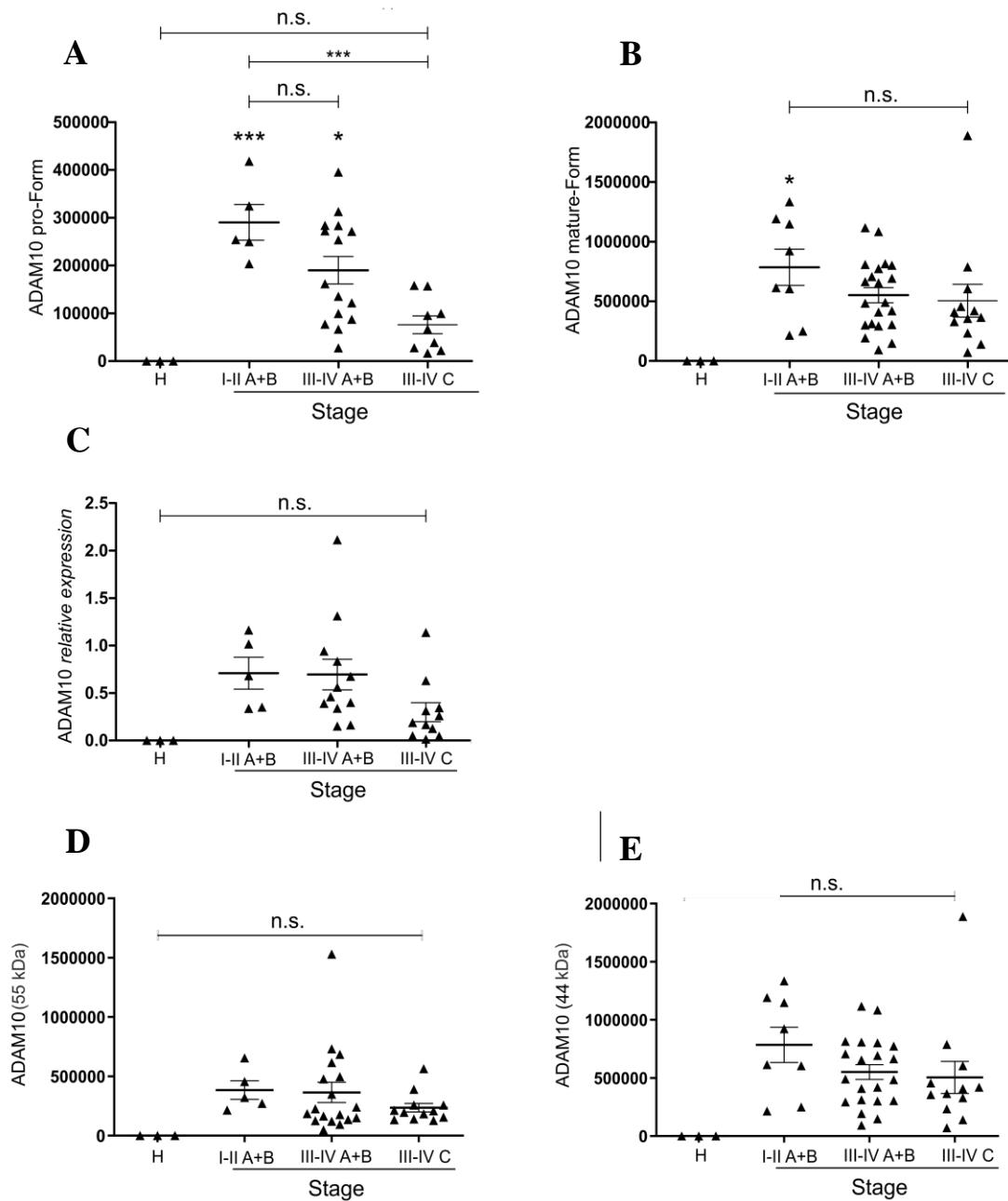


Abbildung 15 Quantifizierung der ADAM10 Proteinexpression im Sulkusfluid:

A-E: Die Gesamtproteinlysate wurden auf 8%igen SDS-Gelen aufgetrennt und auf PVDF-Membranen übertragen. Der Nachweis von ADAM10 erfolgte durch Inkubation mit 0,1 µg/ml Primärantikörper in 5% Milchpulver und anschließender Inkubation mit einem HRP-gekoppelten Zweitantikörper. Die Entwicklung erfolgte mittels ECL im Fujifilm LAS-3000 Luminescent Image Analyzer Bildanalysesystem. Die Bandenintensität wurde anschließend mittels Densitometrie unter Zuhilfenahme der Software AIDA Image Analyzer v.4.14 bestimmt. A: pro-Form, 90 kDa; B: mature-Form, 60 kDa; C: *relative expression*: Verhältnis von mature- und pro-Form; D-E: zusätzliche Banden bei 55-44 kDa. Dargestellt sind die Mittelwerte +/- SD. Die n-Zahlen sind (Tabelle 1) zu entnehmen. Die statistische Prüfung erfolgte mittels One-way ANOVA und Tukey Post-test. n.s.: nicht signifikant, **p<0.01; ***p<0.001.

4.3.3 ADAM17

ADAM17 konnte, übereinstimmend mit ADAM8 und ADAM10, nicht im Sulkusfluid parodontal gesunder PatientInnen nachgewiesen werden (Abbildung 17, A-B). Im Gegensatz dazu war ein deutlicher Anstieg bei parodontaler Erkrankung zu erkennen, wobei keine signifikanten Unterschiede zwischen den Stadien detektiert werden konnten. Lediglich eine Tendenz der Abnahme der pro-Form und der maturen-Form war zu erkennen (Abbildung 17, A-B, exemplarischer Westernblot Abbildung 16). Auch hier wurden zusätzliche Banden im Westernblot detektiert. Diese Banden bei ca. 60 kDa könnten ein Spaltprodukt von ADAM17 sein (Abbildung 16). Die Maturation von ADAM17 als *relative expression*, ist als Verhältnis zwischen mature- und pro-Form dargestellt (Abbildung 17, C).

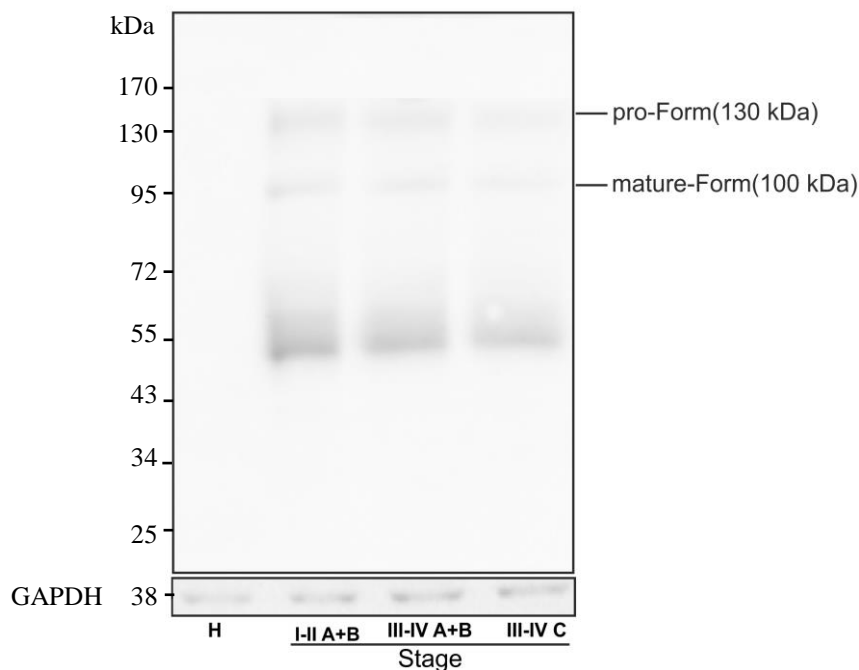


Abbildung 16 Repräsentativer Blot zum Nachweis von ADAM17 im Sulkusfluid:

Die Gesamtproteinlysate wurden auf 8%igen SDS-Gelen aufgetrennt und auf Nitrocellulose-Membranen übertragen. Der Nachweis von ADAM17 erfolgte durch Inkubation mit 0,1µg/ml Primärantikörper in 5% Milchpulver und anschließender Inkubation mit einem HRP-gekoppelten Zweitantikörper. GAPDH wurde als interne Ladekontrolle verwendet. Die Entwicklung erfolgte mittels ECL im Fujifilm LAS-3000 Luminescent Image Analyzer Bildanalyse-System. Die Proben wurden fortwährend analysiert. Ein repräsentativer Blot zur Visualisierung der einzelnen Stadien ist gezeigt.

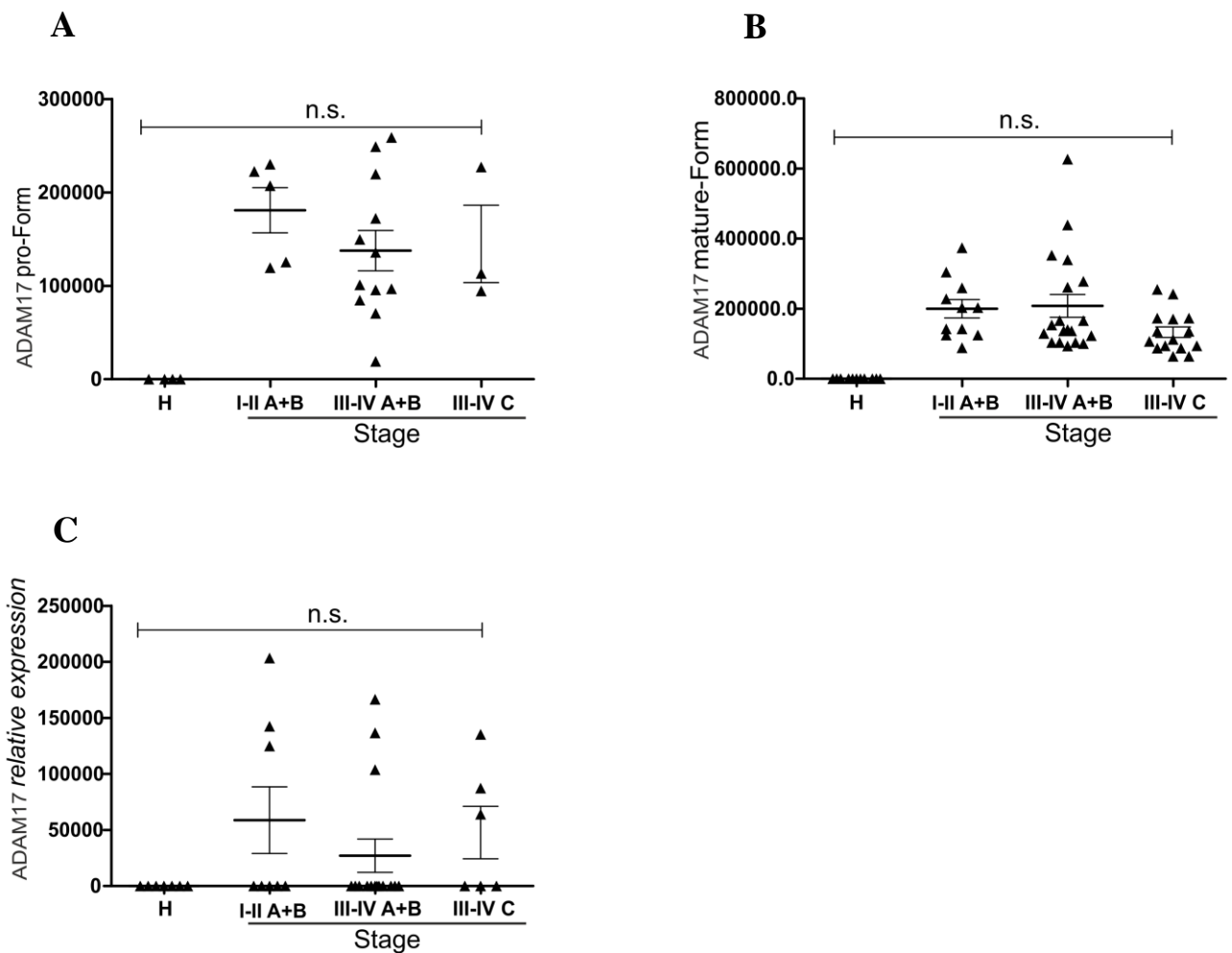


Abbildung 17 Quantifizierung der ADAM17 Proteinexpression im Sulkusfluid:

Die Gesamtproteinlysate wurden auf 8%igen SDS-Gelen aufgetrennt und auf Nitrocellulose-Membranen übertragen. Der Nachweis von ADAM17 erfolgte durch Inkubation mit 0,1µg/ml Primärantikörper in 5% Milchpulver und anschließender Inkubation mit einem HRP-gekoppelten Zweitantikörper. Die Entwicklung erfolgte mittels ECL im Fujifilm LAS-3000 Luminescent Image Analyzer Bildanalyseesystem. Die Bandenintensität wurde anschließend mittels Densitometrie unter Zuhilfenahme der Software AIDA Image Analyzer v.4.14 bestimmt. A: pro-Form, 130 kDa; B: mature-Form 100 kDa; C: *relative expression*: Verhältnis von mature- und pro-Form. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD. Die n-Zahlen sind (Tabelle 1) zu entnehmen. Die statistische Prüfung erfolgte mittels One-way ANOVA und Tukey Post-test. n.s.: nicht signifikant, ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

4.3.4 Zelluläre Bestandteile und interne Ladekontrolle

Für die Westernblot-Analysen wurden gleiche Proben- und Proteinmengen aufgetragen. Um dies zusätzlich zu kontrollieren, erfolgte eine Inkubation mit Antikörpern gegen GAPDH. Nur in 14 von 176 Proben und damit 4 von 68 PatientInnen konnte GAPDH als Maß zellulärer Bestandteile detektiert werden (Abbildung 18).

