

**Serum-Antikörpertiter gegen *Porphyromonas
gingivalis* FimA bei Patienten mit Parodontitis**

Inauguraldissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Zahnmedizin

des Fachbereichs Medizin

der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Nathalie Müller

aus Bad Soden am Taunus

Gießen 2024

Aus dem Fachbereich Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Medizinisches Zentrum für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde

Poliklinik für Parodontologie

Gutachter: Prof. Dr. med. dent. Jörg Meyle

Gutachter: PD Dr. med. Can Imirzalioglu

Tag der Disputation: 16.04.2024

Für meine geliebten Eltern
und Großeltern

Inhaltsverzeichnis

1	Einführung.....	1
2	Wissenschaftlicher Hintergrund.....	3
2.1	Prävalenz der Parodontitis.....	3
2.2	Pathogenese der Parodontitis.....	3
2.3	<i>Porphyromonas gingivalis</i>	6
2.3.1	Virulenzfaktoren von <i>P. gingivalis</i>	7
2.4	<i>P. gingivalis</i> Fimbrien.....	10
2.4.1	FimA (lange Fimbrien).....	11
2.5	Diabetes mellitus Typ 2 und Parodontitis.....	13
2.6	Entzündungsmarker.....	14
2.6.1	C-reaktives Protein (CRP).....	14
2.7	Antikörper.....	15
2.7.1	Aufbau von Antikörpern.....	15
2.7.2	Funktion der Antikörper.....	18
2.7.3	Antikörperproduktion.....	19
2.8	Einführung in immunologische Nachweismethoden.....	20
2.8.1	Polyklonale Antikörper gegen FimA.....	20
2.8.2	Monoklonale Antikörper gegen FimA.....	21
2.8.3	ELISA: Enzyme-linked Immunosorbent-Assay.....	22
3	Zielsetzung.....	27
4	Material und Methoden.....	28
4.1	Material.....	28
4.1.1	Mikrotiterplatte.....	28
4.1.2	Antigen.....	28

4.1.3	Lösungen und Chemikalien.....	28
4.1.4	Antikörper und Serum.....	30
4.1.5	Geräte, Apparaturen und Verbrauchsmaterialien	32
4.1.6	Kooperierende Firmen und Institute	33
4.1.7	Software	33
4.2	Methoden.....	34
4.2.1	Bestimmung der Antikörpertiter	34
4.2.2	Schematische Darstellung des ELISA-Protokolls.....	35
4.2.3	ELISA-Entwicklung: Detektion von IgG-Antikörper gegen <i>P. gingivalis</i> FimA im Präimmun- und Antiserum vom Hasen	37
4.2.4	Bestimmung der Ausgangskonzentration des rekombinanten FimA.....	40
4.2.5	ELISA: Testung der aufgereinigten monoklonalen IgG-Antikörper gegen <i>P. gingivalis</i> FimA der Maus	43
4.2.6	ELISA: Testung der unverdünnten, aufgereinigten monoklonalen IgG- Antikörper gegen <i>P. gingivalis</i> FimA der Maus	44
4.2.7	ELISA: Testung humaner Seren zum Nachweis von IgG-Antikörper gegen <i>P. gingivalis</i> FimA.....	46
4.2.8	ELISA: Testung humaner Seren zum Nachweis von IgM-Antikörper gegen <i>P. gingivalis</i> FimA.....	49
4.3	Datenauswertung	51
5	Ergebnisse	52
5.1	Auswertung der Testung des polyklonalen Antiserums im Vergleich zum Präimmunserum vom Hasen	52
5.2	Auswertung der Testung verschiedener rFimA Konzentrationen	53
5.3	Auswertung der Testung der aufgereinigten monoklonalen IgG-Antikörper der Maus mit c= 0,05 mg/ml	56

5.4	Auswertung der Testung der unverdünnten, aufgereinigten monoklonalen IgG-Antikörper der Maus	57
5.5	Demographische Daten des Patientenkollektivs.....	57
5.6	Auswertung der ELISA-Tests zum Nachweis von humanen IgG-Antikörpern gegen <i>P. gingivalis</i> FimA.....	59
5.7	Auswertung der ELISA-Tests zum Nachweis von humanen IgM-Antikörpern gegen <i>P. gingivalis</i> FimA.....	62
5.8	Auswertung der Negativproben.....	64
5.9	Intra-Assay-Varianz.....	65
5.10	Inter-Assay-Varianz.....	66
5.11	Auswertung: C-reaktives Protein (CRP)	67
5.12	Bestimmung der Rangkorrelation nach Spearman	68
6	Diskussion	69
7	Zusammenfassung	81
8	Abkürzungsverzeichnis	84
9	Literaturverzeichnis.....	86
10	Anhang	95
10.1	Abbildungsverzeichnis	98
10.2	Tabellenverzeichnis	100
11	Publikationsverzeichnis.....	101
12	Ethikvotum	102
13	Ehrenwörtliche Erklärung	103
14	Danksagung.....	104

1 Einführung

Die Parodontitis ist eine entzündliche, multifaktoriell bedingte Erkrankung des Zahnhalteapparates, die durch Bakterien initiiert wird (Meyle & Chapple, 2015; Page & Kornman, 1997). In der fünften Auflage der deutschen Mundgesundheitsstudie untersuchte das Institut der Deutschen Zahnärzte (IDZ) Patienten aus allen sozialen Schichten und Altersgruppen. Sie kamen zu dem Ergebnis, dass alle Bevölkerungs- und Altersschichten betroffen sind. Zusätzlich beobachteten sie, dass das Ausmaß und die Verbreitung der Erkrankung zu dem Zeitpunkt der Studie höher war als in den Jahren zuvor und dass besonders ältere Menschen von der Erkrankung betroffen waren (Dr. Constanze Cholmakow-Bodechtel, 2014). Durch die demographischen Entwicklungen der letzten Jahre werden weitere Zunahmen an Patientenzahlen zu erwarten sein. Des Weiteren konnten Zusammenhänge zwischen Diabetes mellitus und Parodontitis aufgedeckt werden (Baeza et al., 2020; Kocher et al., 2018). Bereits veröffentlichte Studien deuten auf Zusammenhänge zwischen Antikörpertitern gegen *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*) und Parodontitis sowie Diabetes mellitus hin (Choi et al., 2014; Dye et al., 2009). Weitere Studien sind notwendig, um den genauen Zusammenhang ermitteln zu können. Hinzu kommt, dass nicht nur die Anzahl an Parodontitispatienten stetig steigt, sondern auch die Anzahl an Patienten, die an Diabetes mellitus Typ 2 erkranken (Christin Heidemann, 2017; Sun et al., 2022). Ogurtsova et al. zeigten, dass es im Jahr 2021 weltweit 239,7 Millionen (44,7 %) nicht diagnostizierte Diabetes mellitus-Patienten gab, was auf eine hohe Dunkelziffer hinweist (Ogurtsova et al., 2022).

Die komplexe Ätiologie der Parodontitis ist bis zum derzeitigen Zeitpunkt noch nicht gänzlich erschlossen (Hajishengallis, 2015). Hajishengallis et al. entwickelten die Keystone-Pathogen-Hypothese, die das Bakterium *P. gingivalis* als einen möglichen Hauptverursacher der Parodontitis vorschlägt und stellt somit dieses Pathogen in den Vordergrund für mögliche neue Behandlungsansätze (Hajishengallis et al., 2012). Huang et al. und Rocha et al. entwickelten in ihren Studien einen Impfstoff gegen *P. gingivalis*, welcher im Versuch an Mäusen positive Ergebnisse zur Prävention und

Behandlung der Erkrankung zeigten (Huang et al., 2019; Rocha et al., 2021). Um solch einen Impfstoff für den Menschen zu entwickeln, ist es notwendig einen Test zur Verfügung zu haben, der die entstandenen Antikörper und deren Quantität über dessen Titer nachweisen kann. Es ist ebenfalls von großer Wichtigkeit einen möglichen Unterschied zwischen Patienten mit Parodontitis und gesunden Probanden zu ermitteln, da *P. gingivalis* nicht nur in parodontal erkrankten Patienten, sondern auch in oral gesunden Menschen nachgewiesen wurde (Ingalagi et al., 2022; Tuominen & Rautava, 2021).

Um diese Unterschiede zeigen zu können, war es Ziel dieser Arbeit einen Enzyme linked immunosorbent Assay (ELISA) zu entwickeln, der Antikörper gegen FimA von *P. gingivalis* W83 detektiert. Außerdem sollten die Seren von Patienten mit Parodontitis, mit Parodontitis und Diabetes mellitus Typ 2 und gesunden Probanden auf IgG- und IgM-Antikörper gegen FimA von *P. gingivalis* W83 untersucht werden.

2 Wissenschaftlicher Hintergrund

2.1 Prävalenz der Parodontitis

Die Parodontitis betrifft alle Altersgruppen. In der fünften Auflage der deutschen Mundgesundheitsstudie von Oktober 2013- Juli 2014 untersuchte das Institut der Deutschen Zahnärzte (IDZ) 4900 Patienten aus allen sozialen Schichten und Altersgruppen (Dr. Constanze Cholmakow-Bodechtel, 2014).

In der Altersgruppe 35- 44 Jahren betrug die Anzahl der an Parodontitis erkrankten Erwachsenen 52 Prozent, von denen 43 Prozent unter einer moderaten Parodontitis und 8,2 Prozent an einer schweren Form der Parodontitis litten. In der Gruppe der 65-74-Jährigen weisen 65 Prozent eine parodontale Erkrankung auf. Von ihnen zeigten 44,8 Prozent eine moderate Parodontitis und 19,8 Prozent eine schwere Parodontitis. In der Gruppe der 75-100-jährigen Probanden litten die meisten Probanden unter einer Parodontitis. Bei ihnen wiesen 9 von 10 Untersuchten eine Parodontitis auf.

Die Ergebnisse der Studie führten zu dem Schluss, dass die Verbreitung der Parodontitis größer ist, als man aufgrund der Ergebnisse vergangener Studien angenommen hatte.

2.2 Pathogenese der Parodontitis

Die Parodontitis ist eine entzündliche Erkrankung des Zahnhalteapparates, die durch Bakterien initiiert wird (Meyle & Chapple, 2015; Page & Kornman, 1997). Zum Zahnhalteapparat gehören der Alveolarknochen, die Gingiva, das Desmodont und der Wurzelzement des Zahnes.

Die Entstehung einer Parodontitis wird durch eine Dysbiose im oralen Mikrobiom verursacht, welche durch Parodontalbakterien sowie die darauffolgende Immunantwort des Wirtes initiiert werden kann (Hajishengallis, 2015). Im Zuge dieser Dysbiose entstehen durch entzündliche Prozesse eine reversible Gingivitis (Loe et al., 1965). Kann die Gingivitis nicht ausgeheilt werden, kommt es im weiteren Verlauf der

Reaktion des angeborenen und erworbenen Immunsystems zur Zerstörung des Zahnhalteapparates und somit zur Parodontitis.

Des Weiteren können für die Entstehung dieser Erkrankung des Zahnhalteapparates sowie ihre Progression Risikofaktoren eine entscheidende Rolle spielen. Zu ihnen zählen systemische Erkrankungen wie Diabetes mellitus, Elemente des Lebensstils wie schlechte Mundhygiene, Rauchen, vermehrter Alkoholkonsum, körperlicher und psychischer Stress sowie weitere Einflüsse wie genetische Prädispositionen, hormonelle Veränderungen und immunsupprimierende Bedingungen (Herrmann et al., 2020; Mealey & Ocampo, 2007; Page & Kornman, 1997; Salvi et al., 1997; Zhang et al., 2019).

Das humane orale Mikrobiom besteht aus mindestens 772 Bakterienarten, die mit Viren, Protozoen und Pilzen zusammenleben (Verma et al., 2018). Bei einem parodontal gesunden Menschen setzt sich das orale Mikrobiom aus Gram-positiven und -negativen Bakterien zusammen, die in einer kommensalen, symbiotischen Gemeinschaft in Homöostase zusammenleben (Deo & Deshmukh, 2019). Entwickelt sich eine Dysbiose, können sich pathogene Keime, welche häufig Gram-negativ und anaerob sind, vermehren und ausbreiten. Die pathogenen Bakterien können über ihren Stoffwechsel zytotoxische Substanzen und proteolytische Enzyme freisetzen. Infolge dessen kommt es zu einer inflammatorische Immunantwort und zur Zerstörung des Zahnhalteapparates.

Socransky et. al. fanden über Clusteranalysen heraus, dass parodontal pathogene Bakterien in Gruppen (sogenannte Komplexe) eingeteilt werden können (Socransky et al., 1998). Sie entwickelten eine Theorie, bei der die Zusammensetzung des Biofilms und das Auftreten bestimmter Komplexe in Assoziation mit dem Schweregrad der Parodontitis gebracht wurden.

Die Bildung des Biofilms läuft in Phasen ab. Sie beginnt mit den Frühkolonisierern mit geringer Pathogenität und kann mit der Kolonisierung der stark pathogenen Bakterien des roten Komplexes enden. Zu ihnen gehören *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*), *Treponema denticola*, *Tannerella forsythia* und *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. Das Ausmaß der Parodontitis kann sich je nach Kolonisierungsphase unterschiedlich darstellen.

Hajishengallis et. al. entwickelten die Theorie, dass spezielle Bakterien wie *P. gingivalis* als sogenannte „Keystone Pathogene“ fungieren. Diese Keime haben trotz ihrer geringen Anzahl einen großen pathogenen Einfluss auf ihre Umgebung (Hajishengallis et al., 2012). Sie sind in der Lage die kommensalen Bakterien zu beeinflussen, sodass es im symbiotischen subgingivalen Mikrobiom zur Dysbiose kommen kann. *P. gingivalis* hat die Fähigkeit das Immunsystem des Wirtes zu unterwandern und das Wachstum sowie die Entwicklung des Biofilms auf der Zahnoberfläche zu verändern (How et al., 2016). Infolge dessen kommt es zur Zerstörung des Gleichgewichts zwischen den symbiotisch lebenden Bakterien und dem Immunsystem des Wirtes. Dieser Prozess führt zur Inflammation und letztendlich zur Destruktion des Zahnhalteapparates.

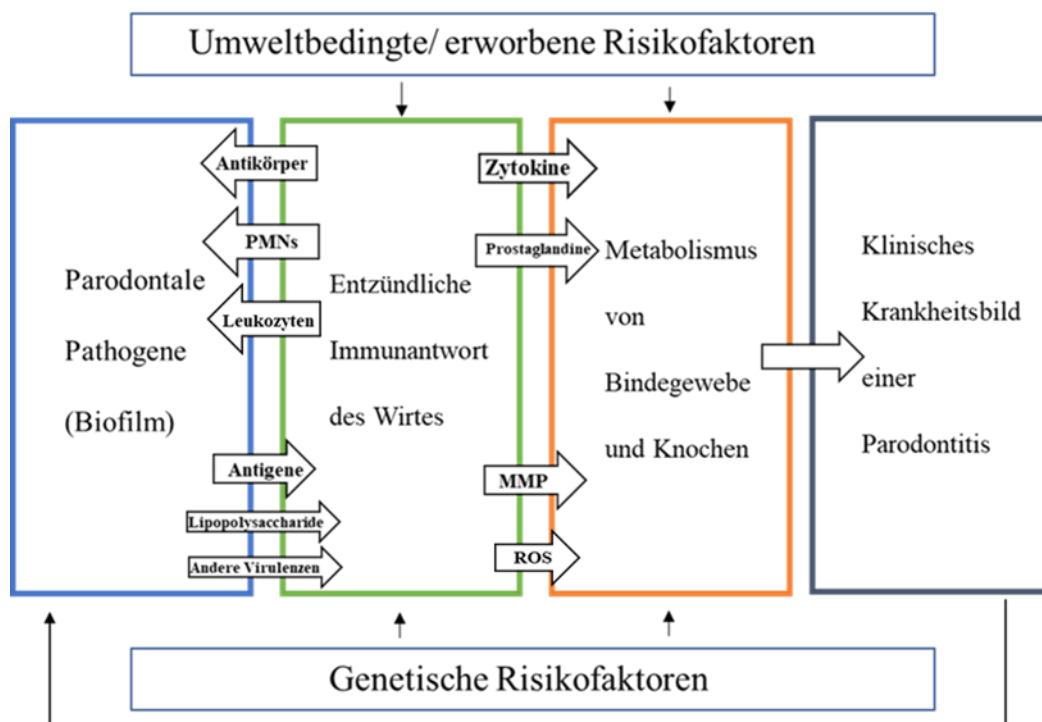


Abbildung 1: Ätiologie und Pathogenese der Parodontitis modifiziert nach Page und Kornman, 1997. MMP: Matrixmetalloproteinasen; PMNs: Polymorphkernige neutrophile Granulozyten; ROS: Sauerstoffradikale.

2.3 *Porphyromonas gingivalis*

Porphyromonas gingivalis (*P. gingivalis*) ist ein kurzes, unbewegliches, Gram-negatives und anaerobes Stäbchenbakterium. Es ist im Menschen hauptsächlich in der Mundhöhle, aber auch im oberen Gastrointestinaltrakt, in den Atemwegen und im Kolon nachweisbar. In der Mundhöhle ist er ein Bestandteil des subgingivalen Mikrobioms und es kann das orale Epithel kolonisieren (Yilmaz, 2008). Bei der Kultivierung auf Blutagar bildet es kleine braune bis schwarze Kolonien, die einen starken Geruch produzieren.

P. gingivalis weist eine große Diversität seiner Genotypen auf (Amano et al., 2004). Es besitzt, abhängig vom Bakterienstamm, verschiedene Virulenzfaktoren, die seine pathogenen Eigenschaften bestimmen (Igboin et al., 2009). Sie spielen eine entscheidende Rolle bei der Koaggregation, Kolonisation der Wirtszellen, der Biofilmentstehung sowie der Entstehung der oralen Dysbiose. Zu ihnen gehören die Fimbrien, die Cysteinproteasen (Gingipaine), das Hämagglutinin, das Hämolysin, seine Kapsel und die Lipopolysaccharide (Enersen et al., 2013; Holt et al., 1999; Xu et al., 2020).

Es kann direkt über die Freisetzung seiner toxischen Faktoren und Metabolite das Gewebe des Zahnhalteapparates zerstören. Eine besondere Eigenschaft von *P. gingivalis* ist, dass es durch die Kommunikation mit anderen Bakterien die Virulenz der mikrobiellen Gemeinschaft modulieren kann (Mantri et al., 2015). Das Pathogen ist in der Lage in die Wirtszelle einzudringen und die Immunantwort des Wirtes zu unterwandern, um seine Elimination zu verhindern (Xu et al., 2020). Ihm wird eine entscheidende Rolle als Parodontalpathogen zugewiesen, das zur Entstehung einer Parodontitis beiträgt und diese voranschreiten lässt. Aus diesem Grund wird er auch als Schlüsselpathogen („Keystone Pathogen“) bezeichnet (Hajishengallis, 2015).

Es wurden bereits Zusammenhänge von *P. gingivalis* mit kardiovaskulären Erkrankungen, Diabetes mellitus Typ 2 sowie Frühgeburten von Säuglingen gezeigt (Enersen et al., 2013). Hinzu kommen epidemiologisch untersuchte Verbindungen zwischen dem Pathogen sowie zur rheumatoiden Arthritis, entzündlichen

Darmerkrankungen, Alzheimer und nichtalkoholischen Fettlebererkrankungen sowie zu bestimmten Krebsarten (Hajishengallis & Chavakis, 2021).

P. gingivalis kann sowohl in entzündeten Parodontaltaschen, als auch bei parodontal gesunden Patienten nachgewiesen werden (Ingalagi et al., 2022; Tuominen & Rautava, 2021). Klinische Studien zeigen einen Zusammenhang zwischen einer erhöhten Anzahl von *P. gingivalis* und der Anwesenheit tiefer Parodontaltaschen (How et al., 2016).

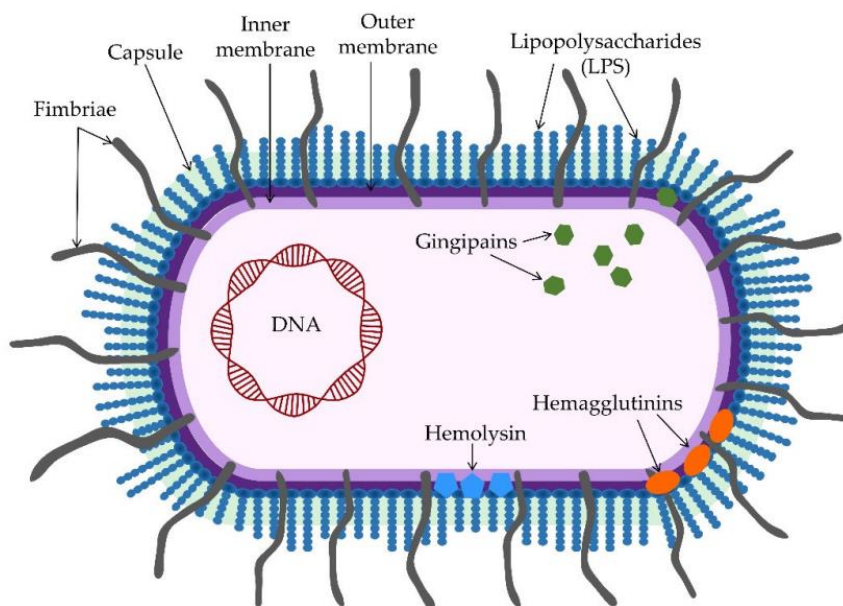


Abbildung 2: Schematische Darstellung von *Porphyromonas gingivalis* und seinen Virulenzfaktoren (Aleksijevic et al., 2022).

2.3.1 Virulenzfaktoren von *P. gingivalis*

2.3.1.1 Lipopolysaccharide (LPS)

Lipopolysaccharide (LPS) sind Bestandteile der äußeren Zellmembran Gram-negativer Bakterien wie *P. gingivalis*. Die Bestandteile von LPS sind das Lipid A, eine Polysaccharidkette in der Kernregion und das O-Antigen, bestehend aus Polysacchariden am äußeren Ende. LPS ist eine wichtige Komponente zum Erhalt der

Struktur des Bakteriums und es verhindert das Eindringen von hydrophoben sowie toxischen Substanzen in das Bakterium.

LPS wird auch als Endotoxin bezeichnet, da es eine proinflammatorische Reaktion des humanen Immunsystems auslöst. Es aktiviert das angeborene Immunsystem und stimuliert die Zytokinproduktion. Dies führt zu einer entzündlichen Immunantwort in der Gingiva. Eine weitere pathogene Eigenschaft des LPS besteht in der Dysregulation des Immunsystems über die Interaktion mit den Toll-like Rezeptoren 2 und 4 (How et al., 2016).

Man konnte eine große Heterogenität der Lipid A Struktur von *P. gingivalis* nachweisen, welche sich auch in der Pathogenität widerspiegelt. Die unterschiedlichen Varianten aktivieren verschiedene pathogene Signalkaskaden, die zur Zerstörung des parodontalen Halteapparates und somit zur Progression einer Parodontitis beitragen können (Xu et al., 2020).

Des Weiteren wird das Immunsystem des Wirts durch LPS über die Inhibition der Sekretion von Interleukin-8 in gingivalen Epithelzellen beeinflusst. Dies führt zur verminderten Chemotaxis von neutrophilen, eosinophilen und basophilen Granulozyten und somit zu einer reduzierten Immunantwort (How et al., 2016).

2.3.1.2 Gingipaine

Die Gingipaine sind für die Spaltung von Proteinen zuständig, um dem Bakterium wichtige Nährstoffe zugänglich zu machen und fördern somit dessen Proliferation. Sie gehören zu den Cysteinproteasen. Man unterscheidet Arginin spezifische Cysteinproteasen (RgpA und RgpB) und Lysin spezifische Gingipaine (Kgp). Sie werden als Proenzyme produziert, um eine ungewollte proteolytische Aktivität zu verhindern. Erst durch weitere posttranslationale Modifizierung erhalten sie ihre proteolytische Wirkung. Gingipaine sind an 85 Prozent der extrazellulären, proteolytischen Aktivität von *P. gingivalis* beteiligt (de Diego et al., 2014).

Die Gingipaine können entweder an die äußere Zellmembran angeheftet werden oder sie werden in den extrazellulären Raum transportiert. Sie spielen eine wichtige Rolle für die Pathogenität von *P. gingivalis*. Die Cysteinproteasen führen zur Aktivierung von

Matrixmetalloproteinasen des Wirtes, Inaktivierung von Inhibitoren und Spaltung sowie Inaktivierung von Kollagen, Immunzellrezeptoren, Zytokinen, Immunglobulinen und Komplementfaktoren.

Sie sind in der Aggregation von *P. gingivalis* an anderen Bakterien und an der Adhäsion an Wirtszellen beteiligt. Des Weiteren sind sie auch für die Spaltung von Profimbrillin zu Fimbrillin verantwortlich, einem der Grundbausteine von FimA, welches für die Adhäsion und Invasion von *P. gingivalis* von Bedeutung ist (How et al., 2016). An diesem Prozess ist besonders RgpB beteiligt (Xu et al., 2020).

Die Cysteinproteasen RgpA und RgpB sind für die Reifung der Grundbausteine der kurzen Fimbrien wichtig von Bedeutung. Gingipaine können Fibrinogen und Fibrin degenerieren, was zur Zerstörung des gingivalen Gewebes führt und die Aggregation der Blutkörperchen verhindert. Eine weitere pathogene Eigenschaft von Gingipainen besteht darin, dass sie zur Auflösung des epithelialen Verbundes führen, wodurch weitere Virulenzfaktoren in das Gewebe eindringen können. Dazu kommt, dass sie zu einer Reduktion der Expression von CD14-Rezeptoren auf der Oberfläche von Makrophagen führen und so die Immunantwort dieser Zellen auf eindringende Bakterien herunterregulieren können (Xu et al., 2020).

2.3.1.3 *P. gingivalis* Kapsel

Die Kapsel von *P. gingivalis*, auch bekannt als K-Antigen, bildet die äußere Struktur des Bakteriums und besteht aus Polysacchariden. Die Zusammensetzung der Kapsel kann je nach *P. gingivalis* Stamm variieren, einige Stämme besitzen keine Kapsel. Die Unterschiede sind hauptsächlich bedingt durch unterschiedliche Saccharid-Komponenten (How et al., 2016; Xu et al., 2020). Die Kapsel dient dem Schutz des Bakteriums und hilft ihm im Wirt zu überleben. Es sind sechs verschiedene Serotypen von Kapseln K1-K6 in verschiedenen *P. gingivalis* Stämmen nachgewiesen worden (How et al., 2016).

Die Schutzfunktion der Kapsel wird bei stark eingekapselten *P. gingivalis* Stämmen deutlich. Sie zeigen eine erhöhte Resistenz gegen Phagozytose, verursachen eine

verminderte Produktion von Leukozyten und reduzieren die Synthese von Interleukin (IL)-1, IL-6 und IL-8 in Fibroblasten (Hajishengallis et al., 2012; How et al., 2016).

Das K-Antigen kann Serotyp-spezifisch eine direkte Immunantwort im Wirt auslösen. Es ist zum Beispiel in der Lage, die Zytokinexpression in dendritischen Zellen und Makrophagen zu induzieren (Xu et al., 2020).

Hinzu kommt, dass die Kapsel mit Hilfe von Adhäsinen die Aggregation von *P. gingivalis* mit anderen Bakterien unterstützt und so die Biofilmbildung fördert.

Besonders stark eingekapselte Stämme zeigen jedoch eine verminderte Autoaggregation und eine verminderte Fähigkeit in Fibroblasten einzudringen (How et al., 2016).

2.4 *P. gingivalis* Fimbrien

P. gingivalis bildet zwei spezifische filamentöse Strukturen aus, die an der äußeren Membran der Zelloberfläche verankert sind und eine wichtige Funktion in der Interaktion mit anderen Bakterien sowie mit dem Wirt ausüben.

Man unterscheidet zwischen den langen Fimbrien, auch FimA genannt und den kurzen Fimbrien, auch Mfa Fimbrien genannt. FimA wird durch Untereinheiten mit der Bezeichnung Fimbrillin gebildet. Es wird aufgrund der genomischen Vielfalt des FimA-Gens in sechs Genotypen I-V und Ib klassifiziert. Dazu kommt, dass es durch die Gene *fimA*, *fimB*, *fimC*, *fimD* und *fimE* codiert wird. Mfa wird aus Mfa1-Proteinen und akzessorischen Proteinen namens Mfa2-5 aufgebaut (Hasegawa & Nagano, 2021; Xu et al., 2020). Die kurzen Fimbrien besitzen ein Gewicht von 75kDa und sind kürzer als die langen Fimbrien (FimA) (Enersen et al., 2013).

