Aus der Poliklinik für Zahnerhaltung und Parodontologie

Poliklinik der Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Untersuchung der Wirkung von antimikrobiellen Peptiden auf die Formation von parodontalpathogenen Biofilmen in-vitro: Abhängigkeit von Konzentration, Ionenstärke und pH-Wert

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Zahnmedizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Sophie Charlotte Laubmeier

aus München

2022

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät

der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. med. dent. Karin Christine Huth, MME
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. Michael Stimmelmayr
	Prof. Dr. rer. nat. Rainer Haas
Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:	Dr. med. dent. Maximilian Kollmuß
Dekan:	Prof. Dr. med. Thomas Gudermann
Tag der mündlichen Prüfung:	08.12.2022

Inhaltsverzeichnis

1	**Einleitung**	**5**
1.1	Entstehung des dentalen Biofilmes	5
1.2	Bakterienassoziierte Erkrankungen	6
1.3	Einteilung der Bakterienkomplexe	11
1.4	Virulenzfaktoren von *Fusobacterium nucleatum*	12
1.5	Virulenzfaktoren von *Porphyromonas gingivalis*	12
1.6	Virulenzfaktoren von *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*	13
1.7	Immunologischer Abwehrmechanismus	13
1.8	Zusammensetzung und Funktion des Speichels	14
1.9	Antimikrobielle Peptide (AMPs)	15
1.9.1	Defensine	15
1.9.2	Das Cathelicidin LL-37	16
1.9.3	Wirkungsweise der AMPs	18
1.9.4	Wechselwirkung zwischen AMP und bakterieller Membran	20
1.10	Definition und Einfluss des pH-Wertes	22
1.11	Definition und Einfluss der ionischen Stärke	23
2	**Fragestellung und Studienziel**	**25**
3	**Material und Methode**	**26**
3.1	Anzucht der Mikroorganismen	26
3.2	Kulturbedingung von *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*	27
3.3	Kulturbedingung anaerober Mikroorganismen	27
3.4	Aufbau und Funktionsweise der anaeroben Sicherheitswerkbank	28
3.5	Herstellung der Bakteriensuspension	29
3.6	Zubereitung der Pufferlösungen	30
3.7	Herstellung antimikrobieller Peptidlösungen	31

3.8 Beschreibung des Versuchsaufbaus 32
3.9 Die Biolumineszenz 32
3.10 Statistische Auswertung 33
4 Ergebnisse 35
4.1 Überlebensrate von *Porphyromonas gingivalis* 35
4.2 Überlebensrate von *Fusobacterium nucleatum* 41
4.3 Überlebensrate von *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* 44
5 Diskussion 46
6 Zusammenfassung 53
7 Literaturverzeichnis 55
8 Abbildungsverzeichnis 73
9 Tabellenverzeichnis 75
10 Abkürzungsverzeichnis 76
11 Anhang 77
12 Danksagung 89
13 Lebenslauf 90

1 Einleitung

Besonders in Zeiten steigender Antibiotikaresistenz wird antimikrobiellen Peptiden (AMPs) als endogener Wirkstoff eine wichtige Bedeutung zugeschrieben. Sie treten im Körper in geringen physiologischen Konzentrationen auf, beispielsweise in der Schleimhaut, und stellen ein Bindeglied zwischen der angeborenen und der erworbenen Immunabwehr dar (Lai und Gallo, 2009). Zahlreiche Faktoren beeinflussen die Wirkungsweise von AMPs auf die Überlebensrate von Mikroorganismen. Hierzu zählen Umweltbedingungen, wie der pH-Wert oder die ionische Stärke (Walkenhorst, 2016). Bakterien entwickeln hingegen vielzählige Schutzmechanismen, um ihr Überleben zu sichern, beispielsweise die Expression bestimmter Virulenzfaktoren oder die Formation eines Biofilmes (Joo *et al*., 2016). Denn Bakterien, die sich in einem festen Verbund organisieren, zeigen sich im Gegensatz zu frei beweglichen planktonischen Zellen weniger empfindlich gegenüber antimikrobiell wirksamen Substanzen (Costerton *et al*., 1987).