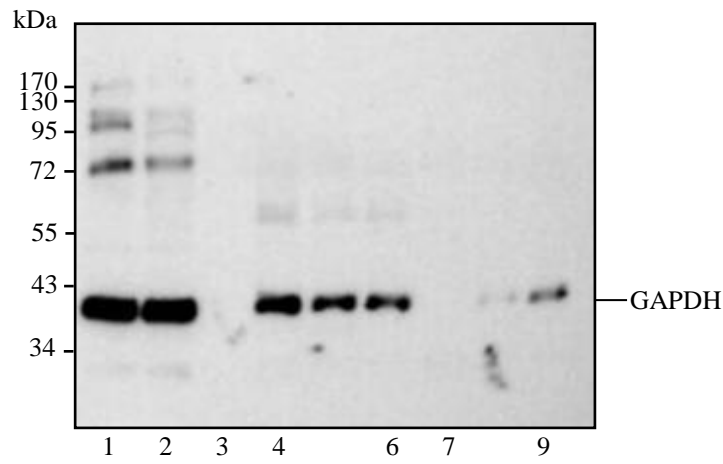


Abbildung 18 Ladekontrolle zur Bestimmung zellulärer Bestandteile in der Probe:

Die Gesamtproteinlysate wurden auf 8%igen SDS-Gelen aufgetrennt und auf Nitrocellulose-Membranen übertragen. Der Nachweis von GAPDH erfolgte durch Inkubation mit 0,4 µg/ml Primärantikörper in 5% Milchpulver und anschließender Inkubation mit einem HRP-gekoppelten Zweitantikörper. Slot 1: A549 ADAM8 transfizierten Zellen, Slot 2: nicht transfizierte A549 Zellen, Slot3: 1.Pat., Slot4-6: 2.Pat, Slot7-9: 3.Pat. Die Entwicklung erfolgte mittels ECL im Fujifilm LAS-3000 Luminescent Image Analyzer Bildanalysesystem.

Dies legt den Schluss nahe, dass es sich bei der detektierten Expression der ADAM-Proteasen weitestgehend nicht um eine direkt zellassozierte Expression, sondern um lösliche Varianten oder eine Freisetzung in vesikulären Strukturen handeln könnte.

4.4 Aktivitätsassay/PrAMA

Die Proteinexpression von ADAM8 gibt nur einen indirekten Hinweis auf die Aktivität. Um diese zu bestimmen, wurden zusätzlich Aktivitätsmessungen durchgeführt. Parodontal gesunde PatientInnen im Stadium I-II A+B zeigten eine konstante Basalaktivität. Im Gegensatz dazu zeigte sich in Stadium III-IV A+B und Stadium III-IV C eine signifikante Zunahme der ADAM8-Aktivität, welche im höchsten Stadium die größte Steigerung im Slope zeigte (Abbildung 19, A-B).

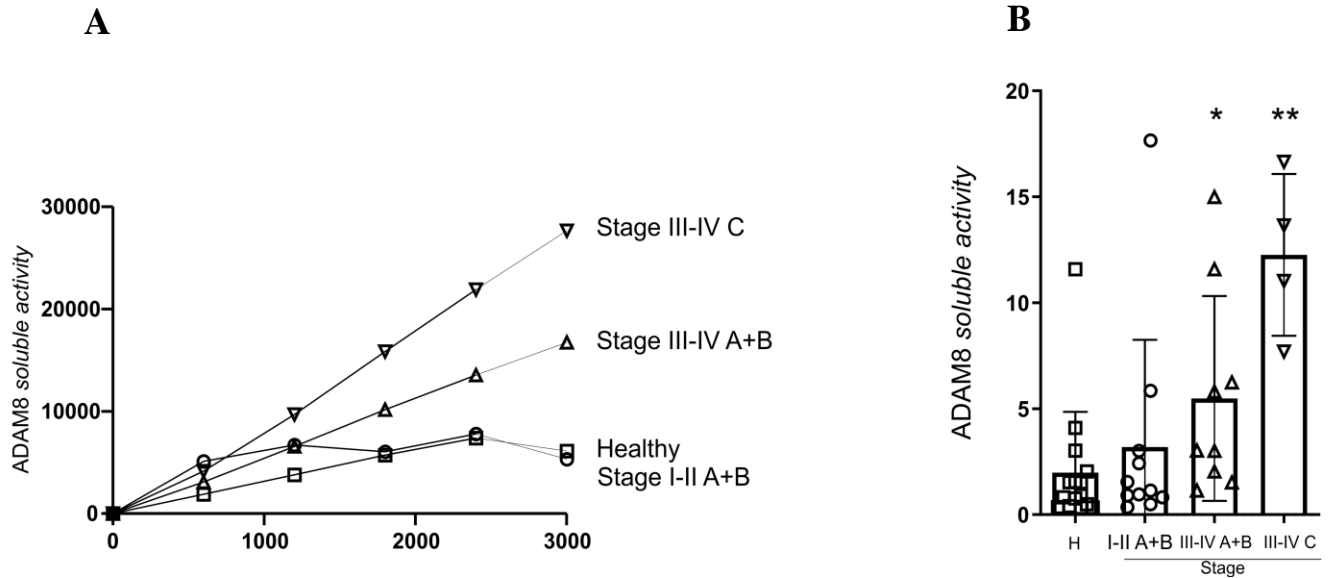


Abbildung 19 ADAM8 Aktivitätsmessungen im Sulkusfluid:

A/B: Die Gesamtproteinlysate wurden nach Verdünnung im Aktivitätspuffer auf eine Mikrotiterplatte vorgelegt. Nach Zugabe des FRET-Polypeptid-Substrats erfolgt die Messung bei 37°C alle zehn Minuten für einen Zeitraum von fünf Stunden mittels Multimode-Mikroplattenlesegerät Fluostar BMG Optimadie. A: Darstellung der Aktivität von ADAM8 über einen Zeitraum von fünf Stunden; B: Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD der einzelnen aufgeschlüsselten Gruppen (n=4-13 pro Gruppe). Die statistische Prüfung erfolgte mittels One-way ANOVA und Tukey Post-test, * p<0.05, ** p<0.01.

5 Diskussion

Es handelt sich bei dieser Studie um eine analytische Querschnittsstudie, in welcher die Expression und Aktivität von ADAM-Proteasen in unterschiedlich stark parodontal geschädigten PatientInnen im Vergleich zu parodontal gesunden PatientInnen betrachtet wurde. Im folgenden Abschnitt werden die PatientInnenzahl, die Prüfmaterialien, die angewandte Methodik sowie die Ergebnisse dieser Studie erörtert und zugrundeliegenden Fragen näher beleuchtet.

5.1 PatientInnenkollektiv

Bei den PatientInnen handelte es sich um PatientInnen aus der Klinik für Zahnerhaltung, Parodontologie und präventive Zahnheilkunde (Gebäude 73) des Universitätsklinikums Saarland und b) um PatientInnen der zahnärztlichen Gemeinschaftspraxis Reinstädtler und Hektor, wodurch ein guter Querschnitt der Bevölkerung in Bezug auf parodontale Gesundheit gegeben ist. Im Vorfeld wurde eine ausgiebige Anamnese erhoben, um mögliche Interaktionen von bereits bekannten Vorerkrankungen mit ADAM-Proteasen und der Parodontitis an sich auszuschließen. Die Probenakquise geschah unabhängig vom Alter und Geschlecht. Die Messungen der Parameter, die zur Einteilung in Stadien und Grade der Parodontitis vorgenommen werden mussten, wurden von Studenten, die sich im klinischen Abschnitt des Studiums befanden, oder durch Zahnärzte und zahnmedizinisch ausgebildetes Personal der Gemeinschaftspraxis Reinstädtler und Hektor durchgeführt. Von den 68 PatientInnen waren 53 parodontal vorerkrankt und 15 als parodontal gesund eingestuft. Da die PatientInnenauswahl nur Stichprobenartig durchgeführt wurde und nicht jede PatientInn in den Probenpool mit aufgenommen wurde, lässt sich durch diese Studie kein Zusammenhang zwischen der Häufigkeit vom Auftreten parodontaler Erkrankungen zu parodontaler Gesundheit ziehen. Die 15 PatientInnen der parodontalen Gesundheit wurden aufgrund eines unauffälligen PSI ausgewählt. Die 53 PatientInnen mit parodontaler Erkrankung hatten einen Altersdurchschnitt von 48,2 Jahren bei Frauen und 47,8 Jahren bei Männern [46]. Von den insgesamt 53 parodontal erkrankten PatientInnen waren 60,4% (n=32) männlich und 39,6% (n=21) weiblich. Das vermehrte Auftreten von parodontalen Erkrankungen bei Männern im Vergleich zu Frauen wurde bereits beschrieben [113]. Jedoch gibt es wiederum Studien, die keinen Zusammenhang zwischen Geschlecht und parodontaler Erkrankung zeigten [26], weshalb es weiterer Untersuchungen benötigt um Geschlechtszusammenhänge genauer zu beschreiben und zu erkennen. Die hier vorliegende Studie kann durch die Anzahl an 68 PatientInnen und daraus resultierenden 176 Proben einen guten Eindruck für die Veränderungen des Vorliegens von ADAM-Proteasen

bei parodontal erkrankten PatientInnen geben und somit als Pilotstudie für weitere Untersuchungen in dem Bereich dienen. Die Anzahl des PatientInnenkollektives reichte ebenso aus um erste Erkenntnisse der Regulationsmechanismen der untersuchten ADAM-Proteasen untereinander und im Zusammenhang mit den Stadien und Graden der Parodontitis aufzuzeigen. Um eine mögliche therapeutische Relevanz zu erreichen, müsste jedoch die Anzahl an PatientInnen vergrößert werden.

5.2 Prüfmaterialien

Um die Auswirkungen und Zusammenhänge von ADAM-Proteasen mit parodontalen Erkrankungen darzustellen, eignet sich die Sulkusflüssigkeit im Vergleich zu bspw. Gewebeproben sehr gut, da zum einen die Abnahme gut in den Arbeitsalltag zu integrieren ist und somit auch keinen enormen Mehraufwand für PatientInnen und BehandlerInnen darstellt und außerdem noch mit einer geringen Invasivität einhergeht. Es lassen sich hierüber sehr gut entzündliche Ereignisse über die Expression und Zusammensetzung von bspw. Enzymen, Zytokinen, Chemokinen oder zellulären Bestandteilen qualitativ und quantitativ nachweisen [60]. Die Probenabnahme der Sulkusflüssigkeit wurde mittels Papierspitzen durchgeführt. Alternativ kann Sulkusflüssigkeit mittels Pipettieren aus dem Sulkus entnommen werden. Dieses Prinzip ist anspruchsvoller in der Umsetzung und birgt auch eine größere Gefahr, Traumata in der Schleimhaut hervorzurufen und somit die Ergebnisse zu verfälschen. Es gibt auch die Möglichkeit, über Spülung des Sulkus mittels isotoner Lösungen Bestandteile herauszulösen und zu analysieren. Diese Technik wurde jedoch nicht verwendet, da hierüber keine genaue Angabe über die Menge des gewonnenen Sulkusfluids möglich gewesen wäre [51]. Ein weiterer Vorteil dieser Methode ist, dass man Poolproben aus unterschiedlichen Regionen des Zahnes sammeln kann und aufgrund der Länge der Papierspitzen auch in tiefere Regionen unterhalb des Zahnfleisches gelangen kann, ohne Verletzungen der Schleimhaut zu riskieren. Die Durchführung der Abnahme und Lagerung der Proben erfolgte durch zuvor instruierte Zahnmedizinstudenten aus dem klinischen Abschnitt des Studiums und trainiertes zahnmedizinisches Personal. Die Probenentnahme und Lagerung geschah nach einem festgelegten Protokoll (7.4 Probenverarbeitungsschema), so dass durch dieses Vorgehen eine standardisierte und gleichbleibende Qualität der Proben erzielt werden konnte.

Die Proben wurden pseudonymisiert an die Arbeitsgruppe von Jun.-Prof. Dr. rer. nat. Daniela Yildiz weitergegeben, sodass keine personenbezogene Datenerfassung oder –weitergabe erfolgte. Die Proben wurden fortlaufend nummeriert, sodass im Falle einer Einwilligungsrück-

nahme der PatientInn über die Mitteilung des Entnahmetags sowie Probennummer alle Proben vernichtet und Versuchsdaten unter Wahrnehmung der PatientInnenanonymität gelöscht werden konnten und weiterhin können. Die Parodontitis wurde in Stadien und Grade eingeteilt und nicht nur anhand der Sondierungstiefen parodontal beurteilt, wie es in zahlreichen Studien getan wird, da zusätzlich zu der Sondierungstiefe auch bspw. der CAL, röntgenologischer Knochenabbau oder auch Zahnverlust für den Verlauf von Parodontopathien entscheidend sind. Durch die so erhobenen klinischen Parameter können akute und noch nicht röntgenologisch auffällige Erkrankungen sowie bereits abgelaufen und/oder anhaltend mit radiologischen Knochenabbau verbundene Erkrankungen systematisch erfasst werden. Durch die strikte Adhärenz an diese neuen Richtlinien ist eine gute Vergleichbarkeit der Studie mit anderen Studien und PatientInnenkollektiven möglich.

5.3 Methodik

5.3.1 Elektrophorese/Westernblot

Der Westernblot inkl. der zunächst durchgeführten Gelelektrophorese zum Auftrennen von Proteinen nach ihrer Größe und Ladung ist eine Standardmethode in der molekularbiologischen und medizinischen Forschung und Diagnostik zum Analysieren von Proteinproben. Die Mehrfachdetektion aus dem geringen Probenvolumen heraus wäre prinzipiell auch mit einem sequentiellen ELISA, d.h. einem sequentiellen Transfer der Probe auf verschiedene ELISA-Platten möglich. Der Westernblot hat sich trotz des höheren Zeitaufwands für diese Studie jedoch aus zwei Gründen als geeignetere Methode erwiesen. Zum einen erlaubt der Westernblot die Detektion verschiedener Proteinformen der ADAM-Proteasen, während der ELISA nur eine quantitative Aussage ermöglicht. Zum anderen enthalten die Zellaufschlusslösungen zahlreiche Detergenzien, welche die Detektion im ELISA erschweren. Bei der Mehrfachverwendung der Membranen (*stripping*) muss man jedoch beachten, dass die gebundene Menge an Proteinen reduziert wird. Außerdem kann es durch nicht komplett abgelöste Antikörperbindungen zu unspezifischen Banden bei der Anschlussinkubation und Nachweis kommen. Um hierdurch verursachte Fehler auszuschließen, wurden die Inkubationsreihenfolgen dauerhaft variiert und geprüft, so dass hier eine Verfälschung der Ergebnisse durch einen Übertrag aus vorherigen Entwicklungen ausgeschlossen werden kann.