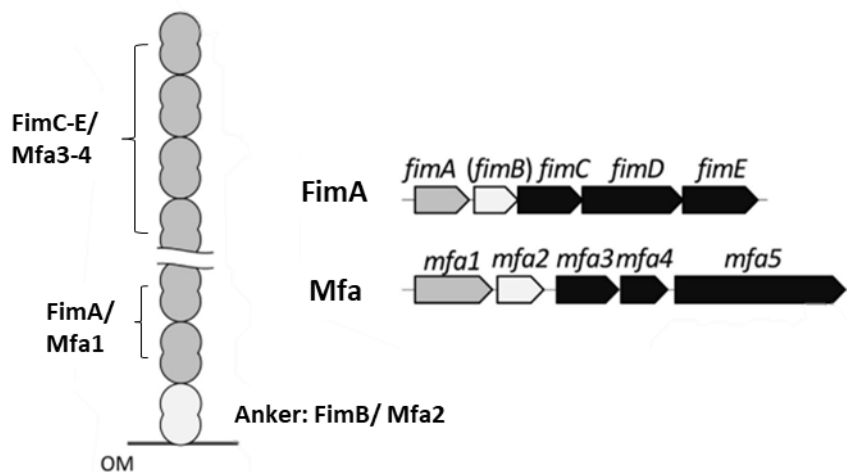


Abbildung 3: Strukturmodell der Fimbrien von *P. gingivalis* modifiziert nach Hasegawa & Nagano, 2021. FimA und Mfa, bestehend aus dem FimA/ Mfa1-Polymer mit den akzessorischen Proteinen FimC-E/ Mfa3-5 an der Spitze. Den Anker bildet FimB/ Mfa2. Rechts: Codierende Gene für *P. gingivalis* Fimbrien FimA und Mfa. OM: äußere Membran.

2.4.1 FimA (lange Fimbrien)

FimA oder auch lange Fimbrien von *P. gingivalis* können in ihrer Länge von 0,03-3 μm variieren. Sie sind 5 nm breit und ihr Molekulargewicht liegt bei 41- 49 kDa (Enersen et al., 2013). Die Primärstruktur des Proteins zeigt keine grundlegenden Gemeinsamkeiten mit anderen Fimbrienarten. FimA besteht aus polymerisiertem Fimbrillin und akzessorischen Proteinen (FimC, FimD, FimE) (Watanabe et al., 1996). Die Tertiärstruktur von FimA ist kompakt und zeigt eine β -Blatt-reiche Proteinstruktur. Diese Eigenschaft macht FimA stabil und resistent gegenüber Umwelteinflüssen (Cueno et al., 2015).

Aufgrund der genomischen Vielfalt klassifiziert man FimA in sechs Genotypen I, Ib, II, III, IV und V (Amano et al., 2004). In klinischen Studien konnten bei parodontal gesunden Patienten häufiger der Genotyp I nachgewiesen werden, während bei Patienten mit einer Parodontitis häufiger die Genotypen II und IV detektiert wurden (Amano et al., 2000; Wang et al., 2020). Des Weiteren besitzt FimA eine starke Invasions- und Adhäsionsfähigkeit zu humanen Epithelzellen (Nakagawa et al., 2002).

Rocas und Siqueira fanden ähnliche *P. gingivalis* FimA Stränge in endodontischen entzündlichen Prozessen wie in parodontalen Infektionen (Rocas & Siqueira, 2010). Außerdem bindet *P. gingivalis* über FimA an viele Speichelbestandteilen, wie an prolinreiche Proteine, prolinreiche Glykoproteine und Statherine (Amano et al., 1998). Der Virulenzfaktor bindet auch an Proteine wie Fibrinogen, Fibronectin und Laktoferrin. Er vermittelt zudem Bindungen auch an Gram-positive und Gram-negative Bakterien, unter anderem orale Streptokokken und Actinomyces Spezies (wie *Actinomyces viscosus* (*A. viscosus*), *Treponema denticola* (*T. denticola*), *Streptococcus gordonii* (*S. gordonii*) und *Streptococcus oralis* (*S. oralis*)). FimA spielt somit eine Rolle in der Biofilmentstehung (Enersen et al., 2013). Es ist bei der Bindung an humane Epithelzellen, Endothelzellen, Milzzellen und periphere Monozyten und die anschließende Ausschüttung von inflammatorischen Zytokinen wie Tumornekrosefaktor- α (TNF- α), IL-1 β , IL-8 sowie IL-6 beteiligt. FimA bindet auch Zelladhäsionsmoleküle wie ICAM-1, VCAM-1 sowie P- und E-Selectin (Amano et al., 2004; Enersen et al., 2013; Harokopakis & Hajishengallis, 2005). Hinzu kommt, dass FimA über die Aktivierung von TLR2 und CD14 die Stimulation des Transkriptionsfaktors Nuclear Factor- κ B (NF- κ B) induziert (Harokopakis & Hajishengallis, 2005). Dies führt zur Induktion und Freisetzung von Zytokinen wie TNF- α , IL-1 β , IL-8 und IL-6. Diese Zytokine spielen eine entscheidende Rolle in der Parodontitis und führen in deren Verlauf zur Destruktion des Zahnhalteapparates (Harokopakis & Hajishengallis, 2005). Unter anderem führt FimA auch zur Hämagglutination von tierischen und humanen Erythrozyten (Ogawa & Hamada, 1994). Takashi et al. fanden heraus, dass FimA in Epithelzellen der Aorta zur Freisetzung von Zytokinen und Induktion von Adhäsinen führt (Takahashi et al., 2006). Dazu kommt, dass FimA über CR3 und Kinase 1/2 die TLR2 abhängige IL-12 Produktion verhindert und so die Immunantwort des Wirtes unterminiert (Hajishengallis et al., 2007). Schlussfolgernd ist FimA einer der Hauptvirulenzfaktoren von *P. gingivalis*. Es ist für die Biofilmentstehung sowie für die Adhäsion und Invasion des Bakteriums von großer Bedeutung. Es besitzt die Fähigkeit das Immunsystem zu unterwandern und hilft dem Bakterium auf diese Weise beim Überleben und seiner Vermehrung.

2.5 Diabetes mellitus Typ 2 und Parodontitis

Diabetes mellitus Typ 2 ist eine Stoffwechselerkrankung, welche auf einer Insulinresistenz der körpereigenen Zellen beruht. Durch die Resistenz kommt es in der Bauchspeicheldrüse zu einer Überproduktion des Insulins, um diese zu kompensieren. Jedoch kann die erhöhte Insulinproduktion der Beta-Zellen des Pankreas nicht dauerhaft aufrecht gehalten werden. Infolge dessen können die aufgenommenen Saccharide nicht in die Zellen aufgenommen werden und es kommt zu erhöhten Blutzuckerwerten. Die weiteren Folgen sind, dass Proteine im Serum durch eine Glykierung, welche nicht enzymatisch stattfindet, mit Sacchariden gekoppelt werden. Sie werden als AGEs (advanced glycation endproducts) bezeichnet (Khalid et al., 2022). Diese AGEs finden keine Verwertung und können sich dann in den Gefäßen ablagern, wo sie Schäden verursachen. Auch das Hämoglobin im Blut kann glykiert werden und bietet einen Messwert für die Blutzuckereinstellung. Dafür wird der HbA1c-Wert bestimmt. Je höher dieser ist, umso mehr Hämoglobin hat mit Sacchariden reagiert und umso unzureichender ist die Blutzuckereinstellung. Ein pathologischer HbA1c-Wert beginnt ab 6,5 % und höher (Kerner et al., 2014). Zellen des angeborenen Immunsystems, wie z.B. Makrophagen und Monozyten, besitzen Rezeptoren, sogenannte RAGEs (Rezeptor für AGE), welche die AGEs binden können. Durch diese Bindung kommt es zur Freisetzung von reaktiven Sauerstoffmolekülen, zur Aktivierung von Transkriptionsfaktoren wie NF- κ B sowie zur Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen, wodurch Abwehrprozesse und Entzündungsreaktionen initiiert werden (Ramasamy et al., 2011). Weitere Folgen des erhöhten Blutzuckerspiegels sind, dass Gewebe, welche nicht insulinabhängig sind, die Saccharide aus dem Serum aufnehmen. Es entsteht ein starker osmotischer Druck, der zu Organschäden führen kann. Der Diabetes mellitus Typ 2 kommt häufig bei Erwachsenen vor. Es sind besonders häufig ältere Menschen von dieser Erkrankung betroffen.

Studien zeigen eine bidirektionale Beziehung zwischen einer Parodontitis und einem Diabetes mellitus Typ 2 (Oberti et al., 2019; Sanz et al., 2018). Bei beiden Erkrankungen spielt das angeborene Immunsystem eine wichtige Rolle, dessen Zellen durch ihre Aktivierung proinflammatorische Zytokine wie IL-1 β , IL-6 und TNF- α

freisetzen. In der Leber wird die Freisetzung von C-reaktivem Protein (CRP) ausgelöst. Neue Studien deuten darauf hin, dass eine effektive Parodontitistherapie zu einer Reduzierung der systemischen Inflammationsmarker und zur Reduzierung des HbA1c-Wertes bei Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 führen (Hajishengallis & Chavakis, 2021). Weitere Studien deuten auf Zusammenhänge zwischen erhöhten Antikörpertitern gegen *P. gingivalis* und Parodontitis sowie Diabetes Mellitus hin (Choi et al., 2014; Dye et al., 2009).

2.6 Entzündungsmarker

2.6.1 C-reaktives Protein (CRP)

Das C-reaktive Protein (CRP), kommt im Blutplasma vor und wird in der Leber gebildet. Es ist ein Entzündungsparameter, der zum Immunsystem gehört und Abwehrmechanismen in Gang setzt. Er gehört zu den sogenannten Akute-Phase-Proteinen und zur Familie der Pentraxine. CRP ist ein Pentamer, das aus 5 identischen Untereinheiten besteht, welche kalziumabhängig an Phosphocholin binden (Moutachakkir et al., 2017).

Kommt es zu einer Entzündung, Infektion oder zu einer Gewebeschädigung, kann man CRP in erhöhter Menge im Blutplasma nachweisen. Es besteht eine Korrelation zwischen der gemessenen Menge an CRP und an der Schwere der Erkrankung. Durch die Schädigung von Geweben oder Infektionen wird das angeborene Immunsystem aktiviert. Es werden Zytokine und Botenstoffe ausgeschüttet, die in der Leber zur Freisetzung des C-reaktiven Proteins führen. Besonders IL-1, IL-6 und TNF- α spielen dabei eine bedeutende Rolle (Esteves-Lima et al., 2020). Seine Konzentration steigt innerhalb von 6-48 Stunden nach dem Entstehen der Entzündung im Blutplasma an. Die durchschnittlichen CRP-Werte eines gesunden Erwachsenen liegen bei 2,06 mg/l (0,32-4,33 mg/l). Faktoren wie das Rauchen können die Entzündungsprozesse und somit das CRP ansteigen lassen (Ioannidou et al., 2006).

Eine der Funktionen von CRP ist die Opsonierung. Bei diesem Vorgang bindet das Molekül an bakterielle Zellmembranen und an Bestandteile zerstörter Körperzellen,

sodass Immunzellen diese schneller erkennen und beseitigen können. Dieser gebildete Komplex wird beispielsweise durch Makrophagen über Rezeptoren erkannt, sodass diese die Eindringlinge beseitigen können. Die mit CRP markierten Bakterien oder Körperzellen aktivieren auch das Komplementsystem und leiten auch so ihre Eliminierung ein. Die Halbwertszeit von CRP beträgt circa 24 Stunden.

Die Meta-Analyse von Machado et al. deuten auf einen Zusammenhang zwischen systemisch erhöhten CRP-Werten bei Patienten mit Parodontitis hin (Machado et al., 2021). Klinische Studien zeigen, dass die CRP-Werte mit dem Schweregrad der Parodontitis ansteigen (Ardila & Guzman, 2015; Esteves-Lima et al., 2020; Loos et al., 2000; Podzimek et al., 2015). Winning et al. zeigten, dass die Anwesenheit von *P. gingivalis* den CRP-Wert um 20 Prozent ansteigen ließen (Winning et al., 2015).

2.7 Antikörper

2.7.1 Aufbau von Antikörpern

Antikörper oder Immunglobuline sind Glykoproteine, die von Plasmazellen synthetisiert werden. Plasmazellen sind differenzierte B-Lymphozyten und gehören dem erworbenen Immunsystem an. Die Antikörper binden spezifisch an sogenannte körperfremde Antigene (Antibody-generator) wie mit einem Schlüssel-Schloss-Prinzip. Antigene können Proteine, Kohlenhydrate oder Lipide sein, wie zum Beispiel Bestandteile von Bakterien wie Lipopolysaccharide oder bezogen auf *P. gingivalis* beispielsweise FimA. Die Antigene werden spezifisch über ihre Epitope an die Antikörper gebunden. Die Bindungsstelle an den Antikörpern wird das Paratop bezeichnet. Die Immunglobuline sind aus zwei identischen schweren Ketten (heavy chains) und zwei identischen leichten Ketten (light chains) aufgebaut. Die leichten Ketten sind mit den schweren Ketten über Disulfidbrücken verbunden sowie die schweren Ketten untereinander. Die leichten Ketten werden in Lambda und Kappa Untereinheiten eingeteilt. Die schweren Ketten erscheinen in fünf Hauptvarianten: μ , δ , γ , α , ϵ . Daraus resultieren fünf Klassen von Antikörpern. Entsprechend der Klasse der schweren Kette heißen sie Immunglobulin (Ig) IgM, IgD, IgG, IgA und IgE (Bradley, 1974).

Des Weiteren unterscheidet man pro leichte Kette zwei Proteinabschnitte, die Domänen genannt werden. Diese Domänen unterscheiden sich in einem variablen Abschnitt und einem konstanten Abschnitt. Die schweren Ketten besitzen vier bis fünf Domänen, wovon eine dieser Domänen variabel in ihrer Aminosäuresequenz ist und die anderen Abschnitte konstant sind. Die Antigenbindungsstelle eines Antikörpers wird aus der variablen Domäne der leichten und der schweren Kette gebildet und werden als Fab Fragment (fragment antigen binding region) bezeichnet (Schroeder & Cavacini, 2010). Die Zellen des Immunsystems binden über den Fc-Rezeptor an die konstante Region der Immunglobuline, auch Fc Fragment (fragment constant) genannt. Infolge dessen wird die Immunantwort ausgelöst.

Die Antikörper IgE, IgG und IgD kommen als Monomere vor. Das Immunglobulin IgM kommt als Pentamer vor, dabei lagern sich fünf IgM-Moleküle zusammen. Das Pentamer wird in der frühen B-Zell-Entwicklung und beim erstmaligen Kontakt mit einem Krankheitserreger gebildet. Es kann dadurch in der akuten Infektionsphase einer Krankheit nachgewiesen werden. IgM wird auf den Membranen von B-Zellen exprimiert. Die naiven B-Zellen verlassen das Knochenmark und wandern in die sekundären lymphatischen Organe.

Der Antikörper IgA kommt als Dimer vor. Ein Dimer entsteht, wenn sich zwei IgA-Moleküle zusammenlagern. Es kommt hauptsächlich auf mukosalen Oberflächen vor und kann in Sekreten, wie in der Muttermilch, nachgewiesen werden.

IgD wird in sehr geringen Mengen im Serum gefunden und hat eine kurze Serumhalbwertszeit. Die Funktion des zirkulierenden IgD ist noch unklar. IgD wird auf den Membranen von B-Zellen exprimiert, wenn diese das Knochenmark verlassen und die sekundären lymphatischen Organe besiedeln.

IgE wird häufig membranständig auf Mastzellen gefunden. Es liegt in der niedrigsten Serumkonzentration vor und hat die kürzeste Halbwertszeit. Es bindet mit hoher Affinität an Rezeptoren auf Mastzellen, Basophilen, Langerhanszellen und Eosinophilen. Es spielt eine wichtige Rolle bei Überempfindlichkeits- und allergischen Reaktionen sowie bei parasitären Wurminfektionen.

IgG ist das vorherrschende Immunglobulin, das im Körper vorkommt. Es hat von allen Immunglobulin-Isotypen die längste Serum-Halbwertszeit. Auf der Grundlage der Unterschiede in der konstanten Region der schweren Kette, kann man ihn in vier IgG-Unterklassen (IgG1, IgG2, IgG3 und IgG4) unterteilen. Er wird beim Kontakt mit einem Krankheitserreger der naiven B-Zelle durch einen Klassenswitch des B-Lymphozyten gebildet (siehe Kapitel 2.6.3). Die Bildung von IgG ist verzögert. Kommt es zu einem zweiten Kontakt mit einem Antigen, können B-Gedächtniszellen über eine schnelle Produktion von IgG eine unmittelbare Immunantwort auslösen. Hinzu kommt, dass IgG-Immunglobuline plazentagängig sind. Sie kommen aufgrund ihrer langen Lebenszeit am häufigstem im Serum vor und sie ermöglichen eine langfristige Immunität gegen Krankheitserreger (Bradley, 1974; Fritz H. Kayser, 2001; Schroeder & Cavacini, 2010).

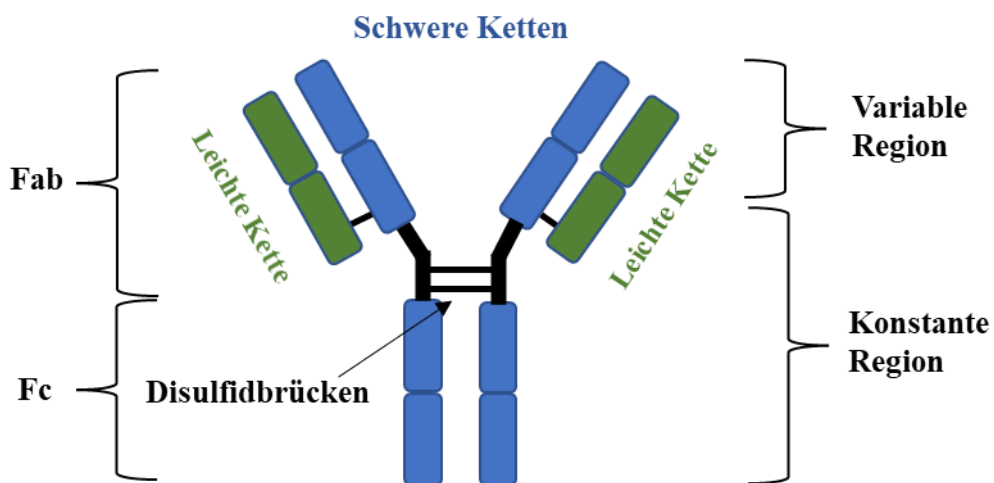


Abbildung 4: Schematische Darstellung eines Antikörpers (Quelle: eigene Darstellung).

2.7.2 Funktion der Antikörper

Antikörper sind Teil des spezifischen Immunsystems und helfen dem Körper schädliche Substanzen oder Eindringlinge wie Bakterien und Viren zu beseitigen.

Die Elimination der Schädlinge erfolgt zum Beispiel über die Agglutination. Dieser Vorgang wird durch die Pentamerstruktur des Immunglobulins IgM begünstigt. Das IgM-Pentamer kann mehrere Antigene gleichzeitig binden und so eine Vernetzung erzeugen. Diesen Prozess nennt man Agglutination und er vereinfacht die Phagozytose durch beispielsweise Makrophagen (Bradley, 1974; Fritz H. Kayser, 2001).

Eine weitere Methode der Beseitigung von Krankheitserregern ist das direkte Binden der Antikörper an Viren oder Toxine. Sie werden dadurch inaktiviert und die Viren können nicht mehr in die Zellen eindringen und sich in ihnen vermehren.

Des Weiteren opsonieren Antikörper schädliche Substanzen. Durch die Bindung der Antikörper werden die krankheitserregenden Substanzen markiert und können leichter von Makrophagen und Granulozyten erkannt werden. Makrophagen und Granulozyten binden über Fc-Rezeptoren an die konstante Region der Antikörper und die Phagozytose wird eingeleitet.

Immunglobuline können Tumorzellen oder geschädigte Zellen über spezifische Oberflächenproteine erkennen und sie markieren. Natürliche Killerzellen, Granulozyten, Monozyten und Makrophagen erkennen Antikörper mit ihrem Fc-Rezeptor und eliminieren die markierten Zellen mittels Phagozytose und Perforinen. Perforine sind zytolytische Proteine, die in die Zellmembran der zu eliminierenden Zelle eingebaut werden. Sie bilden dort eine Pore, wodurch Serinproteasen (Peptidasen) in die Zelle eindringen können und so die Apoptose einleiten.

Eine weitere Funktion der Antikörper ist die Aktivierung des Komplementsystems. Der Antigen-Antikörper-Komplex wird durch ein Komplementprotein gebunden und bewirkt den Start der Aktivierungskaskade des Komplementsystems, die zur Zerstörung des Eindringlings, der durch die Antikörper erkannt und gebunden wurde, führt (Bradley, 1974; Fritz H. Kayser, 2001; Keyt et al., 2020).

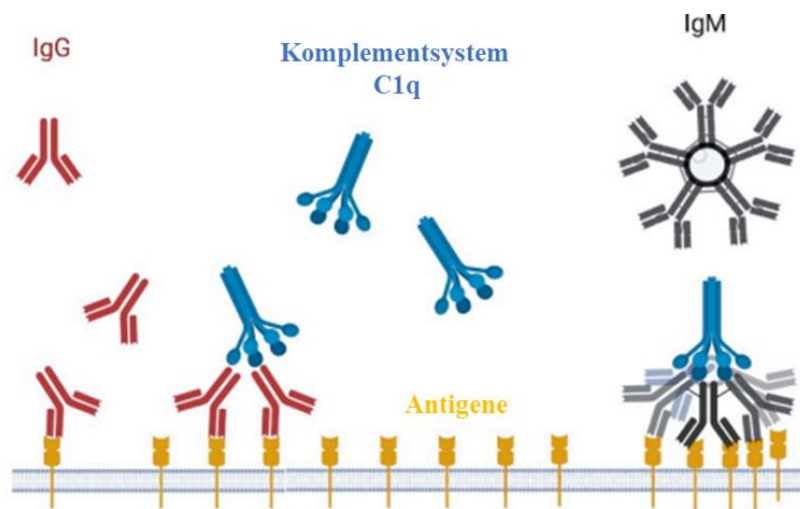


Abbildung 5: Opsonierung, Antikörper-Antigen-Bindung und Komplementbindung/-aktivierung durch IgM- und IgG-Antikörper modifiziert nach Keyt et al., 2020.

2.7.3 Antikörperproduktion

Die Bildung der Immunglobuline setzt die Aktivierung der B-Lymphozyten voraus. Bindet ein pathogenes Antigen an den B-Zell-Rezeptor (bestehend aus membranständigen IgM- oder IgD-Antikörpern) des naiven B-Lymphozyten oder bindet ein körperfremdes Antigen durch eine Antigen-präsentierende Zelle an den B-Zell-Rezeptor, so nimmt dieser den entstehenden Komplex über Endozytose auf. Das Antigen wird proteolytisch aufgespalten und über MHC-Klasse-II-Moleküle werden Anteile des Antigens auf der Oberfläche des B-Lymphozyten präsentiert. Der B-Lymphozyt wandert an den Rand des Primärfollikels. Wird dieser Antigenanteil nun von einer folliculären T-Helferzelle (CD4+-T-Zelle), einem Subtyp der T-Lymphozyten, erkannt, wandert ein Teil der aktivierten B-Lymphozyten zu den Keimzentren der sekundären lymphatischen Organe (Lymphknoten oder Milz). Dort wird die B-Zelle zur Proliferation und Differenzierung zur antikörperproduzierenden Plasmazelle angeregt (Abbas et al., 2021). Gleichzeitig bilden sich B-Gedächtniszellen, die bei einem weiteren Kontakt mit dem Antigen, eine unmittelbare Ausschüttung von Antikörpern bewirkt. Im weiteren Verlauf der Reifung kommt es zum Klassenwechsel der B-Lymphozyten. Dadurch kommt es zum Antikörperklassenwechsel von IgM zu

den anderen Immunglobulinklassen (siehe Abb. 6). Die produzierten Antikörper passen spezifisch zu den präsentierten Antigenen. In seltenen Fällen können B-Lymphozyten nach Internalisierung des Antigens direkt aktiviert werden und IgM produzieren (Abbas et al., 2021; Fritz H. Kayser, 2001).

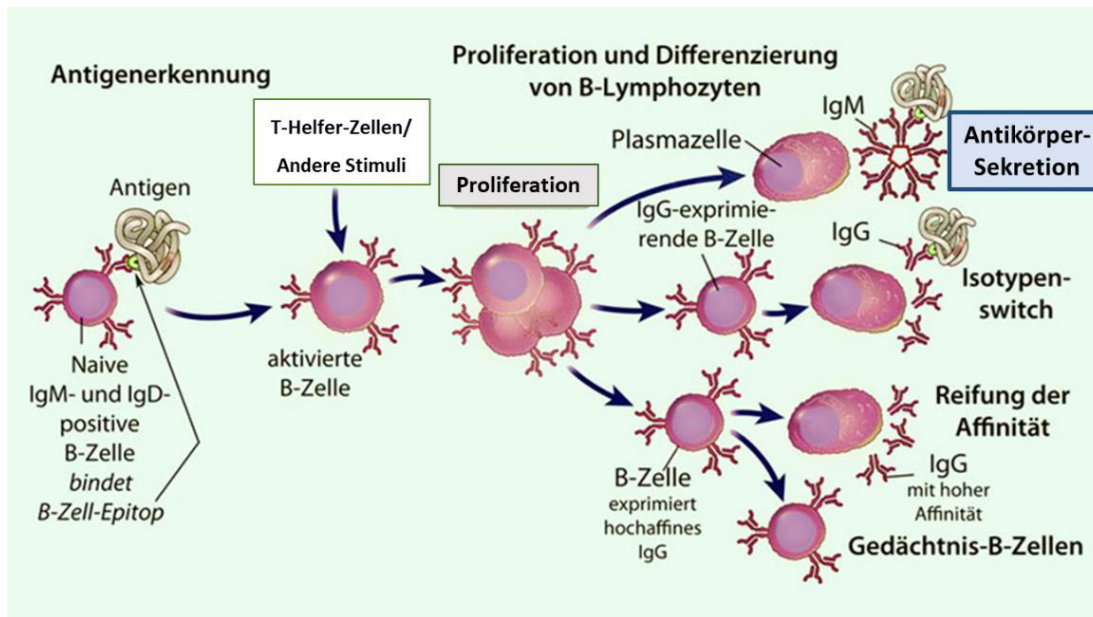


Abbildung 6: Die humorale Immunantwort und Bildung von Antikörpern modifiziert nach Abbas et al., 2021.

2.8 Einführung in immunologische Nachweismethoden

2.8.1 Polyklonale Antikörper gegen FimA

Polyklonale Antikörper entstammen von verschiedenen antikörperproduzierenden B-Lymphozyten des Immunsystems, weswegen sie gegen verschiedene Epitope des Antigens gerichtet sind.

Die Herstellung polyklonaler Antikörper kann über die Immunisierung von Säugetieren mit einem bestimmten Antigen erfolgen. Die Plasmazellen des Immunsystems der Tiere, zu ihnen gehören z.B. Mäuse, Hasen, Ratten sowie Ziegen, bilden spezifische

Antikörper gegen das verabreichte Antigen. Die gebildeten Immunglobuline können aus dem Blutserum der Tiere über Aufreinigungsprozesse gewonnen werden. In diesem Antiserum der Tiere sind polyklonale Antikörper mit unterschiedliche Bindungsaffinitäten gegen die Epitope des Antigens enthalten.

In der vorliegenden Arbeit wurde ein zuvor hergestelltes und aufgereinigtes rekombinantes FimA (rFimA) zur Immunisierung von Hasen verwendet. Das rFimA wurde in Kooperation mit dem Institut für Medizinische Mikrobiologie, Abteilung für Molekulare Diagnostik der Justus-Liebig-Universität Gießen unter der Leitung von Prof. Dr. Eugen Domann hergestellt. Gröger et al. haben die chromosomale DNA von *P. gingivalis* W83 FimA in einen Vektor geklont und in *Listeria innocua*, ein Gram-positives und stäbchenförmiges Bakterium, eingesetzt und angezüchtet. Das durch *Listeria innocua* synthetisierte rFimA wurde mittels Flüssigkeitschromatographie (FPLC) aufgereinigt. Im Anschluss wurde das Protein mit Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page) aufgetrennt und mittels Massenspektrometrie charakterisiert. Es erfolgte die Prüfung der Reinheit mittels MALDI-TOF-Massenspektrometrie (Groeger et al., 2021). Seine biologische Aktivität konnte mit humanen Monozyten nachgewiesen werden. Das durch *Listeria innocua* synthetisierte rFimA besitzt den Vorteil, dass es keine LPS-Verunreinigungen aufweist. Die Herstellung der polyklonalen Antikörper für diese Versuche erfolgte durch die Immunisierung des Hasen mit dem oben beschriebenen rFimA über die Firma Davids Biotechnologie GmbH (aus Regensburg, Deutschland). Der Hase durchlief fünf Immunisierungszyklen. Das Serum wurde einmal vor der Immunisierung und am Tag 63 entnommen. Darauffolgend wurden die gebildeten polyklonalen Antikörper gegen das rFimA mittels Affinitätschromatographie aufgereinigt.

2.8.2 Monoklonale Antikörper gegen FimA

Monoklonale Antikörper (mAK) werden im Gegensatz zu polyklonalen Antikörpern von einer Zellklonlinie produziert. Diese Zellklonlinie geht auf einen Antikörper produzierenden B-Lymphozyten (Plasmazelle) zurück, sodass die monoklonalen Antikörper an ein einzelnes Epitop des Antigens binden.