1.1 Entstehung des dentalen Biofilmes

Initial bildet sich auf der gereinigten Zahnhartsubstanz ein sekundäres Schmelzoberhäutchen, die Pellikel, die sich trotz guter Mundhygiene nicht vollständig beseitigen lässt (Kolenbrander *et al*., 2002). Sie besteht aus prolinreichen und phosphathaltigen Proteinen, Glykoproteinen und Enzymen, die als Rezeptoren für später ansiedelnde Bakterien dienen (Hellwig *et al*., 2013, Kolenbrander *et al*., 2002). Zunächst lagern sich Streptokokken der Spezies *Streptococcus sanguinis* über elektrostatische und hydrophobe Wechselwirkungen reversibel an und haften anschließend an die Oberfläche (Cowan *et al*., 1987). Obgleich Streptokokken ungefähr 20% der bakteriellen Flora in der Mundhöhle stellen (Kolenbrander, 2000), sind *Actinomyces naeslundii* ebenfalls wichtige Frühbesiedler, indem sie über Fimbrien an die prolinreichen Speichelproteine binden (Rosan und Lamont, 2000). Streptokokken koaggregieren sowohl untereinander als auch mit anderen Bakterienspezies (Kolenbrander *et al.*, 1990). Die Bildung extrazellulärer Polysaccharide begünstigt die Etablierung des Biofilmes (Nobbs *et al*., 2009). Mikroorganismen können aufgrund des Zeitpunkts ihrer Anheftung in Früh- und in Spätbesiedler eingeteilt werden (Kolenbrander *et al*., 2002). Hierbei wird *Fusobacterium nucleatum* (*F. nucleatum*) eine Vermittlerfunktion zugeschrieben, da es

sowohl mit früh als auch mit spät anlagernden Mikroorganismen koaggregiert und die Ausbildung des Biofilmes begünstigt (Kolenbrander und London, 1993). Zu den Spätbesiedlern gehören neben *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (*A. actinomycetemcomitans*) die Pathogene *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*) und *Prevotella intermedia* (*P. intermedia*) (Kolenbrander und London, 1993).

Ein wichtiger Faktor für die geringe Sensitivität gegenüber Antibiotika ist das Vorhandensein gramnegativer Pathogene, die durch die Bildung von Virulenzfaktoren das Fortbestehen des Biofilmes sichern (Meuric *et al*., 2013). Dieser spielt eine entscheidende Rolle bei der Etablierung der Parodontitis (Darveau, 2010) und in der Pathogenese endodontogener Infektionen (Neelakantan *et al*., 2017, Noiri *et al*., 2002).

1.2 Bakterienassoziierte Erkrankungen

Die in einem Biofilm auftretenden oralpathogenen Mikroorganismen sind in der Lage unterschiedliche Erkrankungen in der Mundhöhle hervorzurufen. Eine davon ist die Parodontitis apicalis. Diese entwickelt sich als Folge einer unbehandelten Karies, Traumata oder fehlerhafter endodontischer Behandlungen (Nair, 2004). Ursächlich für die Pathogenese der periapikalen Entzündung sind bakterielle Abbauprodukte, die sich im Wurzelkanalsystem ausbreiten (Kakehashi *et al*., 1965, Torabinejad *et al*., 1985). Im Keimspektrum werden vorwiegend Anaerobier der Gattung *Streptococcus* spp., *Parvimonas* spp. und *Prevotella* spp. nachgewiesen (Kist *et al*., 2017). Die Studie von Fujii und Kollegen bestätigte dies, da sich in der Flora des Wurzelkanalsystems einer Parodontitis apicalis 51,6% fakultativ anaerobe, 38,7% obligat anaerobe und 9,7% aerobe Mikroorganismen befanden (Fujii *et al*., 2009). Initial wandern Zellen der unspezifischen Abwehr mit dem Ziel der bakteriellen Eliminierung in das betroffene Areal ein (Nair, 2004). Bei bestehender Infektion wehren zusätzlich Plasmazellen und Lymphozyten als Vertreter des adaptiven Immunsystems die Pathogene ab (Stashenko *et al*., 1998). Infolgedessen kommt es zu einem gesteigerten Blutfluss mit einer Erhöhung der Gefäßpermeabilität (Stashenko *et al*., 1998, Torneck, 1981). Die immunologische Abwehrreaktion löst schließlich eine apikale Knochenresorption aus (Stashenko *et al*., 1992). Neben *F. nucleatum* finden sich auch *A. actinomycetemcomitans* und *P. gingivalis* in endodontischen Infektionen (Pereira *et al*., 2017).

