

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

**Untersuchung der Wirkung von verschiedenen  
*Streptococcus mutans* Stämmen auf die Expression von  
Entzündungsmarkern und AMPs in oralen Zellen**

Dissertation

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

vorgelegt von

Carolin Wirth

aus Bobingen

2022

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. dent. Karin Christine Huth MME

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. Hendrik Schulze-Koops

Mitbetreuung durch den  
promovierten Mitarbeiter: Dr. med. dent. Maximilian Kollmuß

Dekan: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen  
Prüfung: 12.07.2022

## Inhaltsverzeichnis

<b>1.</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>5</b>
1.1.	Karies - Definition und Ätiologie .....	6
1.2.	Pathomechanismus der Karies .....	6
1.3.	Dentale Plaque .....	7
1.4.	Kariespathogene Keime des Biofilms .....	9
1.5.	Körperliche Abwehrmechanismen gegen kariespathogene Plaque .....	11
1.5.1.	Neutralisation von Säuren.....	11
1.5.2.	Immunologische Abwehr.....	12
1.6.	Antimikrobielle Peptide .....	12
1.6.1.	Cathelicidine .....	15
1.6.2.	Defensine.....	15
1.6.3.	Immunologische Wirkung von AMPs .....	17
1.6.3.1.	Unterdrückung des Biofilms durch AMPs .....	17
1.6.3.2.	Antibakterielle Wirkung von AMPs .....	17
1.6.3.3.	Antivirale Wirkung von AMPs.....	20
1.6.3.4.	Antimykotische Wirkung von AMPs .....	22
1.6.4.	Verstärkung und Regelung von Abwehrmechanismen durch AMPs.....	22
1.6.5.	Heilungsfördernde Wirkung von AMPs .....	23
1.6.6.	Wirkung von AMPs gegen kariespathogene Keime .....	24
<b>2.</b>	<b>Fragestellung und Studienziele</b> .....	<b>25</b>
<b>3.</b>	<b>Material und Methoden</b> .....	<b>26</b>
3.1.	Vorbereitung von Zellen und Keimen.....	27
3.1.1.	Anlegen von Zellkulturen .....	27
3.1.2.	Vermehrung der Zellkulturen durch Splitten.....	27
3.1.3.	Auswahl und Anzucht von Streptokokkenstämmen .....	28
3.2.	Anlegen von Co-Kulturen .....	29
3.3.	Herstellung von Bakterienlysaten mittels Schallhomogenisierung .....	30
3.4.	Vorbereitung der Immunodetektion.....	32
3.5.	Immunodetektion von IL-6, LL37, HBD2 und PGE <sub>2</sub> .....	33
3.5.1.	„Sandwich-ELISA“.....	34
3.5.2.	Vorbereitung der Immunodetektion von IL-6, LL37 und HBD2 .....	35

3.5.3.	Immunodetektion von IL-6, LL37 und HBD2 .....	36
3.6.	EIA-Immunoassay zum Nachweis von PGE <sub>2</sub> .....	37
3.7.	Western Blot zum Nachweis von IκBα .....	40
<b>4.</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>45</b>
4.1.	Immunodetektion bei Co-Kulturen mit lebenden Streptokokkenstämmen.....	46
4.1.1.	Expression von IL-6 .....	46
4.1.2.	Synthese von PGE <sub>2</sub> .....	47
4.1.3.	Expression von LL37 .....	49
4.1.4.	Expression von HBD2.....	50
4.2.	Immunodetektion bei Co-Kulturen mit Lysaten von Streptokokkenstämmen	51
4.2.1.	Expression von IL-6 .....	51
4.2.2.	IκBα im Zytosol .....	52
<b>5.</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>53</b>
<b>6.</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>63</b>
<b>7.</b>	<b>Rezepte .....</b>	<b>65</b>
<b>8.</b>	<b>Tabellenverzeichnis.....</b>	<b>67</b>
<b>9.</b>	<b>Abbildungsverzeichnis.....</b>	<b>68</b>
<b>10.</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>69</b>
<b>11.</b>	<b>Danksagung .....</b>	<b>78</b>
<b>12.</b>	<b>Lebenslauf.....</b>	<b>79</b>
<b>13.</b>	<b>Eidesstattliche Versicherung.....</b>	<b>80</b>

## 1. Einleitung

Bei der Entwicklung von Möglichkeiten zur Diagnostik, Therapie und Prävention menschlicher Erkrankungen im Bereich der Mundhöhle hat die Zahnmedizin seit Beginn des zwanzigsten Jahrhunderts bis in die heutige Zeit hinein große Fortschritte gemacht. Dabei ist eine Therapieentwicklung feststellbar, weg von der alleinigen Behebung der Folgeerscheinungen einer Erkrankung, hin zu einer immer differenzierteren Form der Krankheitsbekämpfung. Dies erfolgt mittels präziser Diagnostik, Ursachenforschung und einer umfassenden Datenerfassung über die komplexen Interaktionen des menschlichen Immunsystems und der bestehenden Krankheitserreger. Trotz alledem bleiben weiterhin viele Fragen ungeklärt. In der Kariologie ist es aufgrund von vielschichtigen Zusammenhängen noch immer nicht möglich, vereinheitlichte Therapieformen anzuwenden, die zuverlässig ihre Entstehung verhindern. Ein Grund dafür ist die große Menge an Faktoren, die diese Erkrankungen beeinflussen können. Dazu gehören allgemeine Lebensgewohnheiten eines Menschen wie beispielsweise die Ernährung und körperliche Aktivität und Mundhygiene. Auch der gesundheitliche Allgemeinzustand beeinflusst eine Erkrankung. Nicht zuletzt ist die Immunabwehr und damit das Funktionieren des jeweiligen Immunsystems gegen pathologische Organismen, von entscheidender Bedeutung. Hier sind bei weitem noch nicht alle Prozesse vollständig untersucht und erfasst worden. In den letzten zwei Jahrzehnten ist die Betrachtung der Antimikrobiellen Peptide (AMP), die in ihrer Funktion einen noch nicht vollständig erforschten Teil des Immunsystems bilden mehr in den Vordergrund gerückt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Sekretion von Immunmodulatoren und AMPs durch Zellen des Parodonts und der Gingiva in Anwesenheit von bestimmten kariespathogenen Keimen untersucht. Ziel war es zu erforschen, ob diese Zellen einen immunologischen Einfluss auf eine Kariesentstehung ausüben, indem sie eine Immunabwehr gegen kariespathogene Bakterien starten. Dafür wurden aus Wildtypen von *Streptococcus mutans*- Stämmen und Zellen von Gingiva und Parodont Co-Kulturen angelegt, um die Expression und Synthese von Interleukin-6, Prostaglandin-E<sub>2</sub>, I $\kappa$ B $\alpha$  und der AMPs LL37 und Human-Beta-Defensin-2 (HBD2) zu untersuchen.

### 1.1. Karies - Definition und Ätiologie

Bei Karies handelt es sich um einen langsam fortschreitenden degenerativen Prozess, bei dem es zu einer Demineralisierung und Destruktion von Zahnhartsubstanz kommt. Verursacher dieses Abbaus sind bestimmte kariespathogene Keime, welche auf der Zahnoberfläche in einem komplexen Biofilm angesiedelt sind. Durch deren Metabolisierung der durch den Menschen aufgenommenen Nahrung entstehen Stoffwechselprodukte, welche ein saures Milieu erzeugen, das für die Demineralisierung der Zahnhartsubstanz verantwortlich ist (Orland *et al.*, 1955). Je frequenter die Zufuhr kariespathogener Nahrung ist und je mehr pathogene Keime in der Mikroflora der Zahnplaque vorhanden sind, desto mehr wird die Kariesentstehung und das Voranschreiten begünstigt. Dem gegenüber stehen protektive Faktoren, die durch eine gute Mundhygiene und Ernährung begünstigt werden. Ein Biofilm mit physiologischer Flora, eine gute Immunabwehr sowie Puffer und Mineralien im Speichel können die Demineralisierung der Zahnhartsubstanz einschränken und eine Remineralisierung fördern.

### 1.2. Pathomechanismus der Karies

Die Zahnhartsubstanz ist durch den kristallinen Aufbau ihrer anorganischen Verbindungen aus Hydroxylapatit sehr widerstandsfähig gegen mechanisch einwirkende Kräfte, kann aber durch Säuren demineralisiert werden. Erfolgt über einen längeren Zeitraum die Exposition eines Zahnes in ein Milieu mit einem pH-Wert unter 5,5 werden aus den Apatitkristallen Kalziumionen herausgelöst. Mit fortschreitender Demineralisierung vergrößert sich die Karies und schreitet in Richtung Pulpa voran. Je nach Tiefe kann man sie in verschiedene Stadien einteilen.

Eine Karies der äußeren Schmelzschicht, auch als *Caries superficialis* klassifiziert, schreitet verhältnismäßig langsam voran, da Zahnschmelz hauptsächlich aus den oben erwähnten anorganischen Verbindungen mit großen stabilen Schmelzprismen besteht. Auf den Säureangriff erfolgen rein chemische Reaktionen wie Auflösung und Präzipitation. Dies geschieht an den Schmelzprismen sowohl innen, entlang ihrer Längsachse, als auch von außen (Johansen, 1965, Johnson, 1966). In diesem Stadium ist noch eine Remineralisierung der Zahnhartsubstanz möglich, sobald der pH-Wert einen physiologischen Wert von über 5,5 erreicht hat (Lee *et al.*, 2006). Das

Eindringen vereinzelter Bakterien in die Schmelzschicht wurde zwar beobachtet, jedoch ist das Dentin noch frei von Mikroorganismen (Langeland, 1987).

Wird die Schmelz-Dentin-Grenze überschritten ist von einer *Caries media* oder Dentinkaries die Rede. Hier erfolgt die Kariesausbreitung im Wesentlichen in zwei Richtungen. Zum einen breitet sie sich lateral entlang der Schmelz-Dentin-Grenze unterminierend aus. Verantwortlich hierfür ist ein erhöhter Anteil an organischer Substanz und Wasser im Dentin in diesem Bereich. Der Angriff der kariogenen Säuren hat damit einen stärkeren Effekt (Stock *et al.*, 2008). Zum anderen vollzieht sich die Entkalkung und die Einwanderung von kariopathogenen Keimen entlang der Tubuli, in denen sich die Odontoblastenfortsätze befinden, in Richtung Pulpa (Langeland, 1987). Da es sich bei der Einheit aus Dentin und Pulpa um vitales Gewebe handelt, erfolgen als Reaktion auf diesen Prozess Entzündungsreaktionen und Reparaturprozesse durch Odontoblasten (Kamal *et al.*, 1997). Sie exprimieren Entzündungsmediatoren, aktivieren Entzündungskaskaden und setzen Antimikrobielle Peptide frei, um pathogene Keime abzuwehren (Veerayutthwilai *et al.*, 2007). Sie sind des Weiteren in der Lage, Tertiärdentin auszubilden, um so eine Schutzschicht zu herzustellen. Handelt es sich um eine langsam voranschreitende Karies, übernehmen dies bereits vorhandene Odontoblasten. Bei einem rasanten Verlauf durch eine schnell voranschreitende Karies, durch den bestehende Odontoblasten untergehen, differenzieren sich aus vorhandenen pulpalen Stammzellen neue Odontoblasten zur Erzeugung von Tertiärdentin (Smith *et al.*, 1995).

Ist die Karies so weit vorangeschritten, dass sie sich nahe der Pulpa befindet, ist von einer *Caries profunda* die Rede. In diesem Fall sind vermehrt pathogene Mikroorganismen in das Dentin vorgedrungen. Erreichen sie die Pulpa und führen dort zu einer schweren Entzündung, ist eine endodontische Therapie oft unumgänglich (Langeland, 1987). Werden die sich in der Pulpa befindenden Keime nicht entfernt, führt dies zum letzten Schritt der Kariesprogression. Die Entzündung breitet sich in Richtung Apex aus und erzeugt so letztendlich eine apikale Parodontitis (Gängler *et al.*, 2010, Langeland, 1987).

### 1.3. Dentale Plaque

Ein entscheidender Faktor für die Ätiologie von Karies ist die Zusammensetzung der mikrobiellen Plaque. Diese stellt eine der Zahnoberfläche anhaftende ökologische

Einheit dar, bestehend aus funktionellen Konsortien verschiedener miteinander interagierenden Bakterien. Sie sind umgeben von einer Matrix, welche aus Proteinen, von den Keimen sezernierten Exopolysacchariden und Lipiden zusammengesetzt ist.

Die mikrobielle Plaque entsteht schon kurz nach einer gründlichen Reinigung der Zahnoberfläche und verändert sich mit zunehmender Reife und je nach ihren Umweltbedingungen in ihrer Zusammensetzung. Befinden sich in der direkt nach einer frisch gereinigten Zahnoberfläche entstehenden sogenannten Pellicel noch hauptsächlich Speichelproteine und Lipide, die von Hypoxidkristallen adsorbiert wurden (Al-Hashimi *et al.*, 1989, Lie, 1975), so folgt die bakterielle Besiedlung innerhalb der nächsten Stunden. Diese Erstbesiedler zeichnen sich durch starke Kohäsionseigenschaften aus, welche es ihnen ermöglichen, sich an der Zahnoberfläche fest zu verankern (Kolenbrander *et al.*, 1993). Einer dieser Pionierkeime ist *Streptococcus sanguis*, der eine Vielzahl von Verbindungen mit sowohl der Zahnoberfläche, als auch anderen Keimen eingeht (Lai *et al.*, 1975). Daneben gehören zu den Keimen des jungen Biofilms Stämme von Aktinomyzeten, Veillonellen und Corynebakterien (Ritz, 1967). Auch *Streptococcus mutans* (*S. mutans*) findet sich in einer geringen Menge in der jungen Plaque und trägt durch seine Fähigkeit, aus mehreren Mono- und Disacchariden langkettige Polysaccharide zu synthetisieren, zur Matrixbildung von Biofilmen bei.

Die Weiterbesiedlung erfolgt durch Bakterien, die in der Lage sind, Kohäsionen mit bereits haftenden Keimen über Adhäsine einzugehen (Gibbons *et al.*, 1970, Kolenbrander, 2000). Da es sich dabei um mehrere unterschiedliche Adhäsine handelt, ist die Vielfalt der angehefteten Keime größer (London *et al.*, 1989). Dies ermöglicht ein Wachstum der Plaque, so dass sich deren Schichtdicke verbreitert. Der verstärkte Sauerstoffverbrauch durch weiter außen liegende Keime erzeugt Gradienten innerhalb des Biofilms von sauerstoffreichen Arealen hin zu Bereichen, in denen Keime unter anaeroben Bedingungen überleben müssen. Den Übergang zwischen den Gradienten ermöglichen Bakterien, welche Koaggregationsbrücken zwischen den unterschiedlichen Spezies bilden. Einen wichtigen Anteil hat *Fusobacterium nucleatum*, welches das Überleben von obligaten Anaerobiern in einer Umgebung, in der auch Sauerstoff enthalten ist, sichert (Bradshaw *et al.*, 1998).

Bei einer ausgereiften breiten Plaque mit einer großen Zahl an Keimen entsteht durch deren hohe Umsetzung von Nährstoffen ein saures Milieu. Grund dafür ist, dass viele

Kohlenhydrate verstoffwechselt werden, wobei saure Endprodukte, wie z.B. Milchsäure entstehen. Die Zusammensetzung des Biofilms ändert sich damit auch hin zu einer vermehrt azidophilen Keimflora. Das nun verstärkt saure Milieu wirkt sich auf die Zahnhartsubstanz aus und führt zu Demineralisierung von Schmelz und Dentin.

#### 1.4. Kariespathogene Keime des Biofilms

Diese Entwicklung der mikrobiellen Plaque zu einer säureproduzierenden Keimflora und die Störung des Gleichgewichtes von Demineralisierung und Remineralisierung kennzeichnen einen kariespathogenen Biofilm. Bestimmte Keime unterstützen und verstärken die Pathogenität durch ihre acidophilen Eigenschaften, ihre Vorliebe für ein anaerobes Milieu und ihre Fähigkeit, Kohlenhydrate zu fermentieren.

Einer der am stärksten mit Karies assoziierte Keime ist *Streptococcus mutans* (Brown *et al.*, 1986, Tanzer *et al.*, 2001). Den Namen erhielt diese Keimform 1924 von Clarke, da sie im Gegensatz zu den meisten Kokken eher oval als rund sind, was ihn zu der Vermutung führte, dass es sich dabei um eine mutierte Streptokokkenform handelte (Loesche 1986). Phattarataratip sequenzierte 42 genotypisch unterschiedliche Stämme von *S. mutans* im Speichel von Probanden (Phattarataratip *et al.*, 2011). Der Grund für die besonders zerstörerische Wirkung von *S. mutans* auf die Zahnhartsubstanz ist zum einen seine Fähigkeit, das Wachstum und den Erhalt von Biofilmen zu fördern. Zum anderen handelt es sich um eine acidophile Keimform, die ein saures Milieu erzeugt und bevorzugt und somit stark zur Demineralisierung von Zahnhartsubstanz beiträgt. *S. mutans* synthetisiert Fructosyl- und Glycosyltransferasen, wodurch er mehrere verschiedene Zucker fermentieren, als Nahrungsquelle nutzen, speichern oder aber auch abgeben kann (Li *et al.*, 2001). Bei einem ausreichenden Angebot fermentiert *S. mutans* sie zu Lactat, auch Milchsäure genannt, welches die Demineralisierung der Zahnhartsubstanz bewirkt (Huis in 't Veld *et al.*, 1978). Entsteht ein Überschussangebot von Glucose und Fructose, werden aus diesen zusätzlichen Kohlenhydraten Polysaccharide synthetisiert und intrazellulär gespeichert (Gibbons *et al.*, 1962, Wenham *et al.*, 1979). Bei einem unzureichenden Nährstoffangebot kann *S. mutans* auf diese Polysaccharide zurückgreifen, oder aber sie an die Umgebung abgeben und damit Keime ernähren, denen die Fähigkeit Nahrung zu synthetisieren oder zu speichern fehlt. Das sichert das Überleben des Biofilms in Zeiten von Nahrungsmangel. Die Glycosyltransferasen von *S. mutans* ermöglichen auch die extrazelluläre Synthese von unlöslichen Glucanen aus

Saccharose (Hamada *et al.*, 1978, Tanzer *et al.*, 1974). Sie befähigen den Keim zur Adhäsion an der glatten Oberfläche der Zahnhartsubstanz, was die Erstbesiedelung und das Wachstum von Biofilmen fördert (Orstavik *et al.*, 1974). Auch zur Zerstörung der organischen Substanzen von Zähnen kann *S. mutans* durch die Expression von diversen Kollagenasen beitragen (Jackson *et al.*, 1997). Eine weitere kariogene Wirkung haben die Säuren Ethanol und Essigsäure, die durch die Fermentation der von *S. mutans* synthetisierten Polysaccharide (IPS) entstehen (Freedman *et al.*, 1975). Aufgrund von all diesen Faktoren wird *S. mutans* als besonders kariespathogen angesehen.

Mit Karies ebenfalls sehr stark assoziiert sind Lactobazillen, deren Zusammenhang mit kariösen Läsionen schon Mitte des zwanzigsten Jahrhunderts entdeckt wurde. Ebenso wie *S. mutans* synthetisieren manche Spezies Glycosyltransferasen, um so Kohlenhydrate zu fermentieren (Almstahl *et al.*, 2013, Argimon *et al.*, 2013). Auch sie generieren so ein saures Milieu, welches für ihr Überleben Voraussetzung ist. Da ihnen die Fähigkeit fehlt, aus Polypeptidketten Adhäsine zu synthetisieren, benötigen sie Nischen, in denen sie sich aufhalten können. Diese werden von einer fortgeschrittenen Karies, mit einer Kavität, oder starken Entkalkungen, oder einem reifen Biofilm durch Adhäsine geboten. Aus diesem Grund zählen *Lactobacillus spp.* zu den Spätbesiedlern, die erst dann auftreten, wenn eine Karies bereits vorhanden ist. Sie sind besonders in der späten Dentinkaries zu finden (Munson *et al.*, 2004, Takahashi *et al.*, 2008). Für die Kariespathogenität mancher *Lactobacillus spp.* sind zusätzlich zur Säureerzeugung noch andere Eigenschaften verantwortlich. Im Gegensatz zu *S. mutans* können sie auch Zuckerersatzmittel, wie Mannit, Xylit und Sorbit metabolisieren (Almstahl *et al.*, 2013). Diese Stoffe werden in manchen Süßigkeiten verwendet, um Karies zu vermeiden. Haben Lactobazillen bereits die Möglichkeit gehabt sich anzusiedeln, so wird ihre Population durch die Zugabe dieser Zucker weiterhin gesteigert und ein gegenteiliger Effekt zur Kariesprophylaxe tritt auf. Auch die Gabe von Fluoriden, die die Zahnhartsubstanz stärken, ist bei der Bekämpfung einiger Lactobazillen erfolglos, da sie eine starke Fluoridtoleranz aufweisen (Hamilton *et al.*, 1985, Milnes *et al.*, 1985).

Weitere mit Karies stark assoziierte Spezies sind unter den Erstbesiedlern manche Aktinomyzeten, die sich durch ihre adhäsiven Fähigkeiten und ihr Vermögen, sich an

anaerobe Bedingungen anzupassen, auszeichnen. Sie ermöglichen so das Überleben von anderen kariespathogenen Keimen, wie zum Beispiel den Lactobazillen.

## 1.5. Körperliche Abwehrmechanismen gegen kariespathogene Plaque

### 1.5.1. Neutralisation von Säuren

Die Unterdrückung und Zerstörung von kariespathogenen Keimen in Biofilmen und die Neutralisation von deren Erzeugnissen erfolgt über Inhaltsstoffe des Speichels, der von den Mundspeicheldrüsen sezerniert wird. Darin enthalten sind Substanzen, die von Epithelzellen der Mundschleimhaut oder Abwehrzellen exprimiert werden. Die aktive Elimination der Keime übernehmen Abwehrzellen und lösliche Signalstoffe. Die Neutralisation der von Bakterien sezernierten Säuren erfolgt mithilfe von Puffersystemen. Diese diffundieren über den Speichel in die Plaque und erzeugen durch Reaktion mit den Oxoniumionen der Säuren einen stabilen pH-Wert im Speichel.

Abbildung 1 zeigt eine Darstellung der chemischen Reaktionsgleichungen von Bicarbonatpuffer und Phosphatpuffer. Die stärkste Wirkung hat der Bicarbonatpuffer. Ursache dafür ist seine hohe Konzentration im Speichel im Vergleich zu den übrigen Puffersystemen und sein günstiger Wirkungsbereich innerhalb des entscheidenden pH-Wertes von 5,1 bis 7,1. Bei dem Bicarbonatpuffer werden aus einem Oxoniumion und Bicarbonat Wasser und Kohlensäure gebildet. Weitere Puffer in abnehmender Konzentration sind der Phosphatpuffer und der Proteinpuffer. Mit Hilfe des Phosphatpuffers reagiert Monohydrogenphosphat mit einem Oxoniumion zu Dihydrogenphosphat und Wasser. In geringen Konzentrationen ist im Speichel ein Proteinpuffer vorhanden, bestehend aus einer Vielzahl an verschiedenen Proteinen, die eine gute Wirksamkeit innerhalb des pH-Wertes von 3,3 bis 7,2 aufweisen.

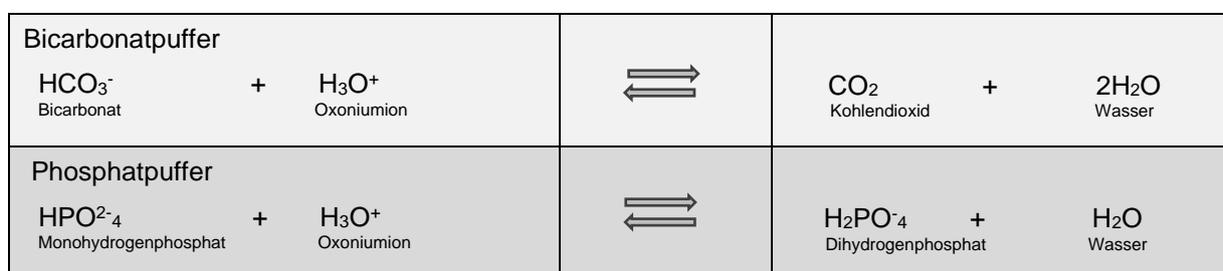


Abb.1: Darstellung der Neutralisation von Säuren durch Puffersysteme. Beispielhaft wird hier ein Oxoniumion gezeigt, das mit Bicarbonat zu Kohlendioxid und Wasser reagiert. Bei dem Phosphatpuffer reagiert das Oxoniumion mit Monohydrogenphosphat zu Dihydrogenphosphat und Wasser

### 1.5.2. Immunologische Abwehr

Die Methoden und Möglichkeiten des Körpers zur Abwehr von kariespathogenen Keimen sind von vielen komplexen Faktoren und Systemen beeinflusst, von denen manche auch heute noch nicht vollständig erforscht sind. Unterschiedliche Entzündungsreaktionen erfolgen in verschieden starker Intensität auf mannigfaltige Keime. Für die Initiation der Immunabwehr sind mehrere Mediatoren des Immunsystems verantwortlich. Zu den wichtigsten gehören der Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), und Zytokine, zu denen Interferone, Interleukine und Chemokine gehören (Rassow *et al.*, 2008).

Eine wichtige Funktion des TNF $\alpha$  ist die Verstärkung der Immunantwort durch Induktion von diversen Zytokinen, welche die Differenzierung und Proliferation zusätzlicher Entzündungszellen aktivieren (Rassow *et al.*, 2008). Dazu gehören unter anderem die Chemokine, welche Monozyten und neutrophile Granulozyten zu Infektionsherden locken (Oppenheim *et al.*, 1991). Chemotaxis bewirkt auch das Interleukin-6 (IL-6). Es wird ausgeschieden von Endothelzellen, Fibroblasten und aktivierten Makrophagen und ist des Weiteren für die Initiation von manchen Entzündungskaskaden verantwortlich (Rassow *et al.*, 2008).

TNF $\alpha$  ist auch bei der Aktivierung von NF- $\kappa$ B beteiligt, indem er für die Phosphorylierung und somit Entfernung des inhibierenden Proteins I $\kappa$ B $\alpha$  sorgt. Das befreite NF $\kappa$ B bewirkt im Zellkern die Transkription von weiteren Genen, welche für zusätzliche Zytokine kodiert sind.