5.3.2 Aktivitätsmessungen

Die „proteolytic activity matrix analysis“ wird für die Bestimmung der Aktivität von Metalloproteinasen in komplexen biologischen Proben verwendet [83]. Diese Methodik wurde bereits in früheren Studien zur Bestimmung in Flüssigkeiten, wie der bronchialveolären Lava-ge [24] oder Speichelproben [69], erfolgreich eingesetzt und entsprechend für die vorliegende Studie adaptiert. Durch das direkte Aliquotieren der Proben wurde eine Verfälschung der Messergebnisse durch mehrfache Auftau-Einfrier-Prozesse vermieden.

5.4 Einordnung der Ergebnisse in den wissenschaftlichen Hintergrund und weiterführende Experimente

Die vorliegende Studie zeigt eine Tendenz der Zunahme der Gesamtproteinmenge im Sulkusfluid bei parodontal erkrankten PatientInnen im Vergleich zu parodontal gesunden PatientInnen. Die Zunahme der Gesamtproteinmenge im Sulkusfluid bei entzündlichen Erkrankungen im Parodont wurde bereits in früheren Studien nachgewiesen [70,88]. Somit kann bereits die Bestimmung der Höhe der Gesamtproteinmenge ein gutes erstes Anzeichen für das Ausmaß einer Entzündung im Parodont geben.

Die angefertigten Westernblots haben gezeigt, dass mit Zunahme des Stadiums und Grades der Parodontitis ADAM8 in seiner maturen- sowie pro-Form vermehrt exprimiert wird, wobei auch die *remnant*-Form im Vergleich zu parodontal gesunden vermehrt aufzufinden ist (Abbildung 13, A-C). Andererseits ließ sich bei ADAM10 und -17 eine Tendenz der Abnahme der pro- und mature-Form nachweisen, wobei die pro-Form von ADAM10 doch entsprechend signifikant abnahm (Abbildung 15, A-B; Abbildung 17, A-B). Es konnte gezeigt werden, dass ADAM8 in der Lage ist, eine lösliche extrazelluläre Form von ADAM10 und ADAM17 freizusetzen, welche ebenfalls proteolytische Aktivitäten ausüben (Abbildung 20) [105]. Zusätzlich zu der tendenziellen Abnahme der Proteinformen konnten im Westernblot zusätzliche Fragmente detektiert werden. Hierbei könnte es sich um unspezifische Antikörperbindungen durch andere Bestandteile des Sulkusfluid handeln. Da diese jedoch nicht in den Proben parodontal gesunder PatientInnen detektiert werden konnten, liegt der Schluss nahe, dass es sich hierbei um *remnant* Formen handelt, welche nach Abspaltungen der extrazellulären Domäne zurückbleiben. Des Weiteren könnte es sich um Degradationsprodukte nach Internalisierung der Proteasen handeln (Abbildung 15, D-E). Die Untersuchungen zur Präsenz von GAPDH im Sulkusfluid als Maß zellulärer Bestandteile haben jedoch gezeigt, dass es sich hierbei nicht direkt um zelluläre Bestandteile, sondern eher um vesikelassoziier-

tes Vorliegen der Proteasen handeln könnte (Abbildung 18). Es wurde bereits in vorherigen Studien beschrieben, dass ADAM8, ADAM10 und ADAM17 auf extrazellulären Vesikeln und insbesondere Exosomen freigesetzt werden [3,10,52].

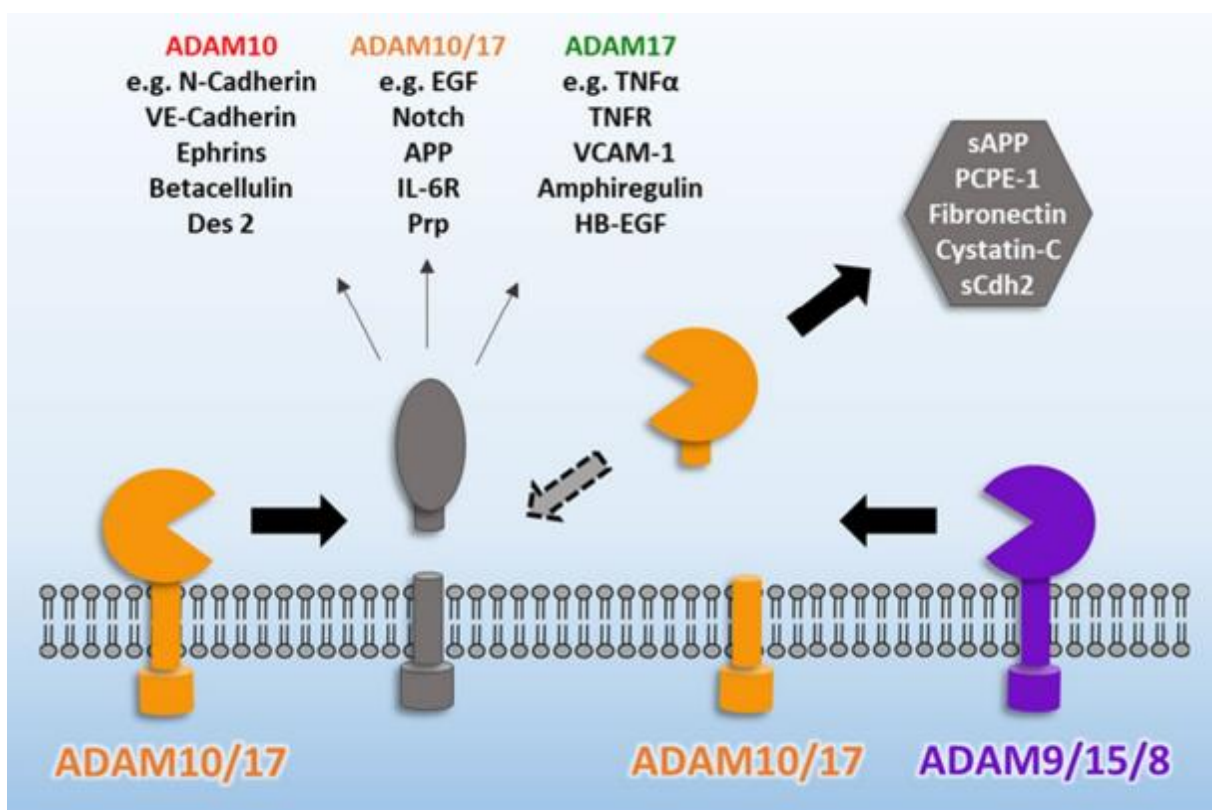


Abbildung 20 ADAM8 abhängige Freisetzung von ADAM10 und -17 Ectodomäne [105]:

ADAM8 ist in der Lage ADAM10 und -17 zu schneiden. Hierbei zeigt sich, dass wiederum membrangebundene ADAM10 und -17 im Gegensatz zu der löslichen geschnittenen Variante sADAM10 und sADAM17 unterschiedliche Substratepools besitzen.

Die Bestimmung der proteolytischen Aktivität von ADAM8 in den verschiedenen Stadien und Graden der Parodontitis unterstützte die Ergebnisse, welche sich aus den Westernblot ergaben. Hier zeigte sich ebenfalls eine Erhöhung der Aktivität von ADAM8 bei Erhöhung des Stadiums und Grades von parodontal erkrankten PatientInnen (Abbildung 19). Dies steht im Einklang mit einer vorherigen Studie, in welcher die proteolytische Aktivität im Speichel untersucht wurde [69]. Um nun eine mögliche Freisetzung von ADAM10 und ADAM17 als lösliche Formen zu prüfen, sollte diese Aktivitätsmessungen ebenfalls für ADAM10 und ADAM17 durchgeführt werden.

Eine Erhöhung des ADAM8-Proteinvorkommens bei chronischen ParodontitispatientInnen im Vergleich zu parodontal gesunden PatientInnen in Speichel und GCF konnte bereits in vorherigen Studien gezeigt werden [35,61,85]. *Human gingival epithelia cells* (HEGCs) aus Gewebeproben parodontal erkrankter PatientInnen wiesen eine Erhöhung der mRNA Expres-

sion von ADAM8 auf, welche durch Infektion mit *Fusobacterium nucleatum* gesteigert wurde [9]. In diesen vorherigen Studien erfolgte jedoch keine genauere Einteilung der parodontal Erkrankten in Stadien oder Grade, so dass keine Hinweise auf ein möglicherweise diagnostisches/prognostisches Potential gewonnen werden konnten. Des Weiteren erfolgte kein systematischer Vergleich der untersuchten Proteasen sowie eine Beachtung von Ergebnisverfälschungen durch systemische Erkrankungen wie Diabetes mellitus, Herz-Kreislauf-Erkrankungen, Lebererkrankungen oder auch Tabakkonsum. Diese Erkrankungen, die in den vorherigen Studien nicht ausgeschlossen wurden, können zusätzlich die Expression der ADAM-Proteasen beeinflussen (3.1 PatientInnen) [67].

Um diesen Aspekt näher zu beleuchten, sollten Zellkulturversuche mit oralen Keratinozyten sowie an weiteren pathogen beteiligten Entzündungszellen durchgeführt werden, um a) die Herkunft der Protease im Sulkusfluid, b) die Freisetzungsform und c) die biologische Relevanz näher zu bestimmen. Hierbei sollte ein Vergleich für die Stimulation mit verschiedenen Zytokinen wie $\text{TNF-}\alpha$, $\text{INF-}\gamma$, $\text{Il-1}\beta$, da diese eine zentrale Rolle im Zytokinnetzwerk der Parodontitis darstellen [91], und mit parodontal pathogenen Keimen wie *Porphyromonas gingivalis* erfolgen. Des Weiteren sind diese *in vitro*-Untersuchungen essentiell, um die biologische Relevanz der Befunde näher zu beleuchten. Matrixmetalloproteinasen (MMP), wie z.B. MMP-8 und -9, haben einen großen Einfluss auf die Integrität des parodontalen Gewebes [58,79]. Eine verstärkte Expression von MMP9 durch ADAM8 wurde in früheren Studien aus Gewebeproben von an Glioblastom erkrankten PatientInnen gezeigt [104]. Auch wurden sowohl erhöhte MMP-8 und -9 als auch ADAM8 Werte bei an akuten Lungenversagen erkrankten PatientInnen beschrieben [24]. Bereits in früheren Studien, war der parodontal pathogene Keime *Porphyromonas gingivalis* in der Lage unter anderem MMP9 vermehrt freizusetzen [29]. Auch konnte bereits gezeigt werden, eine Hemmung von MMP9 zu geringerem alveolären Knochenverlust führt [99]. Es konnte bereits gezeigt werden, dass neutrophile Granulozyten, welche eine wichtige Rolle bei der Entstehung der Parodontitis spielen, auch eine große Bedeutung bei der Freisetzung von MMP9 haben, welches durch ADAM8 gehemmt werden kann [1]. Dieser Zusammenhang zwischen MMPs und ADAM-Proteasen sollte in weiterführenden Studien näher beleuchtet werden, um ein noch besseres Verständnis des Gewebeumbaus und letzten Endes somit einer gezielten und erfolgreichen Therapie zu gewinnen. Ein möglicher therapeutischer Ansatz wäre beispielsweise die Verwendung eines Inhibitors gegen ADAM8 in Form einer Zahnpasta und die Untersuchung einer möglichen Verbesserung des

Erkrankungsbildes. Generell wäre es sinnvoll, PatientInnen, die an Parodontitis leiden, systematisch von der Befundung, über die Behandlung, bis hin zu den Nachkontrollen unter wiederholenden Abnahmen und Verarbeitungen der Sulkusflüssigkeit zu begleiten, um so Effekte der Parodontitistherapie auf die Expression von ADAM-Proteasen zu verfolgen. Bei den in dieser Studie vorliegenden Proben handelt es sich immer nur um Momentaufnahmen. Des Weiteren könnten die Level an Expression von ADAM-Proteasen als eine Art Entzündungsmarker gesehen werden, um das Fortschreiten der Erkrankung frühzeitig zu erkennen und vorherzusagen, bevor es bereits zu Gewebeverlust wie Knochenabbau gekommen ist. Da ADAM-Proteasen und die Parodontitis, wie bereits in dem Material- und Methodenteil (3.1 PatientInnen) beschrieben auch Auswirkungen auf den gesamten Organismus haben, könnten innovative Therapien, die auf die effiziente Behandlung der Parodontitis ausgelegt sind, auch Begleiterkrankungen wie Erkrankungen des Herz-Kreislaufsystems und/oder Diabetes mellitus minimieren.