Zudem werden *F. nucleatum*, *A. actinomycetemcomitans* und *P. gingivalis* bei parodontalen Erkrankungen nachgewiesen (Moore und Moore, 1994, Slots und Ting, 1999, Yong *et al*., 2015). Eine Gingivitis, die nicht durch gute Mundhygiene ausheilt, kann in eine chronische Erkrankung, die Parodontitis, übergehen (Pihlstrom *et al*., 2005). Initial wandern verstärkt polymorphkernige neutrophile Granulozyten und Makrophagen durch das Saumepithel, um Mikroorganismen zu phagozytieren (Figueredo *et al*., 2019, Kinane, 2001). Aufgrund persistierender Plaqueakkumulation kommt es zum Zelltod von Granulozyten, die dabei toxische Bestandteile freisetzen (Kinane, 2001). Das Lipopolysaccharid (LPS) in der äußeren Bakterienmembran gramnegativer Mikroorganismen bewirkt die Freisetzung von TNF-α, IL-1β und IL-6 (Andersson *et al*., 1992). Lacroix und Rivest zeigten in einem Tierversuch mit Ratten, dass IL-1β und TNF-α die Synthese von COX-2 mRNA induzierten (Lacroix und Rivest, 1998). Die Cyclooxygenase-2 veranlasst die Bildung von Prostaglandinen (Rivest *et al*., 2000). Der Zustand der initialen Entzündung zeichnet sich durch die Vasodilatation der Blutgefäße aus, ist reversibel und beschränkt sich auf das koronale Saumepithel (Kinane, 2001). Payne und Kollegen zeigten, dass nach einer Plaqueansammlung von acht Tagen subepithelial verstärkt Lymphozyten infiltrierten und die Erweiterung der Blutgefäße zunahm (Payne *et al*., 1975). Nach einer Plaqueakkumulation von zwei bis drei Wochen entwickelt sich aus der frühen Gingivitis eine etablierte Gingivitis. Auf die etablierte Gingivitis folgt schließlich die Parodontitis (Kinane, 2001). Die Parodontitis, eine entzündliche Erkrankung des Zahnhalteapparates, zeichnet sich durch Gewebe- und Attachmentverlust aus (Darveau, 2010).

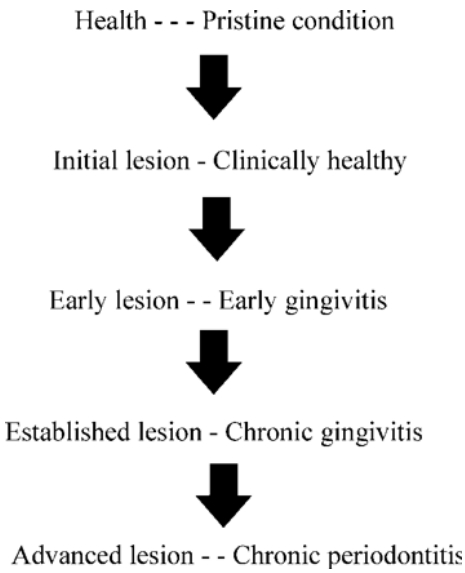

Abbildung 1: Die Entwicklung der Parodontitis (Kinane, 2001)

Bei der Etablierung einer Parodontitis tragen Matrix-Metalloproteasen (MMP) entscheidend zur parodontalen Destruktion bei, da sie für den Abbau der extrazellulären Matrix sowie Kollagen verantwortlich sind (Gursoy *et al*., 2010, Sorsa *et al*., 2004). Dabei gilt *A. actinomycetemcomitans* als besonders pathogen, da sein Virulenzfaktor, Leukotoxin, die Freisetzung von MMP-8 induziert (Claesson *et al*., 2002). Nach einer Studie von Rai und Kollegen lagen MMP-8 im Speichel und MMP-9 in der Sulkusflüssigkeit bei Patienten mit Parodontitis und Gingivitis in höherer Konzentration als bei der gesunden Kontrollgruppe vor (Rai *et al*., 2008). Die parodontale Infektion bewirkt den bindegewebigen Attachment- sowie den irreversiblen Gewebeverlust und endet möglicherweise nach dem Abbau des Alveolarknochens mit Zahnverlust (Darveau, 2010).

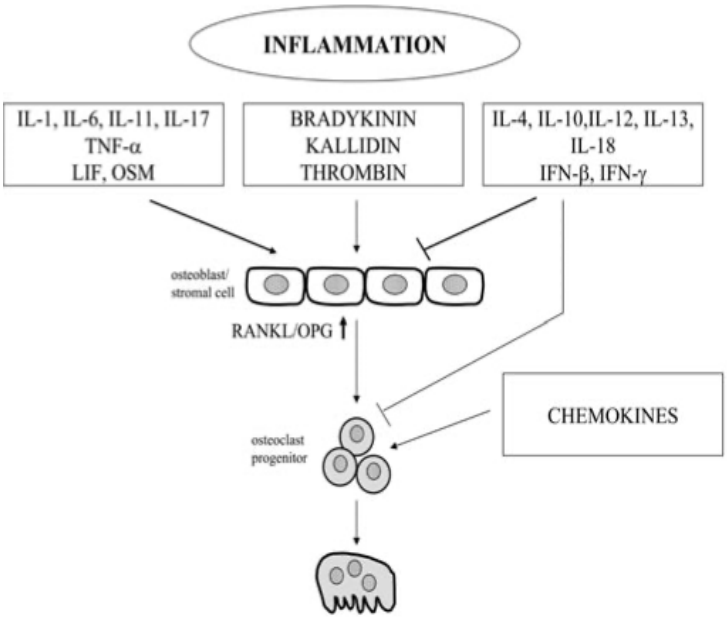

Abbildung 2: Darstellung unterschiedlicher Entzündungsmediatoren, welche die Reifung der Osteoklasten und damit die Knochenresorption fördern (Lerner, 2006)