Eine weitere wichtige Aufgabe von TNF $\alpha$  ist die Aktivierung der Cyclooxygenase-II (COX-II), eines Enzyms, das für die Synthese von Prostaglandin-E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) zuständig ist. Bei PGE<sub>2</sub> handelt es sich um ein Eicosanoid, welches für eine verstärkte Vasodilatation und eine erhöhte Kapillarpermeabilität in entzündeten Gebieten sorgt. Dadurch können verbessert Entzündungszellen und Mediatoren in entzündetes Gewebe transportiert und Abwehrreaktionen verbessert werden (Rassow *et al.*, 2008).

### 1.6. Antimikrobielle Peptide

Eine weitere Unterstützung der Immunabwehr erfolgt über sogenannte „Antimikrobielle Peptide“ (AMP). Dabei handelt es sich um verschiedene Formen von Polypeptiden, die aus bis zu 100 Aminosäuren aufgebaut sind (Bals, 2000). Zu ihren Funktionen zählt unter anderem die Unterstützung und Aktivierung des Immunsystems mittels Induktion

von Entzündungskaskaden und Chemotaxis von Leukozyten. Auch die direkte Eliminierung von pathogenen Organismen wie Bakterien, Pilzen und Viren wird teilweise von AMPs übernommen. Des Weiteren sind AMPs an heilungsfördernden Prozessen, wie Wundheilung und Angiogenese beteiligt. Die erste Beschreibung von AMPs erfolgte 1966 durch Zeya und Spitznagel (Zeya *et al.*, 1966). In der Folgezeit wurden sie in einer Vielzahl unterschiedlichster Lebensformen nachgewiesen, von Insekten über Säugetiere bis hin zum Menschen (Boman, 1996).

Die Suche ergab bis in die heutige Zeit hinein über 900 verschiedene AMPs. Eine damit zwangsweise erforderliche Gruppierung der AMPs in diverse Untereinheiten erfolgte anhand ihrer unterschiedlich aufgebauten Sekundärstruktur und in dem gehäuftem Vorkommen bestimmter Aminosäuren. Zusätzlich erfolgte eine Einteilung in anionische und kationische AMPs. Das ermöglichte eine Festlegung von drei Hauptgruppen (Andreu *et al.*, 1998, Hancock, 1997).

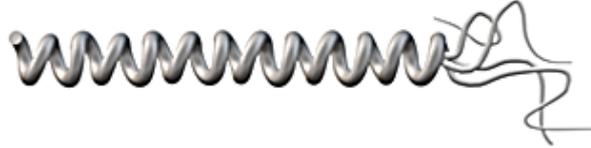
Abbildung 2 zeigt anhand von Beispielen schematisch den Aufbau dieser drei Hauptgruppen. Die erste Hauptgruppe ist durch eine  $\alpha$ -helikal gewundene lineare Struktur gekennzeichnet. Hierunter fallen unter anderem die kationischen Cathelicidine, von welchen hCAP-18 (human cationic antimicrobial protein) mit seiner c-terminalen Domäne LL37 von entscheidender Bedeutung für den Menschen ist. LL37 ist der meistverwendete Ausdruck für dieses Peptid. Die zweite Hauptgruppe ist erkenntlich durch eine  $\beta$ -Faltblattstruktur. Sie entsteht aufgrund von drei Disulfid-Brücken, die sich zwischen sechs verschiedenen Cystein-Aminosäuren bilden. Zu dieser Gruppe zählen die Defensine. Durch die unterschiedliche Positionierung ihrer Disulfidbrücken werden diese wiederum in weitere Unterformen unterteilt. Die dritte Hauptgruppe bilden AMPs, welche linear sind, jedoch im Gegensatz zur ersten Hauptgruppe keine  $\alpha$ -Helix bilden. Sie existieren in gestreckter Form oder bilden Schleifen und enthalten manche Aminosäuren gehäuft, wie Tryptophan, Prolin, Arginin oder Histidin. Die in dieser Arbeit vermehrt behandelten Hauptgruppen der Cathelicidine und der Defensine werden in den folgenden Kapiteln näher erläutert.

## Hauptgruppen der Antimikrobiellen Peptide

### Gruppe I: lineare $\alpha$ -helikal gewundene Antimikrobielle Peptide

Cathelicidine

LL37



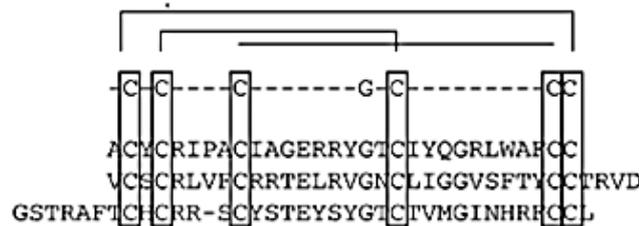
### Gruppe II: Antimikrobielle Peptide mit Disulfidbrücken an Cysteinen

$\alpha$ -Defensine

HNP-1

HNP-4

HD-6

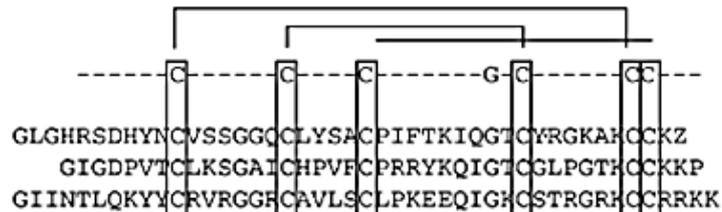


$\beta$ -Defensine

hBD-1

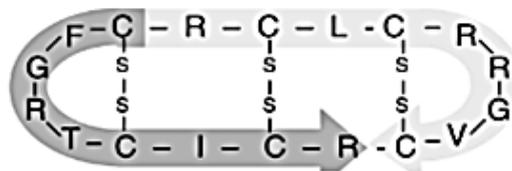
hBD-2

hBD-3



$\theta$ -Defensine

rTD-1



### Gruppe III: Antimikrobielle Peptide mit hohem Anteil an bestimmten Aminosäuren

PR-39

RRRPRPPYLPRPRPPFFPPRLPPRI PPGFPPRFPPRFPGKR

Histatine

His-1

DSHEKRHHGYRRKRFHEKHHSREFPFYGDYGSNYLYDN

His-3

DSHAKRHHGYKRKRFHEKHHSRGRYSNYLYDN

Abbildung 2: Die drei Hauptgruppen von AMPs mit Darstellung der Aminosäuresequenz von Beispielpeptiden. Gruppe I zeigt die Sekundärstruktur von LL37, Gruppe II zeigt Beispiele von  $\alpha$ - und  $\beta$ -, sowie  $\theta$ -Defensinen. Die Senkrechtbalken stellen die Disulfidbrücken dar, die zwischen den Cysteinen (C) gebildet werden. Gruppe III zeigt AMPs, die manche Aminosäuren gehäuft enthalten. Dargestellt ist die Aminosäuresequenz von PR-39 und Histatin 1 und 3. Modifiziert nach (Bals, 2000)

### 1.6.1. Cathelicidine

Das bis dato einzige im menschlichen Körper aufgezeigte Cathelicidin ist hCAP-18, dessen funktionaler Teil aus seiner c-terminalen Domäne LL37 besteht. Der genetische Aufbau der linearen  $\alpha$ -Helix von Cathelicidinen gliedert sich in mehrere Untereinheiten. Die Anzahl und Funktion dieser einzelnen Domänen ist bei allen Cathelicidinen einheitlich. Vier Exons sind für verschiedene Funktionen zuständig. Das erste Exon mit der n-terminalen Domäne beinhaltet das Signalpeptid, während die Exons zwei und drei die Aufgabe der inaktiven Vorstufe erfüllen. Lediglich das vierte Exon mit seiner c-terminalen Domäne, so wie LL37 im Fall von hCAP-18, besitzt antimikrobielle Aktivität (Bals *et al.*, 2003). LL37 wird von hCAP-18 durch Proteolyse mithilfe der Proteinase 3 abgespalten (Sorensen *et al.*, 2001). Die Bezeichnung LL37 ist auf den Aufbau aus 37 Aminosäuren, von denen zwei Leucin-Aminosäuren den Anfang bilden, zurückzuführen (Larrick *et al.*, 1995). Abbildung 2 zeigt den Aufbau der Sekundärstruktur von LL37. Dieses AMP wurde in vielen Bereichen der äußeren körperlichen Schutzbarrieren nach Entzündungsinduktion nachgewiesen (Frohm Nilsson *et al.*, 1999). Basalzellen in nahezu allen Regionen von Haut und Schleimhäuten synthetisieren und sezernieren hCAP-18. Dazu gehören die Mundhöhle und der Gastrointestinaltrakt, ebenso wie die Geschlechtsorgane und der Respirationstrakt. Auch in den dort sezernierten Sekreten wurde LL37 nachgewiesen. Dies alles lässt auf eine wichtige erste äußere Schutzbarriere gegen pathogene Organismen schließen. Des Weiteren wird das Peptid in vielen Abwehrzellen synthetisiert. Fresszellen wie phagozytierende neutrophile Granulozyten und Makrophagen sowie deren Vorläuferzellen Monozyten und Myelozyten exprimieren hCAP-18 (Gudmundsson *et al.*, 1996), aber auch andere Zellen des Immunsystems wie Mastzellen, CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten, B-Lymphozyten und natürliche Killerzellen.

### 1.6.2. Defensine

Bei den AMPs der zweiten Hauptgruppe, den Defensinen, ist wie bereits oben erwähnt das kennzeichnende Merkmal die  $\beta$ -Faltblattstruktur, die durch die Bildung von drei Disulfidbrücken entsteht. Je nach Positionierung dieser Disulfidbrücken ergeben sich vier unterschiedliche Sekundärstrukturen. Dies ermöglicht eine Einteilung in vier unterschiedliche Defensinformen (Ganz *et al.*, 1995). Abbildung 3 veranschaulicht

diese Einteilung in  $\alpha$ -Defensine,  $\beta$ -Defensine, Defensine von Insekten und  $\theta$ -Defensine (Palffy *et al.*, 2009).

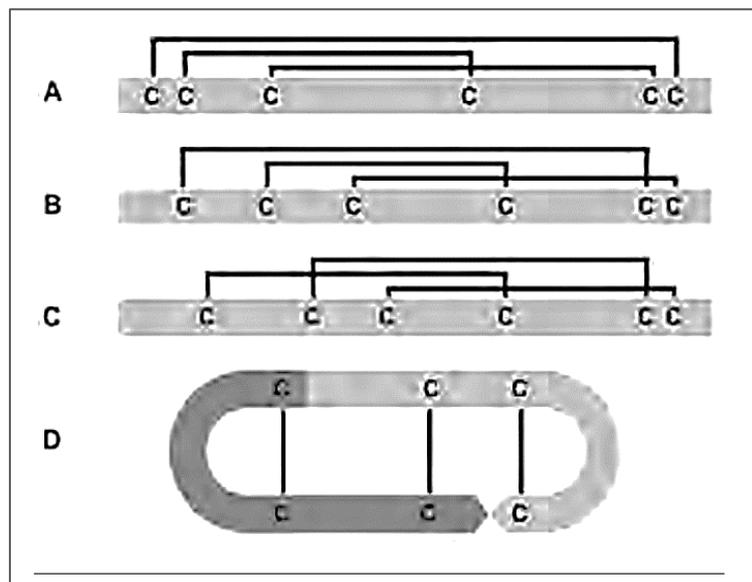


Abbildung 3: Darstellung der Positionen der Disulfidbrücken zwischen den Cystein-Resten bei den verschiedenen -Defensinen: Gruppe A zeigt Brücken von  $\alpha$ -Defensinen (1-6,2-4,3-5) Gruppe B zeigt Brücken von  $\beta$ -Defensinen (1-5,2-4,3-6), Gruppe C zeigt Brücken von Defensinen von Insekten (1-4,2-5,3-6), Gruppe D zeigt Brücken von  $\theta$ -Defensinen (Palffy *et al.*, 2009).

Im Menschen auftretende Defensinformen sind  $\alpha$ - und  $\beta$ -Defensine. Ebenso wie LL37 werden sie ubiquitär auf Schleimhäuten und der äußeren Haut sezerniert, woraus sich auch hier auf eine wichtige erste Schutzfunktion gegen pathogene Organismen schließen lässt. Zu den ersten erforschten Defensinen gehören die  $\alpha$ -Defensine, auch bezeichnet als Human Neutrophil Peptides (HNPs). Ihren Namen erhielten diese Peptide wegen der Beobachtung, dass sie hauptsächlich von neutrophilen Granulozyten sezerniert werden (Bevins *et al.*, 1999). Sie tragen entscheidend zur Immunabwehr bei durch Förderung von Antikörperreaktionen und durch Unterstützung der Wechselwirkungen von B-Lymphozyten und T-Lymphozyten (Lillard *et al.*, 1999).

$\beta$ -Defensine, auch Human-Beta-Defensins (HBD) genannt, werden hauptsächlich von Epithelzellen der Schleimhäute exprimiert (Bissell *et al.*, 2004). Es existieren die vier Untergruppen HBD1 bis HBD4, die unterschiedliche Wirkspektren aufweisen und zu verschiedenen Zeitpunkten exprimiert werden. So sind HBD1 und HBD3 grundsätzlich als vorsorgende Schutzbarriere vorhanden, während andere wie HBD2, erst in Anwesenheit von pathogenen Organismen und bei entzündlichen Prozessen exprimiert werden (Bissell *et al.*, 2004, Singh *et al.*, 1998).

### 1.6.3. Immunologische Wirkung von AMPs

#### 1.6.3.1. Unterdrückung des Biofilms durch AMPs

Insgesamt unterstützen Antimikrobielle Peptide auf vielfältige Art die menschliche Immunabwehr vor allem in den Bereichen der äußeren ersten Schutzbarrieren, wie der äußeren Haut und den Schleimhäuten. Die Anwesenheit von LL37 unterdrückt bereits die Entstehung von sich anheftenden Biofilmen, da es eine antimikrobielle Wirkung gegen *Staphylococcus epidermidis* aufweist. Dieser Keim besitzt die Fähigkeit, sich an glatten Oberflächen anzuheften und eine Basis für weitere Keime zu bilden, weshalb er in der Medizin für Entzündungen an Kathetern, und Zugängen wie Blasenkathetern und Drainagen, aber auch den peripheren und zentralen Venenzugängen verantwortlich ist. Durch seine Reduzierung ist die Kohäsion mit weiteren Keimen unterbunden und damit die Entstehung eines reifen Biofilms eingeschränkt (Hell *et al.*, 2010, Nelson *et al.*, 2009, Overhage *et al.*, 2008).

#### 1.6.3.2. Antibakterielle Wirkung von AMPs

Eine wichtige Funktion von AMPs ist die Zerstörung pathogener Keime durch Lyse von deren Zellwand, indem sie eine porenförmige Öffnung schaffen. Das grundsätzliche Prinzip besteht darin, die feste Struktur einer Doppellipidmembran, die die Wände von Bakterien bildet, zu durchbrechen. Abbildung 4 zeigt als Beispiel Phosphatidylcholin, ein gehäuft in Membranen vorkommendes Phospholipid.

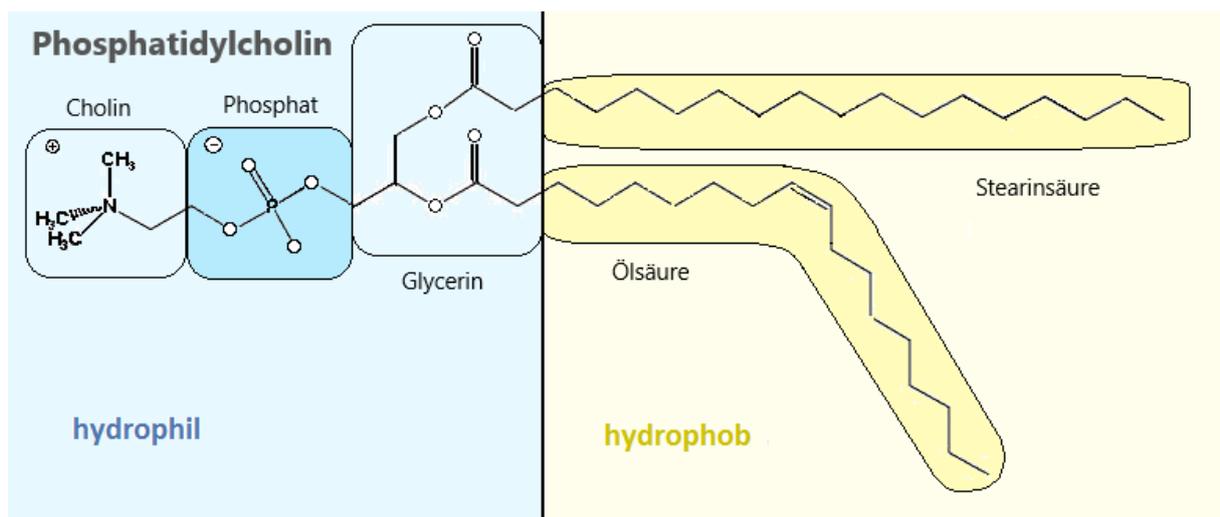


Abbildung 4: Phosphatidylcholin. Der blaue Bereich zeigt den hydrophilen Kopf aus einem Cholin, einem Phosphat und einem Glycerinmolekül. Der gelbe Bereich stellt das hydrophobe Ende dar, das in das Innere von Membranen ragt (selbst erstellte Darstellung).

Die Lipide dieser Membran bestehen aus einem hydrophilen, nach außen in das wässrige Medium ragendem Kopfteil und einem unpolaren hydrophoben Ende aus langen Fettsäuren, das in das Innere der Membran gerichtet ist. Um die stabile Struktur der Doppellipidmembran der Bakterien aufzubrechen, ist eine Bindung der AMPs an diese Membran erforderlich, gefolgt von einer Interaktion mit der Bakterienwand, die zur Porenbildung und letztendlich zur Lyse führt. Entscheidend dafür ist, dass AMPs über einen hydrophoben und einen hydrophilen Teil verfügen.

Mehrere Modelle wurden zu dem genauen Vorgang der Porenbildung von AMPs bei Bakterien erarbeitet (Chan *et al.*, 2006). Das Barrel-Stave-Modell, das Toroidal-Pore-Modell, das Carpet-Modell, sowie das Modell der Molecular-Electrocorporation und das Sinking-Raft-Modell. Abbildung 5 stellt diese Modelle und deren Funktionsweise dar.

Bei dem Barrel-Stave-Modell lagern sich mehrere AMPs mit ihrem hydrophilen Köpfen an der negativ geladenen Bakterienwand zusammen und durchziehen diese mit ihrem hydrophoben Anteil. Daraufhin formen gebildete Multimere einen fassähnlichen Kanal und bewirken so eine Lyse des Bakterieninhaltes, was zur Zerstörung des Bakteriums führt (Ehrenstein *et al.*, 1977).

Der Prozess verläuft ähnlich bei dem Toroidal-Pore-Modell (Mor *et al.*, 1994), zusätzlich verbinden die AMPs jedoch die beiden Lipidschichten zu einer monomolekularen Schicht, indem sie die innere und die äußere Membranschicht miteinander verknüpfen.

Bei dem Carpet-Modell wird die Bakterienwand von AMPs wie von einem Teppich bedeckt, bis eine Schwellenkonzentration erreicht wird, die zur Zersprengung der Wand und zur Mizellenbildung von Membrananteilen führt (Pouny *et al.*, 1992).

Etwas anders entsteht die Porenbildung in dem Modell der Molecular-Electrocorporation. Hier lagern sich stark kationisch geladene AMPs an die Bakterienmembran und bewirken so ein elektrisches Potenzial, das ab einem gewissen Grenzwert zu einer Porenbildung führt (Chan *et al.*, 2006, Miteva *et al.*, 1999).

Bei dem Sinking-Raft-Modell entsteht die Pore durch ein Ungleichgewicht in der Bakterienmembran, herbeigeführt durch AMPs welche in die Membran eingesunken sind. Dies bewirkt ein Ansteigen der Membrankrümmung und die Öffnung wird herbeigeführt (Pokorny *et al.*, 2005).

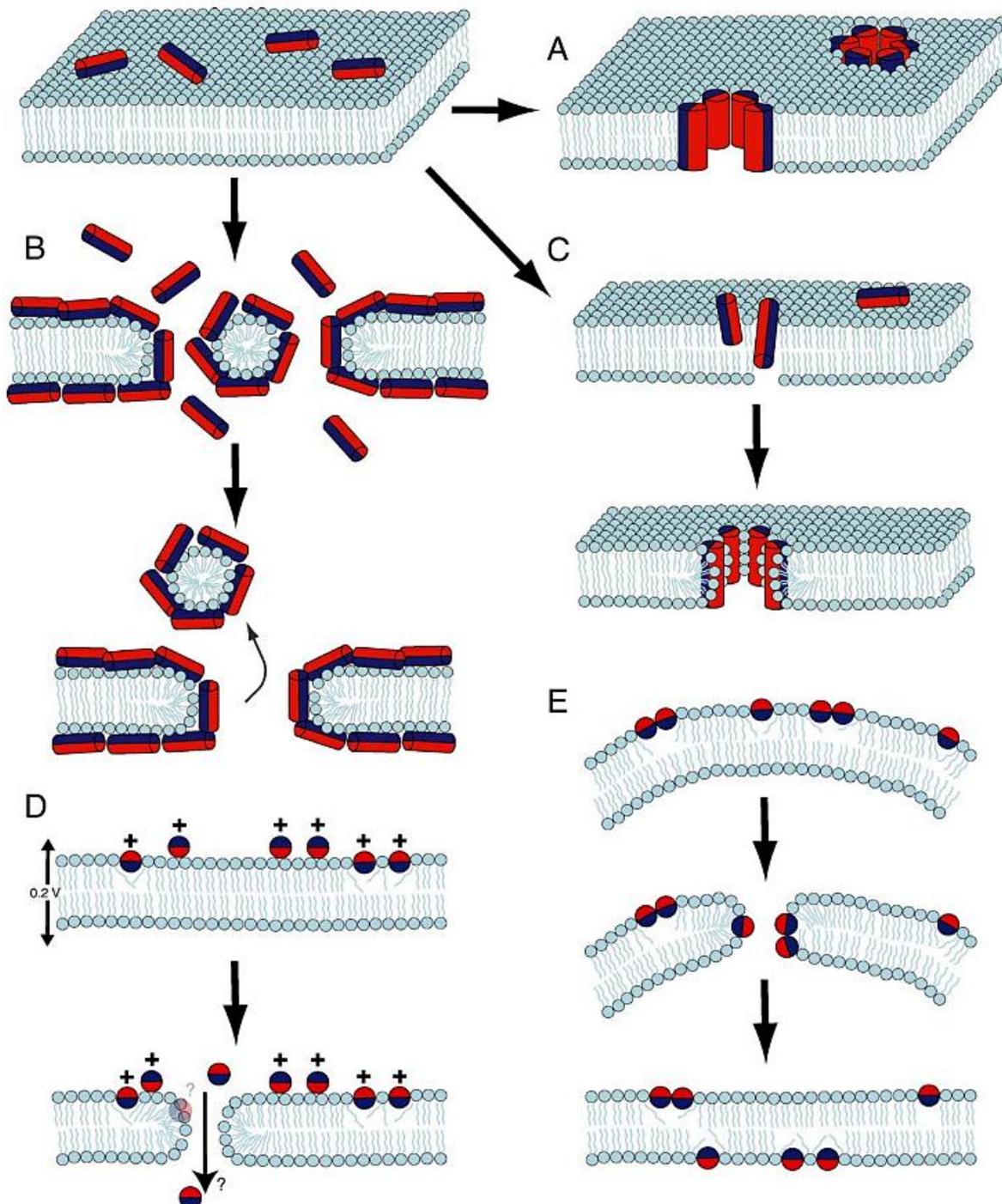


Abbildung 5: Darstellung der Modelle der Porenbildung durch AMPs. An den Doppellipidmembranen (hellblau) lagern sich AMPs an (blaurote Zylinder oder Kugeln). Die roten Hälften stellen den hydrophilen Anteil dar, die blauen den hydrophoben. (A) Barrel-Stave-Modell, (B) Toroidal-Pore-Modell, (C) Carpet-Modell, (D) Modell der Molecular-Electrocorporation und (E) Sinking-Raft-Modell (Chan *et al.*, 2006)

Durch diese oben beschriebenen porenbildenden Funktionsweisen wirken AMPs auf eine Vielzahl von gramnegativen und grampositiven Bakterien. Gordon entdeckte antibakterielle Aktivität von LL37 gegen *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* und *Pseudomonas aeruginosa* (Gordon *et al.*, 2005). Auch wurde eine antibakterielle Wirkung von AMPs gegen Streptokokken der Gruppen A, B und C, gegen *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium*, *Proteus vulgaris*, *Proteus mirabilis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* und Spezies von *Campylobacter* festgestellt (Hancock, 1997, Travis *et al.*, 2000, Turner *et al.*, 1998). AMPs sind folglich in der Lage, eine Vielzahl von Keimen direkt unschädlich zu machen. Sie können des Weiteren körperschädigende Auswirkungen, die bei einer Infektion mit pathogenen Bakterien entstehen reduzieren. So kann LL37 die für den Körper toxischen Lipopolisaccharide von Bakterien binden, die bei der Zerstörung der Keime in den Blutkreislauf freigesetzt werden (Bals, 2000, Larrick *et al.*, 1995). Dies ermöglicht es, einen schweren Krankheitsverlauf mit sehr starken Abwehrreaktionen des Immunsystems, welche im schlimmsten Fall zu einer lebensbedrohlichen Sepsis führen können, zu verhindern (Larrick *et al.*, 1995).

#### 1.6.3.3. Antivirale Wirkung von AMPs

Zusätzlich zur bakteriziden Wirkung konnte eine Vielzahl von antiviralen Aktivitäten durch AMPs nachgewiesen werden. Dean konnte aufzeigen, dass verschiedene AMPs direkt die Virusmembran angreifen und, ähnlich dem bei Bakterien aufgezeigten Carpet-Modell eine Porenöffnung schaffen, die letztendlich zum Absterben des Virus führt. Hierbei erwies sich LL37 als das effektivste AMP (Dean *et al.*, 2010). Zudem legte er den Verdacht nahe, dass AMPs in der Lage sind, die Antigene eines Virus freizulegen, um so eine gezielte Antikörperreaktion zu bewirken und das spezifische Immunsystem zu aktivieren.