6 Literaturverzeichnis

1. Aljohmani A, Heinze H, Gharzia FG, Reda B, Mohamed A, Abdrabou M, Becker S, Bischoff M, Hannig M, Yildiz D Extracellular release of a disintegrin and metalloproteinases 1 orchestrates periodontal disease severity 2.
2. Aljohmani A, Yildiz D (2020) A Disintegrin and Metalloproteinase—Control Elements in Infectious Diseases. *Front Cardiovasc Med* 7:303
3. Aljohmani A, Opitz B, Bischoff M, Yildiz D (2022) *Pseudomonas aeruginosa* Triggered Exosomal Release of ADAM10 Mediates Proteolytic Cleavage in Trans. *Int J Mol Sci* 23:1259
4. Anders A, Gilbert S, Garten W, Postina R, Fahrenholz F (2001) Regulation of the α -secretase ADAM10 by its prodomain and proprotein convertases. *FASEB J* 15:1837–1839
5. Armitage GC (1996) Periodontal diseases: diagnosis. *Ann Periodontol* 1:37–215
6. Armitage GC (2004) Analysis of gingival crevice fluid and risk of progression of periodontitis. *Periodontol* 2000 34:109–119
7. Arweiler NB, Netuschil L (2016) The oral microbiota. Springer New York LLCURL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27161350/>
8. Attström R, Egelberg J (1971) Presence of leukocytes within the gingival crevices during developing gingivitis in dogs. *J Periodontal Res* 6:110–114
9. Aung WPP, Chotjumlong P, Pata S, Montreekachon P, Supanchart C, Khongkhunthian S, Sastraruji T, Krisanaprakornkit S (2017) Inducible expression of A Disintegrin and Metalloproteinase 8 in chronic periodontitis and gingival epithelial cells. *J Periodontal Res* 52:582–593
10. Bartsch JW, Slater EP (2021) Extracellular Vesicle-Based Detection of Pancreatic Cancer. *Front Cell Dev Biol* 9:697939
11. Bibi T, Khurshid Z, Rehman A, Imran E, Srivastava KC, Shrivastava D (2021) Gingival crevicular fluid (GCF): A diagnostic tool for the detection of periodontal health and diseases. *Molecules* 26:
12. Bickel M, Cimasoni G, Andersen E (1985) Flow and albumin content of early (pre-inflammatory) gingival crevicular fluid from human subjects. *Arch Oral Biol* 30:599–602
13. Blobel CP (2005) ADAMs: Key components in egfr signalling and development. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6:32–43
14. Borojevic T (2012) Smoking and Periodontal Disease. *Mater Socio Medica* 24:274
15. Bostanci N, Emingil G, Afacan B, Han B, Ilgenli T, Atilla G, Hughes FJ, Belibasakis GN (2008) Tumor necrosis factor- α -converting enzyme (TACE) levels in periodontal diseases. *J Dent Res* 87:273–277
16. Bruckmann C (2013) Epidemiologie parodontaler Erkrankungen. *Stomatologie* 110:9–14
17. Canault M, Leroyer AS, Peiretti F, Lesèche G, Tedgui A, Bonardo B, Alessi MC, Boulanger CM, Nalbone G (2007) Microparticles of human atherosclerotic plaques enhance the shedding of the tumor necrosis factor- α converting enzyme/ADAM17 substrates, tumor necrosis factor and tumor necrosis factor receptor-1. *Am J Pathol* 171:1713–1723
18. Castellani RJ, Rolston RK, Smith MA (2010) Alzheimer disease. *Disease-a-Month* 56:484–546
19. Caton JG, Armitage G, Berglundh T, Chapple ILC, Jepsen S, Kornman KS, Mealey BL, Papapanou PN, Sanz M, Tonetti MS (2018) A new classification scheme for

- periodontal and peri-implant diseases and conditions - Introduction and key changes from the 1999 classification. *J Clin Periodontol* 45:S1–S8
20. Chapple ILC, Mealey BL, Van Dyke TE, Bartold PM, Dommisch H, Eickholz P, Geisinger ML, Genco RJ, Glogauer M, Goldstein M, Griffin TJ, Holmstrup P, Johnson GK, Kapila Y, Lang NP, Meyle J, Murakami S, Plemons J, Romito GA, Shapira L, Tatakis DN, Teughels W, Trombelli L, Walter C, Wimmer G, Xenoudi P, Yoshie H (2018) Periodontal health and gingival diseases and conditions on an intact and a reduced periodontium: Consensus report of workgroup 1 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. *J Clin Periodontol* 45:S68–S77
 21. Charbonneau M, Harper K, Grondin F, Pelmus M, McDonald PP, Dubois CM (2007) Hypoxia-inducible factor mediates hypoxic and tumor necrosis factor α -induced increases in tumor necrosis factor- α converting enzyme/ADAM17 expression by synovial cells. *J Biol Chem* 282:33714–33724
 22. Chou CW, Huang YK, Kuo TT, Liu JP, Sher YP (2020) An overview of ADAM9: Structure, activation, and regulation in human diseases. *Int J Mol Sci* 21:1–22
 23. Conrad C, Benzel J, Dorzweiler K, Cook L, Schlomann U, Zarbock A, Slater EP, Nimsky C, Bartsch JW (2019) ADAM8 in invasive cancers: Links to tumor progression, metastasis, and chemoresistance. *Clin Sci* 133:83–99
 24. Conrad C, Yildiz D, Cleary SJ, Margraf A, Cook L, Schlomann U, Panaretou B, Bowser JL, Karmouty-Quintana H, Li J, Berg NK, Martin SC, Aljohmani A, Moussavi-Harami SF, Wang KM, Tian JJ, Magnen M, Valet C, Qiu L, Singer JP, Eltzschig HK, Bertrams W, Herold S, Suttorp N, Schmeck B, Ball ZT, Zarbock A, Looney MR, Bartsch JW (2022) ADAM8 signaling drives neutrophil migration and ARDS severity. *JCI Insight* 7:
arbock A, Looney MR, Bartsch JW (2022) ADAM8 signaling drives neutrophil migration and ARDS severity. *JCI Insight* 7:
 25. Cortellini P, Bissada NF (2018) Mucogingival conditions in the natural dentition: Narrative review, case definitions, and diagnostic considerations. *J Periodontol* 89:S204–S213
 26. Dannewitz B, Holtfreter B, Eickholz P (2021) Periodontitis—therapy of a widespread disease. *Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforsch - Gesundheitsschutz* 64:931–940
 27. Detert J, Pischon N, Burmester GR, Buttgereit F (2010) Pathogenese der parodontitis bei rheumatischen erkrankungen. *Z Rheumatol* 69:109–116
 28. Deutsche Mundgesundheitsstudie F DMS V Fünfte Deutsche Mundgesundheitsstudie (DMS V)-Kurzfassung Institut der Deutschen Zahnärzte im Auftrag von Bundeszahnärztekammer und Kassenzahnärztlicher Bundesvereinigung.
 29. Ding Y (1997) Release and activation of human neutrophil matrix metallo- And serine proteinases during phagocytosis of *Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromonas gingivalis* and *Treponema denticola*. *J Clin Periodontol* 24:237–248
 30. Dommisch H, Jepsen S (2015) Diverse functions of defensins and other antimicrobial peptides in periodontal tissues. *Periodontol 2000* 69:96–110
 31. Dr. Anke-Christine Saß (verantw.), PD Dr. Thomas Lampert, Dr. Franziska Prütz, Stefanie Seeling, Anne Starker, Dr. Lars E. Kroll, Alexander Rommel, Dr. Livia Ryl, Dr. Thomas Ziese (2015) Gesundheit in Deutschland – Einzelkapitel: Wie gesund sind die älteren Menschen? URL: https://www.rki.de/DE/Content/Gesundheitsmonitoring/Gesundheitsberichterstattung/GBEDownloadsGiD/2015/08_gesundheit_in_deutschland.pdf?__blob=publicationFile

32. Dreymueller D, Pruessmeyer J, Groth E, Ludwig A (2012) The role of ADAM-mediated shedding in vascular biology. *Eur J Cell Biol* 91:472–485
33. Dreymueller D, Uhlig S, Ludwig A (2015) Adam-family metalloproteinases in lung inflammation: Potential therapeutic targets. *Am J Physiol - Lung Cell Mol Physiol* 308:L325–L343
34. Dreymueller D, Pruessmeyer J, Schumacher J, Fellendorf S, Hess FM, Seifert A, Babendreyer A, Bartsch JW, Ludwig A (2017) The metalloproteinase ADAM8 promotes leukocyte recruitment in vitro and in acute lung inflammation. *Am J Physiol - Lung Cell Mol Physiol* 313:L602–L614
35. Duffy MJ, McKiernan E, O'Donovan N, McGowan PM (2009) Role of ADAMs in cancer formation and progression. *Clin Cancer Res* 15:1140–1144
36. Düsterhöft Kiel S, Grötzinger Korreferent J, Scheidig Korreferent A, Rose-John Prüfungsvorsitz S, Beitz E Die membranproximale Domäne von ADAM17-Ein Schlüssel zur Regulation der Proteaseaktivität.
37. Eke PI, Dye BA, Wei L, Slade GD, Thornton-Evans GO, Borgnakke WS, Taylor GW, Page RC, Beck JD, Genco RJ (2015) Update on Prevalence of Periodontitis in Adults in the United States: NHANES 2009 to 2012. *J Periodontol* 86:611–622
38. Elavarasu S, Suthanthiran T, Thangavelu A, Saravanan J, Selvaraj S, Mohandas L (2015) Comparative analysis of gingival crevicular fluid a disintegrin and metalloproteinase 8 levels in health and periodontal disease: A clinic-biochemical study. *J Pharm Bioallied Sci* 7:S470–S473
39. Elavarasu S, Suthanthiran T, Thangavelu A, Saravanan J, Selvaraj S, Mohandas L (2015) Comparative analysis of gingival crevicular fluid a disintegrin and metalloproteinase 8 levels in health and periodontal disease: A clinic-biochemical study. *J Pharm Bioallied Sci* 7:S470–S473
40. Elmar Hellwig, Edgar Schäfer, Joachim Klimek TA (2018) Einführung in die Zahnerhaltung Prüfungswissen Kariologie, Endodontologie und Parodontologie. Deutscher Ärzteverlag
41. Ercoli C, Caton JG (2018) Dental prostheses and tooth-related factors. *J Clin Periodontol* 45:S207–S218
42. Esther (2016) Regulation und Transport der Disintegrin und Metalloproteinasen ADAM10 und ADAM17.
43. Fan J, Caton JG (2018) Occlusal trauma and excessive occlusal forces: Narrative review, case definitions, and diagnostic considerations. *J Clin Periodontol* 45:S199–S206
44. Ferri CP, Prince M, Brayne C, Brodaty H, Fratiglioni L, Ganguli M, Hall K, Hasegawa K, Hendrie H, Huang Y, Jorm A, Mathers C, Menezes PR, Rimmer E, Sczufca M (2005) Global prevalence of dementia: A Delphi consensus study. *Lancet* 366:2112–2117
45. Fukasawa KM, Hata T, Ono Y, Hirose J (2011) Metal Preferences of Zinc-Binding Motif on Metalloproteases. *J Amino Acids* 2011:1–7
46. Gaengler P, Goebel G, Kurbad A, Kosa W (1988) Assessment of periodontal disease and dental caries in a population survey using the CPITN, GPM/T and DMF/T indices. *Community Dent Oral Epidemiol* 16:236–239
47. GENCO R, OFFENBACHER S, BECK J (2002) Periodontal disease and cardiovascular disease. *J Am Dent Assoc* 133:14S-22S
48. Genco RJ, Evans RT, Ellison SA (1969) Dental research in microbiology with emphasis on periodontal disease. *J Am Dent Assoc* 78:1016–1036

49. Giebeler N, Zigrino P (2016) A disintegrin and metalloprotease (ADAM): Historical overview of their functions. *Toxins (Basel)* 8:122
50. Glickman I (1971) Periodontal Disease. *N Engl J Med* 284:1071–1077
51. Griffiths GS (2003) Formation, collection and significance of gingival crevice fluid. *Periodontol 2000* 31:32–42
52. Groth E, Pruessmeyer J, Babendreyer A, Schumacher J, Pasqualon T, Dreymueller D, Higashiyama S, Lorenzen I, Grötzinger J, Cataldo D, Ludwig A (2016) Stimulated release and functional activity of surface expressed metalloproteinase ADAM17 in exosomes. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res* 1863:2795–2808
53. He J, Da L, Pan Y, Tan X, Li Z, Luo F, Xie W, Gu D (2020) Association between quantitative analyses of periodontal pathogens and the depth of periodontal pockets. *Biotechnol Biotechnol Equip* 34:515–521
54. Holmstrup P, Plemons J, Meyle J (2018) Non-plaque-induced gingival diseases. *J Clin Periodontol* 45:S28–S43
55. Hosokawa Y, Hosokawa I, Ozaki K, Nakae H, Matsuo T (2007) CXC chemokine ligand 16 in periodontal diseases: Expression in diseased tissues and production by cytokine-stimulated human gingival fibroblasts. *Clin Exp Immunol* 149:146–154
56. Howard L, Lu X, Mitchell S, Griffiths S, Glynn P (1996) Molecular cloning of MADM: A catalytically active mammalian disintegrin-metalloprotease expressed in various cell types. *Biochem J* 317:45–50
57. Ishikawa I, Nakashima K, Koseki T, Nagasawa T, Watanabe H, Arakawa S, Nitta H, Nishihara T (1997) Induction of the immune response to periodontopathic bacteria and its role in the pathogenesis of periodontitis. *Periodontol 2000* 14:79–111
58. Isola G, Polizzi A, Ronsivalle V, Alibrandi A, Palazzo G, Lo Giudice A (2021) Impact of Matrix Metalloproteinase-9 during Periodontitis and Cardiovascular Diseases. *Molecules* 26:
59. Jagels MA, Ember JA, Travis J, Potempa J, Pike R, Hugli TE (1996) Cleavage of the Human C5a Receptor by Proteinases Derived from *Porphyromonas gingivalis*: Cleavage of Leukocyte C5a Receptor. *Adv Exp Med Biol* 389:155–164
60. Javed F, Al-Hezaimi K, Salameh Z, Almas K, Romanos GE (2011) Proinflammatory cytokines in the crevicular fluid of patients with peri-implantitis. *Cytokine* 53:8–12
61. Jepsen S, Kerschull M, Deschner J (2011) Wechselwirkungen zwischen Parodontitis und systemischen Erkrankungen. *Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforsch - Gesundheitsschutz* 54:1089–1096
62. Jepsen S, Caton JG, Albandar JM, Bissada NF, Bouchard P, Cortellini P, Demirel K, de Sanctis M, Ercoli C, Fan J, Geurs NC, Hughes FJ, Jin L, Kantarci A, Lalla E, Madianos PN, Matthews D, McGuire MK, Mills MP, Preshaw PM, Reynolds MA, Sculean A, Susin C, West NX, Yamazaki K (2018) Periodontal manifestations of systemic diseases and developmental and acquired conditions: Consensus report of workgroup 3 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. *Blackwell Munksgaard* URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29926500/>
63. Jordan AR, Hoffmann T, Kocher T, Micheelis W (2016) IDZ | Update zu Parodontalerkrankungen in Deutschland 2014. *Zentrale Ergebnisse der Fünften Dtsch Mundgesundheitsstudie* 403–412
64. Karimbux NY, Saraiya VM, Elangovan S, Allareddy V, Kinnunen T, Kornman KS, Duff GW (2012) Interleukin-1 Gene Polymorphisms and Chronic Periodontitis in Adult Whites: A Systematic Review and Meta-Analysis. *J Periodontol* 83:1407–1419