Das RANKL/RANK/OPG System ist wichtig für die Differenzierung der Osteoklasten und steuert den Knochenumbau (Lerner, 2006). RANKL wird von Osteoblasten freigesetzt und initiiert über die Bindung an den RANK Rezeptor auf der Oberfläche von Vorläuferzellen der Osteoklasten ihre Reifung, was schließlich den Knochenabbau bewirkt (Lerner, 2006). Osteoprotegerin (OPG) ist der Gegenspieler von RANKL und blockiert die RANKL Bindung an den Rezeptor RANK (Boyle *et al*., 2003, Lerner, 2006). Während inflammatorischer Prozesse sezernieren aktivierte T-Zellen RANKL und fördern durch die Freisetzung von Zytokinen wie TNF-α und IL-1β die Knochenresorption (Bar-Shavit, 2007, Hofbauer *et al*., 1999, Lerner, 2006).

Verhaltensbedingte, genetische und systemische Risikofaktoren bestimmen den Verlauf und Schweregrad der entzündlichen Erkrankung (Jepsen *et al*., 2011). Zu diesen zählen Stoffwechselerkrankungen wie Diabetes mellitus (Jepsen *et al*., 2011), oder der Nikotinkonsum (Bergström, 2004).

Nach aktuellen Erkenntnissen werden die Parodontitis als Manifestation systemischer Erkrankungen (Albandar *et al*., 2018, Jepsen *et al*., 2018) und die nekrotisierende Parodontitis (Herrera *et al*., 2018) unterschieden. Die ursprüngliche Klassifikation in chronische und aggresive Parodontitis (Armitage, 1999) wurde unter Parodontitis zusammengefasst und mithilfe eines Staging- und Gradingsystems definiert

(Papapanou *et al*., 2018, Tonetti *et al*., 2018). Das Staging beschreibt das Stadium der Parodontitis abhängig von dem Schweregrad der Erkrankung sowie der Komplexität diese zu behandeln und wird in vier Stadien unterteilt (Papapanou *et al*., 2018, Tonetti *et al*., 2018). Unter Berücksichtigung klinischer und röntgenologischer Aspekte wie dem klinischen Attachmentverlust, dem Knochenabbau und dem parodontalen Zahnverlust wird der Schweregrad der Parodontitis bestimmt (Tonetti *et al*., 2018). Mithilfe des Gradings werden Krankheitsprogression sowie Risikofaktoren berücksichtigt (Papapanou *et al*., 2018, Tonetti *et al*., 2018). In Tabelle 1 werden die Stadien der Parodontitis anhand röntgenologischer und klinischer Gesichtspunkte definiert.

	Stage 1:	Stage 2:	Stage 3:	Stage 4:
Röntgenologischer Knochenverlust:	koronales Drittel (< 15%)	koronales Drittel (15%-33%)	mittleres bis apikales Drittel der Wurzel	mittleres bis apikales Drittel der Wurzel
Zahnverlust als Folge der Parodontitis:	Nein	Nein	≤ 4 Zähne	≥ 5 Zähne
Klinischer Attachment-verlust:	1 bis 2 mm	3 bis 4 mm	≥ 5 mm	≥ 5mm

Tabelle 1: Einteilung der Stadien der Parodontitis modifiziert nach Tonetti und Mitarbeiter (Tonetti *et al*., 2018)

Bestimmte Pathogene wie *A. actinomycetemcomitans* und *P. gingivalis* werden mit einer Parodontitis assoziiert (Slots und Ting, 1999). Allerdings führt erst der synergetische Effekt mit anderen Mikroorganismen zu einem pathogenen Krankheitsverlauf (Hajishengallis und Lamont, 2012).

Speziell im subgingivalen Biofilm lösen Pathogene durch ihre Virulenzfaktoren eine Immunreaktion aus, welche die Destruktion des Gewebes zur Folge hat (Åberg *et al*., 2015, Bodet *et al*., 2006).

