

**Aus der Poliklinik für Zahnerhaltung und Parodontologie
Klinikum der Ludwig-Maximilians-Universität München**
Direktor: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

**Untersuchung der Veränderung der Entzündungsreaktion
und Expression von antimikrobiellen Peptiden bei
bakterieller Infektion**

—

ein in-vitro Ko-Kultur-Modell von parodontalpathogenen Bakterien und
oralen Zellen

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Zahnmedizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Lena Isabel Sturm

aus

München

2021

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

Berichterstatterin:	Prof. Dr. med. dent. Karin C. Huth, MME
Mitberichterstatter:	Priv. Doz. Dr. Florian Probst Prof. Dr. Josef Eberle
Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:	Dr. med. dent. Maximilian Kollmuß
Dekan:	Prof. Dr. med. Thomas Gudermann
Tag der mündlichen Prüfung:	09.12.2021

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	5
1.1	Epidemiologie der Parodontitis	5
1.2	Aufbau des Zahnhalteapparates	6
1.3	Klassifikation der Parodontalerkrankungen	7
1.4	Ätiologie	10
1.4.1	Tabakkonsum	11
1.4.2	Diabetes mellitus	11
1.4.3	Psychischer Stress	12
1.4.4	Nicht modifizierbare Risikofaktoren	12
1.5	Pathomechanismus	12
1.5.1	Entwicklung eines dentalen Biofilmes	13
1.5.2	Parodontalpathogene Bakterien	14
1.5.2.1	Porphyromonas gingivalis	15
1.5.2.2	Tannerella forsythia	15
1.5.2.3	Treponema denticola.....	16
1.5.2.4	Aggregatibacter actinomycetemcomitans.....	16
1.5.3	Immunantwort.....	16
1.6	Antimikrobielle Peptide	19
1.6.1	Funktionsmechanismen.....	20
1.6.2	Orale antimikrobielle Peptide.....	23
1.6.2.1	Defensine	24
1.6.2.2	Cathelicidin LL-37	26
1.6.2.3	Histatine.....	26
1.6.2.4	Adrenomedullin.....	27
1.7	Expressionsverhalten von Zytokinen, antimikrobiellen Peptiden und Transkriptionsfaktoren oraler Zellkulturen bei bakterieller Stimulation 27	
1.7.1	Expression von IL-6 und IL-8.....	27
1.7.2	Expression antimikrobieller Peptide	29
1.7.2.1	Expression des humanen β -Defensin 2 in oralen Zellkulturen	29
1.7.2.2	Sekretion von LL-37 in oralen Zellkulturen	31
1.7.3	Expression des Transkriptionsfaktors NF- κ B	31
1.7.4	Expression von COX-2	32

2	Fragestellung und Studienziele	33
3	Material und Methoden	35
3.1	Kultivierung von <i>Porphyromonas gingivalis</i>	35
3.2	Zellarten und Kulturbedingungen	35
3.3	Routinearbeiten in der Zellkultur	38
3.3.1	Auftauen der Zellen	38
3.3.2	Mediumwechsel	38
3.3.3	Subkultivieren der Zellen	38
3.3.4	Bestimmung der Zellzahl	39
3.3.5	Aussäen der Zellen in 6-Well-Platten	39
3.4	Versuchsaufbau und Nachweisverfahren	40
3.4.1	Herstellung der Bakterienlösung	40
3.4.2	Kokultivierung der Zellen und <i>Porphyromonas gingivalis</i>	40
3.4.3	Gewinnung der Proben	41
3.4.3.1	Gewinnung der Zellkulturüberstände	41
3.4.3.2	Herstellung zytosolischer Proteinextrakte	42
3.4.4	Enzyme-linked Immunosorbent Assay auf IL-6	42
3.4.5	Enzyme-linked Immunosorbent Assay auf IL-8	46
3.4.6	Nachweis von LL-37	46
3.4.7	Nachweis von h β D-2	48
3.4.8	Nachweis von I κ B- α	48
3.4.9	Nachweis von COX-2	50
3.4.10	Statistische Auswertung	51
4	Ergebnisse	52
4.1	ELISA auf IL-6	52
4.2	ELISA auf IL-8	55
4.3	ELISA auf LL-37	57
4.4	ELISA auf hβD-2	59
4.5	Western-Blot auf IκB-α	61
4.6	Western-Blot auf COX-2	63
5	Diskussion	65

6	Zusammenfassung.....	77
7	Literaturverzeichnis	79
8	Abbildungs- und Tabellenverzeichnis.....	94
8.1	Abbildungsverzeichnis	94
8.2	Tabellenverzeichnis	96
9	Abkürzungsverzeichnis	97
10	Rezepte.....	99
11	Danksagung.....	100

1 Einleitung

Trotz der intensiven Forschung im Themenbereich der Parodontitis (PA) ist die Entzündung des Zahnhalteapparates nach wie vor einer der Hauptgründe für Zahnverlust. Wie die fünfte Deutsche Mundgesundheitsstudie (DMS V) zeigt, sind 52% der jüngeren Erwachsenen zwischen 35 und 44 Jahren und 65% der jüngeren Senioren zwischen 65 und 74 Jahren von Parodontalerkrankungen betroffen. Diese Daten legen eine Altersassoziation nahe, weswegen sich das Problem der Parodontitis aufgrund des demografischen Wandels verstärken wird [Cholmakow-Bodechtel *et al.*, 2016]. Die Standardtherapie in der Behandlung der Parodontitis stellt die mechanische Reinigung der Wurzeloberflächen durch den Zahnarzt dar [Keestra *et al.*, 2015]. Weiterhin erfolgt bei bestimmten Fällen eine Therapie durch systemische Antibiotikagabe [Slots *et al.*, 2004]. Wie jedoch eine In-vitro-Studie von Rams und Mitarbeitern in den Vereinigten Staaten zeigt, weisen 74,2% der untersuchten Patienten mit chronischer Parodontitis eine Resistenz gegen häufig verwendete Antibiotika auf [Rams *et al.*, 2014]. Aufgrund der Relevanz der Erkrankung und bestehender Probleme der Therapiemethoden, wie beispielsweise die genannten Antibiotikaresistenzen, werden neue Ansätze für die Behandlung und das Verständnis der Erkrankung laufend erforscht.

Neuere Studien beschäftigen sich mit antimikrobiellen Peptiden (AMPs) im Zusammenhang mit Parodontalerkrankungen. Bei der schweren kongenitalen Neutropenie, auch Kostmann-Syndrom genannt, weisen Patienten eine verminderte Produktion von AMPs auf, welche in neutrophilen Granulozyten gespeichert werden [Carlsson *et al.*, 2006, Pütsep *et al.*, 2002]. Da alle Erkrankten der Studie von Pütsep und Mitarbeitern an Parodontitis litten, wurde ein Zusammenhang zwischen dem Fehlen beziehungsweise der Fehlfunktion bestimmter AMPs und dem Auftreten von Parodontitis hergestellt [Pütsep *et al.*, 2002].

Diese Kausalität und die sich daraus ergebende Möglichkeit, das Verständnis und die Therapie der Parodontitis in Zukunft zu verbessern, gab den Anlass für die nachfolgende Arbeit.

1.1 Epidemiologie der Parodontitis

Eine internationale Studie, in welcher Patienten im Alter von über 15 Jahren aus 37 Ländern erfasst wurden, ermittelte die schwere chronische PA als sechsthäufigste

Erkrankung der Welt [Kassebaum *et al.*, 2014]. Die Prävalenz wurde weltweit mit 10,8% angegeben. In der Studie konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Geschlechtern festgestellt werden. Die Prävalenz zeigte einen stetigen Anstieg zwischen 30 und 40 Jahren und erreichte einen Höhepunkt mit 40 Jahren. Die Inzidenz der schweren chronischen Parodontitis erreicht den Höhepunkt mit 38 Jahren. Sowohl Inzidenz als auch Prävalenz unterschieden sich deutlich je nach Land. Jedoch sollte darauf hingewiesen werden, dass die ermittelten Werte sich je nach einbezogenen Daten und verwendeten Methoden unterscheiden [Eke *et al.*, 2015, Frencken *et al.*, 2017, Shiau, 2018].

Die fünfte DMS von 2016 gibt epidemiologische Werte bezogen auf das Alter an. Generell wird ein Rückgang der Parodontalerkrankungen beobachtet. In der Altersgruppe von 35-44 Jahren halbierte sich die Prävalenz der schweren PA von 17,4% auf 8,2% seit der vierten DMS. 43,4% weisen eine moderate und 48,4% eine milde oder keine PA in dieser Altersgruppe auf. Bei Senioren im Alter von 65-74 Jahren sind nur noch 19,8% an einer schweren PA erkrankt, in der vierten DMS waren es noch 44,1%. 44,8% leiden an einer moderaten und 35,3% an einer milden oder keiner PA. In der Altergruppe von 75-100 Jahren manifestiert sich diese Entwicklung. Hier sind etwa 90% an einer schweren beziehungsweise moderaten PA erkrankt. Trotz der rückläufigen Zahlen wird aufgrund des demografischen Wandels insgesamt auf einen erhöhten Behandlungsbedarf verwiesen [Cholmakow-Bodechtel *et al.*, 2016].

1.2 Aufbau des Zahnhalteapparates

Für das Verständnis der Erkrankung des Parodonts wird im Folgenden überblicksweise die Anatomie des Zahnhalteapparates beschrieben.

Der Zahnhalteapparat, das sogenannte Parodont, setzt sich aus Gingiva, Wurzelzement, Wurzelhaut und Alveolarknochen zusammen.

An der Margo gingivalis geht das gingivale Epithel der Mundschleimhaut in ein mehrschichtiges, unverhorntes Alveolarepithel über. Man unterscheidet zwischen freier und befestigter Gingiva. Die freie Gingiva umgibt den marginalen Schmelz des Zahnes und haftet über das Saumepithel am Zahn. Daran schließt sich die befestigte Gingiva an, welche sich bis zur mukogingivalen Grenze erstreckt. Diese ist über kollagene Faserbündel fest mit Zahnfleisch und Alveolarknochen verbunden. Einen besonderen Stellenwert für das Verständnis der PA nimmt das Saumepithel

ein, welches über die innere Basallamina mittels Hemidesmosomen am Zahn befestigt ist und nach koronal hin an Dicke zunimmt. Durch die äußere Basallamina des Saumepithels wird es vom gingivalen Bindegewebe abgegrenzt. Koronal endet das Saumepithel am Boden des Sulcus gingivalis. Bedeutend ist der hohe Zellumsatz des Epithels und eine eigene spezialisierte Immunabwehr durch neutrophile Granulozyten und Lymphozyten. Abbildung 1 stellt den schematischen Aufbau des Parodonts dar.

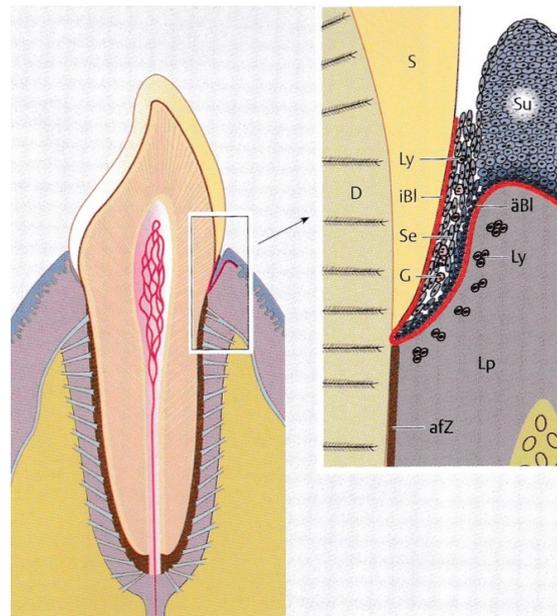


Abbildung 1: Schematische Darstellung des Aufbaus des Parodonts (Se=Saumepithel, Ly=Lymphozyten, G=Granulozyten, Su=Sulkusepithel, iBl=innere Basallamina, äBl=äußere Basallamina, Lp=Lamina propria der Gingiva, afZ=azellulär fibrilläres Zement, D=Dentin, S=Schmelz) [Steiniger et al., 2010]

Den Spalt zwischen Wurzelzement und Alveolarknochen füllt die Wurzelhaut, das sog. Desmodont, aus. Durch diese Struktur findet die Aufhängung des Zahnes in der Alveole im Sinne einer Syndesmose über sog. Sharpey-Fasern statt. Diese kollagenen Faserbündel werden von hochaktiven Fibroblasten gebildet [Schünke et al., 2012, Steiniger et al., 2010].

1.3 Klassifikation der Parodontalerkrankungen

Armitage und Mitarbeiter unterteilten 1999 die Parodontalerkrankungen in acht Hauptgruppen: gingivale Erkrankungen, chronische Parodontitis, aggressive Parodontitis, Parodontitis als Manifestation einer Systemerkrankung, nekrotisierende Parodontalerkrankungen, Parodontalabszesse, Paro-Endo-Läsionen und entwicklungsbedingte oder erworbene Deformationen [Armitage,

1999].

2017 überarbeiteten die EFP (European Federation of Periodontology) und AAP (American Academy of Periodontology) die Klassifikation der Parodontalerkrankungen von 1999 und stellten eine neue Klassifikation vor, welche die neu erlangten Erkenntnisse integriert [Papapanou *et al.*, 2018].

Die neue Klassifikation unterteilt Parodontalerkrankungen in die drei folgenden Krankheitsbilder: nekrotisierende Parodontitis [Herrera *et al.*, 2018], Parodontitis als Manifestation systemischer Erkrankungen [Albandar *et al.*, 2018, Jepsen *et al.*, 2018] und Fälle von Parodontitis, bei denen weder Kennzeichen einer nekrotisierenden Form, noch systemische Erkrankungen vorliegen [Papapanou *et al.*, 2018].

Es wurden Parameter und Kriterien festgelegt, mit deren Hilfe ein „Staging und Grading“ der Parodontitis möglich wird.

Tabelle 1 stellt die Parameter zur Festlegung eines Krankheitsstadiums, im Sinne eines „Staging“, zwischen I-IV dar [Papapanou *et al.*, 2018, Tonetti *et al.*, 2018]. Demnach wird nach Tonetti und Mitarbeitern Stadium I als initiale PA, Stadium II als moderate PA und Stadium III als schwere PA mit Gefahr des weiteren Zahnverlustes bezeichnet. Stadium IV beschreibt eine fortgeschrittene PA mit vorangegangenen ausgedehntem Zahnverlust und Gefahr des Verlustes der gesamten Dentition [Tonetti *et al.*, 2018].

Stadium		Stadium I Initiale PA	Stadium II moderate PA	Stadium III schwere PA	Stadium IV fortgeschrittene PA
Schwere	interdentaler Attachement- verlust	1-2 mm	3-4 mm	≥5 mm	≥5 mm
	radiologischer Knochen- abbau	koronales Drittel (<15%)	koronales Drittel (15%-33%)	bis ins mittlere oder apikale Wurzeldrittel	bis ins mittlere oder apikale Wurzeldrittel
	Zahnverlust	kein Zahnverlust	kein Zahnverlust	Verlust von ≤4 Zähnen	Verlust von ≥5 Zähnen
Komplexität		maximale TST ≤4 mm vorwiegend horizontaler Knochen- abbau	maximale TST ≤5 mm vorwiegend horizontaler Knochen- abbau	zusätzlich zu Stadium II: TST ≥6 mm vertikaler Knochenverlust ≥3 mm Furkationsgrad II oder III moderater Kammdefekt	zusätzlich zu Stadium III: komplexe Rehabilitation notwendig aufgrund gestörter Kaufunktion, sekundärem okklusalen Trauma mit Lockerungsgrad ≥2, schwerer Kammdefekt, Bisskollaps, Zahnwanderung, Auffächerung, weniger als 20 verbleibende Zähne
Ausmaß und Verteilung	als zusätzliche Beschreibung: lokalisiert (<30% der Zähne), generalisiert oder Molaren-/Inzisivenverteilungsmuster				

Tabelle 1: Einteilung der Parodontitis in vier Stadien [Papapanou et al., 2018, Tonetti et al., 2018]

Weiterhin wird zwischen Grad A, B und C bezüglich der Geschwindigkeit der Krankheitsprogression unterschieden. Diese Einteilung ermöglicht das „Grading“ der PA. Hierbei wird der zeitliche Verlauf des radiologischen Knochenabbaus und des klinischen Attachmentverlusts, das prozentuale Verhältnis von Knochenabbau und Alter und die fallspezifische Erscheinungsform berücksichtigt. Zusätzlich werden die Risikofaktoren Rauchen und Diabetes hinzugezogen. Tabelle 2 zeigt die Einteilung in die Grade A-C im Detail [Papapanou et al., 2018, Tonetti et al., 2018].

Grad			Grad A langsame Progression	Grad B moderate Progression	Grad C schnelle Progression
primäre Kriterien	direkter Beweis für Progression	Langzeitdaten (radiologischer Knochen- abbau oder Attachment- verlust)	kein Nachweis über Abbau in den letzten 5 Jahren	<2 mm in den letzten 5 Jahren	≥2 mm in den letzten 5 Jahren
	indirekter Beweis für Progression	% Knochen- verlust/Alter	<0,25	0,25-1,0	>1,0
		fallspezifische Erscheinungs- form	starke Biofilm- ablagerung, geringer Zerstörungs- grad	Zerstörungs- grad der Biofilm- ablagerung angemessen	Zerstörungsgrad überschreitet Erwartung bei gegebenem Biofilm; klinische Hinweise auf schnelle Progression oder frühen Krankheits- beginn (Molaren- /Inzisivenver- teilungsmuster; fehlendes Ansprechen auf antimikrobielle Therapie)
Modifikation		Rauchen	Nicht-Raucher	<10 Zigaretten/Tag	≥10 Zigaretten/Tag
		Diabetes	kein Diabetes/normo- glykämisch	HbA1c <7,0%	HbA1c ≥7,0 %

Tabelle 2: „Grading“ der Parodontitis zur Beurteilung der Geschwindigkeit der Krankheitsprogression [Papapanou et al., 2018, Tonetti et al., 2018]

1.4 Ätiologie

Page und Mitarbeiter stellten ein Modell vor, welches die PA als multifaktorielle Erkrankung beschrieb [Page und Kornman, 1997]. Die für die Erkrankung essentielle Voraussetzung stellt das Vorhandensein eines funktionell und strukturell organisierten Biofilmes dar [Sanz et al., 2017]. Nach Page und Mitarbeitern setzt sich der verursachende subgingivale Biofilm vorrangig aus gramnegativen, anaeroben Bakterien zusammen. Als Hauptverursacher der PA wurden die Spezies *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* (P.g.) und *Tanarella forsythia* angesehen [Page und Kornman, 1997]. Nach heutiger Ansicht entsteht eine Parodontalerkrankung jedoch nicht aufgrund einzelner parodontalpathogener Bakterien oder bestimmter Komplexe, sondern aufgrund

eines aus dem Gleichgewicht geratenen, dysbiotischen Biofilmes [Hajishengallis und Lamont, 2012]. Jedoch ist unumstritten, dass die Anwesenheit und Aktivität bestimmter parodontalpathogener Bakterienspezies eine Voraussetzung für die Entstehung der PA ist. Deren parodontalpathogenes Potenzial beruht einerseits auf dem Stören der Immunfunktion des Wirts und andererseits erhöht ihre Anwesenheit die Pathogenität des gesamten Komplexes.

Neben der bakteriellen Komponente gelten weitere Faktoren als begünstigend für die Entstehung einer Parodontalerkrankung. Nachfolgend werden überblicksweise einige der begünstigenden Faktoren für eine Parodontalerkrankung beschrieben. Man unterscheidet hierbei zwischen beeinflussbaren und nicht beeinflussbaren Faktoren.

1.4.1 Tabakkonsum

Tabakkonsumenten weisen eine erhöhte Prävalenz für Parodontalerkrankungen auf [Albandar *et al.*, 2000]. Daten aus der National Health and Nutrition Examination Survey konnten in den Vereinigten Staaten belegen, dass etwa die Hälfte der Parodontitis-Fälle mit dem Rauchen zusammenhängt. Dies belegt eine starke Assoziation zwischen Tabakkonsum und PA [Tomar und Asma, 2000]. Die Mundgesundheit ehemaliger Raucher ist besser als die von Rauchern, jedoch weisen Patienten, die nie rauchten, die beste Mundgesundheit auf. Weiterhin wurde eine Korrelation zwischen der Intensität der Exposition und der Schwere der Erkrankung festgestellt [Bergström *et al.*, 2000].

1.4.2 Diabetes mellitus

Bei Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 konnten erhöhte Taschensondierungstiefen (TST), vermehrtes Bluten auf Sondierung (BOP= Bleeding On Probing) und mehr fehlende Zähne als bei gesunden Patienten festgestellt werden. Diese Daten legen eine Assoziation von Diabetes mellitus und PA nahe [Campus *et al.*, 2005]. Weiterhin konnte festgestellt werden, dass Patienten, deren Diabetes schlecht eingestellt ist, ein erhöhtes Risiko für Parodontalerkrankungen haben [Pucher und Stewart, 2004, Tsai *et al.*, 2002].

1.4.3 Psychischer Stress

Genco und Mitarbeiter konnten belegen, dass Patienten, welche an Depressionen oder finanziellen Problemen litten, stärkeren Knochenabbau und Attachmentverlust aufwiesen, was für ein erhöhtes PA-Risiko spricht. Bei Frauen, die an einer Stress-induzierten Depression erkrankt waren, konnte ein erhöhtes Kortisol- und IL-6-Level festgestellt werden, was einen möglichen Grund für das erhöhte PA-Risiko darstellen könnte [Johannsen *et al.*, 2006]. Weiterhin fiel auf, dass Patienten mit einer guten Stressbewältigungsstrategie kein erhöhtes Risiko hatten [Genco *et al.*, 1999].

1.4.4 Nicht modifizierbare Risikofaktoren

Eke und Mitarbeiter konnten nachweisen, dass das PA-Risiko auch von nicht beeinflussbaren Faktoren abhängt. Beim männlichen Geschlecht stellte sich eine höhere Prävalenz der PA als bei Frauen dar. Weiterhin konnte ein niedriger sozioökonomischer Status und ein geringes Bildungslevel mit einem erhöhten Risiko für PA in Zusammenhang gebracht werden. Außerdem fand sich eine unterschiedliche Prävalenz je nach ethnischer Herkunft [Eke *et al.*, 2015, Eke *et al.*, 2012].

1.5 Pathomechanismus

Parodontitis wird als wirtsvermittelte chronisch-entzündliche Erkrankung des Zahnhalteapparates verstanden, welche durch einen bakteriellen Biofilm bedingt wird. Die Erkrankung führt zum Verlust von parodontalem Attachment [Tonetti *et al.*, 2018]. Das Vorhandensein einer Gingivitis wird als Voraussetzung für die Entstehung einer Parodontitis angesehen [Chapple *et al.*, 2018]. Die andauernde Konfrontation mit einem Biofilm führt zur Aktivierung des angeborenen und erworbenen Immunsystems, was sich klinisch in Form einer Gingivitis manifestiert und zu reversiblen Schäden des Parodontiums führen kann [Graves *et al.*, 2011]. Im Gegensatz dazu kommt es bei der Parodontitis zur Zerstörung von parodontalem Weichgewebe und Abbau von Alveolarknochen [Hajishengallis, 2014b]. Welche genauen Mechanismen jedoch zur Progression der Gingivitis zu einer Parodontitis führen, ist derzeit noch ungeklärt [Graves *et al.*, 2011].

Histologisch unterschieden Page und Schroeder eine frühe Gingivitis, eine

etablierte Gingivitis und die Parodontitis. Bei Bestehen eines Biofilmes über 8-14 Tage kommt es zur Ausbildung einer frühen Gingivitis. Diese zeichnet sich durch Lymphozytenakkumulation im gingivalen Bindegewebe und Abbau von kollagenem Bindegewebe aus. Das Saumepithel proliferiert im koronalen Bereich bereits nach lateral. Die nächste Stufe entsteht nach etwa 3-4 Wochen und wird als etablierte Gingivitis bezeichnet. Der Kollagenverlust und die laterale Proliferation des Saumepithels schreitet fort und es kann zur Ausbildung von sogenannten Pseudotaschen kommen. Es bestehen deutliche Entzündungszeichen und eine vermehrte Produktion von Sulkusflüssigkeit. Die Zerstörung, welche zu diesem Zeitpunkt bereits vorhanden ist, ist reversibel. Das Fortschreiten der Gingivitis zur Parodontitis ist nicht zwingend notwendig. Bei der Parodontitis kommt es zur Umwandlung des nach apikal proliferierenden Saumepithels zu Taschenepithel und zur Ausbildung echter Parodontaltaschen. Klinisch zeigt sich ein Verlust von parodontalem Weich- und Hartgewebe [Page und Schroeder, 1976, Page und Schroeder, 1982].

1.5.1 Entwicklung eines dentalen Biofilmes

Ein Biofilm definiert sich als Verbund von miteinander interagierenden Mikroorganismen, welche eine Oberfläche besiedeln und dort in eine Matrix aus extrazellulären polymeren Substanzen eingebettet sind [Hojo *et al.*, 2009, Kolenbrander *et al.*, 2002, Sanz *et al.*, 2017]. Innerhalb des Biofilmes sind die Bakterien unempfindlicher gegenüber äußeren Einflüssen [Bradshaw *et al.*, 1998]. Die Zusammensetzung des Biofilmes unterscheidet sich je nach Lokalisation [Marsh und Bradshaw, 1995] und je nachdem, ob ein Krankheitsherd vorliegt [Sanz *et al.*, 2017]. Das historische Verständnis von Bakterien als Pathogene wird von der Ansicht abgelöst, dass der kommensale Biofilm maßgeblich zur regelrechten Funktion und Gesundheit des parodontalen Gewebes beiträgt. Beim Vorliegen einer Parodontalerkrankung zeichnet sich der Biofilm dagegen durch einen Wechsel der vorwiegend grampositiven Bakterien zu überwiegend gramnegativen anaeroben Bakterien aus [Roberts und Darveau, 2002].

Die Voraussetzung für die Entstehung eines dentalen Biofilmes ist ein tertiäres Schmelzoberhäutchen, auch als Pellikel bezeichnet, welches direkt nach dem Putzen der Zähne aus Speichelglykoproteinen entsteht [Huang *et al.*, 2011, Marsh und Bradshaw, 1995]. Nachfolgend kommt es zur reversiblen Bindung von Bakterien an das erworbene Schmelzoberhäutchen [Huang *et al.*, 2011]. Zu den

frühen Kolonisierern zählen Streptokokken, Aktinomyzeten und Veillonellen [Kolenbrander *et al.*, 2002, Kolenbrander und London, 1993, Ritz, 1967]. *Fusobacterium nucleatum* nimmt die Rolle als Brückenkeim ein, aufgrund seiner Fähigkeit sowohl mit Früh- als auch mit Spätbesiedlern Bindungen einzugehen [Kolenbrander *et al.*, 1989]. Während der Reifung des Biofilmes lagern sich Bakterien wie *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* und *Treponema denticola* an [Kolenbrander *et al.*, 2002, Moore und Moore, 1994]. Die zuletzt genannten Bakterien werden auch als Hauptpathogene in der Pathologie der Parodontalerkrankungen angesehen [Sanz *et al.*, 2017]. Bei vorliegender Parodontitis erweitert sich das Spektrum der im Biofilm vorhandenen Bakterien, darunter weniger gängige Bakterientaxa wie *Anaeroglobus*, *Bulleidia*, *Desulfobulbus*, *Filifactor*, *Mogibacterium*, *Phocaeicola*, *Schwartzia* und *TM7* [Camelo-Castillo *et al.*, 2015].

1.5.2 Parodontalpathogene Bakterien

Socransky und Mitarbeiter stellten fünf Bakterienkomplexe vor, welche sich in subgingivalem Biofilm bilden. Der rote Komplex, bestehend aus *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* und *Treponema denticola*, zeigt eine starke Assoziation zu dem orangenen Komplex, welcher unter anderem von *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens*, *Peptostreptococcus micros* und *Campylobacter rectus* gebildet wird. Der Bakterienkomplex aus *Eikenella corrodens*, *Campylobacter concisus* und *Agreggatibacter actinomycetemcomitans* des Serotyp A wird als grüner Komplex bezeichnet. Eine Gruppe von Streptokokken, darunter *Streptococcus mitis*, *Streptococcus oralis* und *Streptococcus sanguis*, bilden den gelben Komplex. *Actinomyces odontolyticus* und *Veillonella parvula* lagern sich zu dem violetten Komplex zusammen. *Agreggatibacter actinomycetemcomitans* des Serotyp B und *Actinomyces oris* bilden mit keinem der anderen Mikroorganismen Komplexe. Es wurde beobachtet, dass eine Kolonisation von parodontalen Taschen mit Mikroorganismen des orangenen Komplexes einer Besiedelung mit Bakterien des roten Komplexes vorausgeht [Socransky *et al.*, 1998].

Dieses Modell der Bakterienkomplexe wird auch heute noch akzeptiert, wobei es neuere Konzepte gibt, welche Zweifel an dem vorliegenden Modell aufkommen lassen [Hajishengallis und Lamont, 2012], da die Vielfalt der beteiligten Mikroorganismen weitaus größer zu sein scheint, als damals angenommen [Curtis

et al., 2011, Dewhirst *et al.*, 2010]. Aufgrund der Fortschritte im Bereich der Mikrobiologie und der Techniken der Molekularbiologie kann heute der verursachende Biofilm genauer untersucht und klassifiziert werden. Dennoch werden die Bakterien des roten Komplexes und *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* als wichtige Pathogene der Parodontalerkrankung angesehen, da sie einerseits die angeborene Immunantwort verändern oder sogar unterdrücken können [Darveau, 2010] und zur Zerstörung des Parodontiums führen [Holt und Ebersole, 2005, Schreiner *et al.*, 2013, Sharma *et al.*, 2005].

1.5.2.1 *Porphyromonas gingivalis*

Porphyromonas gingivalis ist ein gramnegatives, obligat anaerobes unbewegliches Stäbchenbakterium, welches sich aufgrund des vorhandenen Protohäms schwarz färbt [Cutler *et al.*, 1995, Holt *et al.*, 1999]. *Porphyromonas gingivalis* produziert eine Reihe von Virulenzfaktoren, welche sowohl zur Zerstörung von Gewebe, als auch zur Umgehung der Immunreaktion dienen [Holt *et al.*, 1999].

Porphyromonas gingivalis verfügt über eine Kapsel, welche das Bakterium vor Phagozytose schützt [Holt *et al.*, 1999, Wolf *et al.*, 2004]. Weiterhin produziert es toxische Lipopolysaccharide (LPS), kann in das Gewebe invadieren und produziert Kollagenasen und Proteasen [Wolf *et al.*, 2004]. Eine besondere Rolle unter den Proteasen nehmen Gingipaine ein, welche Cysteinproteasen sind und in Lysin-spezifisch und Arginin-spezifisch unterteilt werden [Curtis *et al.*, 2001]. Sie haben beispielsweise die Fähigkeit die Komplementfaktoren C3 und C5 abzubauen [Wingrove *et al.*, 1992] und setzen so die Wirtsimmunität herab [Wolf *et al.*, 2004]. Ein weiterer wichtiger Pathogenitätsfaktor ist die Hemmung der Migration von neutrophilen Granulozyten (PMN) [Madianos *et al.*, 1997].

1.5.2.2 *Tannerella forsythia*

Bacteroides forsythia ist ein gramnegatives obligat anaerobes fusiformes Bakterium [Tanner *et al.*, 1986], welches erstmals 1979 aus parodontalen Taschen isoliert wurde [Tanner *et al.*, 1979]. 2002 klassifizierten Sakamoto und Mitarbeiter das Bakterium neu und nannten es *Tannerella forsythia*, da es nicht der *Bacteroides*-Spezies untergeordnet werden konnte [Sakamoto *et al.*, 2002]. Auch dieses Bakterium findet sich vermehrt in Parodontaltaschen von Parodontitis-Patienten [Ximénez-Fyvie *et al.*, 2000] und produziert dort eine Reihe von Proteasen [Holt und

Ebersole, 2005]. Dazu gehört eine Sialidase [Ishikura *et al.*, 2003], eine Cystein-Protease (Pr^tH) [Saito *et al.*, 1997] und ein Matrix-Metalloprotease-ähnliches Enzym, welches als Karilysin bezeichnet wird [Karim *et al.*, 2010]. In einer In-vitro-Studie bewiesen Koziel und Mitarbeiter, dass Karilysin fähig ist, die bakterizide Aktivität des AMP LL-37 zu hemmen und LPS aus dem LL-37/LPS-Komplex zu lösen [Koziel *et al.*, 2010].

1.5.2.3 *Treponema denticola*

Treponema denticola ist gramnegativer obligat anaerober Vertreter der Spirochäten, genauer der oralen Spirochäten [Holt und Ebersole, 2005, Seshadri *et al.*, 2004]. Das Bakterium besitzt eine Trypsin-ähnliche Protease [Ohta *et al.*, 1986], eine Chymotrypsin-ähnliche Protease [Uitto *et al.*, 1988] und eine prolinspezifische Aminopeptidase. Weiterhin ist es *Treponema denticola* möglich, Kollagen und Gelatine abzubauen [Marsh und Martin, 2003]. *Treponema denticola* ist zytotoxisch [Ishihara, 2010] und widersteht einem Angriff durch die AMPs Human- β -Defensin 1 (h β D-1) und Human- β -Defensin 2 (h β D-2) [Brissette und Lukehart, 2002].