65. Katakowski M, Jiang F, Zheng XG, Gutierrez JA, Szalad A, Chopp M (2009) Tumorigenicity of cortical astrocyte cell line induced by the protease ADAM17. *Cancer Sci* 100:1597–1604
66. KILLAR L, WHITE J, BLACK R, PESCHON J (1999) Adamalysins: A Family of Metzincins Including TNF-alpha Converting Enzyme (TACE). *Ann N Y Acad Sci* 878:442–452
67. Kinoshita N, Awano S, Yoshida A, Soh I, Ansai T (2013) Periodontal disease and gene-expression levels of metalloendopeptidases in human buccal mucosal epithelium. *J Periodontal Res* 48:606–614
68. Ko SY, Lin SC, Wong YK, Liu CJ, Chang KW, Liu TY (2007) Increase of disintegrin metalloprotease 10 (ADAM10) expression in oral squamous cell carcinoma. *Cancer Lett* 245:33–43
69. Koller G, Schürholz E, Ziebart T, Neff A, Frankenberger R, Bartsch JW (2021) Clinical Evaluation of Pathognomonic Salivary Protease Fingerprinting for Oral Disease Diagnosis. *J Pers Med* 2021, Vol 11, Page 866 11:866
70. Koregol A, Koregol S, More S, Kalburgi N (2015) Total protein in gingival crevicular fluid as indicators of periodontal disease activity: A clinico biochemical analysis. *Drug Dev Ther* 6:15
71. Laemmli UK (1970) Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nat* 1970 2275259 227:680–685
72. Lammich S, Kojro E, Postina R, Gilbert S, Pfeiffer R, Jasionowski M, Haass C, Fahrenholz F (1999) Constitutive and regulated α -secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by a disintegrin metalloprotease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:3922–3927
73. Lang NP, Bartold PM (2018) Periodontal health. *J Clin Periodontol* 45:S9–S16
74. Lee JH, Choi YJ, Heo SH, Lee JM, Cho JY (2011) Tumor necrosis factor- α converting enzyme (TACE) increases RANKL expression in osteoblasts and serves as a potential biomarker of periodontitis. *BMB Rep* 44:473–477
75. Li Y, Guo S, Zhao K, Conrad C, Driescher C, Rothbart V, Schlomann U, Guerreiro H, Bopp MH, König A, Carl B, Pagenstecher A, Nimsky C, Bartsch JW (2021) ADAM8 affects glioblastoma progression by regulating osteopontin-mediated angiogenesis. *Biol Chem* 402:195–206
76. Listgarten MA, Helldén L (1978) Relative distribution of bacteria at clinically healthy and periodontally diseased sites in humans. *J Clin Periodontol* 5:115–132
77. Listgarten MA (1986) Pathogenesis of periodontitis. *J Clin Periodontol* 13:418–425
78. Lorenzen I, Lokau J, Düsterhöft S, Trad A, Garbers C, Scheller J, Rose-John S, Grötzinger J (2012) The membrane-proximal domain of A Disintegrin and Metalloprotease 17 (ADAM17) is responsible for recognition of the interleukin-6 receptor and interleukin-1 receptor II. *FEBS Lett* 586:1093–1100
79. Luchian I, Goriuc A, Sandu D, Covasa M (2022) The Role of Matrix Metalloproteinases (MMP-8, MMP-9, MMP-13) in Periodontal and Peri-Implant Pathological Processes. *Int J Mol Sci* 23:
80. Manzine PR, Marcello E, Borroni B, Kamphuis W, Hol E, Padovani A, Nascimento CC, De Godoy Bueno P, Assis Carvalho Vale F, Iost Pavarini SC, Di Luca M, Cominetti MR (2015) ADAM10 gene expression in the blood cells of Alzheimer's disease patients and mild cognitive impairment subjects. *Biomarkers* 20:196–201
81. Meyle J, Herrmann JM (2017) Diabetes mellitus und Parodontitis. *Internist Prax* 58:406–416

82. Milla ME, Leesnitzer MA, Moss ML, Clay WC, Luke Carter H, Miller AB, Su JL, Lambert MH, Willard DH, Sheeley DM, Kost TA, Burkhart W, Moyer M, Kevin Blackburn R, Pahel GL, Mitchell JL, Hoffman CR, Becherer JD (1999) Specific sequence elements are required for the expression of functional tumor necrosis factor- α -converting enzyme (TACE). *J Biol Chem* 274:30563–30570
83. Miller MA, Barkal L, Jeng K, Herrlich A, Moss M, Griffith LG, Lauffenburger DA (2011) Proteolytic Activity Matrix Analysis (PrAMA) for simultaneous determination of multiple protease activities. *Integr Biol* 3:422–438
84. Mulooly M, McGowan PM, Crown J, Duffy MJ (2016) The ADAMs family of proteases as targets for the treatment of cancer. *Cancer Biol Ther* 17:870–880
85. Murakami S, Mealey BL, Mariotti A, Chapple ILC (2018) Dental plaque-induced gingival conditions. *J Periodontol* 89:S17–S27
86. Nazir MA (2017) Prevalence of periodontal disease, its association with systemic diseases and prevention. *Int J Health Sci (Qassim)* 11:72–80
87. Nimcharoen T, Aung WPP, Makeudom A, Sastraruji T, Khongkhunthian S, Sirinirund B, Krisanaprakornkit S, Montreekachon P (2019) Reduced ADAM8 levels upon non-surgical periodontal therapy in patients with chronic periodontitis. *Arch Oral Biol* 97:137–143
88. Noguchi E, Kato R, Ohno K, Mitsui A, Obama T, Hirano T, Itabe H, Yamamoto M (2014) The apolipoprotein B concentration in gingival crevicular fluid increases in patients with diabetes mellitus. *Clin Biochem* 47:67–71
89. Ortiz P, Bissada NF, Palomo L, Han YW, Al-Zahrani MS, Panneerselvam A, Askari A (2009) Periodontal Therapy Reduces the Severity of Active Rheumatoid Arthritis in Patients Treated With or Without Tumor Necrosis Factor Inhibitors. *J Periodontol* 80:535–540
90. Page RC, Kornman KS (1997) The pathogenesis of human periodontitis: an introduction. *Periodontol* 2000 14:9–11
91. Pan W, Wang Q, Chen Q The cytokine network involved in the host immune response to periodontitis.
92. Peter J, Gough ; . (2004) Related Content Regulated Shedding of Transmembrane Chemokines by the Disintegrin and Metalloproteinase 10 Facilitates Detachment of Adherent Leukocytes. *J Immunol* 172
93. Plumb J, McQuaid S, Cross AK, Surr J, Haddock G, Bunning RAD, Woodroffe MN (2006) Upregulation of ADAM-17 expression in active lesions in multiple sclerosis. *Mult Scler* 12:375–385
94. Potempa J, Banbula A, Travis J (2000) Role of bacterial proteinases in matrix destruction and modulation of host responses. *Periodontol* 2000 24:153–192
95. Preshaw PM, Foster N, Taylor JJ (2007) Cross-susceptibility between periodontal disease and type 2 diabetes mellitus: An immunobiological perspective. *Periodontol* 2000 45:138–157
96. Prox J, Saftig P (2014) ADAM10: Alzheimer α -sekretase und neurobiologischer regulator. *Neuroforum* 20:212–220
97. Pruessmeyer J, Hess FM, Alert H, Groth E, Pasqualon T, Schwarz N, Nyamoya S, Kollert J, Van Der Vorst E, Donners M, Martin C, Uhlig S, Saftig P, Dreytmueller D, Ludwig A (2014) Leukocytes require ADAM10 but not ADAM17 for their migration and inflammatory recruitment into the alveolar space. *Blood* 123:4077–4088
98. Pussinen P, Paju S, Mantyla P, Sorsa T (2007) Serum Microbial- and Host-Derived Markers of Periodontal Diseases: A Review. *Curr Med Chem* 14:2402–2412

99. Ramamurthy NS, Xu JW, Bird J, Baxter A, Bhogal R, Wills R, Watson B, Owen D, Wolff M, Greenwald RA (2002) Inhibition of alveolar bone loss by matrix metalloproteinase inhibitors in experimental periodontal disease. *J Periodontol Res* 37:1–7
100. Reddy P, Slack JL, Davis R, Cerretti DP, Kozlosky CJ, Blanton RA, Shows D, Peschon JJ, Black RA (2000) Functional analysis of the domain structure of tumor necrosis factor- α converting enzyme. *J Biol Chem* 275:14608–14614
101. Reiss K, Saftig P (2009) The “A Disintegrin And Metalloprotease” (ADAM) family of sheddases: Physiological and cellular functions. *Semin Cell Dev Biol* 20:126–137
102. Rocks N, Paulissen G, El Hour M, Quesada F, Crahay C, Gueders M, Foidart JM, Noel A, Cataldo D (2008) Emerging roles of ADAM and ADAMTS metalloproteinases in cancer. *Biochimie* 90:369–379
103. Saftig P, Reiss K (2011) The “A Disintegrin And Metalloproteases” ADAM10 and ADAM17: Novel drug targets with therapeutic potential? *Eur J Cell Biol* 90:527–535
104. Schäfer A, Evers L, Meier L, Schlomann U, Bopp MHA, Dreizner GL, Lassmann O, Ben Bacha A, Benescu AC, Pojskic M, Preußner C, von Strandmann EP, Carl B, Nimsky C, Bartsch JW (2022) The Metalloprotease-Disintegrin ADAM8 Alters the Tumor Suppressor miR-181a-5p Expression Profile in Glioblastoma Thereby Contributing to Its Aggressiveness. *Front Oncol* 12:826273
105. Scharfenberg F, Helbig A, Sammel M, Benzel J, Schlomann U, Peters F, Wichert R, Bettendorff M, Schmidt-Arras D, Rose-John S, Moali C, Lichtenthaler SF, Pietrzik CU, Bartsch JW, Tholey A, Becker-Pauly C (2020) Degradome of soluble ADAM10 and ADAM17 metalloproteases. *Cell Mol Life Sci* 77:331–350
106. Schick D, Babendreyer A, Wozniak J, Awan T, Noels H, Liehn E, Bartsch JW, Vlacil AK, Grote K, Zayat R, Goetzenich A, Ludwig A, Dreymueller D (2019) Elevated expression of the metalloproteinase ADAM8 associates with vascular diseases in mice and humans. *Atherosclerosis* 286:163–171
107. Schlomann U, Wildeboer D, Webster A, Antropova O, Zeuschner D, Knight CG, Docherty AJP, Lambert M, Skelton L, Jockusch H, Bartsch JW (2002) The metalloprotease disintegrin ADAM8. Processing by autocatalysis is required for proteolytic activity and cell adhesion. *J Biol Chem* 277:48210–48219
108. Schlomann U, Koller G, Conrad C, Ferdous T, Golfi P, Garcia AM, Höfling S, Parsons M, Costa P, Soper R, Bossard M, Hagemann T, Roshani R, Sewald N, Ketchum RR, Moss ML, Rasmussen FH, Miller MA, Lauffenburger DA, Tuveson DA, Nimsky C, Bartsch JW (2015) ADAM8 as a drug target in pancreatic cancer. *Nat Commun* 2015 6:1–16
109. Seals DF, Courtneidge SA (2003) The ADAMs family of metalloproteases: Multidomain proteins with multiple functions. *Genes Dev* 17:7–30
110. Seegar TCM, Killingsworth LB, Saha N, Meyer PA, Patra D, Zimmerman B, Janes PW, Rubinstein E, Nikolov DB, Skiniotis G, Kruse AC, Blacklow SC (2017) Structural Basis for Regulated Proteolysis by the α -Secretase ADAM10. *Cell* 171:1638-1648.e7
111. Seifert A, Düsterhöft S, Wozniak J, Koo CZ, Tomlinson MG, Nuti E, Rossello A, Cuffaro D, Yildiz D, Ludwig A (2021) The metalloproteinase ADAM10 requires its activity to sustain surface expression. *Cell Mol Life Sci* 78:715–732
112. Serino M, Menghini R, Fiorentino L, Amoruso R, Mauriello A, Lauro D, Sbraccia P, Hribal ML, Lauro R, Federici M (2007) Mice heterozygous for tumor necrosis factor- α converting enzyme are protected from obesity-induced insulin resistance and diabetes. *Diabetes* 56:2541–2546

113. Shiau HJ, Reynolds MA (2010) Sex Differences in Destructive Periodontal Disease: A Systematic Review. *J Periodontol* 81:1379–1389
114. Siney EJ, Holden A, Casselden E, Bulstrode H, Thomas GJ, Willaime-Morawek S (2017) Metalloproteinases ADAM10 and ADAM17 Mediate Migration and Differentiation in Glioblastoma Sphere-Forming Cells. *Mol Neurobiol* 54:3893–3905
115. Slots J, Ting M (1999) Actinobacillus actinomycetemcomitans and Porphyromonas gingivalis in human periodontal disease: Occurrence and treatment. *Periodontol* 2000 20:82–121
116. Smith KM, Gaultier A, Cousin H, Alfandari D, White JM, DeSimone DW (2002) The cysteine-rich domain regulates ADAM protease function in vivo. *J Cell Biol* 159:893–902
117. Socransky SS (1970) Relationship of Bacteria to the Etiology of Periodontal Disease. *J Dent Res* 49:203–222
118. Socransky SS (1979) Criteria for the infectious agents in dental caries and periodontal disease. *J Clin Periodontol* 6:16–21
119. Socransky SS, Haffajee AD (2002) Dental biofilms: Difficult therapeutic targets. *Periodontol* 2000 28:12–55
120. Stoeck A, Keller S, Riedle S, Sanderson MP, Runz S, Le Naour F, Gutwein P, Ludwig A, Rubinstein E, Altevogt P (2006) A role for exosomes in the constitutive and stimulus-induced ectodomain cleavage of L1 and CD44. *Biochem J* 393:609–618
121. Subbarao K, Nattuthurai G, Sundararajan S, Sujith I, Joseph J, Syedshah Y (2019) Gingival Crevicular Fluid: An Overview. *J Pharm Bioallied Sci* 11:S135
122. Takeda S (2016) ADAM and ADAMTS family proteins and snake venom metalloproteinases: A structural overview. *Toxins (Basel)* 8:
123. Togashi N, Ura N, Higashiura K, Murakami H, Shimamoto K (2002) Effect of TNF- α -converting enzyme inhibitor on insulin resistance in fructose-fed rats. *Hypertension* 39:578–580
124. Tomita T, Kubota T, Nakasone N, Morozumi T, Abe D, Maruyama S, Shimizu T, Horimizu M, Saku T, Yoshie H (2013) Gene and protein localisation of tumour necrosis factor (TNF)- α converting enzyme in gingival tissues from periodontitis patients with drug-induced gingival overgrowth. *Arch Oral Biol* 58:1014–1020
125. Valkovskaya N, Kayed H, Felix K, Hartmann D, Giese NA, Osinsky SP, Friess H, Kleeff J (2007) ADAM8 expression is associated with increased invasiveness and reduced patient survival in pancreatic cancer. *J Cell Mol Med* 11:1162–1174
126. Van Der Vorst EPC, Jeurissen M, Wolfs IMJ, Keijbeck A, Theodorou K, Wijnands E, Schurgers L, Weber S, Gijbels MJ, Hamers AAJ, Dreymueller D, Rose-John S, De Winther MPJ, Ludwig A, Saftig P, Biessen EAL, Donners MMPC (2015) Myeloid a disintegrin and metalloproteinase domain 10 deficiency modulates atherosclerotic plaque composition by shifting the balance from inflammation toward fibrosis. *Am J Pathol* 185:1145–1155
127. Worley JR, Hughes DA, Dozio N, Gavrilovic J, Sampson MJ (2007) Cardiovascular Diabetology Low density lipoprotein from patients with Type 2 diabetes increases expression of monocyte matrix metalloproteinase and ADAM metalloproteinase genes.
128. Yu B, Wang CY (2022) Osteoporosis and periodontal diseases - An update on their association and mechanistic links. *Periodontol* 2000 89:99–113
129. Zack MD, Melton MA, Stock JL, Storer CE, Barve RA, Minnerly JC, Weiss DJ, Stejskal JA, Tortorella MD, Turk JR, Shevlin KM, Malfait AM (2009) Reduced incidence and severity of experimental autoimmune arthritis in mice expressing