1.3 Einteilung der Bakterienkomplexe

Socransky und Kollegen teilten Bakterien nach ihrem pathogenen Potential in Komplexe ein (Socransky *et al*., 1998). Dabei bildeten Bakterien der Gattung *Streptococcus* spp. den gelben, Bakterien der Gattung *Capnocytophaga* spp., *Eikenella corrodens*, *Campylobacter concisus* und *Actinobacillus actinomycetemcomitans* vom Serotyp a den grünen, und *Actinomyces odontolyticus* und *Veillonella parvula* den lila Komplex. Der orange Komplex setzte sich unter anderem aus *F. nucleatum*, *Prevotella intermedia* und *Prevotella nigrescens* zusammen. Der rote Komplex, bestehend aus *P. gingivalis*, *T. forsythia* und *T. denticola*, wurde mit Symptomen wie ausgeprägter Taschensondierungstiefe und Blutung auf Sondierung assoziiert. *A. actinomycetemcomitans* vom Serotyp b wurde keinem Komplex zugeordnet (Socransky *et al*., 1998).

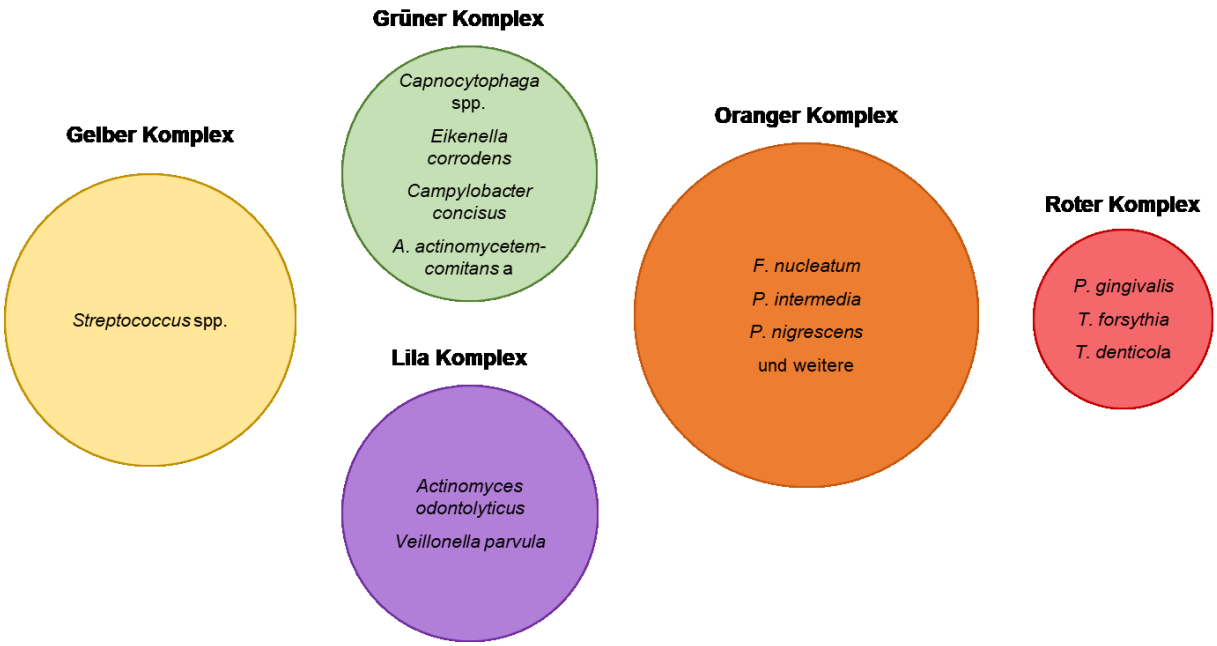

Abbildung 3: Bakterienkomplexe nach Socransky modifiziert nach Socransky und Kollegen (Socransky et al., 1998)

Es ist von Bedeutung, dass in der subgingivalen Plaque bestimmte Komplexe miteinander assoziieren (Socransky und Haffajee, 2002). Socransky und Haffajee zählten die Mikroorganismen des gelben, grünen und lila Komplexes zu den Frühbesiedlern der Zahnoberfläche, die in der Regel untereinander und ohne Bakterien des roten Komplexes assoziierten. Die Bakterien des roten Komplexes

hingegen waren selten ohne Bakterien des orangen Komplexes anzutreffen (Socransky und Haffajee, 2002).

In dieser Arbeit werden neben *F. nucleatum* aus dem orangen Komplex und *P. gingivalis* als Vertreter des roten Komplexes *A. actinomycetemcomitans* untersucht.

1.4 Virulenzfaktoren von *Fusobacterium nucleatum*

F. nucleatum kommt sowohl bei parodontalen Erkrankungen als auch bei einer Reihe von extraoralen Infektionen vor (Moore und Moore, 1994). Das Bakterium bahnt sich seinen Weg durch das Endothel in bestimmte Gewebe und kann häufig in Mischinfektionen nachgewiesen werden (Fardini *et al*., 2011).