Das Detektieren von virusinfizierten Zellen ist ein weiterer wichtiger Abwehrmechanismus, den einige AMPs ausführen können. LL37 bindet an die viralen Fragmente von RNA oder DNA, die von einer verstorbenen Zelle freigesetzt werden und transportiert diese in die endosomalen Kompartimente von Zielzellen, wie den Dendritischen Zellen und Monozyten. Dort wird das virale Erbgut detektiert und es

erfolgt die Aktivierung von Interferon- $\alpha$  und Interferon- $\beta$ , die daraufhin Entzündungskaskaden in Gang setzen und Entzündungszellen aktivieren (Chamilos *et al.*, 2012). LL37 verstärkt zusätzlich die Toll-Like-Rezeptor-3 Signalübertragung, welche nach Detektion der Viruspartikel die Aktivierung der immununterstützenden Interleukine IL-6 und IL-8 bewirkt (Lai *et al.*, 2011).

AMPs sind außerdem in der Lage, die virale Replikation unterdrücken. Eine aktive Abwehr durch LL37 wurde gegen das Influenza A-Virus von Barlow bei Versuchen an Mäusen nachgewiesen. Bei den mit LL37 behandelten Tieren waren sowohl die Schwere der Infektion als auch die Replikation des Virus reduziert (Barlow *et al.*, 2011). Sousa wies nach, dass LL37 den Stoffwechsel von mit Rhinoviren infizierten Lungenepithelzellen reduzieren und somit auch die Vermehrung dieser Zellen hemmen kann (Sousa *et al.*, 2017). Bergman untersuchte dieselbe Wirkung in vitro bei mit dem HIV-1-Virus infizierten mononukleären Zellen des peripheren Blutes einschließlich primärer CD4- und T-Helferzellen, was ihn zu der Vermutung führte, dass AMPs eine lokale Schutzfunktion in den Schleimhäuten gegen das Virus übernehmen (Bergman *et al.*, 2007). Bei dem für die Pockenerkrankung verantwortlichen *Vaccinia virus* wurde ebenfalls sowohl in vitro als auch an Mäusen die Hemmung der Virusreplikation durch LL37 nachgewiesen (Howell *et al.*, 2004). Currie demonstrierte in Versuchen mit Zellkulturen eine antivirale Wirkung von LL37 gegen das *Syncytial virus*, welches zu einer Lungeninfektion mit schwerem Krankheitsverlauf führen kann. LL37 inhibierte die Ausbreitung des Virus in den Kulturen durch Unterdrückung der Replikation und stoppte den Zelltod von bereits infizierten Zellen (Currie *et al.*, 2013).

Von diversen AMPs wurde die antivirale Fähigkeit gegen das *Herpes Simplex virus* (HSV) nachgewiesen (Yasin *et al.*, 2000), wobei Gordon einen sicheren Nachweis lieferte, dass LL37 auf der Hornhaut und Bindehaut des Auges exprimiert wird und zu einer deutlichen Reduktion von sowohl HSV als auch dem *Adenovirus* führt (Gordon *et al.*, 2005).

In-vitro-Experimente zeigen, dass LL37 auch eine inhibitorische Wirkung auf die Infektiosität des *Dengue Virus* hat, wobei vermutet wird, dass LL37 das Virus beim Eintritt in die Zelle hemmt (Alagarasu *et al.*, 2017). Es wird deutlich, dass AMPs ein breites antivirales Spektrum vorweisen.

#### 1.6.3.4. Antimykotische Wirkung von AMPs

Auch eine antimykotische Aktivität durch AMPs wurde nachgewiesen. So konnte bei LL37 eine Wirkung gegen *Candida albicans* beobachtet werden, wobei wieder festgestellt wurde, dass der Ansatzpunkt ähnlich wie bei Bakterien oder Viren die Permeabilisierung der Membran war (Wong *et al.*, 2011). Luo entdeckte diese Funktion auch bei in-vitro-Versuchen gegen *Aspergillus fumigatus*. Bei weiteren Versuchen mit Mäusen, deren Lungenepithel mit *Aspergillus fumigatus* infiziert wurde, war eine deutliche antimykotische Wirkung von LL37 ersichtlich. Des Weiteren konnte eine Reduzierung der Myzel-Invasion und eine Reduzierung der Zerstörung in den Epithelzellen beobachtet werden (Luo *et al.*, 2019). Insgesamt machen all diese Forschungsergebnisse klar, dass AMPs gegen unterschiedlichste Pathoorganismen vorgehen und dabei an verschiedenen Angriffspunkten ansetzen.

#### 1.6.4 Verstärkung und Regelung von Abwehrmechanismen durch AMPs

Über das direkte Ausschalten von pathogenen Erregern hinaus unterstützen Antimikrobielle Peptide die menschliche Immunabwehr durch eine Verstärkung und Regelung diverser Abwehrmechanismen.

Ein wichtiger Wirkungsbereich von AMPs ist die Chemotaxis. Zellen, die in unterschiedlicher Weise für die Immunabwehr von Bedeutung sind, werden von AMPs an den Ort einer Infektion gelockt. Bei diesen Zellen handelt es sich unter anderem um Monozyten und T-Zellen (Chertov *et al.*, 1996, Territo *et al.*, 1989), ebenso wie unreife dendritische Zellen (Pilkington *et al.*, 2018) und neutrophile Granulozyten (De *et al.*, 2000). Sowohl LL37 als auch  $\alpha$ - und  $\beta$ -Defensine sind in der Lage, diese Zellen anzulocken und die zügige Immunantwort zu initiieren.

Eine weitere entscheidende Funktion haben AMPs bei der Regulation von Entzündungskaskaden. So verstärkt zum Beispiel LL37 Entzündungsreaktionen mittels direkter Aktivierung des P2X<sub>7</sub>-Rezeptors. Neben der Chemotaxis ist dieser Rezeptor zuständig für die Freisetzung des proinflammatorischen Zytokins IL1- $\beta$ , welches für das in Gang setzen verschiedener Entzündungskaskaden verantwortlich ist (Elssner *et al.*, 2004).

Zusätzlich ermöglicht die Aktivierung des P2X<sub>7</sub>-Rezeptors durch LL37 eine Verlängerung der Lebenszeit neutrophiler Granulozyten durch Verhinderung ihres programmierten Zelltodes, der sogenannten Apoptose. LL37 inhibiert die extrinsische

Apoptose durch Unterbindung der Umwandlung von Procaspase-3 zu Caspase-3, welche die Kaskade zur Apoptose startet. Auch die intrinsische Apoptose kann LL37 durch Inhibition des Proteins BH3-Interacting Domain-Death-Agonist (BID) verhindern, welcher verantwortlich ist für eine Permeabilisierung der Mitochondrienmembran. Die Freisetzung von in den Mitochondrien gelegenen Apoptose-Mediatorproteinen wird somit unterbunden und die Apoptose kann nicht gestartet werden (Barlow *et al.*, 2006).

Bei infizierten Zellen, die eliminiert werden müssen, um eine Infektionsausbreitung zu verhindern und um den Erreger zu erkennen, kann LL37 andererseits die Apoptose aktivieren. Für das in Gang setzen der Apoptose induziert LL37 in den Mitochondrien von infizierten Zellen die Porenbildung und setzt die oben genannten Apoptose-Mediatorproteine frei. Das Mediatorprotein Cytochrom-c bildet mit dem Apoptotic-Protease-Activating-Factor-1 ein Apoptosom, welches letztendlich die Apoptose über die Caspasen 3 und 9 aktiviert (Barlow *et al.*, 2010).

#### 1.6.5. Heilungsfördernde Wirkung von AMPs

Eine weitere wichtige Rolle haben AMPs außerdem bei der Unterstützung von heilungsfördernden Prozessen. Eine verbesserte Durchblutung ist ein essenzieller Bestandteil von Wundheilung und Immunabwehr. Versuche an parodontalen Zellen haben gezeigt, dass LL37 die Neubildung von Gefäßen vorantreiben kann, indem es bei diesen Zellen die Expression des vaskulären endothelialen Wachstumsfaktors VEGF-A aktiviert, welcher für die Angiogenese verantwortlich ist (Kittaka *et al.*, 2013). Auch wurde bei Tierversuchen mit Kaninchen die Induktion der Angiogenese durch LL37 bestätigt. Die Injektion von LL37 nach einer künstlich erzeugten Ischämie ergab im Vergleich zu Kontrollgruppen eine deutliche Vermehrung von Kapillaren. Dies wurde mittels Angiographie nachgewiesen (Koczulla *et al.*, 2003).

Des Weiteren unterstützt LL37 die Wundheilung durch Induktion der Einwanderung von Keratinozyten, die für den Wundverschluss zuständig sind. LL37 phosphoryliert den auf der äußeren Zellmembran der Keratinozyten liegenden Epidermal-Growth-Factor-Rezeptor (EGFR). Aktiviert dieser Rezeptor den Epidermal-Growth-Factor, ist dieser unter anderem für die Keratinozytenmigration bei Wunden zuständig und ermöglicht so ein zügiges Schließen einer Wunde (Tokumaru *et al.*, 2005).

Dies alles verdeutlicht, dass AMPs in einem weiten Rahmen Einfluss auf Entzündungs- und Regenerationsprozesse haben, insbesondere in den Regionen von nach außen

exponierten Körperoberflächen wie Haut und Schleimhäuten. Somit spielen sie auch in der Mundhöhle eine entscheidende Rolle bei der Bekämpfung von Karies.

#### 1.6.6. Wirkung von AMPs gegen kariespathogene Keime

Durch ihre antibakterielle und immunmodulierende Wirkung sind AMPs auch im Zusammenhang mit der Kariesprävention und Kariesbekämpfung von Interesse. Tao detektierte in einer Studie an Kindern zwischen 11 und 15 Jahren eine negative Korrelation zwischen Kariesbefall und der Konzentration diverser AMPs im Speichel (Tao *et al.*, 2005). Als hochsignifikant stellte sich die negative Korrelation zwischen dem Kariesbefall und der Konzentrationshöhe von HNPs 1-3 heraus (Spearman's rank correlation,  $p = 0,001$ ,  $r = -0,281$ ). Dies bekräftigt die Hypothese, dass  $\alpha$ -Defensine bei der Kariesbekämpfung eine Rolle spielen.

Auch eine Studie von Phattarataratip, in welcher aus Speichelproben von 13-jährigen Teenagern verschiedene Stämme von *S. mutans* gensequenziert und eingeteilt wurden, konnte diese Hypothese bestätigen. Die Stämme von Probanden mit und ohne Karieserfahrung wurden auf ihre Anfälligkeit auf diverse AMPs hin verglichen (Phattarataratip *et al.*, 2011). Es wurde ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Auftreten von kariösen Läsionen und dem Vorhandensein von durch ihre Resistenz gegen AMPs kariespathogenen Stämmen von *S. mutans* bewiesen ( $p = 0,04$ ). Die Resistenzen traten sowohl gegen HNP1 und HNP2 als auch gegen die  $\beta$ -Defensine HBD2 und HBD3 sowie gegen LL37 auf. Dies verdeutlicht, dass eine gute Abwehrfunktion durch AMPs bei der Kariesprävention wichtig ist.

Diese Ergebnisse wurden bestätigt durch eine Studie von Goeke, im Zuge derer kariespathogene Bakterien von Probanden isoliert, quantifiziert und hinsichtlich ihrer Empfindlichkeit gegenüber AMPs getestet wurden. Hier wurde festgestellt, dass signifikante Zusammenhänge bestehen zwischen gegenüber AMPs resistenten Bakterienstämmen und dem Karies-Aktivitäts-Index sowie dem DMFT-Wert der Probanden (Goeke *et al.*, 2018). Ermittelt wurde die Resistenz von Stämmen von *Lactobacillus spp.*, *S. mutans* sowie *A. naeslundii*. Des Weiteren wurde ein Zusammenhang zwischen der Konzentration der AMPs LL37, HBD2, HNP1 und HNP3 und der Reduktion der oben erwähnten Keime ermittelt. Verschiedene Konzentrationen zeigten eine höhere Reduktionsrate bei AMP-Konzentrationen von 5  $\mu\text{g/ml}$  im Vergleich zu 0,5  $\mu\text{g/ml}$  (Univariate ANOVA,  $p < 0,0001$ ,  $n_2 = 0,147$ ). Diese Ergebnisse bestätigen die Hypothese, dass AMPs einen wichtigen Beitrag zur

Reduktion von kariespathogenen Keimen leisten und dass ein Mangel an Interventionsmöglichkeiten durch AMPs zu einem erhöhten Kariesrisiko führt.

## **2. Fragestellung und Studienziele**

Ziel dieser Arbeit war es, Versuchsansätze zu finden, die ein erfolgreiches Weiterarbeiten in der Erforschung der Immununterstützung durch Zellen der Mundschleimhaut bei der Kariesbekämpfung ermöglichen. Dafür wurde ermittelt, ob kariespathogene Wildtypen von *S. mutans*, oder deren isolierte Oberflächenproteine in Zellen von Gingiva und Parodont eine Expression von Entzündungsmarkern und AMPs induzieren.

Bei den ausgewählten Keimen handelt es sich um Stämme von *S. mutans*, die in einer Studie von Goeke von Probanden mittels Speichelprobe entnommen und mittels MALDI-TOF-Verfahren analysiert und spezifiziert wurden (Goeke *et al.*, 2018).

In verschiedenen Versuchen wurde die Reaktion von HGF-Zellen und HPDLF-Zellen nach Inkubation mit einigen dieser isolierten Stämme von *S. mutans*, oder mit deren Oberflächenproteinen untersucht. Dabei wurde die Initiation einer Immunreaktion durch Messung der Expression und der intrazellulären Konzentration von Interleukin-6 (IL-6) überprüft. Auch die intrazelluläre Synthese von I $\kappa$ B $\alpha$ , welches die Immunantwort im Zytosol initiiert, indem es sich von NF $\kappa$ B löst und dieses dadurch aktiviert, wurde gemessen. Des Weiteren wurde untersucht, ob die Zellen, angeregt durch die Anwesenheit der Erreger, das Defensin HBD2 und das Cathelicidin LL37 exprimieren. Ob eine Unterstützung der Immunreaktion stattfindet, wurde durch Messung der Synthese von PGE<sub>2</sub> im Medium überprüft.

### 3. Material und Methoden

Um Ergebnisse über die Expression von Entzündungsmarkern und AMPs durch Zellen in Anwesenheit von Streptokokkenstämmen zu erhalten, wurden Co-Kulturen aus HGF-Zellen und HPDLF-Zellen zusammen mit den Keimen angelegt. Untersucht wurde die Abgabe von IL-6, PGE<sub>2</sub>, LL37 und HBD2 an das Medium. Zur Abklärung, ob durch Oberflächenproteine von neutralisierten Streptokokkenstämmen eine Immunreaktion initiiert wird, wurden Co-Kulturen aus HGF-Zellen zusammen mit durch Schallhomogenisierung neutralisierten Keimen angelegt. Ermittelt wurde die Abgabe von IL-6 an das Medium, sowie die Konzentration von IκBα in den Zellen. Die unterschiedlichen Arbeitsschritte, die für diese Arbeit und deren Auswertung notwendig waren, zeigt Abbildung 6 im Überblick:

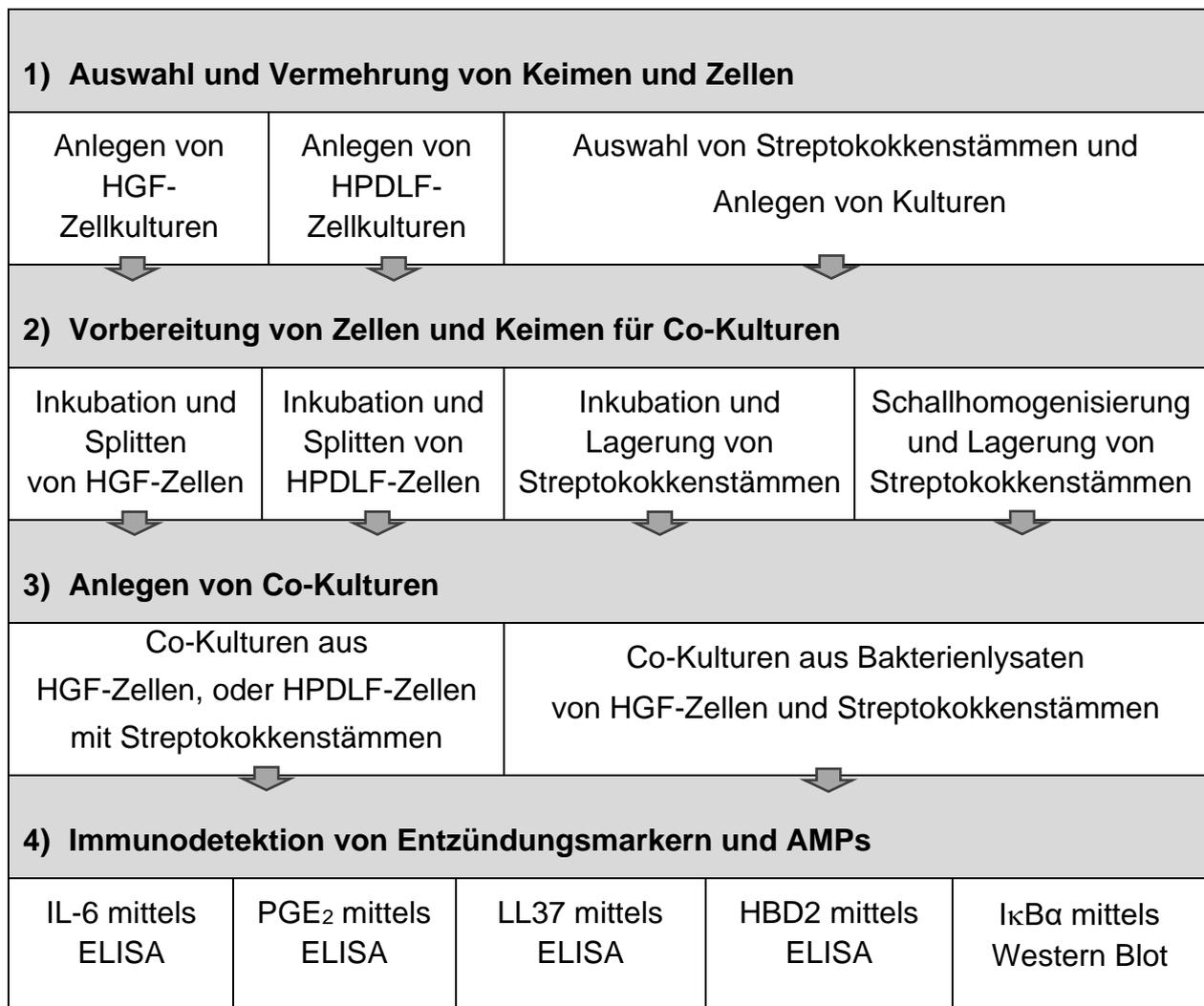


Abbildung 6: aufgelistet sind die Arbeitsschritte, die für die Versuchsdurchführungen notwendig waren. Teilschritte in einer Zeile wurden teilweise zeitgleich ausgeführt

### 3.1. Vorbereitung von Zellen und Keimen

#### 3.1.1. Anlegen von Zellkulturen

Bei den ausgewählten Zellen handelte es sich um Human-Gingiva-Fibroblast-Cells (HGF-Zellen) und Human-Periodontal-Ligament-Fibroblast-Cells (HPDLF-Zellen). Die HGF-Zellen wurden bei der Firma ATCC (Wesel, Deutschland) bestellt. Die Zelllinie mit der Bezeichnung HGF-1 (ATCC® CRL-2014™) stammt von einem 28-jährigen Mann kaukasischen Ursprungs. Primäre HPDLF-Zellen wurden bei der Firma Lonza (Basel, Schweiz) bestellt.

Für das Anzüchten der Zellen wurden Kulturflaschen (Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland) mit einem Fassungsvermögen von 250 ml verwendet. Das verwendete Nährmedium bestand aus einem fertigen  $\alpha$ -MEM- Medium (1X) + GlutaMAX™-I (Thermo Fisher, Dreieich, Deutschland), dem 10% Fetales Bovines Serum (FBS) (Merck, Darmstadt, Deutschland) und eine Antibiotikallösung von 100 U/ml Penicillin und 100  $\mu$ g/ml Streptomycin (100/100 P/S) (Merck) zugesetzt waren. Pro Kulturflasche wurden 20 ml Medium zugegeben. Die Inkubation erfolgte bei 37,0°C und 5,0% CO<sub>2</sub>.

#### 3.1.2. Vermehrung der Zellkulturen durch Splitten

Um genügend Zellen für die Co-Kulturen zu erhalten, wurden sie durch Inkubation vermehrt und bei Bedarf auf mehrere Kulturflaschen aufgesplittet. Um Verunreinigungen zu vermeiden wurden die meisten Tätigkeiten in einer Holten-Reinraum-Werkbank (Thermo Fisher) durchgeführt. Nach Arbeitsschritten außerhalb der Werkbank wurden die benötigten Reagenzien und Materialien mit einer Wischdesinfektion desinfiziert.

Für das Splitten wurde das Medium aus den Kulturflaschen mittels Vakuumpumpe abgesaugt. Der am Boden haftende Zellrasen wurde mit je 5 ml einer Phosphatgepufferten Salzlösung (PBS) (Merck) mit einer elektrischen Pipette gespült.

Um die Zellen vom Boden der Kulturflaschen zu trennen, wurden je 2 ml einer Trypsin-EDTA-Lösung (Lonza) pro Flasche hinzupipettiert. Trypsin-EDTA bewirkt eine Destabilisierung der Membranproteine, die für die Aufrechterhaltung des Zellverbands zuständig sind und führt letztendlich zur Ablösung der Zellen (Gstraunthaler *et al.*, 2013). Um alle Zellen zu benetzen wurde die Kulturflasche leicht geschwenkt. Dann erfolgte die Inkubation bei 37°C für vier Minuten. Die Lagerungszeit wurde begrenzt,

um eine Schwächung, oder Zerstörung der Zellen durch das Trypsin bei zu langer Inkubation zu vermeiden.

Um ein sicheres Lösen der Zellen vom Boden der Kulturflaschen zu gewährleisten, wurde seitlich mehrmals gegen die Flasche geklopft. Zur optischen Überprüfung der vollständigen Ablösung der Zellen wurde der Boden der durchsichtigen Kulturflasche mit einem Axiovert-40C-Lichtmikroskop (Zeiss, Oberkochen, Deutschland) betrachtet. Langgestreckte Zellen lassen auf am Boden haftende Zellen schließen, kugelige, sich im Medium bewegende Zellen bestätigen deren Ablösung von der Oberfläche.

Zur Inaktivierung der Trypsin-EDTA-Lösung wurden pro Flasche jeweils 2 ml des Zellkulturmediums hinzupipettiert. Die Proteine des darin enthaltenen FBS inaktivieren das Trypsin und binden das EDTA.

Der Flascheninhalt wurde in ein 15 ml-Falkon-Röhrchen (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) pipettiert und bei 300 x g für 5 Minuten in einer Tischzentrifuge (Beckman Coulter, Brea, Kalifornien, USA) zentrifugiert. Der entstandene Überstand wurde mittels Vakuumpumpe abgesaugt. Die am Boden des Röhrchens verbliebenen Zellen wurden mit 4 ml des Zellkulturmediums mittels vorsichtiger Pumpbewegungen gelöst.

In neue Kulturflaschen wurde je 1 ml der gelösten Zellen pipettiert und 19 ml des Zellkulturmediums zugegeben. Die Kulturflaschen wurden beschriftet bei 37°C und 5,0% CO<sub>2</sub> inkubiert

### 3.1.3. Auswahl und Anzucht von Streptokokkenstämmen

Bei den verwendeten Keimen handelte es sich um Proben von kariespathogenen Streptokokkenstämmen, die in einer Studie von Goeke ausgewählten Patienten entnommen und spezifiziert worden waren (Goeke *et al.*, 2018).

Von den Streptokokkenstämmen wurden nach mehreren Anzuchtversuchen Stämme ausgewählt, bei denen eine gute Vermehrung auf den Agarplatten ersichtlich war. Für die Ermittlung von IL-6, PGE<sub>2</sub>, LL37 und HBD2 nach Inkubation mit lebenden Keimen wurden die Stämme S17, S37 und S70 verwendet. Der Nachweis von IκBα im Zytosol nach Inkubation mit Lysaten der Erreger erfolgte mit den Keimen S17, S39, S60, S70, S97 und S101. Als zusätzlicher Kontrollkeim wurde *Streptococcus sobrinus* DSM 20381 (DSMZ, Braunschweig, Deutschland) ausgewählt. Des Weiteren fungierte der Entzündungsmediator TNFα als Positivprobe. Angezüchtet wurden die Streptokokken

in jeweils zwei Petrischalen (Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland) mit Plattenmedien aus Columbia-Agar (Becton Dickinson). Sie wurden für 48 h bei 37°C und 60% Luftfeuchtigkeit inkubiert. Bis zur Verwendung folgte die Lagerung im Kühlschrank bei 7°C.

### 3.2. Anlegen von Co-Kulturen

Für das Anlegen einer Co-Kultur mit Bakterien oder Bakterienlysaten wurden in Kulturflaschen gezüchtete HGF-Zellen und HPDLF-Zellen nach dem oben beschriebenen Prinzip aufgesplittet. Das Wachstum der Zellen wurde visuell mit einem Axiovert-40C-Lichtmikroskop (Zeiss) überprüft. Bei ausreichender Anzahl wurde der Inhalt einer Kulturflasche auf je eine 6-Well-Kulturplatte (Greiner bio-one) gleichmäßig verteilt. Abbildung 7 zeigt eine 6-Well-Kulturplatte mit Medium, in die bereits Versuchsansätze pipettiert wurden.