1.5.2.4 *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

Aggregatibacter actinomycetemcomitans ist ein gramnegatives fakultativ anaerobes oder kapnophiles Stäbchen [Herbert *et al.*, 2016, Marsh und Martin, 2003, Wolf *et al.*, 2004]. Es sind die sieben Serotypen a-g bekannt, welche durch Polysaccharide, die sich auf der Oberfläche des Bakteriums befinden, bestimmt werden [Kittichotirat *et al.*, 2011, Takada *et al.*, 2010]. Die verschiedenen Subtypen verfügen über unterschiedliche Virulenzpotenziale [Kittichotirat *et al.*, 2011, Wolf *et al.*, 2004]. Das Bakterium produziert eine Reihe von Virulenzfaktoren, darunter das potente Leukotoxin, welches PMN abtötet [Marsh und Martin, 2003, Wolf *et al.*, 2004] und mit aggressiver Parodontitis in Zusammenhang gebracht wird [Bueno *et al.*, 1998]. Weitere Virulenzfaktoren sind das Endotoxin LPS, immunsupprimierende Faktoren, Kollagenasen, Proteasen und Invasine [Marsh und Martin, 2003, Wolf *et al.*, 2004].

1.5.3 Immunantwort

Auf eine Besiedelung mit parodontalpathogenen Bakterien reagiert das

Immunsystem mit einer Reihe von Abwehrmechanismen, um den Ausbruch beziehungsweise das Fortschreiten der Parodontitis zu stoppen.

Die Immunantwort des Wirts umfasst die angeborene Immunantwort und die erworbene Immunantwort, welche zeitverzögert eintritt [Rassow *et al.*, 2016]

Eine bedeutende Rolle in der angeborenen Immunabwehr des Wirts nimmt das Komplementsystem ein. Das Komplementsystem als humoraler Faktor des angeborenen Immunsystems wird bei Stimulation mit einem bakteriellen Endotoxin, wie zum Beispiel Lipopolysaccharide, aktiviert und führt letztendlich zur Lyse der angegriffenen Zelle. Außerdem können Fragmente des Komplementsystems, vor allem der Faktor C5a, Pathogene opsonieren und so für die Phagozytose vorbereiten [Rassow *et al.*, 2016]. Abbildung 2 stellt die beiden verschiedenen Wege der Aktivierung des Komplementsystems dar.

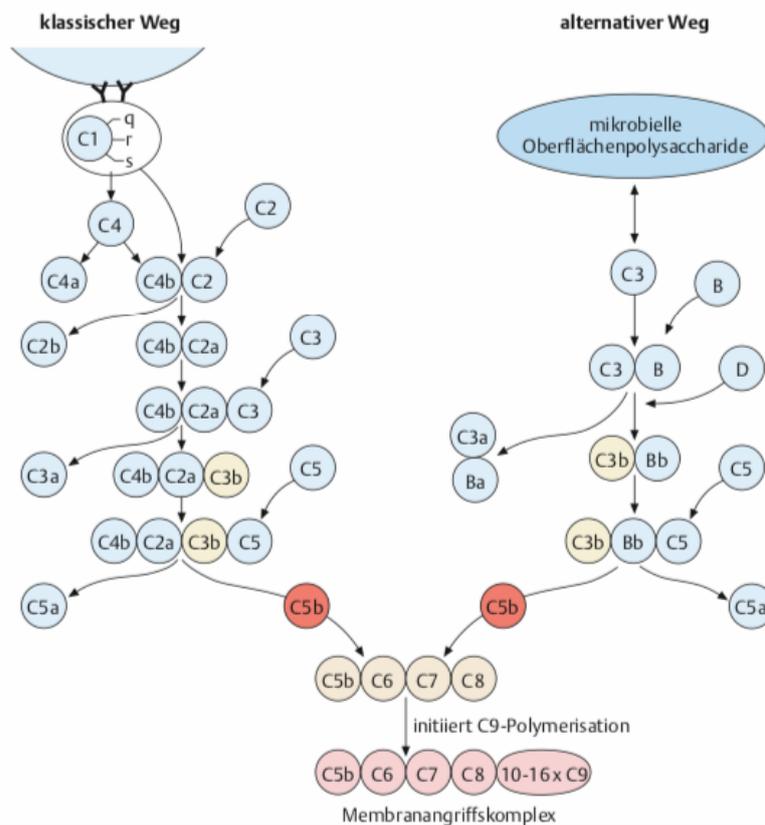


Abbildung 2: klassischer und alternativer Weg der Komplementaktivierung [Behrends *et al.*, 2012]

Die Migration von neutrophilen Granulozyten aus dem gingivalen Gewebe in den Sulkus stellt den ersten Mechanismus der angeborenen zellulären Immunabwehr dar [Wolf *et al.*, 2004]. Dieser Mechanismus ist stark reguliert [Tonetti, 1997]. Tonetti und Mitarbeiter konnten beweisen, dass ein Gradient des Zelladhäsionsmoleküls ICAM-1, welcher innerhalb des Saumepithels in Richtung des gingivalen Sulkus

verläuft, ein wichtiger Regulationsmechanismus der Migration von PMNs darstellt. Auch die vermehrte Expression von Interleukin 8 (IL) erleichtert die Migration der PMNs aus dem Saumepithel in den Sulkus [Tonetti, 1997, Tonetti *et al.*, 1994, Tonetti *et al.*, 1998]. Weitere chemotaktische Faktoren sind Fragmente des Komplementsystems, insbesondere C5a, Fenylopeptide und Leukotrien B4 [Rassow *et al.*, 2016, Tonetti, 1997, Wolf *et al.*, 2004]. Desweiteren gelten bakterielle Stoffwechselprodukte, Zytokine, Chemokine und Komplementfaktoren als rekrutierende Faktoren für Leukozyten [Graves, 2008]. Im Sulkus nehmen die PMNs die opsonierten Mikroorganismen durch Phagozytose auf und töten sie durch lysosomale Enzyme ab. Die Opsonierung der Mikroorganismen kann beispielsweise durch das Komplementsystem stattfinden. Daraufhin werden die Abbauprodukte und Mediatoren freigesetzt [Rassow *et al.*, 2016]. Eine weitere wichtige Rolle in der zellulären Immunabwehr spielen Makrophagen, genauer Langerhans-Zellen, welche ein Bindeglied zwischen der angeborenen und der erworbenen Immunantwort darstellen [Sanz *et al.*, 2017, Wolf *et al.*, 2004]. Nach der Phagozytose präsentieren sie auf ihrer Oberfläche mittels des MHC-II-Rezeptors Antigene für T- und B-Zellen des erworbenen Immunsystems. Sowohl bei Makrophagen als auch bei PMNs folgt die Sekretion von Entzündungsmediatoren, darunter Interleukine, insbesondere IL-1, IL-6 und IL-8, und Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF- α) [Rassow *et al.*, 2016]. Die Expression proinflammatorischer Zytokine spielt außerdem eine besondere Rolle in der Regulation des Knochenabbaus. Es wird angenommen, dass eine Änderung des Verhältnisses von Osteoprotegerin (OPG) und Receptor Activator of NF- κ B Ligand (RANKL) zu Gunsten von RANKL, zu Knochenabbau bei Parodontalerkrankungen führt [Cochran, 2008, Nagasawa *et al.*, 2007]. RANKL aktiviert den NF- κ B-Signalweg von Osteoklasten und deren Vorläuferzellen, was der Initiierung und Aufrechterhaltung der Entzündung dient. Dieser Transkriptionsfaktor reguliert Gene, welche in der Entzündungsreaktion involviert sind, hoch [Boyce *et al.*, 2015, Karin und Greten, 2005]. Er führt unter anderem zur vermehrten Expression von Zytokinen, Chemokinen, Zelladhäsionsmolekülen und Cyclooxygenase-2 [Moynagh, 2005]. Der Transkriptionsfaktor findet sich überwiegend im Zytoplasma von Zellen und wird dort durch die I κ B-Proteine inhibiert, welche an den Transkriptionsfaktor gebunden sind [Ghosh *et al.*, 1998]. Die Aktivierung des NF- κ B-Signalweges geht dabei mit einer Degradation der I κ B-Proteine einher, was durch Phosphorylierung der I κ B-Proteine durch das Enzym I κ B-Kinase geschieht

und somit den Transkriptionsfaktor freisetzt und dessen Aktivität im Zellkern erlaubt [Moynagh, 2005, Yamamoto und Gaynor, 2004]. Die folgende Abbildung 3 stellt den Signalweg des Transkriptionsfaktors schematisch dar.

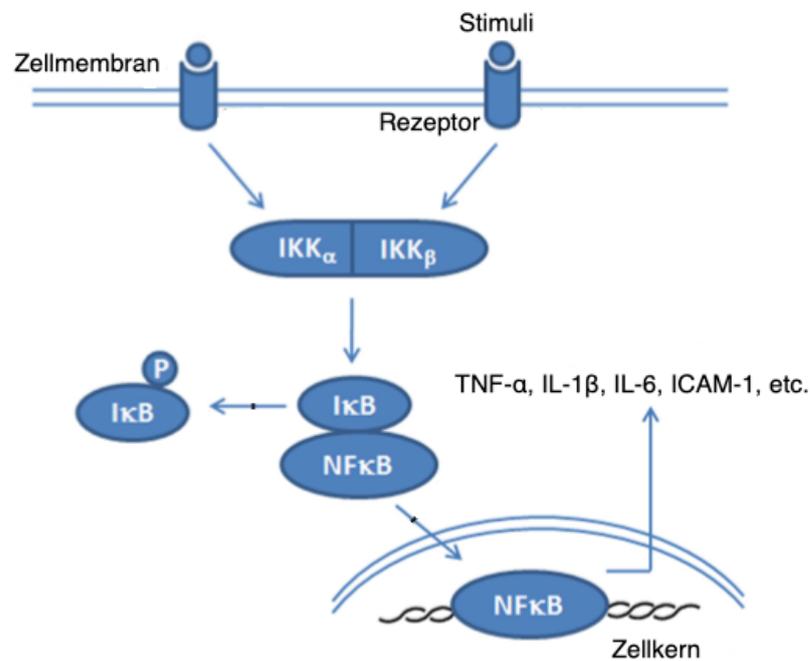


Abbildung 3: Schematische Darstellung des NF- κ B-Signalweges (IKK: I κ B-Kinase, P: Phosphorylierung des Proteins) [Guo et al., 2012]

RANKL bindet an die RANK-Rezeptoren auf Osteoklasten-Vorläuferzellen und fördert deren Differenzierung zu Makrophagen-ähnlichen Zellen, welche durch Sekretion von Enzymen zum Knochenabbau beitragen. Bei Vorliegen von gesunden Verhältnissen ist das Verhältnis des Knochen-erhaltenden OPG, welches das Binden von RANKL an RANK-Rezeptoren verhindert und RANKL ausgeglichen. Die Produktion von RANKL wird durch proinflammatorische Zytokine wie IL-1 β und TNF hochreguliert, wodurch ein Missverhältnis entsteht [Darveau, 2010].

Die Zerstörung des gingivalen Gewebes erfolgt vorwiegend durch Matrixmetalloproteasen (MMPs), welche, durch IL-17 stimuliert, von Fibroblasten und PMNs sezerniert werden [Hajishengallis, 2014a, Wolf et al., 2004].

1.6 Antimikrobielle Peptide

In letzter Zeit wurde die Rolle von AMPs in der angeborenen Abwehr erforscht. Es lassen sich eine Vielzahl von AMPs im Speichel und in der Sulkusflüssigkeit nachweisen. Manchen AMPs wird sowohl eine bakterizide, als auch anti-entzündliche Wirkung in Reaktion auf bakterielle Toxine zugesprochen [Gorr und

Abdolhosseini, 2011].

Antimikrobielle Peptide sind ein wichtiger Bestandteil der angeborenen Infektionsabwehr [Gordon *et al.*, 2005, Yeaman und Yount, 2003]. Aktuell sind etwa 500 verschiedene Peptidstrukturen bekannt [Zasloff, 2002]. Es handelt sich um kationische Peptide, welche aus 12-45 Aminosäureresten bestehen [Hancock, 1997, Hancock und Lehrer, 1998]. Deren starkes antimikrobielles Potential ist wirksam gegen gramnegative und grampositive Bakterien, Pilze, Parasiten und einige Viren [Hancock, 1997, Hancock und Lehrer, 1998, Zasloff, 2002]. Es wird angenommen, dass die Produktion der Peptide entweder konstitutiv oder in Reaktion auf vorliegende Infektionen erfolgt [Hancock und Lehrer, 1998]. Unter den bekannten AMPs besteht eine große Vielfalt im Aufbau der Peptide, wobei ein gemeinsames strukturelles Merkmal der AMPs der amphiphile Aufbau ist [Zasloff, 2002]. Einige dieser Peptide sind als α -Helix-Struktur aufgebaut, andere sind als β -Faltblatt zusammengesetzt [Hancock und Lehrer, 1998]. Ein Merkmal, welches allen AMPs gemein ist, ist ihre Entstehung aus Prä-Peptiden, welchen ein Signalpeptid angehängt ist. Durch eine Reihe von posttranslationalen Modifikationen entstehen letztendlich fertige AMPs [Zasloff, 2002].

1.6.1 Funktionsmechanismen

AMPs weisen unterschiedliche Mechanismen auf, welche zur Zerstörung einer Zelle, im Speziellen eines Bakteriums, führen können. Da die Oberfläche eukaryotischer Zellen im Gegensatz zu prokaryotischen Zellen nicht über eine negative Nettoladung verfügt, haben AMPs, welche positiv geladen sind, lediglich eine sehr geringe Affinität zu eukaryotischen Zellen [Zasloff, 2002]. Zu Beginn müssen die AMPs von der Bakterienoberfläche angezogen werden, was vor allem durch elektrostatische Bindungen zwischen anionischen und kationischen Peptiden geschieht. Die kationischen antimikrobiellen Peptide werden von der anionischen Ladung gramnegativer Bakterien angezogen, welche diese durch die Phosphatgruppen der LPS oder durch anionische Phospholipide auf der Oberfläche der Bakterien erhalten. Bei grampositiven Bakterien geschieht dies über Teichonsäure in der Zellwand. Nachdem die AMPs die für die Bindung störenden Oberflächenstrukturen der Bakterien überwunden haben, kann die Interaktion mit der Lipiddoppelschicht der Bakterienmembran stattfinden [Brogden, 2005]. Der Verbund mit der Lipiddoppelschicht erfolgt in Abhängigkeit von der Konzentration der AMPs parallel oder aufrecht zur Bakterienoberfläche [Yang *et al.*, 2001]. Bei

hoher Konzentration dringen die AMPs in aufrechter Position in die Lipiddoppelschicht ein und bilden eine Pore, wobei zwischen drei verschiedenen Mechanismen unterschieden wird [Brogden, 2005].

Im sogenannten „barrel-stave“-Modell ordnen sich die aufrechtstehenden Peptide so an, dass der hydrophobe Teil mit den Lipiden der Lipiddoppelschicht der Membran interagiert und der hydrophile Teil der Peptide zum Lumen der Pore weist [Oren und Shai, 1998]. Diesen Mechanismus machen sich α -Helix-Peptide zunutze [Shai, 1999]. Abbildung 4 stellt den Mechanismus der Porenbildung schematisch dar.

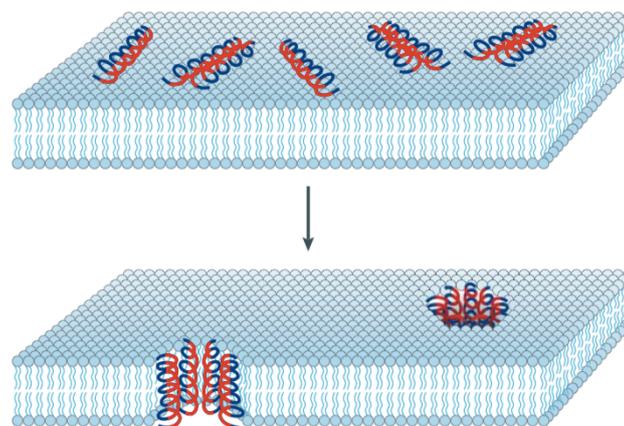


Abbildung 4: Schematische Darstellung des „barrel-stave“-Modells der Porenbildung von α -Helix-Peptiden [Brogden, 2005]

Das „carpet“-Modell beschreibt einen Mechanismus, bei dem die Peptide sich auf der Oberfläche des Mikroorganismus sammeln und einen „Teppich“ bilden [Oren und Shai, 1998]. Beim Vorliegen hoher Peptidkonzentrationen perforieren die Peptide die Membran, wobei keine Bindung zwischen Peptid und Membran zustande kommt [Shai, 1999]. Durch die unterbrochene Lipiddoppelschicht können sich die Peptide nun auch auf der Innenseite der Membran sammeln [Piers *et al.*, 1994, Piers und Hancock, 1994]. Es kommt zur Bildung von Peptid-Lipid-Mizellen einzelner Abschnitte der ehemaligen Bakterienmembran [Bechinger, 1999]. Abbildung 5 erklärt bildlich die Funktionsweise des „carpet“-Modells und der folgenden Mizellenbildung.

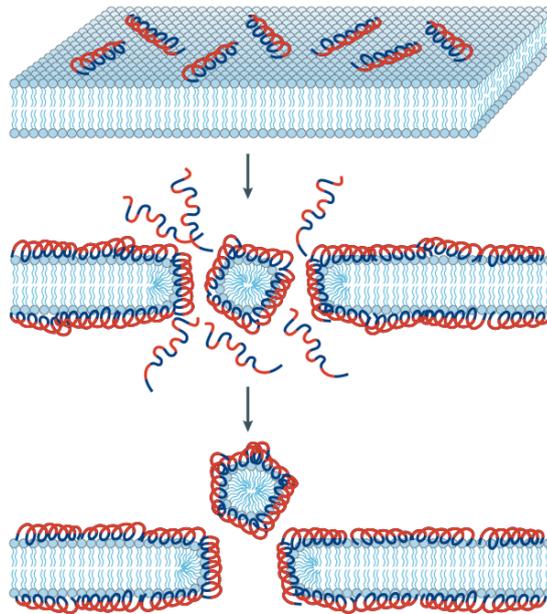


Abbildung 5: Schematische Darstellung des „carpet“-Modells antimikrobieller Peptide mit Bildung von Peptid-Lipid-Mizellen [Brogden, 2005]

Der dritte Mechanismus wird als „toroidal“-Modell beschrieben und wird ebenfalls von α -Helix-Peptiden genutzt [Brogden, 2005]. Der Name dieses Modelles ergibt sich aus der Art und Weise, wie die mit den apolaren Köpfchen der Lipiddoppelschicht verbundenen Peptide die Membran ringförmig aufbiegen. Somit weist der polare Teil der Peptide und die Lipidköpfchen der Membran zur Innenseite der Pore und der apolare Teil der Peptide weist in Richtung der polaren Köpfchen der Lipiddoppelschicht [Yang *et al.*, 2001]. Abbildung 6 stellt den Ablauf der Porenbildung des „toroidal“-Modells dar.

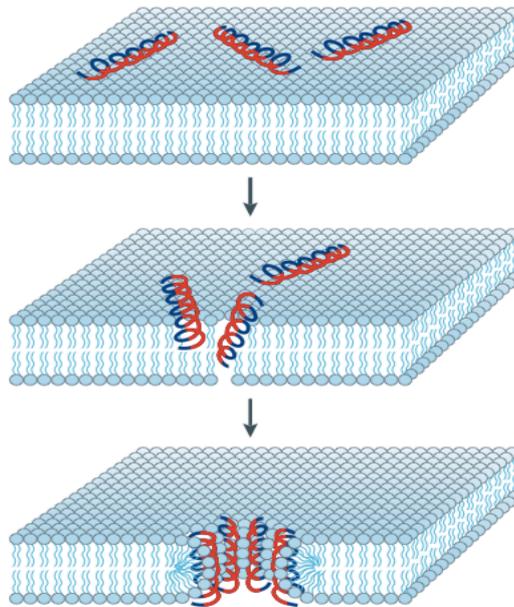


Abbildung 6: Schematische Darstellung des „toroidal“-Modells antimikrobieller Peptide zur Bildung einer Pore [Brogden, 2005]

Neben der Unterbrechung der Membran können AMPs auch durch Störung intrazellulärer Mechanismen der bakteriellen Zielzelle zur Abwehr beitragen [Brogden, 2005]. Dafür perforieren die AMPs zuerst die Membran, ohne sie jedoch durchlässig zu machen [Park *et al.*, 2000]. Im Zytoplasma der Zelle können die Peptide dann die Synthese der Zellwand, die Nukleinsäuresynthese und die Proteinsynthese stören. Außerdem gibt es AMPs, die die enzymatische Aktivität hemmen und die Anordnung der Zytoplasmamembran verändern können [Brogden, 2005].

Je nach Aufbau und Konfiguration des AMPs verwendet es unterschiedliche Mechanismen zum Abtöten der Zielzelle [Shai, 1999].

1.6.2 Orale antimikrobielle Peptide

Das Epithel der Mundhöhle ist konstant Bakterien und anderen potentiellen Pathogenen wie Pilzen oder Viren ausgesetzt. Dabei übernimmt das Epithel selbst die Rolle als mechanische Schutzbarriere gegenüber einem Angriff durch die Pathogene. Jedoch tragen auch eine Reihe von AMPs als Teil der angeborenen Immunantwort zur Aufrechterhaltung der Gesundheit beziehungsweise Bekämpfung einer Infektion im Mundraum bei [Dale und Fredericks, 2005, Dale *et al.*, 2001, Weinberg *et al.*, 1998]. Die Produktion der AMPs übernehmen je nach Peptid unterschiedliche Zellen. Die für die oral exprimierten AMPs bedeutenden Zellen sind Epithelzellen und PMNs. Jedoch produzieren auch die Speicheldrüsen

einige AMPs und somit lassen sich bestimmte Peptide auch im Speichel feststellen [Dale und Fredericks, 2005, Dale *et al.*, 2001, Khurshid *et al.*, 2016]. Für die Produktion der antimikrobiellen Peptide sind je nach Art des Peptides entweder Azinuszellen oder duktale Zellen, oder auch beide, verantwortlich [Murakami *et al.*, 2002, Sahasrabudhe *et al.*, 2000].

Die für die Aufrechterhaltung der oralen Gesundheit wichtigsten AMPs sind α -Defensine, β -Defensine, Cathelicidin (LL-37), Histatine und Adrenomedullin [Khurshid *et al.*, 2016].

1.6.2.1 *Defensine*

Defensine sind kationische Peptide, deren β -Faltblatt-Struktur reich an den Aminosäuren Arginin und Cystein ist und durch drei Disulfidbrücken, welche die Cysteinreste miteinander verbinden, stabilisiert wird [Ganz, 2003, White *et al.*, 1995]. Die in der Mundhöhle exprimierten Defensine sind den α - und β -Defensinen zuzuordnen [Khurshid *et al.*, 2016].

α -Defensine werden von PMNs, welche bei aktiver Immunantwort das Saumepithel durchwandern, produziert [Dale *et al.*, 2001]. Man unterscheidet zwischen vier verschiedenen α -Defensinen, welche als „human neutrophile peptides“ (HNP) bezeichnet werden und von 1-6 nummeriert werden, wobei nur HNP1-4 in der Mundhöhle exprimiert werden [Khurshid *et al.*, 2016, Wang *et al.*, 2016]. Die HNPs der Mundhöhle haben eine Länge von 29-33 Aminosäuren [Wang *et al.*, 2016]. Der strukturelle Aufbau der α -Defensine wird in Abbildung 7 durch einen Stellvertreter, HNP-3, verdeutlicht. HNP 1 ist wirksam gegen gramnegative und grampositive Bakterien, Viren, Pilze und Parasiten und wirken chemotaktisch. HNP 2-4 wirken dagegen nur gegen gramnegative und grampositive Bakterien, Viren und Pilze [Wang *et al.*, 2016].

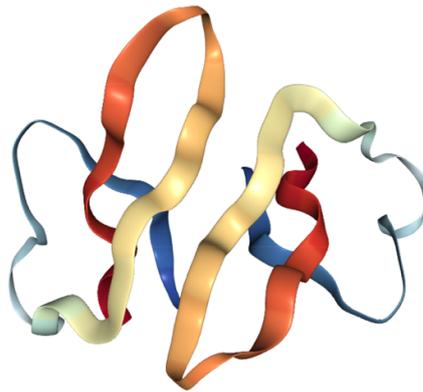


Abbildung 7: dreidimensionale Struktur von HNP-3 stellvertretend für α -Defensine, generiert mit dem PBD 3D-Viewer [Berman *et al.*, 2000]

β -Defensine werden von den suprabasalen Schichten des mehrschichtigen oralen Epithels der Mundhöhle, Sulkusepithel und nicht von Saumepithel exprimiert [Dale *et al.*, 2001]. Vor einiger Zeit konnte auch die Produktion durch gingivale Fibroblasten (HGFs) bewiesen werden [Dommisch *et al.*, 2012, Rizzo *et al.*, 2008]. Die in der Mundhöhle exprimierten β -Defensine umfassen h β D-1-4, wobei sich h β D-4 als neues Mitglied der oralen β -Defensine herausgestellt hat [Li *et al.*, 2016]. Die β -Defensine sind etwas größer als α -Defensine und haben eine andere Aminosäuresequenz, unterscheiden sich jedoch kaum im dreidimensionalen Aufbau, da sie ebenfalls über drei Disulfidbrücken verfügen. Sie setzen sich aus 36-47 Aminosäuren zusammen [De Smet und Contreras, 2005]. Abbildung 8 stellt die dreidimensionale Struktur von h β D-1, stellvertretend für die β -Defensine, dar. Je nach Peptidstruktur wirken die oralen β -Defensine h β D-1-4 gegen gramnegative und grampositive Bakterien, antiviral und fungizid [Wang *et al.*, 2016].

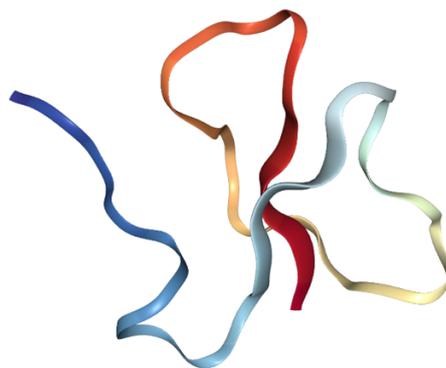


Abbildung 8: dreidimensionaler Aufbau des antimikrobiellen Peptids h β D 1 als Stellvertreter der β -Defensine, generiert mit dem PBD 3D-Viewer [Berman *et al.*, 2000]

1.6.2.2 Cathelicidin LL-37

LL-37 ist das einzige menschliche Cathelicidin [Gudmundsson *et al.*, 1996]. Die Bezeichnung LL-37 setzt sich zusammen aus den Anfangsbuchstaben der ersten beiden Aminosäuren, zweimal Leucin, und der Gesamtanzahl der Aminosäuren aus denen sich das AMP zusammensetzt [Gudmundsson *et al.*, 1996, Wang *et al.*, 2016]. Die Struktur des AMP ist linear, da LL-37 keine Cysteinreste besitzt und somit keine Disulfidbrücken gebildet werden [De Smet und Contreras, 2005]. In hydrophiler Umgebung besitzt das Peptid keine erkennbare Sekundärstruktur, wohingegen es in hydrophober Umgebung eine α -Helix-Struktur aufweist [Turner *et al.*, 1998]. Abbildung 9 bildet die Struktur von LL-37 in hydrophober Umgebung ab.

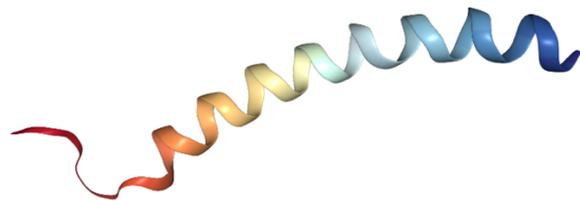


Abbildung 9: α -helikale Struktur des antimikrobiellen Peptids LL-37 in hydrophober Umgebung, generiert mit dem PBD 3D-Viewer [Berman *et al.*, 2000]

In der Mundhöhle wird es bei Bedarf von Sulkusepithel, Saumepithel und PMNs freigesetzt [Dale *et al.*, 2001]. LL-37 leitet sich durch Proteolyse aus seinem Propeptid hCAP-18 ab, wobei sowohl ein Cathelin als auch das antimikrobielle Peptid entstehen [Turner *et al.*, 1998]. Es ist wirksam gegen gramnegative und grampositive Bakterien, Pilze, Viren und Parasiten [Wang *et al.*, 2016]. Weiterhin wirkt es chemotaktisch auf PMNs, Monozyten und T-Zellen [De *et al.*, 2000] und bindet an LPS um es zu neutralisieren [Bals *et al.*, 1999].

1.6.2.3 Histatine

Histatine werden im Gegensatz zu den anderen AMPs nur im Speichel vorgefunden, da sie von den Gangzellen von Glandula submandibularis und Glandula parotidea synthetisiert werden [van der Spek *et al.*, 1989]. Es handelt sich dabei um kationische Peptide, welche reich an Histidin sind und mindestens 12 verschiedene Untergruppen aufweisen. Auch dieses Peptid liegt in hydrophiler Umgebung

ungeordnet vor und organisiert sich in hydrophober Umgebung als α -Helix [Raj *et al.*, 1998]. Die wichtigsten der Histatine sind His-1, -3 und -5, da sie etwa 85% der Produktion ausmachen [Dale und Fredericks, 2005]. His-1, -3 und -5 bestehen aus 38, 32 und 24 Aminosäuren. Die restlichen Histatine entstehen durch proteolytische Abspaltung von His-1, -3 und -5 [Khurshid *et al.*, 2016]. Xu und Mitarbeiter konnten zeigen, dass alle drei Histatine fungizid gegenüber *Candida albicans* wirkten, wohingegen das antimikrobielle Potential bei His-5 am stärksten ausgeprägt war. His-1 wies lediglich ein sehr geringes antimikrobielles Potential auf [Xu *et al.*, 1991].

1.6.2.4 Adrenomedullin

Adrenomedullin ist ein kationisches Peptid, welches aus 52 Aminosäuren besteht [Wang *et al.*, 2016] und durch proteolytische Abspaltung aus einem Protein, bestehend aus 185 Aminosäuren, entsteht [Gorr, 2009]. Das AMP verfügt über eine intramolukulare Disulfidbrücke [Dale und Fredericks, 2005]. Die dreidimensionale Struktur entspricht einer α -Helix [Wang *et al.*, 2016]. Die Wirkung des AMPs umfasst die antibakterielle Aktivität gegen gramnegative und grampositive Bakterien von Haut, Mundhöhle, Magen und der Atemwege [Allaker und Kapas, 2003]. Adrenomedullin findet sich in der Mundhöhle in der gingivalen Sulkusflüssigkeit und Speichel und wird zusätzlich zu der Produktion der Gangzellen der Speicheldrüsen auch von oralen Epithelzellen produziert [Gorr, 2009, Kapas *et al.*, 2001].

1.7 Expressionsverhalten von Zytokinen, antimikrobiellen Peptiden und Transkriptionsfaktoren oraler Zellkulturen bei bakterieller Stimulation

Um Parodontitis als chronisch entzündliche Erkrankung grundlegend zu verstehen, ist es notwendig, die primäre Immunreaktion verschiedener Zellen bei Infektion mit parodontalpathogenen Bakterien zu kennen. Mit dieser grundlegenden Fragestellung beschäftigten sich in der Vergangenheit verschiedene Studien.