F. nucleatum besitzt die Fähigkeit sowohl mit Früh- als auch mit Spätbesiedlern zu koaggregieren (Kolenbrander und London, 1993) und gilt als Wegbereiter für eine stabile Anlagerung von Anaerobiern wie *P. gingivalis* (Kolenbrander *et al*., 1989). Zudem steigert es die Expression von IL-8 aus den Epithelzellen (Gursoy *et al*., 2008). Eine übermäßige Chemotaxis neutrophiler Granulozyten an den Ort des Entzündungsgeschehens kann zu einer Zerstörung des parodontalen Gewebes beitragen (Okada und Murakami, 1998). Wenngleich im parodontal gesunden Zustand pro- und antiinflammatorische Faktoren im Gleichgewicht stehen, fördert *F. nucleatum* als Pathogen die Exazerbation der Entzündung (Han, 2015). Des Weiteren zeigten Gursoy und Kollegen, dass *F. nucleatum* die Sekretion von Matrix-Metalloproteasen stimulierte (Gursoy *et al*., 2008). Darüber hinaus wirkt das Bakterium immunsuppressiv, indem es die Apoptose von mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC) und von Granulozyten, als wichtige Vertreter der Immunabwehr, veranlasst (Jewett *et al*., 2000).

1.5 Virulenzfaktoren von *Porphyromonas gingivalis*

P. gingivalis ist ein Leitkeim der Parodontitis (Slots und Ting, 1999), welche die Entstehung kardiovaskulärer Erkrankungen durch die Ausbreitung von oralen Pathogenen in die Blutbahn begünstigt (Liccardo *et al*., 2019). Zudem besitzt das Bakterium eine Vielzahl an Virulenzfaktoren wie Proteasen, Lipopolysaccharide, Hämagglutinine und Fimbrien, die für die Progression der Parodontitis verantwortlich sind (Ishikawa *et al*., 1997). Endopeptidasen zerstören Bestandteile der extrazellulären Matrix wie Fibronektin und Kollagen vom Typ III, IV und V (Potempa *et al*., 2000). Die

Cysteinprotease (Gingipain-1) vermittelt die Spaltung des Komplementfaktors C5, woraufhin das Anaphylatoxin C5a entsteht, welches die Progression der Parodontitis durch die massive Invasion von Leukozyten fördert (Wingrove *et al*., 1992).

Zudem verhindert *P. gingivalis* mithilfe der Proteinphosphatase (SerB) die Sekretion von IL-8 aus den Epithelzellen und damit die Rekrutierung zahlreicher neutrophiler Granulozyten (Takeuchi *et al*., 2013). Darüber hinaus zeigten Darveau und Kollegen, dass *P. gingivalis* die stimulierende Wirkung auf die IL-8 Sekretion anderer Mikroorganismen wie von *F. nucleatum* inhibierte (Darveau *et al*., 1998).

1.6 Virulenzfaktoren von *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

A. actinomycetemcomitans gilt nicht nur als Pathogen für die Progression der Parodontitis (Åberg *et al*., 2015, Slots und Ting, 1999), sondern wird auch mit koronalen Erkrankungen wie der Endokarditis assoziiert (Yew *et al*., 2014). Aufgrund der unterschiedlichen Expression an Virulenzfaktoren von *A. actinomycetemcomitans* differiert die Pathogenität der Serotypen (Herbert *et al*., 2016).

Das Cytolethal distending Toxin (CdT) besteht aus den Untereinheiten cdtA, cdtB und cdtC (Lara-Tejero und Galán, 2002, Smith und Bayles, 2006). Nachdem die enzymatisch aktive Untereinheit cdtB in den Nukleus der Zielzelle eingedrungen ist, verursacht sie als DNase I einen DNA-Doppelstrangbruch (Lara-Tejero und Galán, 2002). Kann dieser nicht behoben werden, kommt es in der G2/M Phase zum Arrest des Zellzyklus (Lara-Tejero und Galán, 2002).

Das Leukotoxin (LtxA) bindet an Monozyten und Makrophagen und bewirkt deren Lyse (Kelk *et al*., 2011, Kelk *et al*., 2003). Zudem erweist sich der Virulenzfaktor als immunsuppressiv, da er abhängig von seiner Konzentration T-Zellen abtötet (Mangan *et al*., 1991).