Die Herstellung dieser Immunglobuline beginnt mit der Immunisierung eines Säugetiers. Im Anschluss werden Plasmazellen, die den gewünschten Antikörper produzieren, aus der Milz extrahiert (Hanack et al., 2016). Nach der Hybridom-Technik von Köhler, Milstein et al. werden die extrahierten Plasmazellen mit malignen Myelomzellen fusioniert, wodurch eine Hybrid-Zelle geschaffen wird (Hanack et al., 2016; Köhler & Milstein, 1975). Diese Hybrid-Zelle besitzt die Fähigkeit fortlaufend monoklonale Antikörper zu produzieren, da sie die Eigenschaften der Plasmazelle und der Myelomzelle in sich vereint. Die Hybrid-Zellen sind in der Lage sich der Apoptose zu entziehen, sodass sie langlebige Eigenschaften besitzen und sie weisen ein expandierendes Wachstum auf.

Die Produktion der monoklonalen Antikörper für diese Versuche erfolgte durch die Firma Davids Biotechnologie GmbH (aus Regensburg, Deutschland) mit dem hergestellten rFimA. Für die Gewinnung der Immunglobuline wurden vier Mäuse immunisiert. Den Mäusen wurde einmal vor und an Tag 63 der Immunisierung Blut entnommen. Nachdem überprüft wurde, ob Antikörper gegen das rFimA gebildet wurden, erfolgte die Entnahme der Milz sowie die Gewinnung von Plasmazellen. Diese Zellen wurden mit Myelomzellen fusioniert und angezüchtet. Die entstandenen Hybrid-Zellen, die monoklonale Antikörper produzieren, wurden identifiziert und weiter angezüchtet. Aus den Hybridzellen wurde ein Klon bestimmt, der die besten Fähigkeiten zur Produktion der Immunglobuline besitzt. Dieser wurde isoliert und weiter geklont. Zum Schluss wurden die synthetisierten monoklonalen Antikörper von dieser Zelllinie gewonnen und aufgereinigt.

2.8.3 ELISA: Enzyme-linked Immunosorbent-Assay

Der ELISA ist ein immunologisches Nachweisverfahren, mit dem Proteine, wie z.B. Antikörper oder Antigene im Serum, nachgewiesen werden können. Er gehört zu den Immunassays und beruht auf der spezifischen Bindung von Antigen und Antikörper, die z.B. über eine Farbreaktion sichtbar und messbar gemacht wird. Es gibt verschiedene

Varianten eines ELISAs, welche alle auf einer Antigen- und Antikörperbindung basieren (siehe 2.8.3.1- 2.8.3.4).

Beim ELISA wird eine feste Phase mit einem Antigen oder Antikörper beschichtet. Diesen Vorgang nennt man auch „Coaten“. Als feste Phase verwendet man meistens Mikrotiterplatten im 96-Well Format aus Polyvinylchlorid (PVC) oder Polystyrol (PS) (Deshpande, 1996; Luttmann, 2009). Die Adsorption der Antigene oder Antikörper an die Oberfläche der Vertiefungen/ Schächte (Wells) der Mikrotiterplatte wird größtenteils durch hydrophobe Wechselwirkungen zwischen den Proteinen und der unpolaren PVC- oder PS- Oberfläche erzeugt. Im Anschluss wird eine zu testende Probe hinzugegeben und es entsteht eine Antigen-Antikörper-Verbindung. Dieser entstandene Komplex wird über eine enzymatische Farbreaktion sichtbar gemacht. Ein sekundärer Antikörper (oder Antigen), der mit einem Enzym markiert wurde, setzt ein Substrat um und erzeugt einen Farbumschlag und somit ein optisches und detektierbares Signal. Die enzymgekoppelten Antikörper sind häufig mit Meerrettichperoxidase (HRP: horseradish peroxidase), mit einer alkalischen Phosphatase oder mit einer β -Galaktosidase konjugiert. Entsprechend dem gekoppelten Enzym kann als Substrat Tetramethylbenzidin (TMB), Azinino-diethylbenzthiazolin-sulfonsäure (ABTS), o-Phenylendiamin-hydrochlorid (OPD), Para-Nirtophenylphosphat (PNPP) oder o-Nitrophenyl- β -D-galactopyranosid (ONPG) verwendet werden. Mit einem Mikrotiterplattenphotometer kann im Anschluss mit einer entsprechenden Wellenlänge, die vom verwendeten Substrat abhängig ist, die Absorption bzw. die optische Dichte ermittelt werden (Hornbeck, 2015; Konstantinou, 2017).

Die Herstellung dieser sekundäre Antikörper erfolgt häufig über die primäre Immunisierung eines Tieres (z.B. Rabbit= Kaninchen) mit einem spezifischen Antigen, dadurch entstehen primäre Antikörper (Rabbit IgG). Diese primären Antikörper gegen das eingesetzte Antigen werden zur Immunisierung eines zweiten Tieres (z.B. Goat= Ziege) eingesetzt, sodass diese Tierart die sekundären Antikörper gegen den primären Antikörper bilden (z.B. Goat Anti-Rabbit IgG).

Nach dem Coaten der Mikrotiterplatten kann es vorkommen, dass freie Bindungsstellen in den Wells verbleiben, sodass es zu unspezifischen Bindungen des sekundären

Antikörpers an diese Stellen kommen kann. Die Folge ist, dass mit der Zugabe des Substrates ein falsch positives Ergebnis erzeugt wird, da keine Antigen-Antikörperbindung entstanden ist. Dies wird durch sorgsames Waschen der Wells zwischen den einzelnen Beschichtungsphasen und durch die Zugabe eines Blockierungspuffers verhindert. Der Blockierungspuffer enthält kleine Proteine, die die freien Bindungsstellen, die nach dem Coaten verblieben sind, besetzen. Dadurch wird eine Anheftung des sekundären Antikörpers vermieden.

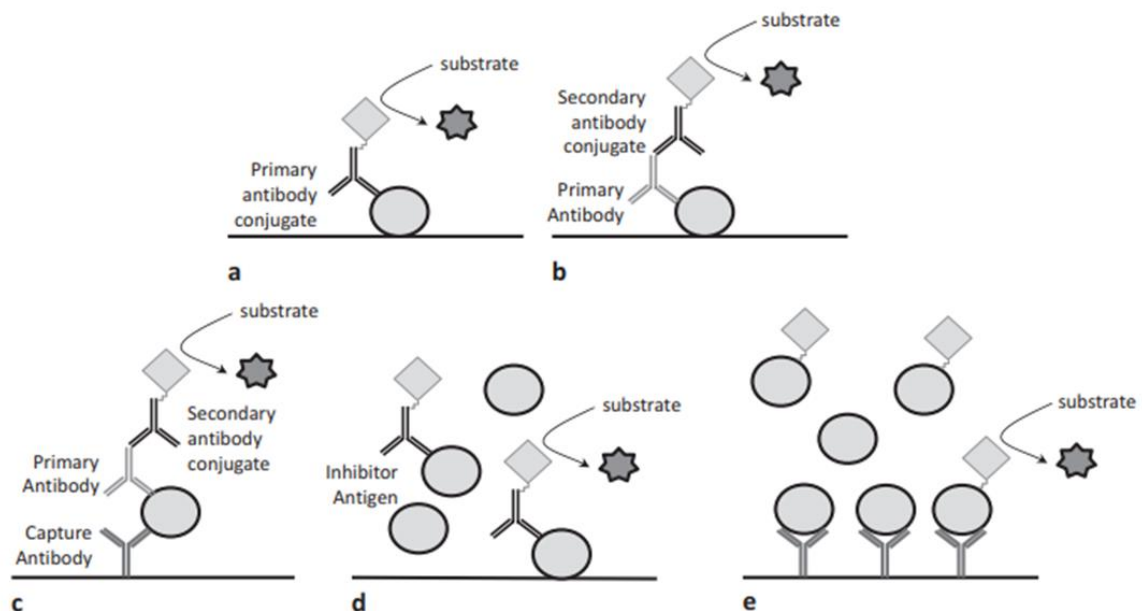


Abbildung 7: Verschiedene ELISA Varianten: (a) Direkter ELISA, (b) Indirekter ELISA, (c) Sandwich ELISA, (d) Kompetitiver ELISA mit konjugiertem Antikörper, (e) Kompetitiver ELISA mit konjugiertem Antigen (Konstantinou, 2017).

2.8.3.1 Direkter ELISA

Bei einem direkten ELISA wird das Antigen an die Mikrotiterplatte gebunden. Im Anschluss wird ein enzymmarkierter Antikörper hinzugegeben, dieser bindet an das Antigen. Durch die Zugabe des Substrates, welches von dem Enzym, das mit dem

Antikörper konjugiert wurde, umgesetzt wird, kommt es zu einem Farbumschlag. Mit Hilfe eines Mikrotiterplattenphotometers kann die optische Dichte des sichtbar gemachten Signals ermittelt werden.

2.8.3.2 Indirekter ELISA

Beim indirekten ELISA wird die Mikrotiterplatte mit dem Antigen beschichtet. Die nicht erfassten Bindungsstellen werden mit einem Blockierungspuffer besetzt. Es erfolgt die Zugabe der primären Antikörper, die spezifisch an das Antigen binden. Darauf folgend wird der sekundäre enzymmarkierte Antikörper hinzugegeben, der an den primären Antikörper bindet. Mit der Zugabe des Substrats wird die Antigen-Antikörperverbindung sichtbar gemacht.

2.8.3.3 Sandwich-ELISA

Beim Sandwich-ELISA wird die feste Phase mit Antikörpern beschichtet. Im Anschluss wird die zu testende Probe hinzugegeben. Das zu ermittelnde Antigen wird von dem an der Platte befindenden „Capture Antikörper“ gebunden. Als nächstes erfolgt die Zugabe des zweiten Antikörpers, der an das Antigen bindet und einen Antikörper-Antigen-Antikörper-Komplex entstehen lässt. Beim Sandwich-ELISA kann man zwischen einem direkten und einem indirekten Verfahren unterscheiden. Beim direkten Sandwich-ELISA ist der zweite Antikörper mit einem Enzym konjugiert. Beim indirekten Verfahren wird ein weiterer enzymkonjugierter Antikörper hinzugegeben, der sich an den Komplex bindet. Mit der Zugabe des Substrates wird diese Verbindung quantifizierbar gemacht.

2.8.3.4 Kompetitiver ELISA

Beim kompetitiven ELISA wird ein nicht markierter Antikörper (Alternative: Antigen) an der Mikrotiterplatte gebunden und eine zu untersuchende Probe wird hinzugegeben. Wenn diese Lösung ein Gleichgewicht erreicht hat, wird ein enzymkonjugiertes Antigen

(Alternative: enzymkonjugierter Antikörper) hinzugefügt. Dieser bindet die freien primären Antikörper, die nicht durch die zu testende Probe ein nichtkonjugiertes Antigen gebunden haben. Anschließend wird das Substrat hinzugegeben, das durch die enzymkonjugierten Antigene umgesetzt wird und zu einem kolorimetrischen Signal führt. Der Farbumschlag ist umso stärker, je mehr konjugierte Antigene gebunden wurden und umso weniger unmarkierte Antigene in der Probe waren und an die primären Antikörper gebunden haben. Diese umgekehrte Proportionalität sagt aus, dass ein geringeres kolorimetrisches Signal entsteht, wenn mehr gesuchtes, nicht-markiertes Antigen in der Probe vorhanden ist.

3 Zielsetzung

Mit Hilfe eines rekombinanten FimA Proteins (siehe 2.8.1), das aus FimA von *P. gingivalis* W83 in *Listeria innocua* produziert wurde und welches für eine Methode zur Quantifizierung von löslichen Substanzen geeignet ist, sollte ein Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) entwickelt werden.

Mit dem entwickelten ELISA sollte getestet werden, ob das Serum von Probanden mit Parodontitis, Probanden mit Parodontitis und Diabetes mellitus Typ 2 sowie oral gesunden Kontrollen Antikörpertiter der Klasse IgG und IgM gegen FimA von *Porphyromonas gingivalis* W83 aufweisen.

Die Fragestellungen, die dieser Arbeit zugrunde liegen sind:

- Gibt es einen Unterschied zwischen den IgG-Titern der Probanden mit Parodontitis sowie der Probanden mit Parodontitis und Diabetes mellitus Typ 2 im Vergleich zu den oral gesunden Probanden?
- Gibt es einen Unterschied zwischen den IgM-Titern der Probanden mit Parodontitis sowie der Probanden mit Parodontitis und Diabetes mellitus Typ 2 im Vergleich zu den oral gesunden Probanden?
- Bestehen Zusammenhänge zwischen den gemessenen IgG-Titern sowie IgM-Titern und den CRP-Werten der Probanden mit Parodontitis, mit Parodontitis und Diabetes mellitus Typ 2 und den oral gesunden Kontrollen?

4 Material und Methoden

4.1 Material

4.1.1 Mikrotiterplatte

Nunc MaxiSorp™ 96-Well-ELISA-Mikrotiterplatten (Hersteller: Thermo Fisher Scientific Inc.)

4.1.2 Antigen

Rekombinantes FimA (rFimA) hergestellt in *Listeria innocua* mit dem transferierten Vektor pIMK2sph His-N von *P. gingivalis* W83. Die Herstellung erfolgte durch das Institut für Medizinische Mikrobiologie, Abteilung für Molekulare Diagnostik der Justus-Liebig Universität Gießen, Leiter: Prof. Dr. Eugen Domann (Groeger et al., 2021).

4.1.3 Lösungen und Chemikalien

Chemikalien und Lösungen	Bestandteile und Firmen
1M HEPES Puffer	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure, pH-Bereich 7,2-7,5, Firma: Gibco™
PBS 10x, frei von Calciumchlorid und Magnesiumchlorid, pH 7,4	PBS: Phosphatgepufferte Lösung aus: Natriumchlorid, Dinatriumhydrogenphosphat, Kaliumchlorid, Kaliumdihydrogenphosphat in destilliertem Wasser, Firma: Gibco™

Tween-20	Polyoxyethylen(20)-sorbitan-monolaurat, Firma: Merck KGaA
Albumin-Lösung aus Rinderserum (BSA) 30% in DPBS, steril gefiltert	Firma: Sigma-Aldrich von Merck KGaA
Destilliertes, steriles Wasser (Aqua B. Braun)	Firma: B. Braun Melsungen AG
Milchpulver (MP), Blotting grade, fettarm	Firma: Carl Roth GmbH

Tabelle 1: Übersicht über die Lösungen und Chemikalien der vorliegenden Arbeit.

ELISA-Puffer und Lösungen	Bestandteile
Beschichtungspuffer	100 mM HEPES Puffer: 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
Waschpuffer	PBS-Puffer 1x, pH 7,4, frei von Calciumchlorid und Magnesiumchlorid mit 0,05% Tween-20
Blockierungspuffer	PBS-Puffer 1x, pH 7,4, frei von Calciumchlorid und Magnesiumchlorid mit 1% Magermilchpulver (MP)
Substrat: 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin	1-Step™ Turbo TMB-ELISA Substratlösung, Firma: Thermo Scientific™
Stopp-Lösung	ELISA Stop Solution, Firma: Invitrogen™
Verdünnungspuffer für die sekundären Antikörper	PBS 1x, pH 7,4, frei von Calciumchlorid und Magnesiumchlorid mit 1% BSA

Tabelle 2: Übersicht über die ELISA-Puffer und Lösungen der vorliegenden Arbeit.

4.1.4 Antikörper und Serum

4.1.4.1 Primäre Antikörper

- Polyklonales Antiserum vom Hasen gegen FimA von *P. gingivalis* W83, Hersteller: Davids Biotechnologie GmbH, Regensburg
- Monoklonale IgG-Antikörper der Maus gegen FimA *P. gingivalis* W83, Hersteller: Davids Biotechnologie GmbH, Regensburg

4.1.4.2 Serum

- Präimmunsrum vom Hasen, Firma: Davids Biotechnologie GmbH, Regensburg
- Serum von 26 Probanden mit Parodontitis
- Serum von 15 Probanden mit Parodontitis und Diabetes mellitus Typ 2
- Serum von 13 oral gesunden Probanden

Auswahlkriterien für die Serumproben:

Probanden mit Parodontitis	Probanden mit Parodontitis und Diabetes mellitus Typ 2	Oral gesunde Probanden
Chronische Parodontitis: parodontaler Screening-Index (PSI) ab 4	Chronische Parodontitis: parodontaler Screening-Index (PSI) ab 4	Oral gesunde Probanden: parodontaler Screening-Index (PSI) < 1
Alter 18- 70 Jahre	Diabetes mellitus Typ 2 mit HbA1c-Wert $\geq 8,5$ %	Alter 18- 70 Jahre
Alle Geschlechter	Alter 18- 70 Jahre	Alle Geschlechter

Patienten mit mindestens 12 natürlichen Zähnen (ohne subgingivale Füllung, Kronen oder Karies)	Alle Geschlechter	Patienten mit mindestens 12 natürlichen Zähnen (ohne subgingivale Füllung, Kronen oder Karies)
	Patienten mit mindestens 12 natürlichen Zähnen (ohne subgingivale Füllung, Kronen oder Karies)	

Tabelle 3: Auswahlkriterien für die Serumproben.

Ausschlusskriterien:

- Schwangerschaft
- Rauchen
- BMI < 18,5 kg/m²
- Schwere kardiovaskuläre Erkrankungen (Koronare Herzerkrankungen, zerebrale Gefäßerkrankungen, periphere Gefäßerkrankungen, Herzklappenerkrankungen, Herzinsuffizienz)
- Andere schwerwiegende Erkrankungen wie Krebs, Lebererkrankungen, Lungenerkrankungen, chronische Infektionserkrankungen wie HIV, Hepatitis usw. außer Parodontitis, rheumatologische Erkrankungen, hämatologische Erkrankungen
- Schwere psychiatrische Erkrankungen
- Anhaltender Alkohol- oder Drogen- oder Medikamentenmissbrauch
- Systemische enterale oder parenterale Medikation wie tägliche Vitamineinnahme oder Nahrungsergänzungsmittel und bestimmte

Kalziumkanalblocker (z.B. Nifedipin) außer Antidiabetika oder Insulinsubstitution

- Allergien gegen unterstützende Medikamente / Antiseptika sowie zahnmedizinische Materialien (zum Beispiel Handschuhe oder Chlorhexidine)
- Schwere Zahnerkrankungen wie schwere Karies und/oder Pulpaerkrankungen, die eine umfangreiche zahnmedizinische, chirurgische oder prothetische Behandlung erfordern, oder Krankheiten, die eine systemische Medikation erfordern.
- Systemische, topische oder inhalative Steroidbehandlung an mehr als 30 aufeinanderfolgenden Tagen innerhalb von 6 Wochen vor der Erstuntersuchung
- Jegliche Parodontalbehandlung innerhalb von 6 Monaten vor Studienbeginn

4.1.4.3 Sekundäre Antikörper

- Goat Anti-Rabbit-IgG (H+L) Horseradish peroxidase/ Meerrettichperoxidase (HRP)-konjugiert (AGM), Konzentration: 0,8 mg/ml, Hersteller: Invitrogen™.
- Goat Anti-Mouse-IgG (H+L) Horseradish peroxidase/ Meerrettichperoxidase (HRP)-konjugiert (AGM), Konzentration: 0,8 mg/ml, Hersteller: Invitrogen™.
- Goat Anti-Human-IgG Horseradish peroxidase/ Meerrettichperoxidase (HRP)-konjugiert (AGM), Konzentration: 1 mg/ml, Hersteller: Invitrogen™.
- Goat Anti-Human-IgM (μ chain) Horseradish peroxidase/ Meerrettichperoxidase (HRP)-konjugiert, cross-adsorbed. Konzentration: 1 mg/ml, Hersteller: Invitrogen™.

4.1.5 Geräte, Apparaturen und Verbrauchsmaterialien

Apparaturen/ Geräte/ Materialien	Firma
Mithras LB 940 Multimode Microplate Reader	Berthold Technologies GmbH & Co. KG

RET control-visc	IKA Labortechnik GmbH & Co. KG
Einkanal-Mikroliterpipette Transferpipette S (0,5-10 µl, 10-100 µl, 100- 1000 µl)	Brand GmbH & Co. KG
Elektronische Mehrfachdispenser-Pipette Multipette E3	Eppendorf SE
Vortex- Genie 2 Mixer	Scientific Industries, Inc.
Thermo Scientific BBD 6220 CO ₂ – Inkubator	Thermo Fisher Scientific GmbH
Selbstklebende Dichtungsfolie für 96- Well-Platten	Thermo Fisher Scientific GmbH

***Tabelle 4:** Übersicht über die Geräte Apparaturen und Verbrauchsmaterialien der vorliegenden Arbeit.*

4.1.6 Kooperierende Firmen und Institute

Dauids Biotechnologie GmbH, Regensburg Deutschland

Institut für Medizinische Mikrobiologie der Justus-Liebig-Universität, Gießen

4.1.7 Software

Microsoft Office 2019, Firma: Microsoft

- a) Word
- b) Excel
- c) Powerpoint

Mikrowin 2000

JASP 0.16.4.0

4.2 Methoden

4.2.1 Bestimmung der Antikörpertiter

Der Titer bezeichnet die Verdünnung einer Antikörperprobe, die erforderlich ist, um einen spezifischen Nachweis mit einer bestimmten Testmethode zu erreichen. Er gibt die höchste Verdünnungsstufe an, bei der eine Reaktion von Antikörper und Antigen, z.B. mit einem Immunoassay, nachweisbar ist.

Der Antikörpertiter bezieht sich spezifischer auf die effektive Wirksamkeit einer bestimmten Antikörperprobe. Unter der Titermessung versteht man die Bestimmung der funktionalen Verdünnung einer Antikörperprobe, die erforderlich ist, um den gewünschten Nachweisbereich in einem bestimmten Assay, wie z. B. ELISA, zu erreichen.

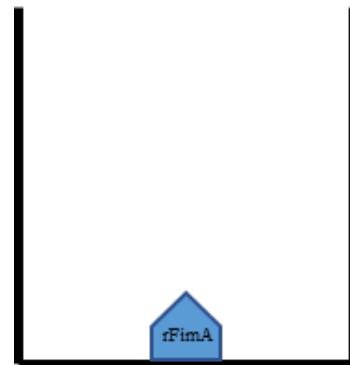
In der vorliegenden Arbeit wurde das Präimmenserum sowie das polyklonale Antiserum vom Hasen und die Blutproben der Patienten in einer Verdünnungsreihe fortlaufend verdünnt. Es wurden Verdünnungen von 1:25, 1:50, 1:100, 1:200, 1:400, 1:800, 1:1600 und 1:3200 hergestellt. Das zu testende Serum wurde mit dem Blockierungspuffer verdünnt. Mit der Verdünnungsreihe wurde dann der ELISA durchgeführt. Der Titer gibt die Verdünnung an, bei der noch eine Farbreaktion im ELISA-Test nachweisbar ist bzw. die gemessene optische Dichte oberhalb des Wertes der dreifachen optischen Dichte (OD) des Leerwertes (Blank) liegt. Anhand der Höhe des Titers lässt sich die Menge des gesuchten Antikörpers quantifizieren. Je höher die gebundene Antikörpermenge ist, umso höher ist die Verdünnung, die den Titer bildet.

4.2.2 Schematische Darstellung des ELISA-Protokolls

Schritt 1:

Die Wells der Mikrotiterplatte werden mit je 50 ng rFimA pro Vertiefung in 100 µl Beschichtungspuffer befüllt und 16 Stunden bei 4 °C inkubiert.

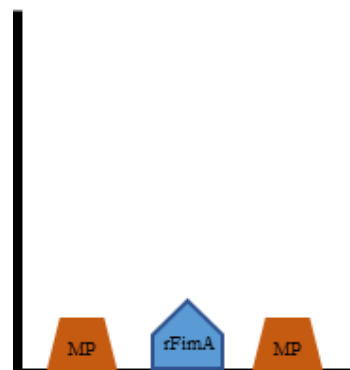
Waschschritt: drei Mal waschen



Schritt 2:

Zugabe von 200 µl Blockierungspuffer (MP) pro Vertiefung und Inkubation für 1 Stunde bei 37°C.

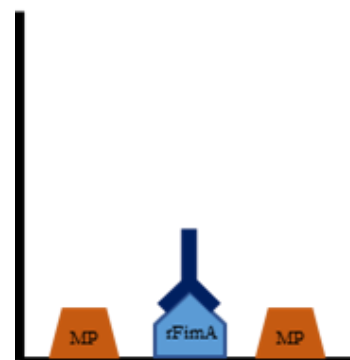
Waschschritt: drei Mal waschen



Schritt 3:

Zugabe von je 100 µl verdünntem Serum und Inkubation bei 37°C für 2 Stunden.

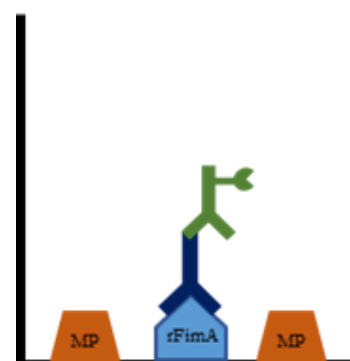
Waschschritt: drei Mal waschen



Schritt 4:

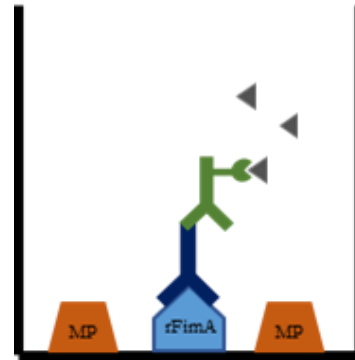
Zugabe von je 100 µl 1:5000 verdünntem HRP-konjugiertem sekundären Antikörper pro Well und Inkubation bei 37°C für 1 Stunde.

Waschschritt: drei Mal waschen



Schritt 5:

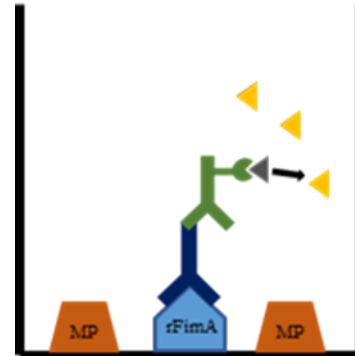
Zugabe von je 100 µl 1-Step™ Turbo TMB-ELISA Substratlösung pro Well. Die Mikrotiterplatte dunkel abdecken und für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren.



Waschschritt: drei Mal waschen

Schritt 6:

Zugabe von je 100µl Invitrogen™ ELISA Stop Solution pro Well.



Schritt 7:

Messung der optischen Dichte bei 450 nm Wellenlänge und einer Referenzwellenlänge von 620 nm im Mikrotiterplattenphotometer.

Abbildung 1: Schematische Darstellung des ELISA-Verfahrens zur Detektion von IgG- und IgM-Antikörper gegen FimA von P. gingivalis W83 (Quelle: eigene Darstellung).

4.2.3 ELISA-Entwicklung: Detektion von IgG-Antikörper gegen *P. gingivalis* FimA im Präimmun- und Antiserum vom Hasen

Um einen ELISA zu entwickeln, der IgG-Antikörper gegen FimA von *P. gingivalis* W83 detektiert, wurde das Prinzip des indirekten ELISA angewendet. Es wurde Serum vom Hasen vor der Immunisierung sowie danach eingesetzt. Zur Gewinnung der Immunglobuline der Klasse IgG hatte die Firma Davids Biotechnologie GmbH einen Hasen gegen FimA von *P. gingivalis* W83 immunisiert (polyklonales Antiserum). Um ein Vergleichsserum ohne die gesuchten Antikörper zu erhalten, wurde dem Tier vor der Immunisierung eine Serumprobe entnommen (Präimmunserum).

Zu Beginn wurde das Präimmunserum sowie das polyklonale Antiserum vom Hasen in einer Verdünnungsreihe in die Verdünnungsstufen 1:25, 1:50, 1:100, 1:200, 1:400, 1:800, 1:1600, 1:3200 mit dem Blockierungspuffer verdünnt.

Eine Nunc MaxiSorp™ 96-Well-ELISA-Mikrotiterplatten wurde mit dem rFimA (siehe 4.1.2), das aus FimA von *P. gingivalis* W83 in *Listeria innocua* produziert wurde, beschichtet. Es wurde pro Vertiefung (Well) 50 ng rFimA hinzugefügt und für 16 Stunden bei 4 Grad Celsius inkubiert. Um Verunreinigungen der Wells oder einen Flüssigkeitsverlust zu verhindern, wurden die Platte bei jedem Inkubationsschritt mit einer speziellen selbstklebenden Dichtungsfolie abgedeckt.

Im Anschluss erfolgte das dreimalige Waschen mit 200 µl Waschpuffer pro Well, um das nicht gebundene rFimA zu entfernen. Die überschüssige Flüssigkeit wurde durch Ausklopfen der Mikrotiterplatte auf saugfähigem Zellstoff entfernt. Die freien Bindungsstellen in den Wells wurden mit je 200 µl Blockierungspuffer pro Vertiefung abgebunden. Die Inkubationszeit des Blockierungspuffers betrug eine Stunde bei 37 Grad Celsius. Darauffolgend wurden die nicht gebundene Überschüsse mit 200 µl Waschpuffer pro Vertiefung dreimal ausgewaschen. Die überschüssige Flüssigkeit wurde wie zuvor durch Ausklopfen der Mikrotiterplatte auf saugfähigem Zellstoff entfernt.