- catalytically inactive A disintegrin and metalloproteinase 8 (ADAM8). Clin Exp Immunol 158:246–256
130. Zahnhalteapparat. URL: <https://m.medeco.de/dentalatlas/zahn-mund-kieferheilkunde-kurzfassung/parodontologie/zahnhalteapparat/>
131. Osteoporose: zm-online. URL: <https://www.zm-online.de/archiv/2013/17/medizin/osteoporose/>
132. Die ADAMs - A Disintegrin and Metalloproteinase. URL: <http://www.bioscientist.de/Seiten/ADAMs.html>
133. Labordiagnostik bei Parodontopathien - IMD Institut für medizinische Diagnostik, Labor. URL: <https://www.imd-berlin.de/spezielle-kompetenzen/zahnmedizin/labordiagnostik-bei-parodontopathien>
134. Quick Guide Comparative Proteomics Kit II: Western Blot Module-Quick Guide Lesson 1 Quick Guide.

7 Anhang

7.1 Materiallisten

7.1.1 ADAM-Lysepuffer

5 mM Tris-HCl

1 mM EGTA

250 mM Saccharose

0,1 % (w/v) SDS

1 % TritonX-100

1 x Complete

1 mM Na₃VO₄

1 mM PMSF

10 mM 1,10-Phenanthrolin

7.1.2 Laemmli-puffer

| | |
|-----------------------|---------------------|
| 8% SDS | 8g |
| 120mM Tris pH6,8 (1M) | 12ml |
| 0,01% Bromphenolblau | 10mg |
| 20% Glycerin | 25,2g |
| H ₂ O | Auf 100ml auffüllen |

Für 2xLaemmli: 900µl Laemmli-puffer + 100µl β-mercaptoethanol

Für 5xLaemmli: 900µl Laemmli-puffer + 125µl β-mercaptoethanol

7.1.3 BCA

BCA-Prot.Assay Reagenz A

BCA-Prot.Assay Reagenz B

Albumin Standard-Ampullen, 2mg/ml

5µl Probe

7.1.4 Westernblot

7.1.4.1 Gele

| | |
|-----------------------|---------|
| Trenngel | 8% |
| 1. 4x TG- Puffer | 2,5ml |
| 2. 40% Aa 29:1 | 2,0ml |
| 3. H ₂ O | 5,41ml |
| 4. 10% APS | 75µl |
| 5. TEMED | 15µl |
| Summe | 10ml |
| Sammelgel | 4% |
| 1.4xSG- Puffer | 1,25ml |
| 2. 40% Acrylamid 29:1 | 0,50ml |
| 3. H ₂ O | 3,21ml |
| 4. 10% APS | 37,5 µl |
| 5. TEMED | 7,5 µl |
| Summe | 5ml |

7.1.4.2 Antikörper

| Name | Firma | Bestellnummer | Lagertemperatur | Host |
|---------------------------------|--------------------------|---------------|-----------------|--------|
| Human ADAM8 Ectodomain Antibody | R&D Systems | AF1031 | -20°C | goat |
| Anti-ADAM 10 c-terminus | Chemicon | AB19026 | -20°C | rabbit |
| Anti-ADAM 17 Antibody | Chemicon | AB19027 | -20°C | rabbit |
| GAPDH | Santa Cruz Biotechnology | sc-25778 | 4°C | rabbit |

7.1.4.3 Marker

Fisher BioReagents™ EZ-Run™

7.1.4.4 Kontrollen

Positivkontrolle: A549 ADAM8 transfizierte Zellen

Negativkontrolle: A549 nicht beladenen Zellen

7.1.4.5 Puffer

Trenngel-puffer

| | | |
|------------------------------|--|---------------------|
| Trenngel-puffer 400ml | | pH8,8 with HCL |
| 1,5 M Tris | | 73,8g |
| 0,4% SDS | | 1,6g |
| H ₂ O | | auf 400ml auffüllen |

Sammelgel-puffer

| | | |
|-------------------------------|--|---------------------|
| Sammelgel-puffer 240ml | | pH6,8 with HCL |
| 0,5M Tris | | 14,7g |
| 0,4% SDS | | 0,96g |
| H ₂ O | | auf 240ml auffüllen |

10%SDS

| | | |
|---|--|------------------|
| 10xSDS Electrophoresis-buffer 1l | | pH 8,3 with HCL |
| 250mM Tris | | 30g |
| 1,92M Glycin | | 144g |
| 1% SDS | | 10g |
| H ₂ O | | auf 1l auffüllen |

10xTBS

| | | |
|--------------------|--|------------------|
| 10 x TBS 1L | | pH 7,5 with HCL |
| 500mM Tris | | 60,5g |
| 1,5M NaCl | | 87,6g |
| H ₂ O | | auf 1l auffüllen |

Blotting-puffer

| | | |
|-----------------------|--|--------|
| Blot-buffer 1l | | |
| 100% Methanol | | 200 ml |
| 10xSDS | | 100 ml |
| H ₂ O | | 700 ml |

5% BSA

| 5% BSA | |
|-----------------------------------|-------|
| BSA | 5g |
| 1xTBS | 100ml |
| 8% NaN ₃ (final 0,05%) | 625µl |

8% NaN₃

| | |
|------------------|-------|
| NaN ₃ | 8g |
| H ₂ O | 100ml |

10xTBS

| 10 x TBS 1L | | pH 7,5 with HCL |
|--------------------|--|-----------------|
| 500mM Tris | | 60,5g |
| 1,5M NaCl | | 87,6g |

Stripping-puffer

| Stripping-puffer | |
|-------------------------|----------|
| Tris-HCL 1M | 0,125ml |
| 1xTBS | 1l |
| SDS 10% | 10ml |
| β-Mecaptoethanol | 350µl |
| H ₂ O | 36,525ml |

5% Magermilch

| 5% Magermilch in 1xTBS 1L | | pH 7,5 with HCL |
|----------------------------------|--|-----------------|
| Magermilchpulver | | 50g |
| 1xTBS | | 1l |

10xTween in TBS

| | |
|----------|-------|
| Tween-20 | 20g |
| 1xTBS | 200ml |

7.2 PrAMA

Stock FRET-Polypeptid Substrate (10mM DMSO, stored at -20°C, obtained from BioZyme Inc, Apex, NC)



- PEPDab013 (Dabcyl-HGDQMAQKSK(5FAM)-NH₂)

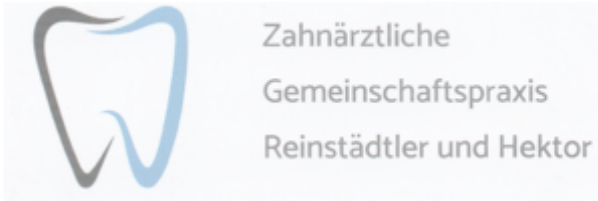
Aktivitäts-Puffer: 1 mM ZnCl₂, 20 mM Tris (pH 8.0), 10 mM CaCl₂, 150 mM NaCl, 0,0006% Brij-3

7.3 Datenblätter

7.3.1 Einwilligungserklärung Gemeinschaftspraxis/Klinik

7.3.1.1 Gemeinschaftspraxis

| | | |
|--|---|--|
|  | <p>Zahnärztliche Gemeinschaftspraxis Reinstädler und Hektor</p> | <p>Unsere Sprechzeiten</p> <p>Montag: 07:30 - 19:00 Dienstag: 07:30 - 20:00 Mittwoch: 8:00 - 16:00 Donnerstag: 8:00 - 11:30 & 15:00 - 19:00 Freitag: 8:00 - 13:00</p>  |
| <p><small>Zahnärztliche Gemeinschaftspraxis Reinstädler und Hektor, Grubenstraße 5, 66767 Wedgassen</small></p> | | <p><small>Grubendraße 5, D-66767 Wedgassen Sekretariat Telefon 0 68 34 / 42304 Fax 0 68 34 / 401542 www.reinstaedler-heidor.de</small></p> |
| <p>Einwilligungserklärung</p> <p>Rolle von Metalloproteinasen bei der Beurteilung von parodontalen Erkrankungen</p> | | |
| <p>Hiermit möchte ich mit der Zurverfügungstellung von Sulkusfluid als menschlichem Untersuchungsmaterial die oben erwähnte Grundlagenforschung unterstützen. Meine Einwilligung, an diesem Forschungsvorhaben als Spender von menschlichem Untersuchungsmaterial teilzunehmen, erfolgt freiwillig. Durch die Untersuchung dieses Materials werde ich nicht zusätzlich belastet. Ich weiß, dass ich jederzeit ohne Angaben von Gründen meine Zusage zurückziehen kann und mir daraus keine Nachteile entstehen.</p> | | |
| <p>Name des Patienten in Druckbuchstaben:.....</p> | | |
| <ul style="list-style-type: none">▪ Ich bin von Frau/ Herrn _____ über Wesen, Bedeutung und Tragweite der Studie sowie die sich für mich daraus ergebenden Anforderungen aufgeklärt worden. Ich habe darüber hinaus den Text der Patientenaufklärung und dieser Einwilligungserklärung gelesen.▪ Ich hatte ausreichend Zeit, Fragen zu stellen und mich zu entscheiden. Aufgetretene Fragen wurden mir von der Studienärztin/vom Studienarzt beantwortet.▪ Ich weiß, dass ich meine freiwillige Mitwirkung jederzeit beenden kann, ohne dass mir daraus Nachteile entstehen. | | |
| <p>Ich erkläre mich bereit, an der Studie teilzunehmen.</p> | | |
| <p>1. Ich willige ein, dass personenbezogene Daten über mich, wie in der Informationsschrift beschrieben, erhoben und in Papierform sowie auf elektronischen Datenträgern aufgezeichnet werden.</p> | | |
| <p>Soweit erforderlich, dürfen die erhobenen Daten pseudonymisiert (verschlüsselt) weitergegeben werden:</p> <p>a) an Jun.-Prof. Dr. rer. nat. Daniela Yildiz</p> | | |
| <p>2. Zur Kontrolle der Datenübermittlung willige ich dazu ein, dass dies durch einen angehenden Zahnmediziner geschieht. Zu diesem Zweck entbinde ich die mich behandelnden Ärzte von der ärztlichen Schweigepflicht.</p> | | |
| <p>Ich bin darüber aufgeklärt worden, dass ich meine Einwilligung jederzeit widerrufen kann. Im Falle des Widerrufs werden keine weiteren Daten mehr erhoben. Ich kann in diesem Fall die Löschung der Daten verlangen.</p> | | |
| <p><small>Seite 1 von 2</small></p> | | |



Kontaktdaten des behandelnden Arztes:

(Name und Vorname in Druckschrift)

Grubenstraße 5, D-66787 Wadgassen

06843/42304

Ich willige in die Verarbeitung der genannten Daten ein.

Ein Exemplar der Informationsschrift und der Einwilligungserklärung habe ich erhalten. Ein Exemplar verbleibt in der zahnärztlichen Gemeinschaftspraxis Reinstädtler und Hektor.

Unterschrift des Teilnehmers/der Teilnehmerin

(Name und Vorname in Druckschrift)

(Datum)

(Unterschrift)

Erklärung und Unterschrift des aufklärenden Arztes/der aufklärenden Ärztin

Ich habe das Aufklärungsgespräch geführt und die Einwilligung eingeholt.

(Name und Vorname in Druckschrift)

(Datum)


(Unterschrift)

7.3.1.2 Klinik

Zentrum für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde
Klinik für
Zahnerhaltung, Parodontologie und Präventive Zahnheilkunde

Direktor: Prof. Dr. med. dent. Matthias Hannig

Universitätsklinikum des Saarlandes, Klinik für Zahnerhaltung,
Parodontologie und Präventive Zahnheilkunde, Gebäude 73, D-66421 Homburg

 UKS
Universitätsklinikum
des Saarlandes

Gebäude 73, D-66421 Homburg
Saarland
Telefon 0 68 41 / 16 – 2 49 60
Fax 0 68 41 / 16 – 2 49 54
E-Mail silvia.klein@uks.eu
Poliklinik
Telefon 0 68 41 / 16 – 2 2 49 64
Web www.uks.eu/zahnerhaltung

Einwilligungserklärung
Rolle von Metalloproteinasen bei der Beurteilung von parodontalen Erkrankungen

Hiermit möchte ich mit der Zurverfügungstellung von Sulkusfluid als menschlichem Untersuchungsmaterial die oben erwähnte Grundlagenforschung unterstützen. Meine Einwilligung, an diesem Forschungsvorhaben als Spender von menschlichem Untersuchungsmaterial teilzunehmen, erfolgt freiwillig. Durch die Untersuchung dieses Materials werde ich nicht zusätzlich belastet. Ich weiß, dass ich jederzeit ohne Angaben von Gründen meine Zusage zurückziehen kann und mir daraus keine Nachteile entstehen.