1.7 Immunologischer Abwehrmechanismus

Parodontalpathogene Mikroorganismen sichern ihr Überleben, indem sie durch den Einsatz ihrer Virulenzfaktoren die Zellen des Immunsystems abwehren (Holt und Ebersole, 2005). Der menschliche Körper muss sich täglich vor einer großen Anzahl an Fremdkörpern und Pathogenen schützen. Hierbei macht er sich das Immunsystem zu Nutze, welches sich in ein angeborenes und in ein adaptives System unterteilen

lässt. Die Schleimhaut übernimmt durch ihren ständigen Kontakt zu Mikroorganismen eine wichtige Schutzfunktion und dient als physikalische Barriere (Krisanaprakornkit *et al*., 2000). Dringen dennoch Erreger in das Gewebe ein, übernehmen ortsständige Makrophagen einen unspezifischen Basisschutz (Kelk *et al*., 2011). Zahlreiche Leukozyten wandern in das Entzündungsgebiet ein, um die Pathogene abzuwehren (Kornman *et al*., 1997). Zudem wird die Fließrate der Sulkusflüssigkeit, die neben Immunglobuline zelluläre Bestandteile enthält, um das drei- bis vierfache erhöht (Hellwig *et al*., 2013).

Der humorale Bestandteil der angeborenen Immunabwehr ist das Komplementsystem, das sich aus über 30 verschiedenen Proteinen zusammensetzt und Pathogene abwehrt (Clarke und Tenner, 2014). Darüber hinaus verbindet es das angeborene und das erworbene Immunsystem (Clarke und Tenner, 2014), zu welchem sowohl B- als auch T-Lymphozyten zählen, die für die spezifische Erkennung und Abwehr von Pathogenen verantwortlich sind (Hellwig *et al*., 2013).

Dem Speichel wird eine wichtige immunologische Funktion zugesprochen, da er neben antimikrobiell wirksamen Enzymen (Lysozyme, Lactoferrin, Peroxidasen) Muzine enthält, die zum Schutz vor Pathogenen beitragen (Dodds *et al*., 2005, Schenkels *et al*., 1995).

1.8 Zusammensetzung und Funktion des Speichels

Der Speichel wird von den großen Speicheldrüsen Glandulae parotideae, Glandulae submandibulares und Glandulae sublinguales sowie zahlreichen kleinen Speicheldrüsen gebildet (Aumüller *et al*., 2010). Das Sekret besteht zu mehr als 99% aus Wasser, anorganischen und organischen Substanzen (Humphrey und Williamson, 2001). Die Glandulae parotideae stellen seröse Drüsen dar, wohingegen die Glandulae submandibulares ein seromuköses und die Glandulae sublinguales ein mukoseröses Sekret produzieren (Aumüller *et al*., 2010). Die tägliche physiologische Speichelmenge in der Mundhöhle beträgt in etwa 750 ml, wobei der pH-Wert zwischen 6,2 und 7,6 variiert (Baliga *et al*., 2013). In einer Studie von Forcella und Kollegen stellte sich heraus, dass der Ruhespeichelfluss von Kindern sowohl mit dem pH-Wert als auch mit der Pufferkapazität korrelierte (Forcella *et al*., 2018). Insgesamt übernimmt der Speichel eine Schutzfunktion (Marsh, 1994). Hierfür macht er sich drei

unterschiedliche Puffersysteme wie das Bikarbonat-, das Phosphat- und das Proteinpuffersystem zu Nutze (Bardow *et al*., 2000).

Mithilfe des Bikarbonatpuffersystems werden die Protonen der Säure an das Hydrogenkarbonat übertragen, und es entsteht eine schwache Kohlensäure, die wiederum in Wasser und Kohlenstoffdioxid dissoziiert (Bardow *et al*., 2000). Bei steigender Speichelfließrate nimmt die Bikarbonat-Konzentration zu und führt durch die säureneutralisierende Wirkung zu einem pH-Wert Anstieg (Bardow *et al*., 2000). Die Zusammensetzung des Speichels korreliert mit oralen Erkrankungen wie Karies und Parodontitis sowie einer Reihe von systemischen Erkrankungen (Zhang *et al*., 2016). Dabei übernehmen antimikrobielle Peptide im Speichel durch die Abwehr pathogener Bakterien eine protektive Aufgabe (Dale *et al*., 2006).

1.9 Antimikrobielle Peptide (AMPs)

Antimikrobielle Peptide werden von Genen kodiert und können aufgrund ihrer Aminosäuresequenz, der Größe sowie der räumlichen Anordnung in unterschiedliche Klassen eingeteilt werden (Bals, 2000). Im Folgenden wird die Familie der Defensine und das Cathelicidin LL-37 näher beschrieben.

1.9.1 Defensine

Defensine sind kationische, argininreiche Peptide, die antimikrobielle Wirkung gegenüber Bakterien, Pilzen und bestimmten Viren entfalten (Lehrer *et al*., 1991). Aufgrund der drei intramolekularen Disulfidbrücken bilden sie die Sekundärstruktur eines β-Faltblattes und zeigen amphipathische Eigenschaften (Agerberth *et al*., 2000). Je nach Anordnung der Cystein Aminosäuren und der Disulfidbrücken lassen sich die Peptide in α- und β-Defensine unterscheiden (Ganz und Lehrer, 1998). α-Defensine zeichnen sich durch eine Länge von 29-35 Aminosäuren aus (Bals, 2000), wobei HNP1-4 als Präpropeptid synthetisiert und erst nach proteolytischer Spaltung als reife Peptide in der azurophilen Granula neutrophiler Granulozyten gespeichert werden (Gallo *et al*., 2002, Valore und Ganz, 1992). In Abbildung 4 wird das antimikrobielle Peptid HNP-1 dargestellt.