1.7.1 Expression von IL-6 und IL-8

Yumoto und Mitarbeiter konnten in einer *in vitro*-Studie eine Grundaktivität der Produktion von IL-6 und IL-8 einer Plattenepithelkarzinomzelllinie feststellen. Bei Inkubation der Zellen mit dem Bakterium *Eikenella corrodens* für 8 h waren die gemessenen Konzentrationen von IL-6 und IL-8 deutlich höher als in der

Negativkontrolle [Yumoto *et al.*, 1999]. Uchida und Mitarbeiter infizierten humane gingivale Epithelzellen und humane Gingivafibroblasten mit *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. Dabei konnte abhängig von der Konzentration des Bakteriums eine vermehrte Sekretion der Epithelzellen von IL-8, aber nicht von IL-6 gemessen werden. Hierbei konnten nur geringfügige Unterschiede der Konzentration festgestellt werden, wenn *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* zuerst hitzeinaktiviert wurde. Die Fibroblasten dagegen sezernierten sowohl IL-8, als auch IL-6 vermehrt [Uchida *et al.*, 2001]. Bei Infektion primärer menschlicher Epithelzellen mit lebenden *Porphyromonas gingivalis* wurden dagegen weder IL-6 noch IL-8 vermehrt sezerniert. Andere Pathogene wie *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Fusobacterium nucleatum* oder hitzeinaktivierte *Porphyromonas gingivalis* stimulierten die Produktion der Zytokine deutlich [Stathopoulou *et al.*, 2009]. Bei Stimulation einer KB-Zelllinie und Primärkulturen von Parodontaltaschenepithel mit *Porphyromonas gingivalis* wurde ebenfalls eine starke Induktion der Produktion der Zytokine beobachtet [Sandros *et al.*, 2000]. Yee und Mitarbeiter untersuchten die Reaktion von zwei verschiedenen Plattenepithelkarzinomzelllinien und einer Art von Epithelzelle auf *Porphyromonas gingivalis*. Sie schlussfolgerten, dass die Produktion von IL-6 und IL-8 für jeden Zelltyp gesondert betrachtet werden sollte, da *Porphyromonas gingivalis* unterschiedlich starke Effekte auf die Produktion der Zytokine bewirkte. In allen drei untersuchten Zelltypen verursachten hitzeinaktivierte Bakterien einen stärkeren Effekt auf die Produktion [Yee *et al.*, 2014]. PMNs, welche mit LPS von *Porphyromonas gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Fusobacterium nucleatum*, *Capnocytophaga ochracea* oder *Escherichia coli* stimuliert wurden, sezernierten unabhängig von der Bakterienart vermehrt IL-8, wobei *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* und *Escherichia coli* zu deutlich höheren Konzentrationen von IL-8 führten. Hier stieg, analog zu den anderen beschriebenen Studien, die Sekretion der Zytokine in positiver Korrelation mit der Zeit der Inkubation der Bakterien mit den Zellen deutlich an [Yoshimura *et al.*, 1997]. Bei Infektion von humanen parodontalen Ligamentfibroblasten mit LPS von *Porphyromonas gingivalis* oder *Escherichia coli* wurden im Vergleich zu den Kontrollproben deutlich gesteigerte Konzentrationen von IL-6 und IL-8 festgestellt, wobei höhere Konzentrationen von *Escherichia coli* als von *Porphyromonas gingivalis* notwendig waren. Auch hier wurden mit längerer Inkubationszeit auch höhere Konzentrationen der Zytokine gemessen [Yamaji *et al.*, 1995]. Bei Infektion

humaner Gingivafibroblasten mit zwei verschiedenen Arten von *Porphyromonas gingivalis*-LPS bemerkten Herath und Mitarbeiter eine Steigerung der Konzentration durch ein LPS, wohingegen das andere LPS keine Reaktion hervorrief. Es wurde geschlussfolgert, dass verschiedene LPS von *Porphyromonas gingivalis* mit unterschiedlichen Strukturen jeweils andere Immunreaktionen der humanen Gingivafibroblasten auslösen [Herath *et al.*, 2011]. Bei der Infektion von Makrophagen-ähnlichen Zellen von Mäusen mit *Porphyromonas gingivalis* in Kombination mit *Tannerella forsythia* oder *Treponema denticola* beobachteten Tamai und Mitarbeiter eine deutliche Steigerung der Expression von IL-6. Inhibitoren der Arginin- und Lysin-Gingipaine unterdrückten die Expression von IL-6. Die Autoren sahen dies als Hinweis dafür, dass Gingipaine für die Produktion des Zytokins verantwortlich seien [Tamai *et al.*, 2009].

Aus den vorliegenden Studien lässt sich schlussfolgern, dass die jeweilige Immunreaktion und Sekretion der Zytokine stark von der Zellart und der im Versuchsaufbau verwendeten Bakterien beziehungsweise Bakterienbestandteile oder Stoffwechselprodukte abhängig ist. Auch die Hitzeinaktivierung von Bakterien zeigte je nach Bakterien- und Zellart divergierende Ergebnisse. Einheitliche Resultate zeigen die Studien im Bezug auf die Verstärkung der Produktion der Zytokine in Abhängigkeit von der Inkubationszeit.

1.7.2 Expression antimikrobieller Peptide

Da antimikrobiell wirkende Peptide auch in der Mundhöhle beheimatet sind und Parodontalerkrankungen bakteriell induziert sind, lässt sich schlussfolgern, dass AMPs in Interaktion mit parodontopathogenen Bakterien treten und somit einen Einfluss auf die Erkrankung haben. Inwiefern parodontopathogene Bakterien die Produktion von AMPs in oralen Zellen beeinflussen, untersuchten in der Vergangenheit verschiedene Studien. Auch hier zeigen sich sehr unterschiedliche Ergebnisse. Diese Unterschiede scheinen aus der Verwendung verschiedener Zellarten und -linien, unterschiedlicher Bakterienspezies und der Verwendung jeweils anderer Analyseverfahren zu resultieren.

1.7.2.1 Expression des humanen β -Defensin 2 in oralen Zellkulturen

Bei Stimulation dendritischer Zellen und gingivaler Epithelzellen mit verschiedenen Konzentrationen von Bakterien und unterschiedlichen Bakterienspezies konnte eine

bakterienspezifische und konzentrationsabhängige Steigerung der Expression von h β D-2 festgestellt werden, wobei eine Stimulation mit *Porphyromonas gingivalis* im Vergleich zur Stimulation mit anderen Bakterien geringere Konzentrationen von h β D-2 initiierte [Yin *et al.*, 2010]. Eine ältere Studie stimulierte humane Gingivaepithelzellen mit Zellwandextrakten von *Porphyromonas gingivalis* und bestimmte daraufhin die h β D-2-Konzentration. Die Zellwandextrakte von *Porphyromonas gingivalis* konnten die Zellen nicht zur Produktion von h β D-2 stimulieren, wohingegen Zellwandextrakte von *Fusobacterium nucleatum* einen stimulierenden Effekt auf die Zellen hatten [Krisanaprakornkit *et al.*, 2000]. Eine weitere Studie bestätigte die Ergebnisse im Bezug auf die h β D-2-Produktion von Gingivaepithelzellen, welche mit Zellwandextrakten von *Fusobacterium nucleatum* infiziert wurden, wobei die Zellen in diesem Versuch ohne Stimulation kein h β D-2 sezernierten [Diamond *et al.*, 2001]. Bei Gingivaepithelzellen von Parodontitispatienten konnte *Porphyromonas gingivalis* weder eine Produktion von h β D-2, noch IL-8 induzieren [Vankeerberghen *et al.*, 2005]. Gegenteilige Ergebnisse zeigte eine Studie im Jahr 2006 in welcher Gingivaepithelzellen mit *Porphyromonas gingivalis* infiziert wurden und nach 48 h deutlich erhöhte mRNA-Konzentrationen von h β D-2 im Vergleich zu unstimulierten Zellen messbar waren. Gleiches galt für die Sekretion von IL-8, hier jedoch bereits nach einer Inkubationszeit von 3 h [Taguchi und Imai, 2006]. Auch Dommisch und Mitarbeiter konnten die Produktion von h β D-2 in Gingivaepithelzellen und humanen Gingivafibroblasten durch Infektion mit *Porphyromonas gingivalis* sowie *Streptococcus gordonii* innerhalb von 24 h stimulieren [Dommisch *et al.*, 2012]. Bei dem Vergleich der Expression von h β D-2 in humanen Gingivaepithelzellen und fünf verschiedenen Plattenepithelkarzinomzelllinien fanden Abiko und Mitarbeiter heraus, dass die Gingivaepithelzellen sowohl unstimuliert, als auch nach entzündlicher Stimulation h β D-2 produzierten. Jedoch sezernierten auch alle der Plattenepithelkarzinomzelllinien h β D-2, wobei sich die exprimierte Menge unterschied [Abiko *et al.*, 1999]. Weder bei normalen orale Epithelzellen, noch bei immortalisierten Epithelzellen, welche mit *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* infiziert wurden, konnte eine Produktion des humanen β -Defensin 2 stimuliert werden [Feucht *et al.*, 2003]. Immortalisierte orale Keratinozyten produzieren je nach Bakterienart unterschiedliche Konzentrationen von h β D-2. Hierbei zeigt sich die Tendenz, dass Bakterien des roten Komplexes geringere Konzentrationen von h β D-2 als wenig parodontalpathogene Bakterien induzieren [Ji *et al.*, 2007].

Gingivafibroblasten gesunder Patienten, welche mit sechs verschiedenen Bakterienspezies inkubiert wurden, produzierten mehr h β D-2, wenn sie mit den weniger pathogenen Spezies infiziert wurden. Die Bakterien des roten Komplexes führten nur zu einer geringfügigen Steigerung der Produktion von h β D-2. Diese Beobachtungen ließen sich auch auf die Expression von IL-6 und IL-8 übertragen [Jang *et al.*, 2017].

1.7.2.2 Sekretion von LL-37 in oralen Zellkulturen

Der stimulierende Effekt auf die Produktion von LL-37 von Bakterien des roten Komplexes auf humane orale Keratinozyten ist im Vergleich zu einigen nicht-parodontalpathogenen Bakterien geringer [Ji *et al.*, 2007]. Tada und Mitarbeiter konnten nachweisen, dass ein Null-Mutant des Bakteriums *Porphyromonas gingivalis*, welcher keine Gingipaine produziert, die Expression von LL-37 in Gingivaepithelzellen stärker steigerte als der Wildtyp-Stamm [Tada *et al.*, 2017].

Die unzureichende Datenlage hinsichtlich der Produktion von LL-37 von oralen Zellkulturen bei Stimulation mit parodontalpathogenen Bakterien gab den Anlass, diese Fragestellung in dieser Studie näher zu untersuchen.

1.7.3 Expression des Transkriptionsfaktors NF- κ B

Bei Stimulation primärer humaner Gingivaepithelzellen mit hitzeinaktivierten *Porphyromonas gingivalis* wiesen Brozovic und Mitarbeiter mittels Western Blot mit einem Phospho-NF κ B-p65-Antikörper nukleäre Levels des Proteins, welches eine Untereinheit des Transkriptionsfaktors ist, nach [Brozovic *et al.*, 2006]. Diese Beobachtung konnte auch bei der Infektion humaner parodontaler Ligamentstammzellen mit LPS von *Porphyromonas gingivalis* gemacht werden. Auch hier wurde der Transkriptionsfaktor nach Infektion der Zellen nur innerhalb des Nukleus der Zellen vermehrt festgestellt [Diomede *et al.*, 2017a]. Die nukleäre Translokation von NF- κ B oraler Epithelzellen konnte sowohl durch *Fusobacterium nucleatum*, als auch durch *Porphyromonas gingivalis* gesteigert werden, wobei *Fusobacterium nucleatum* den größeren Effekt auf die Expression hatte [Milward *et al.*, 2007]. Dommisch und Mitarbeiter konnten diese Beobachtungen bestätigen, indem sie primäre Gingivaepithelzellen mit *Porphyromonas gingivalis* infizierten und eine Aktivierung von NF- κ B feststellten [Dommisch *et al.*, 2010].

1.7.4 Expression von COX-2

Cyclooxygenase-2 (COX-2) ist ein Enzym, genauer eine Isoform der Prostaglandin H₂-Synthase, welches die Bildung von Prostaglandin H₂ aus der Arachidonsäure katalysiert. Prostaglandin H₂ stellt eine Vorstufe zu verschiedenen Prostaglandinen und Thromboxan A₂ dar. COX-2 wird ohne vorliegende Entzündung nur geringfügig produziert, wohingegen COX-1 konstitutiv produziert wird. Die Expression der COX-2 wird bei vorliegender Entzündungsreaktion stark gesteigert. Deshalb eignet sich die Untersuchung des Enzyms, um eine Entzündungsreaktion zu identifizieren [Rassow *et al.*, 2016].

Die Stimulation von Gingivafibroblasten mit LPS von *Porphyromonas gingivalis* zeigte, dass die Expression der COX-2 nach 24 h deutlich gesteigert war [Noguchi *et al.*, 1996]. Auch die Stimulation humaner Gingivaepithelzellen mit extrazellulären Membranvesikeln von *Porphyromonas gingivalis* steigerte die mRNA-Expression von COX-2 [Kou *et al.*, 2008]. Es liegen wenige In-vitro-Studien zu dieser Fragestellung vor, weswegen in dieser Studie die Expression von COX-2 oraler Zellkulturen bei Stimulation mit *Porphyromonas gingivalis* untersucht wird.

2 Fragestellung und Studienziele

Aufgrund der Probleme in der antimikrobiellen Therapie der Parodontitis und der vermehrt auftretenden Antibiotikaresistenzen gegenüber parodontalpathogenen Bakterien wird in der Forschung vermehrt nach Alternativen zu herkömmlichen Antibiotika gesucht. Einen Ansatz, den viele Forschungsgruppen dabei verfolgen, stellen antimikrobielle Peptide und deren möglicher Einsatz in der Therapie bakterieller Erkrankungen dar. Dazu gehört auch die Therapie der Parodontitis. Um die Ergebnisse der antimikrobiellen Therapie in Zukunft zu verbessern, beschäftigen sich derzeit viele Studien mit diesem Thema. Da die Expression antimikrobieller Peptide zusammen mit anderen Mechanismen der angeborenen Immunantwort darüber bestimmt, ob die bakterielle Kolonisation weiter voranschreitet oder sich zu einer manifesten Parodontitis entwickelt, ist das Verständnis über die Modulation der Expression der antimikrobiellen Peptide und das Expressionsverhalten proinflammatorischer Zytokine grundlegend. Jedoch herrscht bislang kein Konsens, wie Mikroorganismen beziehungsweise Entzündungsreaktionen die Expression der Peptide beeinflussen. Diese Grundlagen sind jedoch essentiell, um die mögliche Entwicklung antimikrobieller Peptide als Therapeutika in der Parodontitis voranzutreiben. Der Zusammenhang der Expression proinflammatorischer Zytokine bei Interaktion parodontalpathogener Bakterien und oraler Zellen mit der Expression von antimikrobiellen Peptiden soll ein tiefergehendes Verständnis für die Erkrankung und die potentiellen Behandlungsmöglichkeiten nahebringen.

Diese Studie untersucht in einem In-vitro-Modell die Modulation der Expression proinflammatorischer Zytokine und antimikrobieller Peptide bei Ko-Kultur parodontalpathogener Bakterien und oraler Zellen.

Folgende Hypothesen wurden überprüft:

1. Die Produktion von IL-6 und IL-8 oraler Zellkulturen steigt bei Stimulation mit *Porphyromonas gingivalis*.
2. Die Produktion von LL-37 und h β D-2 oraler Zellkulturen steigt bei Stimulation mit *Porphyromonas gingivalis*.
3. Die Stimulation oraler Zellkulturen mit *Porphyromonas gingivalis* resultiert in einer Aktivierung der NF- κ B-Kaskade.
4. Die Stimulation oraler Zellkulturen mit *Porphyromonas gingivalis* führt zu einer Mehrproduktion von COX-2.

Durch Durchführung von Nachweisverfahren auf proinflammatorische Zytokine, IL-6 und IL-8, auf die antimikrobiellen Peptide LL-37 und h β D-2 und Western-Blots auf I κ B- α und COX-2 sollen die Effekte von *Porphyromonas gingivalis* auf vier ausgewählte orale Zellkulturen untersucht werden.

3 Material und Methoden

3.1 Kultivierung von *Porphyromonas gingivalis*

Nach dem Auftauen wurde *Porphyromonas gingivalis* ATC 33277 des Leibniz-Instituts (DSMZ – Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Deutschland) auf Agarplatten der Firma Becton, Dickinson and Company (BD Schaedler Agar mit Vitamin K1 und 5% Schafsblut, Franklin Lakes, NJ, USA) im Drei-Felder-Ausstrich in einer anaeroben Bank (5% H₂, 10% CO₂, 85% N₂ Bactron Anaerobic / Environmental Chamber, Sheldon Manufacturing, Inc., Cornelius, OR, USA) ausplattiert. Nach erfolgreicher Anzucht wurden die Platten in den integrierten Inkubator (Innovens Jouan, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) überführt und bei 37°C inkubiert. Alle 5-7 Tage wurden die Bakterien mithilfe von Impfösen auf neue Agarplatten überimpft.



Abbildung 10: *Porphyromonas gingivalis* ATC 33277 im Drei-Felder-Ausstrich auf einer Agarplatte

3.2 Zellarten und Kulturbedingungen

Für die Versuche dieser Studie wurden humane Gingivafibroblasten (HGF-1) der Firma LGC Promochem (Teddington, UK) verwendet, welche ursprünglich aus einer humanen Gingivabiopsie isoliert wurden. Abbildung 11 zeigt eine Fotografie der HGF-1, welche durch das Mikroskop aufgenommen wurde.



Abbildung 11: Fotografie der kultivierten HGF-1 durch das Mikroskop (Axiovert 40 C, Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland)

Außerdem wurden humane Fibroblasten des parodontalen Ligaments (hPDLF) der Firma Lonza (Basel, Schweiz) verwendet, welche aus dem parodontalen Ligament von Molaren gewonnen wurden. Die Tests auf Bakterien, Pilze, Hefen und Mykoplasmen waren negativ. Weiterhin war keiner der Spender an HIV-1, Hepatitis B oder C erkrankt. Abbildung 12 zeigt eine Fotografie der hPDLF durch das Mikroskop.



Abbildung 12: Fotografie der hPDLF durch das Mikroskop (Axiovert 40 C, Carl Zeiss)

hPDSC-hTERT-Zellen sind Progenitorzellen des parodontalen Ligaments, welche durch lentiviralen Gentransfer der humanen Telomerase-Reverse-Transkriptase (hTERT = human telomerase reverse transcriptase) immortalisiert wurden [Docheva *et al.*, 2010]. Durch das Einbringen der Telomerase in das Genom der Zelle wird verhindert, dass sich das Genom der Zelle bei der Replikation verkürzt

und die Zelle somit nicht dem programmierten Zelltod unterliegt. Diese Zellen wurden uns freundlicherweise von Prof. Dr. D. Docheva, Leiterin der experimentellen Unfallchirurgie der chirurgischen Klinik und Poliklinik Regensburg, zur Verfügung gestellt. Abbildung 13 zeigt eine Fotografie der hPDSC-hTERT durch das Mikroskop.



Abbildung 13: Fotografie der hPDSC-hTERT durch das Mikroskop (Axiovert 40 C, Carl Zeiss)

Zuletzt wurden menschliche Plattenepithelkarzinomzellen (BHY) des Leibniz-Instituts verwendet. Diese wurden ursprünglich aus einem hochdifferenzierten oralen Plattenepithelkarzinom des Unterkiefers eines 52-jährigen Japaners isoliert. Abbildung 14 zeigt eine Fotografie der BHY-Zellen durch das Mikroskop.



Abbildung 14: Fotografie der BHY-Zellen durch das Mikroskop (Axiovert 40 C, Carl Zeiss)

HGF-1 und hPDLF wurden in α -MEM (Minimal Essential Medium, Gibco, Life

Technologies, Carlsbad, CA, USA) kultiviert. Für die PDSC-hTERT und BHY wurde DMEM (Dulbecco`s Modified Eagle`s Medium – high glucose, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) verwendet. Beiden Medien wurde jeweils 10% fetales Kälberserum (FBS, Sigma-Aldrich), 100 U/ml Penicillin G und 100 μ g/ml Streptomycin (Sigma-Aldrich) zugesetzt. Die Medien wurden bei etwa 7°C im Kühlschrank aufbewahrt und vor Verwendung in einem Wasserbad auf 37°C erwärmt.

Alle Zellen wurden in 75 cm² Zellkulturflaschen der Firma Greiner Bio-One International GmbH (Kremsmünster, Österreich) kultiviert und bei 37°C, 5% CO₂ und 100% Luftfeuchtigkeit in einem Inkubator (HeraCell 150i, CO₂ Inkubator, Thermo Fisher Scientific) inkubiert.

3.3 Routinearbeiten in der Zellkultur

3.3.1 Auftauen der Zellen

Die Zellen wurden gemäß der Gebrauchsanweisung aufgetaut. Die Kulturflaschen wurden mit 19 ml Medium auf 37°C präinkubiert und anschließend die auf 37°C erwärmte Zellsuspension hinzupipettiert. Um eine gleichmäßige Verteilung auf dem Flaschenboden zu erzielen, wurden die Flaschen vorsichtig geschwenkt. Am nächsten Tag erfolgte ein Mediumwechsel, um das zytotoxische Dimethylsulfoxid (DMSO), welches als Gefrierschutzmittel zur Vermeidung der Eiskristallbildung beim Einfrieren von Zellen diente, zu entfernen.

3.3.2 Mediumwechsel

Der Wechsel des Zellkulturmediums erfolgte drei mal wöchentlich. Dabei wurde das Medium mit einer Glaspipette abgesaugt und 20 ml frisches Medium in die Kulturflaschen pipettiert.

3.3.3 Subkultivieren der Zellen

Zum Subkultivieren der Zellen wurde zuerst das Medium mit einer Glaspipette abgesaugt. Anschließend wurden die Zellen mit 5 ml PBS (Phosphat gepufferte Salzlösung, ohne Ca²⁺/Mg²⁺, pH = 7,4, Sigma Aldrich) gewaschen, da Rückstände des Zellkulturmediums das Trypsin neutralisieren würden. Daraufhin wurde das

PBS mit einer Glaspipette abgesaugt. Das Trypsin wurde aufgetaut, auf 37°C erwärmt und 2 ml in die Kulturflasche gegeben. Um zu erreichen, dass mindestens 90% der Zellen vom Boden gelöst werden, wurden die Kulturflaschen je nach Zellart 2-6 Minuten bei 37°C inkubiert. Dann wurde durch vorsichtiges Klopfen der Flaschen gegen die Handfläche sichergestellt, dass sich die Zellen vom Boden der Flasche gelöst hatten. Anschließend wurde der Vorgang optisch mithilfe eines Mikroskopes (Axiovert 40 C, Carl Zeiss) überprüft. Die übrigen anhaftenden Zellen wurden durch mehrmaliges Spülen mit einer Pipette vom Boden der Flasche gelöst und anschließend vollständig mit einer Pipette aufgenommen. Um die Trypsinaktivität zu stoppen, wurde die Zell-Trypsin-Suspension in ein 15 ml Falcon mit 2 ml Zellkulturmedium pipettiert. Nach Zentrifugation des Falcons für 5 Minuten bei 300 g (22°C, Allegra X-15R, Beckman Coulter Life Sciences, Brea, CA, USA) wurde der Überstand mit einer Glaspipette abgesaugt und das Zellpellet mit Medium resuspendiert. Die Menge des hinzugefügten Mediums variierte je nachdem, auf wie viele Flaschen die Zellen verteilt werden sollten. Je Flasche wurde 1 ml des Mediums hinzugefügt und die resuspendierten Zellen dann in Kulturflaschen mit 19 ml Medium pipettiert.

3.3.4 Bestimmung der Zellzahl

Nach der Zentrifugation der trypsinisierten Zellen wurde das Zellpellet in 1 ml Medium resuspendiert. Die Zellzählung erfolgte mithilfe des Cedex XS Analyzer (Roche innovatis AG, Bielefeld, Deutschland). Diese Methode der Zellzählung bedient sich der Trypanblau-Ausschlussmethode. Dieser Test beruht auf dem Phänomen, dass abgestorbene Zellen den verwendeten Farbstoff in sich aufnehmen und lebende Zellen ungefärbt bleiben. Es wurden 10 μ l der Zelllösung und 10 μ l Trypanblau (0,4%, Gibco, Life Technologies) in eine Durchflusszelle pipettiert. Mithilfe des Cedex XS Analyzer und der dazugehörigen Software (Cedex 2 Software) wurde die Konzentration der Zellen pro Milliliter bestimmt. Für die Durchführung der Versuche war jeweils eine Anzahl von 2,4 Millionen Zellen notwendig, da die Zellen in eine 6-Well-Platte pipettiert wurden und jedes der 6 Wells etwa 400.000 Zellen beeinhaltete sollte.

3.3.5 Aussäen der Zellen in 6-Well-Platten

Nach Aussäen der Zellsuspension in 6-Well-Platten wurde eine Inkubationszeit von

24 h bei 37 °C, 5% CO₂ und 100% Luftfeuchtigkeit im HeraCell 150i Inkubator abgewartet, um die Adhärenz der Zellen am Boden der 6-Well-Platte sicherzustellen. Nach 24 h erfolgte die optische Kontrolle auf Adhärenz und Gleichmäßigkeit der Verteilung der Zellen mithilfe eines Mikroskopes.

3.4 Versuchsaufbau und Nachweisverfahren

3.4.1 Herstellung der Bakterienlösung

Porphyromonas gingivalis wurde direkt vor Verwendung mit einer Impföse (VWR International, Radnor, PA, USA) von der Agarplatte aufgenommen und in 1 ml 0,9% NaCl (Fresenius Kabi AG, Bad Homburg, Deutschland) resuspendiert und 10 Sekunden gevortext (Vortex Mixer, neoLab Migge GmbH, Heidelberg, Deutschland). Es wurde sichergestellt, dass die Bakterien gleichmäßig in der Flüssigkeit verteilt waren. Es erfolgte eine optische Dichtemessung mithilfe des Varioskan (Thermo Fisher Scientific). Dazu wurden 100 µl der Bakterienlösung in eine 96-Well-Mikrotiterplatte (Greiner Bio-One International GmbH) pipettiert. Nach der Dichtemessung wurde die Bakterienlösung auf die gewünschte optische Dichte von 0,4 verdünnt. Nach dem Zentrifugieren (Microfuge 22R Centrifuge, Beckman Coulter Life Sciences) für 5 Minuten bei 12000 g wurde das NaCl abpipettiert und die Bakterien in Zellkulturmedium ohne Antibiotikum (AB) resuspendiert.

Die Hälfte der Versuche wurde mit hitzeinaktivierten Bakterien durchgeführt. Dazu wurden die in NaCl resuspendierten Bakterien nach erfolgter Dichtemessung 1 h in einem Schüttelinkubator (Thermomixer Comfort, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) auf 76°C erhitzt [Yee *et al.*, 2014]. Anschließend wurde wie oben beschrieben fortgefahren.

3.4.2 Kokultivierung der Zellen und *Porphyromonas gingivalis*

Bevor den zuvor inkubierten Zellen antibiotikafreies Medium, je nach Zellart α -MEM oder DMEM, hinzugefügt wurde, wurde das Zellkulturmedium mit einer Glaspipette abgesaugt und die Wells mit 1 ml PBS gewaschen. Das PBS wurde anschließend ebenfalls abgesaugt.

Tabelle 3 stellt schematisch den Versuchsaufbau und das Pipettierschema des Versuches dar.

<p>1</p> <p>Negativkontrolle</p> <p>1 ml Medium ohne AB</p>	<p>2</p> <p>Positivkontrolle</p> <p>1 ml Medium ohne AB + 10 μl TNF-α (200 U/ml)</p>	<p>3</p> <p>6 h</p> <p>250 μl Bakteriensuspension + 750 μl Medium ohne AB</p>
<p>4</p> <p>24 h</p> <p>250 μl Bakteriensuspension + 750 μl Medium ohne AB</p>	<p>5</p> <p>6 h</p> <p>250 μl Bakteriensuspension + 750 μl Medium ohne AB + 20 μl E-64</p>	<p>6</p> <p>24 h</p> <p>250 μl Bakteriensuspension + 750 μl Medium ohne AB + 20 μl E-64</p>

Tabelle 3: Pipettierschema der 6-Well-Platte

Zwei der Wells wurden zusätzlich zu der Bakteriensuspension 20 μ l (100 μ M) E-64 Proteaseinhibitor (Sigma-Aldrich) hinzugefügt. E-64 ist ein irreversibler, potenter hochselektiver Cysteinproteaseinhibitor. E-64 wurde verwendet, um die Rolle der Proteasen von *Porphyromonas gingivalis* in der Induktion von entzündlichen Reaktionen zu untersuchen.

Die 6-Well-Platte wurde während der Inkubationszeit in einem Inkubator bei 37 °C, 5% CO₂ und 100% Luftfeuchtigkeit aufbewahrt.

Für den Western-Blot wurde zusätzlich eine Probe als Positivkontrolle hergestellt. Hierbei wurden die Zellen für 1 h mit 10 μ l TNF- α (200 U/ml) inkubiert.

3.4.3 Gewinnung der Proben

Es wurden sowohl Proteinextrakte für die Durchführung von Western Blots gewonnen, als auch der Zellkulturüberstand für die Durchführung von Enzyme-linked Immunsorbent Assays (ELISA) abpipettiert.

3.4.3.1 Gewinnung der Zellkulturüberstände

Für die Durchführung von ELISAs wurden die Zellkulturüberstände benötigt. In den Zellkulturüberständen befinden sich die von den Zellen sezernierten Proteine, welche in diesem Fall analysiert wurden. Diese wurden in beschriftete Eppendorf-Gefäße überführt und anschließend für 10 Minuten bei 14000 rpm in der Microfuge

22R Zentrifuge (Beckman Coulter Life Sciences) zentrifugiert, um Bakterien und Zellkulturüberstand zu trennen. Der Überstand wurde abpipettiert und in beschriftete Eppendorf-Gefäße überführt.

3.4.3.2 Herstellung zytosolischer Proteinextrakte

Für die Durchführung der Western Blots wurden zytosolische Proteinextrakte mithilfe des NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction Kit (Thermo Scientific) hergestellt.

Nach Entfernung des Zellkulturüberstandes wurden die Zellen mit 1 ml PBS gewaschen und anschließend mit jeweils einer frischen Glaspipette abgesaugt. Dann wurde je 600 μ l PBS in die Wells pipettiert und die Zellen mit einem sterilen Zellschaber (16 cm, Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland) vorsichtig vom Boden gelöst. Die noch anhaftenden Zellen wurden mit einer Pipette vom Boden der Wells abgespült und dann in beschriftete Eppendorf-Gefäße überführt. Die Zellsuspension wurde für 4 Minuten bei 3000 rpm in der Microfuge 22R Zentrifuge (Beckman Coulter) bei 0 °C zentrifugiert und anschließend der Zellüberstand abpipettiert. Nach der Zentrifugierung wurde das Zellpelett mit 100 μ l CER I resuspendiert und 15 Sekunden auf dem Vortexer vermischt. CER I wurde unmittelbar vor der Verwendung der Proteaseinhibitor hinzugefügt, um die Integrität und Funktion der Proteine aufrechtzuerhalten. Anschließend wurden die Eppendorf-Gefäße für 10 Minuten auf Eis gelagert. Nach Ablauf der Zeit wurden 5,5 μ l CER II hinzugefügt und 5 Sekunden mithilfe des Vortexers vermischt. Die Gefäße wurden für 1 Minute auf Eis gelagert. Anschließend wurden die Eppendorf-Gefäße 5 Minuten bei 18000 g zentrifugiert. Dadurch befanden sich die zytosolischen Proteine im Überstand und konnten in neue vorgekühlte Eppendorf-Gefäße überführt werden. Die Proben wurden anschließend bis zur Verwendung bei -20 °C eingefroren.

3.4.4 Enzyme-linked Immunosorbent Assay auf IL-6

Die Familie der IL-6 Zytokine beeinflusst Gene, welche Einfluss auf Apoptose oder Überleben von Zellen, Proliferation und Differenzierung haben. IL-6 nimmt eine wichtige Rolle in der Hämatopoese ein und reguliert Akute-Phase-Reaktion und Immunantwort. IL-6 kann sowohl proinflammatorisch, als auch antientzündlich agieren [Heinrich *et al.*, 2003, Kishimoto *et al.*, 1995]. Die Expression des Zytokins

erfolgt durch eine Reihe unterschiedlicher Zellen, darunter Fibroblasten, Endothelzellen, Keratinozyten, Monozyten und B- und T-Zellen. Produktionssteigernde Stimuli sind dabei unter anderem Lipopolysaccharide, TNF- α und IL-1 [Heinrich *et al.*, 1990].

Bei dem human IL-6 Quantikine ELISA Kit der Firma R&D Systems handelt es sich um ein quantitatives Sandwich-Enzym-Immunoassay. Dieses Enzyme-linked Immunosorbent Assay verwendet die Methode der quantitativen Sandwich-Enzym-Immunoassay-Technik. Hierbei werden zwei Antikörper verwendet welche beide an unterschiedliche Stellen des nachzuweisenden Antigens binden, wobei einer der Antikörper am Boden der Wells der mitgelieferten Platten fixiert ist und bei Kontakt der Proben mit dem Boden der Wells die gesuchten Antigene bindet. Nach dem Waschvorgang bleibt nun der gebildete Antigen-Antikörper-Komplex zurück. In Form des human IL-6-Conjugates wird der Sekundär-Antikörper hinzugefügt, welcher nun auch an das zu untersuchende IL-6 bindet. Durch eine Farbreaktion mit der Substrat-Lösung, welche vom enzymgekoppelten Sekundär-Antikörper umgesetzt wird, kann die Menge des gebundenen IL-6 photometrisch nachgewiesen werden und daraus anschließend die Konzentration von IL-6 in der Probe berechnet werden. Abbildung 15 stellt schematisch den Ablauf eines ELISAs dar.