Name des Patienten in Druckbuchstaben:.....

- Ich bin von Frau/ Herrn _____ über Wesen, Bedeutung und Tragweite der Studie sowie die sich für mich daraus ergebenden Anforderungen aufgeklärt worden. Ich habe darüber hinaus den Text der Patientenaufklärung und dieser Einwilligungserklärung gelesen.
- Ich hatte ausreichend Zeit, Fragen zu stellen und mich zu entscheiden. Aufgetretene Fragen wurden mir von der Studienärztin/vom Studienarzt beantwortet.
- Ich weiß, dass ich meine freiwillige Mitwirkung jederzeit beenden kann, ohne dass mir daraus Nachteile entstehen.

Ich erkläre mich bereit, an der Studie teilzunehmen.

1. Ich willige ein, dass personenbezogene Daten über mich, wie in der Informationsschrift beschrieben, erhoben und in Papierform sowie auf elektronischen Datenträgern aufgezeichnet werden.

Soweit erforderlich, dürfen die erhobenen Daten pseudonymisiert (verschlüsselt) weitergegeben werden:

- a) an Jun.-Prof. Dr. rer. nat. Daniela Yildiz

2. Zur Kontrolle der Datenübermittlung willige ich dazu ein, dass dies durch einen angehenden Zahnmediziner geschieht. Zu diesem Zweck entbinde ich die mich behandelnden Ärzte von der ärztlichen Schweigepflicht.

Ich bin darüber aufgeklärt worden, dass ich meine Einwilligung jederzeit widerrufen kann. Im Falle des Widerrufs werden keine weiteren Daten mehr erhoben. Ich kann in diesem Fall die Löschung der Daten verlangen.

Seite 1 von 2

Zentrum für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde

Klinik für
Zahnerhaltung, Parodontologie und Präventive Zahnheilkunde



Direktor: Prof. Dr. Matthias Hannig

Kontaktdaten des behandelnden Arztes:

(Name und Vorname in Druckschrift)

Kirberger Strasse Gebäude 73, D-66421 Homburg/ Saar

06841/1624964

Ich willige in die Verarbeitung der genannten Daten ein.

Ein Exemplar der Informationsschrift und der Einwilligungserklärung habe ich erhalten. Ein Exemplar verbleibt in der Klinik für Zahnerhaltung, Parodontologie und präventive Zahnheilkunde (Gebäude 73).

Unterschrift des Teilnehmers/der Teilnehmerin

(Name und Vorname in Druckschrift)

(Datum)

(Unterschrift)

Erklärung und Unterschrift des aufklärenden Arztes/der aufklärenden Ärztin

Ich habe das Aufklärungsgespräch geführt und die Einwilligung eingeholt.


(Name und Vorname in Druckschrift)

(Datum)

(Unterschrift)

7.3.2 Patienteninformationen Gemeinschaftspraxis/Klinik


7.3.2.1 Gemeinschaftspraxis



Zahnärztliche
Gemeinschaftspraxis
Reinstädler und Hektor

Unsere Sprechzeiten

Montag: 07:30 - 19:00
Dienstag: 07:30 - 20:00
Mittwoch: 8:00 - 16:00
Donnerstag: 8:00 - 11:30 & 15:00 - 19:00
Freitag: 8:00 - 13:00



Zahnärztliche Gemeinschaftspraxis Reinstädler und Hektor,
Grubenstraße 5, 68757 Wedgassen

Grubenstraße 5, D-68757 Wedgassen
Sekretariat
Telefon 0 68 34 / 42304
Fax 0 68 34 / 401542
www.reinstaedler-hektor.de

Patienteninformation

Rolle von Metalloproteinasen bei der Beurteilung von parodontalen Erkrankungen

Entzündungen sind notwendige Abwehrreaktionen gegen in den Körper eingedrungene Krankheitserreger, wie z.B. Viren und Bakterien. Eine zu starke und insbesondere andauernde Entzündung kann zu dauerhaften Schäden des Gewebes führen, wie sie beispielsweise im Zuge von Entzündungen des Zahnhalteapparats kommt. Hierbei kann es zur Bildung von Zahnfleischtaschen und Knochenabbau kommen.

In der Arbeitsgruppe von Frau Yildiz werden grundlegende Mechanismen der Entzündungsregulation durch ADAM Proteasen untersucht. Dabei handelt es sich um Metalloproteinasen, die zum einen Botenstoffe der Entzündung freisetzen, zum anderen aber auch an der Zerstörung des umliegenden Gewebes beteiligt sind. Metalloproteinasen sind Enzyme, welche in ihrem strukturellen Aufbau positiv geladene Metallionen aufweisen. In Zusammenarbeit mit der Klinik für Zahnerhaltung, Parodontologie und präventive Zahnheilkunde und der zahnärztlichen Gemeinschaftspraxis Reinstädler und Hektor soll die Beteiligung der ADAM Proteasen am Entzündungsprozess bei parodontalen Erkrankungen untersucht werden. Mechanistische Untersuchungen können im Reagenzglas erfolgen. Dies dient dazu herauszufinden, welche Interaktionen von Komponenten in einem System ein bestimmtes Phänomen hervorruft. Für die Überprüfung der klinischen Bedeutung ist es jedoch essentiell, durch Verwendung der Sulkusflüssigkeit, welches ein vom Zahnfleisch und dem Zahnhalteapparat in der Zahnfleischrinne gebildetes Exsudat darstellt, a) die Art, Menge und Form der vorhandenen Metalloproteinasen zu untersuchen und b) Mediatoren (Botenstoffe) zu entdecken, die durch ihre Aktivität in parodontalen Erkrankungen freigesetzt werden.

Zu diesem Zwecke werden für eine Studie zur Rolle von Metalloproteinasen bei der Beurteilung von parodontalen Erkrankungen Patient(inn)en für die Entnahme von Sulkusfluid (Sulkusflüssigkeit) gesucht. Im Rahmen der Studie werden von den Patient(inn)en das Alter, Geschlecht, und das Stadium der Parodontitis erfasst. Da eine Beeinflussung parodontaler Erkrankungen durch andere entzündliche und chronische Erkrankungen nicht ausgeschlossen werden kann, werden zusätzlich Angaben zu akuten und chronischen Erkrankungen der Lunge, kardiovaskulären Erkrankungen, Diabetes mellitus und hepatischen Erkrankungen aufgezeichnet. Das Einbringen der Papierspitzen zur Entnahme von Sulkusflüssigkeit könnte eine leichte Blutung induzieren und ein vorübergehendes Druckgefühl auslösen. Auch eine Verschleppung von Keimen aus oberflächlichen in tiefer gelegene Regionen wäre möglich. Die Probengewinnung erfolgt entsprechend der in der Routineuntersuchung durchgeführten Taschensondierung, sodass kein erhöhtes Risiko für die Proband(inn)en entsteht.

Die Proben werden von der/dem Sulkusfluid gewinnenden Zahnärztin/ Zahnarzt pseudonymisiert an die Arbeitsgruppe von Frau Yildiz weitergegeben, d.h. es erfolgt keine personenbezogene Datenerfassung oder Datenweitergabe. Dies gilt gleichermaßen für die aus Röntgenaufnahmen gewonnenen Daten. Die Röntgenaufnahmen werden nur bei vorliegender medizinischer Indikation gewonnen und nicht extra aus Studiengründen, sodass keine zusätzliche Strahlenbelastung für die Patient(inn)en entsteht. Die Proben werden fortlaufend nummeriert. Der Ansprechpartner ist immer, z.B. im Falle der jederzeit möglichen Einwilligungsrücknahme, die Zahnärztin/ der Zahnarzt, sodass über die Mitteilung des Entnahmetags sowie die Probennummer alle Proben vernichtet und Versuchsdaten unter Wahrnehmung der Patienten-anonymität gelöscht werden können.

Seite 1 von 3



Zahnärztliche
Gemeinschaftspraxis
Reinstädtler und Hektor

Datenschutz

- Rechtsgrundlage für die Datenverarbeitung ist Ihre freiwillige Einwilligung (Art. 6 Abs. 1 Buchst. c) DSGVO).

Die Daten werden zu jeder Zeit vertraulich behandelt. Die Daten werden in pseudonymisierter Form an den Initiator der Studie, Jun.-Prof. Dr. rer. nat. Daniela Yildiz zum Zweck der wissenschaftlichen Auswertung weitergeleitet. Zugriff auf die personenbezogenen Daten haben nur die zuständigen Personen im jeweiligen Studienzentrum (Klinik für Zahnerhaltung, Parodontologie und präventive Zahnheilkunde (Gebäude 73) oder zahnärztliche Gemeinschaftspraxis Reinstädtler und Hektor).

Pseudonymisieren bedeutet, dass die personenbezogenen Daten wie der Name und das Geburtsdatum ohne Hinzubeziehung einer Liste nicht mehr einer konkreten Person zugeordnet werden können. Die personenbezogenen Daten werden durch einen Nummern- und Buchstabencode ersetzt; die Angabe des Geburtsdatums wird auf das Geburtsjahr beschränkt. In der Praxis ist eine Liste hinterlegt, auf der die Namen den Nummern- und Buchstabencodes zugeordnet sind. Diese Liste wird in der Praxis gesondert aufbewahrt und unterliegt dort technischen und organisatorischen Maßnahmen, die gewährleisten, dass die personenbezogenen Daten Ihnen durch unbefugte Personen nicht zugeordnet werden können. Eine Entschlüsselung erfolgt nur bei Widerruf der Einwilligungserklärung.

Die Daten und Proben werden nicht nach Beendigung oder Abbruch der Studie aufbewahrt. Sie sind gegen unbefugten Zugriff gesichert. Sie werden gelöscht, wenn sie nicht mehr benötigt werden.

Zuständige und zur Verschwiegenheit verpflichtete Mitarbeiter des Initiators der Studie können, auch nachdem alle relevanten Daten bereits übermittelt wurden, Einsicht in die in der Praxis vorhandenen Behandlungsunterlagen nehmen, um die Datenübertragung zu überprüfen. Durch Ihre Unterschrift entbinden Sie zu diesem Zweck Ihre Ärzte von der ärztlichen Schweigepflicht.

Sind mit der Datenverarbeitung Risiken verbunden?

Bei jeder Erhebung, Speicherung, Nutzung und Übermittlung von Daten bestehen Vertraulichkeitsrisiken (z.B. die Möglichkeit, die betreffende Person zu identifizieren). Diese Risiken lassen sich nicht völlig ausschließen und steigen, je mehr Daten miteinander verknüpft werden können. Der Initiator der Studie versichert Ihnen, alles nach dem Stand der Technik Mögliche zum Schutz Ihrer Privatsphäre zu tun und Daten nur an Stellen weiterzugeben, die ein geeignetes Datenschutzkonzept vorweisen können. Medizinische Risiken sind mit der Datenverarbeitung nicht verbunden.

Kann ich meine Einwilligung widerrufen?

Sie können Ihre jeweilige Einwilligung jederzeit ohne Angabe von Gründen schriftlich oder mündlich widerrufen, ohne dass Ihnen daraus ein Nachteil entsteht. Wenn Sie Ihre Einwilligung widerrufen, werden keine weiteren Daten mehr erhoben. Die bis zum Widerruf erfolgte Datenverarbeitung bleibt jedoch rechtmäßig.

Sie können im Fall des Widerrufs auch die Löschung Ihrer Daten verlangen.



Zahnärztliche
Gemeinschaftspraxis
Reinstädtler und Hektor

Welche weiteren Rechte habe ich bezogen auf den Datenschutz?

Sie haben das Recht, vom Verantwortlichen Auskunft über die von Ihnen gespeicherten personenbezogenen Daten (einschließlich der kostenlosen Überlassung einer Kopie der Daten) zu verlangen. Ebenfalls können Sie die Berichtigung unzutreffender Daten sowie gegebenenfalls eine Übertragung der von Ihnen zur Verfügung gestellten Daten und die Einschränkung ihrer Verarbeitung verlangen.

Bitte wenden Sie sich im Regelfall an das Prüfzentrum, denn allein das Prüfzentrum kann aufgrund des Pseudonymisierungsprozesses vollumfänglich auf Ihre Daten zugreifen bzw. entsprechende Auskünfte geben.

Sie haben ein Beschwerderecht bei jeder Aufsichtsbehörde für den Datenschutz. Eine Liste der Aufsichtsbehörden in Deutschland finden Sie unter

https://www.bfdi.bund.de/DE/Infothek/Anschriften_Links/anschriften_links-node.html

7.3.2.2 Klinik

Zentrum für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde

Klinik für
Zahnerhaltung, Parodontologie und Präventive Zahnheilkunde



UKS
Universitätsklinikum
des Saarlandes

Direktor: Prof. Dr. med. dent. Matthias Hannig

Universitätsklinikum des Saarlandes, Klinik für Zahnerhaltung,
Parodontologie und Präventive Zahnheilkunde, Gebäude 73, D-66421 Homburg

Gebäude 73, D-66421 Homburg
Sekretariat
Telefon 0 68 41 / 16 – 2 49 60
Fax 0 68 41 / 16 – 2 49 64
E-Mail silvia.klein@uks.eu
Poliklinik
Telefon 0 68 41 / 16 – 2 2 49 64
Web www.uks.eu/zahnerhaltung

Patienteninformation

Rolle von Metalloproteinasen bei der Beurteilung von parodontalen Erkrankungen

Entzündungen sind notwendige Abwehrreaktionen gegen in den Körper eingedrungene Krankheitserreger, wie z.B. Viren und Bakterien. Eine zu starke und insbesondere andauernde Entzündung kann zu dauerhaften Schäden des Gewebes führen, wie sie beispielsweise im Zuge von Entzündungen des Zahnhalteapparats kommt. Hierbei kann es zur Bildung von Zahnfleischtaschen und Knochenabbau kommen.