Das verdünnte Präimmunserum und das verdünnte polyklonale Antiserum vom Hasen wurde in je 100 µl pro Well entsprechend der Abbildung Nr. 9 der Plattenbelegung hinzugefügt und für zwei Stunden bei 37 Grad Celsius inkubiert. Durch diesen Prozess

konnten die im Serum enthaltenen IgG-Antikörper gegen *P. gingivalis* FimA an das rFimA in der Mikrotiterplatte binden.

Die Überstände wurden nach der Inkubation dreimal mit je 200 µl Waschpuffer ausgewaschen und die überschüssige Flüssigkeit wurde mit dem bereits erläuterten Vorgehen entfernt. Danach wurde pro Well 100 µl des mit Meerrettichperoxidase (HRP) konjugierten sekundären Goat Anti-Rabbit-IgG-Antikörper mit der Verdünnung 1:5000 hinzugefügt. Nach einer Inkubationszeit von einer Stunde bei 37 Grad Celsius wurden die nicht gebundenen Anteile mit je 200 µl Waschpuffer entfernt und der Flüssigkeitsüberschuss wurde analog zu den vorherigen Schritten entfernt.

Im Anschluss wurde pro Well 100 µl TMB-Lösung (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin) hinzugefügt und die Platte wurde dunkel für zwanzig Minuten inkubiert. Der HRP-konjugierte sekundäre Antikörper bindet spezifisch an den primären IgG-Antikörper gegen *P. gingivalis* FimA. Das HRP führte zu einer enzymatischen Umsetzung des TMBs und die Lösung im Well verfärbte sich in Anhängigkeit von der Menge des gebundenen Komplexes (bestehend aus sekundärem Antikörper, gesuchtem Antikörper und rFimA) blau.

Die Reaktion zwischen der Meerrettichperoxidase und dem TMB wurde mit der Zugabe von 100 µl Invitrogen™ ELISA Stop Solution gestoppt, es kam zu einem Farbumschlag von blau zu gelb. Die optische Dichte (OD) wurde bei einer Wellenlänge von 450 Nanometer (nm) und einer Referenzwellenlänge von 620 nm im Mikrotiterplattenphotometer gemessen. Die Intensität der Färbung sowie die gemessene OD war proportional zur Menge an gebundenem IgG gegen FimA von *P. gingivalis* W83.

Die Inkubationsschritte für die Leerproben (Blanks) erfolgten entsprechend zu den bereits geschilderten Schritten, außer die Zugabe von Präimmunserum oder Antiserum vom Hasen erfolgten nicht. Die Blanks wurden doppelt bestimmt.

Alles in allem konnte man mit dem ELISA ein positives Ergebnis erzielen, wenn in der zu testenden Serumprobe IgG gegen FimA von *P. gingivalis* W83 enthalten waren und diese über der Nachweisgrenze (Titer) liegen. Die Nachweisgrenze bzw. der Titer wird mit Hilfe der dreifachen OD der Blank-Probe ermittelt. Alle Verdünnungen und

Verdünnungspuffer der sekundären Antikörper wurden nach Herstellerangaben am Tag des jeweiligen Versuches hergestellt.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Blank	Polyklonales Antiserum vom Hasen (PA) 1:25	Präimmunserum vom Hasen (PS) 1:25									
B	Blank	PA 1:50	PS 1:50									
C		PA 1:100	PS 1:100									
D		PA 1:200	PS 1:200									
E		PA 1:400	PS 1:400									
F		PA 1:800	PS 1:800									
G		PA 1:1600	PS 1:1600									
H		PA 1:3200	PS 1:3200									

Abbildung 9: Plattenbelegung einer 96-Well-ELISA-Mikrotiterplatte mit Angabe der verschiedenen Verdünnungsstufen der Seren.

ELISA-Protokoll

1. Die Wells der Mikrotiterplatte werden mit je 50 ng rFimA pro Vertiefung in 100 µl Beschichtungspuffer aufgefüllt.
2. Inkubation für 16 Stunden bei 4 °C.
3. Dreimaliges Auswaschen der Wells mit dem Waschpuffer und Entfernung der überschüssigen Flüssigkeit.
4. Zugabe von 200 µl Blockierungspuffer pro Well.
5. Inkubation für 1 Stunde bei 37°C.

6. Dreimaliges Auswaschen der Wells mit dem Waschpuffer und Entfernung der überschüssigen Flüssigkeit.
7. Zugabe von je 100 μ l verdünntem Präimmunserum und verdünntem polyklonales Antiserum vom Hasen in die Wells entsprechend der Plattenbelegung Abb. Nr. 9 (Verdünnungsstufen: 1:25, 1:50, 1:100, 1:200, 1:400, 1:800, 1:1600, 1:3200).
8. Inkubation der Platten bei 37°C für 2 Stunden.
9. Dreimaliges Auswaschen der Wells mit dem Waschpuffer und Entfernung der überschüssigen Flüssigkeit.
10. Zugabe von je 100 μ l 1:5000 verdünntem Goat Anti-Rabbit-IgG HRP-konjugiert pro Well.
11. Inkubation der Platten bei 37°C für 1 Stunde.
12. Dreimaliges Auswaschen der Wells mit dem Waschpuffer und Entfernung der überschüssigen Flüssigkeit.
13. Zugabe von je 100 μ l 1-Step™ Turbo TMB-ELISA Substratlösung pro Well.
14. Dunkel abdecken und Inkubation für 20 Minuten bei Raumtemperatur.
15. Zugabe von je 100 μ l Invitrogen™ ELISA Stop Solution pro Well.
16. Messung der optischen Dichte (OD) bei 450 nm und einer Referenzwellenlänge von 620 nm mit dem Mikrotiterplattenphotometer.

4.2.4 Bestimmung der Ausgangskonzentration des rekombinanten FimA

Um die optimale Konzentration an rFimA zur initialen Beschichtung der Wells der Mikrotiterplatte zu ermitteln, wurden Konzentrationen von 10 ng rFimA pro Well, 25 ng rFimA pro Well, 50 ng rFimA pro Well, 100 ng rFimA pro Well, 150 ng rFimA pro Well, 200 ng rFimA pro Well, 250 ng rFimA pro Well, 300 ng rFimA pro Well, 350 ng rFimA pro Well, 400 ng rFimA pro Well, 450 ng rFimA pro Well und 500 ng rFimA pro Well getestet. Die Mikrotiterplatte wurde entsprechend der Plattenbelegung auf Abb. Nr. 10 mit den verschiedenen Konzentrationen an rFimA pro Well in 100 μ l

Beschichtungspuffer aufgefüllt. Die Inkubationszeit betrug 16 Stunden 4 °C. Für den ELISA wurde das verdünnte polyklonale Antiserum vom Hasen gegen rFimA von *P. gingivalis* W83 sowie das Präimmunserum vom Hasen 1:25 verdünnt eingesetzt. Die Blanks wurden entsprechend des vorherigen Protokolls (siehe 4.2.2) inkubiert, jedoch erfolgte nicht die Zugabe des polyklonalen Antiserums gegen FimA oder das Präimmunserum vom Hasen. Für die Testung erfolgte für jede Testgruppe eine dreifache Bestimmung. Das Vorgehen und die Inkubationszeiten des Testverfahrens entsprechen dem ELISA-Protokoll aus 4.2.3.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	10 ng/ Well AK 1:25	25 ng/ Well AK 1:25	50 ng/ Well AK 1:25	100 ng/ Well AK 1:25	150 ng/ Well AK 1:25	200 ng/ Well AK 1:25	250 ng/ Well AK 1:25	300 ng/ Well AK 1:25	350 ng/ Well AK 1:25	400 ng/ Well AK 1:25	450 ng/ Well AK 1:25	500 ng/ Well AK 1:25
B	AK 1:25	AK 1:25	AK 1:25	AK 1:25	AK 1:25	AK 1:25	AK 1:25	AK 1:25	AK 1:25	AK 1:25	AK 1:25	AK 1:25
C	AK 1:25	AK 1:25	AK 1:25	AK 1:25	AK 1:25	AK 1:25	AK 1:25	AK 1:25	AK 1:25	AK 1:25	AK 1:25	AK 1:25
D	10 ng/ Well PS 1:25	25 ng/ Well PS 1:25	50 ng/ Well PS 1:25	100 ng/ Well PS 1:25	150 ng/ Well PS 1:25	200 ng/ Well PS 1:25	250 ng/ Well PS 1:25	300 ng/ Well PS 1:25	350 ng/ Well PS 1:25	400 ng/ Well PS 1:25	450 ng/ Well PS 1:25	500 ng/ Well PS 1:25
E	PS 1:25	PS 1:25	PS 1:25	PS 1:25	PS 1:25	PS 1:25	PS 1:25	PS 1:25	PS 1:25	PS 1:25	PS 1:25	PS 1:25
F	PS 1:25	PS 1:25	PS 1:25	PS 1:25	PS 1:25	PS 1:25	PS 1:25	PS 1:25	PS 1:25	PS 1:25	PS 1:25	PS 1:25
G	Blank 10 ng/ Well	Blank 25 ng/ Well	Blank 50 ng/ Well	Blank 100 ng/ Well	Blank 150 ng/ Well	Blank 200 ng/ Well	Blank 250 ng/ Well	Blank 300 ng/ Well	Blank 350 ng/ Well	Blank 400 ng/ Well	Blank 450 ng/ Well	Blank 500 ng/ Well
H	Blank 10 ng/ Well	Blank 25 ng/ Well	Blank 50 ng/ Well	Blank 100 ng/ Well	Blank 150 ng/ Well	Blank 200 ng/ Well	Blank 250 ng/ Well	Blank 300 ng/ Well	Blank 350 ng/ Well	Blank 400 ng/ Well	Blank 450 ng/ Well	Blank 500 ng/ Well

Abbildung 2: Plattenbelegung einer 96-Well-ELISA-Mikrotiterplatte mit Angabe der eingesetzten rFimA-Konzentration und mit Angabe der verschiedenen Verdünnungsstufen der Seren. AK: Polyklonale Antikörper, PS: Präimmenserum.

4.2.5 ELISA: Testung der aufgereinigten monoklonalen IgG-Antikörper gegen *P. gingivalis* FimA der Maus

Mit dem entwickelten ELISA-Protokoll wurden im Anschluss die aufgereinigten monoklonalen IgG-Antikörper der Maus getestet. Die monoklonalen IgG-Immunglobuline wurden durch die Firma Davids Biotechnologie GmbH hergestellt. Die IgG-Antikörper-Suspensionen der Klone mit den Nummern 3, 17, 20, 41, 55, 85, 89, 128, 188 sowie 189 wurden unverdünnt, 1:25 und 1:50 verdünnt verwendet (siehe Abb. Nr. 11). Die Anfangskonzentration der aufgereinigten monoklonalen IgG-Antikörper-Suspensionen der unterschiedlichen Klone wurden mit dem Blockierungspuffer auf die Konzentration 0,05 mg/ml verdünnt. Das Vorgehen für den ELISA erfolgte nach dem Protokoll aus 4.2.3. Die Wells wurden mit je 50 ng rFimA pro Well in 100 µl Beschichtungspuffer aufgefüllt und für 16 Stunden bei 4 °C inkubiert. Für die Detektion der monoklonalen IgG-Antikörper gegen *P. gingivalis* FimA wurden je 100 µl 1:5000 verdünntem Goat Anti-Mouse-IgG-Antikörper HRP-konjugiert pro Well als sekundäre Antikörper verwendet.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Blank	Klon 3 uv	Klon 20 uv	Klon 55 uv	Klon 89 uv	Klon 188 uv						
B	Blank	1:25	1:25	1:25	1:25	1:25						
C		1:50	1:50	1:50	1:50	1:50						
D		Klon 17 uv	Klon 41 uv	Klon 85 uv	Klon 128 uv	Klon 189 uv						
E		1:25	1:25	1:25	1:25	1:25						
F		1:50	1:50	1:50	1:50	1:50						
G												
H												

Abbildung 11: Plattenbelegung einer 96-Well-ELISA-Mikrotiterplatte mit Angabe der Verdünnungsstufen der aufgereinigten monoklonalen IgG-Antikörper der verschiedenen Klone (Maus) gegen *P. gingivalis* FimA. Uv: unverdünnt.

4.2.6 ELISA: Testung der unverdünnten, aufgereinigten monoklonalen IgG-Antikörper gegen *P. gingivalis* FimA der Maus

Im nächsten Versuch wurden die aufgereinigten, monoklonalen IgG-Antikörper-Suspensionen der Klone 3, 17, 20, 41, 55, 85, 89, 128, 188 und 189 unverdünnt eingesetzt (siehe Abb. Nr. 12). Die eingesetzten Proteinmengen pro Well sind in der Tabelle Nr. 5 aufgelistet. Das Vorgehen erfolgte analog zum ELISA-Protokoll aus

4.2.3. Als sekundäre Antikörper wurden entsprechend zu 4.2.5 1:5000 verdünnte Goat Anti-Mouse-IgG-Antikörper HRP-konjugiert pro Well eingesetzt.

Klon	Konzentration [mg/ml]	Eingesetzte Proteinmenge [mg]
Klon 3	0,31	0,031
Klon 17	0,27	0,027
Klon 20	0,39	0,039
Klon 41	0,44	0,044
Klon 55	0,29	0,029
Klon 85	0,23	0,023
Klon 89	0,224	0,0224
Klon 128	0,44	0,044
Klon 188	0,14	0,014
Klon 189	0,34	0,034

Tabelle 5: Übersicht über die eingesetzte Konzentration und Proteinmenge der monoklonalen Antikörper der jeweiligen Klone.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Blank	Klon 3	Klon 188									
B	Blank	Klon 17	Klon 189									
C		Klon 20										
D		Klon 41										
E		Klon 55										
F		Klon 85										
G		Klon 89										
H		Klon 128										

Abbildung 12: Plattenbelegung einer 96-Well-ELISA-Mikrotiterplatte mit den aufgereinigten monoklonalen IgG-Antikörpern (Maus) der verschiedenen Klone gegen *P. gingivalis* FimA.

4.2.7 ELISA: Testung humaner Seren zum Nachweis von IgG-Antikörper gegen *P. gingivalis* FimA

Das Serum von 26 Probanden mit Parodontitis, 15 mit Parodontitis mit Diabetes mellitus Typ 2 und 13 oral gesunder Probanden wurden in die Verdünnungsstufen 1:25, 1:50, 1:100, 1:200, 1:400, 1:800, 1:1600 und 1:3200 mit dem Blockierungspuffer verdünnt. Die ELISA-Testung der verschiedenen Seren zum Nachweis von IgG-Antikörper gegen FimA von *P. gingivalis* W83 erfolgte nach dem Protokoll aus 4.2.3.

Der Einsatz der verschiedenen Konzentrationen der Seren erfolgte entsprechend der Plattenbelegung der Abb. Nr. 13. In allen Tests erfolgte die Inkubation unter Abdeckung der Mikrotiterplatte mit einer selbstklebenden Abdichtungsfolie. Alle Verdünnungen wurden am selben Tag des Versuchs hergestellt. Als sekundäre Antikörper wurden 1:5000 verdünnte Goat Anti-Human-IgG-Antikörper HRP-konjugiert pro Well verwendet.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	Blank PA-Pat.: Nr.1 1:25 1:50	PA-Pat.: Nr.1 1:25 1:50	PA-Pat.: Nr.2 1:25 1:50	PA-Pat.: Nr.2 1:25 1:50	PA-Pat.: Nr. 3 1:25 1:50	PA-Pat.: Nr.3 1:25 1:50	Gesunder Pat.: Nr.1 1:25 1:50	Gesunder Pat.: Nr.1 1:25 1:50	Gesunder Pat.: Nr.2 1:25 1:50	Gesunder Pat.: Nr.2 1:25 1:50	Gesunder Pat.: Nr.2 1:25 1:50	
B	Blank 1:50	1:50	1:50	1:50	1:50	1:50	1:50	1:50	1:50	1:50	1:50	
C	1:100	1:100	1:100	1:100	1:100	1:100	1:100	1:100	1:100	1:100	1:100	
D	1:200	1:200	1:200	1:200	1:200	1:200	1:200	1:200	1:200	1:200	1:200	
E	1:400	1:400	1:400	1:400	1:400	1:400	1:400	1:400	1:400	1:400	1:400	
F	1:800	1:800	1:800	1:800	1:800	1:800	1:800	1:800	1:800	1:800	1:800	
G	1:1600	1:1600	1:1600	1:1600	1:1600	1:1600	1:1600	1:1600	1:1600	1:1600	1:1600	
H	1:3200	1:3200	1:3200	1:3200	1:3200	1:3200	1:3200	1:3200	1:3200	1:3200	1:3200	

Abbildung 3: Plattenbelegung einer 96-Well-ELISA-Mikrotiterplatte mit Angabe den verschiedenen Verdünnungsstufen der Blutseren. PA- Pat.: Patient mit Parodontitis oder Parodontitis und Diabetes mellitus Typ 2; Gesunder-Pat.: oral gesunder Proband.

4.2.8 ELISA: Testung humaner Seren zum Nachweis von IgM-Antikörper gegen *P. gingivalis* FimA

Die Testung der 26 Seren der Probanden mit Parodontitis, der 15 Patienten mit Parodontitis und Diabetes mellitus Typ 2 und der 13 Seren der oral gesunden Probanden auf IgM-Antikörper gegen *P. gingivalis* FimA startete mit der Herstellung einer Verdünnungsreihe der Seren in die Verdünnungsstufen 1:25, 1:50, 1:100, 1:200, 1:400, 1:800, 1:1600 und 1:3200. Alle Arbeitsschritte des ELISA-Tests, erfolgten nach dem ELISA-Protokoll, welches unter 4.2.3 aufgeführt ist. Wie in 4.2.7 geschildert, erfolgte jeder Inkubationsschritt unter Abdeckung der Mikrotiterplatte mit einer selbstklebenden Dichtungsfolie. Alle Verdünnungen wurden am selben Tag des Versuchs hergestellt. Als sekundäre Antikörper wurden 1:5000 verdünnte Goat Anti-Human-IgM-Antikörper HRP-konjugiert pro Well verwendet. Die eingesetzten Seren mit ihren unterschiedlichen Verdünnungen sind in der Abb. Nr. 14 der Plattenbelegung ersichtlich.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	Blank	PA-Pat.: Nr.1 1:25	PA-Pat.: Nr.1 1:25	PA-Pat.: Nr.2 1:25	PA-Pat.: Nr. 3 1:25	PA-Pat.: Nr.3 1:25	Gesunder Pat.: Nr.1 1:25	Gesunder Pat.: Nr.1 1:25	Gesunder Pat.: Nr.2 1:25	Gesunder Pat.: Nr.2 1:25	Gesunder Pat.: Nr.2 1:25	
B	Blank	1:50	1:50	1:50	1:50	1:50	1:50	1:50	1:50	1:50	1:50	
C		1:100	1:100	1:100	1:100	1:100	1:100	1:100	1:100	1:100	1:100	
D		1:200	1:200	1:200	1:200	1:200	1:200	1:200	1:200	1:200	1:200	
E		1:400	1:400	1:400	1:400	1:400	1:400	1:400	1:400	1:400	1:400	
F		1:800	1:800	1:800	1:800	1:800	1:800	1:800	1:800	1:800	1:800	
G		1:1600	1:1600	1:1600	1:1600	1:1600	1:1600	1:1600	1:1600	1:1600	1:1600	
H		1: 3200	1:3200	1: 3200	1: 3200	1: 3200	1:3200	1:3200	1:3200	1:3200	1:3200	

Abbildung 4: Plattenbelegung einer 96-Well-ELISA-Mikrotiterplatte mit Angabe der verschiedenen Verdünnungsstufen der Blutseren der Probanden. PA- Pat.: Patient mit Parodontitis oder Parodontitis und Diabetes mellitus Typ 2; Gesunder-Pat.: oral gesunder Proband.

4.3 Datenauswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mit der Unterstützung des Instituts für medizinische Statistik der Justus-Liebig-Universität Gießen (Dr. biol. hom. Anita Windhorst). Zur Datenauswertung wurden Microsoft Excel und JASP 0.16.4.0 verwendet.

Die erfassten Daten wurden auf ihre Normalverteilung mit dem Shapiro-Wilk-Test bestimmt. Die aufgenommenen IgG- und IgM-Titer sowie die CRP-Werte wiesen keine Normalverteilung auf. Beim Alter der Probanden wurde von einer Normalverteilung ausgegangen. Die Varianzhomogenitätsprüfung der Studiengruppen erfolgte mit dem Levene-Test.

Die Unabhängigkeit und Vergleichbarkeit der Studiengruppen wurden mit dem Chi-Quadrat-Unabhängigkeits-Test und der einfaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA) ermittelt.

Die Überprüfung eines statistisch signifikanten Unterschieds zwischen den Gruppen oral gesunde Kontrollen, Probanden mit Parodontitis und Probanden mit Parodontitis und Diabetes mellitus Typ 2 in den erfassten Messungen (IgG-Titer, IgM-Titer, CRP-Werte) erfolgte mit dem Kruskal-Wallis-Test. Bei einer nachgewiesenen statistischen Signifikanz von $p < 0,05$ erfolgte im Anschluss der Post-hoc-Test nach Dunn mit Korrekturen nach Bonferroni-Holm.

Zusammenhänge zwischen den CRP-Werten und den IgG- sowie IgM-Titern wurden mit der Bestimmung der Rangkorrelation nach Spearman getestet.

Das Signifikanzniveau für alle Tests wurde auf $p < 0,05$ festgelegt.

5 Ergebnisse

5.1 Auswertung der Testung des polyklonalen Antiserums im Vergleich zum Präimmunserum vom Hasen

Mit dem ELISA-Protokoll (siehe 4.2.2 und 4.2.3) wurde das Antiserum mit den polyklonalen Antikörpern vom Hasen im Vergleich zum Präimmunserum vom Hasen getestet. Von den ermittelten optischen Dichten für die jeweilige Verdünnungsstufe wurde der Mittelwert der Blanks, der aus den OD-Werten der Blanks ermittelt wurde, subtrahiert. Die Auswertung zeigte, dass spezifische Bindungen nachgewiesen werden konnten. Die OD-Werte des Antiserums waren pro Verdünnungsstufe vierfach höher als die Absorptions-Werte des Präimmunserums. Die Werte zeigten bei einer Erhöhung der Verdünnung der Seren einen gleichmäßig sinkenden OD-Wert (siehe Abb. Nr. 15).

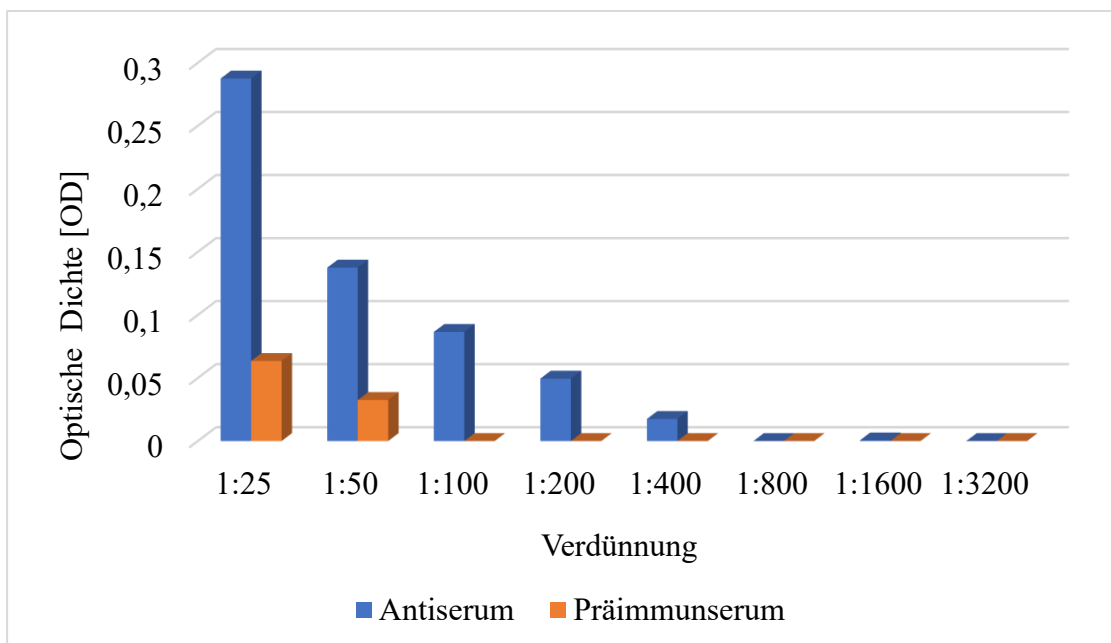


Abbildung 15: Auswertung der optischen Dichten des Präimmunserums im Vergleich zum Antiserum vom Hasen der verschiedenen Verdünnungsstufen. Der Mittelwert der Blanks wurde von allen Werten subtrahiert.

Nachdem man den dreifachen Wert des Mittelwertes der Blanks von den Absorptionswerten beider Testgruppen subtrahiert hat, erhielt man den Titer. Der Titer lag für das Antiserum bei einer Verdünnung von 1:200 und für das Präimmunserum bei 1:25. Der erhaltene OD-Wert des Antiserums bei der Verdünnung von 1:25 war zehnfach höher als der OD-Wert des Präimmunserums bei gleicher Verdünnung. Die gemessenen Kreuzreaktionen für das Präimmunserum liegen bei 9,86 %.

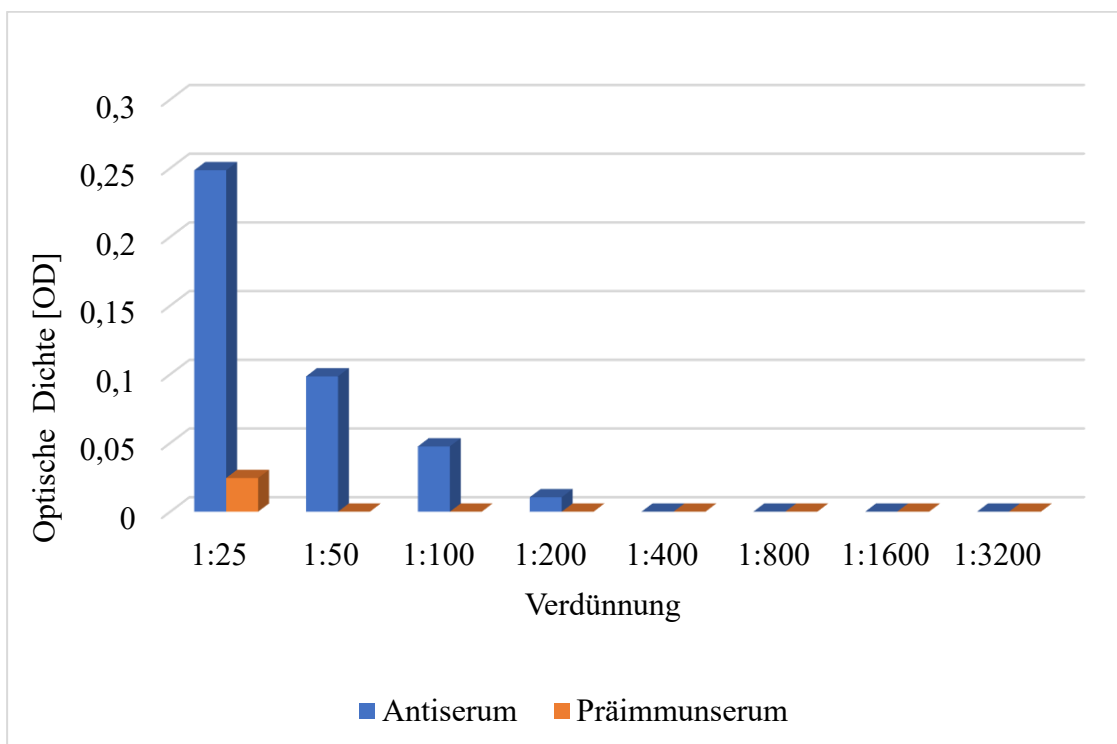


Abbildung 16: Titerauswertung der optischen Dichten des Präimmunserums im Vergleich zum Antiserum vom Hasen. Der dreifache Mittelwert der Blanks wurde von allen Werten subtrahiert.