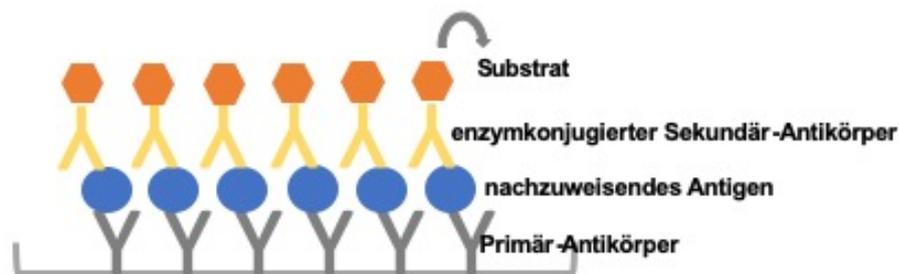


Abbildung 15: Prinzip des Sandwich-Enzym-Immunoassays

Nach Auftauen der Proben und Verdünnung im Verhältnis 1:30 mithilfe des Calibrator Diluent RD5T, wurde gemäß der Bedienungsanleitung eine Standard-Verdünnungsreihe hergestellt. Nachdem 667 μ l Calibrator Diluent RD5T in das erste der 6 Eppendorf-Reaktionsgefäße pipettiert wurden und 500 μ l in die übrigen, gab Abbildung 16 das Schema der Standardverdünnungsreihe vor.

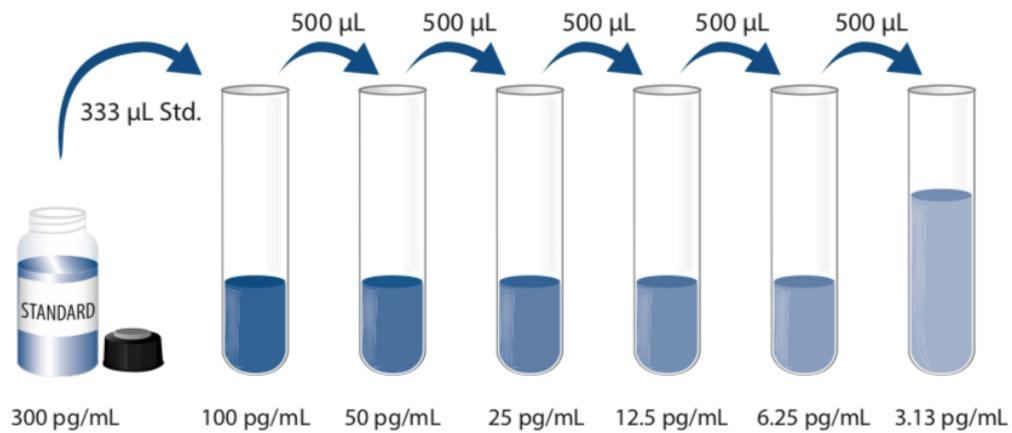


Abbildung 16: Pipettierschema der Standardverdünnungsreihe des Quantikine human IL-6 ELISA der Firma R&D Systems

In jedes der 96 Wells wurden 100 µl des Assay Diluent RD1W pipettiert und anschließend jeweils 100 µl der Standards oder der Proben hinzugefügt. Die Platte wurde mit dem mitgelieferten Klebestreifen dicht versiegelt und für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Entfernung des Inhaltes der Platte wurden vier Waschschritte mit jeweils 400 µl des Waschpuffers vorgenommen. Nach rückstandsloser Entfernung des Waschpuffers wurden 200 µl des menschlichen IL-6 Konjugats, welches den IL-6-spezifische Enzym-gebundene polyklonale Antikörper enthält, hinzugefügt und die 2-stündige Inkubation der versiegelten Mikrotiterplatte abgewartet. Das viermalige Waschen der 96 Wells wurde wiederholt. 200 µl der Substrat-Lösung führten zum Farbumschwung der Wells auf blau. Die Substrat-Lösung, in diesem Fall Tetramethylbenzidin, wird von dem enzymgekoppelten Sekundärantikörper umgesetzt und färbt sich blau. Die Intensität der blauen Farbe ist dabei proportional zum vorhandenen Gehalt von IL-6. Nach einer Inkubationszeit von 20 Minuten, geschützt vor Licht, konnten 50 µl einer Stop-Lösung, hier Schwefelsäure, hinzugefügt werden, was zu einem Farbumschwung von blau auf gelb führte. Die Platte wurde vorsichtig geschwenkt um die Reagenzien ausreichend miteinander zu vermischen. Abbildung 17 zeigt die Mikrotiterplatte nach dem Hinzufügen der Stop-Lösung.

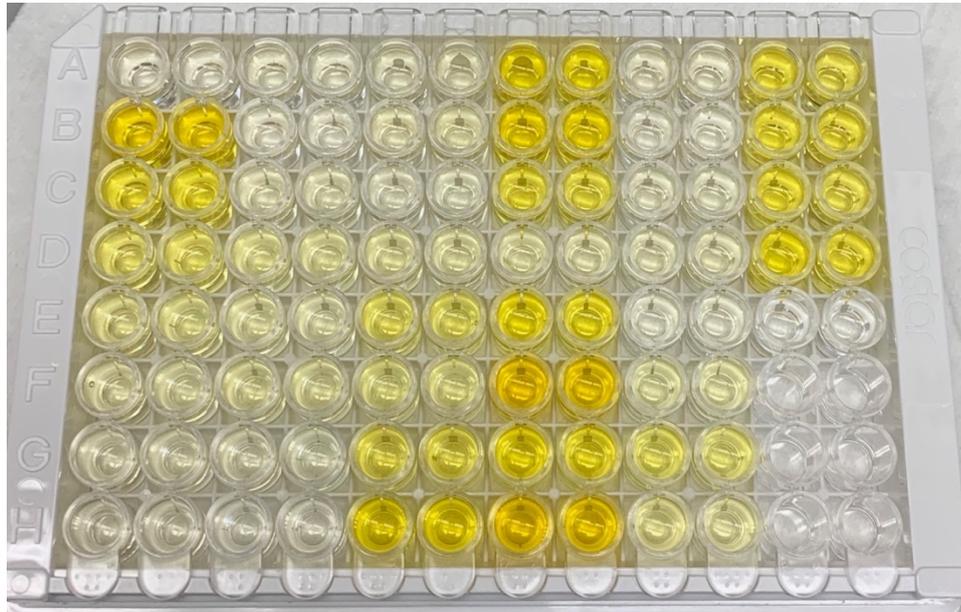


Abbildung 17: ELISA auf IL-6 nach Hinzufügen der Stop-Lösung

Innerhalb von 30 Minuten nach Beendigung des Assays erfolgte die photometrische Messung bei 450 nm mithilfe des Varioskan und der Software Skanlt 2.2. Nach Erstellung einer Standardkurve aus den Standards der Verdünnungsreihe konnten die jeweiligen Konzentrationen der Proben berechnet werden. Die Abbildung 18 stellt eine typische Standardkurve für das Quantikine IL-6-ELISA dar, welche mithilfe von Microsoft Excel 2019 (Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA) erstellt wurde.

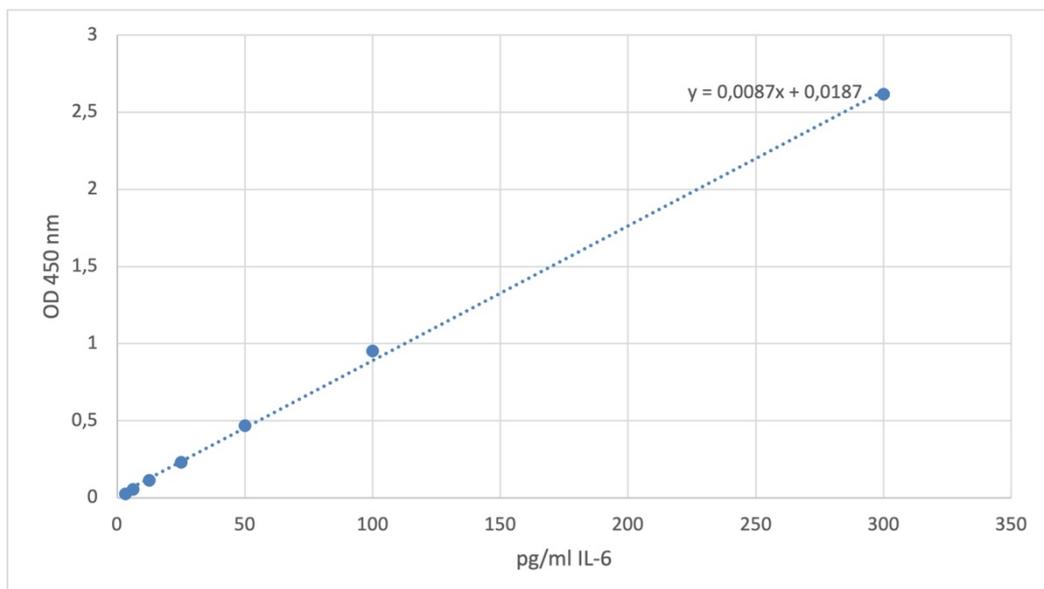


Abbildung 18: repräsentative Standardkurve, welche aus den Standards eines IL-6-ELISAs berechnet wurde

3.4.5 Enzyme-linked Immunosorbent Assay auf IL-8

IL-8 ist ein Chemokin, welches je nach Zelltyp durch Stimulation mit IL-1, TNF- α und LPS unter anderem von Fibroblasten, Epithelzellen und Hepatozyten, Monozyten und Endothelzellen exprimiert wird. Die Effekte des Chemokins auf neutrophile Granulozyten umfassen Chemotaxis, Stimulation der Produktion von Zelladhäsionsmolekülen und Degranulation [Baggiolini *et al.*, 1989, Waugh und Wilson, 2008].

Es wurde das ELISA Kit der Firma R&D Systems (Quantikine ELISA Kit Human IL-8, Minneapolis, MN, USA) verwendet.

Die zu analysierenden Proben wurden in einem Verhältnis von 1:30 verdünnt. Die Verdünnung erfolgte mithilfe des Calibrator Diluent RD5P. Es wurde eine Standard-Verdünnungsreihe nach dem in Abbildung 19 dargestellten Pipettierschema hergestellt.

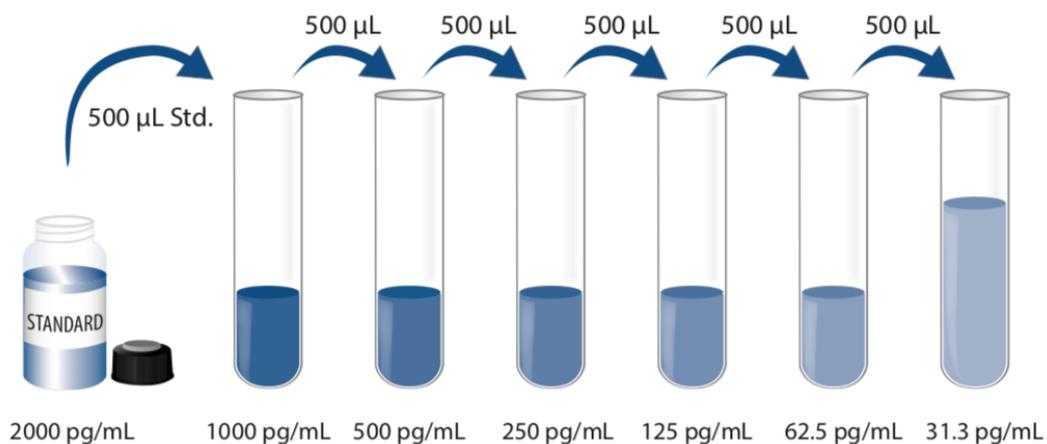


Abbildung 19: Pipettierschema der Standardverdünnungsreihe des ELISA Kits auf IL-8 (R&D Systems)

Das Assay wurde gemäß der Gebrauchsanleitung analog zu dem ELISA auf IL-6 durchgeführt und analysiert.

3.4.6 Nachweis von LL-37

Für die Messung des LL-37-Gehalts der Zellkulturüberstände wurde das ELISA-Kit HK321 der Firma Hycult Biotech (Uden, Niederlande) verwendet.

Hierbei wurden lediglich die Proben der Zelllinien HGF-1 und BHY untersucht. Die Untersuchung der Proben, welche nach 6 h Inkubationszeit gewonnen wurden entfiel, da die Expression nach 6 h naturgemäß noch nicht signifikant erhöht sein

kann. Die verwendeten Reagenzien wurden gemäß der Bedienungsanleitung hergestellt. Die Standard-Verdünnungsreihe wurde nach dem in Abbildung 20 dargestellten Schema erstellt.

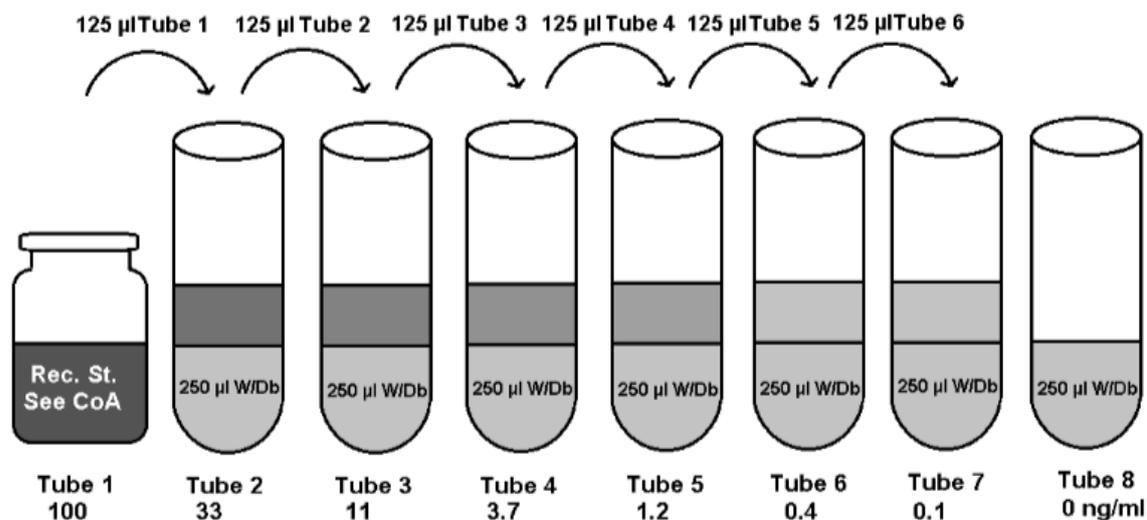


Abbildung 20: Standard-Verdünnungsreihe des ELISA auf LL-37 (Hycult Biotech)

In die Wells der Platte wurden 100 µl der Standards und Proben pipettiert und die Platte mithilfe eines Klebestreifens für die Dauer der 1-stündigen Inkubationszeit versiegelt. In dieser Zeit wurden die in den Proben vorhandenen LL-37-Peptide von der beschichteten Platte gebunden. Es folgte das Waschen der Wells mit dem zuvor vorbereiteten Waschpuffer. Der Waschvorgang wurde vier mal mit je 200 µl durchgeführt. Anschließend wurden je 100 µl des Tracers in die Wells pipettiert, die Platte mit einem neuen Klebestreifen versiegelt und erneut die Inkubationszeit von einer Stunde abgewartet. Der in diesem Schritt hinzugefügte biotinylierte Antikörper dient zur Markierung des LL-37, um das Peptid später identifizieren zu können. Der Waschvorgang wurde wie oben beschrieben wiederholt. Es wurden 100 µl des Streptavidin-Peroxidase Konjugats in die Wells pipettiert, welches wiederum an den biotinylierten Antikörper bindet. Nach der 1-stündigen Inkubationszeit und dem erneuten Waschvorgang wurden 100 µl des Substrates Tetramethylbenzidin (TMB) in die Wells pipettiert, welches mit dem zuvor gebundenen Streptavidin-Peroxidase Konjugat reagiert. Die 96-Well-Platte wurde erneut mit einem Klebestreifen versiegelt und für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Dabei wurde die Platte mit Aluminiumfolie vor direkter Lichteinstrahlung geschützt. Zuletzt wurde die Reaktion mithilfe von 100 µl der Stop-Solution beendet, welche Oxalsäure beinhaltet. Innerhalb von 30 Minuten nach Beendigung der Reaktion erfolgte die photometrische Messung bei 450 nm mit dem Varioskan und der SkanIt Software

2.2. Die Berechnung der Konzentration von LL-37 oder dessen Propeptid hCAP-18 erfolgte mithilfe der durch die Standards vorgegebenen Standardkurve.

3.4.7 Nachweis von h β D-2

Der Nachweis von β -Defensin 2 erfolgte durch das ELISA-Kit der Firma MyBioSource, Inc. (San Diego, CA, USA). Hierbei wurden ebenfalls die Proben der Zelllinien HGF-1 und BHY, welche nach 24 h gewonnen wurden, untersucht. Nach Vorbereitung des Waschpuffers wurden 50 μ l der Standards, der Kontrolle und der Proben in die Wells pipettiert. Zusätzlich wurde in jedes, außer in das Kontrollwell, 100 μ l der Meerrettich-Peroxidase (HRP Conjugate) pipettiert und anschließend die Platte mit einem Klebestreifen versiegelt. Während der Inkubationszeit von 1 h bei 37 °C banden die vorhandenen β -Defensine an die beschichtete Oberfläche der Wells. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden 4 Waschvorgänge mit je 300 μ l des Waschpuffers durchgeführt und jeweils 1 min gewartet, bevor der Waschpuffer wieder entfernt wurde. 50 μ l der Chromogen-Lösung A wurden in alle Wells pipettiert und danach 50 μ l der Chromogen-Lösung B (Tetramethylbenzidin, TMB). Nach vorsichtigem Schwenken zum Vermischen der Reagenzien wurde die Platte vor Licht geschützt bei 37 °C inkubiert und in regelmäßigen Abständen die blaue Farbentwicklung kontrolliert. Nach 15 min wurden 50 μ l der Stop Solution hinzugefügt und die Reaktion gestoppt. Die Wells färbten sich in Abstufungen von gelb. Innerhalb von 5 min nach Beendigung des Assays wurde die Extinktion der 96-Well-Platte im Varioskan mithilfe der Skanlt 2.2 Software bei 450 nm gemessen. Die in den Proben enthaltenen Konzentrationen von h β D-2 wurden durch Erstellen einer Standardkurve errechnet.

3.4.8 Nachweis von I κ B- α

Da die Aktivierung von NF κ -B wie oben beschrieben in der inflammatorischen Immunreaktion vor der Expression von Zytokinen wie IL-6 und IL-8 steht, soll durch einen Western-Blot auf I κ B- α die Aktivierung des Transkriptionsfaktor nachgewiesen werden. Der aktivierte Transkriptionsfaktor reguliert eine Vielzahl an Genen, darunter Interleukine, Chemokine, TNF- α , β -Defensine und andere Vermittler einer entzündlichen Immunantwort [Matsusaka *et al.*, 1993, Strickland und Ghosh, 2006]. Hierbei ist das Vorhandensein des inhibitorischen Faktors I κ B- α umgekehrt proportional zum Vorhandensein von NF κ -B. Damit wird auch die frühe

Immunantwort der Zellen auf das Pathogen *Porphyromonas gingivalis* überprüft und qualitativ nachgewiesen. Da NF κ -B zusammen mit I κ B- α im Zytosol aller Zellen vorliegt und erst nach Phosphorylierung aktiviert wird und somit in den Nucleus von Zellen wandert, wurden hierzu lediglich die zytosolischen Proteine der Zellen extrahiert [Serasanambati und Chilakapati, 2016].

Nach Durchführung eines Bradford-Assays (Quick-Start Bradford Protein Assay, BioRad Laboratories, Inc. , Hercules, CA, USA) zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurden die Proben mit H₂O verdünnt, um die gleiche Proteinmenge in jeder Probe zu erhalten. Weiterhin wurde ein vierfach verdünnter Laemmli Ladepuffer mit β -Mercaptoethanol hinzugefügt. Der Puffer spaltet die inter- und intramolekularen Disulfidbrücken und denaturiert die Proteine während der Inkubation im Eppendorf-Heizblock bei 95°C für 5 Minuten. Die Proteine erhalten dadurch außerdem eine negative Gesamtladung. Für die Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) wurde ein TRIS-Glycin-Gel auf Polyacrylamidbasis (12% Mini-Protean TGX Gels; BioRad Laboratories, Inc.) als Matrix verwendet. Die Elektrophoresekammer (BioRad Laboratories, Inc.) wurde mit einem 1X SDS-Laufpuffer befüllt und anschließend 5 μ l des Größenstandards und 13 μ l der Proben in die Geltaschen pipettiert. Bei einer konstanten Spannung von 180 V für 40 Minuten im Kühlraum wanderten die negativ geladenen Proteine zum Plus-Pol.

Zum Nachweis der Proteine wurden diese anschließend durch Durchführung eines Western-Blots auf eine Trägermembran übertragen. Durch ein elektrisches Feld, welches senkrecht zum Polyacrylamid-Gel ausgerichtet wird, wandern die zuvor der Größe nach aufgetrennten Proteine auf eine 0,45 μ m Polyvinylidenfluorid-Membran (Merck Millipore, Burlington, MA, USA) in Richtung des Plus-Poles. Nachdem die Elektrophoresekammer mit 1X Tris-Glycin-Transferpuffer nach Towbin mit 20 % Methanol gefüllt wurde, erfolgte die Übertragung der Proteinbanden auf die Membran bei 200 mA für 45 min in der Kühlkammer.

Anschließend wurde die Membran in 5 ml TBS-T-Puffer (Tris-gepufferte Salzlösung mit Tween) auf einem Shaker (Heidolph Polymax 1040, Heidolph Instruments GmbH & CO. KG, Schwabach, Deutschland) gewaschen. Die unspezifischen Antikörper-Bindungsstellen wurden durch Inkubation mit 5 ml TBST-Puffer und 5 % bovinem Serumalbumin (BSA, Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA) für 60 min auf dem Shaker bei Raumtemperatur blockiert. Dann wurde die Membran

über Nacht auf einem Shaker im Kühlraum mit TBS-T, 5 % BSA und Primärantikörper ($\text{I}\kappa\text{B-}\alpha$ Antikörper, Cell Signaling Technology) im Verhältnis 1:1000 inkubiert. In diesem Schritt bindet der Primär-Antikörper an das gesuchte Protein, in diesem Fall $\text{I}\kappa\text{B-}\alpha$.

Nun wurde die Membran drei Mal für 5 min in TBS-T-Puffer gewaschen und dann für 60 min in 5 ml TBS-T-Puffer mit 5% BSA und Sekundär-Antikörper (Anti-rabbit IgG, HRP-linked Antikörper, Cell Signaling Technology), ebenfalls im Verhältnis 1:1000, auf dem Shaker inkubiert. Der Sekundärantikörper, an Meerrettichperoxidase konjugiert, bindet an den Primärantikörper. Die Meerrettichperoxidase katalysiert die Umsetzung der im nächsten Schritt hinzugefügten Substratlösung.

Anschließend wurde die Membran erneut drei Mal für 5 min in TBS-T-Puffer gewaschen. Zuletzt wurde die im Verhältnis 1:1 hergestellte Chemilumineszenz-Substratlösung (Super Signal West Pico Chemilumineszenz Substrat, Thermo Fisher Scientific) zu den Membranen hinzugegeben und für 5 min auf dem Shaker inkubiert. Die Luminol-basierte Substratlösung wird durch die an den Sekundär-Antikörper gebundene Meerrettichperoxidase oxidiert. Beim Umsetzen des Substrats entstand eine Chemilumineszenz, welche durch ein Dokumentationsgerät (Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland) bei einer Wellenlänge von 280 nm visualisiert wurde. Es wurde die zugehörige Software Chemi-Capt verwendet.

Die Ladekontrolle erfolgte mit dem Primärantikörper β -Actin 1:1000 (Cell Signaling Technology), um eine gleichmäßige Verteilung der Proteinmengen sicherzustellen.

3.4.9 Nachweis von COX-2

Der Nachweis der Cyclooxygenase 2 erfolgte ebenfalls mithilfe eines Western Blots. Die Durchführung erfolgte analog zu dem Western Blot-Nachweis von $\text{I}\kappa\text{B-}\alpha$. Als Primärantikörper wurde COX-2 der Firma Cell Signaling Technology verwendet. Anschließend wurde der gleiche Sekundär-Antikörper (Anti-rabbit IgG, HRP-linked Antikörper, Cell Signaling Technology) zur Bindung an den Primärantikörper, hier COX-2, verwendet. Die Ladekontrolle erfolgte ebenfalls mit dem Primärantikörper β -Actin 1:1000 (Cell Signaling Technology).

3.4.10 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mithilfe der Software SPSS der Firma IBM (IBM SPSS Statistics 25, Armonk, NY, USA). Zur Überprüfung der Normalverteilung der Ergebnisse wurde der Shapiro-Wilk-Test durchgeführt. Bei positivem Ergebnis erfolgte eine einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA). Anschließend wurde ein LSD Post-Hoc-Test durchgeführt. Bei keiner Normalverteilung wurde ein Kruskal-Wallis-Test durchgeführt. Anschließend wurde ein Dunn-Bonferoni Post-Hoc-Test durchgeführt. Das Signifikanzlevel lag bei $p < 0,05$.

4 Ergebnisse

4.1 ELISA auf IL-6

In den folgenden Diagrammen sind die in den jeweiligen Proben enthaltenen Konzentrationen von IL-6 in pg/ml aufgetragen. Die Werte wurden ermittelt, indem der Mittelwert von drei unabhängigen Versuchsreihen gebildet wurde. Die schwarzen Balken stehen hier jeweils für die Versuchsreihe, bei der die Zellen mit unbehandelten, nativen *Porphyromonas gingivalis* infiziert wurden. Die weißen Balken stellen die Konzentrationen der Versuchsreihen, bei denen die Zellen mit bei 76 °C für 1 h inaktivierten *Porphyromonas gingivalis* infiziert wurden, dar.

Abbildung 21 zeigt die Ergebnisse der ELISAs auf das Zytokin IL-6 der humanen Gingivafibroblasten.

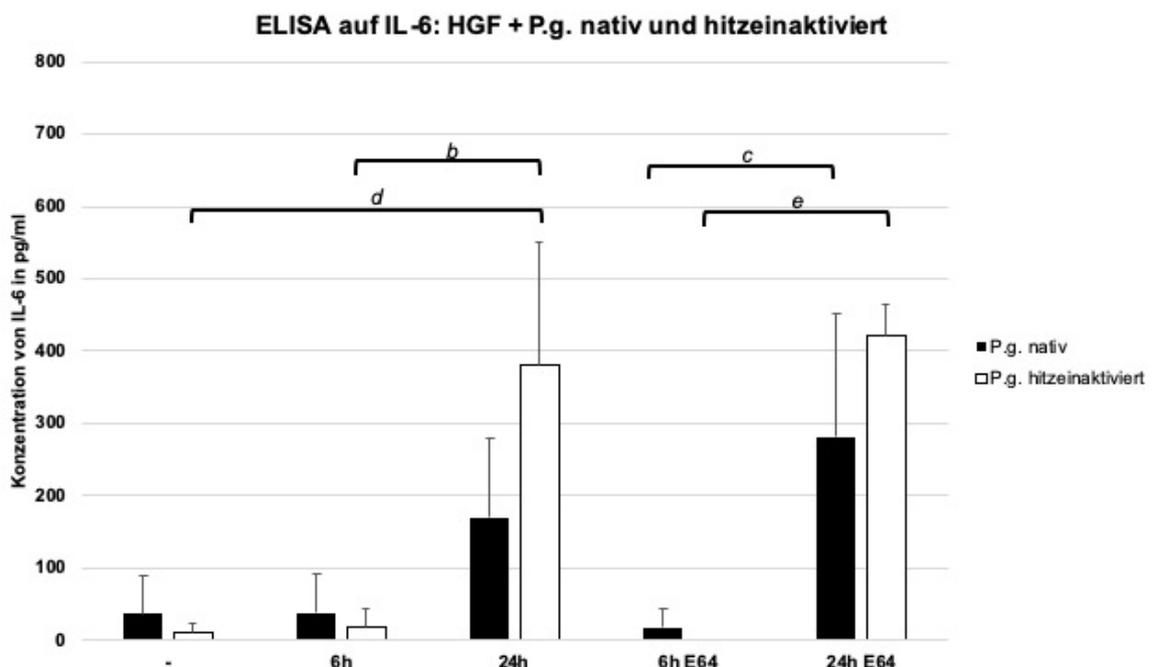


Abbildung 21: Ergebnisse des ELISA auf IL-6, ^a $p < 0,012$, ^b $p < 0,029$, ^c $p < 0,047$, ^d $p < 0,023$, ^e $p < 0,004$ (Kruskal-Wallis-Test)

Die basale Produktion der unstimulierten HGF-1 (Negativkontrolle) wurde zwischen 10,03 und 37,17 pg/ml ermittelt. Die Steigerung der Produktion von IL-6 nach 6 h, sowohl bei Infektion mit nativen als auch hitzeinaktivierten *Porphyromonas gingivalis*, war nicht signifikant. Gleiches gilt für die 6-stündige Inkubation bei Hinzugabe der Proteaseinhibitors E-64 (100-200 μ M). Die 24-stündige Inkubation mit hitzeinaktivierten Bakterien führte zu einer signifikanten Steigerung der Produktion von IL-6. Es wurde jeweils signifikant mehr IL-6 bei 24-stündiger

Inkubation als bei 6-stündiger Inkubation produziert. Lediglich die Steigerung der Produktion bei alleiniger Inkubation mit nativen *Porphyromonas gingivalis* nach 24 h war nicht signifikant. Weiterhin war die Steigerung der Produktion bei 24-stündiger Inkubation mit hitzeinaktivierten *Porphyromonas gingivalis* und E-64 signifikant.

Abbildung 22 stellt die Ergebnisse der ELISAs auf IL-6 der hPDLF dar.

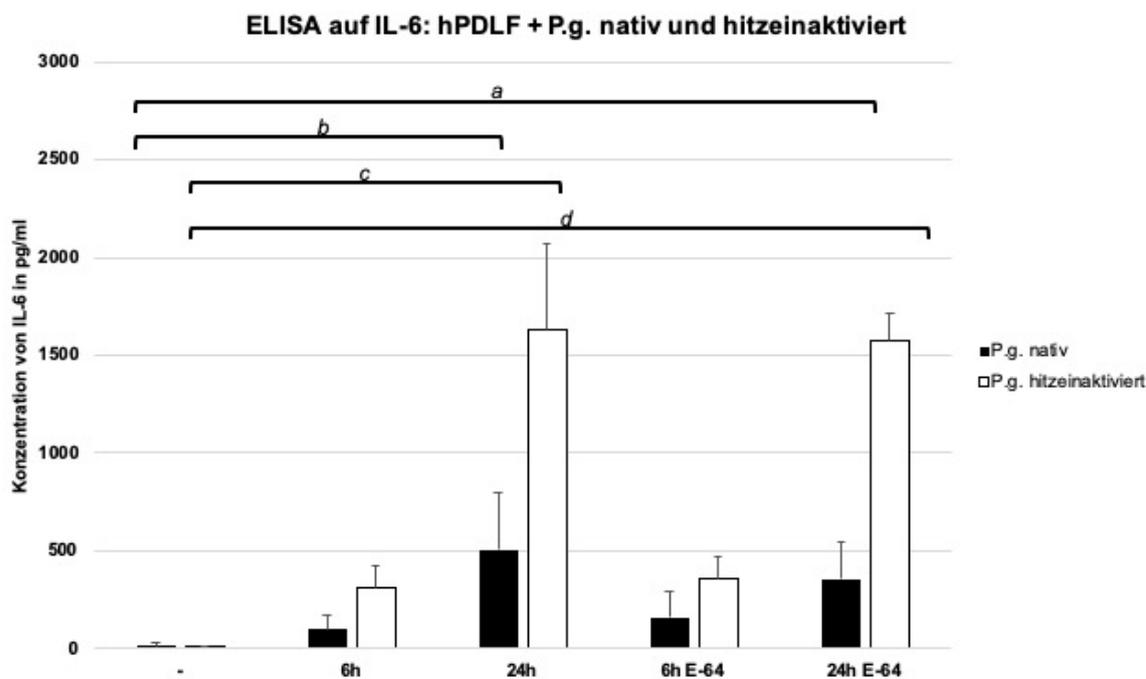


Abbildung 22: Ergebnisse des ELISA auf IL-6, ^a $p < 0,046$, ^b $p < 0,023$, ^c $p < 0,01$, ^d $p < 0,01$ (Kruskal-Wallis-Test)

Die basale Produktion der hPDLF lag hier zwischen 12,98 und 16,55 pg/ml. Die 24-stündige Inkubation, sowohl mit hitzeinaktivierten als auch nativen *Porphyromonas gingivalis*, führte zu einer signifikanten Steigerung der Produktion. Außerdem produzierten die hPDLF signifikant mehr IL-6 bei 24-stündiger Inkubation mit E-64 und entweder hitzeinaktivierten oder nativen *Porphyromonas gingivalis*.

Abbildung 23 stellt die Ergebnisse der ELISAs auf IL-6 der hPDSC-hTERT dar.