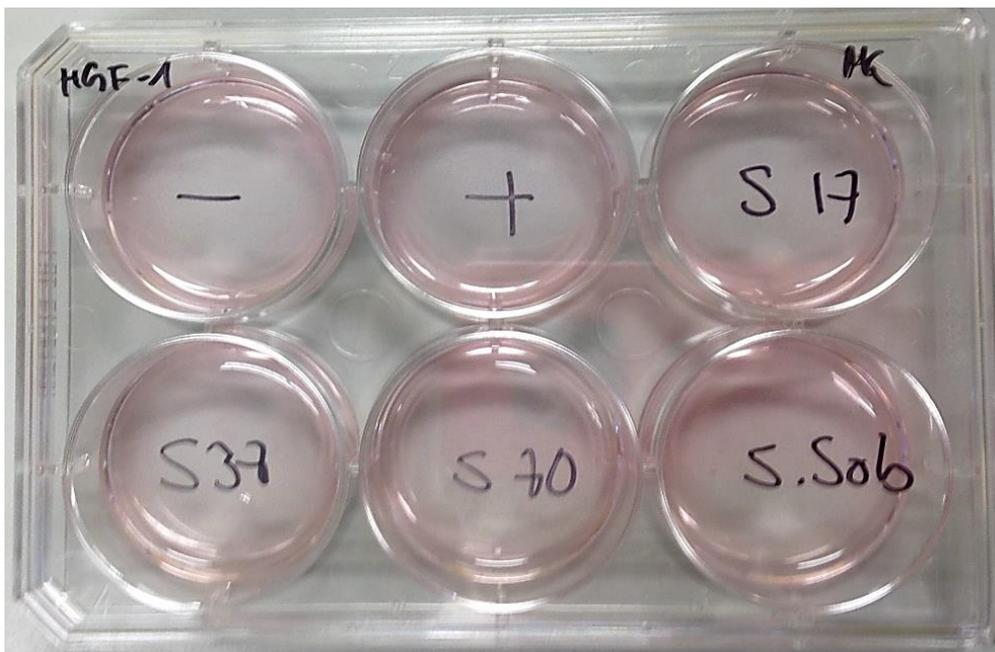


Abbildung 7: Co-Kultur aus Medium mit HGF-Zellen mit aufpipettierten Proben. Die Beschriftung über den Fächern beschreibt die Probe, links oben wird die Zellart angegeben. Rechts oben sind die Initialen des Versuchsverantwortlichen

Streptokokkenstämme wurden mit einer Impföse von den Agarplatten entnommen und in 300 µl PBS (Merck) resuspendiert. Nach kurzem Vortexen wurden jeweils 50 µl einer Probe in die vorbereiteten Wells mit HGF-Zellen oder HPDLF Zellen gegeben. Ein Well für die Negativprobe blieb unpipettiert, der Mediator TNFα wurde in das Well

der Positivprobe pipettiert. Anschließend erfolgte die Inkubation der Kulturplatte in einem Brutschrank.

Co-Kulturen mit Streptokokkenlysaten wurden nach dem gleichen Prinzip angelegt. Anstelle von Bakterien wurden 50 µl von deren Lysaten auf die Wells der Kulturplatten pipettiert und bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Die Inkubationsdauer der Co-Kulturen variierte zwischen einem und drei Tagen, bei einer Temperatur von 37°C. Das Medium bestand aus Alpha Mem-Medium (Gibco) und wurde ergänzt mit 10% FBS (Merck). Die Menge variierte je nach Versuch zwischen 1 und 2 ml. Bei einigen Co-Kulturen wurde dem Medium 100/100 P/S (Merck) zugefügt

### 3.3. Herstellung von Bakterienlysaten mittels Schallhomogenisierung

Um die Schallhomogenisierung durchzuführen wurden die Bakterien in Flüssigkulturen in einem beschrifteten Falconröhrchen (Eppendorf) zusammen mit 5 ml Trypticase Soy Broth (TSYB) angelegt. Dafür wurden sie von einer Kulturplatte mit einer Impföse entnommen, in dem Falconröhrchen resuspendiert und gevortext. Anschließend erfolgte die Lagerung für 24 h bei 23°C auf einem Orbital-Shaker (Thermo Fisher). Bis zur Weiterverwendung wurden die Flüssigkulturen im Kühlschrank bei 7°C aufbewahrt.

Für die Schallhomogenisierung wurden die Flüssigkulturen 5 min bei 1500 x g mit einer Tischzentrifuge zentrifugiert (Beckman Coulter). Der Überstand wurde abgekippt und den am Boden verbliebenen Keimen 1 ml Natriumchlorid (NaCl) hinzugefügt. Der Inhalt wurde mit Pipette durch Pumpbewegungen resuspendiert und in ein 2 ml Eppendorfgefäß (Eppendorf) pipettiert. In diesem Gefäß erfolgte die Zerstörung der Keimwände mittels Ultraschall.

Der Versuchsaufbau für die Schallhomogenisierung der Bakterien ist in Abbildung 8 ersichtlich. Er wurde bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Mikrospitze eines Ultraschallhomogenisators (Bandelin Electronic, Berlin, Deutschland) wurde in das 2 ml Eppendorfgefäß mit den gelösten Keimen getaucht. Diese wurden durch Aktivierung des Ultraschalls zerstört. Zur Arretierung der Schallspitze in einer festen Position innerhalb der Flüssigkeit des Eppendorfgefäßes wurde der Griff der umgedrehten Spitze an einer Haltevorrichtung mit Einmalpinzetten fixiert. Zur Vermeidung einer Denaturierung der Bakterienproteine ab einer Temperatur von 50°C erfolgte die Schallhomogenisierung unter Kühlung mit Eis, in welches das Eppendorfgefäß platziert wurde. Dafür wurde ein bis zum Rand mit Eis gefülltes

Becherglas ( $V = 1 \text{ l}$ ) verwendet. Diese Menge an Kühlmittel war vonnöten, um ein zu schnelles Aufwärmen und Schmelzen des Eises wegen der Ultraschallschwingungen und der Raumtemperatur zu verhindern. Eine Verunreinigung der Probe durch Schmelzwasser wurde mithilfe einer Kofferdam-Membran verhindert, die auf die Eisfläche gelegt war. Das Ende des Eppendorfgefäßes ragte über eine kleine gestanzte Perforation in der Membran in die darunterliegende Eisfläche.



*Abbildung 8: Versuchsaufbau der Schallhomogenisierung: Zu sehen sind das Ultraschallgerät mit seiner Bedienungseinheit im Hintergrund und der an einer Haltevorrichtung fixierte schwarze Griff der Schallspitze. Das aktive metallene Ende der Schallspitze ragt in das Eppendorfgefäß. Dieses steckt in der perforierten Kofferdam-Membran und ragt so in das Eis im Becherglas darunter*

Um eine ausreichende Zerstörung der Bakterienwände ohne eine Denaturierung der Proteine zu bewirken, wurden in mehreren Versuchen die optimalen Parameter der Versuchsdurchführung ermittelt. Dabei wurden Gesamtdauer, Dauer der Impulse, Dauer der Pausen, und Versuche mit und ohne Eis variiert. Letztendlich wurde bei maximaler Amplitude die Schallhomogenisierung insgesamt 60 min, bei stets aufeinanderfolgenden 30 s Puls und 60 s Pause durchgeführt.

Eine Denaturierung der Proteine durch Überhitzung wurde vermieden, indem eine Höchsttemperatur der Flüssigkeit im Gefäß von 40°C festgesetzt und mit einem digitalen Thermometer alle 5 Minuten während der gesamten Versuchsdauer überprüft wurde. Tabelle 10 (Kapitel 4.2.) veranschaulicht die Ergebnisse der Temperaturmessung über den Zeitraum einer Stunde. Zur Entfernung der restlichen vollständigen Bakterien wurde das Bakterienlysat bei 10.000 x g mit einer Tischzentrifuge (Beckman Coulter) für 20 min zentrifugiert und der Überstand abpipettiert.

Die Konzentration der vorhandenen Bakterienproteine wurde mit dem Bio-Rad Protein Assay Kit I # 5000001 (Bio-Rad Laboratories, Herkules, Kalifornien, USA) nach dem Prinzip von Bradford (Bradford, 1976) ermittelt (siehe Kapitel 3.7.4). Mit den Lysaten wurden nach dem oben beschriebenen Prinzip (Kapitel 3.2.) Co-Kulturen mit HGF-Zellen für 24 Stunden angelegt.

#### 3.4. Vorbereitung der Immunodetektion

Für die Ermittlung der durch HGF-Zellen und HPDLF-Zellen exprimierten Proteine wurde der Überstand der Co-Kulturen abpipettiert und für weitere Versuche zur Untersuchung der Expression von IL-6, PGE<sub>2</sub>, LL37 und HBD2 bei -20°C eingefroren.

Der am Boden der Wells haftende Zellrasen wurde verwendet, um zu überprüfen, ob intrazellulär Proteine synthetisiert wurden. Die Zellen wurden mit 1 ml PBS (Merck) gespült, nach Zugabe von 700 µl PBS mit einem Kunststoffspatel (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) vorsichtig gelöst und in ein 2 ml Eppendorfgefäß pipettiert.

Nach 4-minütiger Zentrifugation bei 400 x g in einer Tischzentrifuge (Beckman Coulter) wurde der Überstand abpipettiert und die Röhrchen auf Eis gestellt.

Für die Extraktion der zytosolischen Proteine wurde das System Nuclear Cytoplasmic Extraction Reagents (Thermo Fisher) verwendet. Der Vorgang erfolgte nach Angaben des Herstellers.

Dem für die Lyse notwendigen Lysepuffer Cytoplasmic Extraction Reagent 1 wurde ein Protease-Inhibitor-Cocktail im Verhältnis 1:100 beigemischt. Davon wurden in die Eppendorfgefäße je 100 µl zusammen mit den Zellen pipettiert und mit 10-maligen Pumpbewegungen und Vortexen für 10 Sekunden resuspendiert.

Nach 10-minütiger Lagerung auf Eis folgte die Beimischung von 5,5 µl / 100 µl des Lysepuffers Cytoplasmic Extraction Reagent 2. Nach kurzem Vortexen erfolgte eine Zentrifugation der Röhrchen bei maximaler Beschleunigung für 5 min. Der Überstand mit den Proteinen wurde in ein neues Röhrchen pipettiert, für die weitere Verwendung beschriftet und bei -20°C eingefroren.

### 3.5. Immunodetektion von IL-6, LL37, HBD2 und PGE<sub>2</sub>

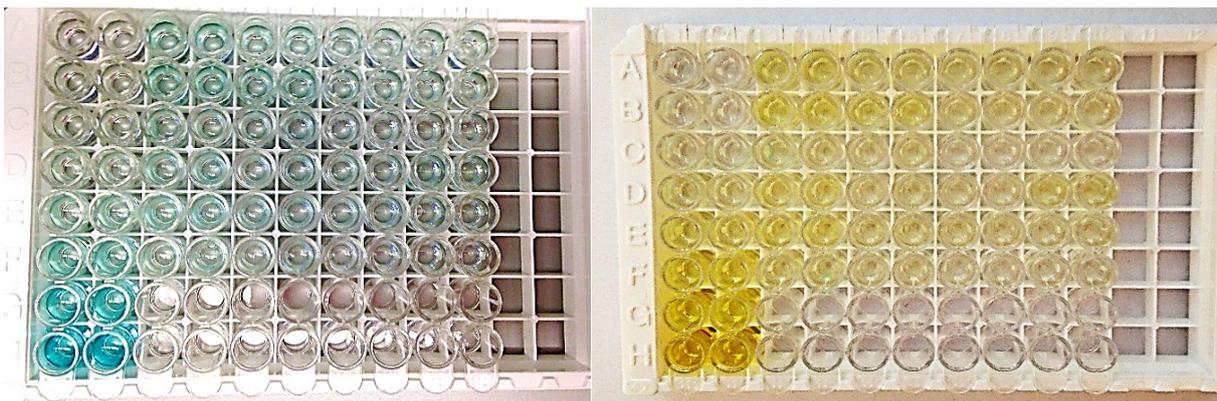
Zur Ermittlung der Expression von IL-6, LL37 und HBD2 und der Synthese von PGE<sub>2</sub> bei Co-Kulturen mit Zellen und Bakterien wurden insgesamt 33 Versuchsreihen durchgeführt. Sie sind unterteilt in Versuche, die mit HGF-Zellen durchgeführt wurden, Versuche, die mit HPDLF-Zellen durchgeführt wurden und Versuche, bei denen in das Medium der Co-Kultur Streptomycin/Penicillin beigemischt war oder nicht. Um einen besseren Überblick zu erhalten sind Art und Anzahl der Versuche in Tabelle 1 dargestellt.

Anzahl der Immunodetektionen mittels ELISA oder EIA				
	gesamt	HGF + AB	HGF - AB	HPDLF - AB
IL-6	7	3	2	2
LL37	9		5	4
HBD2	7		4	3
PGE <sub>2</sub>	10	1	5	4

*Tabelle 1: Anzahl der Immunodetektionen. Die Spalten unterscheiden sich nach Versuchen mit HGF- oder HPDLF-Zellen und nach Versuchen mit und ohne Antibiotikum (AB) im Medium. In der ersten Spalte ist die Gesamtzahl der Versuchsreihen angegeben*

### 3.5.1. „Sandwich-ELISA“

Für die Messung der extrazellulären Expression von IL-6, HBD2 und LL37 wurden Enzyme-Linked Immunosorbent Assays (ELISA) verwendet, die nach dem Prinzip des „Sandwich-ELISA“ funktionieren. Hierbei binden die zu ermittelnden Substanzen, die als Antigen fungieren, an vorbehandelten Microtiter-Well-Platten, die mit passenden Primärantikörpern beschichtet wurden. Das an den Antikörper gebundene Antigen bindet dann an einen weiteren Antikörper, den sogenannten Sekundärantikörper. Von der Position der als Antigen fungierenden gesuchten Substanz zwischen den beiden Antikörpern leitet sich der Ausdruck „Sandwich-ELISA“ ab. Der Sekundärantikörper ist mit einem Substrat konjugiert, das eine enzymatische Farbreaktion katalysiert. Abbildung 9 zeigt beispielhaft einen „Sandwich-ELISA“-Test zur Ermittlung von IL-6 vor und nach der enzymatischen Farbreaktion. Je stärker die Farbreaktion ausfällt, umso höher ist die Konzentration der gesuchten Substanz. Misst man die optische Dichte der Lösungen, kann man so die genaue Konzentration ermitteln. In dieser Arbeit wurde diese mithilfe einer Excel-Tabelle ausgewertet. Die mit den Standards erhaltenen Messpunkte wurden in einem Diagramm dargestellt. An diese Messpunkte (Konzentration; optische Dichte) wurde je nach Herstellerangaben und Verlauf eine Ausgleichsgerade oder eine Exponentialfunktion mit Excel angepasst. Über diese Kalibrierung wurden zu gemessenen optischen Dichten die entsprechenden Konzentrationen berechnet.



*Abbildung 9: 96-Microtiter-Well-Platte mit „Sandwich-ELISA“ zur Ermittlung von IL-6. Das linke Bild zeigt die blaugefärbten Wells vor der Farbreaktion, das rechte die endgültige Färbung für die Messung der optischen Dichte. Die vertikalen Reihen 1 und 2 stellen in doppelter Ausführung die Standardkonzentrationen dar, in den Reihen 3-10 befinden sich die Proben, ebenfalls in doppelter Ausführung*

### 3.5.2. Vorbereitung der Immunodetektion von IL-6, LL37 und HBD2

Die Ermittlung der extrazellulären Expression bei Co-Kulturen von Zellen und Streptokokkenstämmen erfolgte für IL-6 mithilfe des ELISA-Kits von R&D-Systems (R&D-Systems, Minneapolis, Minnesota, USA). Bei LL37 wurde der Human ELISA-Kit (Hycult Biotech, Udden, Niederlande) verwendet. Der Nachweis für HBD2 erfolgte mithilfe des Human Defensin Beta 2 (DEFB2) ELISA-Kit (BioSource, San Diego, USA).

Die Versuche wurden nach den Vorgaben des jeweiligen Herstellers durchgeführt. Notwendige Reagenzien und Proben wurden vor den Versuchen stets 30 Minuten auf Raumtemperatur aufgewärmt. Bei den drei Versuchen wurde eine mit den entsprechenden Primärantikörpern beschichtete 96-Microtiter-Well-Platte verwendet. Die Pipettierung erfolgte stets für jede Probe in doppelter Ausführung, die Mengen der Reagenzien variierten je nach Herstellerangabe.

Die in den Versuchskits enthaltenen konzentrierten Waschpuffer wurden mit destilliertem Wasser verdünnt. Die Puffer wurden verwendet für die Neutralisation der Wells zwischen den einzelnen Versuchsschritten sowie für die Herstellung der aufsteigenden Standardkonzentrationen. Bei IL-6 wurden die Pufferlösungen im Verhältnis 1:25 verdünnt. Für LL37 wurde Puffer A im Verhältnis 1:10 und Puffer B im Verhältnis 1:20 verdünnt. Anschließend wurden beide im Verhältnis 1:1 vermischt. Der Puffer für HBD2 wurde im Verhältnis 1:20 verdünnt.

Für die Erstellung der Standardlösungen wurde für IL-6 der Human-IL-6-Standard in 5 ml Calibrator Diluent RD5T gelöst so, dass eine Konzentration von 300 pg/ml entstand und 15 Minuten stehen gelassen. Danach wurde die Lösung für die restlichen Standards mit Calibrator Diluent RD5T weiter verdünnt. Bei LL37 wurde das Standardpulver mit der notwendigen Menge an Waschpuffer verdünnt auf eine Konzentration von 100 ng/ml und daraus die Standardlösungen erstellt. Bei HBD2 wurden fertige Standardlösungen verwendet. Tabelle 2 zeigt die verschiedenen Standardlösungen für IL-6, LL37 und HBD2.

Aufsteigende Konzentrationen der verschiedenen Standardlösungen								
IL-6 [pg/ml]	0	3,13	6,25	12,5	25	50	100	300
LL37 [ng/ml]	0	0,1	0,4	1,2	3,7	11	33	100
HBD2 [pg/ml]	0	15,6	31,25	62,5	125	250	500	

*Tabelle 2: Konzentrationen der Standardlösungen von IL-6, LL37 und HBD2*

Für den Nachweis von IL-6 wurden die Proben für eine bessere Anpassung an die optische Dichte der Standards verdünnt, entweder im Verhältnis 1:10 oder 1:20 mit Calibrator Diluent RD5T. Bei der späteren Auswertung der Ergebnisse wurde diese Verdünnung berücksichtigt und einberechnet.

Zur Vorbereitung für die Ermittlung von LL37 wurde das Tracer-Solution-Pulver mit den Sekundärantikörpern in 1 ml destilliertem Wasser gelöst und mit 11 ml Waschpuffer verdünnt. Die für die Bindung des Farbsubstrats notwendige Streptavidinperoxidase wurde im Verhältnis 1:100 mit destilliertem Wasser angemischt.

Vor dem Versuch von HBD2 wurden die Standardlösungen und das Meerrettich-Peroxidase-Konjugat für 1-2 Sekunden zentrifugiert. Weitere notwendige Reagenzien für die Versuche waren pipettierfertig vorhanden.

### 3.5.3. Immunodetektion von IL-6, LL37 und HBD2

Proben und Standardlösungen wurden in die mit den entsprechenden Antikörpern beschichteten Wells nach dem oben dargestellten Schema pipettiert. Für den Versuch von IL-6 und LL37 jeweils 100 µl. Für den Versuch zur Ermittlung von HBD2 wurden 50 µl der Proben und Standardlösungen pipettiert und direkt im Anschluss 100 µl des Konjugats von Sekundärantikörper und Meerrettichperoxidase.

Um eine gute Bindung der Antigene an die Antikörper auf den Platten zu gewährleisten, wurden die Platten mit einer adhäsiven Folie bedeckt und gelagert. Die Platten für IL-6 und LL37 ruhten bei Raumtemperatur, IL-6 zwei Stunden, LL37 eine Stunde. Die Platte für HBD2 wurde bei 37°C für eine Stunde inkubiert.

Für eine Entfernung der restlichen Proteine und Substanzen wurden die Platten nach Ablauf der Zeit über einem Spülbecken abgekippt und mit dem Waschpuffer gewaschen. Dafür wurde der Puffer einzeln in die Wells pipettiert und erneut abgekippt.

Anschließend wurden die Platten auf sterilen Einmalhandtüchern ausgeklopft und evtl. verbliebene Reste mit einer Pipette abgesaugt. Die Menge an Waschpuffer betrug bei den Versuchen für IL-6 und HBDs 300 µl, bei den Versuchen für LL37 200 µl. Der Vorgang wurde insgesamt jeweils viermal durchgeführt.

Im nächsten Schritt wurden bei dem Versuch für LL37 100 µl Sekundärantikörper, bei dem Versuch für IL-6 200 µl eines Konjugats aus Sekundärantikörper und dem Reaktionsenzym, einer Meerrettichperoxidase, hinzupipettiert. Um eine Bindung an die Antigene zu erreichen wurden die Platten mit einer adhäsiven Folie bedeckt und für IL-6 zwei Stunden, für LL37 eine Stunde bei Raumtemperatur gelagert. Danach folgte der viermalige Waschvorgang nach oben beschriebem Schema.

Die Zuführung von 100 µl Streptavidin-Peroxidase als Reaktionsenzym erfolgte für LL37 in einem weiteren Zwischenschritt mit gleicher Lagerung und Waschung, wie in den vorherigen Schritten.

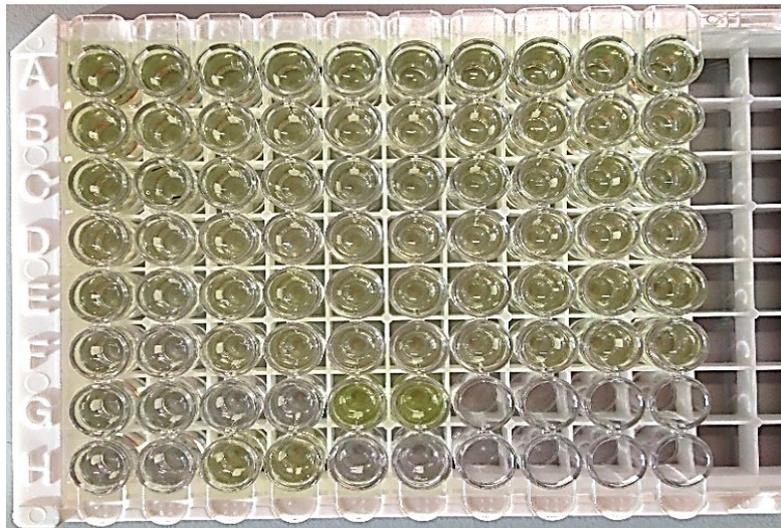
Im Anschluss erfolgte bei allen drei Versuchsarten die Zuführung des Chromogens in Form von Tetramethylbenzidine, welches in Verbindung mit Peroxidase eine Blaufärbung annimmt. Für IL-6 wurden Color Reagent A und B im Verhältnis 1:1 gemischt und jeweils 200 µl aufpipettiert. Für LL37 wurden 100 µl des Chromogens aufpipettiert. Bei HBD2 wurden hintereinander 100 µl des Reaktionsenzym und der Chromogenlösung aufpipettiert. Da das Tetramethylbenzidin lichtempfindlich ist, erfolgte die anschließende Lagerung lichtgeschützt unter einer Aluminiumfolie. Die Platten für IL-6 wurden 20 Minuten gelagert, die für LL37 30 Minuten, beide bei Raumtemperatur. Die Platten für die Ermittlung von HBD2 wurden bei 37°C für 15 Minuten inkubiert.

Für das Beenden der Reaktion wurde eine Stopperlösung mit Schwefelsäure in die Wells pipettiert, was einen Farbumschlag von blau zu gelb bewirkte. Bei den Versuchen mit IL-6 und HBD2 wurden 50 µl zupipettiert, bei LL37 100 µl. Danach erfolgte bei allen Versuchen die Messung der optischen Dichte der Flüssigkeiten in den Wells der Platten bei 450 nm mit dem Varioskan multiplate reader (Thermo Fisher).

### 3.6. EIA-Immunoassay zum Nachweis von PGE<sub>2</sub>

Mittels kompetitivem-EIA-Test wurde die Konzentration von PGE<sub>2</sub> im Medium der Co-Kulturen nach 3-tägiger Inkubation ermittelt. Der Unterschied zu den „Sandwich-

ELISA“-Tests besteht darin, dass das Konjugat für die Farbreaktion nicht an die gesuchte Substanz bindet, sondern an alle noch unbesetzten Bindestellen. So erfolgt die Farbreaktion, anhand derer die optische Dichte gemessen werden kann nur dort, wo das gesuchte Antigen, in diesem Fall  $\text{PGE}_2$ , nicht vorhanden ist. Bei der Auswertung muss mit einberechnet werden, dass das Verhältnis zwischen der Konzentration der gesuchten Substanz und der Signalstärke, also der gemessenen optischen Dichte, umgekehrt proportional ist. Abbildung 10 zeigt ein typisches Bild eines Versuchs zur Ermittlung von  $\text{PGE}_2$ .



*Abbildung 10: Kompetitiver EIA-Test zur Messung von  $\text{PGE}_2$ . Die Stärke der optischen Dichte ist umgekehrt proportional zu der Konzentration von  $\text{PGE}_2$ . Der sich mit zunehmender Konzentration abschwächende Farbverlauf von oben nach unten ist in den ersten beiden Spalten der Standardfächer ersichtlich.*

Die Synthese von  $\text{PGE}_2$  bei Co-Kulturen von Zellen und Keimen wurde in insgesamt zehn Versuchen mithilfe des  $\text{PGE}_2$  High Sensitivity ELISA-Kit (Enzo Life Sciences, Lausen, Schweiz) ermittelt. Die Versuche wurden nach den Vorgaben des Herstellers durchgeführt. Notwendige Reagenzien und Proben wurden vor den Versuchen 30 Minuten auf Raumtemperatur aufgewärmt. Bei den drei Versuchen wurde eine mit den entsprechenden Primärantikörpern beschichtete 96-Microtiter-Well-Platte verwendet. Die Pipettierung erfolgte stets für jede Probe in doppelter Ausführung, die Mengen der Reagenzien variierten je nach Herstellerangabe. Zur Kalibrierung wurde eine Standard-Verdünnungsreihe hergestellt. Tabelle 3 zeigt die aufsteigenden Konzentrationen.

Konzentrationen der Standards [pg/ml]							
0	7,81	15,63	62,5	125	250	500	1000

*Tabelle 3: Konzentrationen der Standardlösungen für die Ermittlung von PGE<sub>2</sub>*

Von den Standard-Konzentrationen wurden je 100 µl in die ersten beiden Spalten pipettiert. Daneben wurden ebenfalls paarweise 100 µl der Proben, die im Verhältnis 1:20 mit Zellkulturmedium verdünnt waren, pipettiert. Die Verdünnung wurde bei der späteren Berechnung der Konzentration berücksichtigt

Um die enzymatische Aktivität des enzymkonjugierten kompetitiven Antikörpers zu messen, dienten je zwei Fächer, in denen die Total Activity (TA) gemessen wurde. Dort wurden je 50 µl von blauem Conjugat und PGE<sub>2</sub>-Antikörper hinzupipettiert.