5.2 Auswertung der Testung verschiedener rFimA Konzentrationen

Um die optimale Konzentration zum Coaten der einzelnen Wells zu ermitteln, wurden verschiedene Konzentrationen an rFimA mit demselben ELISA-Protokoll (siehe 4.2.4)

getestet. Es wurden für den Test das Antiserum und Präimmunserum vom Hasen verwendet. Für die Auswertung wurde der Mittelwert und die Standardabweichung der OD-Werte für die verschiedenen rFimA-Konzentrationen bestimmt. Der Mittelwert der Absorptionen der Blanks wurde von den gemessenen OD-Werten subtrahiert. Die eingesetzte Menge von 50 ng rFimA pro Well zeigte einen Mittelwert der optischen Dichte von 0,756 sowie eine Standardabweichung von 0,018 in der Gruppe des Antiserums und im Vergleich zum Präimmunserum eine mittlere optische Dichte von 0,118 sowie eine Standardabweichung von 0,008. Eine Erhöhung der rFimA-Menge von 25 ng (von 25 ng auf 50 ng pro Well) zeigte eine Erhöhung der optischen Dichte um den Faktor 1,7 beim Antiserum und um den Faktor 1,2 beim Präimmunserum. Im Vergleich dazu bewirkte eine Erhöhung von 50 ng (von 50 ng auf 100 ng pro Well) eine 1,1-fache Erhöhung der OD beim Antiserum sowie beim Präimmunserum und eine erneute Erhöhung von 50 ng (von 100 ng auf 150 ng pro Well) 1,008-fache Erhöhung beim Antiserum und eine 1,3-fache Erhöhung beim Präimmunserum. Die Standardabweichungen der optischen Dichten bei 50 ng rFimA pro Well sowie der ermittelte Mittelwert der OD zeigten im Vergleich zu den anderen Parametern das beste Read-out. Aufgrund dessen wurde die Konzentration auf 50 ng rFimA pro Well festgelegt.

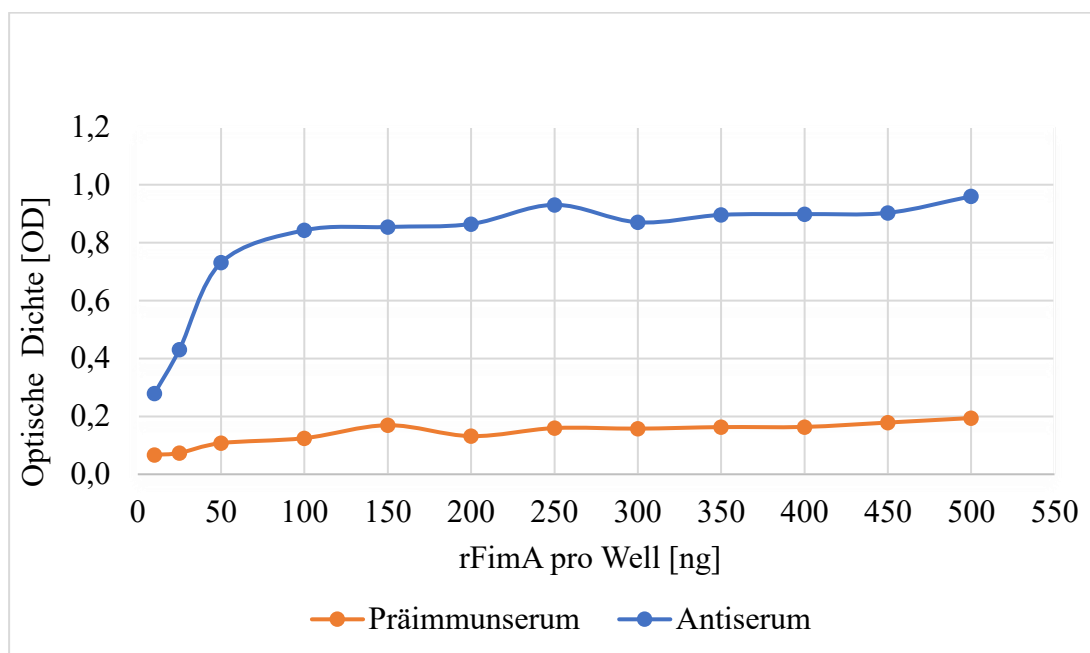


Abbildung 17: Auswertung Coating der Wells: Optische Dichten des Präimmunserums im Vergleich zum Antiserum vom Hasen bei unterschiedlicher Menge an rFimA. Der Mittelwert der Blanks wurden von den einzelnen OD-Werten subtrahiert.

Proteinmenge pro Well	MW OD AK	SD OD AK	MW OD PS	SD OD PS	MW OD Blank	SD OD Blank
10 ng	0,286	0,053	0,084	0,001	0,017	0,0035
25 ng	0,448	0,017	0,098	0,004	0,0245	0,009
50 ng	0,756	0,018	0,118	0,008	0,01	0,0055
100 ng	0,853	0,026	0,130	0,006	0,0055	0,002
150 ng	0,860	0,027	0,171	0,030	0,0015	0,0005
200 ng	0,866	0,035	0,140	0,007	0,0085	0,0005
250 ng	0,940	0,041	0,163	0,007	0,003	0,0025
300 ng	0,874	0,048	0,165	0,014	0,007	0,003
350 ng	0,903	0,031	0,169	0,013	0,006	0,004
400 ng	0,905	0,026	0,164	0,027	0	0,006
450 ng	0,903	0,025	0,179	0,022	0	0,000
500 ng	0,960	0,037	0,194	0,043	0	0,000

Tabelle 6: Übersicht der Optischen Dichten (OD) der verschiedenen rFimA-Konzentrationen. AK: Polyklonale Antikörper vom Hasen, PS: Präimmunserum vom Hasen, Blank: Leerwert, MW: Mittelwert, SD: Standardabweichung.

5.3 Auswertung der Testung der aufgereinigten monoklonalen IgG-Antikörper der Maus mit $c=0,05$ mg/ml

Mit dem ELISA-Protokoll wurden aufgereinigte monoklonale IgG-Antikörper der Maus gegen FimA von *P. gingivalis* W83 mit der Ausgangskonzentration 0,05 mg/ml getestet (siehe 4.2.5). Es erfolgte einer Verdünnung der Suspensionen in die Verdünnungsstufen unverdünnt, 1:25 und 1:50. Die monoklonalen IgG-Antikörper des Klons mit der Nummer 55 wiesen die höchste Reaktivität und Affinität zum rFimA auf, gefolgt vom Klon 189.

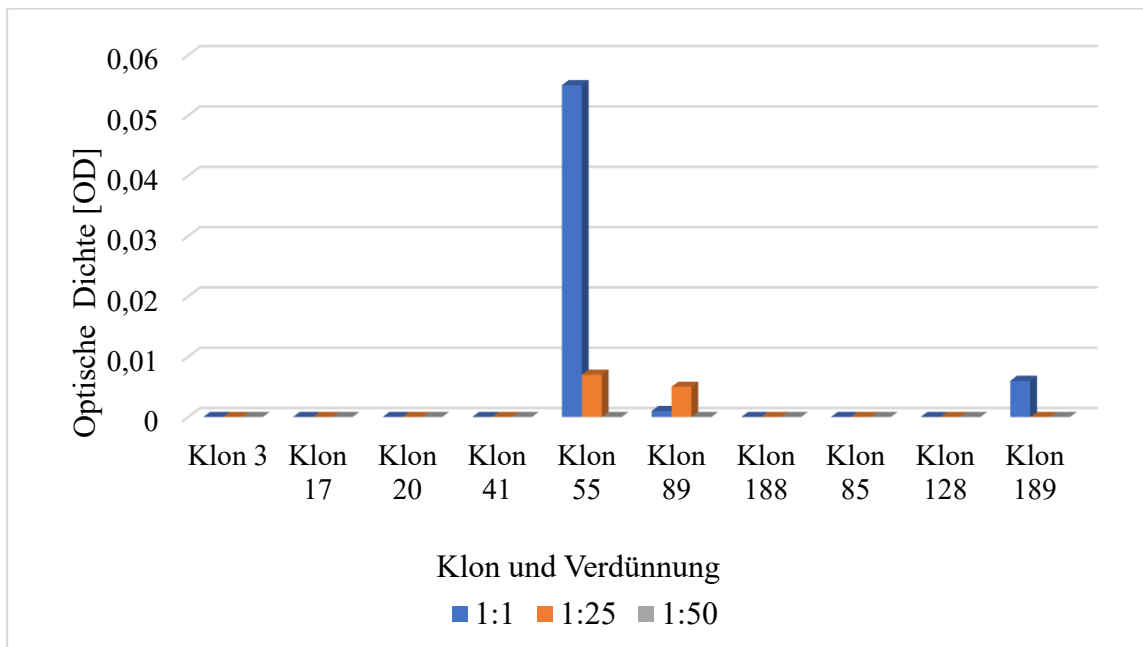


Abbildung 18: Auswertung der optischen Dichten der aufgereinigten monoklonalen Antikörper-Suspensionen der unterschiedlichen Klone der Maus mit den Ausgangskonzentrationen $c=0,05$ mg/ml. Der Mittelwert der OD der Blanks wurde von jedem Wert subtrahiert.

5.4 Auswertung der Testung der unverdünnten, aufgereinigten monoklonalen IgG-Antikörper der Maus

Mit dem ELISA-Protokoll (siehe 4.2.6) wurden die unverdünnten, aufgereinigten monoklonalen IgG-Antikörper-Suspensionen der unterschiedlichen Klone von der Maus gegen FimA von *P. gingivalis* W83 getestet. Die Auswertung zeigte, dass spezifische Bindungen nachgewiesen werden konnten. Die monoklonalen IgG-Antikörper, welche durch den Klon 55 hergestellt wurden, wiesen die höchste Reaktivität und Affinität zum rFimA auf. Der Klon 189 wies die zweithöchste Menge an gebundenen monoklonalen IgG-Antikörpern der Maus auf.

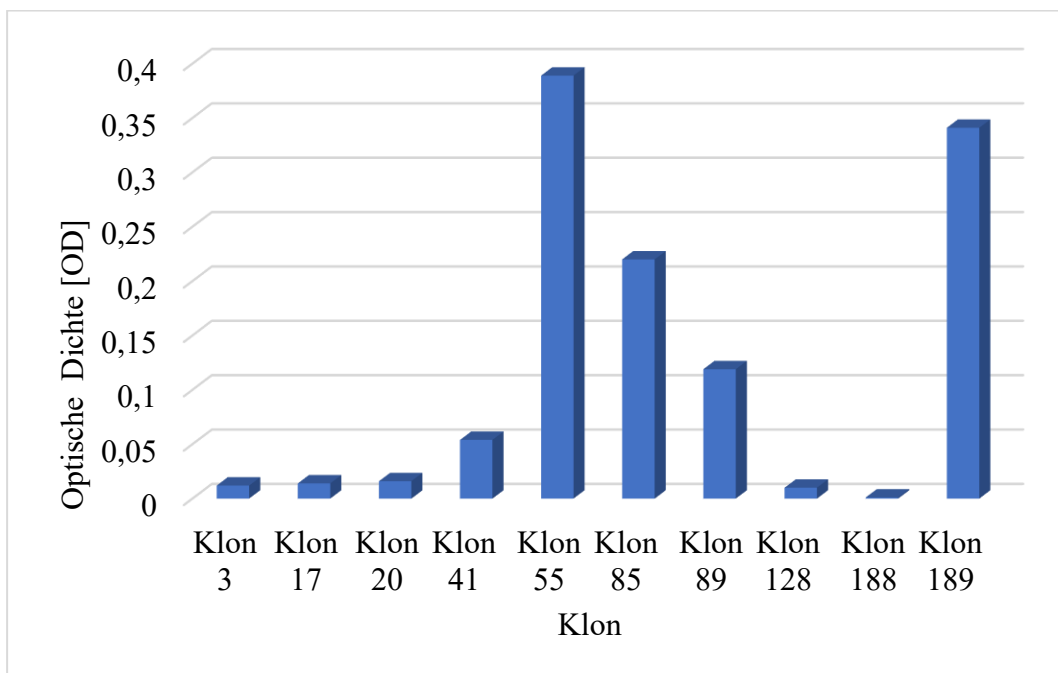


Abbildung 19: Auswertung der optischen Dichten der unverdünnten, aufgereinigten monoklonalen IgG-Antikörper der unterschiedlichen Klone von der Maus. Der Mittelwert der OD der Blanks wurde von jedem Wert subtrahiert.

5.5 Demographische Daten des Patientenkollektivs

Es wurden 13 Seren von oral gesunden Probanden, 26 Seren von Patienten mit Parodontitis sowie 15 Seren von Parodontitispatienten mit Diabetes mellitus Typ 2

getestet. Das mittlere Alter der oral gesunden Kontrollen betrug 44 Jahre und 51 Jahre für die Parodontitispatienten. Der Mittelwert für das Alter in der Gruppe der Parodontitispatienten mit Diabetes mellitus Typ 2 ergab 47 Jahre. Die demographischen Daten des Patientenkollektivs sind in Tabelle Nr. 7 dargestellt.

Kohorte	Anzahl	weiblich	männlich	MWAlter [Jahre]	SD Alter [Jahre]	Varianz Alter [Jahre ²]
C	13	5	8	44	9	86,3
P	26	14	12	51	12	164,8
P+D	15	7	8	47	9	93,6

Tabelle 7: Demographische Daten des Patientenkollektivs. C: oral gesunde Probanden; P: Parodontitispatienten; P+D: Patienten mit Parodontitis und Diabetes mellitus Typ 2, MW: Mittelwert, SD: Standardabweichung.

Die stochastische Unabhängigkeit und Vergleichbarkeit der Testgruppen zueinander wurde für das Alter mit der einfaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA) überprüft. Die Voraussetzungen für die ANOVA, dass eine Normalverteilung der Parameter sowie eine Varianzhomogenität vorliegen müssen, wurden mit dem Shapiro-Wilk-Test (gesunde Kontrollen $p=0,185$; Parodontitispatienten $p=0,838$; Parodontitispatienten mit Diabetes mellitus Typ 2 $p=0,219$) und mit dem Levene-Test ($p=0,281$) bestätigt. Die ANOVA ergab, bezogen auf das Alter der Testgruppen, keinen Unterschied zwischen den Kohorten ($p=0,215$).

Zusätzlich wurde die stochastische Vergleichbarkeit der drei Studiengruppen in Bezug auf das Geschlecht (männlich, weiblich) mit dem Chi-Quadrat-Unabhängigkeits-Test überprüft. Der Test ergab, dass die Parameter unabhängig voneinander sind ($p=0,657$).

5.6 Auswertung der ELISA-Tests zum Nachweis von humanen IgG-Antikörpern gegen *P. gingivalis* FimA

Die Patientenseren wurden mit dem entwickelten ELISA auf IgG-Antikörper gegen FimA von *P. gingivalis* W83 getestet. Die ausgewerteten optischen Dichten zeigten, dass die Mediane der IgG-Titer der oral gesunden Probanden bei einer Verdünnung von 1:200, bei den Parodontitispatienten bei 1:800 und bei den Probanden mit Parodontitis und Diabetes mellitus Typ 2 bei 1:3200 lagen. Die am häufigsten vorkommenden IgG-Titer bei den oral gesunden Probanden lagen bei einer Verdünnung von 1:200 (30,77 %) sowie von 1:400 (30,77 %). Die Parodontitispatienten wiesen den am häufigsten vorkommenden Titer bei einer Verdünnung von 1:1600 (26,92 %) und die Patienten mit Parodontitis und Diabetes mellitus Typ 2 bei einer Verdünnung von 1:3200 (53,33 %) auf.

Deskriptive Statistik: IgG-Titer			
Diagnose	C	P	P+D
Anzahl	13	26	15
Modus	1:200; 1:400	1:1600	1:3200
Median	1:200	1:800	1:3200
Shapiro-Wilk	0,848	0,825	0,762
P-Wert Shapiro-Wilk	0,027	< 0,001	0,001

Tabelle 8: Deskriptive Statistik der IgG-Titer der Kohorten. C: oral gesunde Probanden; P: Parodontitispatienten; P+D: Patienten mit Parodontitis und Diabetes mellitus Typ 2.

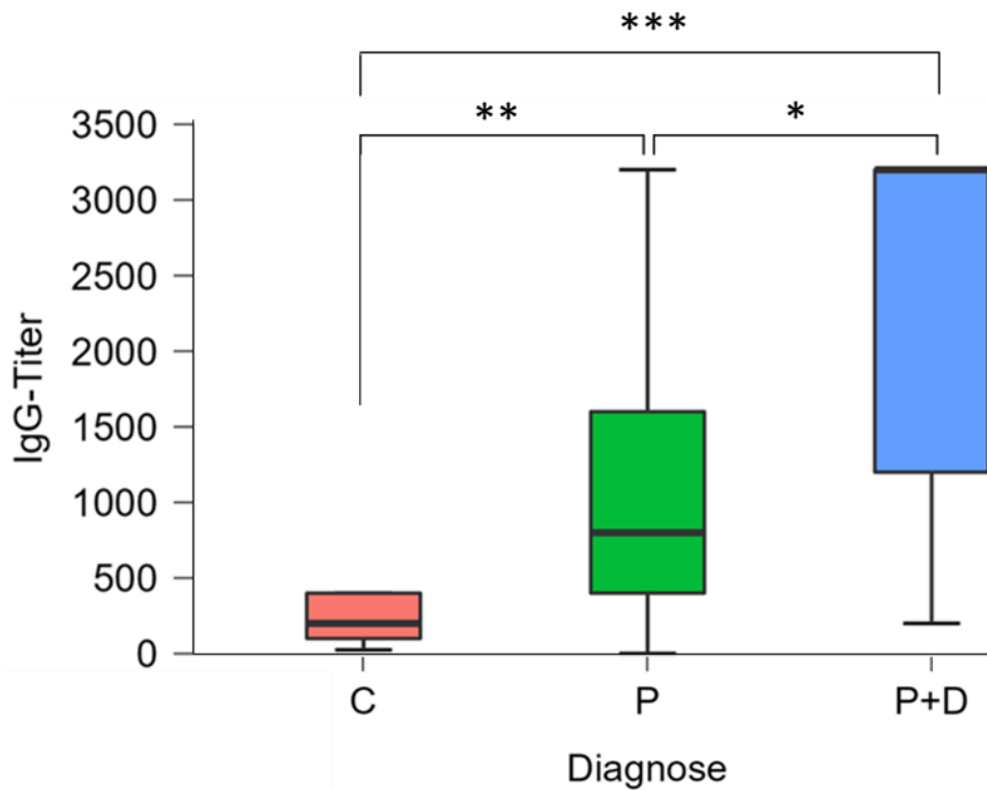


Abbildung 20: Boxplots für die IgG-Titer der einzelnen Studienkohorten. X-Achse: Diagnose C: oral gesunde Probanden; P: Parodontitispatienten; P+D: Patienten mit Parodontitis und Diabetes mellitus Typ 2. Y-Achse: IgG-Titer $f(x)=1: y$. Kruskal-Wallis-/ Post-hoc-Test nach Dunn mit Korrekturen nach Bonferroni-Holm * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Dazu kommt, dass alle 13 getesteten oral gesunden Probanden sowie alle 15 Patienten mit Parodontitis und Diabetes mellitus Typ 2 einen Titer aufwiesen. In der Gruppe der Probanden mit Parodontitis zeigte eine Person keinen IgG-Titer (siehe Tabelle 9). Die Gruppe der oral gesunden Probanden zeigten einen maximalen Titer bei der Verdünnung 1:400.

		IgG-Titer									
Diagnose		Kein Titer	1:25	1:50	1:100	1:200	1:400	1:800	1:1600	1:3200	Gesamt
C	Anzahl	0	1	1	3	4	4	0	0	0	13
	% in Zeile	0	7,69	7,69	23,08	30,77	30,77	0	0	0	100
P	Anzahl	1	0	1	0	4	6	5	7	2	26
	% in Zeile	3,85	0	3,85	0	15,39	23,08	19,23	26,92	7,69	100
P+D	Anzahl	0	0	0	0	2	1	1	3	8	15
	% in Zeile	0	0	0	0	13,33	6,67	6,67	20	53,33	100

Tabelle 9: Absolute und relative Häufigkeitsverteilung der IgG-Titer. C: oral gesunde Probanden; P: Parodontitispatienten; P+D: Probanden mit Parodontitis und Diabetes mellitus Typ 2.

Der Shapiro-Wilk Test ergab, dass die Daten nicht normalverteilt sind. Der Kruskal-Wallis Test mit anschließendem Post-hoc-Test nach Dunn mit der Korrektur nach Boferroni-Holm zeigten, dass es einen signifikanten Unterschied zwischen den IgG-Titern der oral gesunden Probanden und den Parodontitispatienten ($p=0,008$) sowie den oral gesunden Probanden und den Patienten mit Parodontitis und Diabetes mellitus Typ 2 ($p<0,001$) gab. Außerdem wurde eine statistische Signifikanz im Vergleich der IgG-Titer der Parodontitispatienten mit den Patienten mit Parodontitis und Diabetes mellitus Typ 2 ($p=0,02$) nachgewiesen.

Kruskal-Wallis-Test				Levene-Test
Faktor	Statistik	df	p	p
Diagnose	20.951	2	< 0,001***	<0,001***

Tabelle 10: Kruskal-Wallis-Test und Levene-Test der IgG-Titer in Bezug auf die Kohorten: C: oral gesunde Probanden; P: Parodontitispatienten; P+D: Patienten mit Parodontitis und Diabetes mellitus Typ 2.

Post-hoc-Test nach Dunn mit Korrektur nach Bonferroni-Holm	
Vergleich	p
C - P	0,008 **
C - P+D	< 0,001 ***
P - P+D	0,02 *

Tabelle 11: Post-hoc-Test nach Dunn mit Korrekturen nach Bonferroni-Holm der IgG-Titer in Bezug auf die Kohorten: C: oral gesunde Probanden; P: Parodontitispatienten; P+D: Patienten mit Parodontitis und Diabetes mellitus Typ 2. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

5.7 Auswertung der ELISA-Tests zum Nachweis von humanen IgM-Antikörper gegen *P. gingivalis* FimA

Der ELISA-Test zur Detektion von IgM-Antikörper gegen FimA von *P. gingivalis* W83 ergab einen Median für den IgM-Titer der oral gesunden Probanden von einer Verdünnung von 1:100 und für die Parodontitispatienten lag der Median bei einer Verdünnung von 1:200. Bei den Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 und Parodontitis lag der Median bei einer Verdünnung von 1:200. Der Titer, der in der Gruppe der oral gesunden Probanden am häufigsten vorkam, war die Verdünnung 1:200 (30,77 %) und in der Gruppe der Parodontitispatienten 1:50 (26,92 %) sowie 1:400 (26,92 %). Der Modus für die Gruppe der Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 und Parodontitis lag bei 1:200 (46,67 %). Die höchste Verdünnung, bei der ein Nachweis der IgM-Antikörper erreicht wurde, lag bei den oral gesunden Probanden und bei den Patienten mit Parodontitis und Diabetes mellitus Typ 2 bei 1:400. Die höchste Verdünnung wurde in der Gruppe der Parodontitispatienten bei 1:800 nachgewiesen.

Deskriptive Statistik: IgM-Titer			
Diagnose	C	P	P+D
Anzahl	13	26	15
Modus	1:200	1:50; 1:400	1:200
Median	1:100	1:200	1:200

Deskriptive Statistik: IgM-Titer			
Diagnose	C	P	P+D
Shapiro-Wilk	0,862	0,803	0,819
P-Wert Shapiro-Wilk	0,041	< 0,001	0,007

Tabelle 12: Deskriptive Statistik der IgM-Titer der Kohorten. C: oral gesunde Probanden; P: Parodontitispatienten; P+D: Patienten mit Parodontitis und Diabetes mellitus Typ 2.

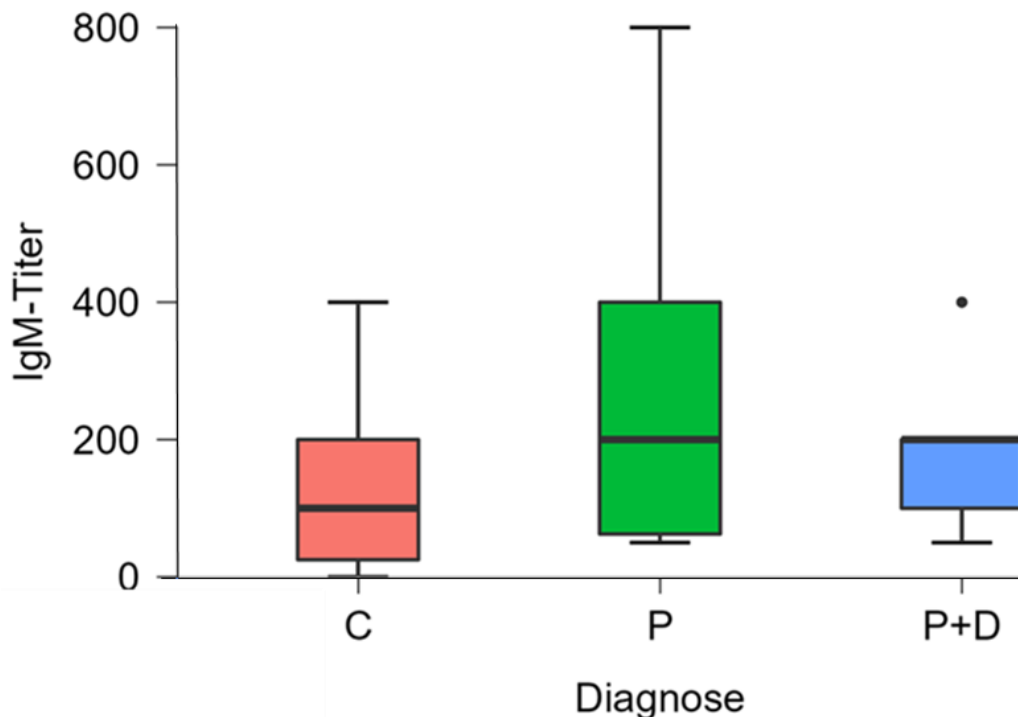


Abbildung 22: Boxplots für die IgM-Titer der einzelnen Studienkohorten. X-Achse: Diagnose C: oral gesunde Probanden; P: Parodontitispatienten; P+D: Patienten mit Parodontitis und Diabetes mellitus Typ 2. Y-Achse: IgM-Titer $f(x)=1: y$.

Des Weiteren wurden alle 26 Parodontitispatienten und 15 Parodontitispatienten mit Diabetes mellitus Typ 2 positiv auf IgM-Antikörper gegen *P. gingivalis* FimA getestet. In der Gruppe der oral gesunden Probanden wiesen zwei Probanden keine IgM-Antikörper auf (siehe Tabelle 13).

		IgM-Titer									
Diagnose		Kein Titer	1:25	1:50	1:100	1:200	1:400	1:800	1:1600	1:3200	Gesamt
C	Anzahl	2	2	1	2	4	2	0	0	0	13
	% in Zeile	15,39	15,39	7,69	15,39	30,77	15,39	0	0	0	100
P	Anzahl	0	0	7	5	6	7	1	0	0	26
	% in Zeile	0	0	26,92	19,23	23,08	26,92	3,85	0	0	100
P+D	Anzahl	0	0	1	4	7	3	0	0	0	15
	% in Zeile	0	0	6,67	26,67	46,67	20	0	0	0	100

Tabelle 13: Absolute und relative Häufigkeitsverteilung der IgM-Titer. C: oral gesunde Probanden; P: Parodontitispatienten; P+D: Patienten mit Parodontitis und Diabetes mellitus Typ 2.

Bei den Daten wurde, nach Testung mit dem Shapiro-Wilk-Test, von keiner Normalverteilung ausgegangen. Der Kruskal-Wallis-Test zeigte keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den IgM-Titern der oral gesunden Probanden, der Parodontitispatienten und der Probanden mit Parodontitis und Diabetes mellitus Typ 2.

Kruskal-Wallis-Test			
Faktor	Statistik	df	p
Diagnose	2,504	2	0,286

Tabelle 14: Kruskal-Wallis-Test der IgM-Titer der Studiengruppen (Diagnose): C: oral gesunde Probanden; P: Parodontitispatienten; P+D: Patienten mit Parodontitis und Diabetes mellitus Typ 2.

5.8 Auswertung der Negativproben

Die Negativproben bzw. Blanks geben die Hintergrundsignale an, welche durch die Zugabe aller Bestandteile des ELISA-Protokolls außer dem Testserum entstehen. Der Mittelwert des Hintergrundrauschens lag bei der optischen Dichte von 0,052 mit einer

Standardabweichung von 0,021. Der Shapiro-Wilk-Test ergab keine Normalverteilung der Daten.

Deskriptive Statistik: Optische Dichten der Negativproben								
N	MW	SD	Varianz	Median	Modus	Max	Min	P-Wert Shapiro-Wilk
108	0,052	0,021	0,00044902	0,046	0,043	0,12	0,008	<0,001

Tabelle 15: Deskriptive Statistik der optischen Dichten der Negativproben. N: Anzahl, MW: Mittelwert, SD: Standardabweichung, Max.: Maximum, Min: Minimum.

5.9 Intra-Assay-Varianz

Die Intra-Assay-Varianz wird durch den Variationskoeffizienten (VK) beschrieben. Dieser wird durch die Division der Standardabweichung mit dem Mittelwert berechnet. Sie ist ein Messwert, der für die Einschätzung der Reproduzierbarkeit sowie der Messstreuung innerhalb einer Assay-Platte bestimmt wird. Der Variationskoeffizient wurde durch den ELISA-Test, bei dem innerhalb einer Mikrotiterplatte fünf verschiedene Patientenseren doppelt bestimmt wurden, ermittelt. Jede Serumprobe wurde 1:25, 1:50, 1:100, 1:200, 1:400, 1:800, 1:1600 und 1:3200 verdünnt pro Well aufgetragen. Die Mittelwerte, die Standardabweichungen und die Variationskoeffizienten wurden berechnet. Im Anschluss wurde der Mittelwert der berechneten Variationskoeffizienten bestimmt. Die Intra-Assay-Varianz ergab für den entwickelten ELISA-Test 4,66 % (siehe Tabelle 16).