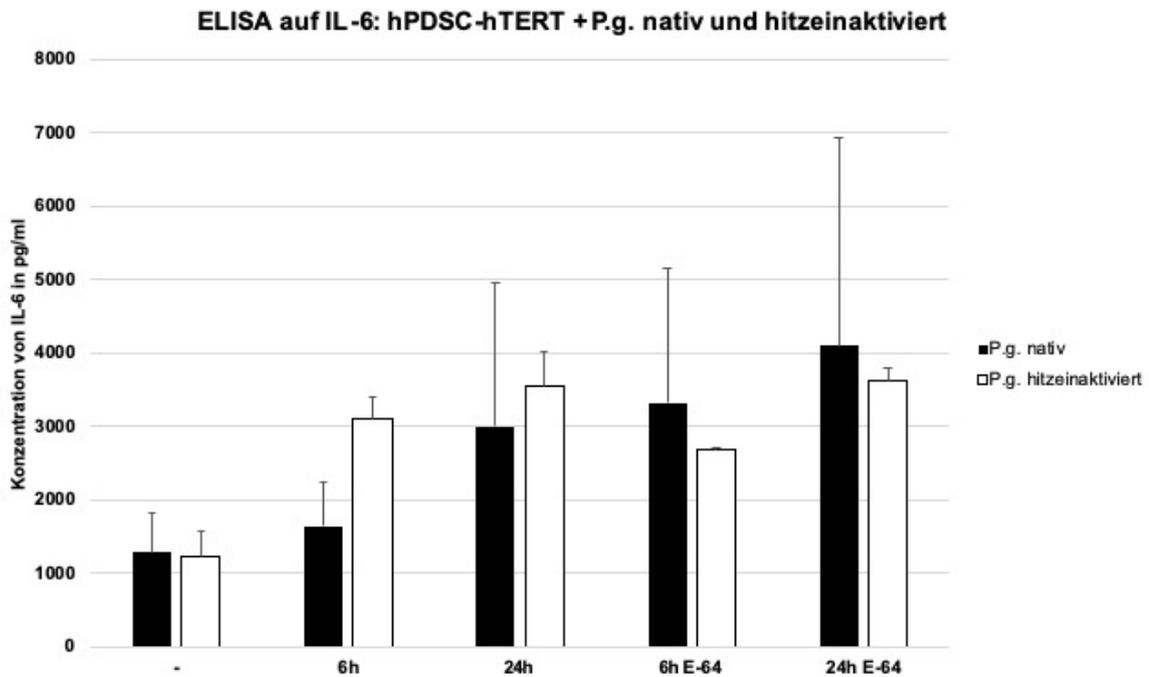


Abbildung 23: Ergebnisse des ELISAs auf IL-6 der hPDSC-hTERT

Bei den hPDSC-hTERT wurden bei den unstimulierten Negativkontrollen Konzentrationen zwischen 1287,86 und 1234,69 pg/ml gemessen. Die 6-stündige Inkubation mit nativen und hitzeinaktivierten Bakterien führte in beiden Fällen zu einer gesteigerten Produktion des Zytokins. Nach 24 h konnten in beiden Fällen nochmals gesteigerte Konzentrationen gemessen werden. Sowohl bei 6-stündiger, als auch 24-stündiger Inkubation der nativen Bakterien und E-64 wurden nochmals höhere Konzentrationen ermittelt, wobei hier erneut nach 24 h mehr IL-6 produziert wurde als nach 6 h. Im Gegensatz zu den Ergebnissen der Fibroblasten wurde bei Hitzeinaktivierung der Bakterien und Zugabe von E-64 weniger IL-6 gemessen als bei Stimulation mit nativen Bakterien und Hinzugabe von E-64. Die gemessenen Unterschiede waren jedoch nicht signifikant.

Abbildung 24 stellt durch ELISA ermittelten Konzentrationen von IL-6 der Plattenepithelkarzinomzellen (BHY) dar.

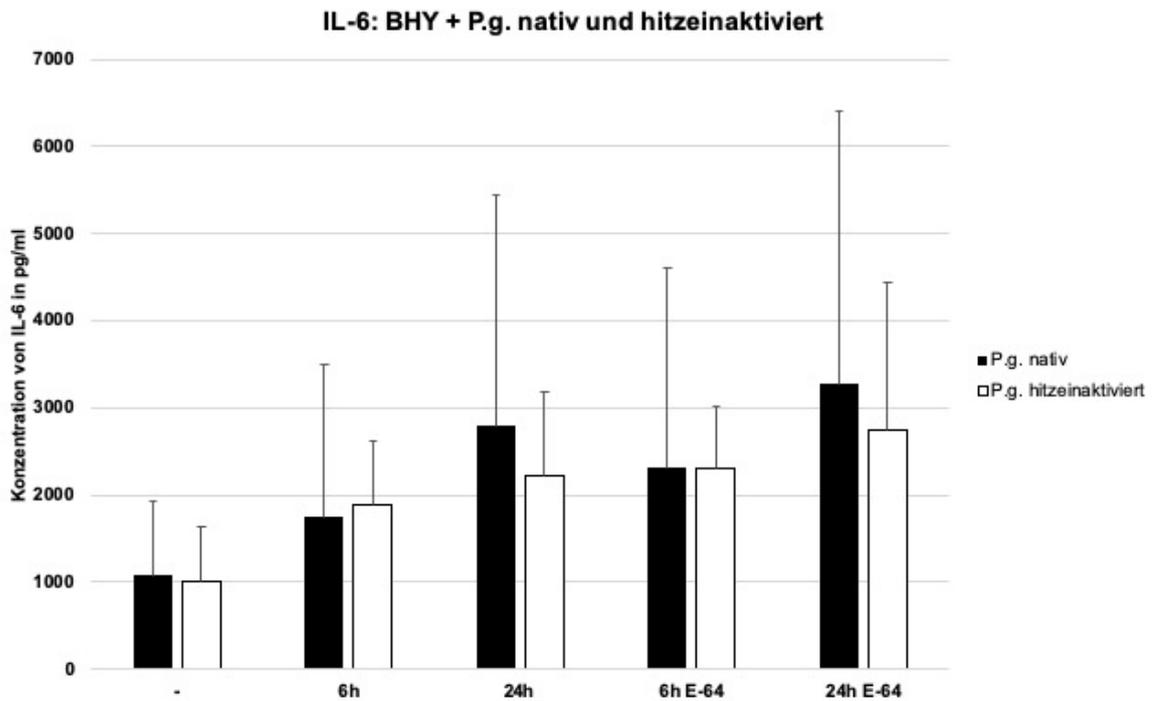


Abbildung 24: Ergebnisse des IL-6-ELISA der Plattenepithelkarzinomzellen (BHY)

Sowohl die 6-stündige als auch die 24-stündige Inkubation der BHY mit nativen Bakterien resultierte in einer gesteigerten Produktion von IL-6. Hierbei konnte keine Steigerung der Produktion bei Hitzeinaktivierung der Bakterien im Vergleich zu Stimulation mit nativen Bakterien festgestellt werden. Die Hinzugabe von E-64 führte insgesamt zu gesteigerten Konzentrationen, jedoch zeigte auch hier die Stimulation mit hitzeinaktivierten Bakterien geringere Effekte auf die Produktion des Zytokins als die Stimulation mit nativen Bakterien. Die gemessenen Konzentrationen unterschieden sich untereinander und mit der Negativkontrolle nicht signifikant.

4.2 ELISA auf IL-8

In den Diagrammen zur Darstellung der durch ELISA ermittelten Konzentrationen an IL-8 wurden die Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchsreihen in pg/ml aufgetragen. Hier gilt die selbe farbliche Kodierung der Balken wie oben beschrieben. Der ELISA auf IL-8 wurde für die Proben von HGF-1 und hPDLF durchgeführt.

Abbildung 25 stellt die ermittelten Konzentrationen der Proben der humanen Gingivafibroblasten (HGF-1) dar.

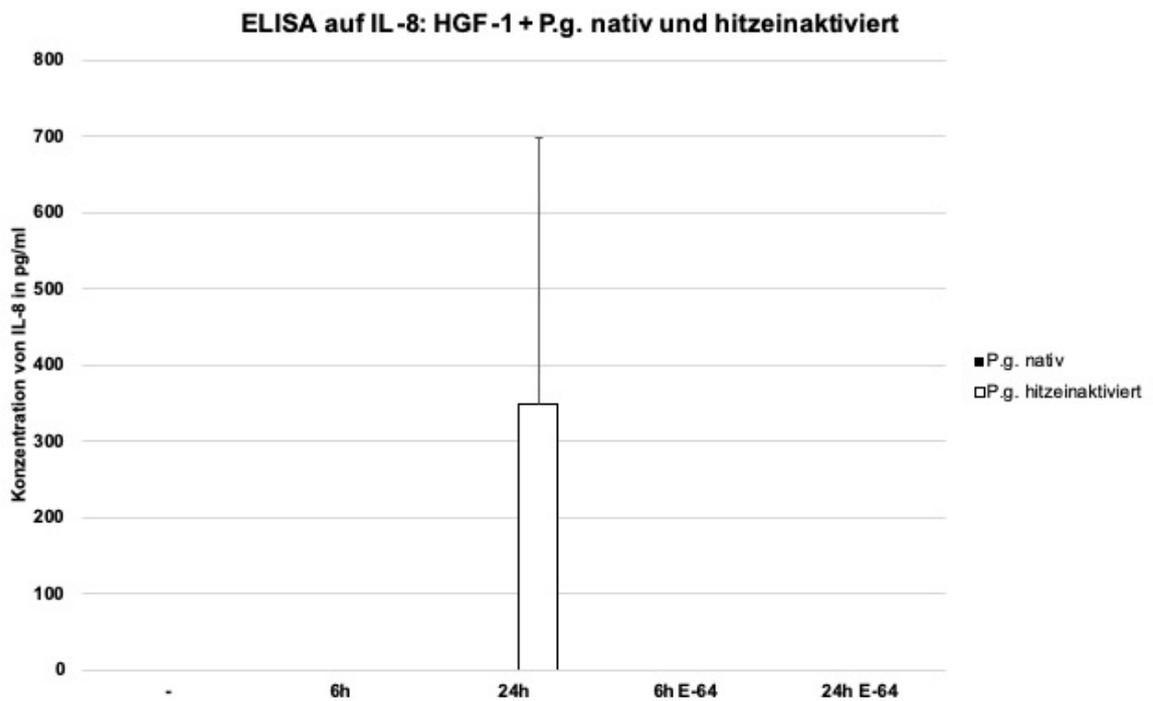


Abbildung 25: Ergebnisse des ELISA auf IL-8 der HGF-1

Die humanen Gingivafibroblasten produzierten ohne Stimulation mit P.g. kein IL-8. Auch nach 6-stündiger Inkubation der Fibroblasten mit P.g., sowohl nativ als auch hitzeinaktiviert, konnte kein IL-8 gemessen werden. Nach 24-stündiger Inkubation zeigten die mit hitzeinaktivierten P.g. infizierten Zellen eine deutlich erhöhte Sekretion. Die hier gemessene Konzentration lag bei 349,25 pg/ml. Bei Hinzugabe von E-64 lag die Konzentration von IL-8 wiederum bei 0 pg/ml. Die gemessenen Konzentrationen waren weder untereinander, noch im Vergleich zur Negativkontrolle signifikant.

Abbildung 26 zeigt die mittels ELISA gemessenen Konzentrationen von IL-8 der humanen parodontalen Ligamentfibroblasten (hPDLF).

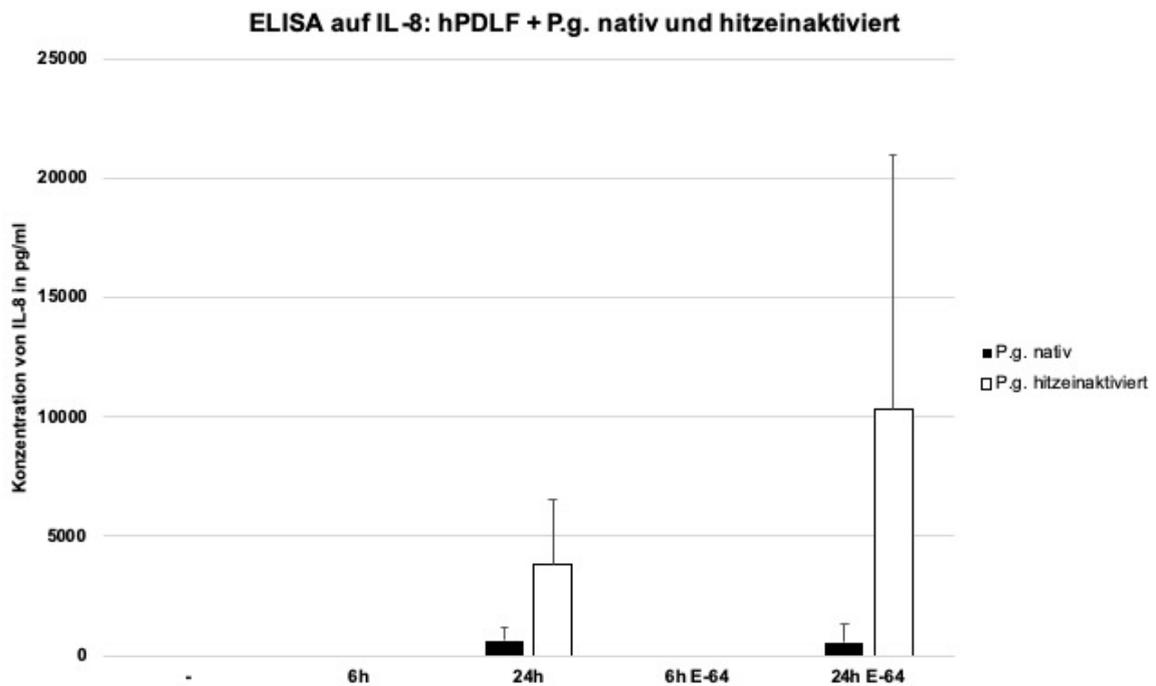


Abbildung 26: ermittelte Konzentrationen von IL-8 der humanen parodontalen Ligamentfibroblasten

Auch die hPDLF zeigten keine Grundaktivität. Eine 6-stündige Inkubation mit P.g. zeigte, sowohl bei Verwendung nativer als auch hitzeinaktivierter P.g., keine Steigerung der Aktivität. Auch die Zugabe von E-64 konnte die hPDLF nach 6 h nicht zur Sekretion von IL-8 stimulieren. Bei 24-stündiger Inkubation mit nativen P.g. konnte das Zytokin jedoch mit einer Konzentration von 644,65 pg/ml ermittelt werden. Die Stimulation mit hitzeinaktivierten P.g. führte sogar zu Konzentrationen von 3822,24 pg/ml. In den Proben mit E-64 und nativen P.g. wurden geringfügig niedrigere Konzentrationen von IL-8 gemessen, wohingegen die Proben mit E-64 und hitzeinaktivierten P.g. deutlich höhere Konzentrationen als ohne E-64 zeigten. Auch diese Ergebnisse zeigten weder untereinander, noch im Vergleich zur Negativkontrolle eine Signifikanz.

4.3 ELISA auf LL-37

Die Analysen zur Feststellung der in den Proben enthaltenen Konzentrationen von LL-37 erfolgte für die HGF-1 und Plattenepithelkarzinomzellen (BHY). Die folgenden Diagramme zeigen die Konzentrationen des antimikrobiellen Peptids LL-37 in ng/ml. Es gilt die selbe farbliche Kodierung der Balken wie oben beschrieben.

Abbildung 27 stellt die Ergebnisse des ELISA auf LL-37 der HGF-1 dar.

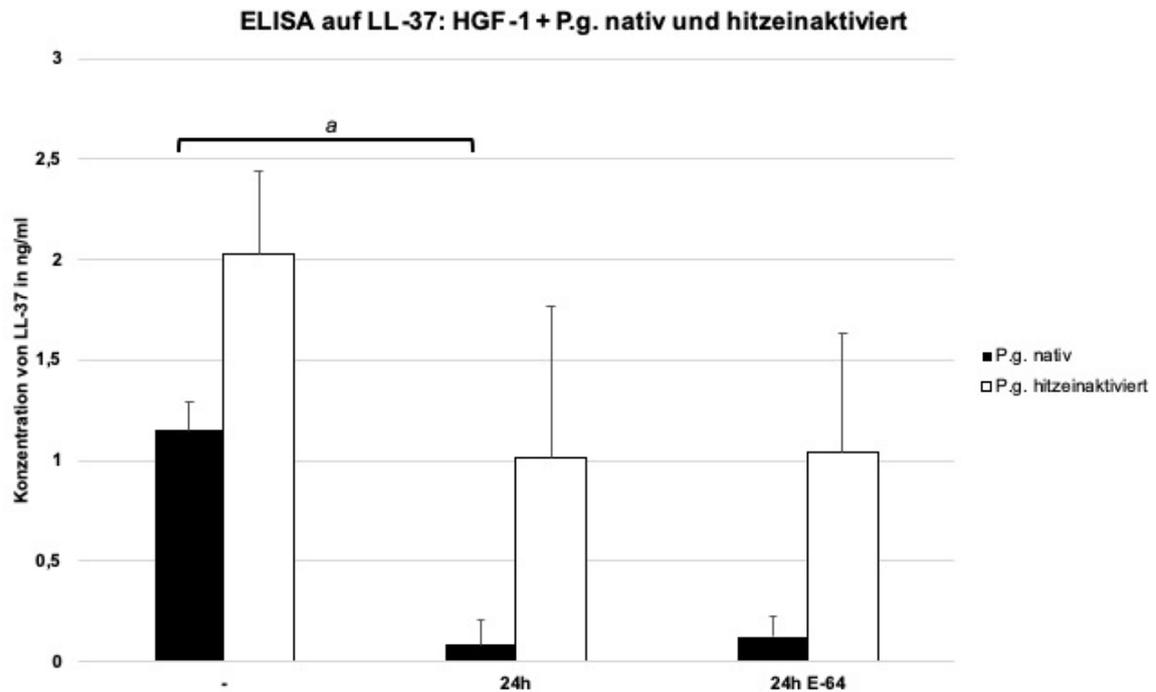


Abbildung 27: Ergebnisse des ELISA auf LL-37 der humanen Gingivafibroblasten (HGF-1), ^a $p < 0,039$ (Kruskal-Wallis-Test)

Die ermittelten Konzentrationen der Negativkontrollen der Versuchsreihen lagen zwischen 1,15 und 2,02 ng/ml. Ausgehend davon wurde eine signifikant reduzierte Konzentration von LL-37 bei 24-stündiger Stimulation der Zellen mit nativen P.g. gemessen. Auch bei zusätzlicher Zugabe von E-64 wurde eine Unterdrückung der Sekretion von LL-37 festgestellt, welche jedoch geringfügig schwächer war, als bei den Proben ohne E-64. Auch bei Infektion der Zellen mit hitzeinaktivierten Bakterien konnte eine Unterdrückung der Produktion des antimikrobiellen Peptids beobachtet werden. Hierbei war der Effekt ebenso minimal geringer, wenn zusätzlich E-64 verwendet wurde. Diese Ergebnisse waren jedoch nicht signifikant.

Abbildung 28 stellt die gemessenen Konzentrationen von LL-37, welche von BHY-Zellen sezerniert wurden, dar.

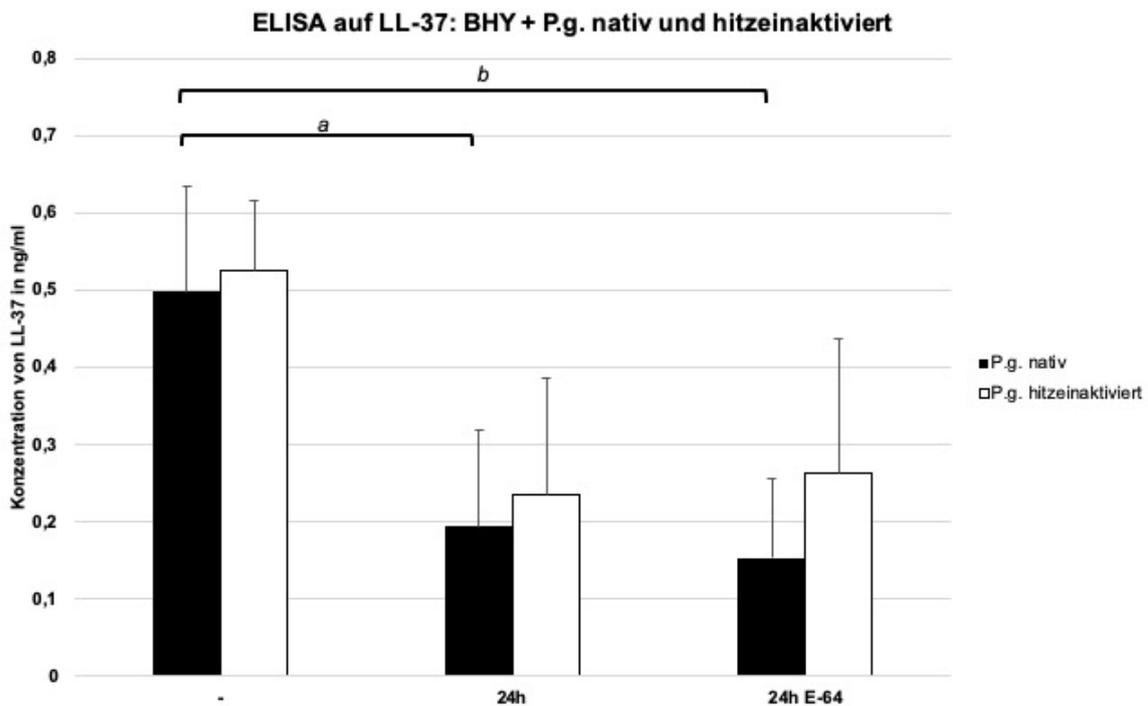


Abbildung 28: ermittelte Konzentrationen von LL-37 bei Plattenepithelkarzinomzellen (BHY), ^a $p < 0,041$, ^b $p < 0,023$ (LSD Post-Hoc-Test)

Die Plattenepithelkarzinomzellen zeigten eine deutlich geringere Grundaktivität als die Fibroblasten. Diese lag zwischen 0,50 und 0,53 ng/ml. Bei Infektion der Zellen mit nativen Bakterien wurden nach 24 h signifikant geringere Konzentrationen von LL-37 gemessen. Diese Beobachtung wurde bei Stimulation mit hitzeinaktivierten P.g. ebenfalls gemacht. Diese Suppression der Sekretion zeigte sich im Vergleich zur Negativkontrolle jedoch nicht signifikant. Bei Hinzugabe von E-64 sezernierten die BHY-Zellen bei Stimulation mit nativen Bakterien wiederum signifikant weniger LL-37 als die Negativkontrolle. Auch bei Hitzeinaktivierung und Hinzugabe von E-64 wurden geringere Konzentrationen als in der Negativkontrolle gemessen. Diese Beziehung zeigte jedoch keine Signifikanz.

4.4 ELISA auf hβD-2

Mittels ELISA wurden die in den Proben der HGF-1 und BHY-Zellen enthaltenen Konzentrationen von hβD-2 ermittelt. Die folgenden Diagramme stellen die gemessenen Konzentrationen in pg/ml dar. Es gilt die selbe Farbkodierung der Balken wie oben beschrieben.

Abbildung 29 zeigt die Ergebnisse des ELISA auf hβD-2 der humanen Gingivafibroblasten (HGF-1).

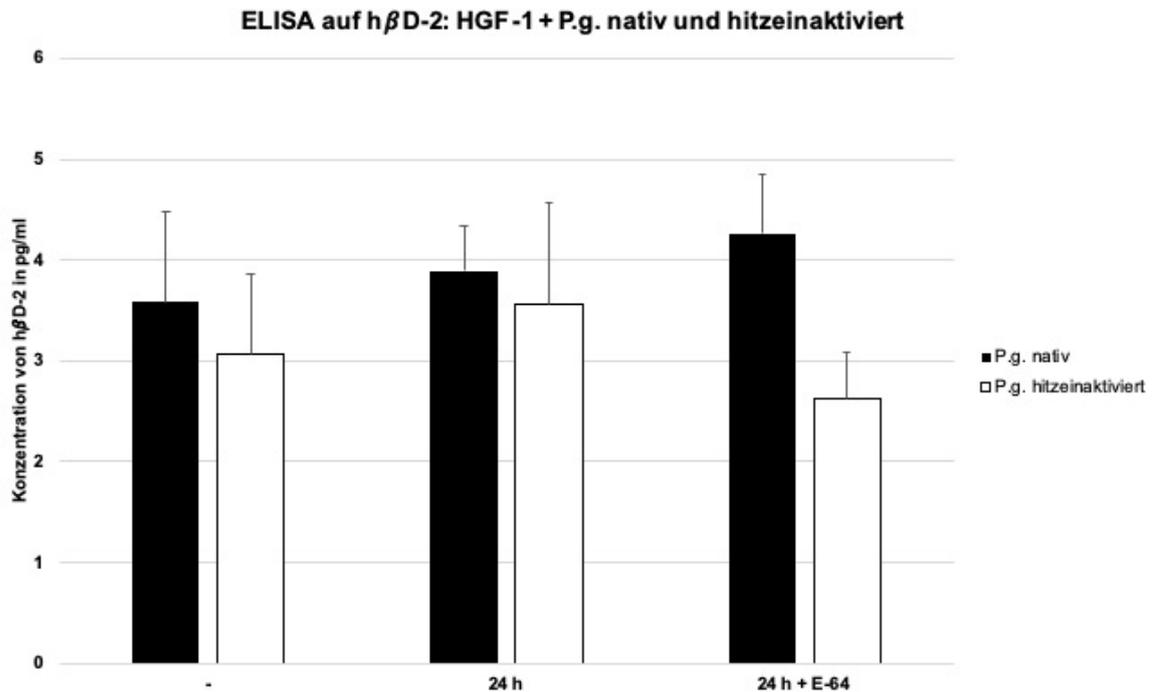


Abbildung 29: Ergebnisse des ELISA auf h β D-2 der HGF-1

Die unstimulierten HGF-1 produzierten zwischen 3,58 und 3,08 pg/ml h β D-2. Bei Ko-Kultur der Zellen mit nativen *Porphyromonas gingivalis* und hitzeinaktivierten *Porphyromonas gingivalis* wurden im Vergleich zur Negativkontrolle etwas erhöhte Konzentrationen von h β D-2 gemessen. Die Zugabe von E-64 zu HGF-1 und nativen Bakterien steigerte die Produktion des antimikrobiellen Peptids, wohingegen die Zugabe von E-64 zu HGF-1 und hitzeinaktivierten P.g. zu einer geringeren Konzentration von h β D-2 im Vergleich zu den Proben ohne E-64 führte. Die Ergebnisse waren jedoch weder untereinander, noch im Vergleich mit der Negativkontrolle signifikant.

Abbildung 30 stellt die gemessenen Konzentrationen von h β D-2 der analysierten Proben dar, welche von Plattenepithelkarzinomzellen (BHY) sezerniert wurden.

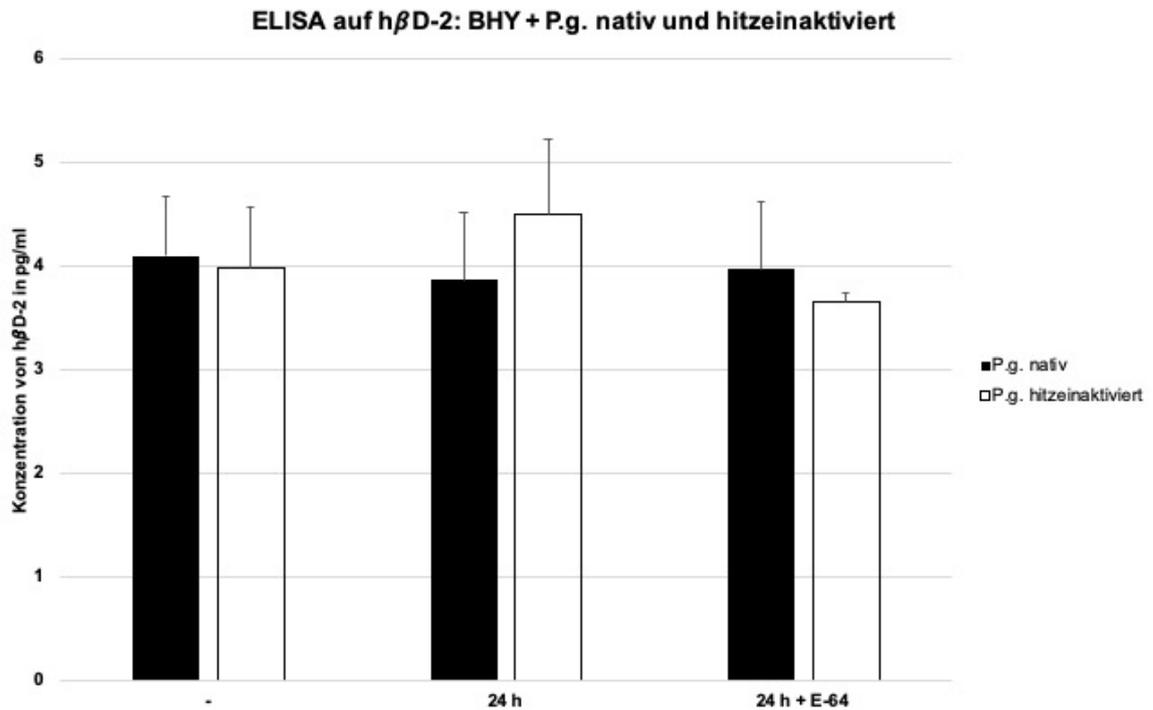


Abbildung 30: Ergebnisse des ELISA auf h β D-2 der Plattenepithelkarzinomzellen (BHY)

Die Plattenepithelkarzinomzellen wiesen eine Grundaktivität der h β D-2-Produktion auf, welche zwischen 3,98 und 4,09 pg/ml lag. Bei 24-stündiger Inkubation der BHY mit nativen Bakterien fielen minimal geringere Konzentrationen von h β D-2 auf. Bei Inkubation der Zellen mit hitzeinaktivierten *Porphyromonas gingivalis* dagegen konnte eine etwas höhere Konzentration als die der Negativkontrolle gemessen werden. Bei Zugabe von E-64 wurde bei Infektion mit nativen Bakterien eine minimal höhere Konzentration und bei Infektion mit hitzeinaktivierten Bakterien eine etwas geringere Konzentration von h β D-2 gemessen als bei den Proben ohne E-64. Die Ergebnisse waren jedoch weder untereinander, noch im Vergleich zur Negativkontrolle signifikant.

4.5 Western-Blot auf I κ B- α

Aus den drei Versuchsreihen wurde jeweils ein repräsentativer Western-Blot für die jeweilige Zellart ausgewählt. Für die Durchführung des Western-Blots wurde der Primärantikörper I κ B- α verwendet, weswegen die Intensität der Chemolumineszenz der dargestellten Banden umgekehrt proportional zu der vorhandenen Menge des Transkriptionsfaktors NF- κ B- α ist. Die dargestellte Reihenfolge ist wie folgt: Negativkontrolle, Positivkontrolle mit TNF- α , 6 h Inkubation, 24 h Inkubation, 6 h Inkubation mit E-64, 24 h Inkubation mit E-64. Weiterhin erfolgte eine Ladekontrolle

mit β -Actin, welche unterhalb der Western-Blots auf $I\kappa B-\alpha$ dargestellt ist.

Abbildung 31 zeigt einen repräsentativen Western-Blot auf $I\kappa B-\alpha$ bei Infektion von hPDLF mit lebenden, nativen *Porphyromonas gingivalis*.

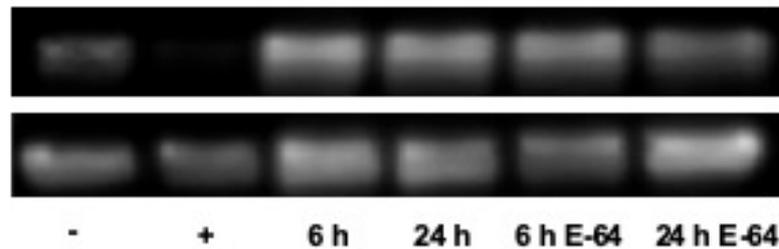


Abbildung 31: Western-Blot zum Nachweis von $I\kappa B-\alpha$; Infektion der hPDLF mit nativen *Porphyromonas gingivalis*; obere Bande: $I\kappa B-\alpha$, untere Bande: β -Actin

Bei Stimulation der Zellen mit $TNF-\alpha$ konnte im Vergleich zu der Negativkontrolle kein $I\kappa B-\alpha$ mehr nachgewiesen werden. Bei einer Inkubationszeit von 6 h, 24 h und 6 h mit E-64 konnten in etwa gleiche Mengen von $I\kappa B-\alpha$ nachgewiesen werden. Bei 24-stündiger Inkubationszeit der hPDLF mit E-64 und *Porphyromonas gingivalis* wurden etwas geringere Mengen von $I\kappa B-\alpha$ nachgewiesen.

Abbildung 32 zeigt einen repräsentativen Western-Blot auf $I\kappa B-\alpha$. Die hPDLF wurden mit hitzeinaktivierten *Porphyromonas gingivalis* infiziert.