Zwei Non-Specific Binding-Fächer (NSB), die für die Subtraktion unspezifischer Bindungen des konjugierten Enzyms verwendet werden, wurden mit 50 µl eines vorher im Verhältnis 1:19 gemischten Waschpuffers gefüllt.

Zwei Wells wurden ungefüllt belassen. Sie dienten dazu, die optische Dichte von Flüssigkeit und Kunststoff der Microtiter-Well-Platte von der ermittelten optischen Dichte zu subtrahieren.

In alle Fächer, abgesehen von TA und Blank, wurden je 50 µl von blauem Konjugat aus einer alkalinen Phosphatase und dem kompetitiven PGE<sub>2</sub> pipettiert. Danach folgten je 50 µl von monoklonalen PGE<sub>2</sub>-Antikörpern in jedes Well, ausgenommen die Wells für TA, Blank und NSB. Um eine vollständige Bindung zu gewährleisten, wurde die Platte mit einer adhäsiven Folie bedeckt und bei 4°C auf einem Orbital-Shaker (Thermo Fisher) für 24 Stunden gelagert.

Es folgte ein dreimaliger Waschvorgang mit je 300 µl Waschpuffer durch Zugabe und Abschütten des Puffers. Nach dem letzten Waschgang wurde die Platte auf sterilisierten Einmaltüchern ausgeklopft. Noch in den Wells vorhandene Reste wurden abpipettiert.

In das TA-Well wurden 50 µl blaues Konjugat gegeben, danach wurden je 200 µl para-Nitrophenolphosphat-substrat (pNpp-Substrat) in jedes Well pipettiert. Für die Umwandlung von pNpp in gelbes p-Nitrophenol durch die alkalische Phosphatase wurde die Platte mit einer adhäsiven Folie bedeckt und bei 37°C für eine Stunde inkubiert. Zum Beenden der Reaktion folgte die Zugabe von je 50 µl Stop Solution in jedes Well. Direkt im Anschluss wurde die optische Dichte der Lösungen mit einem

Varioskan multiplate reader (Thermo Fisher) bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen.

### 3.7. Western Blot zum Nachweis von I $\kappa$ B $\alpha$

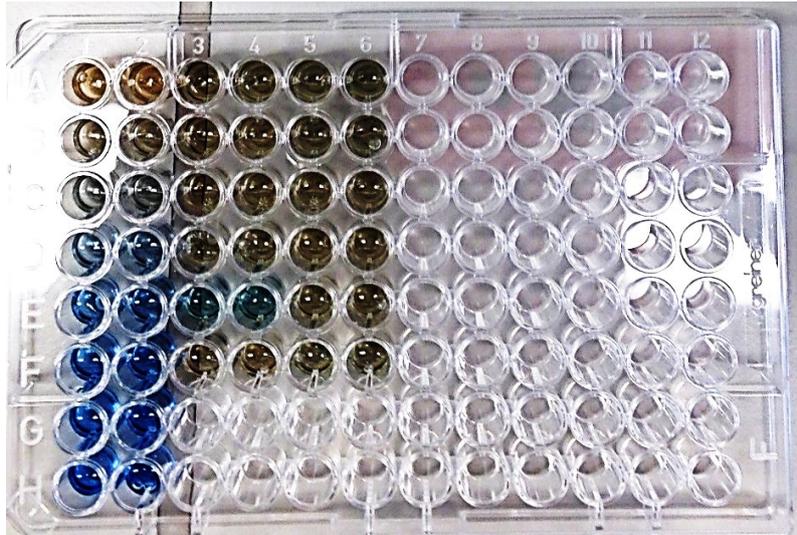
Die Überprüfung der intrazellulären Abgabe von COX-II und I $\kappa$ B $\alpha$  durch HGF-Zellen nach Inkubation mit Lysaten von kariespathogenen Streptokokken erfolgte mittels Western Blot. Hierbei werden Proteine durch eine Gelelektrophorese getrennt und mittels Transfer Blot auf eine Membran übertragen, wo sie dann mithilfe von Chemolumineszenz sichtbar gemacht werden können.

Die Konzentrationsbestimmung der Proteine zur Berechnung der für den Western Blot benötigten Menge an Probenflüssigkeit erfolgte mittels Bradford Assay (Bradford, 1976). Es wurde der Quick-Start™ Protein Assay (Bio-Rad) mit fertigen Standardlösungen verwendet. In 2 ml Eppendorf-Röhrchen (Eppendorf) wurden je 245  $\mu$ l Dye Reagent mit 5  $\mu$ l der einzelnen Proben und Standards und einmal NaCl als untersten Standard pipettiert. Die Konzentrationswerte der Standardlösungen sind in Tabelle 4 dargestellt.

Konzentrationen der Standards [mg/ml]							
0	0,125	0,25	0,5	0,75	1	1,5	2

*Tabelle 4: Konzentrationen der Standardlösungen für den Bradford Assay*

Die Reagenzien wurden kurz gevortext und jeweils 100  $\mu$ l auf eine 96-Microtiter-Well-Platte (Greiner bio-one) in doppelter Ausführung pipettiert. Abbildung 11 zeigt so eine 96-Microtiter-Well-Platte mit einem Bradford Assay. Nach 5-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur erfolgte die photometrische Auswertung mit dem Varioskan multiplate reader (Thermo Fisher) bei einer Wellenlänge von 650 nm. Um aus den gemessenen Extinktionswerten die für die anschließende Gelelektrophorese richtige Verdünnung der Proben zu ermitteln, erfolgte die Berechnung der notwendigen Verdünnungsmittel anhand einer Excel-Tabelle. So konnten die Mengen an H<sub>2</sub>O und Ladepuffer eruiert werden. Die Proben, das H<sub>2</sub>O und der Ladepuffer wurden in 2 ml Eppendorf-Röhrchen (Eppendorf) pipettiert und zur Denaturierung der Proteine bei 95°C für 5 min bei 500 Umdrehungen pro Minute in einem Eppendorf ThermoMixer C (Eppendorf) geschwenkt.



*Abbildung 11: Bradford Assay mit doppelter Standard-Reihe in Reihe 1 und 2 und doppelten Reihen von Proben in Reihe 3-6. Mit Zunahme der Proteinkonzentration verstärkt sich die Blaufärbung*

Die anschließende Gelelektrophorese dient der Aufspaltung der Proteine durch ein elektrisches Feld. Dafür werden sie in einem Gel, das als Trägermatrix fungiert, durch das Anlegen einer Spannung in eine Richtung bewegt. Je nach Eigenschaften der unterschiedlichen Proteine, wie Ladung, Größe und Struktur wandern sie eine für sie typische Strecke und können so spezifiziert werden. Damit ein kontinuierlicher Stromfluss von Kathode zu Anode besteht, befindet sich die Trägermatrix in einer mit einem Laufpuffer aufgefüllten Kammer. Abbildung 12 zeigt die Kammer einer Gelelektrophorese.

In der durchgeführten Gelelektrophorese wurde als Trägermatrix ein 12%-iges Tris-Glycin-Polyacrylamid-Gel (Bio-Rad) verwendet. Als Laufpuffer diente ein Tris-Glycin-SDS-Puffer (s. Anhang Rezepte). Als Ladepuffer wurden 4,5  $\mu\text{l}$  des selbst hergestellten 4-fach konzentrierten Tris-Glycin-Puffers, auch Laemmli-Puffer genannt, verwendet (s. Anhang Rezepte). Die Gelelektrophorese fand in einem auf 4°C abgekühlten Raum statt. Proben und Standardlösung wurden vorsichtig in einzelne, in das Gel eingelassene und mit einer Ziffer gekennzeichnete Kammern pipettiert. Von einem Standardgemisch (Bio-Rad) wurden 7  $\mu\text{l}$  in die dritte Kammer, von den Proteingemischen jeweils 12  $\mu\text{l}$  in die folgenden Kammern pipettiert. Tabelle 5 beschreibt die Reihenfolge der Pipettierung. Eine kontinuierliche Spannung von 180 V wurde für 40 min angelegt.

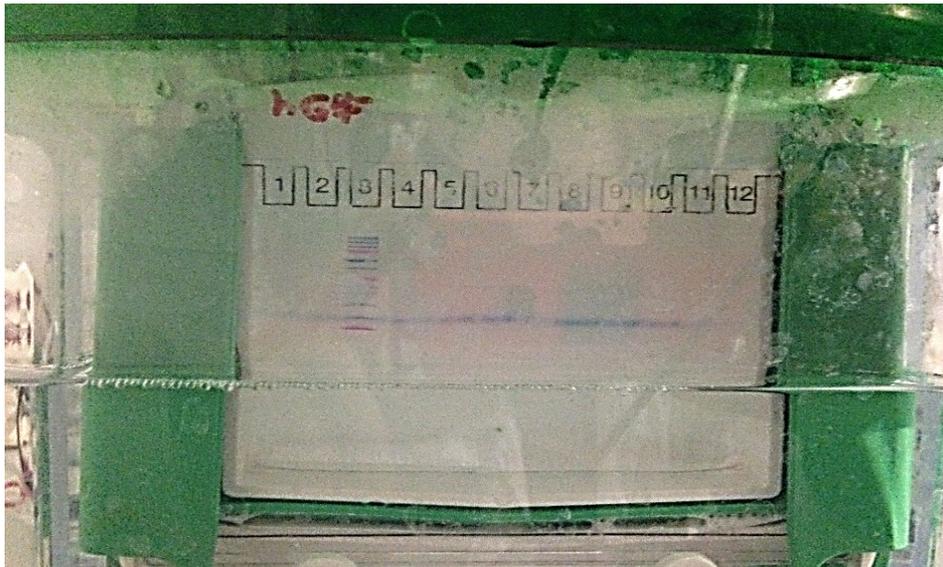


Abbildung 12: Gelelektrophorese kurz vor Ende der Laufzeit. Die bezziferten Fächer zeigen die einzelnen Kammern des Gels, in die Standard und Proben einzeln pipettiert wurden. Bei den Linien in Fach drei handelt es sich um die Aufspaltung der Standardprobe, die durchgezogene blaue Linie weiter unten bildet die Lauffront der Proteine

Reihenfolge der Pipettierung in Geltaschen bei der Gelelektrophorese								
Standard	-	TNF $\alpha$	S17	S39	S60	S70	S97	S101

Tabelle 5: Pipettierreihenfolge der Proben bei der Gelelektrophorese für den Western Blot

Bei dem danach folgenden Western Blot wurden die zu detektierenden Proteine von der Trägermatrix auf eine Membran übertragen, um sie dort mithilfe von Antikörpern, an denen Enzymkonjugate haften, mittels Chemolumineszenz detektieren zu können. Abbildung 13 zeigt den schematischen Aufbau der Kammer, in der ein Transfer Blot durchgeführt wird. Für die Übertragung werden Trägermatrix und Membran eng aneinanderliegend zwischen schützenden Papiermembranen und Schwämmen fixiert und in einen Transferpuffer getaucht. Wie bei der vorherigen Gelelektrophorese wird durch Anlegen einer Spannung eine Wanderung der Proteine bewirkt, in diesem Fall weg von dem Trägergel, in Richtung Anode, und somit auf die Membran.

Als Transferpuffer wurde ein Towbin-Puffer mit 20 Volumenprozent Methanol verwendet (s. Anhang Rezepte). Der Transfer erfolgte jeweils von der Trägermatrix auf eine PVDF-Membran, die vorher in Methanollösung aktiviert wurde. Die Dauer des Transfers betrug 40 min bei einer konstanten Stromstärke von 200 mA bei 4°C.

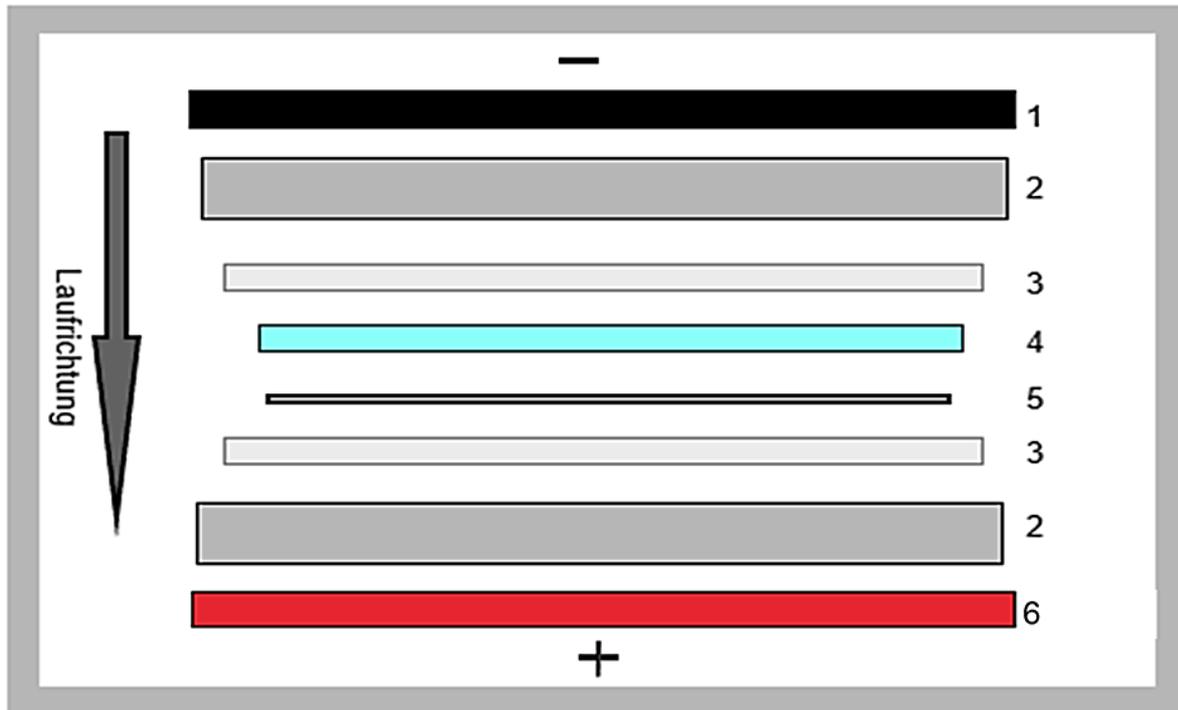


Abbildung 13: Kammer für den Transfer Blot. Querschnitt von oben. Die Kammer ist mit Laufpuffer gefüllt. Die Schichten sind fest zusammengepresst, werden aber zum besseren Verständnis getrennt aufgezeichnet. Zwischen den Schlitten (1,6) befinden sich die Schwämme (2), die Papiermembranen (3), sowie das Gel (4), von welchem die Proteine in Richtung Anode auf die PVDF-Membran (5) wandern (selbst erstellte Darstellung)

Die anschließende Proteindetektion erfolgte ähnlich wie bei dem in Kapitel 3.5.1 beschriebenen „Sandwich-ELISA“-Prinzip. Auch hier wurde mithilfe von Konjugaten von Antikörpern und Meerrettichperoxidase, sowie einer Luminol-Enhancer-Lösung eine Detektion mittels Chemolumineszenz durchgeführt.

Zur Neutralisierung des Methanols wurden die Membranen des Transfer Blots einmal in TBS-T gewaschen und die Waschlösung abgekippt. Zur Blockierung von unspezifischen Antikörpern wurde eine TBS-T-Lösung mit 3% BSA dazugegeben. Die Membranen in Lösung wurden für 60 min auf dem Orbital-Shaker (Thermo Fisher) geschwenkt.

Die Primärantikörper wurden in TBS-T-Lösung mit 3% BSA gelöst. Für ein Verhältnis von Antikörpern zu BSA-Lösung von 1:1000 wurden 5 µl Antikörper in 5 ml BS-Lösung gegeben. Die Membranen wurden einzeln jeweils in einer solchen Lösung für 24 Stunden auf dem Orbital-Shaker (Thermo Fisher) bei 4°C geschwenkt.

Nach dieser Zeit wurde die Lösung abgegossen und die Membranen in TBS-T dreimal 5 Minuten geschwenkt und erneut abgegossen. Die Sekundärantikörper wurden in 5%-igem Magermilchpulver gelöst und in dem Verhältnis 1:1000 in TBS-T verdünnt.

Für die Reaktion wurden die Membranen in einer 1:1 gemischten Luminol-Enhancer Peroxid-Solution (Thermo Fisher) vier Minuten geschwenkt.

Im Anschluss wurde jede Membran zwischen zwei Folien gelegt und die Lufteinschlüsse ausgewalzt. Die Auswertung der Bandenintensität erfolgte in einem Chemolumineszenz-Imager der Firma PEGLAB Biotechnologie (Erlangen, Deutschland) bei 285 nm.

## 4. Ergebnisse

Für einen besseren Gesamtüberblick folgt hier noch einmal die Aufzählung der verschiedenen Auswertungen:

Der erste Teil umfasst Reaktionen von HGF-Zellen und HPDLF-Zellen auf eine Inkubation mit *S. mutans*-Wildtypen. Hierzu werden nacheinander die gemessenen Konzentrationen von IL-6, PGE<sub>2</sub>, LL37 und HBD2 präsentiert. Bei diesen Versuchen handelt es sich um ELISA- und EIA-Tests.

Der zweite Teil demonstriert Ergebnisse zu Versuchen, bei denen HGF-Zellen mit den Oberflächenproteinen der *S. mutans*-Wildtypen inkubiert wurden. Hier werden zuerst Ergebnisse der Temperaturmessung bei der Schallhomogenisierung der Streptokokken aufgelistet, um zu zeigen, dass zwar eine Lyse der Keime, aber keine Denaturierung der Proteine stattfand.

Es folgen die Ergebnisse der Abgabe von IL-6 an das Medium, die mittels ELISA gemessen wurde. Zuletzt werden Abbildungen der mittels Chemolumineszenz sichtbar gemachten Menge von I $\kappa$ B $\alpha$  gezeigt, welches über einen Western Blot ermittelt wurde.

#### 4.1. Immunodetektion bei Co-Kulturen mit lebenden Streptokokkenstämmen

##### 4.1.1. Expression von IL-6

Zur Überprüfung, ob ausgewählte Streptokokkenstämmen in HGF-Zellen oder HPDLF-Zellen eine Immunreaktion aktivieren, wurde die Expression von IL-6 mittels ELISA ermittelt. Es wurden insgesamt sieben Versuche durchgeführt. Bei drei Versuchen mit HGF-Zellen war dem Medium der Co-Kultur zusätzlich Antibiotikum (P/S = 100/100) beigemischt.

Die gemessenen Konzentrationen von IL-6 sind Tabelle 6 zu entnehmen. Die graphische Darstellung dieser Werte ist in Abbildung 14 zu sehen. Sie verdeutlicht einen ähnlichen Trend der Werte trotz Unterschieden in der Konzentration insgesamt.

<b>Keimprobe</b>	<b>IL-6 aus HGF-Zellen mit AB (n=3) Mittelwert ± SD [pg/ml]</b>	<b>IL-6 aus HGF-Zellen ohne AB (n=2) Mittelwert ± SD [pg/ml]</b>	<b>IL-6 aus HPDLF-Zellen ohne AB (n=2) Mittelwert ± SD [pg/ml]</b>
<b>Negativprobe</b>	30 ± 21	221 ± 29	156 ± 6
<b>TNF<math>\alpha</math> [50U/<math>\mu</math>l]</b>	91 ± 19	320 ± 70	153 ± 8
<b>S17</b>	35 ± 13	180 ± 50	64,0 ± 2,4
<b>S37</b>	36 ± 15	240 ± 100	170 ± 50
<b>S70</b>	43 ± 13	260 ± 100	148 ± 7
<b>S. sobrinus</b>	39 ± 17	190 ± 70	74 ± 5

*Tabelle 6: Mittelwerte mit Standardabweichung (SD) der Konzentrationen von IL-6. Die Spalten 1 und 2 zeigen die Konzentrationen nach Inkubation von HGF-Zellen mit und ohne Antibiotikum (AB) im Medium. Die dritte Spalte zeigt die Konzentration nach Inkubation von HPDLF-Zellen ohne Antibiotikum im Medium*

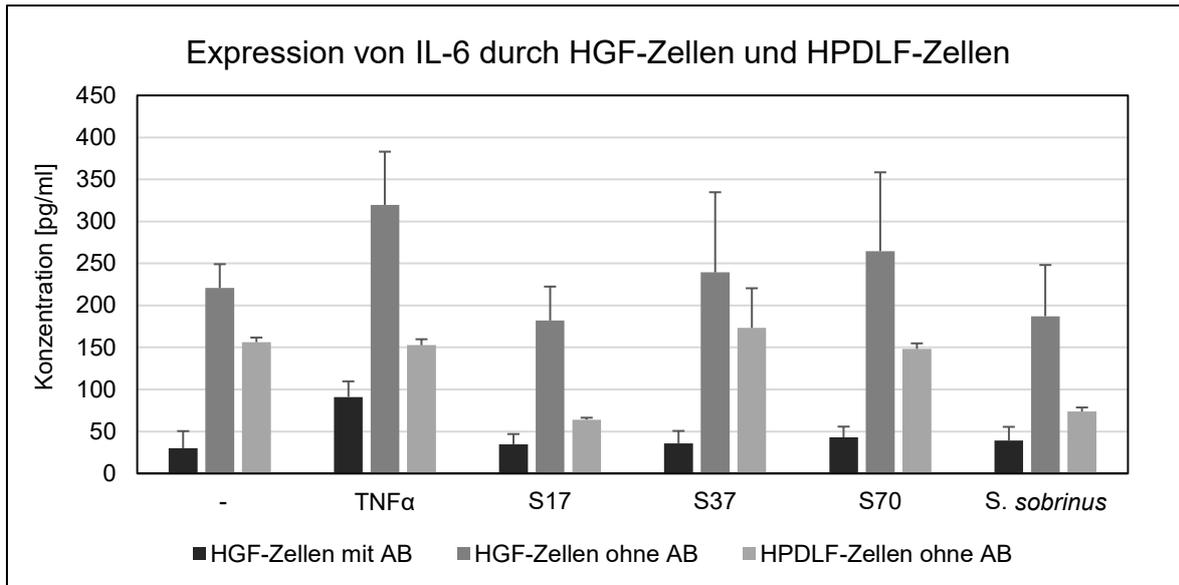


Abbildung 14: Mittelwerte der Konzentrationen von IL-6 mit Standardabweichung. Die Datenreihen zeigen die Expression bei Inkubation von HGF-Zellen mit und ohne Antibiotikum (AB), sowie von HPDLF-Zellen ohne Antibiotikum im Medium

#### 4.1.2. Synthese von PGE<sub>2</sub>

Um zu eruieren, ob die Anwesenheit von kariespathogenen Streptokokkenstämmen an HGF-Zellen oder HPDLF-Zellen Immunreaktionen induziert, wurde die Abgabe von PGE<sub>2</sub> an das Medium der Co-Kulturen mittels EIA gemessen.

Tabelle 7 zeigt die Konzentrationen von durch HGF-Zellen und HPDLF-Zellen freigesetztem PGE<sub>2</sub>. Beide Zellformen waren ohne Antibiotikum (P/S = 100/100) inkubiert worden. Bei einem einzelnen Versuch mit Antibiotikum sind die Werte ca. um das 10- bis 100-fache höher als die der anderen Versuche.

Keimprobe	PGE <sub>2</sub> aus HGF-Zellen mit AB (n=1) [pg/ml]	PGE <sub>2</sub> aus HGF-Zellen ohne AB (n=5) Mittelwert ± SD [pg/ml]	PGE <sub>2</sub> aus HPDLF-Zellen ohne AB (n=4) Mittelwert ± SD [pg/ml]
Negativprobe	1901	127 ± 7	120 ± 29
TNF $\alpha$	3103	115 ± 26	92 ± 28
S17	615	110 ± 40	103 ± 25
S37	469	140 ± 50	130 ± 18
S70	182	90 ± 40	110 ± 40
<i>S. sobrinus</i>	15411	210 ± 120	164 ± 27

Tabelle 7: Konzentrationen von PGE<sub>2</sub> bei Versuchen ohne Beimengung von Antibiotikum (AB) im Vergleich mit einem Versuch mit Antibiotikum

Abbildung 15 zeigt die Konzentrationen von PGE<sub>2</sub> bei Co-Kulturen bestehend aus HGF-Zellen oder HPDLF-Zellen zusammen mit Streptokokkenstämmen. Die Balken entsprechen den Werten von Tabelle 7 Spalte 2 und 3. Dem Medium der Co-Kulturen wurde kein Antibiotikum hinzugefügt. Es wurden mit HGF-Zellen fünf Versuche durchgeführt, mit HPDLF-Zellen vier.

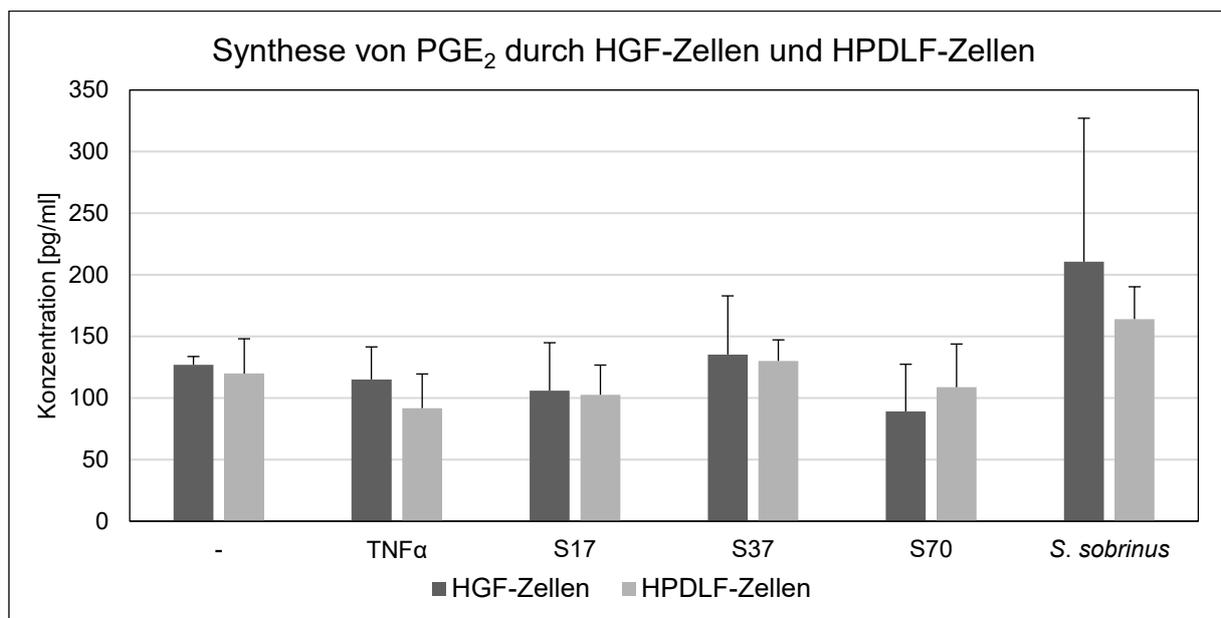


Abbildung 15: Mittelwerte mit Standardabweichung der Konzentrationen von PGE<sub>2</sub>, synthetisiert durch HGF-Zellen und HPDLF-Zellen

#### 4.1.3. Expression von LL37

Um zu eruieren, ob die Anwesenheit von kariespathogenen Streptokokkenstämmen bei HGF-Zellen und HPDLF-Zellen eine direkte Immunantwort durch Freisetzung von AMPs induzieren, wurde die Expression von LL37 mittels ELISA ermittelt.