Verdünnung	VK Probe 1 [%]	VK Probe 2 [%]	VK Probe 3 [%]	VK Probe 4 [%]	VK Probe 5 [%]
1:25	1,26	8,07	0,34	2,32	0,41
1:50	0,40	1,42	0,67	8,94	4,62
1:100	3,47	8,62	7,25	1,54	1,31
1:200	1,24	13,04	14,88	3,45	10,65
1:400	12,15	2,20	5,85	4,35	3,53
1:800	11,93	0,62	4,66	0,00	3,26

1:1600	10,59	7,41	2,99	1,72	2,16
1:3200	11,41	5,80	0,83	0,00	0,99
Gesamt-VK [%]	4,66				

Tabelle 16: Auswertung der Variationskoeffizienten (VK) für die Intra-Assay-Varianz der fünf doppelt bestimmten Patientenseren innerhalb einer Mikrotiterplatte.

5.10 Inter-Assay-Varianz

Die Inter-Assay-Varianz gibt die Reproduzierbarkeit und Messstreuung innerhalb verschiedener Assays an, welche an unterschiedlichen Tagen erfasst wurden. Sie wird durch den Variationskoeffizienten beschrieben. Die Mittelwerte, die Standardabweichungen und die Variationskoeffizienten wurden von fünf verschiedenen Serumproben, welche an unterschiedlichen Tagen getestet wurden und an beiden Tagen doppelt bestimmt wurden, berechnet. Jede Serumprobe wurde 1:25, 1:50, 1:100, 1:200, 1:400, 1:800, 1:1600 und 1:3200 verdünnt pro Well aufgetragen. Im Anschluss wurde der Mittelwert der berechneten Variationskoeffizienten bestimmt. Die Inter-Assay-Varianz ergab für den entwickelten ELISA-Test 10,07 % (siehe Tabelle 17).

Verdünnung	VK Probe 1 [%]	VK Probe 2 [%]	VK Probe 3 [%]	VK Probe 4 [%]	VK Probe 5 [%]
1:25	6,77	12,38	8,40	8,97	13,56
1:50	5,83	4,97	9,64	9,02	16,33
1:100	2,39	6,68	6,66	5,86	16,67
1:200	14,22	12,10	14,03	3,76	21,76
1:400	4,73	8,84	11,08	12,61	19,69
1:800	3,32	6,94	13,06	8,48	13,41
1:1600	6,92	10,00	13,55	15,33	11,18
1:3200	12,03	11,74	0,41	9,01	10,62
Gesamt-VK [%]	10,07				

Tabelle 17: Auswertung der Variationskoeffizienten für die Inter-Assay-Varianz der fünf doppelt bestimmten Patientenseren. Die Messungen erfolgten an unterschiedlichen Tagen.

5.11 Auswertung: C-reaktives Protein (CRP)

Die Werte für das C-reaktive Protein wurden vom Institut für Labormedizin, Pathobiochemie, Molekulare Diagnostik der Justus-Liebig-Universität Gießen bestimmt. Der Shapiro-Wilk-Test zeigte keine Normalverteilung der Daten. Es wurde kein statistisch signifikanter Unterschied im Kruskal-Wallis-Test zwischen den Studiengruppen nachgewiesen.

Diagnose	Mittlerer CRP-Wert [mg/L]	SD [mg/L]	Median [mg/L]
C	1,153	1,167	0,785
P	3,22	4,375	0,66
P+D	5,771	5,915	2,3

Tabelle 18: Deskriptive Statistik der Werte des C-reaktiven Proteins in Bezug auf die Kohorten: C: oral gesunde Probanden; P: Parodontitispatienten; P+D: Patienten mit Parodontitis und Diabetes mellitus Typ 2, SD: Standardabweichung.

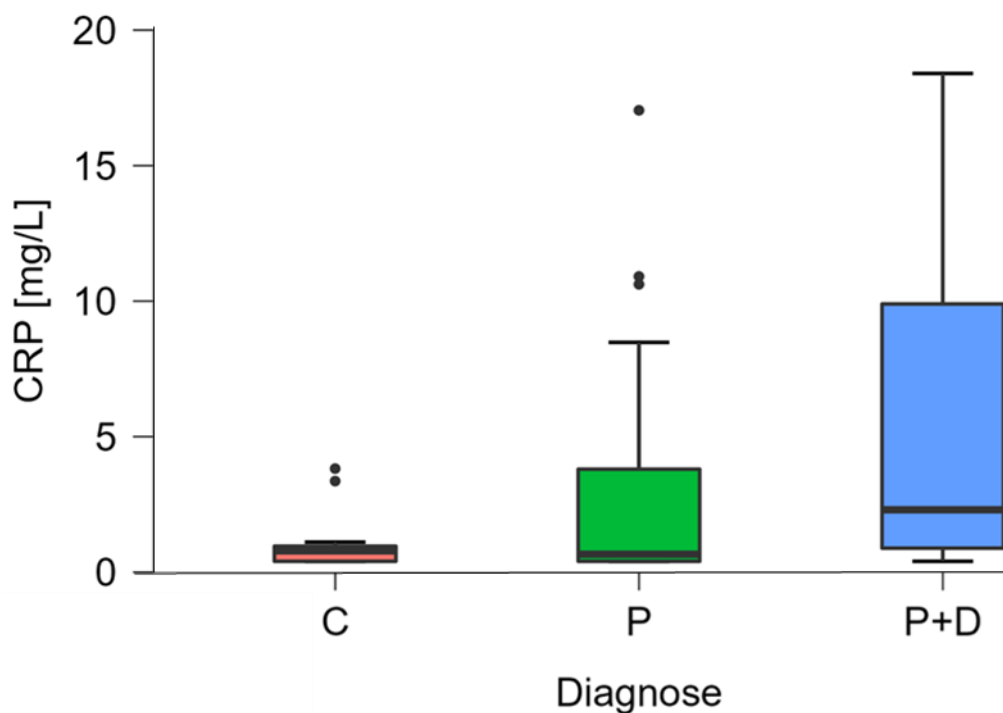


Abbildung 23: Boxplots für die CRP-Werte [mg/L] (Y-Achse) der einzelnen Studienkohorten auf der X-Achse: Diagnose C: oral gesunde Probanden; P: Parodontitispatienten; P+D: Patienten mit Parodontitis und Diabetes mellitus Typ 2.

Kruskal-Wallis-Test			
Faktor	Statistik	df	p
Diagnose	2,504	2	0,076

Tabelle 19: Kruskal-Wallis-Test der CRP-Werte der Studiengruppen.

Post-hoc-Test nach Dunn	
Vergleich	p
C - P	0,56
C - P+D	0,037 *
P - P+D	0,064

Tabelle 20: Post-hoc-Test nach Dunn der CRP-Werte der Studiengruppen C: oral gesunde Probanden; P: Parodontitispatienten; P+D: Patienten mit Parodontitis und Diabetes mellitus Typ 2. * $p < 0,05$.

5.12 Bestimmung der Rangkorrelation nach Spearman

Durch die Bestimmung der Rangkorrelation nach Spearman wurden Zusammenhänge zwischen den Parametern CRP-Werte, IgG-Titer sowie IgM-Titer untersucht. Es wurde ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen den IgG-Titern und den IgM-Titern gefunden ($p < 0,01$). Der positive Zusammenhang zwischen den Parameter besaß mit einen Spearmans Rho von 0,421 eine mittlere Stärke.

Spearmans Korrelationen			
Vergleich		Spearmans Rho	p
IgG-Titer	CRP	0,158	0,263
IgG-Titer	IgM-Titer	0,421	0,002 **
CRP	IgM-Titer	-0,009	0,948

Tabelle 21: Übersicht der Rangkorrelation nach Spearman. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

6 Diskussion

Entwicklung des ELISAs

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es einen ELISA-Test zu entwickeln, der IgG- und IgM- Antikörper gegen FimA von *P. gingivalis* W83 detektiert.

Dafür wurde ein indirekter ELISA verwendet, da antikörperbasierte Nachweisverfahren etablierte Verfahren in den meisten Laboren darstellen. Der Vorteil des ELISAs ist, dass man mit seinem Testverfahren eine hohe Sensitivität sowie Spezifität erreichen kann.

Außerdem kann man mit ihm effiziente und simultane Tests durchführen, weswegen er in vielen Laboren zur Anwendung kommt. Die Nachteile des Testverfahrens sind, dass er durch die Anwendung multipler, verschiedener Lösungen sowie Arbeits- und Inkubationsschritte techniksensitiv sein kann. Dazu kommt, dass die Lagerung sowie der Transport der Bestandteile aufwendig sein kann (Sakamoto et al., 2018). Des Weiteren eignet sich besonders der indirekte ELISA durch die Fixierung des Antigens an der Mikrotiterplatte zum Nachweis antigenspezifischer Antikörper (Hornbeck, 2015), sodass er das Testverfahren der Wahl darstellte.

Die Auswahl der Mikrotiterplatte im 96-Well-Format ist für die Bindung des Antigens (rFimA) an die Oberfläche der Platte und somit für den Erfolg des Immunassays von Bedeutung. Die Adsorption des Festkörpers wird von dem Material der Platte sowie deren Eigenschaften beeinflusst (Luttmann, 2009). Die Wahl fiel auf die Nunc MaxiSorp™ 96-Well-ELISA-Mikrotiterplatten vom Hersteller Thermo Fisher Scientific Inc., da sie aus Polystyrol bestehen und eine hohe Bindungskapazität für Proteine aufweisen (Stevens et al., 1995). Außerdem wurde die Oberfläche speziell behandelt, sodass diese eine hohe Affinität zu gemischt hydrophilen und hydrophoben Domänen besitzt und somit die Adsorption des Antigens erleichtert.

Im nächsten Schritt erfolgte das Benetzen der Wells der Mikrotiterplatte mit dem rFimA von *P. gingivalis* W83. Es wurde der Genotyp *P. gingivalis* W83 zur Herstellung des rFimAs gewählt, da er in der Lage ist das FimA auf seiner Oberfläche auszubilden. Nicht alle genetischen Varianten des Bakteriums bilden diesen Virulenzfaktor aus, weswegen sie sich in ihrer Pathogenität voneinander unterscheiden. *P. gingivalis* W83

bildet das FimA vom Typ IV aus, welcher häufig bei Patientin mit Parodontitis festgestellt wird (Amano et al., 2000; Kugaji et al., 2020).

Des Weiteren ist es von Bedeutung, dass das hergestellte rFimA vor dem Einsatz im ELISA aufgereinigt und funktional klassifiziert wird. Groeger et al. zeigten in ihrer Studie, dass das rFimA als Virulenzfaktor in humanen Plattenepithelkarzinomzellen eine starke immunologische transkriptomische Reaktion auslöst (Groeger et al., 2022). Dazu kommt, dass durch die Herstellung von rFimA im Gram-positiven Bakterium *L. innocua*, eine Kontamination während der Proteinisolation mit Lipopolysacchariden verhindert werden konnte (Groeger et al., 2021). Dieser Prozess ist von Bedeutung um eine spezifische Bindung des gesuchten Antikörpers zum Antigen zu erreichen und unspezifische Bindungen zu vermeiden.

Die optimale Konzentration für die Adsorption des Antigens an die Mikrotiterplatten- Wells muss zuvor ermittelt werden. Zu niedrige Konzentrationen führen zu freien Bindungsstellen und zu einem erhöhten Hintergrundrauschen. Der Einsatz von zu hohen Konzentrationen kann zur Bildung von instabilen Multilayern führen, welche sich negativ auf das Read-out des ELISAs auswirken können (Butler, 2000; Crowther, 2001). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass eine Erhöhung von 25 ng rFimA pro Well auf 50 ng rFimA pro Well eine deutliche Erhöhung der optischen Dichte (Antiserum 1,7-fach, Präimmunsereum 1,3-fach) bewirkte. Eine erneute Verdopplung der Menge auf 100 ng rFimA pro Well bewirkte keine so starke Erhöhung der Extinktionswerte (Antiserum und Präimmunsereum 1,1-fach). Auch weitere Erhöhungen brachten keine relevante Erhöhung der optischen Dichten der getesteten Antiseren und Präimmunsereum. Die Extinktionswerte der Leerwerte waren bei allen Konzentrationen gering. Hinzu kommt, dass der Vergleich der Standardabweichungen bei 50 ng Antigen pro Well geringe Abweichungen von den Mittelwerten der Testseren zeigten. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde die Konzentration auf 50 ng rFimA pro Well festgelegt, da sie stabile Werte für das Read-out bei Einsatz einer geringen Proteinmenge zeigte.

Die Inkubationszeit kann ebenfalls einen Einfluss auf die Empfindlichkeit des Tests nehmen. Eine erhöhte Inkubationszeit bei einer niedrigen Temperatur kann die Empfindlichkeit steigern und eine partielle Denaturierung des Antigens verhindern,

welche einen Verlust des Epitops verursachen könnte (Deshpande, 1996). Die Antigen-Antikörper-Bindung beruht hauptsächlich auf hydrophoben Wechselwirkungen, weshalb das Material der Mikrotiterplatte einen höheren Stellenwert für diese Bindung als der pH-Wert des Puffers hat (Luttmann, 2009). Aufgrund dessen wurde das rFimA bei 4 °C für 16 Stunden in 100 mM HEPES-Puffer inkubiert.

Ein weiterer Einflussfaktor auf den ELISA hat das Hintergrundrauschen. Es entsteht durch unspezifische Bindungen von Molekülen an freie Bindungsstellen auf der Oberfläche der Wells. Diese können entstehen, wenn beispielsweise nicht genug Antigen bindet. Die Ursachen dafür können eine zu geringe Konzentration der Antigenlösung beim Beschichten der Wells sein, so dass die Bindungsstellen in den Wells nicht komplett besetzt werden können oder eine zu hohe Konzentration an Antigen, sodass sich die Moleküle sterisch behindern. Außerdem können freie Bindungsstellen durch zu starke Auswaschungen verursacht werden oder durch Verunreinigungen in den Wells (Crowther, 2001). Eine Methode, um dieses unerwünschte Signal zu reduzieren, ist einen Blockierungspuffer einzusetzen (Yoon et al., 2021). Dabei werden kleine Proteine eingesetzt, die sich in die freien Bindungsstellen in den Wells, welche nach der Inkubation mit dem Antigen noch vorhanden sein sollten, setzen und somit eine Adsorption des sekundären Antikörpers an die Wand verhindert.

Außerdem zeigten Studien, dass die Verwendung von Detergenzien (wie Tween-20) ohne Einsatz von Blockierungspuffern zu einer Reduzierung des Hintergrundrauschens und somit zu einer Reduzierung von unspezifischen Bindungen sowie zu einer Verbesserung des spezifischen Signals führen können (Mohammad & Esen, 1989). Eine weitere Möglichkeit zur Blockierung der freien Stellen in den Wells ist die Verwendung von tierischen Seren als Blockierungslösungen wie Bovines Serum Albumin oder Ziegenserum. Der Nachteil dieser Methode ist, dass die Bestandteile des tierischen Serums mit dem humanen Serum, dem sekundären Antikörper oder dem Antigen interferieren können und dass endogene Bestandteile zu Kontaminationen der Platte führen können (Fujii et al., 1989; Konstantinou, 2017). Aufgrund dessen fiel die Entscheidung gegen tierische Seren als Blockierungslösung. Die Verwendung von 0,1-1 prozentige Milchpulverlösung (non fat dry milk) stellt eine weitere verbreitete

Blockierungsmöglichkeit dar (Deshpande, 1996). In einer Studie aus der Charité in Berlin erwies sich eine 1% Milchpulverlösung als beste Blockierungslösung (Riemekasten et al., 2002). Sie besitzt den Vorteil, dass sie keine Kontaminationsmöglichkeit durch endogene Moleküle oder Immunglobuline beherbergt. Aus den genannten Gründen wurde zum Blockieren eine 1-prozentige Magermilchpulver-Lösung in PBS (pH 7,4) verwendet. Zusätzlich wurde nach jedem Inkubationsschritt eine dreifache Waschung der Wells durchgeführt, um nicht gebundene Moleküle zu entfernen. Dafür wurde 0,05 % Tween-20 in PBS (pH 7,4) verwendet. Sie besitzt den Vorteil, dass das Tween-20 eine zusätzliche Blockierungsfunktion besitzt, sollte sich die Proteine des Milchpulvers von der Polystyroloberfläche lösen.

Um die gesuchte Antigen-Antikörper-Verbindung nachweisen zu können, wurde ein sekundärer enzymkonjugierter Antikörper eingesetzt. Dieser Antikörper entsteht durch die Immunisierung eines Säugetieres mit einem primären Antikörper (z.B. humanes IgG, humanes IgM oder IgG vom Hasen oder der Maus), der detektiert werden soll. Dieser Immunisierungsprozess ist notwendig, da der Wirt des gebildeten primären Antikörpers keine weiteren Immunglobuline gegen körpereigene Moleküle bilden kann. Der Angriffspunkt der sekundären Antikörper ist die konstante Region des primären Immunglobulins. In der vorliegenden Arbeit wurde ein sekundärer Antikörper, der in der Ziege produziert sowie mit Meerrettichperoxidase (HRP) konjugiert wurde, eingesetzt. Das Substrat für unser Enzym war 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin. Die Kombination aus diesem Enzym und Substrat kommt häufig in ELISA-Tests erfolgreich zum Einsatz und hat sich in der Praxis bewährt (Kohl & Ascoli, 2017; Wang et al., 2022). Die Inkubationszeit von einer Stunde bei 37°C wurde gewählt, da eine Steigerung der Temperatur die Reaktivität der Moleküle steigert und dem System genug Zeit gegeben werden muss, dass es zu einer Bindung zwischen dem gesuchten und dem sekundären Antikörper kommen kann (Deshpande, 1996; Lin, 2015). Die Verdünnung des jeweiligen sekundären Antikörpers erfolgte nach Herstellerangaben.

Bei jedem Test werden Leerwerte, sogenannte Blanks oder Negativproben, erfasst. Dabei werden alle Bestandteile des ELISAs nach dem Protokoll hinzugegeben, außer dem Testserum. Sie sind wichtig um Extinktionswerte für das Hintergrundrauschen

sowie für den Cut-Off zu erhalten. Der Cut-Off gibt den Extinktionswert an, der überschritten werden muss, um einen positiven Nachweis der gesuchten IgG- oder IgM-Antikörper gegen FimA zu erhalten. Die gemessenen optischen Dichten der Blanks wiesen keine Normalverteilung auf (Shapiro Wilk Test, $p < 0,001$), weshalb der Cut-Off den dreifachen Mittelwert der Extinktionswerte der Negativproben bildete (Crowther, 2001). Im Anschluss wurde dieser ermittelte Wert von den gemessenen Extinktionswerten der anderen Proben subtrahiert, wodurch der Titer bestimmt werden konnte.

In der vorliegenden Arbeit wurde ein Serum mit polyklonalen Antikörpern eingesetzt, da diese den polyklonalen Antikörpern, die infolge einer adaptiven Immunantwort auf ein Antigen im Menschen gebildet werden, am ähnlichsten sind. Der Vorteil von polyklonalen Antikörpern ist, dass sie mehrere Epitope auf dem Antigen erkennen und diesen trotzdem binden können, sollte ein Epitop durch Fixierungsprozesse oder partieller Denaturierung verloren gegangen sein. Die Nachteile sind, dass bereits im Präimmenserum Antikörper durch vorherige ungewollte Immunprozesse enthalten sein können und zu Kreuzreaktionen führen können. Außerdem können Unterschiede in den produzierten Chargen vorhanden sein, denn die Herstellungsprozesse sind vom Immunsystem des Tieres abhängig. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass der entwickelte ELISA spezifische Bindungen zwischen dem rFimA und den IgG-Antikörpern im immunisierten Serum vom Hasen nachweist. Dazu kommt, dass im Präimmenserum die kreuzreagierenden Antikörper im Vergleich zu den funktionellen IgG-Antikörper im Testserum mit 9,86 % unter 10 Prozent liegen und somit im normalen Bereich (Luttmann, 2009).

Der Einsatz von monoklonalen Antikörpern erfordert eine höhere Sensitivität, denn diese Antikörper binden nur ein spezifisches Epitop des Antigens. Sollte dieses durch partielle Denaturierung zerstört worden sein, wird es zu keiner spezifischen Bindung kommen. Die Vorteile von monoklonalen Antikörpern sind, dass sie durch Hybridomazellen produziert werden, welche durch Klonierung eine große Menge an Antikörpern produzieren können (Stanker & Hnasko, 2015). Zusätzlich können Antikörper mit der gleichen Spezifität produziert werden, sodass eine gute Reproduzierbarkeit von Tests ermöglicht werden kann. Dazu kommt, dass die

Kreuzreaktivität vermindert wird, da monoklonalen Antikörper nur ein Epitop erkennen können. Andererseits kann dies auch bedingen, dass ein verloren gegangenes Epitop dazu führt, dass es zu keiner Antigen-Antikörper-Verbindung kommt und deswegen auch die Nachweisgrenze nicht erreicht wird (Nelson et al., 2000). Die vorliegende Arbeit zeigt, dass spezifische Bindungen zwischen den monoklonalen Antikörpern und dem rFimA erzielt werden konnten. Der Klon mit der Nummer 55 zeigte die höchste Reaktivität seiner Antikörper.

Testung der humanen Seren auf IgG-Antikörper gegen FimA

Die Ergebnisse der Serumtestung oral gesunder Probanden (n= 13), Parodontitispatienten (n= 26) und Patienten mit Parodontitis und Diabetes mellitus Typ 2 (n= 15) auf IgG-Antikörper gegen FimA von *P. gingivalis* W83 ergaben, dass sich die IgG-Titer der drei Testgruppen signifikant unterscheiden (Kruskal-Wallis-Test $p < 0,001$, Post-hoc-Tests nach Dunn mit Korrekturen nach Bonferroni-Holm). Die Studiengruppe der gesunden Probanden wiesen die niedrigsten IgG-Titer und somit die wenigsten IgG-Antikörper nach. Die Titer der Patienten mit Parodontitis waren im Vergleich zu den Titern der oral gesunden Probanden höher. Die gemessenen Werte zeigen, dass Parodontitispatienten durch eine Infektion mit *P. gingivalis* eine stärkere adaptive Immunantwort ausbilden, wodurch mehr IgG-Antikörper gegen einen der Virulenzfaktoren des Pathogens gebildet werden. Diese Beobachtung wird durch den chronischen Charakter einer Parodontitis-Erkrankung unterstützt, der multifaktoriell bedingt zu immer wiederkehrender Exazerbation der inflammatorischen Immunprozesse im Zahnhalteapparat führt (Meyle & Chapple, 2015; Page & Kornman, 1997). Vergleicht man nun diese Ergebnisse mit den Titern der Gruppe der Patienten, welche an Parodontitis und Diabetes mellitus Typ 2 erkrankt sind, so sieht man, dass in dieser Gruppe der höchste Titer mit der Verdünnung von 1:3200 am häufigsten nachgewiesen wurde. Daraus lässt sich schließen, dass eine Diabetes mellitus Typ 2 Erkrankung von Parodontitispatienten zu einer zusätzlich verstärkten inflammatorischen adaptiven Immunantwort führt. Dies hat zu Folge, dass die Anwesenheit von *P. gingivalis* zu einer erhöhten Bildung von IgG-Antikörper gegen seinen Virulenzfaktor FimA führt. Durch

den erhöhten Blutzuckerspiegel der Diabetes mellitus Patienten (getestete Seren: HbA1c-Wert von $\geq 8,5\%$) und die Entstehung der AGEs mit ihrer Bindung an die RAGEs werden Abwehrprozesse und Entzündungsreaktionen initiiert (Ramamamy et al., 2011). Diese Prozesse können zu Gewebe- und Organschäden führen und somit zu erhöhten systemischen Inflammationsvorgängen, welche eine Parodontitis zu verstärken scheinen. Bereits veröffentlichte Studien zeigen eine bidirektionale Beziehung zwischen einer Parodontitis und einem Diabetes mellitus Typ 2 und untermauern die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit (Oberti et al., 2019; Sanz et al., 2018).

Des Weiteren zeigen Studien, dass *P. gingivalis* bei oral gesunden Probanden nachgewiesen werden kann, jedoch weniger häufig als bei Patienten mit Parodontitis (Ingalagi et al., 2022). Ingalagi et al. wiesen bei 53 % der gesunden Probanden *P. gingivalis* mit einem PCR-Test nach. Mögliche Ursachen für die hohen Inzidenzen in der vorliegenden Arbeit könnten gemessene Kreuzreaktionen zu anderen Antikörpern oder Bestandteile des Serums sein, welche an das rFimA binden und so ein falsch-positives Ergebnis erzeugen könnten. Jedoch wurden die Kreuzreaktionen für das ELISA-Protokoll durch die Testung mit dem immunisierten Hasenserum und dessen Präimmenserum eruiert. Die gemessene Kreuzreaktion lag unter den akzeptablen 10 %, welche die Literatur angibt (siehe 5.1). Hinzu kommt, dass die Übertragung von *P. gingivalis* durch Familienmitglieder eine weitere Möglichkeit für die hohen Inzidenzen von Antikörper gegen das Bakterium darstellen könnten (Bennani et al., 2020). Eine weitere Möglichkeit ist, dass ein niedriger IgG-Titer eine mögliche Schutzfunktion gegen die Entstehung einer Parodontitis bieten könnte. Diese Theorien könnten erklären, warum die gesunden Probanden Antikörper gegen das Bakterium entwickeln, obwohl keine Parodontitis vorhanden ist. Dazu kommt, dass die geringere Stichprobenanzahl der gesunden Probanden (n= 13) ein weiterer Grund für das gemessene Ergebnis sein könnte. Dennoch ist aus dieser Arbeit ersichtlich, dass oral gesunde Probanden weniger IgG-Antikörper gegen FimA von *P. gingivalis* ausbilden als Parodontitispatienten und Patienten mit einer zusätzlichen Diabetes mellitus Typ 2 Erkrankung. Dies spricht für ein erhöhtes Entzündungsgeschehen, einhergehend mit einer starken adaptiven Immunantwort, welche besonders durch eine Diabetes mellitus Typ 2 Erkrankung verstärkt zu werden scheint.

In verschiedenen Studien wurden über 5000 Serumproben von Probanden evaluiert. Die Ergebnisse zeigten einen starken Zusammenhang zwischen hohen IgG-Antikörper-Titer gegen *P. gingivalis* und Diabetes mellitus sowie Parodontitis auf (Choi et al., 2014; Dye et al., 2009). Dye et al. verwendeten in ihren Versuchen einen Western Blot sowie Ganzzell-Antigene, welche im Gegensatz zum rFimA stark kreuzreagierende LPS-Moleküle beinhalten. Hinzu kommt, dass für den Western Blot im Vergleich zum ELISA eine Gelelektrophorese der Proteine notwendig ist und dass er eine geringere Empfindlichkeit als der ELISA aufweist. Die Studie von Sims et al. zeigte, dass der Median der Serum IgG-Titer gegen *P. gingivalis* in Patienten mit Diabetes mellitus Typ 1 und Parodontitis signifikant höher waren als bei Patienten ohne Diabetes mellitus Typ 1 (Sims et al., 2002; Sims et al., 2001). Eine mögliche Ursache dafür wurde in der Studie von Montevecchi et al. gezeigt. Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 und Parodontitis wiesen demnach einen höheren Anteil an pathogenen Bakterien wie *P. gingivalis* auf als Patienten mit Parodontitis und ohne Diabetes (Montevecchi et al., 2021). Die Gesamt-IgG-Anzahl in den Seren der Probanden mit Parodontitis, der Probanden mit Parodontitis und Diabetes mellitus Typ 2 sowie der oral gesunden Probanden wurde nicht bestimmt.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse der Testung auf IgG-Antikörper gegen FimA von *P. gingivalis*, dass dieser Virulenzfaktor eine klare humorale Immunantwort induziert. Dazu kommt, dass erhöhte IgG-Titer gegen FimA von *P. gingivalis* ein Indiz auf eine mögliche Parodontitis und Diabetes mellitus Typ 2 Erkrankung darstellen können. Weitere Studien sind notwendig, um die Mechanismen des Einflusses von *P. gingivalis* auf das menschlichen Immunsystem sowie auf die orale und systemische Gesundheit des Menschen besser zu verstehen.