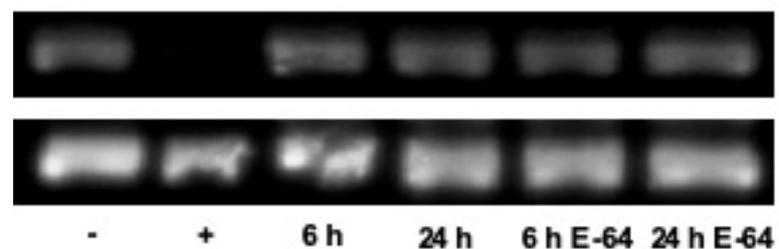


Abbildung 32: Western-Blot zum Nachweis von $I\kappa B-\alpha$; Infektion der hPDLF mit hitzeinaktivierten *Porphyromonas gingivalis*; obere Bande: $I\kappa B-\alpha$, untere Bande: β -Actin

Bei Stimulation der hPDLF mit $TNF-\alpha$ konnte auch hier kein $I\kappa B-\alpha$ nachgewiesen werden. Sowohl in der Negativkontrolle, also auch in den vier Proben konnten etwa gleiche Mengen von $I\kappa B-\alpha$ nachgewiesen werden.

Abbildung 33 zeigt einen repräsentativen Western-Blot auf $I\kappa B-\alpha$. Die BHY wurden mit nativen *Porphyromonas gingivalis* infiziert.

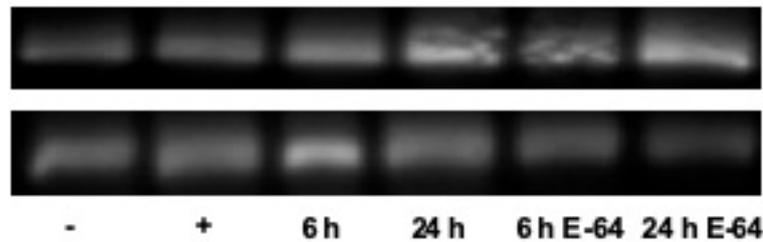


Abbildung 33: Western-Blot auf $I\kappa B-\alpha$; Infektion von BHY mit nativen *Porphyromonas gingivalis*; obere Bande: $I\kappa B-\alpha$, untere Bande: β -Actin

Die Stimulation der Zellen mit $TNF-\alpha$ führte bei den BHY nicht zu einer Aktivierung der $NF-\kappa B$ -Kaskade. Die 6-stündige Inkubation mit den Bakterien resultierte mit und ohne E-64 in etwas größeren Mengen $I\kappa B-\alpha$. Beide Proben, welche 24 h mit *Porphyromonas gingivalis* inkubiert wurden, wiesen nochmals größere Mengen an $I\kappa B-\alpha$ auf.

Abbildung 34 zeigt einen repräsentativen Western-Blot auf $I\kappa B-\alpha$ bei Infektion der BHY mit hitzeinaktivierten Bakterien.

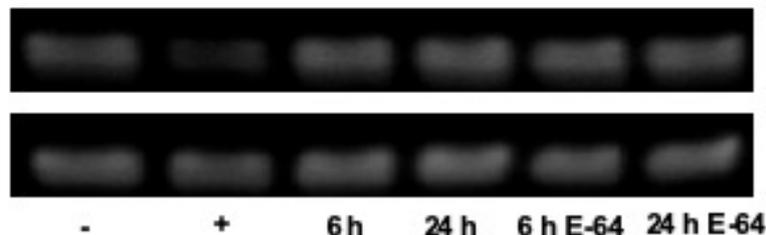


Abbildung 34: Western-Blot zum Nachweis von $I\kappa B-\alpha$; Infektion der BHY mit hitzeinaktivierten *Porphyromonas gingivalis*; obere Bande: $I\kappa B-\alpha$, untere Bande: β -Actin

In der Positivkontrolle konnte kaum $I\kappa B-\alpha$ nachgewiesen werden. Die anderen untersuchten Proben wiesen alle etwa gleiche Mengen von $I\kappa B-\alpha$ auf.

4.6 Western-Blot auf COX-2

Hierbei wurde ebenfalls ein repräsentativer Western-Blot aus den drei Versuchsreihen ausgewählt.

Die dargestellten Banden zeigen: Negativkontrolle, Positivkontrolle mit $TNF-\alpha$, 6 h Inkubation, 24 h Inkubation, 6 h Inkubation mit E-64, 24 h Inkubation mit E-64. Weiterhin erfolgte eine Ladekontrolle mit β -Actin, welche unterhalb des Western-

Blots auf COX-2 dargestellt ist.

Abbildung 35 zeigt einen repräsentativen Western-Blot auf COX-2 bei Infektion von BHY mit hitzeinaktivierten *Porphyromonas gingivalis*.

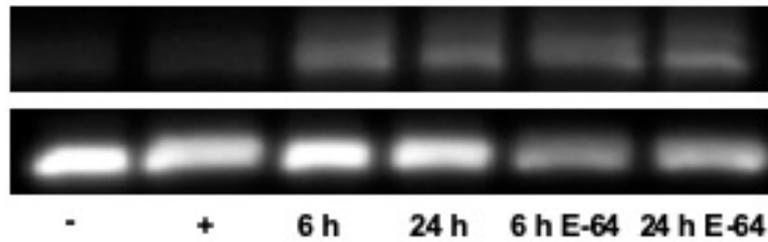


Abbildung 35: Western-Blot auf COX-2; Infektion der BHY mit hitzeinaktivierten *Porphyromonas gingivalis*; obere Bande: COX-2, untere Bande: Ladekontrolle mit β -Actin

Sowohl die Negativkontrolle als auch die Positivkontrolle wiesen etwas geringere Mengen an COX-2 auf als die stimulierten Proben. In den vier untersuchten Proben konnten in etwa gleiche Mengen von COX-2 festgestellt werden.

5 Diskussion

Die vorliegende Studie simuliert eine primäre Immunreaktion von unterschiedlichen oralen Zelltypen auf das parodontalpathogene Bakterium *Porphyromonas gingivalis*, welches in der Vergangenheit eindeutig mit der chronisch entzündlichen Erkrankung Parodontitis in Verbindung gebracht werden konnte [Socransky und Haffajee, 2005]. In einem In-vitro-Modell wurde die primäre Immunreaktion, insbesondere die Sekretion von IL-6, IL-8, h β D-2, LL-37, NF- κ B und COX-2, vier ausgewählter oraler Zellkulturen bei Infektion mit dem Pathogen des roten Komplexes, *Porphyromonas gingivalis*, untersucht. Durch konstante Laborbedingungen und die Verwendung humaner Zellkulturen sind die Ergebnisse der Studie reproduzierbar.

Da in der Vergangenheit Studien belegten, dass nicht nur unterschiedliche Zelltypen, sondern auch unterschiedliche Zelllinien des gleichen Zelltyps eine jeweils andere Reaktion auf die Infektion mit parodontalpathogenen Bakterien im Bezug auf die Sekretion von Zytokinen, antimikrobiellen Peptiden und anderen Entzündungsmediatoren zeigten [Yee *et al.*, 2014], wurden für diese Studie vier Zellarten ausgewählt. Diese Auswahl soll die wichtigsten im Parodontium vertretenen Zellen widerspiegeln. Aufgrund von Unterschieden in der Genexpression entzündlicher Faktoren von hPDLF und HGF [Yun *et al.*, 2006] und der daraus resultierenden Vermutung, dass beide Zellarten unterschiedlich auf eine bakterielle Stimulation reagieren, wurden stellvertretend für die im Parodontium vorkommenden Fibroblasten diese beiden Zellarten untersucht. Zur Untersuchung der Reaktion von Epithelzellen auf bakterielle Stimulation wurde eine Plattenepithelkarzinom-Zelllinie, BHY, gewählt. Zuletzt wurde eine immortalisierte Progenitorzelle des parodontalen Ligaments, welche aufgrund der Fähigkeit zur Differenzierung zu Osteoblasten, der Expression von für mesenchymalen Stammzellen typischen Oberflächenantigenen und weiteren Eigenschaften von Docheva und Mitarbeiter für die Verwendung in der Parodontitis-Forschung vorgeschlagen wurden, verwendet [Docheva *et al.*, 2010].

Es ist darauf hinzuweisen, dass sich die Ergebnisse der Studien mit ähnlichem Versuchsaufbau wie in der vorliegenden Studie in der Vergangenheit teilweise deutlich unterschieden. Dies lässt sich unter anderem auf unterschiedliche Laborbedingungen und -methoden zurückführen. Einerseits zählt hierzu natürlich die Auswahl der untersuchten Zellen und des Pathogens, welches zur Stimulation

der Zellen verwendet wurde. Des Weiteren spielen speziellere Faktoren, wie die Inkubationszeit, die Menge der zur Stimulation verwendeten Bakterien, die Verwendung von Bakterienstoffwechselprodukten, lebenden oder hitzeinaktivierten Bakterien und die durchgeführten Analyseverfahren eine bedeutende Rolle. Aufgrund dieser Faktoren ist es schwierig, die Ergebnisse der Studien in direkten Vergleich zu stellen.

Nachdem ortsständige Zellen eine Infektion feststellen, werden als erster Abwehrmechanismus des angeborenen Immunsystems unter anderem Cytokine und Chemokine sezerniert. Diese dienen der Vermittlung der Entzündungsreaktion und wirken chemotaktisch auf neutrophile Granulozyten [Medzhitov, 2008]. Um IL-6 und IL-8 als wichtigen Teil der angeborenen Immunreaktion auf Pathogene zu untersuchen, wurde mithilfe von Enzyme-linked-Immunosorbent-Assays die der Zellen sezernierten Konzentrationen von IL-8 und IL-6 analysiert.

Die durchgeführte Analyse der Sekretion von IL-6 wies eine zeitabhängige Steigerung auf. Die Sekretion der HGF-1 von IL-6 nach 6-stündiger Inkubation mit hitzeinaktivierten Bakterien steigerte sich bei 24-stündiger Inkubation signifikant. Auch der Vergleich mit der Negativkontrolle zeigte signifikant gesteigerte Konzentrationen von IL-6 bei Stimulation mit hitzeinaktivierten Bakterien für 24 h, wohingegen nach 6 h keine signifikante Steigerung der Konzentration feststellbar war. Auch bei den hPDLF war eine signifikante Steigerung der Expression erst nach 24 h und noch nicht nach 6 h feststellbar. Die zeitabhängige Steigerung der Sekretion von IL-6 bei den BHY und hPDSC-hTERT war dagegen nicht signifikant. Die Ergebnisse der Untersuchung der HGF-1 und hPDLF sind übereinstimmend mit anderen Studien, welche die zeitabhängige Sekretion des Zytokins in Reaktion auf bakterielle Stimulation untersuchten [Yamaji *et al.*, 1995, Yee *et al.*, 2014, Yumoto *et al.*, 1999]. Im direkten Vergleich der untersuchten Zellarten miteinander sezernieren zwar alle untersuchten Zellarten das Zytokin auch ohne bakterielle Stimulation, jedoch unterschieden sich die sezernierten Konzentrationen deutlich voneinander. Die hPDLF sezernierten mit etwa 12,98 pg/ml am wenigsten und die hPDSC-hTERT mit 1287,86 pg/ml am meisten IL-6. Die am meisten gesteigerte Konzentration, welche durch lebende *Porphyromonas gingivalis* hervorgerufen wurde, wiesen die hPDLF auf, welche ihre Produktion um etwa das 42-fache steigerten. Dagegen reagierten die hPDSC-hTERT mit einer Steigerung um das 2,3-fache am trägsten auf eine Stimulation mit lebenden *Porphyromonas gingivalis*. Diese Beobachtung legt die Annahme nahe, dass, je höher die Grundaktivität der

Sekretion von IL-6 ist, desto weniger anfällig die Zellen gegenüber einer Infektion mit *Porphyromonas gingivalis* im Bezug auf die Sekretion von IL-6 sind. Es liegen unseres Wissens keine Studien vor, in welcher unterschiedliche Zellarten auf diese Kausalität untersucht wurden. Weitere Studien stützen die Ergebnisse im Bezug auf die erhöhte Expression von IL-6 nach bakterieller Stimulation, wobei sich diese Studien im Bezug auf die Art der Stimulation von der vorliegenden Studie unterscheiden. Es wurden beispielsweise entweder Lipopolysaccharide von *Porphyromonas gingivalis* oder *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* verwendet, was die Vergleichbarkeit mit der vorliegenden Untersuchung mindert [Herath *et al.*, 2011, Uchida *et al.*, 2001, Yamaji *et al.*, 1995].

Die Steigerung der Produktion von IL-6 bei Infektion mit einem parodontalpathogenen Bakterium stimmt mit den Ergebnissen von Untersuchungen überein, welche eindeutig belegten, dass IL-6 von an Parodontitis erkranktem Gewebe und von spezifischen Zellen in an Parodontitis erkranktem Gewebe sowie in der gingivalen Sulkusflüssigkeit von Parodontitis-Patienten vermehrt produziert wird [Fujihashi *et al.*, 1993, Lin *et al.*, 2005, Matsuki *et al.*, 1992]. Da das inflammatorische Zytokin zusammen mit anderen Zytokinen seiner Familie die Fähigkeit besitzt, die RANKL-Expression zu verstärken und gleichzeitig die Osteoprotegrin-Produktion zu vermindern [Nakashima *et al.*, 2000], spielt die Konzentration von IL-6 bei Parodontalerkrankungen eine bedeutende Rolle. Dieses Missverhältnis zugunsten von RANKL steht in Korrelation mit erhöhten Sondierungstiefen und klinischem Attachmentlevel [Bostanci *et al.*, 2007] und führt offensichtlich zur Knochenresorption des parodontal erkrankten Knochen [Garlet *et al.*, 2006].

Da Studien in der Vergangenheit die Degradation von Zytokinen beziehungsweise Modulation der Produktion durch Gingipaine von *Porphyromonas gingivalis* nachwiesen [Nassar *et al.*, 2002, Stathopoulou *et al.*, 2009, Yun *et al.*, 2001], wurde diese Rolle der Gingipaine durch Inhibition der Cysteinproteasen durch E-64 überprüft. Bei Zugabe von E-64 (100-200 μ M) und lebenden *Porphyromonas gingivalis* zu HGF-1 wurden nach 24 h deutlich höhere Konzentrationen des Zytokins IL-6 gemessen. Die Steigerung der gemessenen Konzentration war jedoch nicht signifikant. Die Hinzugabe von E-64 bei Stimulation der Zellen mit hitzeinaktivierten Bakterien führte zwar bei 24-stündiger Inkubation zu einer signifikant gesteigerten messbaren Konzentration im Vergleich zur Negativkontrolle. Der Vergleich mit der Inkubation ohne E-64 zeigte jedoch keine Signifikanz. Auch

bei den hPDLF, BHY und hPDSC-hTERT führte die Hinzugabe von E-64 nicht zu signifikant veränderten Konzentrationen des Zytokins.

Stathopoulou und Mitarbeiter stellten fest, dass Gingipaine Zytokine degradieren. Nach diesen Ergebnissen müsste die Inhibition der Cysteinproteasen in gesteigerten Konzentrationen von IL-6 im Vergleich zur Stimulation mit Bakterien ohne Hinzugabe eines Cysteinproteaseinhibitors führen [Stathopoulou *et al.*, 2009]. Yee und Mitarbeiter konnten jedoch in Übereinstimmung mit unseren Ergebnissen auch keine signifikante Beeinflussung der Konzentration von Zytokinen durch den Cysteinproteaseinhibitor E-64 beobachten [Yee *et al.*, 2014]. Da Yee und Mitarbeiter die selbe Konzentration von E-64 wie in der vorliegenden Studie verwendeten, könnte möglicherweise die Konzentration zu gering gewesen sein. Eine andere Erklärung dafür könnte sein, dass das Sekretionsschema von IL-6 sich deutlich zwischen verschiedenen Zelllinien unterscheiden muss und auch der Effekt von *Porphyromonas gingivalis* und seinen Gingipainen auf unterschiedliche Zelllinien jeweils anders ist. Andere Studien wiesen dagegen sogar eine Induktion der Produktion von IL-6 durch Gingipaine von *Porphyromonas gingivalis* nach [Lourbakos *et al.*, 2001, Tamai *et al.*, 2009]. In der vorliegenden Studie konnte kein signifikanter Unterschied der Produktion von IL-6 bei Verwendung des Proteaseinhibitors im Vergleich zu Stimulation ohne E-64 nachgewiesen werden. Die Rolle der Gingipaine in der Modulation der Produktion des Zytokins IL-6 sollte in weiteren Studien untersucht werden.

Die Hitzeinaktivierung der Bakterien führte bei den beiden untersuchten Fibroblasten zu einer gesteigerten Sekretion von IL-6. Dieser Effekt zeigte sich bei den hPDLF bereits nach 6 h und wurde nach 24 h bei beiden Zellarten deutlicher. Die Beobachtung, dass eine Hitzeinaktivierung der Bakterien in der vorliegenden Studie bei HGF-1 und hPDLF zu einer Steigerung der nachweisbaren Konzentration von IL-6 führte, stützt wiederum die Ergebnisse von Stathopoulou und Mitarbeiter, wenn man davon ausgeht, dass eine Hitzeinaktivierung des Bakteriums unter anderem zu einer Inaktivierung der Proteasen führt [Stathopoulou *et al.*, 2009]. Somit könnte die fehlende Degradation von Zytokinen durch die Cysteinproteasen der Grund für die deutlich gesteigerten Konzentrationen von IL-6 sein. Diese Beobachtung stimmt ebenfalls mit den Ergebnissen von Yee und Mitarbeiter überein. Sie untersuchten die Zytokinproduktion der Plattenepithelkarzinomzelllinien HSC-3 und H-413, welche eindeutig stärker auf die Infektion mit hitzeinaktivierten *Porphyromonas gingivalis* als mit lebenden

reagierten [Yee *et al.*, 2014]. Unsere Ergebnisse im Bezug auf die Steigerung der Sekretion von IL-6 bei Hitzeinaktivierung der Bakterien erwiesen sich jedoch nicht als signifikant. Bei Hitzeinaktivierung und gleichzeitiger Hinzugabe von E-64 zeigte sich eine nochmals geringfügig gesteigerte Konzentration von IL-6 bei HGF-1 und hPDSC-hTERT, was wiederum für die These spricht, dass Gingipaine zu einer Degradation der Zytokine führen. Diese Ergebnisse wiesen jedoch auch keine Signifikanz auf. Interessanterweise reagierten die BHY-Zellen mit einer geringeren Produktion von IL-6 auf hitzeinaktivierte, als auf lebende Bakterien. Dies steht im Kontrast zu den Ergebnissen von Yee und Mitarbeitern. Da es sich hierbei jedoch um Tumorzellen handelt, kann den Ergebnissen dieser Zellart nicht der selbe Stellenwert beigemessen werden, da die Mechanismen von Tumorzellen bekannterweise von physiologischen Zellmechanismen abweichen. Bei den hPDSC-hTERT waren die Ergebnisse bei Hitzeinaktivierung der Bakterien inkonsistent. Die Zellen reagierten bei Infektion mit den hitzeinaktivierten Bakterien mit erhöhter Sekretion des Zytokins und bei Hitzeinaktivierung und Zugabe von E-64 mit etwas geringerer Sekretion. Dies steht wiederum im Kontrast zu der Theorie der Degradierung der Zytokine durch Gingipaine. Diese inkonsistenten Ergebnisse der verschiedenen Zellarten legen wiederum die Annahme nahe, dass es sich um zellspezifische Unterschiede der Reaktion auf das Pathogen beziehungsweise dessen Proteasen und Stoffwechselprodukte handeln muss.

Weder HGF-1 noch hPDLF zeigten eine basale Sekretion des Chemokins IL-8. Durch Infektion mit nativen *Porphyromonas gingivalis* konnte keine Sekretion bei den HGF-1 und nur eine geringe Sekretion bei den hPDLF, erst nach 24 h Inkubationszeit, beobachtet werden. Bei Hitzeinaktivierung der Bakterien jedoch konnte sowohl bei den HGF-1 als auch bei den hPDLF eine gesteigerte Sekretion des Chemokins gemessen werden, was ebenfalls übereinstimmend mit den Ergebnissen von Yee und Mitarbeitern ist [Yee *et al.*, 2014]. Zhang und Mitarbeiter konnten belegen, dass Proteasen von *Porphyromonas gingivalis* IL-8 degradierten [Zhang *et al.*, 1999]. Da eine Hitzeinaktivierung der Bakterien zu einer Inhibition der Proteasen führen muss, könnte dies ein Grund für die gesteigerte Sekretion des Zytokins sein. Weitere Studien stützen diese Theorie [Nassar *et al.*, 2002, Stathopoulou *et al.*, 2009, Yun *et al.*, 2001], wobei die gesteigerte Sekretion von IL-8 bei Hitzeinaktivierung der Bakteriums in unserer Studie nicht signifikant war. Bei den hPDLF führte eine Hinzugabe des Cysteinproteasen-Inhibitors E-64 zu einer weiter gesteigerten Sekretion des Chemokins, was die Theorie der Degradierung

der Zytokine durch Gingipaine ebenfalls stützt. Jedoch war auch diese Veränderung der sezernierten Konzentrationen nicht signifikant. Bei den HGF-1 hatte E-64 einen inhibitorischen Effekt auf die Produktion von IL-8, wobei auch dies nicht signifikant war. Aufgrund der inkonsistenten Ergebnisse bei dem Vergleich der beiden untersuchten Zellarten werden auch im Bezug auf die Sekretion von IL-8 zellspezifische Reaktionen auf eine Infektion mit *Porphyromonas gingivalis* vermutet. Wie die Betrachtung der Reaktion von HGF-1 auf das Pathogen zeigt, kann keine eindeutige Aussage über die Rolle der Proteasen von *Porphyromonas gingivalis* getroffen werden.

Grundsätzlich bestätigen die vorliegenden Ergebnisse die Hypothese der durch *Porphyromonas gingivalis* induzierten Mehrproduktion von IL-6 und IL-8, wobei die zeitabhängige Steigerung der Produktion, die zellspezifischen Unterschiede und andere bedeutende Parameter beachtet werden müssen.

Mittels ELISA auf LL-37 konnten basale Konzentrationen sowohl von HGF-1 als auch von BHY-Zellen festgestellt werden, wobei die von den HGF-1 sezernierte Konzentration von LL-37 ohne Stimulation zwei- bis viermal höher ist als die der BHY-Zellen. Sowohl die HGF-1, als auch die BHY-Zellen sezernierten bei Infektion mit lebenden Bakterien signifikant weniger LL-37 als die unstimulierten Zellen. Dies steht im Widerspruch zu den Ergebnissen von Ji und Mitarbeiter, welche eine Induktion der Sekretion von LL-37 durch *Porphyromonas gingivalis* beobachteten, wenn auch relativ geringfügig [Ji *et al.*, 2007]. Tada und Mitarbeiter stützten diese Beobachtung [Tada *et al.*, 2017]. Unsere Ergebnisse könnten entweder darauf hinweisen, dass von *Porphyromonas gingivalis* produzierte Proteasen LL-37 degradieren [Gutner *et al.*, 2009, Nussbaum und Shapira, 2011, Potempa *et al.*, 2009, Puklo *et al.*, 2008] oder jedoch, dass *Porphyromonas gingivalis* die Produktion des antimikrobiellen Peptids hemmt. Beide Möglichkeiten sprechen für die in der Vergangenheit oft diskutierte Herabsetzung der Wirtsimmunität durch *Porphyromonas gingivalis*, im Bezug auf Chemokine auch als Chemokin-Paralyse-Theorie bezeichnet [Darveau *et al.*, 1998]. Dass jedoch die Hitzeinaktivierung und somit Inaktivierung von Proteasen von *Porphyromonas gingivalis* auch einen inhibierenden Effekt auf die Sekretion von LL-37 hat, spricht gegen die Degradation durch Gingipaine, wobei diese Ergebnisse nicht signifikant waren. Auch die Hinzugabe von E-64 führte im Vergleich zu Stimulation der Zellen ohne E-64 nicht zu einer signifikanten Veränderung der gemessenen Konzentrationen. Jedoch halbierte sich die gemessene Konzentration bei Zugabe hitzeinaktivierter Bakterien

nur, wohingegen die Konzentration von LL-37 bei Zugabe lebender Bakterien deutlich drastischer sank. Dies spricht wiederum für die Annahme, dass die Gingipaine lebender *Porphyromonas gingivalis* LL-37 degradieren. Diese Überlegung steht im Einklang mit der Beobachtung, dass bei Infektion von Epithelzellen mit *Porphyromonas gingivalis*, welche keine Proteasen sezernieren, die Sekretion von LL-37 stärker steigt [Tada *et al.*, 2017]. Da die Studienlage eindeutig belegt, dass an chronischer Parodontitis erkrankte Patienten erhöhte Konzentrationen von LL-37 in ihrer Sulkusflüssigkeit aufweisen, muss LL-37 eine bedeutende Rolle in der Immunreaktion bei parodontaler Entzündung spielen. Außerdem besteht eine Korrelation zwischen der Sondierungstiefe und dem BOP mit der in der Sulkusflüssigkeit gemessenen Konzentration von LL-37 [Türkoğlu *et al.*, 2009, Türkoğlu *et al.*, 2010]. Offensichtlich reicht jedoch die entzündlich erhöhte Konzentration von LL-37 von Patienten mit chronischer Parodontitis beziehungsweise bei Infektion mit parodontalpathogenen Bakterien nicht aus, um der Erkrankung in ausreichendem Maße Einhalt zu gebieten. Dass *Porphyromonas gingivalis* zu einer Verminderung der sezernierten Konzentration von LL-37 führt, spricht für seine immunsuppressive Wirkung. Die bei Parodontitispatienten insgesamt erhöhte Konzentration von LL-37 lässt vermuten, dass andere parodontalpathogene Bakterien oder jedoch die kommensalen oralen Bakterien bei Parodontalerkrankungen zur Steigerung der Konzentration führen, um eine Infektion mit beispielsweise *Porphyromonas gingivalis* zu bekämpfen.

Im Bezug auf die Produktion des AMPs h β D-2 oraler Zellkulturen bei Stimulation mit parodontalpathogenen Bakterien brachten Studien in der Vergangenheit keine einheitlichen Ergebnisse hervor. Unsere Beobachtung, dass die HGF-1 und BHY jeweils nur geringfügig mehr, gleichbleibend oder sogar weniger h β D-2 nach bakterieller Stimulation für 24 h produzierten, steht im Einklang mit den Ergebnissen von Jang und Mitarbeiter und Ji und Mitarbeiter, wobei unsere Ergebnisse nicht signifikant waren. In diesen Studien konnten weniger pathogene Bakterien wie *Fusobacterium nucleatum*, *Leptotrichia wadei* und *Campylobacter gracilis* stärkere Immunreaktionen im Bezug auf die Produktion von antimikrobiellen Peptiden anregen als stark parodontalpathogene Bakterien wie *Porphyromonas gingivalis* [Jang *et al.*, 2017, Ji *et al.*, 2007, Krisanaprakornkit *et al.*, 2000]. Diese Beobachtungen lassen vermuten, dass weniger pathogene Bakterien oder kommensale Bakterien aufgrund ihres Potentials die Produktion von AMPs anzuregen, notwendig sind, um eine stabile Gesundheitssituation in der Mundhöhle

aufrecht zu erhalten. Wenn es zur Besiedlung der Mundhöhle mit stark pathogenen Bakterien kommt, wird die Produktion der für die Immunabwehr bedeutenden AMPs reduziert beziehungsweise aufgrund des Missverhältnisses zwischen kommensalen und pathogenen Bakterien weniger AMPs freigesetzt [Krisanaprakornkit *et al.*, 2000]. Dies unterstützt die Annahme, dass ein dysbiotischer Biofilm zum Entstehen einer Parodontitis führt [Hajishengallis und Lamont, 2012]. Der Vergleich der mRNA-Expression von erkranktem und gesundem Gingivagewebe ergab, dass die mRNA-Expression von h β D-2 von gesundem Gewebe höher war, als die der Parodontitispatienten [Bissell *et al.*, 2004, Liu *et al.*, 2014]. Es wurde vermutet, dass die antimikrobiellen Peptide eine Art Schutzmechanismus gegen den Ausbruch einer Krankheit darstellen [Bissell *et al.*, 2004]. Pereira und Mitarbeiter fanden dagegen in der Sulkusflüssigkeit von Patienten mit chronischer Parodontitis erhöhte Konzentrationen von h β D-2 im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe [Pereira *et al.*, 2012] und konnten ähnliche Ergebnisse bei der Untersuchung des Speichels von Patienten mit chronischer Parodontitis belegen [Pereira *et al.*, 2013]. Andere Studien zeigten, dass die Hälfte der Patienten mit chronischer Parodontitis mehr, die andere Hälfte weniger h β D-2-mRNA exprimiert als die gesunde Kontrollgruppe [Vardar-Sengul *et al.*, 2007]. Damit wird deutlich, dass in der Literatur kein Konsens herrscht, ob h β D-2 bei Parodontitis-Patienten verstärkt exprimiert wird oder inhibiert wird. Unsere Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass *Porphyromonas gingivalis* keinen oder nur einen sehr geringen Effekt auf die Produktion des antimikrobiellen Peptids hat. Eine im erkrankten Gewebe deutlich gesteigerte oder verminderte Expression der mRNA beziehungsweise Sekretion des Peptids muss vorrangig durch andere Pathogene oder Faktoren bedingt sein, da der Effekt des Pathogens insgesamt gering war. Jedoch konnte belegt werden, dass sowohl HGF-1 als auch BHY in der Lage sind h β D-2 zu sezernieren. Beide Zellarten produzierten das antimikrobielle Peptid in ähnlichen Konzentrationen.

Auch die Hinzugabe des Proteaseinhibitors E-64 oder die Hitzeinaktivierung führte zu keiner signifikanten Veränderung der gemessenen Konzentrationen. In der Vergangenheit nahmen Carlisle und Mitarbeiter an, dass Gingipaine AMPs degradieren [Carlisle *et al.*, 2009]. Auf der anderen Seite konnten Studien belegen, dass Gingipaine die Expression von h β D-2-mRNA steigerten [Chung *et al.*, 2004, Dommisch *et al.*, 2007]. Unsere Ergebnisse legen die Annahme nahe, dass Gingipaine keinen Effekt auf die Sekretion von h β D-2 haben und die Gingipaine

auch nicht in der Lage sind das AMP zu degradieren. Jedoch muss auch hier beachtet werden, dass aufgrund der unterschiedlichen Versuchsaufbauten kein direkter Vergleich der Ergebnisse möglich ist.

Die Hypothese, dass orale Zellkulturen bei Infektion mit *Porphyromonas gingivalis* mehr LL-37 produzieren als unstimulierte Zellen muss abgelehnt werden. Die vorliegende Studie belegt eindeutig eine Verringerung der Produktion von LL-37 nach Stimulation mit dem parodontalpathogenen Bakterium. Auch im Bezug auf $h\beta D-2$ muss die aufgestellte Hypothese abgelehnt werden, da mittels der vorliegenden Ergebnisse weder eine Mehrproduktion, noch eine Verringerung der Produktion des antimikrobiellen Peptids eindeutig belegt werden kann.

Die Analyse der Proben erfolgte mithilfe von ELISAs. Hierbei werden die nach extrazellulär sezernierten Proteine analysiert. Dabei ist nicht auszuschließen, dass es im Vorfeld zu einer Degradierung der Proteine kam. Eine andere Möglichkeit für die Analyse wäre die Durchführung einer Polymerase-Kettenreaktion (PCR) gewesen, wobei es hierbei unterschiedliche Methoden gibt. Mit diesem Verfahren kann die mRNA verschiedener Proteine intrazellulär nachgewiesen werden. Die nachzuweisenden Zytokine oder AMPs unterliegen hier also keinen extrazellulären Einflüssen, wie beispielsweise einer möglichen Degradierung durch Gingipaine. Da in dieser Studie jedoch auch der Einfluss der Gingipaine untersucht werden sollte und somit die Konzentration der Zytokine beziehungsweise AMPs nach einer möglichen Degradierung durch die Gingipaine von Interesse war, wurde für die Analysen ELISAs gewählt. Um in Zukunft zu erforschen, ob es durch Degradierung durch Gingipaine oder etwa durch eine Inhibition der Produktion von Zytokinen und AMPs zu verminderten Sekretionen kommt, wäre ergänzend der Nachweis der mRNA der untersuchten Zytokine beziehungsweise AMPs sinnvoll.

Um ergänzend zu den ELISAs, welche eine quantitative Analyse der Proteine ermöglichten, eine qualitative Beurteilung von Entzündungsfaktoren zu erhalten, wurden Western-Blots durchgeführt, bei denen die zytosolischen Proteine analysiert wurden. Da $NF-\kappa B$ in seiner inaktiven Form im Zytosol an $I\kappa B-\alpha$ gebunden ist, ist das Absinken des zytosolischen $I\kappa B-\alpha$ ein indirekter Nachweis für die frühe Aktivierung des Transkriptionsfaktors. Eine weitere Möglichkeit zum Nachweis der Transaktivierung des Transkriptionsfaktors wäre die real-time PCR zum Nachweis von $I\kappa B-\alpha$ -mRNA [Bottero *et al.*, 2003]. Da jedoch der qualitative Nachweis des aktiven Transkriptionsfaktors erfolgen sollte wurden die Proben mittels Western-Blot analysiert. Durch den Nachweis von mRNA könnten nur indirekte Schlüsse auf die

tatsächlich vorhandene Proteinmenge gezogen werden.