Abbildung 16 veranschaulicht die Mittelwerte der Konzentrationen von LL37 mit Standardabweichung. Fünf Versuche wurden mit HGF-Zellen durchgeführt, vier mit HPDLF-Zellen. Tabelle 8 zeigt die Ergebnisse in Tabellenform.

Keimprobe	LL37 aus HGF-Zellen (n=5) Mittelwert $\pm$ SD [ng/ml]	LL37 aus HPDLF-Zellen (n=4) Mittelwert $\pm$ SD [ng/ml]
Negativprobe	0,54 $\pm$ 0,09	0,52 $\pm$ 0,05
TNF $\alpha$ [50 U/ $\mu$ l]	0,62 $\pm$ 0,13	0,51 $\pm$ 0,04
S17	0,54 $\pm$ 0,06	0,50 $\pm$ 0,04
S37	0,50 $\pm$ 0,23	0,49 $\pm$ 0,03
S70	0,57 $\pm$ 0,09	0,49 $\pm$ 0,03
<i>S. sobrinus</i>	0,52 $\pm$ 0,05	0,41 $\pm$ 0,09

Tabelle 8: Konzentrationen der Expression von LL37 durch HGF-Zellen und HPDLF-Zellen

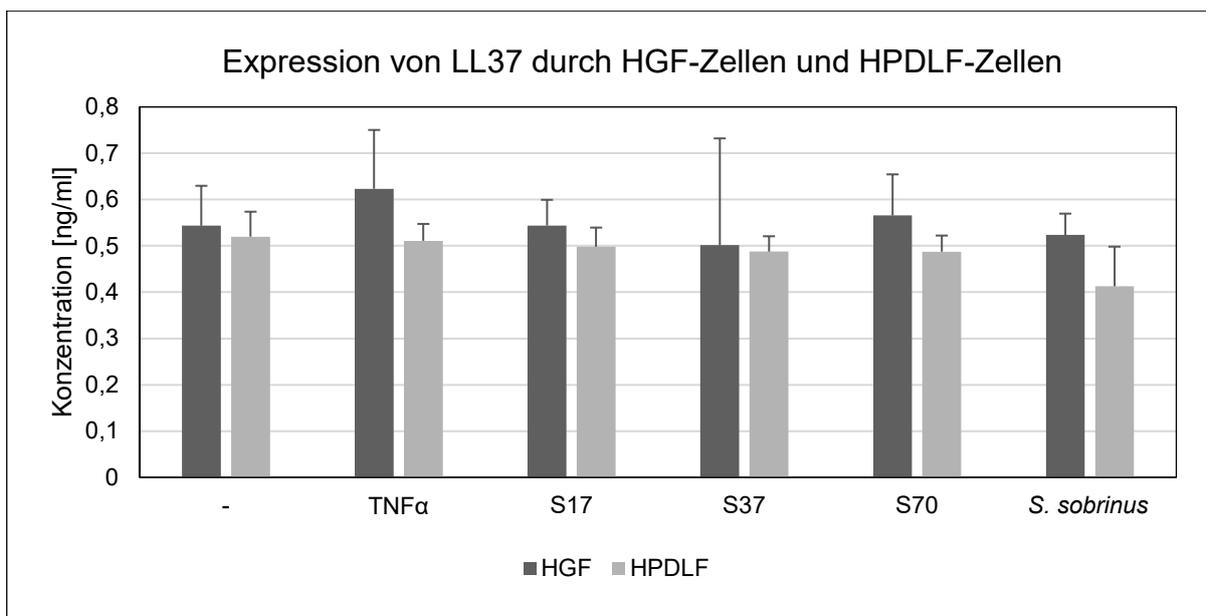


Abbildung 16: Mittelwerte mit Standardabweichung der Konzentrationen von LL37, exprimiert von HGF-Zellen und HPDLF-Zellen.

#### 4.1.4. Expression von HBD2

Um zu eruieren, ob die Anwesenheit von kariespathogenen Streptokokkenstämmen bei HGF-Zellen und HPDLF-Zellen eine direkte Immunantwort durch Freisetzung von AMPs induzieren, wurde die Expression von HBD2 mittels ELISA ermittelt. Tabelle 9 zeigt die Mittelwerte der Konzentrationen von HBD2 mit Standardabweichung, Abbildung 17 zeigt die gemessenen Konzentrationen noch einmal in Diagrammform. Vier Versuche wurden mit HGF-Zellen durchgeführt, drei mit HPDLF-Zellen.

Keimprobe	HBD2 aus HGF-Zellen (n=4) Mittelwert $\pm$ SD [pg/ml]	HBD2 aus HPDLF-Zellen (n=3) Mittelwert $\pm$ SD [pg/ml]
Negativprobe	13 $\pm$ 4	14,0 $\pm$ 2,3
TNF $\alpha$ [50 U/ $\mu$ l]	15,1 $\pm$ 2,6	12,9 $\pm$ 1,2
S17	14,0 $\pm$ 2,8	14,2 $\pm$ 1,9
S37	13,2 $\pm$ 1,6	12,8 $\pm$ 2,1
S70	14,6 $\pm$ 2,0	13,1 $\pm$ 1,5
<i>S. sobrinus</i>	12 $\pm$ 4	12,5 $\pm$ 1,5

Tabelle 9: Konzentrationen der Expression von HBD2 durch HGLF-Zellen und HPDLF-Zellen

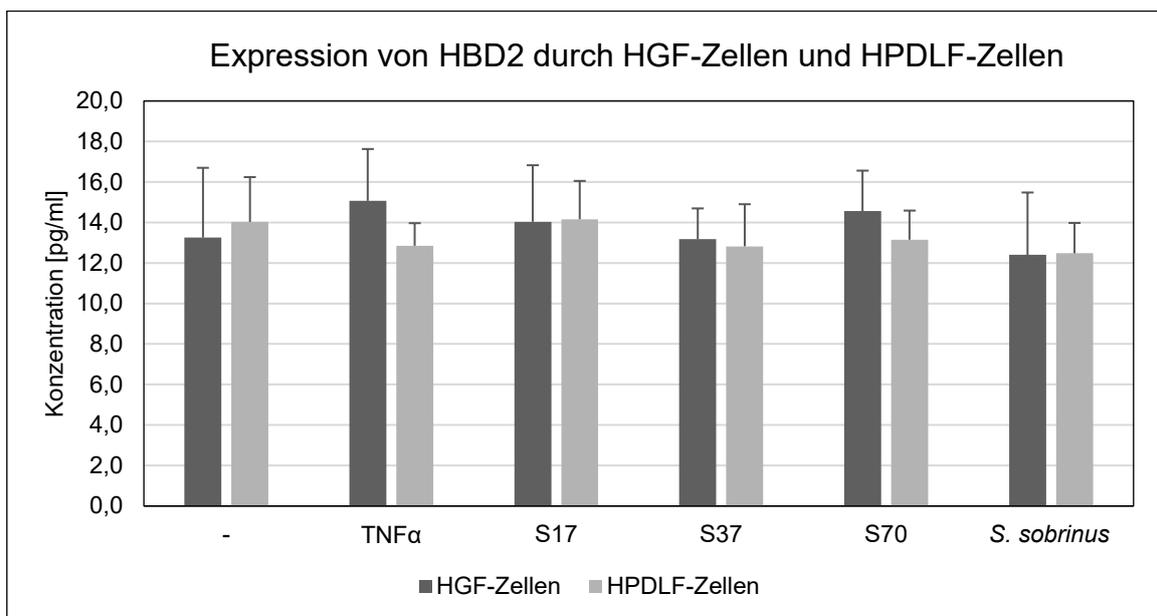


Abbildung 17: Mittelwerte mit Standardabweichung der Konzentrationen von HBD2, exprimiert von HGF-Zellen und HPDLF-Zellen

#### 4.2. Immunodetektion bei Co-Kulturen mit Lysaten von Streptokokkenstämmen

Ziel war es, zu ermitteln, ob lediglich die Oberflächenproteine von ausgewählten Wildtypen von *S. mutans* in einer Co-Kultur die Synthese und Expression von Entzündungsfaktoren durch HGF-Zellen initiieren. Dafür wurden im Medium die Konzentration von IL-6, sowie die intrazelluläre Konzentration von COX-II und I $\kappa$ B $\alpha$  gemessen.

Tabelle 10 zeigt die innerhalb einer Stunde in 5-Minuten-Intervallen gemessenen Temperaturwerte der Flüssigkeit, in welcher Streptokokken durch Schallhomogenisierung zerstört wurden. Diese Messungen wurden durchgeführt, um zu gewährleisten, dass die Höhe der Temperatur, bei welcher eine Denaturierung von Proteinen erfolgt, nicht überschritten wurde. Eine Höchsttemperatur von 40°C wurde festgelegt. Mit einem Höchstwert von 35,5°C lagen die Werte stets darunter.

Zeit [min]	Temperatur [°C]	Zeit [min]	Temperatur [°C]
1	23,5	36	35,5
5	23,6	42	24,3
10	23,8	49	34,4
15	23,9	54	6,0
24	24,2	55	8,7
31	23,2	56	11,2

*Tabelle 10: Temperaturmessungen des Mediums mit Streptokokken während der Schallhomogenisierung*

##### 4.2.1. Expression von IL-6

Eine Zellkultur aus HGF-Zellen, die zusammen mit durch Schallhomogenisierung lysierten und damit inaktivierten Streptokokkenstämmen für 24 Stunden angelegt wurde, diente der Klärung, ob lediglich die Oberflächenproteine der Keime zu einer Induktion von IL-6 und damit zum Start einer Immunantwort führen. Tabelle 11 zeigt die Ergebnisse des Versuches.

Keimprobe	IL-6 aus HGF-Zellen (n=1) [pg/ml]
Negativprobe	2,5
TNF $\alpha$ [50 U/ $\mu$ l]	227
S17	2,6
S37	2,3
S70	3,1
<i>S. sobrinus</i>	1,8

Tabelle 11: Expression von IL-6 aus HGF-Zellen bei einer Co-Kultur mit schallhomogenisierten Streptokokkenstämmen

#### 4.2.2. I $\kappa$ B $\alpha$ im Zytosol

Für die Überprüfung einer intrazellulären Immunreaktion in HGF-Zellen nach Inkubation mit schallhomogenisierten Streptokokkenstämmen wurde das Vorhandensein von I $\kappa$ B $\alpha$  mittels Western Blot kontrolliert. Abbildung 18 bestätigt das Freiwerden von I $\kappa$ B $\alpha$ , mit Ausnahme der Negativprobe.

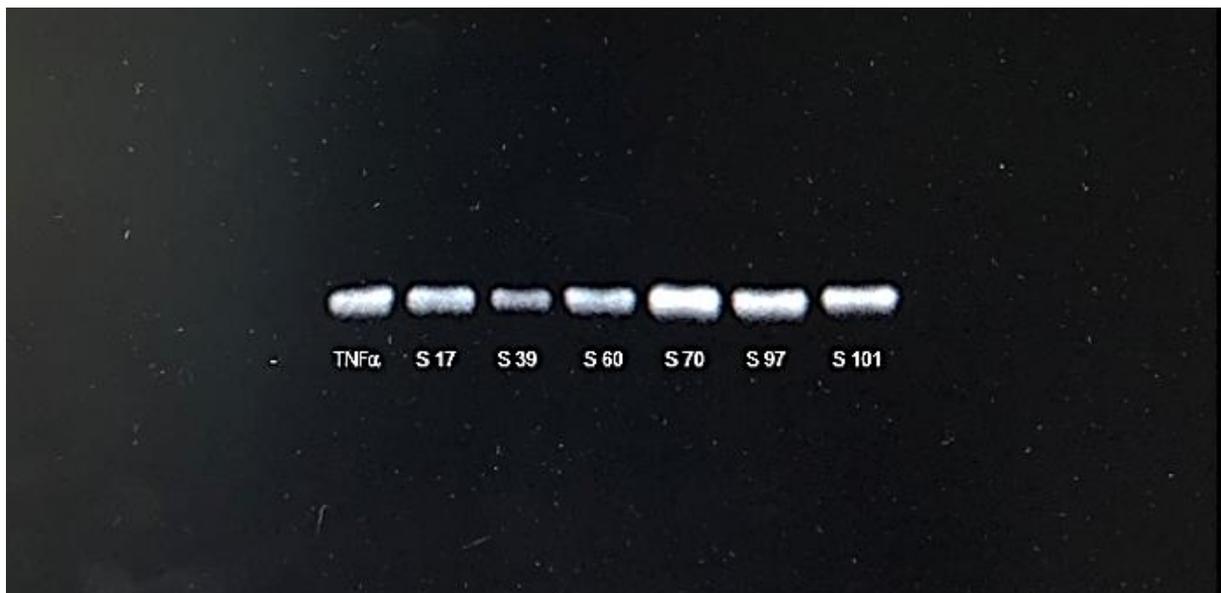


Abbildung 18: Beispielhafter Western Blot bei n=3. Sichtbar gemacht wurde das Freiwerden von I $\kappa$ B $\alpha$ . Die Versuchsansätze sind unter den Streifen benannt. Bei der Negativprobe (-) ist kein I $\kappa$ B $\alpha$  ersichtlich (ganz links).

## 5. Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es, Versuchsansätze zu finden, die ein erfolgreiches Weiterarbeiten in der Erforschung der immununterstützten Kariesprävention ermöglichen. Hierbei galt es zu ermitteln, ob bestimmte kariespathogene Wildtypen von *Streptococcus mutans* oder Oberflächenproteine dieser Keime eine immunaktivierende, oder immununterdrückende Wirkung auf Fibroblasten von Gingiva und Parodont haben.

Kriterien für die Auswahl der Streptokokkenstämme waren eine besondere Resistenz gegenüber AMPs, und die positive Korrelation mit einem erhöhten Kariesrisiko, die bei einer Studie von Goeke festgestellt worden war (Goeke *et al.*, 2018). *Streptococcus sobrinus* wurde als Kontrollkeim gewählt, da er ebenfalls an der Kariespathogenese beteiligt ist und, weil von diesem Keim immunmodulatorische Eigenschaften bekannt sind (Veiga-Malta *et al.*, 2004).

Bei den verwendeten Zellen handelt es sich um HGF-Zellen und HPDLF-Zellen, da sie als Teil der Epithelien der Mundschleimhaut unter den Bereich der äußeren Schutzbarriere fallen. Es wurde vermutet, dass diese Zellen HBD2 und LL37 ausschütten, da von verschiedenen Zellformen dieser Barriere über eine Expression dieser AMPs nach Infektionen berichtet wurde (Frohm Nilsson *et al.*, 1999, Liu *et al.*, 2013) und da sie aufgrund ihrer Nähe zum Zahn für eine schnelle Reaktion auf eine Karies geeignet wären. Bei den verwendeten HGF-Zellen ist zu bedenken, dass nicht bekannt ist, aus welcher Region der Gingiva sie entnommen wurden. Es bleibt also eine gewisse Unsicherheit darüber bestehen, in welcher Nähe von Zähnen diese Zellen gewachsen sind.

Für ein von äußeren Einflüssen ungestörtes Experimentieren wurden die Versuche in isolierten Zellkulturen durchgeführt. Hier gilt es zu beachten, dass Prozesse, die *in vitro* ablaufen, sich nicht zwingend wie *in vivo* verhalten, da in einem lebenden Organismus noch eine Reihe von weiteren Faktoren existieren, die Prozesse in Gang setzen oder stoppen können, insbesondere im Bereich der Immunologie. Die Zellkultur kann diese Abläufe nur in einem begrenzten Maß nachstellen, eignet sich jedoch gut, um Zusammenhänge zwischen einzelnen Mechanismen zu entdecken und abzugrenzen, oder gar auszuschließen.

Es wurde bei der Verwendung der Kulturen keine festgelegte Anzahl verwendet, sondern visuell mittels eines Mikroskops abgeschätzt, ob die Dichte des angezüchteten Zellrasens ausreichend ist. Daraus resultiert, dass sich Unterschiede in den Gesamtkonzentrationen der verschiedenen Versuchsreihen ergeben können. Bei einem Versuch für die Ermittlung von LL37 fielen die Werte der Expression für beide Zellformen insgesamt um ca. 2/3 höher als bei den übrigen Versuchen aus. Um den Verlauf des Trends sichtbarer zu machen, wurde der Wert vor Berechnung der Mittelwerte und Standardabweichungen mittels Dreisatzrechnung an den Wert der Negativprobe angeglichen. Die Darstellung der Mittelwerte nach dieser Skalierung ist in Abbildung 16 zu sehen und Tabelle 8 zu entnehmen.

Bei der Immunodetektion fiel die Auswahl hauptsächlich auf Enzyme-Linked Immunosorbent Assays, da sie eine genaue quantitative Konzentrationsbestimmung ermöglichen und zusätzlich ein schnelles und einfaches Handling ermöglichen. Für eine gute bildliche Darstellung der Ergebnisse wurde die intrazelluläre Konzentration von  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$  mit dem aufwändigeren Western Blot ermittelt. Im Gegensatz zu den ELISA-Tests ist hier eine genaue Quantifizierung allerdings nicht möglich.

Um eine größere Menge von Ansätzen zu erzeugen, wurden verschiedene Versuchsvariationen durchgeführt. Wiederholungen der einzelnen Versuche wurden bis zu fünf Mal durchgeführt, da in dieser Arbeit eher der Fokus darauf lag, Ergebnisse und Trends zu finden, deren weitere Erforschung empfehlenswert ist, als neue Fakten zu postulieren. Es wurde variiert zwischen Kulturen, die mit und ohne Antibiotikum (P/S=100/100) im Medium angelegt wurden, um so unterschiedliche Wachstumsbedingungen für die Keime zu schaffen. Des Weiteren wurde die Inkubationsdauer variiert. Da bei Versuchen mit HGF-Zellen und schallhomogenisierten Keimen eine sehr geringe Expression von IL-6 folgte, wurde bei den übrigen Versuchen nach 24 Stunden die Inkubationszeit auf 72 h erhöht. Auch Sakabe setzte nach mehreren Versuchsansätzen zur Expression von hCAP-18 aus Keratinozyten eine dreitägige Inkubationszeit fest. Bei einer Inkubationszeit von 6 h und 24 h war die Expression hier nicht ausreichend gewesen (Sakabe *et al.*, 2014).

Da TNF $\alpha$  ein guter Mediator für den Start von Immunreaktionen ist (Rassow *et al.*, 2008), wurde er als Positivprobe oder als weitere Kontrollprobe verwendet. Als guter Indikator erwies er sich bei der Messung von IL-6, wo er, wie in Abbildung 14 ersichtlich, bei HGF-Zellen eine starke Expression bewirkte. Sehr deutlich ist die

Reaktion auf TNF $\alpha$  in Tabelle 11 in den Ergebnissen zu den Kulturen aus schallhomogenisierten Keimen und HGF-Zellen ersichtlich, wo die Expression von IL-6 durch TNF $\alpha$  die der übrigen um das ca. 100-fache überstieg. Auch bei der Ermittlung von I $\kappa$ B $\alpha$  konnte TNF $\alpha$ , wie Abbildung 18 zeigt, sehr gut verwendet werden. Die Expression von LL37 und HBD2 durch TNF $\alpha$  zeigte, wie bei Abbildung 16 und 17 ersichtlich, sowohl bei HGF-Zellen als auch bei HPDLF-Zellen kaum Unterschiede zu den übrigen Versuchsansätzen. Die Synthese von PGE<sub>2</sub> fiel, wie in Abbildung 15 ersichtlich teilweise geringer aus. Aufgrund dessen wird der TNF $\alpha$  hier nicht als Positivprobe, sondern als weitere Kontrollprobe betrachtet.

Die Expression von IL-6 wurde gemessen, um zu eruieren, ob die ausgewählten Stämme von *S. mutans* in den Zellen eine Immunantwort initiieren, oder evtl. in der Lage sind, diese zu unterdrücken. Dafür wurden diverse Versuchsansätze durchgeführt. HGF-Zellen wurden mit oder ohne Antibiotikum im Medium inkubiert. Betrachtet man Abbildung 14, so fällt auf, dass die Werte der Expression von IL-6 bei Anwesenheit von Antibiotikum niedriger sind. HGF-Zellen exprimierten in Kulturen mit Antibiotikum (30  $\pm$  21) pg/ml bis (91  $\pm$  19) pg/ml. Im Gegensatz dazu lagen die Werte bei Kulturen ohne Zugabe von Antibiotikum bei (180  $\pm$  50) pg/ml bis (320  $\pm$  70) pg/ml. Diese Ergebnisse könnten darauf schließen lassen, dass das Antibiotikum die Freisetzung von IL-6 durch HGF-Zellen reduziert. Da Penicillin durch Hemmung der Zellwandsynthese die Keimzahl reduziert und Streptomycin durch die Anlagerung von fehlerhafter Transfer-RNA bei der Proteinsynthese bakterizid wirkt, wäre eine Erklärung, dass ein vermindertes Wachstum der Stämme in der Kultur die Induktion zur Expression von IL-6 reduziert. Dagegen spricht, dass alle Proben, einschließlich der Negativprobe und der TNF $\alpha$ -Probe, diesen Trend aufweisen. Es ist momentan von Penicillin und Streptomycin keine IL-6-Induktion-supprimierende Wirkung bekannt, sie ist jedoch auch nicht auszuschließen.

Die Werte der Kulturen mit HPDLF-Zellen ohne Antibiotikum bewegen sich dazwischen. Die grundsätzlich geringere Ausschüttung von IL-6 durch HPDLF-Zellen im Vergleich zu HGF-Zellen, wurde ebenfalls von Scheres festgestellt, nachdem Kulturen beider Zellformen teilweise ohne Zugabe, teilweise mit *Porphyromonas gingivalis*, oder aber mit dessen Lipopolisacchariden (LPS) inkubiert wurden (Scheres *et al.*, 2010). Genaue Angaben dieser Ergebnisse sind nicht möglich, da sie mithilfe eines Säulendiagramms dargestellt sind. Die Expressionswerte der Negativprobe

durch HGF-Zellen lagen bei ca. 150-170 pg/ml, bei den mit LPS von *P. gingivalis* inkubierten Zellen bei ca. 380 pg/ml. Die Expression durch HPDLF-Zellen fiel hier, ähnlich wie in unseren Versuchen mit ca. 70 pg/ml bei der Negativprobe und 110 pg/ml bei den mit LPS stimulierten, im Vergleich mit HGF-Zellen niedriger aus.

Yamamoto konnte, nachdem HPDLF-Zellen für 24 h mit *S. mutans* inkubiert wurden, eine IL-6-Expression von ca. 100 pg/ml messen (Yamamoto *et al.*, 2006). Damit bewegen sich seine Werte für die Expression von IL-6 durch HPDLF-Zellen in einem ähnlichen Bereich, wie die in Tabelle 6 dargestellten Expressionen dieser Arbeit, wo der niedrigste Mittelwert bei  $(64,0 \pm 2,4)$  pg/ml induziert durch S17 und der höchste bei  $(170 \pm 50)$  pg/ml induziert durch S37 liegt.

Betrachtet man die Wirkung durch einzelne Keime auf die Zellen, so fällt eine niedrige Expression von IL-6 bei Co-Kulturen ohne Antibiotikum mit *S. sobrinus* und dem Wildtyp S17 auf. Hier lagen die Werte stets weit unterhalb der Werte der Negativproben. Dies ist sowohl bei HGF-Zellen als auch bei HPDLF-Zellen der Fall. Ursache dafür könnte eine immunsuppressive Wirkung dieser beiden Keime sein. Schon Veiga-Malta konnte bestätigen, dass die Enolase von *S. sobrinus* zu einer Reduzierung der Immunantwort führt, unter anderem deshalb, weil sie die Freisetzung von IL-10 bewirkt, welches eine entzündungshemmende Wirkung hat (Veiga-Malta *et al.*, 2004). Für diese These spricht, dass sich die Expression von IL-6 in Kulturen mit Antibiotikum in einem normalen Bereich leicht oberhalb des Wertes der Negativprobe von  $(30 \pm 21)$  pg/ml befand (siehe Tabelle 6). Der Wert von S17 lag hier bei  $(35 \pm 13)$  pg/ml, der von *S. sobrinus* bei  $(39 \pm 17)$  pg/ml. Grund für die niedrigen Werte bei den Co-Kulturen mit Antibiotikum im Medium könnte sein, dass das Antibiotikum die Keimvermehrung hemmt und diese so nur reduziert eine immunaktivierende Wirkung entfalten können.

Eine weitere Erklärung wäre eine starke pathogene Wirkung durch S17 oder *S. sobrinus*, so dass dies zum Zelltod und einer Verminderung der Zellanzahl führen könnte, und damit eine geringere Expression von IL-6 möglich wäre. Dies würde die erhöhte Expression bei Versuchen mit Antibiotikum erklären, da eine größere Zellzahl überleben und die Synthese von IL-6 starten könnte. Bei beiden Überlegungen wären diese beiden Stämme besonders pathologisch und verdienen eine tiefergehende Erforschung.