In der Arbeitsgruppe von Frau Yildiz werden grundlegende Mechanismen der Entzündungsregulation durch ADAM Proteasen untersucht. Dabei handelt es sich um Metalloproteinasen, die zum einen Botenstoffe der Entzündung freisetzen, zum anderen aber auch an der Zerstörung des umliegenden Gewebes beteiligt sind. Metalloproteinasen sind Enzyme, welche in ihrem strukturellen Aufbau positiv geladene Metallionen aufweisen. In Zusammenarbeit mit der Klinik für Zahnerhaltung, Parodontologie und präventive Zahnheilkunde und der zahnärztlichen Gemeinschaftspraxis Reinstädtler und Hektor soll die Beteiligung der ADAM Proteasen am Entzündungsprozess bei parodontalen Erkrankungen untersucht werden. Mechanistische Untersuchungen können im Reagenzglas erfolgen. Dies dient dazu herauszufinden, welche Interaktionen von Komponenten in einem System ein bestimmtes Phänomen hervorruft. Für die Überprüfung der klinischen Bedeutung ist es jedoch essentiell, durch Verwendung der Sulkusflüssigkeit, welches ein vom Zahnfleisch und dem Zahnhalteapparat in der Zahnfleischrinne gebildetes Exsudat darstellt, a) die Art, Menge und Form der vorhandenen Metalloproteinasen zu untersuchen und b) Mediatoren (Botenstoffe) zu entdecken, die durch ihre Aktivität in parodontalen Erkrankungen freigesetzt werden.

Zu diesem Zwecke werden für eine Studie zur Rolle von Metalloproteinasen bei der Beurteilung von parodontalen Erkrankungen Patient(inn)en für die Entnahme von Sulkusfluid (Sulkusflüssigkeit) gesucht. Im Rahmen der Studie werden von den Patient(inn)en das Alter, Geschlecht, und das Stadium der Parodontitis erfasst. Da eine Beeinflussung parodontaler Erkrankungen durch andere entzündliche und chronische Erkrankungen nicht ausgeschlossen werden kann, werden zusätzlich Angaben zu akuten und chronischen Erkrankungen der Lunge, kardiovaskulären Erkrankungen, Diabetes mellitus und hepatischen Erkrankungen aufgezeichnet. Das Einbringen der Papierspitzen zur Entnahme von Sulkusflüssigkeit könnte eine leichte Blutung induzieren und ein vorübergehendes Druckgefühl auslösen. Auch eine Verschleppung von Keimen aus oberflächlichen in tiefer gelegene Regionen wäre möglich. Die Probengewinnung erfolgt entsprechend der in der Routineuntersuchung durchgeführten Taschensondierung, sodass kein erhöhtes Risiko für die Proband(inn)en entsteht.

Die Proben werden von der/dem Sulkusfluid gewinnenden Zahnärztin/ Zahnarzt pseudonymisiert an die Arbeitsgruppe von Frau Yildiz weitergegeben, d.h. es erfolgt keine personenbezogene Datenerfassung oder Datenweitergabe. Dies gilt gleichermaßen für die aus Röntgenaufnahmen gewonnenen Daten. Die Röntgenaufnahmen werden nur bei vorliegender medizinischer Indikation gewonnen und nicht extra aus Studiengründen, sodass keine zusätzliche Strahlenbelastung für die Patient(inn)en entsteht. Die Proben werden fortlaufend nummeriert. Der Ansprechpartner ist immer, z.B. im Falle der jederzeit möglichen Einwilligungsrücknahme, die Zahnärztin/ der Zahnarzt, sodass über die Mitteilung des Entnahmetags sowie die Probennummer alle Proben vernichtet und Versuchsdaten unter Wahrnehmung der Patienten-anonymität gelöscht werden können.

Seite 1 von 3

Zentrum für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde

Klinik für
Zahnerhaltung, Parodontologie und Präventive Zahnheilkunde



UKS
Universitätsklinikum
des Saarlandes

Direktor: Prof. Dr. Matthias Hannig

Datenschutz

- Rechtsgrundlage für die Datenverarbeitung ist Ihre freiwillige Einwilligung (Art. 6 Abs. 1 Buchst. c) DSGVO).

Die Daten werden zu jeder Zeit vertraulich behandelt. Die Daten werden in pseudonymisierter Form an den Initiator der Studie, Jun.-Prof. Dr. rer. nat. Daniela Yildiz zum Zweck der wissenschaftlichen Auswertung weitergeleitet. Zugriff auf die personenbezogenen Daten haben nur die zuständigen Personen im jeweiligen Studienzentrum (Klinik für Zahnerhaltung, Parodontologie und präventive Zahnheilkunde (Gebäude 73) oder zahnärztliche Gemeinschaftspraxis Reinstädtler und Hektor).

Pseudonymisieren bedeutet, dass die personenbezogenen Daten wie der Name und das Geburtsdatum ohne Hinzubeziehung einer Liste nicht mehr einer konkreten Person zugeordnet werden können. Die personenbezogenen Daten werden durch einen Nummern- und Buchstabencode ersetzt; die Angabe des Geburtsdatums wird auf das Geburtsjahr beschränkt. In der Praxis ist eine Liste hinterlegt, auf der die Namen den Nummern- und Buchstabencodes zugeordnet sind. Diese Liste wird in der Praxis gesondert aufbewahrt und unterliegt dort technischen und organisatorischen Maßnahmen, die gewährleisten, dass die personenbezogenen Daten Ihnen durch unbefugte Personen nicht zugeordnet werden können. Eine Entschlüsselung erfolgt nur bei Widerruf der Einwilligungserklärung.

Die Daten und Proben werden nicht nach Beendigung oder Abbruch der Studie aufbewahrt. Sie sind gegen unbefugten Zugriff gesichert. Sie werden gelöscht, wenn sie nicht mehr benötigt werden.

Zuständige und zur Verschwiegenheit verpflichtete Mitarbeiter des Initiators der Studie können, auch nachdem alle relevanten Daten bereits übermittelt wurden, Einsicht in die in der Praxis vorhandenen Behandlungsunterlagen nehmen, um die Datenübertragung zu überprüfen. Durch Ihre Unterschrift entbinden Sie zu diesem Zweck Ihre Ärzte von der ärztlichen Schweigepflicht.

Sind mit der Datenverarbeitung Risiken verbunden?

Bei jeder Erhebung, Speicherung, Nutzung und Übermittlung von Daten bestehen Vertraulichkeitsrisiken (z.B. die Möglichkeit, die betreffende Person zu identifizieren). Diese Risiken lassen sich nicht völlig ausschließen und steigen, je mehr Daten miteinander verknüpft werden können. Der Initiator der Studie versichert Ihnen, alles nach dem Stand der Technik Mögliche zum Schutz Ihrer Privatsphäre zu tun und Daten nur an Stellen weiterzugeben, die ein geeignetes Datenschutzkonzept vorweisen können. Medizinische Risiken sind mit der Datenverarbeitung nicht verbunden.

Kann ich meine Einwilligung widerrufen?

Sie können Ihre jeweilige Einwilligung jederzeit ohne Angabe von Gründen schriftlich oder mündlich widerrufen, ohne dass Ihnen daraus ein Nachteil entsteht. Wenn Sie Ihre Einwilligung widerrufen, werden keine weiteren Daten mehr erhoben. Die bis zum Widerruf erfolgte Datenverarbeitung bleibt jedoch rechtmäßig.

Sie können im Fall des Widerrufs auch die Löschung Ihrer Daten verlangen.

Zentrum für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde

Klinik für
Zahnerhaltung, Parodontologie und Präventive Zahnheilkunde



UKS
Universitätsklinikum
des Saarlandes

Direktor: Prof. Dr. Matthias Hannig

Welche weiteren Rechte habe ich bezogen auf den Datenschutz?

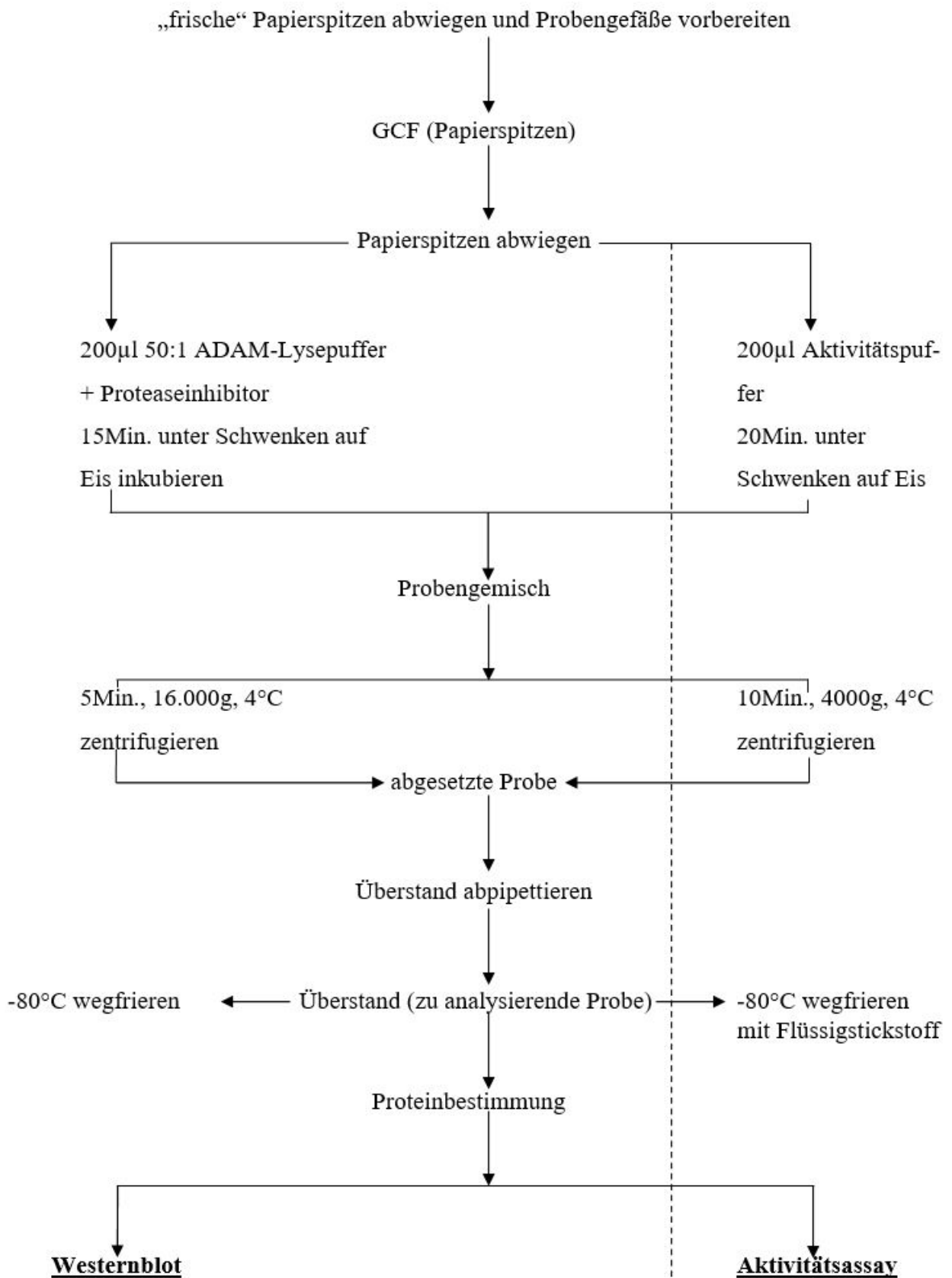
Sie haben das Recht, vom Verantwortlichen Auskunft über die von Ihnen gespeicherten personenbezogenen Daten (einschließlich der kostenlosen Überlassung einer Kopie der Daten) zu verlangen. Ebenfalls können Sie die Berichtigung unzutreffender Daten sowie gegebenenfalls eine Übertragung der von Ihnen zur Verfügung gestellten Daten und die Einschränkung ihrer Verarbeitung verlangen.

Bitte wenden Sie sich im Regelfall an das Prüfzentrum, denn allein das Prüfzentrum kann aufgrund des Pseudonymisierungsprozesses vollumfänglich auf Ihre Daten zugreifen bzw. entsprechende Auskünfte geben.

Sie haben ein Beschwerderecht bei jeder Aufsichtsbehörde für den Datenschutz. Eine Liste der Aufsichtsbehörden in Deutschland finden Sie unter

https://www.bfdi.bund.de/DE/Infothek/Anschriften_Links/anschriften_links-node.html

7.4 Probenverarbeitungsschema



8 Publikation / Danksagung

8.1 Publikation

Aljohmani A*, Heinze H*, Gharzia FG*, Reda B, Abdrabou AMM, Becker S, Bischoff M, Hannig M, Yildiz D. Extracellular release of a disintegrin and metalloproteinases orchestrates periodontal disease severity. *bioRxiv* 2023 DOI: 10.1101/2023.07.21.550016 (*equal contribution)

Aljohmani A*, Heinze H*, Gharzia FG*, Reda B, Abdrabou AMM, Becker S, Bischoff M, Hannig M, Yildiz D. Extracellular release of ADAMs orchestrates periodontal disease severity. (*equal contribution) submitted und unter Begutachtung im Journal of Dental Research

8.2 Danksagung

In erster Linie möchte ich mich bei meiner Doktormutter Jun.-Prof. Dr. Daniela Yildiz für die gemeinsame Ausarbeitung, Überlassung und ständige Betreuung dieses spannenden Dissertationsthemas bedanken. Die Begeisterung für dieses Thema war bei Dir stets zu spüren, sodass ich wirklich mit jeder Frage zu Dir kommen konnte, was einen noch weiter angespornt hat, intensiv diese Arbeit voranzutreiben. Des Weiteren möchte ich gerne Prof. Dr. Matthias Hannig für die vor allem zahnmedizinische Expertise und Unterstützung danken. Auch möchte ich der gesamten Arbeitsgruppe rund um Jun.-Prof. Dr. Daniela Yildiz danken. Insbesondere danke ich Nina Schnellbach, Ahmad Aljohmani und Federico Guillermo Gharzia für die technische Unterstützung bei den Versuchsdurchführungen und der Auswertung meiner Ergebnisse. Für die Bereitschaft der Probenakquise in ihrer zahnärztlichen Gemeinschaftspraxis Reinstädler und Hektor gilt mein besonderer Dank Bernd Reinstädler und Daniel Hektor. Mein größter Dank gilt meinen Eltern und Geschwistern, meiner Tochter und nicht zuletzt meiner Verlobten Darleen Honeycutt-Heinze, durch deren Unterstützung, Liebe und Geduld ich mein Studium sowie diese Dissertation so fokussiert angehen konnte.

9 Lebenslauf

Aus datenschutzrechtlichen Gründen wird der Lebenslauf in der elektronischen Fassung der Dissertation nicht veröffentlicht.