Bei der Betrachtung der Western-Blot-Analysen auf I κ B- α fällt auf, dass bei Stimulation der Zellen mit TNF- α keine oder nur geringe Mengen von I κ B- α nachweisbar waren. Im Umkehrschluss bedeutet dies, dass TNF- α zur Aktivierung der NF- κ B-Kaskade führte. Die mit *Porphyromonas gingivalis* stimulierten Proben wiesen in etwa gleich viel oder etwas mehr I κ B- α im Vergleich zu der Negativkontrolle auf. Studien wiesen in der Vergangenheit eindeutig eine Aktivierung der NF- κ B-Kaskade bei Stimulation von Zellen mit *Porphyromonas gingivalis* oder dessen Bestandteilen nach [Brozovic *et al.*, 2006, Diomedea *et al.*, 2017b, Dommisch *et al.*, 2010, Milward *et al.*, 2007]. Dass im Zellkulturüberstand bei Stimulation mittels ELISA eindeutig Zytokine, welche durch den Transkriptionsfaktor verstärkt transkribiert werden, nachgewiesen wurden, weist jedoch darauf hin, dass eine Aktivierung der NF- κ B-Kaskade stattgefunden hat. Ein möglicher Grund, dass trotz Stimulation mit *Porphyromonas gingivalis* relativ große Mengen an I κ B- α vorhanden waren, könnte die lange Inkubationszeit sein. Möglicherweise konnte I κ B- α aufgrund der langen Inkubationszeit inzwischen resynthetisiert werden, was bei der Stimulation mit TNF- α und einer Inkubationszeit von lediglich 1 h nicht der Fall war. Da die Aktivierung der NF- κ B-Kaskade eine frühe Reaktion auf inflammatorische Stimuli darstellt, könnte diese Reaktion aufgrund der langen Inkubationszeit inzwischen beendet sein und lediglich die Endprodukte, die Zytokine, nachzuweisen sein. Auffallend ist, dass bei den hPDLF bei Infektion mit nativen *Porphyromonas gingivalis*, 24-stündiger Inkubation und Hinzugabe von E-64 etwas geringere Mengen von I κ B- α nachweisbar waren, was für eine stärkere Aktivierung der NF- κ B-Kaskade spricht. Dies könnte für eine Hemmung der Aktivierung des Transkriptionsfaktors durch Gingipaine sprechen, was für deren Fähigkeit zur Herabsetzung der Wirtsimmunität sprechen könnte. Die übrigen Western-Blots bestätigen diese Annahme jedoch nicht.

Somit kann die Hypothese, dass die Stimulation mit *Porphyromonas gingivalis* zu einer Aktivierung der NF- κ B-Kaskade führt nicht eindeutig belegt werden.

Auch für den Nachweis von COX-2 wurden die zytosolischen Proteine mittels Western-Blot analysiert. Andere Möglichkeiten hierfür wären auch die real-time PCR und der Nachweis von Prostaglandinen mittels ELISA.

Die Stimulation mit TNF- α führte nur zu geringfügig gesteigerten Mengen von COX-2 im Vergleich zu der Negativkontrolle. Alle vier untersuchten Proben weisen in etwa

gleiche Mengen an COX-2 auf und weist somit eine Aktivierung von COX-2 durch *Porphyromonas gingivalis* nach. Dies ist übereinstimmend mit den Ergebnissen von Kou und Mitarbeitern und Noguchi und Mitarbeitern [Kou *et al.*, 2008, Noguchi *et al.*, 1996]. Diese Ergebnisse stützen die aufgestellte Hypothese der Mehrproduktion von COX-2 von oralen Zellkulturen bei Stimulation mit *Porphyromonas gingivalis*.

Für die Untersuchung der Entzündungsreaktion von Parodontalzellen auf *Porphyromonas gingivalis* scheint es wichtig zu sein, verschiedene Zellarten zu untersuchen, da die Reaktionen sich deutlich voneinander unterscheiden. Durch die Auswahl einer in-vitro-Studie sind die Ergebnisse miteinander vergleichbar, was beispielsweise bei der Entnahme von Gewebe von unterschiedlichen Parodontitis-Patienten nicht der Fall ist, da mögliche lokale Einflüsse oder Grunderkrankungen des Patienten nicht untersucht werden. Für diese Studie wurde das stark parodontalpathogene Bakterium *Porphyromonas gingivalis* ausgewählt, welches eine bedeutende Rolle in der Pathogenese der Parodontitis spielt und in der Vergangenheit eingehend untersucht wurde. Selbstverständlich muss beachtet werden, dass für die Pathogenese der Parodontitis das Zusammenspiel einer Vielzahl an Mikroorganismen verantwortlich ist [Paster *et al.*, 2001]. Deshalb sind diese Ergebnisse nicht als allgemeine Aussage über die Entzündungsreaktion bei Parodontalerkrankungen zu sehen, sondern beziehen sich lediglich auf *Porphyromonas gingivalis*. Der verursachende Biofilm ist jedoch sehr komplex und bis heute bestehen verschiedene Theorien über die genauen Entstehungsmechanismen der Parodontitis. Jedes der in der Mundhöhle vorhandenen Pathogene oder kommensalen Bakterien scheint ein anderes Expressionsmuster von Zytokinen und antimikrobiellen Peptiden hervorzurufen [Ji *et al.*, 2007]. Die genauen Mechanismen sind bis zum heutigen Zeitpunkt nicht vollständig verstanden. Jedoch scheint die Produktion antimikrobieller Peptide bei vorhandener Parodontitis nicht ausreichend zu sein, um die Pathogene zu eliminieren und die Progression der Erkrankung zu stoppen. Aufgrund der mikrobiellen Ätiologie der Erkrankung wird Parodontitis häufig mit Antibiotika therapiert. Aktuelle Studien legen eindrücklich dar, dass das Mikrobiom von Parodontitis-Patienten immer mehr Antibiotika-Resistenzen aufweist [Ardila *et al.*, 2010, Rams *et al.*, 2014]. Deshalb wird immer mehr nach anderen Wirkstoffen gesucht, welche antimikrobiell wirken und keine Resistenzen hervorrufen. Die Verwendung von antimikrobiellen Peptiden stellt dabei einen vielversprechenden Ansatz dar. Zum aktuellen Zeitpunkt gibt es jedoch noch keine Möglichkeit eine

Parodontitis mithilfe von antimikrobiellen Peptiden effektiv zu therapieren. Um das Potential der antimikrobiellen Peptide für die Therapie der Parodontitis ausschöpfen zu können sind weitere Studien notwendig.

6 Zusammenfassung

Die Infektion oraler Zellkulturen mit dem parodontalpathogenen Bakterium *Porphyromonas gingivalis* führt zu einer Modulation der Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine und antimikrobieller Peptide. Ziel der Studie war es, die Modulation der Expression zu quantifizieren und qualifizieren. Das veränderte Expressionsverhalten von Zytokinen und antimikrobiellen Peptiden bei Infektion mit parodontalpathogenen Bakterien ist zusammen mit anderen Mechanismen des Immunsystems ausschlaggebend für die Entstehung der Parodontitis. Die Untersuchung soll ein tiefergehendes Verständnis für die Entstehung der Erkrankung und potentielle antimikrobielle Behandlungsmöglichkeiten vermitteln.

Für die Durchführung der Versuche wurden humane Gingivafibroblasten (HGF-1), humane Fibroblasten des parodontalen Ligaments (hPDLF), Progenitorzellen des parodontalen Ligaments (hPDSC-hTERT) und humane Plattenepithelkarzinomzellen (BHY) verwendet. Die Zellen wurden mit lebenden oder hitzeinaktivierten *Porphyromonas gingivalis* (ATC 33277) für 6 h und 24 h bei 37°C, 5% CO₂ und 100% Luftfeuchtigkeit inkubiert. Die quantitative Analyse der Proben erfolgte mittels Enzyme-linked Immunosorbent Assays (ELISA) auf IL-6, IL-8 und auf die antimikrobiellen Peptide h β D-2 und LL-37. Für die qualitative Analyse von I κ B- α und COX-2 wurden Western Blots durchgeführt.

Die Ergebnisse zeigten bei allen Analysen eine starke zellspezifische Variabilität. Die 24-stündige Inkubation der Proben ergab bei allen Zellarten höhere nachweisbare Mengen an IL-6. Die HGF-1 und den hPDLF produzierten bei Infektion der Zellen mit hitzeinaktivierten Bakterien höhere Mengen IL-6 als bei Infektion mit lebenden Bakterien. Diese Beobachtung wurde auch bei der Analyse der Proben der hPDLF und HGF-1 auf IL-8 gemacht. Die Produktion von LL-37 der HGF-1 und hPDLF sank bei 24-stündiger Inkubation im Vergleich zur Negativkontrolle, wobei die Produktion des antimikrobiellen Peptids bei Infektion mit hitzeinaktivierten *Porphyromonas gingivalis* höher war. Die HGF-1 und BHY produzierten weder signifikant mehr, noch weniger h β D-2 bei Infektion der Zellen mit *Porphyromonas gingivalis* im Vergleich zur Negativkontrolle. Hier konnten auch keine Unterschiede zwischen der Infektion mit lebenden oder hitzeinaktivierten Bakterien festgestellt werden. Die Western Blot-Analysen der hPDLF und BHY ergaben in etwa gleiche Mengen an I κ B- α im Vergleich zu der Negativkontrolle, unabhängig von der Inkubationszeit. Der Western-Blot der BHY auf COX-2 zeigte

in allen stimulierten Proben etwa gleich viel COX-2, jedoch etwas mehr als in der Negativkontrolle.

Die große Variabilität der Ergebnisse der verschiedenen Zellarten legen nahe, dass in zukünftigen Studien jeweils eine Auswahl an Zellen verwendet werden sollte um eine Repräsentativität der Ergebnisse zu erreichen. *Porphyromonas gingivalis* induzierte in allen getesteten Zellarten eine Steigerung der Produktion von IL-6 und IL-8, jedoch in Abhängigkeit von der Inkubationszeit und je nachdem, ob lebende oder hitzeinaktivierte Zellen verwendet wurden. Die Ergebnisse bezüglich der Produktion von LL-37 deuten auf eine Unterdrückung der Produktion des antimikrobiellen Peptids hin, wohingegen sich die Produktion von h β D-2 kaum veränderte. Da bezüglich der Modulation der antimikrobiellen Peptide bisher kein Konsens herrscht, sollte diese Fragestellung in zukünftigen Studien näher beleuchtet werden, um die Mechanismen der Produktion der antimikrobiellen Peptide und deren Rolle in der Entstehung und in der Bekämpfung der Erkrankung zu verstehen.

7 Literaturverzeichnis

1. Abiko Y, Mitamura J, Nishimura M, Muramatsu T, Inoue T, Shimono M, Kaku T. Pattern of expression of beta-defensins in oral squamous cell carcinoma (1999). *Cancer Lett* **143**: 37-43
2. Albandar JM, Streckfus CF, Adesanya MR, Winn DM. Cigar, Pipe, and Cigarette Smoking as Risk Factors for Periodontal Disease and Tooth Loss (2000). *J Periodontol* **71**: 1874-1881
3. Albandar JM, Susin C, Hughes FJ. Manifestations of systemic diseases and conditions that affect the periodontal attachment apparatus: Case definitions and diagnostic considerations (2018). *J Clin Periodontol* **45**: S171-S189
4. Allaker RP, Kapas S. Adrenomedullin and mucosal defence: interaction between host and microorganism (2003). *Regul Pept* **112**: 147-152
5. Ardila CM, Granada MI, Guzmán IC. Antibiotic resistance of subgingival species in chronic periodontitis patients (2010). *J Periodontol Res* **45**: 557-563
6. Armitage GC. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions (1999). *Ann Periodontol* **4**: 1-6
7. Baggolini M, Walz A, Kunkel S, Joci. Neutrophil-activating peptide-1/interleukin 8, a novel cytokine that activates neutrophils (1989). **84**: 1045-1049
8. Bals R, Weiner DJ, Moscioni AD, Meegalla RL, Wilson JM. Augmentation of Innate Host Defense by Expression of a Cathelicidin Antimicrobial Peptide (1999). *Infect Immun* **67**: 6084
9. Bechinger B. The structure, dynamics and orientation of antimicrobial peptides in membranes by multidimensional solid-state NMR spectroscopy (1999). *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1462**: 157-183
10. Behrends J, Bischofberger J, Deutzmann R, Ehmke H, Frings M, Grissmer S, Hoth M, Kurtz A, Leipziger j, Müller F, Pedain C, Rettig I, Wagner C, Wischmeyer E in Bob A, Bob K. Duale Reihe Physiologie. Georg Thieme Verlag. Stuttgart. 2. 2012
11. Bergström J, Eliasson S, Dock J. Exposure to tobacco smoking and periodontal health (2000). *J Clin Periodontol* **27**: 61-68
12. Berman HM, Westbrook J, Feng Z, Gilliland G, Bhat TN, Weissig H, Shindyalov IN, Bourne PE (2000). RCSB Protein Data Bank. [online] <https://www.rcsb.org/> [20.11.2018].
13. Bissell J, Joly S, Johnson GK, Organ CC, Dawson D, B. McCray Jr P, Guthmiller JM. Expression of β -defensins in gingival health and in periodontal disease (2004). *J Oral Pathol Med* **33**: 278-285
14. Bostanci N, İlgenli T, Emingil G, Afacan B, Han B, Töz H, Atilla G, Hughes FJ, Belibasakis GN. Gingival crevicular fluid levels of RANKL and OPG in periodontal diseases: implications of their relative ratio (2007). *J Clin Periodontol* **34**: 370-376

15. Bottero V, Imbert V, Frelin C, Formento JL, Peyron JF. Monitoring NF-kappa B transactivation potential via real-time PCR quantification of I kappa B-alpha gene expression (2003). *Mol Diagn* **7**: 187-194
16. Boyce BF, Xiu Y, Li J, Xing L, Yao Z. NF-kB-Mediated Regulation of Osteoclastogenesis (2015). *Endocrinology and Metabolism* **30**: 35-44
17. Bradshaw DJ, Marsh PD, Watson GK, Allison C. Role of *Fusobacterium nucleatum* and coaggregation in anaerobe survival in planktonic and biofilm oral microbial communities during aeration (1998). *Infect Immun* **66**: 4729-4732
18. Brissette CA, Lukehart SA. *Treponema denticola* is resistant to human β -defensins (2002). *Infect Immun* **70**: 3982-3984
19. Brogden KA. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? (2005). *Nature Reviews: Microbiology* **3**: 238
20. Brozovic S, Sahoo R, Barve S, Shiba H, Uriarte S, Blumberg RS, Kinane DF. *Porphyromonas gingivalis* enhances FasL expression via up-regulation of NFkB-mediated gene transcription and induces apoptotic cell death in human gingival epithelial cells (2006). *Microbiology* **152**: 797-806
21. Bueno LC, Mayer MPA, DiRienzo JM. Relationship Between Conversion of Localized Juvenile Periodontitis-Susceptible Children From Health to Disease and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* Leukotoxin Promoter Structure (1998). *J Periodontol* **69**: 998-1007
22. Camelo-Castillo AJ, Mira A, Pico A, Nibali L, Henderson B, Donos N, Tomás I. Subgingival microbiota in health compared to periodontitis and the influence of smoking (2015). *Frontiers in Microbiology* **6**
23. Campus G, Salem A, Uzzau S, Baldoni E, Tonolo G. Diabetes and Periodontal Disease: A Case-Control Study (2005). *J Periodontol* **76**: 418-425
24. Carlisle MD, Srikantha R, Brogden K. Degradation of human α -and β -defensins by culture supernatants of *Porphyromonas gingivalis* strain 381 (2009). *Journal of Innate Immunity* **1**: 118-122
25. Carlsson G, Wahlin Y-B, Johansson A, Olsson A, Eriksson T, Claesson R, Hänström L, Henter J-I. Periodontal Disease in Patients From the Original Kostmann Family With Severe Congenital Neutropenia (2006). *J Periodontol* **77**: 744-751
26. Chapple ILC, Mealey BL, Dyke TE, Bartold PM, Dommisch H, Eickholz P, Geisinger ML, Genco RJ, Glogauer M, Goldstein M, Griffin TJ, Holmstrup P, Johnson GK, Kapila Y, Lang NP, Meyle J, Murakami S, Plemons J, Romito GA, Shapira L, Tatakis DN, Teughels W, Trombelli L, Walter C, Wimmer G, Xenoudi P, Yoshie H. Periodontal health and gingival diseases and conditions on an intact and a reduced periodontium: Consensus report of workgroup 1 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions (2018). *J Clin Periodontol* **45**: S68-S77
27. Cholmakow-Bodechtel C, Füßl-Grünig E, Geyer S, Hertrampf K, Hoffmann TH, Birte, Jordan AR, Kocher TM, Wolfgang, Nitschke I, Noffz S, Scharf LS, Ulrich, Schützhold S, Stark H, Zimmer S (2016). Fünfte Deutsche

Mundgesundheitsstudie. [online]

https://www.bzaek.de/fileadmin/PDFs/dms/Zusammenfassung_DMS_V.pdf

[28.10.2018].

28. Chung WO, Hansen SR, Rao D, Dale BA. Protease-activated receptor signaling increases epithelial antimicrobial peptide expression (2004). *The Journal of Immunology* **173**: 5165-5170
29. Cochran DL. Inflammation and Bone Loss in Periodontal Disease (2008). *J Periodontol* **79**: 1569-1576
30. Curtis MA, Aduse-Opoku J, Rangarajan M. Cysteine Proteases of Porphyromonas Gingivalis (2001). *Crit Rev Oral Biol Med* **12**: 192-216
31. Curtis MA, Zenobia C, Darveau RP. The relationship of the oral microbiota to periodontal health and disease (2011). *Cell Host & Microbe* **10**: 302-306
32. Cutler CW, Kalmar JR, Genco CA. Pathogenic strategies of the oral anaerobe, Porphyromonas gingivalis (1995). *Trends Microbiol* **3**: 45-51
33. Dale BA, Fredericks LP. Antimicrobial peptides in the oral environment: expression and function in health and disease (2005). *Curr Issues Mol Biol* **7**: 119-133
34. Dale BA, Kimball JR, Krisanaprakornkit S, Roberts F, Robinovitch M, O'Neal R, Valore EV, Ganz T, Anderson GM, Weinberg A. Localized antimicrobial peptide expression in human gingiva (2001). *J Periodontal Res* **36**: 285-294
35. Darveau RP. Periodontitis: a polymicrobial disruption of host homeostasis (2010). *Nature Reviews: Microbiology* **8**: 481
36. Darveau RP, Belton CM, Reife RA, Lamont RJ. Local chemokine paralysis, a novel pathogenic mechanism for Porphyromonas gingivalis (1998). *Infect Immun* **66**: 1660-1665
37. De Smet K, Contreras R. Human Antimicrobial Peptides: Defensins, Cathelicidins and Histatins (2005). *Biotechnol Lett* **27**: 1337-1347
38. De Y, Chen Q, Schmidt AP, Anderson GM, Wang JM, Wooters J, Oppenheim JJ, Chertov O. LI-37, the Neutrophil Granule-Derived Cathelicidin, Utilizes Formyl Peptide Receptor-Like 1 (Fpr1) as a Receptor to Chemoattract Human Peripheral Blood Neutrophils, Monocytes, and T Cells (2000). *The Journal of Experimental Medicine* **192**: 1069
39. Dewhirst FE, Chen T, Izard J, Paster BJ, Tanner AC, Yu W-H, Lakshmanan A, Wade WG. The human oral microbiome (2010). *J Bacteriol* **192**: 5002-5017
40. Diamond DL, Kimball JR, Krisanaprakornkit S, Ganz T, Dale BA. Detection of β -defensins secreted by human oral epithelial cells (2001). *J Immunol Methods* **256**: 65-76
41. Diomedede F, Thangavelu SR, Merciaro I, D'Orazio M, Bramanti P, Mazzon E, Trubiani O. Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide stimulation in human periodontal ligament stem cells: role of epigenetic modifications to the inflammation (2017a). *European journal of histochemistry : EJH* **61**: 2826-2826

42. Diomede F, Zingariello M, Cavalcanti MF, Merciaro I, Pizzicannella J, De Isla N, Caputi S, Ballerini P, Trubiani O. MyD88/ERK/NFκB pathways and pro-inflammatory cytokines release in periodontal ligament stem cells stimulated by *Porphyromonas gingivalis* (2017b). *European journal of histochemistry: EJH* **61**
43. Docheva D, Padula D, Popov C, Weishaupt P, Pragert M, Miosge N, Hickel R, Bocker W, Clausen-Schaumann H, Schieker M. Establishment of immortalized periodontal ligament progenitor cell line and its behavioural analysis on smooth and rough titanium surface (2010). *Eur Cell Mater* **19**: 228-241
44. Dommisch H, Chung WO, Jepsen S, Hacker BM, Dale BA. Phospholipase C, p38/MAPK, and NF-κB mediated induction of MIP-3α/CCL20 by *Porphyromonas gingivalis* (2010). *Innate immunity* **16**: 226-234
45. Dommisch H, Chung WO, Rohani MG, Williams D, Rangarajan M, Curtis MA, Dale BA. Protease-activated receptor 2 mediates human beta-defensin 2 and CC chemokine ligand 20 mRNA expression in response to proteases secreted by *Porphyromonas gingivalis* (2007). *Infect Immun* **75**: 4326-4333
46. Dommisch H, Reinartz M, Backhaus T, Deschner J, Chung W, Jepsen S. Antimicrobial responses of primary gingival cells to *Porphyromonas gingivalis* (2012). *J Clin Periodontol* **39**: 913-922
47. Eke PI, Dye BA, Wei L, Slade GD, Thornton-Evans GO, Borgnakke WS, Taylor GW, Page RC, Beck JD, Genco RJ. Update on Prevalence of Periodontitis in Adults in the United States: NHANES 2009 to 2012 (2015). *J Periodontol* **86**: 611-622
48. Eke PI, Dye BA, Wei L, Thornton-Evans GO, Genco RJ. Prevalence of Periodontitis in Adults in the United States: 2009 and 2010 (2012). *J Dent Res* **91**: 914-920
49. Feucht E, DeSanti C, Weinberg A. Selective induction of human beta-defensin mRNAs by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in primary and immortalized oral epithelial cells (2003). *Oral Microbiol Immunol* **18**: 359-363
50. Frencken JE, Sharma P, Stenhouse L, Green D, Lavery D, Dietrich T. Global epidemiology of dental caries and severe periodontitis – a comprehensive review (2017). *J Clin Periodontol* **44**: S94-S105
51. Fujihashi K, Beagley KW, Kono Y, Aicher WK, Yamamoto M, DiFabio S, Xu-Amano J, McGhee JR, Kiyono H. Gingival mononuclear cells from chronic inflammatory periodontal tissues produce interleukin (IL)-5 and IL-6 but not IL-2 and IL-4 (1993). *The American journal of pathology* **142**: 1239-1250
52. Ganz T. Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity (2003). *Nature Reviews: Immunology* **3**: 710
53. Garlet GP, Cardoso CR, Silva TA, Ferreira BR, Ávila-Campos MJ, Cunha FQ, Silva JS. Cytokine pattern determines the progression of experimental periodontal disease induced by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* through the modulation of MMPs, RANKL, and their physiological inhibitors (2006). *Oral Microbiol Immunol* **21**: 12-20

54. Genco RJ, Ho AW, Grossi SG, Dunford RG, Tedesco LA. Relationship of Stress, Distress, and Inadequate Coping Behaviors to Periodontal Disease (1999). *J Periodontol* **70**: 711-723
55. Ghosh S, May MJ, Kopp EB. NF- κ B AND REL PROTEINS: Evolutionarily Conserved Mediators of Immune Responses (1998). *Annu Rev Immunol* **16**: 225-260
56. Gordon YJ, Romanowski EG, McDermott AMJ Cer. A review of antimicrobial peptides and their therapeutic potential as anti-infective drugs (2005). *Curr Eye Res* **30**: 505-515
57. Gorr S-U. Antimicrobial peptides of the oral cavity (2009). *Periodontol 2000* **51**: 152-180
58. Gorr SU, Abdolhosseini M. Antimicrobial peptides and periodontal disease (2011). *J Clin Periodontol* **38**: 126-141
59. Graves D. Cytokines That Promote Periodontal Tissue Destruction (2008). *J Periodontol* **79**: 1585-1591
60. Graves DT, Oates T, Garlet GP. Review of osteoimmunology and the host response in endodontic and periodontal lesions (2011). *J Oral Microbiol* **3**: 5304
61. Gudmundsson GH, Agerberth B, Odeberg J, Bergman T, Olsson B, Salcedo R. The Human Gene FALL39 and Processing of the Cathelin Precursor to the Antibacterial Peptide LL-37 in Granulocytes (1996). *Eur J Biochem* **238**: 325-332
62. Guo L, Ye C, Hao X, Zheng R, Ju R, Wu D, Luo L, Wang C, Li J, Yu XJ JoP, Therapeutics E. Carboxyamidotriazole ameliorates experimental colitis by inhibition of cytokine production, nuclear factor- κ B activation, and colonic fibrosis (2012). **342**: 356-365
63. Gutner M, Chaushu S, Balter D, Bachrach G. Saliva enables the antimicrobial activity of LL-37 in the presence of proteases of *Porphyromonas gingivalis* (2009). *Infect Immun* **77**: 5558-5563
64. Hajishengallis G. Immunomicrobial pathogenesis of periodontitis: keystones, pathobionts, and host response (2014a). *Trends Immunol* **35**: 3-11
65. Hajishengallis G. Periodontitis: from microbial immune subversion to systemic inflammation (2014b). *Nat Rev Immunol* **15**: 30
66. Hajishengallis G, Lamont RJ. Beyond the red complex and into more complexity: the polymicrobial synergy and dysbiosis (PSD) model of periodontal disease etiology (2012). *Molecular Oral Microbiology* **27**: 409-419
67. Hancock RE. Peptide antibiotics (1997). *The Lancet* **349**: 418-422
68. Hancock RE, Lehrer R. Cationic peptides: a new source of antibiotics (1998). *Trends Biotechnol* **16**: 82-88
69. Heinrich PC, Behrmann I, Haan S, Hermanns HM, MÜLLer-Newen G, Schaper F. Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its

regulation (2003). *Biochem J* **374**: 1

70. Heinrich PC, Castell JV, Andus T. Interleukin-6 and the acute phase response (1990). *The Biochemical journal* **265**: 621-636

71. Herath TD, Wang Y, Seneviratne CJ, Lu Q, Darveau RP, Wang CY, Jin L. Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide lipid A heterogeneity differentially modulates the expression of IL-6 and IL-8 in human gingival fibroblasts (2011). *J Clin Periodontol* **38**: 694-701

72. Herbert BA, Novince CM, Kirkwood KL. Aggregatibacter actinomycetemcomitans, a potent immunoregulator of the periodontal host defense system and alveolar bone homeostasis (2016). *Molecular Oral Microbiology* **31**: 207-227

73. Herrera D, Retamal-Valdes B, Alonso B, Feres M. Acute periodontal lesions (periodontal abscesses and necrotizing periodontal diseases) and endo-periodontal lesions (2018). *J Clin Periodontol* **45**: S78-S94

74. Hojo K, Nagaoka S, Ohshima T, Maeda N. Bacterial interactions in dental biofilm development (2009). *J Dent Res* **88**: 982-990

75. Holt SC, Ebersole JL. Porphyromonas gingivalis, Treponema denticola, and Tannerella forsythia: the 'red complex', a prototype polybacterial pathogenic consortium in periodontitis (2005). *Periodontol 2000* **38**: 72-122

76. Holt SC, Kesavalu L, Walker S, Genco CA. Virulence factors of Porphyromonas gingivalis (1999). *Periodontol 2000* **20**: 168-238

77. Huang R, Li M, Gregory RL. Bacterial interactions in dental biofilm (2011). *Virulence* **2**: 435-444

78. Ishihara K. Virulence factors of Treponema denticola (2010). *Periodontol 2000* **54**: 117-135

79. Ishikura H, Arakawa S, Nakajima T, Tsuchida N, Ishikawa I. Cloning of the Tannerella forsythensis (Bacteroides forsythus) siaHI gene and purification of the sialidase enzyme (2003). *J Med Microbiol* **52**: 1101-1107

80. Jang JY, Song IS, Baek KJ, Choi Y, Ji S. Immunologic characteristics of human gingival fibroblasts in response to oral bacteria (2017). *J Periodontal Res* **52**: 447-457

81. Jepsen S, Caton JG, Albandar JM, Bissada NF, Bouchard P, Cortellini P, Demirel K, Sanctis M, Ercoli C, Fan J, Geurs NC, Hughes FJ, Jin L, Kantarci A, Lalla E, Madianos PN, Matthews D, McGuire MK, Mills MP, Preshaw PM, Reynolds MA, Sculean A, Susin C, West NX, Yamazaki K. Periodontal manifestations of systemic diseases and developmental and acquired conditions: Consensus report of workgroup 3 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions (2018). *J Clin Periodontol* **45**: S219-S229

82. Ji S, Kim Y, Min BM, Han S, Choi Y. Innate immune responses of gingival epithelial cells to nonperiodontopathic and periodontopathic bacteria (2007). *J Periodontal Res* **42**: 503-510

83. Johannsen A, Rylander G, Söder B, Marie Å. Dental Plaque, Gingival Inflammation, and Elevated Levels of Interleukin-6 and Cortisol in Gingival Crevicular Fluid From Women With Stress-Related Depression and Exhaustion (2006). *J Periodontol* **77**: 1403-1409
84. Kapas S, Bansal A, Bhargava V, Maher R, Malli D, Hagi-Pavli E, Allaker RP. Adrenomedullin expression in pathogen-challenged oral epithelial cells (2001). *Peptides* **22**: 1485-1489
85. Karim AY, Kulczycka M, Kantyka T, Dubin G, Jabaiah A, Daugherty PS, Thogersen IB, Enghild JJ, Nguyen K-A, Potempa J. A novel matrix metalloprotease-like enzyme (karilysin) of the periodontal pathogen *Tannerella forsythia* ATCC 43037 (2010). *Biol Chem* **391**: 105-117
86. Karin M, Greten FR. NF- κ B: linking inflammation and immunity to cancer development and progression (2005). *Nature Reviews: Immunology* **5**: 749
87. Kassebaum NJ, Bernabé E, Dahiya M, Bhandari B, Murray CJL, Marcenes W. Global Burden of Severe Periodontitis in 1990-2010: A Systematic Review and Meta-regression (2014). *J Dent Res* **93**: 1045-1053
88. Keestra JAJ, Grosjean I, Coucke W, Quirynen M, Teughels W. Non-surgical periodontal therapy with systemic antibiotics in patients with untreated chronic periodontitis: a systematic review and meta-analysis (2015). *J Periodontal Res* **50**: 294-314
89. Khurshid Z, Naseem M, Sheikh Z, Najeeb S, Shahab S, Zafar MS. Oral antimicrobial peptides: Types and role in the oral cavity (2016). *Saudi Pharmaceutical Journal* **24**: 515-524
90. Kishimoto T, Akira S, Narazaki M, Taga TJB. Interleukin-6 family of cytokines and gp130 (1995). **86**: 1243-1254
91. Kittichotirat W, Bumgarner RE, Asikainen S, Chen C. Identification of the pangenome and its components in 14 distinct *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* strains by comparative genomic analysis (2011). *PLoS ONE* **6**: e22420
92. Kolenbrander P, Andersen R, Moore L. Coaggregation of *Fusobacterium nucleatum*, *Selenomonas flueggei*, *Selenomonas infelix*, *Selenomonas noxia*, and *Selenomonas sputigena* with strains from 11 genera of oral bacteria (1989). *Infection Immunity* **57**: 3194-3203
93. Kolenbrander PE, Andersen RN, Blehert DS, Eglund PG, Foster JS, Palmer RJ. Communication among oral bacteria (2002). *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **66**: 486-505
94. Kolenbrander PE, London J. Adhere today, here tomorrow: oral bacterial adherence (1993). *J Bacteriol* **175**: 3247
95. Kou Y, Inaba H, Kato T, Tagashira M, Honma D, Kanda T, Ohtake Y, Amano A. Inflammatory responses of gingival epithelial cells stimulated with *Porphyromonas gingivalis* vesicles are inhibited by hop-associated polyphenols (2008). *J Periodontol* **79**: 174-180

96. Koziel J, Karim AY, Przybyszewska K, Ksiazek M, Rapala-Kozik M, Nguyen KA, Potempa J. Proteolytic Inactivation of LL-37 by Karilysin, a Novel Virulence Mechanism of *Tannerella forsythia* (2010). *Journal of Innate Immunity* **2**: 288-293
97. Krisanaprakornkit S, Kimball JR, Weinberg A, Darveau RP, Bainbridge BW, Dale BA. Inducible expression of human β -defensin 2 by *Fusobacterium nucleatum* in oral epithelial cells: multiple signaling pathways and role of commensal bacteria in innate immunity and the epithelial barrier (2000). *Infect Immun* **68**: 2907-2915
98. Li X, Duan D, Yang J, Wang P, Han B, Zhao L, Jepsen S, Dommisch H, Winter J, Xu Y. The expression of human β -defensins (hBD-1, hBD-2, hBD-3, hBD-4) in gingival epithelia (2016). *Arch Oral Biol* **66**: 15-21
99. Lin S-J, Chen Y-L, Kuo MY-B, Li C-L, Lu H-K. Measurement of gp130 cytokines – Oncostatin M and IL-6 in gingival crevicular fluid of patients with chronic periodontitis (2005). *Cytokine* **30**: 160-167
100. Liu J, Chen J, Du X, Hu L, Chen L. The expression of hBDs in the gingival tissue and keratinocytes from healthy subjects and periodontitis patients (2014). *Arch Oral Biol* **59**: 193-198
101. Lourbakos A, Potempa J, Travis J, Andrea MR, Andrade-Gordon P, Santulli R, Mackie EJ, Pike RN. Arginine-Specific Protease from *Porphyromonas gingivalis* Activates Protease-Activated Receptors on Human Oral Epithelial Cells and Induces Interleukin-6 Secretion (2001). *Infect Immun* **69**: 5121
102. Madianos PN, Papapanou PN, Sandros J. *Porphyromonas gingivalis* infection of oral epithelium inhibits neutrophil transepithelial migration (1997). *Infection Immunity* **65**: 3983-3990
103. Marsh P, Martin MV in Marsh P, Martin MV. *Orale Mikrobiologie*. Georg Thieme Verlag. Stuttgart. 4. 2003
104. Marsh PD, Bradshaw DJ. Dental plaque as a biofilm (1995). *J Ind Microbiol* **15**: 169-175
105. Matsuki Y, Yamamoto T, Hara K. Detection of inflammatory cytokine messenger RNA (mRNA)-expressing cells in human inflamed gingiva by combined in situ hybridization and immunohistochemistry (1992). *Immunology* **76**: 42-47
106. Matsusaka T, Fujikawa K, Nishio Y, Mukaida N, Matsushima K, Kishimoto T, Akira S. Transcription factors NF-IL6 and NF- κ B synergistically activate transcription of the inflammatory cytokines, interleukin 6 and interleukin 8 (1993). *Proceedings of the National Academy of Sciences* **90**: 10193-10197
107. Medzhitov R. Origin and physiological roles of inflammation (2008). *Nature* **454**: 428
108. Milward MR, Chapple ILC, Wright HJ, Millard JL, Matthews JB, Cooper PR. Differential activation of NF- κ B and gene expression in oral epithelial cells by periodontal pathogens (2007). *Clin Exp Immunol* **148**: 307-324
109. Moore WEC, Moore LVH. The bacteria of periodontal diseases (1994).