Die Expressionswerte der Keime S70 und S37 schwankten zwischen Werten, die sich unterhalb und oberhalb der Negativprobe befanden. Die Expression, die durch TNF $\alpha$  induziert wurde, lag meist über der von S70 und S37. Die eindeutige Induktion zur Expression von IL-6 durch HGF-Zellen und HPDLF-Zellen durch diese Stämme von *S. mutans* war somit zwar öfter messbar, kann jedoch nicht eindeutig bestätigt werden. Zur Abklärung dieser Frage wären Wiederholungen des Versuches mit einer Erhöhung der Anzahl empfehlenswert.

Die Konzentration von PGE<sub>2</sub> wurde gemessen, um zu eruieren, ob die Anwesenheit von kariespathogenen Streptokokkenstämmen eine erhöhte, oder reduzierte Synthese von PGE<sub>2</sub> in HGF-Zellen oder HPDLF-Zellen induziert. Damit galt es zu klären, ob die ausgewählten Stämme von *S. mutans* auf diese Zellformen grundsätzlich eine immunmodulatorische Wirkung haben, oder eventuell in der Lage sind, eine Immunantwort zu unterdrücken.

Betrachtet man in Abbildung 15 die Darstellung der Mittelwerte des synthetisierten PGE<sub>2</sub>, so sieht man, dass beide Zellformen einen ähnlichen Trend aufweisen. Grundsätzlich wurde unter jeder Bedingung PGE<sub>2</sub> erzeugt, wobei die Synthese durch HPDLF-Zellen etwas schwächer als die durch HGF-Zellen ausfiel. Einzige Ausnahme bildet der Versuchsansatz mit dem Keim S70. Es ist folglich möglich, dass HPDLF-Zellen PGE<sub>2</sub> weniger stark synthetisieren als HGF-Zellen. Die Tatsache, dass Scheres eine ähnliche Wirkung bei IL-6 bestätigte, unterstützt diese Annahme (Scheres *et al.*, 2010).

Untersucht man die Wirkung einzelner Keime und des TNF $\alpha$  auf die Zellen, so fallen mehrere Besonderheiten auf. In Abbildung 15 ist ersichtlich, dass nach Inkubation mit TNF $\alpha$  und den Keimstämmen S17 und S70 die Synthese von PGE<sub>2</sub> niedriger ausfiel als bei der Negativprobe. Auch bei einem Einzelversuch mit HGF-Zellen und Antibiotikum im Kulturmedium waren die Werte bei den drei *S. mutans*-Stämmen im Vergleich zu den übrigen stark reduziert. In Tabelle 7 sind diese Werte in der ersten Spalte zu sehen. Dafür könnte es verschiedene Ursachen geben.

Es wäre möglich, dass die geringe Synthese von PGE<sub>2</sub> bei Inkubation mit den Stämmen von *S. mutans* und Antibiotikum aufgrund von einer starken Keimreduktion und damit einer schwächeren Immunantwort seitens der Zellen hervorgerufen wird. Dafür spricht, dass TNF $\alpha$  mit 3103 pg/ml eine starke Synthese bewirkte. Im Vergleich

synthetisierten die Zellen, die mit *S. mutans*-Stämmen inkubiert wurden zwischen 182 und 615 pg/ml. Im Gegenzug waren allerdings die Werte der Negativprobe mit 1901 pg/ml weit höher als die der Stämme. Wäre das Ausbleiben von immunaktivierenden Stoffen für eine niedrige Synthese verantwortlich, müsste auch die Negativprobe geringer ausfallen.

Eine andere Erklärung wäre eine immunsuppressive Wirkung auf die verwendeten Zellen durch die Stämme von *S. mutans*, was eine geringere Synthese von PGE<sub>2</sub> zur Folge haben könnte. Da dies von anderen Keimen beobachtet wurde, ist das im Bereich des Möglichen (Veiga-Malta *et al.*, 2004).

Auch wäre es denkbar, dass diese Stämme auf die Zellen stark pathologisch wirken und so zu deren Untergang führen. Die reduzierte Zellzahl würde eine erniedrigte Synthese von PGE<sub>2</sub> hervorrufen. Sowohl Morioka als auch Urnowey berichten über die Fähigkeit von *Porphyromonas gingivalis*, einem stark mit Parodontitis assoziierten Keim, die anti- und proapoptotischen Gene von HGF-Zellen zu beeinflussen und so eine Apoptose herbeizuführen (Morioka *et al.*, 1993, Urnowey *et al.*, 2006). Es wäre denkbar, dass manche Stämme von *S. mutans* eine ähnliche Wirkungsweise besitzen.

Im Gegensatz zu den PGE<sub>2</sub>-Werten der Stämme von *S. mutans* fielen die Ergebnisse für *S. sobrinus* sowohl in den Versuchen ohne als auch mit Antibiotikum sehr hoch aus. Die synthetisierte Menge von PGE<sub>2</sub> übertraf die Werte der Negativproben und die der übrigen Keime bei weitem. Bei dem Versuch mit Antibiotikum erreichte der Wert, wie in Tabelle 7 ersichtlich mit 15411 pg/ml sogar das bis 100-fache der oben beschriebenen übrigen Werte. Dass der Keim in beiden Fällen im Vergleich zu den übrigen Keimen diese auffällig stärkere Synthese von PGE<sub>2</sub> bewirkte, könnte darauf zurückzuführen sein, dass *S. sobrinus* weniger anfällig auf die verwendeten Antibiotika ist. Auch wäre es denkbar, dass der Keim tatsächlich weniger pathologisch auf die Zellen wirkt und so im Gegensatz zu den *S. mutans*-Stämmen deren Wachstum und Immunreaktionen kaum beeinflussen könnte.

Vergleicht man allerdings diese Ergebnisse mit den Messungen von IL-6, HBD2 und LL37, wo *S. sobrinus* in vielen Fällen die geringste Induktion bewirkte, so wird ersichtlich, dass für eindeutige Aussagen noch mehr Versuchsreihen erfolgen müssen.

Die Konzentration von LL37 und HBD2 wurde gemessen, um zu eruieren, ob HGF-Zellen und HPDLF-Zellen diese AMPs exprimieren, so, wie es andere Zellen der

äußeren Schutzbarrieren tun (Dale *et al.*, 2001, Frohm Nilsson *et al.*, 1999, Ouhara *et al.*, 2006). Des Weiteren galt es zu klären, ob die ausgewählten kariespathogenen Streptokokkenstämmen eine direkte Immunantwort durch Freisetzung dieser AMPs induzieren können, oder eventuell in der Lage sind, diese zu hemmen.

Über die Fähigkeit von HGF-Zellen und HPDLF-Zellen, LL37 zu exprimieren wurde bisher noch wenig veröffentlicht. Deswegen werden hier für eine Vergleich teilweise Studien mit anderen Zellformen der Gingiva hinzugezogen. Die in Tabelle 8 dargestellten Konzentrationen der Versuche dieser Arbeit befanden sich mit einem Tiefstwert von  $(0,41 \pm 0,09)$  ng/ml induziert durch *S. sobrinus* und einem Höchstwert von  $(0,62 \pm 0,13)$  ng/ml induziert durch TNF $\alpha$  zwar in einem niedrigen, aber dennoch messbaren Bereich. Die Werte der Stämme von *S. mutans* befanden sich dazwischen. Der Hersteller des Versuchskits (s. Kapitel 2.5.2) gibt die messbaren Konzentrationen bei zwischen 0,1 und 100 ng/ml an. Somit wurde eine geringe Expression von LL37 gemessen, wobei die durch HPDLF-Zellen geringfügig niedriger ausfiel. Sakabes Ergebnisse zu der Expression von LL37 durch Keratinozyten, die, wie in den Versuchen dieser Arbeit 72 h inkubiert waren, lagen bei nicht stimulierten Zellen mit ca. 0,4 ng/ml in einem ähnlichen Bereich (Sakabe *et al.*, 2014). Eine genauere Angabe der Werte ist hier nicht möglich, da die Ergebnisse als Säulendiagramm dargestellt sind. Diese Zellen, die mithilfe von IL-17 und IL-22 stimuliert worden waren, exprimierten im Mittel ca. 0,5 ng/ml. Die Werte bewegen sich somit in einem ähnlichen Bereich, wie in den Versuchen dieser Arbeit mit HGF-Zellen und HPDLF-Zellen. Hierbei muss man bedenken, dass es sich um eine andere Zellform handelt, die eventuell auf eine andere Art und Weise aktiviert wird, oder sich in ihrem Expressionsverhalten von den Fibroblasten unterscheidet.

Insgesamt weichen die Werte dieser Arbeit mit einem Intervall von 0,25 ng/ml nur wenig voneinander ab. Da die durch TNF $\alpha$  exprimierte Menge an LL37 nur geringfügig höher war, als die der übrigen, ist es schwierig zu unterscheiden, ob die Werte sich grundsätzlich in diesem Bereich befinden, oder ob eine Steigerung der Expression möglich wäre. Es wäre von Interesse zu beobachten, ob ein anderes Zytokin, wie beispielsweise IL1 $\beta$  eine erhöhte Expression bewirken könnte. Mathews beobachtete an Keratinozyten, die 24 h inkubiert wurden, eine um das etwa 16-fache höhere Expression von HBD2 im Vergleich zur Negativprobe bei Inkubation mit IL1 $\beta$  (Mathews *et al.*, 1999).

Die in dieser Arbeit gemessenen Konzentrationen von HBD2 befanden sich insgesamt knapp an der unteren Nachweisgrenze des Tests. Diese Grenze wurde vom Hersteller (s. Kapitel 3.5.2.) mit 15,6 pg/ml angegeben. Die in Tabelle 9 dargestellten Werte bewegten sich zwischen  $(12 \pm 4)$  und  $(15,1 \pm 2,6)$  pg/ml. Damit vergrößert sich die Messungsgenauigkeit. Dass HGF-Zellen in der Lage sind, HBD2 zu exprimieren bestätigte Liu, nachdem die Zellen für 24 h mit verschiedenen Konzentrationen von IL1 $\beta$  inkubiert wurden (Liu *et al.*, 2013).

Bei Betrachtung der Werte von Tabelle 8 und 9 ist es interessant festzustellen, dass die Expression von LL37 und HBD2 bei Inkubation mit *S. sobrinus* geringer ausfiel als bei den Negativproben und bei den meisten übrigen Versuchsansätzen. HGF-Zellen exprimierten bei Inkubation mit dem Keim  $(0,52 \pm 0,05)$  pg/ml weniger LL37 und somit weniger als die Zellen der Negativprobe, deren Wert bei  $(0,54 \pm 0,09)$  pg/ml lag. HPDLF-Zellen exprimierten induziert durch *S. sobrinus* mit  $(0,41 \pm 0,09)$  pg/ml weniger LL37 als alle übrigen Versuchsreihen. Im Fall von HBD2 lagen die Mittelwerte der Expression bei *S. sobrinus* mit  $(12 \pm 4)$  pg/ml aus HGF-Zellen und  $(12,5 \pm 1,5)$  pg/ml aus HPDLF-Zellen ebenfalls unterhalb der Negativproben. Ebenso wie bei den Ergebnissen zu IL-6 könnte auch in diesen Fällen die niedrige Expression auf die immunsuppressive Wirkung von *S. sobrinus* zurückzuführen sein.

Eine mögliche Erklärung, für die grundsätzlich niedrigen und wenig variierenden Expressionswerte von LL37 und HBD2 in den Versuchen dieser Arbeit wäre, dass für die Ausschüttung dieser AMPs durch HGF-Zellen und HPDLF-Zellen ein weiterer Reiz notwendig wäre, der in dem in vitro-Versuch mit reinen Fibroblasten nicht gegeben ist. Es ist möglich, dass in den angelegten Co-Kulturen nicht alle notwendigen immunologischen Abläufe nachgestellt werden, so dass den Zellen für die Expression von AMPs noch weitere notwendige Initiatoren aus beispielsweise dem Blutserum oder den Abwehrzellen fehlen. Die Möglichkeit, dass ein Zusammenspiel mehrerer Zellverbände die Expression von Entzündungsmediatoren verändern kann, zeigte Bedran in einem nachgestellten Modell von in eine Kollagenmatrix eingebetteten Epithelzellen und HGF-Zellen, welche eine deutlich höhere Ausschüttung von IL-6 bewirkten als reine HGF-Zellen, nachdem beide mit Lipopolisacchariden von *A. accenomycetemcomitans* inkubiert worden waren (Bedran *et al.*, 2014). Mathews beobachtete an Kulturen von Keratinozyten der Gingiva, die für 24 h angelegt wurden,

erst eine Expression von HBD2, nachdem diese mit Lipopolisacchariden von *Escherichia coli* oder mit IL-1 $\beta$  inkubiert wurden (Mathews *et al.*, 1999). Es ist auch vorstellbar, dass HGF-Zellen und HPDLF-Zellen tatsächlich nur in geringem Maße für die Expression von AMPs verantwortlich sind und entweder keine, oder nur wenige AMPs exprimieren und dass eine vermehrte Ausschüttung durch andere Zellen, wie beispielsweise Immunzellen oder Epithelzellen (Gudmundsson *et al.*, 1996, Mathews *et al.*, 1999, Ouhara *et al.*, 2006) stattfindet. Zur Abklärung dieser Überlegungen wäre es empfehlenswert, die Anzahl der Versuche mit den ausgewählten Streptokokkenstämmen zu erhöhen und zu überprüfen, ob eine andere Positivprobe, wie beispielsweise IL1 $\beta$ , zu höheren Werten führen könnte.

Zur Überprüfung einer Immunantwort von HGF-Zellen auf Oberflächenproteine von Streptokokkenstämmen wurde bei einer Zellkultur, versehen mit durch Schallhomogenisierung neutralisierten Streptokokken, die Expression von IL-6 ermittelt, bei einer weiteren Kultur die intrazelluläre Konzentration von I $\kappa$ B $\alpha$ . Es ist bei den gemessenen Konzentrationen zu bedenken, dass diese Zellkulturen mit den Lysaten für 24 h angelegt waren. Diese reduzierte Zeit für die Synthese von Stoffen könnte die Expressionswerte reduzieren. Auch wurde hier dem Medium Antibiotikum (P/S =100/100) beigemischt, was, wie bei den Versuchen mit intakten Streptokokken mit IL-6 bestätigt, die Expression reduziert.

Die in Tabelle 11 dargestellten Konzentrationen von IL-6 zeigen, dass die Werte sowohl bei der Negativprobe mit 2,5 pg/ml, als auch bei den Versuchsansätzen mit Bakterienlysaten sehr niedrig ausfielen. Sie bewegten sich zwischen 1,8 pg/ml induziert durch *S. sobrinus* und 3,1 pg/ml hervorgerufen durch S70. Bei der Negativprobe wurden 2,5 pg/ml exprimiert. Die Werte lagen damit knapp an der unteren Nachweisgrenze des Tests. Diese wurde vom Hersteller (s. Kapitel 3.5.2.) mit 2,95 pg/ml angegeben. Damit vergrößert sich die Messungengenauigkeit. Die sehr hohe Expression von 225 pg/ml, welche durch TNF $\alpha$  induziert wurde, bestätigt, ebenso wie die übrigen Versuche zu IL-6 mit lebenden Keimen, dass die Expression von IL-6 durch HGF-Zellen induzierbar ist. Scheres verglich ebenfalls die Expression von IL-6 aus Kulturen von HGF-Zellen und HPDLF-Zellen, nachdem sie mit Lipopolisacchariden (LPS) von *Porphyromonas gingivalis* für 6 h inkubiert worden waren (Scheres *et al.*, 2010). Die Werte der Negativprobe lagen bei HGF-Zellen bei ca. 160 pg/ml, während die mit LPS inkubierten Zellen mit ca. 380 pg/ml weit mehr IL-6 exprimierten. Die Werte

bewegen sich in einem ähnlichen Bereich wie die der Expression durch TNF $\alpha$  in dieser Arbeit und sind damit um etwa das Hundertfache höher als die Expressionswerte bei den hier verwendeten Stämmen von *S. mutans*. Um die Ursache für die niedrige Expression zu finden, muss man mehrere Faktoren abwägen. Einerseits wäre es möglich, dass Inkubationszeit und Zellmenge nicht ausreichend waren. Dafür spricht, dass bei den Versuchen mit intakten Keimen und Antibiotikum im Medium, die 72 h dauerten bei der Negativprobe der Wert bei  $(30 \pm 21)$  pg/ml lag. Der nicht in den Tabellen angegebene niedrigste Wert lag bei 10 pg/ml. Die Expression war wenn auch nicht viel, so doch ein wenig höher. Auch durch das Antibiotikum könnte eine zusätzliche Reduzierung der Expression erfolgt sein. Dafür sprechen die höheren Werte bei den Negativproben der Versuche mit lebenden Keimen. HGF-Zellen exprimierten  $(221 \pm 29)$  pg/ml, HPDLF-Zellen  $(156 \pm 6)$  pg/ml. Der Grund dafür, dass sich die Expression bei Scheres bereits nach sechs Stunden in diesem Bereich bewegte, könnte sein, dass es sich bei den Zellen um Gewebeproben von extrahierten Molaren handelte. Hier waren im Gegensatz zu reinen Fibroblasten, wie bei den Versuchen dieser Arbeit, Gewebereinheiten inkubiert. Somit wäre eine Interaktion von verschiedenen Zellformen wie sie bei den Zellbiopsien von Scheres eventuell stattfand, für eine höhere Expression von IL-6 verantwortlich.

Es ist allerdings nicht auszuschließen, dass die niedrigen Expressionswerte wegen einer geringeren IL-6-induzierenden Wirkung der inaktivierten Stämme von *S. mutans* auf HGF-Zellen entstanden sind. Grund dafür könnte einerseits sein, dass die alleinigen Proteine der inaktivierten Keime keine Immunreaktion hervorrufen, oder dass die Schallhomogenisierung in der durchgeführten Art und Weise zu einer zu starken Zerstörung der Proteine geführt haben könnte. Dagegen spricht jedoch das Ergebnis des Western Blots zur Ermittlung der intrazellulären Freisetzung von I $\kappa$ B $\alpha$  in HGF-Zellen, das in Abbildung 18 gezeigt ist. Die einzelnen Streifen, welche für eine Anwesenheit von I $\kappa$ B $\alpha$  sprechen sind deutlich erkennbar, während im Bereich der Negativprobe keine Verfärbung für I $\kappa$ B $\alpha$  ersichtlich ist. Am stärksten ist die Reaktion auf S70 abgebildet, dicht gefolgt von TNF $\alpha$ , S17, S97 und S101. Am schwächsten ausgeprägt ist die Bande von S39. Für die Beurteilung liegt das Augenmerk auf den Ergebnissen der Stämme S17 und S37, sowie auf denen von TNF $\alpha$  und der Negativprobe, da die übrigen Keime in dieser Arbeit sonst nicht verwendet wurden. Es ist festzuhalten, dass jeder Keim die Freisetzung von I $\kappa$ B $\alpha$  in den Zellen induzierte.

Zellen, die ohne Streptokokkenlysate inkubiert wurden, zeigten jedoch ein negatives Ergebnis. Dieser Versuch deutet darauf hin, dass die Oberflächenproteine dieser Keime die Aktivierung von NF $\kappa$ B starten, indem die Phosphorylierung und Abkopplung von I $\kappa$ B $\alpha$  initiiert wird. Da es sich um zwei Einzelversuche handelt, ist für eine Untermauerung dieses Gedankens eine große Anzahl von weiteren Experimenten nötig. Dabei wäre auch zu überprüfen, ob die stärkere Reaktion durch den Keim S70 bei diesen Versuchen zu IL-6 und I $\kappa$ B $\alpha$  tatsächlich aufgrund von einer starken Immunreaktion hervorgerufen wurde und kein Zufallsergebnis war. Es ist von Interesse, dass *S. sobrinus* auch hier die niedrigste Expression von IL-6 induzierte, was wieder ein Hinweis auf eine immunsuppressive Wirkung dieses Keims sein könnte.

## 5. Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war es, Versuchsansätze zu finden, die ein Vertiefen der Erforschung der immununterstützten Kariesprävention ermöglichen. Hierfür galt es zu ermitteln, ob bestimmte kariespathogene Wildtypen von *Streptococcus mutans* oder deren Proteine eine immunmodulierende Wirkung auf zahnumgebende Fibroblasten haben. Dafür wurde nach Inkubation mit den Keimen oder mit deren schallhomogenisierten Lysaten die Expression von IL-6, LL37 und HBD2, sowie die Synthese von PGE<sub>2</sub> und das Freiwerden von I $\kappa$ B $\alpha$  aus HGF-Zellen und HPDLF-Zellen gemessen.

Die Freisetzung von IL-6 konnte bei den drei ausgewählten Stämmen von *S. mutans* zwar beobachtet werden, häufig unterschritten jedoch die Werte der Negativprobe. Für einen eindeutigen Nachweis und für die Abklärung, ob auch immunsupprimierende Faktoren eine Rolle spielen, sind weitere Erforschungen mit größeren Versuchsreihen zu empfehlen. Für die Initiation einer Immunantwort allein durch die Anwesenheit von Oberflächenproteinen der ausgewählten Streptokokken spricht die Freisetzung von I $\kappa$ B $\alpha$  in HGF-Zellen nach Inkubation mit lysierten Keimen und eine wenn auch geringe Ausschüttung von IL-6. Der Stamm S70 initiierte in beiden Fällen die stärkste Reaktion.

PGE<sub>2</sub> wurde stark durch den Kontrollkeim *Streptococcus sobrinus* synthetisiert. Die Stämme S17 und S70 von *S. mutans* riefen eine gegenteilige Wirkung hervor. Hier war die Synthese von PGE<sub>2</sub> niedriger als bei den Negativproben. Es wäre interessant, mit weiteren Versuchsreihen abzuklären, ob hier eine pathogene, oder eine immunmodulatorische Wirkung der Keime auf die Zellen einen Einfluss ausübt.

Die Expression von LL37 und HBD2 fiel bei der Negativprobe, dem TNF $\alpha$ , und den verschiedenen Keimstämmen häufig gleichwertig aus. Um zu eruieren, ob diese Zellformen grundsätzlich die gemessenen Mengen an AMPs exprimieren, ob weitere immununterstützende Faktoren in der Zellkultur die Expression steigern könnten, oder ob immunmodulatorische Eigenschaften der Keime die AMP-Expression reduzierten, sind weitere Versuche angezeigt. Auch wäre es interessant, mit anderen zahnumgebenden Zellarten die Expression von LL37 und HBD2 durch die verwendeten Keime zu untersuchen.

Insgesamt liefert diese Arbeit eine Vorlage zur Weitererforschung der Wirkung kariespathogener Streptokokken auf zahnumgebende Fibroblasten. Eine Vermehrung der Versuchsreihen mit den verwendeten Keimen oder die Untersuchung ihrer Wirkung auf andere zahnumgebende Zellformen könnte es ermöglichen, das Wirken der Keime besser zu verstehen, und so ihren schädigenden Einfluss zu reduzieren.

## 6. Rezepte

### Medium zur Anzucht von Keimen

- Columbia Agar mit Schafsblut
- 5% Schafsblut
- 12 g pankreatisch abgebautes Casein
- 5 g peptisch abgebautes Tiergewebe, Hefe- und Rindfleischextrakte
- 13,5 g Agar

### Medium für die Lagerung von Streptokokkenstämmen

- Medium mit Trypticase Soy Broth (TSYB) 1 ml
- Trypticase Soy Broth: 30,0 g
- Yeast Extract: 3,0 g
- Agar: 15,0 g
- Destilliertes H<sub>2</sub>O: 1000 ml
- Glycerin

### Ladepuffer nach Laemmli 4x

- 2 ml 1M Tris-HCL pH 6,8 (12,1g Tris-Base auf 100 ml H<sub>2</sub>O pH-Wert mit HCL einstellen)
- 0,8 g SDS
- 4 ml 100% Glycerol
- 0,4 ml 14,7M  $\beta$ -mercaptoethanol
- 1ml 0,5M EDTA
- 8 mg bromophenol blue

### Laufpuffer für Western Blot

#### 10x Tris-Glycin-SDS Laufpuffer

- Tris Base 30,3 g
- Glycin 144,1 g
- SDS 10 g
- Lösen in 600 ml destilliertem H<sub>2</sub>O
- Auffüllen mit H<sub>2</sub>O auf 1000 ml

## Transferpuffer für Western Blot

### 10x Tris Glycin Transferpuffer (nach Towbin)

- Tris-Base 30,3 g
- Glycin 144,1 g
- Lösen in 600 ml destilliertem H<sub>2</sub>O
- Auffüllen mit H<sub>2</sub>O auf 1000 ml
- Herstellung 1 L 1x-Puffer:
  - 80 ml 10x-Puffer auffüllen mit H<sub>2</sub>O auf 800 ml
  - Zugabe von 200 ml Methanol reinst

## 8. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Anzahl der Immunodetektionen.....	33
Tabelle 2: Konzentrationen der Standardlösungen für IL-6, LL37 und HBD2.....	36
Tabelle 3: Konzentrationen der Standardlösungen für PGE <sub>2</sub> .....	39
Tabelle 4: Konzentrationen der Standardlösungen für Bradford Assay.....	40
Tabelle 5: Pipettierreihenfolge bei der Gelelektrophorese.....	42
Tabelle 6: Konzentrationen von IL-6.....	46
Tabelle 7: Konzentrationen von PGE <sub>2</sub> .....	48
Tabelle 8: Konzentrationen von LL37.....	49
Tabelle 9: Konzentrationen von HBD2.....	50
Tabelle 10: Temperaturmessungen während der Schallhomogenisierung.....	51
Tabelle 11: Konzentrationen von IL-6 bei Bakterienlysaten.....	52

## 9. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Neutralisation von Säuren durch Puffersysteme.....	11
Abbildung 2: Die drei Hauptgruppen von AMPs (modifiziert nach Bals 2000) .....	14
Abbildung 3: Darstellung der Positionen der Disulfidbrücken bei $\beta$ -Defensinen (Palfy <i>et al.</i> , 2009) .....	16
Abbildung 4: Phosphatidylcholin.....	17
Abbildung 5: Modelle der Porenbildung durch AMPs (Chan <i>et al.</i> , 2006) .....	19
Abbildung 6: Übersicht der unterschiedlichen Arbeitsschritte.....	26
Abbildung 7: 6-Well-Kulturplatte mit Medium und Co-Kultur.....	29
Abbildung 8: Versuchsaufbau der Schallhomogenisierung.....	31
Abbildung 9: 96-Microtiter-Well-Platte mit „Sandwich-ELISA“.....	34
Abbildung 10: 96-Microtiter-Well-Platte mit kompetitivem EIA.....	38
Abbildung 11: 96-Microtiter-Well-Platte mit Bradford Assay.....	41
Abbildung 12: Kammer einer Gelelektrophorese.....	42
Abbildung 13: Kammer für Transfer Blot, schematischer Querschnitt von oben.....	43
Abbildung 14: Konzentrationen von IL-6.....	47
Abbildung 15: Konzentrationen von PGE <sub>2</sub> .....	48
Abbildung 16: Konzentrationen von LL37 .....	49
Abbildung 17: Konzentrationen von HBD2.....	50
Abbildung 18: Nachweis von $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ mit Western Blot.....	52

## 10. Literaturverzeichnis

1. Al-Hashimi I, Levine M J. Characterization of in vivo salivary-derived enamel pellicle (1989). *Arch Oral Biol* **34**: 289-295.
2. Alagarasu K, Patil P S, Shil P, Seervi M, Kakade M B, Tillu H, Salunke A. In-vitro effect of human cathelicidin antimicrobial peptide LL-37 on dengue virus type 2 (2017). *Peptides* **92**: 23-30.
3. Almstahl A, Lingstrom P, Eliasson L, Carlen A. Fermentation of sugars and sugar alcohols by plaque Lactobacillus strains (2013). *Clin Oral Investig* **17**: 1465-1470.
4. Andreu D, Rivas L. Animal antimicrobial peptides: an overview (1998). *Biopolymers* **47**: 415-433.
5. Argimon S, Alekseyenko A V, DeSalle R, Caufield P W. Phylogenetic analysis of glucosyltransferases and implications for the coevolution of mutans streptococci with their mammalian hosts (2013). *PLoS One* **8**: e56305.
6. Bals R. [Antimicrobial peptides and peptide antibiotics] (2000). *Med Klin (Munich)* **95**: 496-502.
7. Bals R. Epithelial antimicrobial peptides in host defense against infection (2000). *Respir Res* **1**: 141-150.
8. Bals R, Wilson J M. Cathelicidins--a family of multifunctional antimicrobial peptides (2003). *Cell Mol Life Sci* **60**: 711-720.
9. Barlow P G, Beaumont P E, Cosseau C, Mackellar A, Wilkinson T S, Hancock R E, Haslett C, Govan J R, Simpson A J, Davidson D J. The human cathelicidin LL-37 preferentially promotes apoptosis of infected airway epithelium (2010). *Am J Respir Cell Mol Biol* **43**: 692-702.
10. Barlow P G, Li Y, Wilkinson T S, Bowdish D M, Lau Y E, Cosseau C, Haslett C, Simpson A J, Hancock R E, Davidson D J. The human cationic host defense peptide LL-37 mediates contrasting effects on apoptotic pathways in different primary cells of the innate immune system (2006). *J Leukoc Biol* **80**: 509-520.
11. Barlow P G, Svoboda P, Mackellar A, Nash A A, York I A, Pohl J, Davidson D J, Donis R O. Antiviral activity and increased host defense against influenza infection elicited by the human cathelicidin LL-37 (2011). *PLoS One* **6**: e25333.
12. Bedran T B, Mayer M P, Spolidorio D P, Grenier D. Synergistic anti-inflammatory activity of the antimicrobial peptides human beta-defensin-3 (hBD-3) and cathelicidin (LL-37) in a three-dimensional co-culture model of gingival epithelial cells and fibroblasts (2014). *PLoS One* **9**: e106766.