Testung der humanen Seren auf IgM-Antikörper gegen FimA

Die Testung der Seren der oral gesunden Probanden (n= 13), Parodontitispatienten (n= 26) und Patienten mit Parodontitis und Diabetes mellitus Typ 2 (n= 15) auf IgM-Antikörper gegen FimA von *P. gingivalis* W83 zeigte eine leichte Tendenz von höheren IgM-Titern in den Gruppen der Patienten mit Parodontitis und mit Parodontitis und

Diabetes mellitus Typ 2 im Vergleich zu den oral gesunden Probanden. Dieser Unterschied wies im Kruskal-Wallis-Test keine statistische Signifikanz auf ($p= 0,286$). Eine mögliche Ursache könnte die Probandenanzahl darstellen, welche die statistische Signifikanz beeinflussen kann. Hinzu kommt, dass IgM-Antikörper als primäre Antikörper bei einer akuten adaptiven Immunantwort auf ein Antigen vom Wirt gebildet werden und die Parodontitis eine chronische Erkrankung ist, welche mit unterschiedlichen Stadien der Inflammation und Immunantwort des Wirtes einhergeht (Lamont et al., 2018). Des Weiteren beträgt die durchschnittliche Halbwertszeit von Immunglobulinen der Klasse IgM 5-10 Tage, sodass diese nur in einem begrenzten Zeitraum nach einer akuten Infektion nachweisbar sind (Sathe & Cusick, 2022). Ein weiterer Grund für die gemessenen Ergebnisse könnte sein, dass im Serum vor allem IgG Immunglobuline vorherrschen. Sie können in die Reaktion zwischen den IgM-Antikörper und dem rFimA interferieren, da IgG-Antikörper eine höhere Affinität zu ihren Antigenen besitzen und somit die Bindung der IgM-Antikörper verhindern können (Deshpande, 1996). Eine mögliche Lösung, um effizienter IgM-Antikörper detektieren zu können, wäre eine Aufreinigung der Seren vor dem ELISA, um nur IgM Immunglobuline zu erhalten oder die Mikrotiterplatte mit monoklonalen Antikörpern spezifisch für Anti-FimA-IgM-Antikörper zu beschichten.

Blanks

Die gemessenen optischen Dichten der Blanks der Tests lagen zwischen 0,12 und 0,008. Die mittlere optische Dichte lag bei 0,052 und die Standardabweichung der Extinktionswerte lag bei 0,021. Die große Spannweite der optischen Dichten der Blanks kann verschiedene Ursachen haben wie Pipettierfehler oder Verunreinigungen der Mikrotiterplatte, die zu höheren Extinktionswerten führen. Des Weiteren können auch ein zu starker Pipettierdruck, der zu Auswaschungen der gebundenen Moleküle auf der Platte führt oder Antikörper, welche an den Transport- oder Aufbewahrungsbehälter kleben bleiben, einen Unterschied in der gemessenen optischen Dichte verursachen. Diese Limitationen eines Tests können trotz größter Sorgfalt, wie durch die

Verwendung von speziellen Pipetten oder selbstklebenden Dichtungsfolien zum Schutz der Lösungen sowie Wells während der Inkubation, nicht vollständig beseitigt werden.

CRP und Antikörpertiter

Das C-reaktive Protein stellt einen Entzündungsmarker dar, welcher bei systemischen Inflammationen, Infektionen oder Gewebeschädigungen ansteigen kann (Sproston & Ashworth, 2018). Die Auswertung der CRP-Werte in den drei Studiengruppen zeigten, dass die Parodontitispatienten tendenziell höhere CRP-Werte zeigten als die oral gesunden Probanden. Die Patienten mit Parodontitis und Diabetes mellitus Typ 2 hatten im Mittel die höchsten CRP-Werte. Die maximalen CRP-Werte, die in den jeweiligen Gruppen erreicht wurden, waren bei den Parodontitis- und Diabetes mellitus Typ 2 Patienten am größten. Auch die Parodontitispatienten wiesen einen höheren Maximalwert als die oral gesunden Probanden auf.

Eine Meta-Analyse von Studien deutet auf erhöhte CRP-Werte bei Patienten mit Parodontitis hin (Machado et al., 2021). Entgegen der Erwartung waren die medianen CRP-Werte der oral gesunden Probanden höher als bei den Parodontitispatienten. Die ausgewerteten Unterschiede in den drei Studiengruppen wiesen keine statistische Signifikanz auf (Kruskal-Wallis-Test: $p=0,076$). Durch den Post-hoc-Test nach Dunn konnte eine statistische Signifikanz zwischen den CRP-Werten der oral gesunden Probanden und den Patienten mit Parodontitis und Diabetes mellitus Typ 2 nachgewiesen werden ($p=0,037$). Der Vergleich der CRP-Werte der Parodontitispatienten mit denen der Parodontitispatienten mit Diabetes mellitus Typ 2 ergab eine geringe Abweichung vom gewählten Signifikanzniveau von 5% ($p=0,064$). Diese statistisch geringen Abweichungen vom gewählten Signifikanzniveau können durch die geringere Probandenanzahl bedingt sein. Außerdem können systemische Entzündungsprozesse, welche oral nicht ersichtlich waren oder nicht diagnostiziert wurden, bei den oral gesunden Probanden zu erhöhten CRP-Werten führen und somit das Ergebnis beeinflussen. Auch externe Auswertungsfehler oder Transport- und Lagerungsschäden der Serumproben sind, trotz Einhaltung aller Vorsichtsmaßnahmen, nicht komplett auszuschließen.

Der Vergleich der Rangkorrelationen nach Spearman zeigte eine statistisch signifikante Korrelation ($p= 0,002$) zwischen den IgM- und IgG-Titern. Mit einem Spearmans Rho von 0,421 konnte eine mittlere, positive Korrelation zwischen den beiden Parametern gezeigt werden. Dies lässt sich daraus erklären, dass IgG-Antikörper durch einen Klassenswitch der B-Lymphozyten gebildet werden, welche primär IgM-Antikörpern sezernieren (Sathe & Cusick, 2022). Infolge dessen entstehen beim bestehenden Kontakt mit einem Antigen zuerst IgM-Immunglobuline und im Anschluss IgG-Antikörper. Da jedoch die IgM-Antikörper nur nach einer akuten Immunantwort in einem begrenzten Zeitraum nachweisbar sind, kann es dazu kommen, dass man diese nur in einem geringeren Umfang nachweisen kann. Des Weiteren wurde keine statistisch signifikante Korrelation zwischen den IgG-Titern oder den IgM-Titern gegen *P. gingivalis* FimA und den CRP-Werten nachgewiesen. Ähnliche Ergebnisse zeigte die Studie von Miyashita und Kollegen. Sie untersuchten einen Zusammenhang zwischen den Antikörpertitern gegen *P. gingivalis* und den CRP-Werten. Es wurden 49 Parodontitispatienten im Vergleich zu 40 oral gesunden Probanden getestet. Ihre Ergebnisse zeigten erhöhte CRP-Werte bei den Probanden mit Parodontitis, jedoch wurde keine statistisch signifikante Korrelation nachgewiesen (Miyashita et al., 2012). Der Widerspruch in den fehlenden statistischen Signifikanzen zu den bereits erwähnten Ergebnissen der Meta-Analyse von Machado et al. kann trotz gleicher Tendenzen möglicherweise an der niedrigeren Probandenanzahl liegen.

Schlussfolgerungen

Zusammenfassend lässt sich schlussfolgern, dass erhöhte Serum IgG-Titer gegen FimA von *P. gingivalis* W83 auf eine Parodontitis und Diabetes mellitus Typ 2 hinweisen, besonders bei nachgewiesenen Titern mit einer Verdünnung ab 1:800 und höher. Ein gemessener Titer ab 1:3200 liefert ein Indiz, dass neben einer Parodontitis eine mögliche Diabetes mellitus Typ 2 Erkrankung besteht. Ein Screening des Serums von Patienten vor beispielsweise invasiven chirurgischen Eingriffen kann anhand des IgG-Titers auf eine behandlungsbedürftige Parodontitis oder einen unentdeckten Diabetes mellitus Typ 2 hinweisen. Dieser Befund kann die Notwendigkeit einer lebenswichtigen

Vorbehandlung vor Operationen, wie beispielsweise einem Herzklappenersatz, aufzeigen und damit zu ihrem Erfolg beitragen. Studien belegen, dass *P. gingivalis* an einer Reihe von Erkrankungen beteiligt sein könnte, wie kardiovaskulären Erkrankungen, Diabetes mellitus Typ 2, Frühgeburten von Säuglingen, rheumatoider Arthritis, entzündlichen Darmerkrankungen, Alzheimer Demenz und nichtalkoholischen Fettlebererkrankungen (Hajishengallis & Chavakis, 2021). Hinzu kommt, dass die Anzahl an Patienten, welche an Diabetes mellitus erkranken stetig steigt und Studien gezeigt haben, dass die Dunkelziffer der Betroffenen, welche nicht diagnostiziert wurden, möglicherweise sehr hoch ist (Ogurtsova et al., 2022). Aufgrund dessen spielt die Früherkennung und Behandlung einer Parodontitis und eines Diabetes mellitus eine entscheidende Rolle für die Gesundheit der Weltbevölkerung.

Die vorliegende Arbeit hat gezeigt, dass ein ELISA gegen Anti-FimA-Antikörper von *P. gingivalis* W83 entwickelt werden konnte, der mit einer Intra-Assay-Varianz von unter 5 % und einer Inter-Assay-Varianz von 10 % unterhalb der geforderten 15 % aus der Literatur liegt und damit zuverlässige sowie reproduzierbare Ergebnisse liefert (Karnes et al., 1991). Hinzu kommt, dass gezeigt werden konnte, dass das hergestellte rFimA ein stabiles und zuverlässiges Antigen ist, welches für weitere Forschungsarbeiten zur Verfügung steht. Weitere Studien mit größeren Probandenzahlen werden zukünftig das Ergebnis statistisch stärker untermauern können. Außerdem werden künftige wissenschaftliche Arbeiten pathophysiologische Hinweise auf Zusammenhänge zwischen Antikörpertitern, Parodontitis und Diabetes mellitus liefern. Aktuelle Studien zeigen, dass erhöhte IgG-Titer gegen *P. gingivalis* im Zusammenhang mit einer rheumatoiden Arthritis stehen könnten (Bender et al., 2017; Kobayashi et al., 2022). Der entwickelte Test könnte für weitergehende Studien über Antikörpertiter in vielen Bereichen eingesetzt werden.

7 Zusammenfassung

Die Parodontitis ist eine chronisch entzündliche Erkrankung, die alle Bevölkerungsschichten und alle Altersgruppen betrifft (Dr. Constanze Cholmakow-Bodechtel, 2014). Hajishengallis et al. entwickelten die Keystone-Pathogen-Theorie, die das Bakterium *P. gingivalis* als möglichen Hauptverursacher der Parodontitis darstellt und dieses Pathogen somit in den Vordergrund für mögliche neue Behandlungsansätze stellt (Hajishengallis et al., 2012). Weitere Studien zeigen eine bidirektionale Beziehung zwischen einer Parodontitis und einem Diabetes mellitus Typ 2, deren Inzidenzen in den folgenden Jahren ebenfalls stetig stiegen (Oberti et al., 2019; Sanz et al., 2018).

Aktuelle Studien deuten auf Zusammenhänge zwischen erhöhten Antikörpertitern gegen *P. gingivalis* und Parodontitis sowie Diabetes mellitus hin (Choi et al., 2014; Dye et al., 2009). Es sind jedoch weitere Studien nötig, um den pathophysiologischen Zusammenhang aufdecken zu können. Des Weiteren gibt es bisher keinen laborchemischen Test, der ein Screening auf eine bestehende Parodontitis und einen Diabetes mellitus Typ 2 ermöglicht.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es mit Hilfe eines rekombinanten FimA Proteins, das aus FimA von *P. gingivalis* W83 entstanden und welches für eine Methode zur Quantifizierung von löslichen Substanzen geeignet ist, einen Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) zu entwickeln. Mit diesem ELISA wurde das Serum von Probanden mit Parodontitis (n= 26), Probanden mit Parodontitis und Diabetes mellitus Typ 2 (n= 15) sowie oral gesunden Probanden (n= 13) auf Antikörpertiter der Klassen IgG und IgM gegen FimA von *P. gingivalis* W83 untersucht.

Die Ergebnisse zeigten einen statistisch signifikanten Unterschied ($p < 0,001$) zwischen den IgG-Titern der drei Studiengruppen. Die Patienten mit Parodontitis und Diabetes mellitus Typ 2 wiesen die höchsten IgG-Titer und somit die höchsten IgG-Level auf, gefolgt von den Parodontitispatienten und den oral gesunden Probanden.

Zusammenfassend zeigt diese Studie, dass ein verlässlicher und reproduzierbarer ELISA zur Detektion von Antikörper gegen *P. gingivalis* FimA etabliert werden konnte. Hinzu kommt, dass eine Screening-Methode entwickelt werden konnte, welche anhand

der IgG-Antikörpertiter gegen *P. gingivalis* FimA Hinweise auf eine vorliegende Parodontitis und einen Diabetes mellitus Typ 2 liefern kann.

Summary

Periodontitis is a chronic inflammatory disease that affects all population and age groups (Dr. Constanze Cholmakow-Bodechtel, 2014). Hajishengallis et al. developed the “Keystone Pathogen Theory”, which proposes the bacterium *P. gingivalis* as a possible major causative agent of periodontitis, thus bringing this pathogen to the attention of research aiming for potential new treatment approaches (Hajishengallis et al., 2012). Studies show a bidirectional relationship between periodontitis and type 2 diabetes mellitus, both with steadily increasing incidences in the future (Oberti et al., 2019; Sanz et al., 2018).

Previously published studies suggest associations between high antibody titers to *P. gingivalis* and periodontitis and diabetes mellitus (Choi et al., 2014; Dye et al., 2009). However, further studies are needed to determine the pathophysiologic relationship between them. Furthermore, to this date, there is no laboratory test available that enables screening for existing periodontitis and type 2 diabetes mellitus.

The aim of the present study was to develop an Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) using a recombinant FimA protein derived from FimA of *P. gingivalis* W83, which is suitable for quantification of soluble substances. The developed ELISA was used to analyze the serum of subjects with periodontitis (n= 26), patients with periodontitis and type 2 diabetes mellitus (n= 15), and orally healthy individuals (n= 13) for IgG- and IgM-antibody titers against FimA of *P. gingivalis* W83.

The results indicated a statistically significant difference ($p < 0.001$) between the IgG titers of the three study groups. The patients with periodontitis and type 2 diabetes mellitus showed the highest IgG titers and thus the highest level of IgG antibodies, followed by the periodontitis patients and the orally healthy subjects. In conclusion, this study shows that a reliable and reproducible ELISA for the detection of antibodies against FimA from *P. gingivalis* W83 was established. In addition, a screening method has been developed, which can indicate that periodontitis and type 2 diabetes mellitus are existent based on IgG antibody titers against *P. gingivalis* FimA.

8 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ABTS	2,2'-Azinino-di(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure)
Antigen	Antibody-generator
BGG	Bovine Gammaglobuline
BSA	Bovines Serumalbumin
CD14	Cluster of differentiation 14
CRP	C-reaktives Protein
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
Etc.	Et cetera
Fab Fragment	fragment antigen binding region
Fc Fragment	fragment constant
FPLC	Fast protein liquid chromatography (Flüssigkeitschromatographie)
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HRP	Horseradish peroxidase (Meerrettichperoxidase)
H ₂ SO ₄	Schwefelsäure
ICAM-1	Intercellular adhesion molecule-1
IDZ	Institut der Deutschen Zahnärzte
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
kDa	Kilo-Dalton
kg	KiloGramm
LPS	Lipopolysaccharide
mAK	monoklonale Antikörper
MALDI-TOF	Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation
MHC	Haupt-Histokompatibilitäts-Komplex
M	Mol

mM	Millimol
m ²	Quadratmeter
MP	Magermilchpulver
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer
NF-κB	Nuklearfaktor-κB
ng	NanoGramm
nm	Nanometer
Nr.	Nummer
OD	Optische Dichte
ONPG	o-Nitrophenyl-β-D-galactopyranosid
OPD	o-Phenylendiamin-hydrochlorid
<i>P. gingivalis</i>	<i>Porphyromonas gingivalis</i>
PBS	Phosphate buffered saline (Phosphatgepufferte Lösung)
pg	PikoGramm
PNPP	Para-Nitrophenylphosphat
rFimA	Rekombinantes FimA
SDS-Page	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
TLR2	Toll-like Rezeptor 2
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
TNF-α	Tumornekrosefaktor-α
VCAM-1	Vascular cell adhesion molecule-1
VK	Variationskoeffizienten
z.B.	zum Beispiel

9 Literaturverzeichnis

- Abbas, A. K., Lichtman, A. H., & Pillai, S. (2021). *Cellular and Molecular Immunology, -South Asia Edition-E-Book*. Elsevier Health Sciences.
- Aleksijevic, L. H., Aleksijevic, M., Skrlec, I., Sram, M., Sram, M., & Talapko, J. (2022). Porphyromonas gingivalis Virulence Factors and Clinical Significance in Periodontal Disease and Coronary Artery Diseases. *Pathogens*, 11(10).
<https://doi.org/10.3390/pathogens11101173>
- Amano, A., Kuboniwa, M., Nakagawa, I., Akiyama, S., Morisaki, I., & Hamada, S. (2000). Prevalence of specific genotypes of Porphyromonas gingivalis fimA and periodontal health status. *J Dent Res*, 79(9), 1664-1668.
<https://doi.org/10.1177/00220345000790090501>
- Amano, A., Nakagawa, I., Okahashi, N., & Hamada, N. (2004). Variations of Porphyromonas gingivalis fimbriae in relation to microbial pathogenesis. *J Periodontal Res*, 39(2), 136-142. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0765.2004.00719.x>
- Amano, A., Shizukuishi, S., Horie, H., Kimura, S., Morisaki, I., & Hamada, S. (1998). Binding of Porphyromonas gingivalis fimbriae to proline-rich glycoproteins in parotid saliva via a domain shared by major salivary components. *Infect Immun*, 66(5), 2072-2077.
<https://doi.org/10.1128/IAI.66.5.2072-2077.1998>
- Ardila, C. M., & Guzman, I. C. (2015). Comparison of serum amyloid A protein and C-reactive protein levels as inflammatory markers in periodontitis. *J Periodontal Implant Sci*, 45(1), 14-22. <https://doi.org/10.5051/jpis.2015.45.1.14>
- Baeza, M., Morales, A., Cisterna, C., Cavalla, F., Jara, G., Isamitt, Y., Pino, P., & Gamonal, J. (2020). Effect of periodontal treatment in patients with periodontitis and diabetes: systematic review and meta-analysis. *J Appl Oral Sci*, 28, e20190248.
<https://doi.org/10.1590/1678-7757-2019-0248>
- Bender, P., Burgin, W. B., Sculean, A., & Eick, S. (2017). Serum antibody levels against Porphyromonas gingivalis in patients with and without rheumatoid arthritis - a systematic review and meta-analysis. *Clin Oral Investig*, 21(1), 33-42.
<https://doi.org/10.1007/s00784-016-1938-5>
- Bennani, M., Range, H., Meuric, V., Mora, F., Bouchard, P., & Carra, M. C. (2020). Shared detection of Porphyromonas gingivalis in cohabiting family members: a systematic review and meta-analysis. *J Oral Microbiol*, 12(1), 1687398.
<https://doi.org/10.1080/20002297.2019.1687398>
- Bradley, J. (1974). Immunoglobulins. *J Med Genet*, 11(1), 80-90.
<https://doi.org/10.1136/jmg.11.1.80>

- Butler, J. E. (2000). Enzyme-linked immunosorbent assay. *J Immunoassay*, 21(2-3), 165-209.
<https://doi.org/10.1080/01971520009349533>
- Choi, Y. H., McKeown, R. E., Mayer-Davis, E. J., Liese, A. D., Song, K. B., & Merchant, A. T. (2014). Serum C-reactive protein and immunoglobulin G antibodies to periodontal pathogens may be effect modifiers of periodontitis and hyperglycemia. *J Periodontol*, 85(9), 1172-1181. <https://doi.org/10.1902/jop.2014.130658>
- Christin Heidemann, C. S.-N. (2017). Prävalenz, Inzidenz und Mortalität von Diabetes mellitus bei Erwachsenen in Deutschland – Bestandsaufnahme zur Diabetes-Surveillance. *Journal of Health Monitoring*, 105-128. <https://doi.org/DOI 10.17886/RKI-GBE-2017-050>
- Crowther, J. R. (2001). *The ELISA Guidebook* (Vol. 149). Humana Press Inc.
- Cueno, M. E., Nagano, K., Imai, K., Tamura, M., Yoshimura, F., & Ochiai, K. (2015). Ab initio modeling approach towards establishing the structure and docking orientation of the Porphyromonas gingivalis FimA. *J Mol Graph Model*, 55, 65-71.
<https://doi.org/10.1016/j.jmglm.2014.11.001>
- de Diego, I., Veillard, F., Sztukowska, M. N., Guevara, T., Potempa, B., Pomowski, A., Huntington, J. A., Potempa, J., & Gomis-Ruth, F. X. (2014). Structure and mechanism of cysteine peptidase gingipain K (Kgp), a major virulence factor of Porphyromonas gingivalis in periodontitis. *J Biol Chem*, 289(46), 32291-32302.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M114.602052>
- Deo, P. N., & Deshmukh, R. (2019). Oral microbiome: Unveiling the fundamentals. *J Oral Maxillofac Pathol*, 23(1), 122-128. https://doi.org/10.4103/jomfp.JOMFP_304_18
- Deshpande, S. S. (1996). *Enzyme Immunoassays: From Concept to Product Development* (1 ed.). Springer New York, NY. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-1-4613-1169-0> (30.06.1996)
- Dr. Constanze Cholmakow-Bodechtel, E. F.-G., Prof. Dr. Siegfried Geyer, Prof. Dr. Katrin Hertrampf, Prof. Dr. Thomas Hoffmann, Dr. Birte Holtfreter, PD Dr. A. Rainer Jordan, Prof. Dr. Thomas Kocher, Dr. Wolfgang Micheelis, Prof. Dr. Ina Nitschke et. al. . (2014). Fünfte deutsche Mundgesundheitsstudie (DMS V). In (Vol. BZÄK/KZBV, 1. Auflage
 Berlin/Köln, August 2016): Kassenzahnärztliche Bundesvereinigung, Bundeszahnärztekammer.
- Dye, B. A., Herrera-Abreu, M., Lerche-Sehm, J., Vlachoianis, C., Pikdoken, L., Pretzl, B., Schwartz, A., & Papapanou, P. N. (2009). Serum antibodies to periodontal bacteria as diagnostic markers of periodontitis. *J Periodontol*, 80(4), 634-647.
<https://doi.org/10.1902/jop.2009.080474>
- Enersen, M., Nakano, K., & Amano, A. (2013). Porphyromonas gingivalis fimbriae. *J Oral Microbiol*, 5. <https://doi.org/10.3402/jom.v5i0.20265>

- Esteves-Lima, R. P., Reis, C. S., Santirocchi-Junior, F., Abreu, L. G., & Costa, F. O. (2020). Association between periodontitis and serum c-reactive protein levels. *J Clin Exp Dent*, *12*(9), e838-e843. <https://doi.org/10.4317/jced.57041>
- Fritz H. Kayser, E. C. B., Rolf M. Zinkernagel, Otto Haller, Johannes Eckert, Peter Deplazes. (2001). *Medizinische Mikrobiologie*. Georg Thieme Verlag.
- Fujii, K., Tsuji, M., Murota, K., Terato, K., Shimosuru, Y., & Nagai, Y. (1989). An improved enzyme-linked immunosorbent assay of anti-collagen antibodies in human serum. *J Immunol Methods*, *124*(1), 63-70. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(89\)90186-5](https://doi.org/10.1016/0022-1759(89)90186-5)
- Groeger, S., Hudel, M., Zechel, S., Chakraborty, T., Lochnit, G., Meyle, J., & Domann, E. (2021). Generation and functional characterization of recombinant Porphyromonas gingivalis W83 FimA. *J Biotechnol*, *340*, 22-29. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2021.08.009>
- Groeger, S. E., Hudel, M., Zechel-Gran, S., Herrmann, J. M., Chakraborty, T., Domann, E., & Meyle, J. (2022). Recombinant Porphyromonas gingivalis W83 FimA alters immune response and metabolic gene expression in oral squamous carcinoma cells. *Clin Exp Dent Res*, *8*(4), 976-987. <https://doi.org/10.1002/cre2.588>
- Hajishengallis, G. (2015). Periodontitis: from microbial immune subversion to systemic inflammation. *Nat Rev Immunol*, *15*(1), 30-44. <https://doi.org/10.1038/nri3785>
- Hajishengallis, G., & Chavakis, T. (2021). Local and systemic mechanisms linking periodontal disease and inflammatory comorbidities. *Nat Rev Immunol*, *21*(7), 426-440. <https://doi.org/10.1038/s41577-020-00488-6>
- Hajishengallis, G., Darveau, R. P., & Curtis, M. A. (2012). The keystone-pathogen hypothesis. *Nat Rev Microbiol*, *10*(10), 717-725. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2873>
- Hajishengallis, G., Shakhathreh, M. A., Wang, M., & Liang, S. (2007). Complement receptor 3 blockade promotes IL-12-mediated clearance of Porphyromonas gingivalis and negates its virulence in vivo. *J Immunol*, *179*(4), 2359-2367. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.179.4.2359>
- Hanack, K., Messerschmidt, K., & Listek, M. (2016). Antibodies and Selection of Monoclonal Antibodies. *Adv Exp Med Biol*, *917*, 11-22. https://doi.org/10.1007/978-3-319-32805-8_2
- Harokopakis, E., & Hajishengallis, G. (2005). Integrin activation by bacterial fimbriae through a pathway involving CD14, Toll-like receptor 2, and phosphatidylinositol-3-kinase. *Eur J Immunol*, *35*(4), 1201-1210. <https://doi.org/10.1002/eji.200425883>
- Hasegawa, Y., & Nagano, K. (2021). Porphyromonas gingivalis FimA and Mfa1 fimbriae: Current insights on localization, function, biogenesis, and genotype. *Jpn Dent Sci Rev*, *57*, 190-200. <https://doi.org/10.1016/j.jdsr.2021.09.003>

- Herrmann, J. M., Sonnenschein, S. K., Groeger, S. E., Ewald, N., Arneth, B., & Meyle, J. (2020). Refractory neutrophil activation in type 2 diabetics with chronic periodontitis. *J Periodontal Res*, 55(2), 315-323. <https://doi.org/10.1111/jre.12717>
- Holt, S. C., Kesavalu, L., Walker, S., & Genco, C. A. (1999). Virulence factors of *Porphyromonas gingivalis*. *Periodontol 2000*, 20, 168-238. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0757.1999.tb00162.x>
- Hornbeck, P. V. (2015). Enzyme-Linked Immunosorbent Assays. *Curr Protoc Immunol*, 110, 21-23. <https://doi.org/10.1002/0471142735.im0201s110>
- How, K. Y., Song, K. P., & Chan, K. G. (2016). *Porphyromonas gingivalis*: An Overview of Periodontopathic Pathogen below the Gum Line. *Front Microbiol*, 7, 53. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00053>
- Huang, N., Shimomura, E., Yin, G., Tran, C., Sato, A., Steiner, A., Heibeck, T., Tam, M., Fairman, J., & Gibson, F. C., 3rd. (2019). Immunization with cell-free-generated vaccine protects from *Porphyromonas gingivalis*-induced alveolar bone loss. *J Clin Periodontol*, 46(2), 197-205. <https://doi.org/10.1111/jcpe.13047>
- Igboin, C. O., Griffen, A. L., & Leys, E. J. (2009). *Porphyromonas gingivalis* strain diversity. *J Clin Microbiol*, 47(10), 3073-3081. <https://doi.org/10.1128/JCM.00569-09>
- Ingalagi, P., Bhat, K. G., Kulkarni, R. D., Kotrashetti, V. S., Kumbar, V., & Kugaji, M. (2022). Detection and comparison of prevalence of *Porphyromonas gingivalis* through culture and Real Time-polymerase chain reaction in subgingival plaque samples of chronic periodontitis and healthy individuals. *J Oral Maxillofac Pathol*, 26(2), 288. https://doi.org/10.4103/jomfp.jomfp_163_21
- Ioannidou, E., Malekzadeh, T., & Dongari-Bagtzoglou, A. (2006). Effect of periodontal treatment on serum C-reactive protein levels: a systematic review and meta-analysis. *J Periodontol*, 77(10), 1635-1642. <https://doi.org/10.1902/jop.2006.050443>
- Karnes, H. T., Shiu, G., & Shah, V. P. (1991). Validation of bioanalytical methods. *Pharm Res*, 8(4), 421-426. <https://doi.org/10.1023/a:1015882607690>
- Kerner, W., Bruckel, J., & German Diabetes, A. (2014). Definition, classification and diagnosis of diabetes mellitus. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, 122(7), 384-386. <https://doi.org/10.1055/s-0034-1366278>
- Keyt, B. A., Baliga, R., Sinclair, A. M., Carroll, S. F., & Peterson, M. S. (2020). Structure, Function, and Therapeutic Use of IgM Antibodies. *Antibodies (Basel)*, 9(4). <https://doi.org/10.3390/antib9040053>
- Khalid, M., Petroianu, G., & Adem, A. (2022). Advanced Glycation End Products and Diabetes Mellitus: Mechanisms and Perspectives. *Biomolecules*, 12(4). <https://doi.org/10.3390/biom12040542>