110. Moynagh PN. The NF- κ B pathway (2005). *J Cell Sci* **118**: 4589
111. Murakami M, Ohtake T, Dorschner RA, Gallo RL. Cathelicidin Antimicrobial Peptides are Expressed in Salivary Glands and Saliva (2002). *J Dent Res* **81**: 845-850
112. Nagasawa T, Kiji M, Yashiro R, Hormdee D, Lu H, Kunze M, Suda T, Koshy G, Kobayashi H, Oda S, Nitta H, Ishikawa I. Roles of receptor activator of nuclear factor- κ B ligand (RANKL) and osteoprotegerin in periodontal health and disease (2007). *Periodontol 2000* **43**: 65-84
113. Nakashima T, Kobayashi Y, Yamasaki S, Kawakami A, Eguchi K, Sasaki H, Sakai H. Protein Expression and Functional Difference of Membrane-Bound and Soluble Receptor Activator of NF- κ B Ligand: Modulation of the Expression by Osteotropic Factors and Cytokines (2000). *Biochem Biophys Res Commun* **275**: 768-775
114. Nassar H, Chou H-H, Khlgatian M, Gibson FC, Van Dyke T, Genco CA. Role for fimbriae and lysine-specific cysteine proteinase gingipain K in expression of interleukin-8 and monocyte chemoattractant protein in Porphyromonas gingivalis-infected endothelial cells (2002). *Infect Immun* **70**: 268-276
115. Noguchi K, Shitashige M, Yanai M, Morita I, Nishihara T, Murota S, Ishikawa I. Prostaglandin production via induction of cyclooxygenase-2 by human gingival fibroblasts stimulated with lipopolysaccharides (1996). *Inflammation* **20**: 555-568
116. Nussbaum G, Shapira L. How has neutrophil research improved our understanding of periodontal pathogenesis? (2011). *J Clin Periodontol* **38**: 49-59
117. Ohta K, Makinen K, Loesche WJ. Purification and characterization of an enzyme produced by Treponema denticola capable of hydrolyzing synthetic trypsin substrates (1986). *Infection Immunity* **53**: 213-220
118. Oren Z, Shai Y. Mode of action of linear amphipathic α -helical antimicrobial peptides (1998). *Peptide Science* **47**: 451-463
119. Page RC, Kornman KS. The pathogenesis of human periodontitis: an introduction (1997). *Periodontol 2000* **14**: 9-11
120. Page RC, Schroeder HE. Pathogenesis of inflammatory periodontal disease. A summary of current work (1976). *Lab Invest* **34**: 235-249
121. Page RC, Schroeder HE in Periodontitis in man and other animals. A comparative review. S. karger. 1982
122. Papapanou PN, Sanz M, Buduneli N, Dietrich T, Feres M, Fine DH, Flemmig TF, Garcia R, Giannobile WV, Graziani F. Periodontitis: Consensus report of workgroup 2 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions (2018). *J Periodontol* **89**: S173-S182
123. Park CB, Yi K-S, Matsuzaki K, Kim MS, Kim SC. Structure–activity analysis

of buforin II, a histone H2A-derived antimicrobial peptide: the proline hinge is responsible for the cell-penetrating ability of buforin II (2000). *Proceedings of the National Academy of Sciences* **97**: 8245-8250

124. Paster BJ, Boches SK, Galvin JL, Ericson RE, Lau CN, Levanos VA, Sahasrabudhe A, Dewhirst FE. Bacterial diversity in human subgingival plaque (2001). *J Bacteriol* **183**: 3770-3783

125. Pereira AL, Franco GC, Cortelli SC, Aquino DR, Costa FO, Raslan SA, Cortelli JR. Influence of Periodontal Status and Periodontopathogens on Levels of Oral Human β -Defensin-2 in Saliva (2013). *J Periodontol* **84**: 1445-1453

126. Pereira AL, Holzhausen M, Franco GCN, Cortelli SC, Cortelli JR. Human β -defensin 2 and protease activated receptor-2 expression in patients with chronic periodontitis (2012). *Arch Oral Biol* **57**: 1609-1614

127. Piers KL, Brown MH, Hancock R. Improvement of outer membrane-permeabilizing and lipopolysaccharide-binding activities of an antimicrobial cationic peptide by C-terminal modification (1994). *Antimicrob Agents Chemother* **38**: 2311-2316

128. Piers KL, Hancock RE. The interaction of a recombinant cecropin/melittin hybrid peptide with the outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa* (1994). *Mol Microbiol* **12**: 951-958

129. Potempa M, Potempa J, Kantyka T, Nguyen K-A, Wawrzonek K, Manandhar SP, Popadiak K, Riesbeck K, Eick S, Blom AM. Interpain A, a cysteine proteinase from *Prevotella intermedia*, inhibits complement by degrading complement factor C3 (2009). *PLoS Pathog* **5**: e1000316

130. Pucher J, Stewart J. Periodontal disease and diabetes mellitus (2004). *Curr Diab Rep* **4**: 46-50

131. Puklo M, Guentsch A, Hiemstra PS, Eick S, Potempa J. Analysis of neutrophil-derived antimicrobial peptides in gingival crevicular fluid suggests importance of cathelicidin LL-37 in the innate immune response against periodontogenic bacteria (2008). *Oral Microbiol Immunol* **23**: 328-335

132. Pütsep K, Carlsson G, Boman HG, Andersson M. Deficiency of antibacterial peptides in patients with morbus Kostmann: an observation study (2002). *The Lancet* **360**: 1144-1149

133. Raj PA, Marcus E, Sukumaran DK. Structure of human salivary histatin 5 in aqueous and nonaqueous solutions (1998). *Biopolymers* **45**: 51-67

134. Rams TE, Degener JE, van Winkelhoff AJ. Antibiotic Resistance in Human Chronic Periodontitis Microbiota (2014). *J Periodontol* **85**: 160-169

135. Rasso J, Hauser K, Netzker R, Deutzmann R in Rasso JH, Karin; Netzker, Roland; Deutzmann, Rainer. *Duale Reihe Biochemie*. Georg Thieme Verlag. Stuttgart. 4. 2016

136. Ritz H. Microbial population shifts in developing human dental plaque (1967). *Arch Oral Biol* **12**: 1561-1568

137. Rizzo A, Paolillo R, Buommino E, Lanza AG, Guida L, Annunziata M, Carratelli CR. Modulation of cytokine and β -defensin 2 expressions in human gingival fibroblasts infected with *Chlamydia pneumoniae* (2008). *Int Immunopharmacol* **8**: 1239-1247
138. Roberts FA, Darveau RP. Beneficial bacteria of the periodontium (2002). *Periodontol 2000* **30**: 40-50
139. Sahasrabudhe KS, Kimball JR, Morton TH, Weinberg A, Dale BA. Expression of the Antimicrobial Peptide, Human β -defensin 1, in Duct Cells of Minor Salivary Glands and Detection in Saliva (2000). *J Dent Res* **79**: 1669-1674
140. Saito T, Ishihara K, Kato T, Okuda K. Cloning, expression, and sequencing of a protease gene from *Bacteroides forsythus* ATCC 43037 in *Escherichia coli* (1997). *Infection Immunity* **65**: 4888-4891
141. Sakamoto M, Suzuki M, Umeda M, Ishikawa I, Benno Y. Reclassification of *Bacteroides forsythus* (Tanner et al. 1986) as *Tannerella forsythensis* corrig., gen. nov., comb. nov (2002). *International journal of systematic evolutionary microbiology* **52**: 841-849
142. Sandros J, Karlsson C, Lappin D, Madianos P, Kinane D, Papapanou P. Cytokine responses of oral epithelial cells to *Porphyromonas gingivalis* infection (2000). *J Dent Res* **79**: 1808-1814
143. Sanz M, Beighton D, Curtis MA, Cury JA, Dige I, Dommisch H, Ellwood R, Giacaman RA, Herrera D, Herzberg MC, Könönen E, Marsh PD, Meyle J, Mira A, Molina A, Mombelli A, Quirynen M, Reynolds EC, Shapira L, Zaura E. Role of microbial biofilms in the maintenance of oral health and in the development of dental caries and periodontal diseases. Consensus report of group 1 of the Joint EFP/ORCA workshop on the boundaries between caries and periodontal disease (2017). *J Clin Periodontol* **44**: S5-S11
144. Schreiner H, Li Y, Cline J, Tsiagbe VK, Fine DH. A Comparison of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa) Virulence Traits in a Rat Model for Periodontal Disease (2013). *PLoS ONE* **8**: e69382
145. Schünke M, Schulte E, Schumacher U, Voll M, Wesker K in Schünke M, Schulte E, Schumacher U, Voll M, Wesker K. Prometheus Lernatlas der Anatomie - Kopf, Hals und Neuroanatomie. Georg Thieme Verlag. Stuttgart. 3. 2012
146. Serasanambati M, Chilakapati SR. Function of nuclear factor kappa B (NF- κ B) in human diseases-a review (2016). *South Indian Journal of Biological Sciences* **2**: 368-387
147. Seshadri R, Myers GS, Tettelin H, Eisen JA, Heidelberg JF, Dodson RJ, Davidsen TM, DeBoy RT, Fouts DE, Haft DH. Comparison of the genome of the oral pathogen *Treponema denticola* with other spirochete genomes (2004). *Proceedings of the National Academy of Sciences* **101**: 5646-5651
148. Shai Y. Mechanism of the binding, insertion and destabilization of phospholipid bilayer membranes by α -helical antimicrobial and cell non-selective membrane-lytic peptides (1999). *Biochimica et Biophysica Acta -Biomembranes* **1462**: 55-70

149. Sharma A, Inagaki S, Honma K, Sfintescu C, Baker PJ, Evans RT. Tannerella forsythia-induced Alveolar Bone Loss in Mice Involves Leucine-rich-repeat BspA Protein (2005). *J Dent Res* **84**: 462-467
150. Shiau HJ. Periodontal Disease in Women and Men (2018). *Current Oral Health Reports*
151. Slots J, Greenwell H, Fiorellini J, Giannobile W, Offenbacher S, Salkin L, Townsend C, Sheridan P, Genco R. Position Paper: Systemic Antibiotics in Periodontics (2004). *J Periodontol* **75**: 1553-1565
152. Socransky SS, Haffajee AD. Periodontal microbial ecology (2005). *Periodontol 2000* **38**: 135-187
153. Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent RL. Microbial complexes in subgingival plaque (1998). *J Clin Periodontol* **25**: 134-144
154. Stathopoulou P, Benakanakere M, Galicia J, Kinane DJ, O'M, immunology. The host cytokine response to Porphyromonas gingivalis is modified by gingipains (2009). **24**: 11-17
155. Steiniger B, Schwarzbach H, Stachniss V in Steiniger B, Schwarzbach H, Stachniss V. Mikroskopische Anatomie der Zähne und des Parodonts. Georg Thieme Verlag. Stuttgart. 1. 2010
156. Strickland I, Ghosh S. Use of cell permeable NBD peptides for suppression of inflammation (2006). *Ann Rheum Dis* **65**: iii75-iii82
157. Tada H, Shimizu T, Matsushita K, Takada H. Porphyromonas gingivalis-induced IL-33 down-regulates hCAP-18/LL-37 production in human gingival epithelial cells (2017). *Biomed Res* **38**: 167-173
158. Taguchi Y, Imai H. Expression of β -defensin-2 in human gingival epithelial cells in response to challenge with Porphyromonas gingivalis in vitro (2006). *J Periodontal Res* **41**: 334-339
159. Takada K, Saito M, Tsuzukibashi O, Kawashima Y, Ishida S, Hirasawa M. Characterization of a new serotype g isolate of Aggregatibacter actinomycetemcomitans (2010). *Molecular Oral Microbiology* **25**: 200-206
160. Tamai R, Deng X, Kiyoura Y. Porphyromonas gingivalis with either Tannerella forsythia or Treponema denticola induces synergistic IL-6 production by murine macrophage-like J774. 1 cells (2009). *Anaerobe* **15**: 87-90
161. Tanner A, Listgarten M, Ebersole J, Strzempko M. Bacteroides forsythus sp. nov., a slow-growing, fusiform Bacteroides sp. from the human oral cavity (1986). *International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology* **36**: 213-221
162. Tanner ACR, Haffer C, Bratthall GT, Visconti RA, Socransky SS. A study of the bacteria associated with advancing periodontitis in man (1979). *J Clin Periodontol* **6**: 278-307
163. Tomar SL, Asma S. Smoking-Attributable Periodontitis in the United States:

Findings From NHANES III (2000). *J Periodontol* **71**: 743-751

164. Tonetti MS. Molecular factors associated with compartmentalization of gingival immune responses and transepithelial neutrophil migration (1997). *J Periodontol Res* **32**: 104-109

165. Tonetti MS, Greenwell H, Kornman KS. Staging and grading of periodontitis: Framework and proposal of a new classification and case definition (2018). *J Periodontol* **89**: 159-172

166. Tonetti MS, Imboden MA, Gerber L, Lang NP, Laissue J, Mueller C. Localized expression of mRNA for phagocyte-specific chemotactic cytokines in human periodontal infections (1994). *Infection Immunity* **62**: 4005-4014

167. Tonetti MS, Imboden MA, Lang NP. Neutrophil Migration Into the Gingival Sulcus Is Associated With Transepithelial Gradients of Interleukin-8 and ICAM-1 (1998). *J Periodontol* **69**: 1139-1147

168. Tsai C, Hayes C, Taylor GW. Glycemic control of type 2 diabetes and severe periodontal disease in the US adult population (2002). *Community Dent Oral Epidemiol* **30**: 182-192

169. Türkoğlu O, Emingil G, Kütükçüler N, Atilla G. Gingival Crevicular Fluid Levels of Cathelicidin LL-37 and Interleukin-18 in Patients With Chronic Periodontitis (2009). *J Periodontol* **80**: 969-976

170. Türkoğlu O, Kandiloğlu G, Berdeli A, Emingil G, Atilla G. Antimicrobial peptide hCAP-18/LL-37 protein and mRNA expressions in different periodontal diseases (2010). *Oral Dis* **17**: 60-67

171. Turner J, Cho Y, Dinh N-N, Waring AJ, Lehrer RI. Activities of LL-37, a Cathelin-Associated Antimicrobial Peptide of Human Neutrophils (1998). *Antimicrob Agents Chemother* **42**: 2206

172. Uchida Y, Shiba H, Komatsuzawa H, Takemoto T, Sakata M, Fujita T, Kawaguchi H, Sugai M, Kurihara H. Expression of IL-1 β and IL-8 by human gingival epithelial cells in response to *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (2001). *Cytokine* **14**: 152-161

173. Uitto V-J, Grenier D, Chan E, McBride B. Isolation of a chymotrypsinlike enzyme from *Treponema denticola* (1988). *Infection Immunity* **56**: 2717-2722

174. van der Spek JC, Wyandt HE, Skare JC, Milunsky A, Oppenheim FG, Troxler RF. Localization of the genes for histatins to human chromosome 4q13 and tissue distribution of the mRNAs (1989). *Am J Hum Genet* **45**: 381-387

175. Vankeerberghen A, Nuytten H, Dierickx K, Quirynen M, Cassiman JJ, Cuppens H. Differential induction of human beta-defensin expression by periodontal commensals and pathogens in periodontal pocket epithelial cells (2005). *J Periodontol* **76**: 1293-1303

176. Vardar-Sengul S, Demirci T, Sen BH, Erkizan V, Kurulgan E, Baylas H. Human β defensin-1 and -2 expression in the gingiva of patients with specific periodontal diseases (2007). *J Periodontol Res* **42**: 429-437

177. Wang G, Li X, Wang Z (2016). The Antimicrobial Peptide Database. [online] <http://aps.unmc.edu/AP/main.php> [20.11.2018].
178. Waugh DJ, Wilson CJ. The interleukin-8 pathway in cancer (2008). **14**: 6735-6741
179. Weinberg A, Krisanaprakornkit S, Dale BA. Epithelial Antimicrobial Peptides: Review and Significance for Oral Applications (1998). *Crit Rev Oral Biol Med* **9**: 399-414
180. White SH, Wimley WC, Selsted ME. Structure, function, and membrane integration of defensins (1995). *Curr Opin Struct Biol* **5**: 521-527
181. Wingrove JA, DiScipio R, Chen Z, Potempa J, Travis J, Hugli T. Activation of complement components C3 and C5 by a cysteine proteinase (gingipain-1) from *Porphyromonas* (*Bacteroides*) *gingivalis* (1992). *J Biol Chem* **267**: 18902-18907
182. Wolf HF, Rateitschak-Plüss E, Rateitschak KH in Wolf HF, Rateitschak KH. *Farbatlanten der Zahnmedizin Parodontologie*. Georg Thieme Verlag. Stuttgart. 3. 2004
183. Ximénez-Fyvie LA, Haffajee AD, Socransky SS. Comparison of the microbiota of supra- and subgingival plaque in health and periodontitis (2000). *J Clin Periodontol* **27**: 648-657
184. Xu T, Levitz SM, Diamond RD, Oppenheim FG. Anticandidal activity of major human salivary histatins (1991). *Infect Immun* **59**: 2549
185. Yamaji Y, Kubota T, Sasaguri K, Sato S, Suzuki Y, Kumada H, Umemoto T. Inflammatory cytokine gene expression in human periodontal ligament fibroblasts stimulated with bacterial lipopolysaccharides (1995). *Infect Immun* **63**: 3576-3581
186. Yamamoto Y, Gaynor RB. I κ B kinases: key regulators of the NF- κ B pathway (2004). *Trends Biochem Sci* **29**: 72-79
187. Yang L, Harroun TA, Weiss TM, Ding L, Huang HW. Barrel-stave model or toroidal model? A case study on melittin pores (2001). *Biophys J* **81**: 1475-1485
188. Yeaman MR, Yount NY. Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance (2003). *Pharmacol Rev* **55**: 27-55
189. Yee M, Kim S, Sethi P, Düzgüneş N, Konopka K. *Porphyromonas gingivalis* stimulates IL-6 and IL-8 secretion in GSM-K, HSC-3 and H413 oral epithelial cells (2014). *Anaerobe* **28**: 62-67
190. Yin L, Chino T, Horst OV, Hacker BM, Clark EA, Dale BA, Chung WO. Differential and coordinated expression of defensins and cytokines by gingival epithelial cells and dendritic cells in response to oral bacteria (2010). *BMC Immunol* **11**: 37
191. Yoshimura A, Hara Y, Kaneko T, Kato I. Secretion of IL-1 β , TNF- α , IL-8 and IL-1ra by human polymorphonuclear leukocytes in response to lipopolysaccharides from periodontopathic bacteria (1997). *J Periodontal Res* **32**: 279-286

192. Yumoto H, Nakae H, Fujinaka K, Ebisu S, Matsuo T. Interleukin-6 (IL-6) and IL-8 are induced in human oral epithelial cells in response to exposure to periodontopathic *Eikenella corrodens* (1999). *Infect Immun* **67**: 384-394
193. Yun PLW, Decarlo AA, Collyer C, Hunter N. Hydrolysis of Interleukin-12 by *Porphyromonas gingivalis*; Major Cysteine Proteinases May Affect Local Gamma Interferon Accumulation and the Th1 or Th2 T-Cell Phenotype in Periodontitis (2001). *Infect Immun* **69**: 5650
194. Yun S-J, Kim B-O, Yun J-H, Kang D-W, Jang HS. Profiling of genes in healthy hGF, aging hGF, healthy hPDLF and inflammatory hPDLF by DNA microarray (2006). *The Journal of the Korean Academy of Periodontology* **36**: 767-782
195. Zasloff M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms (2002). *Nature* **415**: 389
196. Zhang J, Dong H, Kashket S, Duncan MJ. IL-8 degradation by *Porphyromonas gingivalis* proteases (1999). *Microb Pathog* **26**: 275-280

8 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

8.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Schematische Darstellung des Aufbaus des Parodonts (Se=Saumepithel, Ly=Lymphozyten, G=Granulozyten, Su=Sulkusepithel, iBl=innere Basallamina, äBl=äußere Basallamina, Lp=Lamina propria der Gingiva, afZ=azellulär fibrilläres Zement, D=Dentin, S=Schmelz) [Steiniger et al., 2010].....	7
Abbildung 2:	klassischer und alternativer Weg der Komplementaktivierung [Behrends et al., 2012].....	17
Abbildung 3:	Schematische Darstellung des NF- κ B-Signalweges (IKK: I κ B-Kinase, P: Phosphorylierung des Proteins) [Guo et al., 2012].....	19
Abbildung 4:	Schematische Darstellung des „barrel-starve“-Modells der Porenbildung von α -Helix-Peptiden [Brogden, 2005].....	21
Abbildung 5:	Schematische Darstellung des „carpet“-Modells antimikrobieller Peptide mit Bildung von Peptid-Lipid-Mizellen [Brogden, 2005].....	22
Abbildung 6:	Schematische Darstellung des „toroidal“-Modells antimikrobieller Peptide zur Bildung einer Pore [Brogden, 2005].....	23
Abbildung 7:	dreidimensionale Struktur von HNP-3 stellvertretend für α -Defensine, generiert mit dem PBD 3D-Viewer [Berman et al., 2000].....	25
Abbildung 8:	dreidimensionaler Aufbau des antimikrobiellen Peptids h β D 1 als Stellvertreter der β -Defensine, generiert mit dem PBD 3D-Viewer [Berman et al., 2000].....	25
Abbildung 9:	α -helikale Struktur des antimikrobiellen Peptids LL-37 in hydrophober Umgebung, generiert mit dem PBD 3D-Viewer [Berman et al., 2000].....	26
Abbildung 10:	Porphyromonas gingivalis ATC 33277 im Drei-Felder-Ausstrich	

	auf einer Agarplatte.....	35
Abbildung 11:	Fotografie der kultivierten HGF-1 durch das Mikroskop (Axiovert 40 C, Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland).....	36
Abbildung 12:	Fotografie der hPDLF durch das Mikroskop (Axiovert 40 C, Carl Zeiss).....	36
Abbildung 13:	Fotografie der hPDSC-hTERT durch das Mikroskop (Axiovert 40 C, Carl Zeiss).....	37
Abbildung 14:	Fotografie der BHY-Zellen durch das Mikroskop (Axiovert 40 C, Carl Zeiss).....	37
Abbildung 15:	Prinzip des Sandwich-Enzym-Immunoassays.....	43
Abbildung 16:	Pipettierschema der Standardverdünnungsreihe des Quantikine human IL-6 ELISA der Firma R&D Systems.....	44
Abbildung 17:	ELISA auf IL-6 nach Hinzufügen der Stop-Lösung.....	45
Abbildung 18:	repräsentative Standardkurve, welche aus den Standards eines IL-6-ELISAs berechnet wurde.....	45
Abbildung 19:	Pipettierschema der Standardverdünnungsreihe des ELISA Kits auf IL-8 (R&D Systems).....	46
Abbildung 20:	Standard-Verdünnungsreihe des ELISA auf LL-37 (Hycult Biotech).....	47
Abbildung 21:	Ergebnisse des ELISA auf IL-6, a $p < 0,012$, b $p < 0,029$, c $p < 0,047$, d $p < 0,023$, e $p < 0,004$ (Kruskal-Wallis-Test).....	52
Abbildung 22:	Ergebnisse des ELISA auf IL-6, a $p < 0,046$, b $p < 0,023$, c $p < 0,01$, d $p < 0,01$ (Kruskal-Wallis-Test).....	53
Abbildung 23:	Ergebnisse des ELISAs auf IL-6 der hPDSC-hTERT.....	54
Abbildung 24:	Ergebnisse des IL-6-ELISA der Plattenepithelkarzinomzellen (BHY).....	55
Abbildung 25:	Ergebnisse des ELISA auf IL-8 der HGF-1.....	56
Abbildung 26:	ermittelte Konzentrationen von IL-8 der humanen parodontalen Ligamentfibroblasten.....	57
Abbildung 27:	Ergebnisse des ELISA auf LL-37 der humanen Gingivafibroblasten (HGF-1), a $p < 0,039$ (Kruskal-Wallis-Test)	

	58
Abbildung 28:	ermittelte Konzentrationen von LL-37 bei Plattenepithelkarzinomzellen (BHY), a p < 0,041, b p < 0,023 (LSD Post-Hoc-Test).....	59
Abbildung 29:	Ergebnisse des ELISA auf h β D-2 der HGF-1.....	60
Abbildung 30:	Ergebnisse des ELISA auf h β D-2 der Plattenepithelkarzinomzellen (BHY).....	61
Abbildung 31:	Western-Blot zum Nachweis von I κ B- α ; Infektion der hPDLF mit nativen Porphyromonas gingivalis; obere Bande: I κ B- α , untere Bande: β -Actin.....	62
Abbildung 32:	Western-Blot zum Nachweis von I κ B- α ; Infektion der hPDLF mit hitzeinaktivierten Porphyromonas gingivalis; obere Bande: I κ B- α , untere Bande: β -Actin.....	62
Abbildung 33:	Western-Blot auf I κ B- α ; Infektion von BHY mit nativen Porphyromonas gingivalis; obere Bande: I κ B- α , untere Bande: β -Actin.....	63
Abbildung 34:	Western-Blot zum Nachweis von I κ B- α ; Infektion der BHY mit hitzeinaktivierten Porphyromonas gingivalis; obere Bande: I κ B- α , untere Bande: β -Actin.....	63
Abbildung 35:	Western-Blot auf COX-2; Infektion der BHY mit hitzeinaktivierten Porphyromonas gingivalis; obere Bande: COX-2, untere Bande: Ladekontrolle mit β -Actin.....	64

8.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Einteilung der Parodontitis in vier Stadien [Papapanou et al., 2018, Tonetti et al., 2018].....	9
Tabelle 2:	„Grading“ der Parodontitis zur Beurteilung der Geschwindigkeit der Krankheitsprogression [Papapanou et al., 2018, Tonetti et al., 2018].....	10
Tabelle 3:	Pipettierschema der 6-Well-Platte.....	41

9 Abkürzungsverzeichnis

Parodontitis	PA
Deutsche Mundgesundheitsstudie	DMS
Antimikrobielle Peptide	AMPs
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	P.g.
Taschensondierungstiefen	TST
Bluten auf Sondieren	BOP = Bleeding on Probing
Lipopolysaccharide	LPS
neutrophile Granulozyten	PMN = polymorphnukleäre Zellen
Human- β -Defensin	h β D
Interleukin	IL
Tumor-Nekrose-Faktor- α	TNF- α
Osteoprotegerin	OPG
Receptor Activator of NF κ B Ligand	RANKL
Matrixmetalloproteasen	MMPs
human neutrophile peptide	HNP
Cyclooxygenase 2	COX-2
gingivale Fibroblasten	HGFs
C-C chemokine ligand 20	CCL20
humane Gingivafibroblasten	HGF-1
parodontale Ligamentfibroblasten	hPDLF
humane Plattenepithelkarzinomzellen	BHY
humane Telomerase-Reverse- Transkriptase	hTERT = human telomerase reverse transcriptase
Antibiotikum	AB
Enzyme-linked Immunosorbent Assay	ELISA
Tris-gepufferte Salzlösung mit Tween	TBS-T

bovines Serumalbumin

BSA

Polymerase-Kettenreaktion

PCR

10 Rezepte

1. 10X Tris-Glycin-SDS Laufpuffer (für SDS-PAGE)

Der 10-fach konzentrierte Puffer wurde mit 30,3 g Tris-Base, 144,1 g Glycin und 10 g SDS hergestellt und in 600 ml reinstem H₂O gelöst. Anschließend wurde der Puffer auf 1000 ml mit reinst-H₂O aufgefüllt. Bei Verwendung wurde der Puffer 1:10 verdünnt.

2. 10X Tris-Glycin Transferpuffer (nach Towbin)

Für den Transferpuffer wurden 30,3 g Tris-Base und 144,1 g Glycin in 600 ml reinst-H₂O gelöst und dann auf 1000 ml aufgefüllt.

Zur Herstellung eines 1X Transferpuffers wurden 80 ml des 10X-Puffers mit reinst-H₂O auf 800 ml aufgefüllt und 200 ml reinst-Methanol hinzugegeben.

3. Laemmli-Ladepuffer 4X

Zur Herstellung des Ladepuffers nach Laemmli wurden 12,1 g Tris-Base in 100 ml reinst- H₂O gelöst und anschließend durch Hinzugabe von Salzsäure ein pH-Wert von 6,8 erreicht. 2 ml der 1 M HCl-Tris-Lösung ergaben zusammen mit 0,8 g SDS, 4 ml 100%-Glycerol, 0,4 ml 14,7 M β -Mercaptoethanol, 1 ml 0,5 M EDTA und 8 mg Bromophenolblau den 4X-Laemmli-Ladepuffer.

4. 1X Tris-gepufferte Salzlösung mit Tween 20

Zur Herstellung des TBS-T 20 wurden 50 ml der 20X TBS/Tween 20-Lösung mit 950 ml destilliertem Wasser verdünnt.

11 Danksagung

Mein Dank gilt meiner Doktormutter Frau Prof. Dr. Karin Huth, MME für die Überlassung des Themas, die Betreuung und die Bereitstellung der notwendigen Mittel für die Durchführung der Versuche und die Korrektur meiner Arbeit.

Des Weiteren danke ich Herrn Prof. Dr. Reinhard Hickel, Direktor der Poliklinik für Zahnerhaltung und Parodontologie und Dekan der Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München für die Möglichkeit diese Arbeit in seiner Abteilung durchzuführen.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Maximilian Kollmuß, welcher mich sowohl bei der Durchführung der Versuche, als auch bei dem Verfassen dieser Arbeit zu jedem Zeitpunkt unterstützte und jede meiner Fragen beantwortete. Vielen Dank für die fachlich kompetente Betreuung und die zahlreichen Korrekturen und Verbesserungsvorschläge.

Zuletzt gilt mein Dank meinen Eltern Dr. Manuela Bauer-Sturm und Markus Sturm, meiner Schwester Dr. Lisa Sturm und meinem Freund Dr. Stephan Wimmer, die mir immer beistanden, mich unterstützten und motivierten.

Eidesstattliche Versicherung

Sturm, Lena Isabel

Ich erkläre hiermit an Eides statt,

dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

„Untersuchung der Veränderung der Entzündungsreaktion und Expression von antimikrobiellen Peptiden bei bakterieller Infektion

–

ein in-vitro Ko-Kultur-Modell von parodontalpathogenen Bakterien und oralen Zellen“

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

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

München, 15.12.2021

Lena Sturm