13. Bergman P, Walter-Jallow L, Broliden K, Agerberth B, Soderlund J. The antimicrobial peptide LL-37 inhibits HIV-1 replication (2007). *Curr HIV Res* **5**: 410-415.
14. Bevins C L, Martin-Porter E, Ganz T. Defensins and innate host defence of the gastrointestinal tract (1999). *Gut* **45**: 911-915.
15. Bissell J, Joly S, Johnson G K, Organ C C, Dawson D, McCray P B, Jr., Guthmiller J M. Expression of beta-defensins in gingival health and in periodontal disease (2004). *Journal of oral pathology & medicine : official publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology* **33**: 278-285.
16. Boman H G. [Man's own antibiotics--an innate immune system] (1996). *Nord Med* **111**: 176-179.
17. Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding (1976). *Anal Biochem* **72**: 248-254.
18. Bradshaw D J, Marsh P D, Watson G K, 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.
19. Brown L R, Billings R J, Kaster A G. Quantitative comparisons of potentially cariogenic microorganisms cultured from noncarious and carious root and coronal tooth surfaces (1986). *Infect Immun* **51**: 765-770.
20. Chamilos G, Gregorio J, Meller S, Lande R, Kontoyiannis D P, Modlin R L, Gilliet M. Cytosolic sensing of extracellular self-DNA transported into monocytes by the antimicrobial peptide LL37 (2012). *Blood* **120**: 3699-3707.
21. Chan D I, Prenner E J, Vogel H J. Tryptophan- and arginine-rich antimicrobial peptides: structures and mechanisms of action (2006). *Biochim Biophys Acta* **1758**: 1184-1202.
22. Chertov O, Michiel D F, Xu L, Wang J M, Tani K, Murphy W J, Longo D L, Taub D D, Oppenheim J J. Identification of defensin-1, defensin-2, and CAP37/azurocidin as T-cell chemoattractant proteins released from interleukin-8-stimulated neutrophils (1996). *J Biol Chem* **271**: 2935-2940.
23. Currie S M, Findlay E G, McHugh B J, Mackellar A, Man T, Macmillan D, Wang H, Fitch P M, Schwarze J, Davidson D J. The human cathelicidin LL-37 has antiviral activity against respiratory syncytial virus (2013). *PLoS One* **8**: e73659.
24. Dale B A, Kimball J R, Krisanaprakornkit S, Roberts F, Robinovitch M, O'Neal R, Valore E V, Ganz T, Anderson G M, Weinberg A. Localized antimicrobial peptide expression in human gingiva (2001). *J Periodontal Res* **36**: 285-294.

25. De Y, Chen Q, Schmidt A P, Anderson G M, Wang J M, Wooters J, Oppenheim J J, Chertov O. LL-37, the neutrophil granule- and epithelial cell-derived cathelicidin, utilizes formyl peptide receptor-like 1 (FPRL1) as a receptor to chemoattract human peripheral blood neutrophils, monocytes, and T cells (2000). *J Exp Med* **192**: 1069-1074.
26. Dean R E, O'Brien L M, Thwaite J E, Fox M A, Atkins H, Ulaeto D O. A carpet-based mechanism for direct antimicrobial peptide activity against vaccinia virus membranes (2010). *Peptides* **31**: 1966-1972.
27. Ehrenstein G, Lecar H. Electrically gated ionic channels in lipid bilayers (1977). *Q Rev Biophys* **10**: 1-34.
28. Elssner A, Duncan M, Gavrilin M, Wewers M D. A novel P2X7 receptor activator, the human cathelicidin-derived peptide LL37, induces IL-1 beta processing and release (2004). *J Immunol* **172**: 4987-4994.
29. Freedman M L, Coykendall A L. Variation in internal polysaccharide synthesis among *Streptococcus mutans* strains (1975). *Infect Immun* **12**: 475-479.
30. Frohm Nilsson M, Sandstedt B, Sorensen O, Weber G, Borregaard N, Stahle-Backdahl M. The human cationic antimicrobial protein (hCAP18), a peptide antibiotic, is widely expressed in human squamous epithelia and colocalizes with interleukin-6 (1999). *Infect Immun* **67**: 2561-2566.
31. Gängler P, Hoffmann T, Willershausen B, Schwenzer N, Ehrenfeld M, Arnold H W, Steinberg D. Konservierende Zahnheilkunde und Parodontologie (2010). *Georg Thieme Verlag* 132-133.
32. Ganz T, Lehrer R I. Defensins (1995). *Pharmacol Ther* **66**: 191-205.
33. Gibbons R J, Nygaard M. Interbacterial aggregation of plaque bacteria (1970). *Arch Oral Biol* **15**: 1397-1400.
34. Gibbons R J, Socransky S S. Intracellular polysaccharide storage by organisms in dental plaques. Its relation to dental caries and microbial ecology of the oral cavity (1962). *Arch Oral Biol* **7**: 73-79.
35. Goeke J E, Kist S, Schubert S, Hickel R, Huth K C, Kollmuss M. Sensitivity of caries pathogens to antimicrobial peptides related to caries risk (2018). *Clin Oral Investig* **22**: 2519-2525.
36. Gordon Y J, Huang L C, Romanowski E G, Yates K A, Proske R J, McDermott A M. Human cathelicidin (LL-37), a multifunctional peptide, is expressed by ocular surface epithelia and has potent antibacterial and antiviral activity (2005). *Curr Eye Res* **30**: 385-394.
37. Gstraunthaler G, Lindl T. Zell-und Gewebekultur Allgemeine Grundlagen und spezielle Anwendungen (2013). *Springer-Verlag* 307.

38. Gudmundsson G H, 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.
39. Hamada S, Tai S, Slade H D. Binding of glucosyltransferase and glucan synthesis by *Streptococcus mutans* and other bacteria (1978). *Infect Immun* **21**: 213-220.
40. Hamilton I R, Boyar R M, Bowden G H. Influence of pH and fluoride on properties of an oral strain of *Lactobacillus casei* grown in continuous culture (1985). *Infect Immun* **48**: 664-670.
41. Hancock R E. Peptide antibiotics (1997). *Lancet* **349**: 418-422.
42. Hell E, Giske C G, Nelson A, Romling U, Marchini G. Human cathelicidin peptide LL37 inhibits both attachment capability and biofilm formation of *Staphylococcus epidermidis* (2010). *Lett Appl Microbiol* **50**: 211-215.
43. Howell M D, Jones J F, Kisich K O, Streib J E, Gallo R L, Leung D Y. Selective killing of vaccinia virus by LL-37: implications for eczema vaccinatum (2004). *J Immunol* **172**: 1763-1767.
44. Huis in 't Veld J H, Backer Dirks O. Intracellular polysaccharide metabolism in *Streptococcus mutans* (1978). *Caries Res* **12**: 243-249.
45. Jackson R J, Lim D V, Dao M L. Identification and analysis of a collagenolytic activity in *Streptococcus mutans* (1997). *Curr Microbiol* **34**: 49-54.
46. Johansen E. Electron microscopic and chemical studies of carious lesions with reference to the organic phase of affected tissues (1965). *Ann N Y Acad Sci* **131**: 776-785.
47. Johnson N W. Differences in the shape of human enamel crystallites after partial destruction by caries, EDTA and various acids (1966). *Arch Oral Biol* **11**: 1421-1424.
48. Kamal A M, Okiji T, Kawashima N, Suda H. Defense responses of dentin/pulp complex to experimentally induced caries in rat molars: an immunohistochemical study on kinetics of pulpal Ia antigen-expressing cells and macrophages (1997). *J Endod* **23**: 115-120.
49. Kittaka M, Shiba H, Kajiya M, Ouhara K, Takeda K, Kanbara K, Fujita T, Kawaguchi H, Komatsuzawa H, Kurihara H. Antimicrobial peptide LL37 promotes vascular endothelial growth factor-A expression in human periodontal ligament cells (2013). *J Periodontal Res* **48**: 228-234.
50. Koczulla R, von Degenfeld G, Kupatt C, Krotz F, Zahler S, Gloe T, Issbrucker K, Unterberger P, Zaiou M, Lebherz C, Karl A, Raake P, Pfosser A, Boekstegers P, Welsch U, Hiemstra P S, Vogelmeier C, Gallo R L, Clauss M, Bals R. An angiogenic role for the human peptide antibiotic LL-37/hCAP-18 (2003). *J Clin Invest* **111**: 1665-1672.

51. Kolenbrander P E. Oral microbial communities: biofilms, interactions, and genetic systems (2000). *Annu Rev Microbiol* **54**: 413-437.
52. Kolenbrander P E, London J. Adhere today, here tomorrow: oral bacterial adherence (1993). *J Bacteriol* **175**: 3247-3252.
53. Lai C H, Listgarten M A, Rosan B. Immunoelectron microscopic identification and localization of *Streptococcus sanguis* with peroxidase-labeled antibody: localization of *Streptococcus sanguis* in intact dental plaque (1975). *Infect Immun* **11**: 200-210.
54. Lai Y, Adhikarakunnathu S, Bhardwaj K, Ranjith-Kumar C T, Wen Y, Jordan J L, Wu L H, Dragnea B, San Mateo L, Kao C C. LL37 and cationic peptides enhance TLR3 signaling by viral double-stranded RNAs (2011). *PLoS One* **6**: e26632.
55. Langeland K. Tissue response to dental caries (1987). *Endod Dent Traumatol* **3**: 149-171.
56. Larrick J W, Hirata M, Balint R F, Lee J, Zhong J, Wright S C. Human CAP18: a novel antimicrobial lipopolysaccharide-binding protein (1995). *Infect Immun* **63**: 1291-1297.
57. Lee Y L, Liu J, Clarkson B H, Lin C P, Godovikova V, Ritchie H H. Dentin-pulp complex responses to carious lesions (2006). *Caries Res* **40**: 256-264.
58. Li Y, Burne R A. Regulation of the *gtfBC* and *fff* genes of *Streptococcus mutans* in biofilms in response to pH and carbohydrate (2001). *Microbiology* **147**: 2841-2848.
59. Lie T. Pellicle formation on hydroxyapatite splints attached to the human dentition: morphologic confirmation of the concept of adsorption (1975). *Arch Oral Biol* **20**: 739-742.
60. Lillard J W, Jr., Boyaka P N, Chertov O, Oppenheim J J, McGhee J R. Mechanisms for induction of acquired host immunity by neutrophil peptide defensins (1999). *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 651-656.
61. Liu J, Du X, Chen J, Hu L, Chen L. The induction expression of human beta-defensins in gingival epithelial cells and fibroblasts (2013). *Arch Oral Biol* **58**: 1415-1421.
62. London J, Hand A R, Weiss E I, Allen J. *Bacteroides loeschei* PK1295 cells express two distinct adhesins simultaneously (1989). *Infect Immun* **57**: 3940-3944.
63. Luo X-L, Li J-X, Huang H-R, Duan J-L, Dai R-X, Tao R-J, Yang L, Hou J-Y, Jia X-M, Xu J-F. LL37 Inhibits *Aspergillus fumigatus* Infection via Directly Binding to the Fungus and Preventing Excessive Inflammation (2019). *Frontiers in immunology* **10**: 283-283.
64. Mathews M, Jia H P, Guthmiller J M, Losh G, Graham S, Johnson G K, Tack B F, McCray P B, Jr. Production of beta-defensin antimicrobial peptides by the oral mucosa and salivary glands (1999). *Infect Immun* **67**: 2740-2745.

65. Milnes A R, Bowden G H, Hamilton I R. Effect of NaF and pH on the growth and glycolytic rate of recently isolated strains of oral Lactobacillus species (1985). *J Dent Res* **64**: 401-404.
66. Miteva M, Andersson M, Karshikoff A, Otting G. Molecular electroporation: a unifying concept for the description of membrane pore formation by antibacterial peptides, exemplified with NK-lysin (1999). *FEBS Lett* **462**: 155-158.
67. Mor A, Nicolas P. The NH<sub>2</sub>-terminal alpha-helical domain 1-18 of dermaseptin is responsible for antimicrobial activity (1994). *J Biol Chem* **269**: 1934-1939.
68. Morioka M, Hinode D, Nagata A, Hayashi H, Ichimiya S, Ueda M, Kido R, Nakamura R. Cytotoxicity of Porphyromonas gingivalis toward cultured human gingival fibroblasts (1993). *Oral Microbiol Immunol* **8**: 203-207.
69. Munson M A, Banerjee A, Watson T F, Wade W G. Molecular analysis of the microflora associated with dental caries (2004). *J Clin Microbiol* **42**: 3023-3029.
70. Nelson A, Hultenby K, Hell E, Riedel H M, Brismar H, Flock J I, Lundahl J, Giske C G, Marchini G. Staphylococcus epidermidis isolated from newborn infants express pilus-like structures and are inhibited by the cathelicidin-derived antimicrobial peptide LL37 (2009). *Pediatr Res* **66**: 174-178.
71. Oppenheim J J, Zachariae C O, Mukaida N, Matsushima K. Properties of the novel proinflammatory supergene "intercrine" cytokine family (1991). *Annu Rev Immunol* **9**: 617-648.
72. Orland F J, Blayney J R, Harrison R W, Reyniers J A, Trexler P C, Ervin R F, Gordon H A, Wagner M. Experimental caries in germfree rats inoculated with enterococci (1955). *J Am Dent Assoc* **50**: 259-272.
73. Orstavik D, Kraus F W, Henshaw L C. In vitro attachment of streptococci to the tooth surface (1974). *Infect Immun* **9**: 794-800.
74. Ouhara K, Komatsuzawa H, Shiba H, Uchida Y, Kawai T, Sayama K, Hashimoto K, Taubman M A, Kurihara H, Sugai M. Actinobacillus actinomycetemcomitans outer membrane protein 100 triggers innate immunity and production of beta-defensin and the 18-kilodalton cationic antimicrobial protein through the fibronectin-integrin pathway in human gingival epithelial cells (2006). *Infect Immun* **74**: 5211-5220.
75. Overhage J, Campisano A, Bains M, Torfs E C, Rehm B H, Hancock R E. Human host defense peptide LL-37 prevents bacterial biofilm formation (2008). *Infect Immun* **76**: 4176-4182.
76. Palffy R, Gardlik R, Behuliak M, Kadasi L, Turna J, Celec P. On the physiology and pathophysiology of antimicrobial peptides (2009). *Mol Med* **15**: 51-59.

77. Phattarataratip E, Olson B, Broffitt B, Qian F, Brogden K A, Drake D R, Levy S M, Banas J A. Streptococcus mutans strains recovered from caries-active or caries-free individuals differ in sensitivity to host antimicrobial peptides (2011). *Mol Oral Microbiol* **26**: 187-199.
78. Pilkington S M, Dearman R J, Kimber I, Griffiths C E M. Langerhans cells express human  $\beta$ -defensin 3: relevance for immunity during skin ageing (2018). *Br J Dermatol* **179**: 1170-1171.
79. Pokorny A, Almeida P F. Permeabilization of raft-containing lipid vesicles by delta-lysine: a mechanism for cell sensitivity to cytotoxic peptides (2005). *Biochemistry* **44**: 9538-9544.
80. Pouny Y, Rapaport D, Mor A, Nicolas P, Shai Y. Interaction of antimicrobial dermaseptin and its fluorescently labeled analogues with phospholipid membranes (1992). *Biochemistry* **31**: 12416-12423.
81. Rassow J, Hauser K, Netzker R, Deutzmann R. Biochemie (2008). *Georg Thieme Verlag KG* 730-732.
82. Ritz H L. Microbial population shifts in developing human dental plaque (1967). *Arch Oral Biol* **12**: 1561-1568.
83. Sakabe J, Umayahara T, Hiroike M, Shimauchi T, Ito T, Tokura Y. Calcipotriol increases hCAP18 mRNA expression but inhibits extracellular LL37 peptide production in IL-17/IL-22-stimulated normal human epidermal keratinocytes (2014). *Acta Derm Venereol* **94**: 512-516.
84. Scheres N, Laine M L, de Vries T J, Everts V, van Winkelhoff A J. Gingival and periodontal ligament fibroblasts differ in their inflammatory response to viable Porphyromonas gingivalis (2010). *J Periodontal Res* **45**: 262-270.
85. Singh P K, Jia H P, Wiles K, Hesselberth J, Liu L, Conway B A, Greenberg E P, Valore E V, Welsh M J, Ganz T, Tack B F, McCray P B, Jr. Production of beta-defensins by human airway epithelia (1998). *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 14961-14966.
86. Smith A J, Cassidy N, Perry H, Begue-Kirn C, Ruch J V, Lesot H. Reactionary dentinogenesis (1995). *Int J Dev Biol* **39**: 273-280.
87. Sorensen O E, Follin P, Johnsen A H, Calafat J, Tjabringa G S, Hiemstra P S, Borregaard N. Human cathelicidin, hCAP-18, is processed to the antimicrobial peptide LL-37 by extracellular cleavage with proteinase 3 (2001). *Blood* **97**: 3951-3959.
88. Sousa F H, Casanova V, Findlay F, Stevens C, Svoboda P, Pohl J, Proudfoot L, Barlow P G. Cathelicidins display conserved direct antiviral activity towards rhinovirus (2017). *Peptides* **95**: 76-83.

89. Stock S R, Vieira A E, Delbem A C, Cannon M L, Xiao X, Carlo F D. Synchrotron microComputed Tomography of the mature bovine dentinoenamel junction (2008). *J Struct Biol* **161**: 162-171.
90. Takahashi N, Nyvad B. Caries ecology revisited: microbial dynamics and the caries process (2008). *Caries Res* **42**: 409-418.
91. Tanzer J M, Freedman M L, Fitzgerald R J, Larson R H. Diminished virulence of glucan synthesis-defective mutants of *Streptococcus mutans* (1974). *Infect Immun* **10**: 197-203.
92. Tanzer J M, Livingston J, Thompson A M. The microbiology of primary dental caries in humans (2001). *J Dent Educ* **65**: 1028-1037.
93. Tao R, Jurevic R J, Coulton K K, Tsutsui M T, Roberts M C, Kimball J R, Wells N, Berndt J, Dale B A. Salivary antimicrobial peptide expression and dental caries experience in children (2005). *Antimicrob Agents Chemother* **49**: 3883-3888.
94. Territo M C, Ganz T, Selsted M E, Lehrer R. Monocyte-chemotactic activity of defensins from human neutrophils (1989). *J Clin Invest* **84**: 2017-2020.
95. Tokumaru S, Sayama K, Shirakata Y, Komatsuzawa H, Ouhara K, Hanakawa Y, Yahata Y, Dai X, Tohyama M, Nagai H, Yang L, Higashiyama S, Yoshimura A, Sugai M, Hashimoto K. Induction of keratinocyte migration via transactivation of the epidermal growth factor receptor by the antimicrobial peptide LL-37 (2005). *J Immunol* **175**: 4662-4668.
96. Travis S M, Anderson N N, Forsyth W R, Espiritu C, Conway B D, Greenberg E P, McCray P B, Jr., Lehrer R I, Welsh M J, Tack B F. Bactericidal activity of mammalian cathelicidin-derived peptides (2000). *Infect Immun* **68**: 2748-2755.
97. Turner J, Cho Y, Dinh N N, Waring A J, Lehrer R I. Activities of LL-37, a cathelin-associated antimicrobial peptide of human neutrophils (1998). *Antimicrob Agents Chemother* **42**: 2206-2214.
98. Urnowey S, Ansai T, Bitko V, Nakayama K, Takehara T, Barik S. Temporal activation of anti- and pro-apoptotic factors in human gingival fibroblasts infected with the periodontal pathogen, *Porphyromonas gingivalis*: potential role of bacterial proteases in host signalling (2006). *BMC Microbiol* **6**: 26.
99. Veerayutthwilai O, Byers M R, Pham T T, Darveau R P, Dale B A. Differential regulation of immune responses by odontoblasts (2007). *Oral Microbiol Immunol* **22**: 5-13.
100. Veiga-Malta I, Duarte M, Dinis M, Tavares D, Videira A, Ferreira P. Enolase from *Streptococcus sobrinus* is an immunosuppressive protein (2004). *Cell Microbiol* **6**: 79-88.
101. Wenham D G, Hennessey T D, Cole J A. Regulation of glucosyl- and fructosyltransferase synthesis by continuous cultures of *Streptococcus mutans* (1979). *J Gen Microbiol* **114**: 117-124.

102. Wong J H, Ng T B, Legowska A, Rolka K, Hui M, Cho C H. Antifungal action of human cathelicidin fragment (LL13-37) on *Candida albicans* (2011). *Peptides* **32**: 1996-2002.
103. Yamamoto T, Kita M, Oseko F, Nakamura T, Imanishi J, Kanamura N. Cytokine production in human periodontal ligament cells stimulated with *Porphyromonas gingivalis* (2006). *J Periodontal Res* **41**: 554-559.
104. Yasin B, Pang M, Turner J S, Cho Y, Dinh N N, Waring A J, Lehrer R I, Wagar E A. Evaluation of the inactivation of infectious Herpes simplex virus by host-defense peptides (2000). *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **19**: 187-194.
105. Zeya H I, Spitznagel J K. Antimicrobial specificity of leukocyte lysosomal cationic proteins (1966). *Science* **154**: 1049-1051.

## 11. Danksagung

Hier möchte ich meinen großen Dank allen beteiligten Personen aussprechen, die mich bei der Anfertigung meiner Dissertation unterstützt haben.

Besonders danken möchte ich meiner Doktormutter Frau Prof. Dr. med. dent. Karin Christine Huth, Professorin an der Poliklinik für Zahnerhaltung und Parodontologie der Ludwig-Maximilians-Universität München, für die Möglichkeit das herausfordernde und spannende Thema der Antimikrobiellen Peptide erforschen zu können, sowie für die kompetente Betreuung, die ich dabei erhalten habe.

Des Weiteren gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel, Direktor der Poliklinik für Zahnerhaltung und Parodontologie und Dekan der Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München, dass ich meine Versuche an seiner Einrichtung durchführen durfte.

Auch möchte ich meinem Betreuer Herrn Dr. med. dent. Maximilian Kollmuß meinen besonderen Dank aussprechen. Dessen stete Unterstützung und unermüdliche Einsatzbereitschaft war mir ein großes Vorbild und hat mich stets angespornt, mein Wissen in der Materie noch weiter zu vertiefen.

Bedanken möchte ich mich auch bei Frau MTA Brigitte Hackl, die während meiner Labortätigkeiten stets ein hilfsbereiter und freundlicher Ansprechpartner war.

Von ganzem Herzen danke ich meinem Ehemann Dr. Hans-Friedrich Wirth und meiner Schwester Dr. Sybille Simon für ihre immerwährende Unterstützung.

## 12. Lebenslauf

### **13. Eidesstattliche Versicherung**

Wirth, Carolin

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

**„Untersuchung der Wirkung von verschiedenen  
*Streptococcus mutans* Stämmen auf die Expression von  
Entzündungsmarkern und AMPs in oralen Zellen“**

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient habe 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.

Carolin Wirth

Baldham, den 15.11.2021