- Kobayashi, T., Ito, S., Murasawa, A., Ishikawa, H., & Tabeta, K. (2022). The Serum Immunoglobulin G Titers Against *Porphyromonas gingivalis* as a Predictor of Clinical Response to One-Year Treatment with Biological Disease-Modifying Antirheumatic Drugs in Rheumatoid Arthritis Patients: A Retrospective Cohort Study. *Mod Rheumatol*. <https://doi.org/10.1093/mr/roac093>
- Kocher, T., Konig, J., Borgnakke, W. S., Pink, C., & Meisel, P. (2018). Periodontal complications of hyperglycemia/diabetes mellitus: Epidemiologic complexity and clinical challenge. *Periodontol 2000*, 78(1), 59-97. <https://doi.org/10.1111/prd.12235>
- Kohl, T. O., & Ascoli, C. A. (2017). Indirect Immunometric ELISA. *Cold Spring Harb Protoc*, 2017(5). <https://doi.org/10.1101/pdb.prot093708>
- Köhler, G., & Milstein, C. (1975). Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*, 256(5517), 495-497. <https://doi.org/10.1038/256495a0>
- Konstantinou, G. N. (2017). Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). *Methods Mol Biol*, 1592, 79-94. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6925-8_7
- Kugaji, M., Muddapur, U., Bhat, K., Joshi, V., Manubolu, M., Pathakoti, K., Peram, M. R., & Kumbar, V. (2020). Variation in the Occurrence of fimA Genotypes of *Porphyromonas gingivalis* in Periodontal Health and Disease. *Int J Environ Res Public Health*, 17(6). <https://doi.org/10.3390/ijerph17061826>
- Lamont, R. J., Koo, H., & Hajishengallis, G. (2018). The oral microbiota: dynamic communities and host interactions. *Nat Rev Microbiol*, 16(12), 745-759. <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0089-x>
- Lin, A. V. (2015). Indirect ELISA. *Methods Mol Biol*, 1318, 51-59. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2742-5_5
- Loe, H., Theilade, E., & Jensen, S. B. (1965). Experimental Gingivitis in Man. *J Periodontol*, 36, 177-187. <https://doi.org/10.1902/jop.1965.36.3.177>
- Loos, B. G., Craandijk, J., Hoek, F. J., Wertheim-van Dillen, P. M., & van der Velden, U. (2000). Elevation of systemic markers related to cardiovascular diseases in the peripheral blood of periodontitis patients. *J Periodontol*, 71(10), 1528-1534. <https://doi.org/10.1902/jop.2000.71.10.1528>
- Luttmann, W., Bratke, Küpper, M., Myrtek, V. (2009). *Der Experimentator Immunologie* (3 ed.). Springer Spektrum Berlin, Heidelberg.
- Machado, V., Botelho, J., Escalda, C., Hussain, S. B., Luthra, S., Mascarenhas, P., Orlandi, M., Mendes, J. J., & D'Aiuto, F. (2021). Serum C-Reactive Protein and Periodontitis: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Front Immunol*, 12, 706432. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.706432>
- Mantri, C. K., Chen, C. H., Dong, X., Goodwin, J. S., Pratap, S., Paromov, V., & Xie, H. (2015). Fimbriae-mediated outer membrane vesicle production and invasion of

- Porphyromonas gingivalis. *Microbiologyopen*, 4(1), 53-65.
<https://doi.org/10.1002/mbo3.221>
- Mealey, B. L., & Ocampo, G. L. (2007). Diabetes mellitus and periodontal disease. *Periodontol 2000*, 44, 127-153. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0757.2006.00193.x>
- Meyle, J., & Chapple, I. (2015). Molecular aspects of the pathogenesis of periodontitis. *Periodontol 2000*, 69(1), 7-17. <https://doi.org/10.1111/prd.12104>
- Miyashita, H., Honda, T., Maekawa, T., Takahashi, N., Aoki, Y., Nakajima, T., Tabeta, K., & Yamazaki, K. (2012). Relationship between serum antibody titres to Porphyromonas gingivalis and hs-CRP levels as inflammatory markers of periodontitis. *Arch Oral Biol*, 57(6), 820-829. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2011.11.008>
- Mohammad, K., & Esen, A. (1989). A blocking agent and a blocking step are not needed in ELISA, immunostaining dot-blot and western blots. *J Immunol Methods*, 117(1), 141-145. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(89\)90129-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(89)90129-4)
- Montevicchi, M., Valeriani, L., Gatto, M. R., D'Alessandro, G., & Piana, G. (2021). Subgingival pathogens in chronic periodontitis patients affected by type 2 diabetes mellitus: a retrospective case-control study. *J Periodontal Implant Sci*, 51(6), 409-421. <https://doi.org/10.5051/jpis.2100180009>
- Moutachakir, M., Lamrani Hanchi, A., Baraou, A., Boukhira, A., & Chellak, S. (2017). Immunoanalytical characteristics of C-reactive protein and high sensitivity C-reactive protein. *Ann Biol Clin (Paris)*, 75(2), 225-229. <https://doi.org/10.1684/abc.2017.1232> (Caracteristiques immunoanalytiques de la proteine C-reactive et de la proteine C-reactive ultrasensible.)
- Nakagawa, I., Amano, A., Kuboniwa, M., Nakamura, T., Kawabata, S., & Hamada, S. (2002). Functional differences among FimA variants of Porphyromonas gingivalis and their effects on adhesion to and invasion of human epithelial cells. *Infect Immun*, 70(1), 277-285. <https://doi.org/10.1128/IAI.70.1.277-285.2002>
- Nelson, P. N., Reynolds, G. M., Waldron, E. E., Ward, E., Giannopoulos, K., & Murray, P. G. (2000). Monoclonal antibodies. *Mol Pathol*, 53(3), 111-117. <https://doi.org/10.1136/mp.53.3.111>
- Oberti, L., Gabrione, F., Nardone, M., & Di Girolamo, M. (2019). Two-way relationship between diabetes and periodontal disease: a reality or a paradigm? *J Biol Regul Homeost Agents*, 33(3 Suppl. 1), 153-159 DENTAL SUPPLEMENT. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31538462>
- Ogawa, T., & Hamada, S. (1994). Hemagglutinating and chemotactic properties of synthetic peptide segments of fimbrial protein from Porphyromonas gingivalis. *Infect Immun*, 62(8), 3305-3310. <https://doi.org/10.1128/iai.62.8.3305-3310.1994>

- Ogurtsova, K., Guariguata, L., Barengo, N. C., Ruiz, P. L., Sacre, J. W., Karuranga, S., Sun, H., Boyko, E. J., & Magliano, D. J. (2022). IDF diabetes Atlas: Global estimates of undiagnosed diabetes in adults for 2021. *Diabetes Res Clin Pract*, *183*, 109118. <https://doi.org/10.1016/j.diabres.2021.109118>
- Page, R. C., & Kornman, K. S. (1997). The pathogenesis of human periodontitis: an introduction. *Periodontol 2000*, *14*, 9-11. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0757.1997.tb00189.x>
- Podzimek, S., Mysak, J., Janatova, T., & Duskova, J. (2015). C-Reactive Protein in Peripheral Blood of Patients with Chronic and Aggressive Periodontitis, Gingivitis, and Gingival Recessions. *Mediators Inflamm*, *2015*, 564858. <https://doi.org/10.1155/2015/564858>
- Ramasamy, R., Yan, S. F., & Schmidt, A. M. (2011). Receptor for AGE (RAGE): signaling mechanisms in the pathogenesis of diabetes and its complications. *Ann N Y Acad Sci*, *1243*, 88-102. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2011.06320.x>
- Riemekasten, G., Marell, J., Hentschel, C., Klein, R., Burmester, G. R., Schoessler, W., & Hiepe, F. (2002). Casein is an essential cofactor in autoantibody reactivity directed against the C-terminal SmD1 peptide AA 83-119 in systemic lupus erythematosus. *Immunobiology*, *206*(5), 537-545. <https://doi.org/10.1078/0171-2985-00202>
- Rocas, I. N., & Siqueira, J. F., Jr. (2010). Distribution of Porphyromonas gingivalis fimA genotypes in primary endodontic infections. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, *109*(3), 474-478. <https://doi.org/10.1016/j.tripleo.2009.11.009>
- Rocha, F. G., Berges, A., Sedra, A., Ghods, S., Kapoor, N., Pill, L., Davey, M. E., Fairman, J., & Gibson, F. C., 3rd. (2021). A Porphyromonas gingivalis Capsule-Conjugate Vaccine Protects From Experimental Oral Bone Loss. *Front Oral Health*, *2*, 686402. <https://doi.org/10.3389/froh.2021.686402>
- Sakamoto, S., Putalun, W., Vimolmangkang, S., Phoolcharoen, W., Shoyama, Y., Tanaka, H., & Morimoto, S. (2018). Enzyme-linked immunosorbent assay for the quantitative/qualitative analysis of plant secondary metabolites. *J Nat Med*, *72*(1), 32-42. <https://doi.org/10.1007/s11418-017-1144-z>
- Salvi, G. E., Lawrence, H. P., Offenbacher, S., & Beck, J. D. (1997). Influence of risk factors on the pathogenesis of periodontitis. *Periodontol 2000*, *14*, 173-201. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0757.1997.tb00197.x>
- Sanz, M., Ceriello, A., Buysschaert, M., Chapple, I., Demmer, R. T., Graziani, F., Herrera, D., Jepsen, S., Leone, L., Madianos, P., Mathur, M., Montanya, E., Shapira, L., Tonetti, M., & Vegh, D. (2018). Scientific evidence on the links between periodontal diseases and diabetes: Consensus report and guidelines of the joint workshop on periodontal diseases and diabetes by the International Diabetes Federation and the European Federation of Periodontology. *J Clin Periodontol*, *45*(2), 138-149. <https://doi.org/10.1111/jcpe.12808>

- Sathe, A., & Cusick, J. K. (2022). Biochemistry, Immunoglobulin M. In *StatPearls*.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32310455>
- Schroeder, H. W., Jr., & Cavacini, L. (2010). Structure and function of immunoglobulins. *J Allergy Clin Immunol*, *125*(2 Suppl 2), S41-52.
<https://doi.org/10.1016/j.jaci.2009.09.046>
- Sims, T. J., Lernmark, A., Mancl, L. A., Schifferle, R. E., Page, R. C., & Persson, G. R. (2002). Serum IgG to heat shock proteins and Porphyromonas gingivalis antigens in diabetic patients with periodontitis. *J Clin Periodontol*, *29*(6), 551-562.
<https://doi.org/10.1034/j.1600-051x.2002.290612.x>
- Sims, T. J., Lernmark, A., Smith, T., Page, R. C., & Persson, G. R. (2001). Treatment outcome for IDDM patients in relation to glutamic acid decarboxylase autoantibodies and serum IgG to periodontal pathogens. *J Clin Periodontol*, *28*(6), 550-557.
<https://doi.org/10.1034/j.1600-051x.2001.028006550.x>
- Socransky, S. S., Haffajee, A. D., Cugini, M. A., Smith, C., & Kent, R. L., Jr. (1998). Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol*, *25*(2), 134-144.
<https://doi.org/10.1111/j.1600-051x.1998.tb02419.x>
- Sproston, N. R., & Ashworth, J. J. (2018). Role of C-Reactive Protein at Sites of Inflammation and Infection. *Front Immunol*, *9*, 754. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00754>
- Stanker, L. H., & Hnasko, R. M. (2015). A Double-Sandwich ELISA for Identification of Monoclonal Antibodies Suitable for Sandwich Immunoassays. *Methods Mol Biol*, *1318*, 69-78. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2742-5_7
- Stevens, P. W., Hansberry, M. R., & Kelso, D. M. (1995). Assessment of adsorption and adhesion of proteins to polystyrene microwells by sequential enzyme-linked immunosorbent assay analysis. *Anal Biochem*, *225*(2), 197-205.
<https://doi.org/10.1006/abio.1995.1144>
- Sun, H., Saeedi, P., Karuranga, S., Pinkepank, M., Ogurtsova, K., Duncan, B. B., Stein, C., Basit, A., Chan, J. C. N., Mbanya, J. C., Pavkov, M. E., Ramachandaran, A., Wild, S. H., James, S., Herman, W. H., Zhang, P., Bommer, C., Kuo, S., Boyko, E. J., & Magliano, D. J. (2022). IDF Diabetes Atlas: Global, regional and country-level diabetes prevalence estimates for 2021 and projections for 2045. *Diabetes Res Clin Pract*, *183*, 109119. <https://doi.org/10.1016/j.diabres.2021.109119>
- Takahashi, Y., Davey, M., Yumoto, H., Gibson, F. C., 3rd, & Genco, C. A. (2006). Fimbria-dependent activation of pro-inflammatory molecules in Porphyromonas gingivalis infected human aortic endothelial cells. *Cell Microbiol*, *8*(5), 738-757.
<https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2005.00661.x>
- Tuominen, H., & Rautava, J. (2021). Oral Microbiota and Cancer Development. *Pathobiology*, *88*(2), 116-126. <https://doi.org/10.1159/000510979>

- Verma, D., Garg, P. K., & Dubey, A. K. (2018). Insights into the human oral microbiome. *Arch Microbiol*, 200(4), 525-540. <https://doi.org/10.1007/s00203-018-1505-3>
- Wang, H., Zhang, W., Wang, W., & Zhang, L. (2020). The prevalence of fimA genotypes of Porphyromonas gingivalis in patients with chronic periodontitis: A meta-analysis. *PLoS One*, 15(10), e0240251. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0240251>
- Wang, K., Hu, Z., Fan, M., Shao, Z., Yu, Q., & Li, X. (2022). Development of an indirect ELISA to detect PEDV specific IgA antibody based on a PEDV epidemic strain. *BMC Vet Res*, 18(1), 319. <https://doi.org/10.1186/s12917-022-03419-w>
- Watanabe, K., Onoe, T., Ozeki, M., Shimizu, Y., Sakayori, T., Nakamura, H., & Yoshimura, F. (1996). Sequence and product analyses of the four genes downstream from the fimbrilin gene (fimA) of the oral anaerobe Porphyromonas gingivalis. *Microbiol Immunol*, 40(10), 725-734. <https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.1996.tb01133.x>
- Winning, L., Patterson, C. C., Cullen, K. M., Stevenson, K. A., Lundy, F. T., Kee, F., & Linden, G. J. (2015). The association between subgingival periodontal pathogens and systemic inflammation. *J Clin Periodontol*, 42(9), 799-806. <https://doi.org/10.1111/jcpe.12450>
- Xu, W., Zhou, W., Wang, H., & Liang, S. (2020). Roles of Porphyromonas gingivalis and its virulence factors in periodontitis. *Adv Protein Chem Struct Biol*, 120, 45-84. <https://doi.org/10.1016/bs.apcsb.2019.12.001>
- Yilmaz, O. (2008). The chronicles of Porphyromonas gingivalis: the microbium, the human oral epithelium and their interplay. *Microbiology (Reading)*, 154(Pt 10), 2897-2903. <https://doi.org/10.1099/mic.0.2008/021220-0>
- Yoon, B. K., Sut, T. N., Yoo, K. Y., Lee, S. H., Hwang, Y., Jackman, J. A., & Cho, N. J. (2021). Lipid bilayer coatings for rapid enzyme-linked immunosorbent assay. *Appl Mater Today*, 24, 101128. <https://doi.org/10.1016/j.apmt.2021.101128>
- Zhang, Y., He, J., He, B., Huang, R., & Li, M. (2019). Effect of tobacco on periodontal disease and oral cancer. *Tob Induc Dis*, 17, 40. <https://doi.org/10.18332/tid/106187>

10 Anhang

Tabelle 22: Rohdaten der optischen Dichten zu 5.1 Auswertung der Testung des polyklonalen Antiserums im Vergleich zum Präimmunserum vom Hasen.

OD der Blanks	Verdünnungsstufen	OD der Polyklonale Antikörper (Antiserum)	OD des Präimmunserums
0,013	1:25	0,307	0,083
0,026	1:50	0,157	0,052
	1:100	0,106	0,015
	1:200	0,069	0,002
	1:400	0,037	0
	1:800	0,009	0
	1:1600	0,02	0
	1:3200	0	0

OD: optische Dichte

Tabelle 23: Rohdaten zu 5.2 Auswertung der Testung verschiedener rFimA Konzentrationen, OD: optische Dichte.

	10 ng Polyklonale Antikörper (AK)	25 ng/Well AK	50 ng/Well AK	100ng AK	150 ng AK	200 ng AK
OD	0,322	0,426	0,78	0,89	0,898	0,901
OD	0,211	0,45	0,739	0,837	0,84	0,88
OD	0,325	0,468	0,748	0,832	0,842	0,818
	10 ng Präimmunserum (PS)	25ng PS	50ng PS	100ng PS	150ng PS	200ng PS
OD	0,085	0,093	0,109	0,128	0,154	0,139
OD	0,083	0,1	0,128	0,124	0,146	0,133
OD	0,085	0,101	0,116	0,139	0,213	0,149
	Blank	Blank	Blank	Blank	Blank	Blank
OD	0,007	0,026	0,03	0,012	0,006	0,002
OD	0	0,008	0,019	0,008	0,005	0,001

250 ng Polyklonale Antikörper (AK)	300ng AK	350ng AK	400ng AK	450ng AK	500ng AK
0,993	0,941	0,941	0,926	0,939	0,999
0,893	0,83	0,905	0,92	0,883	0,972
0,933	0,85	0,864	0,869	0,888	0,91
300ng Präimmunserum (PS)	300ng PS	350ng PS	400ng PS	450ng PS	500ng PS
0,156	0,157	0,152	0,154	0,156	0,145
0,159	0,153	0,17	0,137	0,172	0,188
0,173	0,184	0,185	0,2	0,208	0,25
Blank	Blank	Blank	Blank	Blank	Blank
0,011	0,011	0,011	0,012	0	0
0,006	0,005	0,003	0	0	0

Tabelle 24: Rohdaten der optischen Dichte zu 5.9 Intra-Assay-Varianz.

Verdünnung	1:25	1:50	1:100	1:200	1:400	1:800	1:1600	1:3200
M Probe 322	0,675	0,505	0,375	0,241	0,161	0,109	0,085	0,075
SD Probe 322	0,009	0,002	0,013	0,003	0,020	0,013	0,009	0,009
VK Probe 322	1,260	0,396	3,467	1,245	12,150	11,927	10,588	11,409
M Probe 328	0,731	0,492	0,308	0,173	0,114	0,081	0,054	0,069
SD Probe 328	0,059	0,007	0,027	0,023	0,003	0,001	0,004	0,004
VK Probe 328	8,071	1,423	8,618	13,043	2,203	0,621	7,407	5,797
M Probe 333	0,870	0,595	0,421	0,242	0,163	0,097	0,067	0,061
SD Probe 333	0,003	0,004	0,031	0,036	0,009	0,005	0,002	0,001
VK Probe 333	0,345	0,672	7,253	14,876	5,846	4,663	2,985	0,826
M Probe 349	0,733	0,492	0,358	0,218	0,127	0,089	0,058	0,053
SD Probe 349	0,017	0,044	0,006	0,008	0,006	0,000	0,001	0,000
VK Probe 349	2,319	8,943	1,538	3,448	4,348	0,000	1,724	0,000
M Probe 320	0,738	0,433	0,305	0,169	0,128	0,092	0,070	0,051
SD Probe 320	0,003	0,020	0,004	0,018	0,005	0,003	0,001	0,000
VK Probe 320	0,407	4,619	1,311	10,651	3,529	3,261	2,158	0,990

M: Mittelwert, SD: Standardabweichung, VK: Variationskoeffizient

Tabelle 25: Rohdaten der optischen Dichten zu 5.10 Inter-Assay-Varianz.

Verdünnung	1:25	1:50	1:100	1:200	1:400	1:800	1:1600	1:3200
M Probe 322	0,724	0,536	0,366	0,211	0,153	0,106	0,080	0,067
SD Probe 322	0,049	0,031	0,009	0,030	0,007	0,004	0,005	0,008
VK Probe 322	6,773	5,828	2,389	14,218	4,731	3,318	6,918	12,030
M Probe 328	0,834	0,518	0,330	0,196	0,125	0,087	0,060	0,062
SD Probe 328	0,103	0,026	0,022	0,024	0,011	0,006	0,006	0,007
VK Probe 328	12,376	4,973	6,677	12,102	8,835	6,936	10,000	11,741
M Probe 333	0,950	0,659	0,451	0,282	0,183	0,111	0,078	0,061
SD Probe 333	0,080	0,064	0,030	0,040	0,020	0,015	0,011	0,000
VK Probe 333	8,397	9,643	6,659	14,032	11,081	13,063	13,548	0,412
M Probe 349	0,805	0,541	0,380	0,226	0,145	0,097	0,069	0,058
SD Probe 349	0,072	0,049	0,022	0,008	0,018	0,008	0,010	0,005
VK Probe 349	8,972	9,015	5,859	3,761	12,608	8,483	15,328	9,013
M Probe 320	0,854	0,518	0,366	0,216	0,159	0,106	0,078	0,057
SD Probe 320	0,116	0,085	0,061	0,047	0,031	0,014	0,009	0,006
VK Probe 320	13,558	16,329	16,667	21,759	19,685	13,412	11,182	10,619

M: Mittelwert, SD: Standardabweichung, VK: Variationskoeffizient.

10.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Ätiologie und Pathogenese der Parodontitis	5
Abbildung 2: Schematische Darstellung von Porphyromonas gingivalis und seinen Virulenzfaktoren.....	7
Abbildung 3: Strukturmodell der Fimbrien von P. gingivalis: FimA und Mfa	11
Abbildung 4: Schematische Darstellung eines Antikörpers.....	17
Abbildung 5: Opsonierung, Antikörper-Antigen-Bindung und Komplementbindung/-aktivierung durch IgM- und IgG-Antikörper. Modifiziert nach Keyt et al., 2020.....	19
Abbildung 6: Die humorale Immunantwort und Bildung von Antikörpern	20
Abbildung 7: Verschiedene ELISA Varianten: (a) Direkter ELISA, (b) Indirekter ELISA, (c) Sandwich ELISA, (d) Kompetitiver ELISA mit konjugiertem Antikörper, (e) Kompetitiver ELISA mit konjugiertem Antigen	24
Abbildung 8: Schematische Darstellung des ELISA-Verfahrens zur Detektion von IgG- und IgM-Antikörper gegen FimA von P. gingivalis W83	36
Abbildung 9: Plattenbelegung einer 96-Well-ELISA-Mikrotiterplatte mit Angabe der verschiedenen Verdünnungsstufen der Seren.	39
Abbildung 10: Plattenbelegung einer 96-Well-ELISA-Mikrotiterplatte mit Angabe der eingesetzten rFimA-Konzentration und mit Angabe der verschiedenen Verdünnungsstufen der Seren	42
Abbildung 11: Plattenbelegung einer 96-Well-ELISA-Mikrotiterplatte mit Angabe der Verdünnungsstufen der aufgereinigten monoklonalen IgG-Antikörper der verschiedenen Klone (Maus) gegen P. gingivalis FimA.....	44
Abbildung 12: Plattenbelegung einer 96-Well-ELISA-Mikrotiterplatte mit den aufgereinigten monoklonalen IgG-Antikörpern (Maus) der verschiedenen Klone gegen P. gingivalis FimA.....	46
Abbildung 13: Plattenbelegung einer 96-Well-ELISA-Mikrotiterplatte mit Angabe den verschiedenen Verdünnungsstufen der Blutseren	48
Abbildung 14: Plattenbelegung einer 96-Well-ELISA-Mikrotiterplatte mit Angabe der verschiedenen Verdünnungsstufen der Blutseren der Probanden	50
Abbildung 15: Auswertung der optischen Dichten des Präimmuserums im Vergleich zum Antiserum vom Hasen der verschiedenen Verdünnungsstufen.....	52
Abbildung 16: Titerauswertung der optischen Dichten des Präimmuserums im Vergleich zum Antiserum vom Hasen	53

Abbildung 17: Auswertung Coating der Wells: Optische Dichten des Präimmunserums im Vergleich zum Antiserum vom Hasen bei unterschiedlicher Menge an rFimA	55
Abbildung 18: Auswertung der optischen Dichten der aufgereinigten monoklonalen Antikörper-Suspensionen der unterschiedlichen Klone der Maus mit den Ausgangskonzentrationen $c = 0,05 \text{ mg/ml}$	56
Abbildung 19: Auswertung der optischen Dichten der unverdünnten, aufgereinigten monoklonalen IgG-Antikörper der unterschiedlichen Klone von der Maus	57
Abbildung 20: Boxplots für die IgG-Titer der einzelnen Studienkohorten	60
Abbildung 22: Boxplots für die IgM-Titer der einzelnen Studienkohorten	63
Abbildung 23: Boxplots für die CRP-Werte der einzelnen Studienkohorten	67

10.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht über die Lösungen und Chemikalien der vorliegenden Arbeit.	29
Tabelle 2: Übersicht über die ELISA-Puffer und Lösungen der vorliegenden Arbeit ...	29
Tabelle 3: Auswahlkriterien für die Serumproben.	31
Tabelle 4: Übersicht über die Geräte Apparaturen und Verbrauchsmaterialien	33
Tabelle 5: Übersicht über die eingesetzte Konzentration und Proteinmenge der monoklonalen Antikörper der jeweiligen Klone	45
Tabelle 6: Übersicht der Optischen Dichten der verschiedenen rFimA-Konzentrationen	55
Tabelle 7: Demographische Daten des Patientenkollektivs	58
Tabelle 8: Deskriptive Statistik der IgG-Titer der Kohorten.....	59
Tabelle 9: Absolute und relative Häufigkeitsverteilung der IgG-Titer	61
Tabelle 10: Kruskal-Wallis-Test und Levene-Test der IgG-Titer in Bezug auf die Kohorten.....	61
Tabelle 11: Post-hoc-Test nach Dunn mit Korrekturen nach Bonferroni-Holm der IgG- Titer in Bezug auf die Kohorten.....	62
Tabelle 12: Deskriptive Statistik der IgM-Titer der Kohorten	63
Tabelle 13: Absolute und relative Häufigkeitsverteilung der IgM-Titer.....	64
Tabelle 14: Kruskal-Wallis-Test der IgM-Titer der Studiengruppen	64
Tabelle 15: Deskriptive Statistik der optischen Dichten der Negativproben	65
Tabelle 16: Auswertung der Variationskoeffizienten für die Intra-Assay-Varianz.....	66
Tabelle 17: Auswertung der Variationskoeffizienten für die Inter-Assay-Varianz.....	66
Tabelle 18: Deskriptive Statistik der Werte des C-reaktiven Proteins in Bezug auf die Kohorten.....	67
Tabelle 19: Kruskal-Wallis-Test der CRP-Werte der Studiengruppen.	68
Tabelle 20: Post-hoc-Test nach Dunn der CRP-Werte der Studiengruppen	68
Tabelle 21: Übersicht der Rangkorrelation nach Spearman	68
Tabelle 22: Rohdaten der optischen Dichten zu 5.1 Auswertung der Testung des polyklonalen Antiserums im Vergleich zum Präimmunserum vom Hasen	92
Tabelle 23: Rohdaten zu 5.2 Auswertung der Testung verschiedener rFimA Konzentrationen	92
Tabelle 24: Rohdaten der optischen Dichte zu 5.9 Intra-Assay-Varianz	93
Tabelle 25: Rohdaten der optischen Dichten zu 5.10 Inter-Assay-Varianz	94

11 Publikationsverzeichnis

Posterpräsentation bei der Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Parodontologie mit dem Titel: „Analyse des Virulenzfaktors FimA von *Porphyromonas gingivalis* bei Parodontitis“. Stuttgart, 15.-17.09.2022.

12 Ethikvotum

Die Serumproben der Probanden dieser Studie entstammen den Studien „Zytosolische Signalübertragung humaner polymorphkerniger Granulozyten und zelluläre Effektorfunktionen bei Patienten mit Diabetes mellitus und chronischer Parodontitis“ und „White Blood Cell Signaling and Defense Mechanisms in Patients with Diabetes Mellitus Type 2 and Periodontitis“ (Antragsnummer der Ethikkommission: 175/07).

Für die vorliegende Arbeit wurde ein Amendment durch die Ethikkommission der Justus-Liebig-Universität zugelassen (Auftragsnummer der Ethikkommission: 175/07 Addendum IV).

13 Ehrenwörtliche Erklärung

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

Ort/ Datum

Unterschrift

14 Danksagung

Ich danke Herrn Professor Dr. med. dent. Jörg Meyle für die Überlassung des Dissertationsthemas und die fachliche Beratung sowie gute Betreuung.

Ich danke Frau PD Dr. med. Sabine E. Gröger für die motivierende und gute Zusammenarbeit sowie fachliche Betreuung.

Ich danke Prof. Dr. Eugen Domann und Frau Martina Hudel für die Herstellung und Aufbereitung des rekombinanten FimA.

Ich danke Dr. biol. hom. Anita Windhorst für die Beratung und Unterstützung bei der statistischen Auswertung.

Ich danke meinen Kollegen für die gute Zusammenarbeit im Labor und im klinischen Bereich.

Ich danke Philip D. Sauer für das Verständnis und die Unterstützung in allen Lebenslagen.

Ich danke meiner Familie für die Ermöglichung meines Werdegangs und für ihre unbegrenzte Unterstützung.