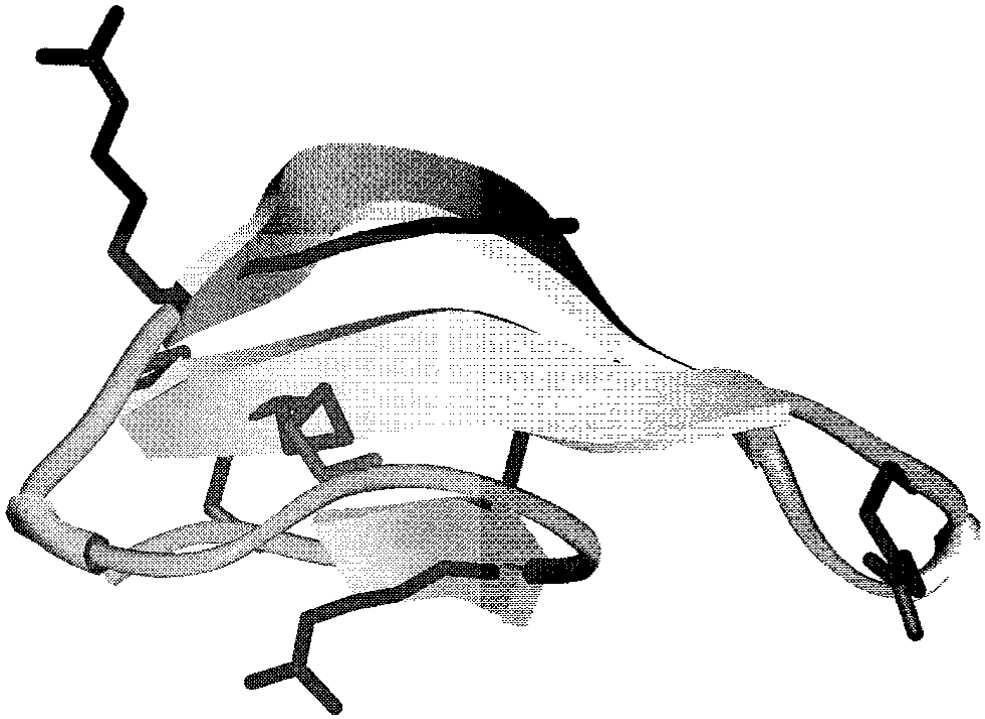

Abbildung 4: Darstellung von HNP-1 (Hancock und Chapple, 1999)

HBD-1 und HBD-2 bestehen aus 38 bis 47 Aminosäuren und werden von Epithelzellen mehrerer Organe exprimiert, wobei HBD-2 bevorzugt in der Haut, Lunge und Trachea nachgewiesen wird (Schröder und Harder, 1999). Proinflammatorische Stimuli wie IL-1β fördern die Expression von HBD-2 und HBD-3 aus den Zellen, wobei die Freisetzung von HBD-1 konstitutiv erfolgt (Abiko *et al*., 2007, Mathews *et al*., 1999, Ouhara *et al*., 2006). Darüber hinaus bewirken Zellwandextrakte von *F. nucleatum* sowie die Mikroorganismen *P. gingivalis* und *A*. *actinomycetemcomitans* die Freisetzung von HBD-2 mRNA aus oralen Epithelzellen (Dale und Krisanaprakornkit, 2001, Ouhara *et al*., 2006).

1.9.2 Das Cathelicidin LL-37

LL-37 ist ein lineares α-helikales Peptid ohne die Aminosäure Cystein, dessen Information auf dem Chromosom 3 gespeichert liegt (Bals, 2000). Genetisch betrachtet codieren die ersten drei Exons für das Signal-Peptid am N-Terminus und die pro-Sequenz, wobei das vierte Exon die Information für das variable Carboxyl-Segment enthält (Bals und Wilson, 2003). Das Cathelicidin wird als Propeptid in den Granula neutrophiler Granulozyten gespeichert (Bals, 2000). Erst mit der Abspaltung des Carboxyl-Abschnittes kann das Peptid als LL-37 seine antimikrobielle Wirksamkeit entfalten (Bals, 2000, Zanetti, 2005). Die Proteinase 3 ist für die Abspaltung

verantwortlich und befindet sich in der azurophilen Granula neutrophiler Granulozyten (Sørensen *et al*., 2001).

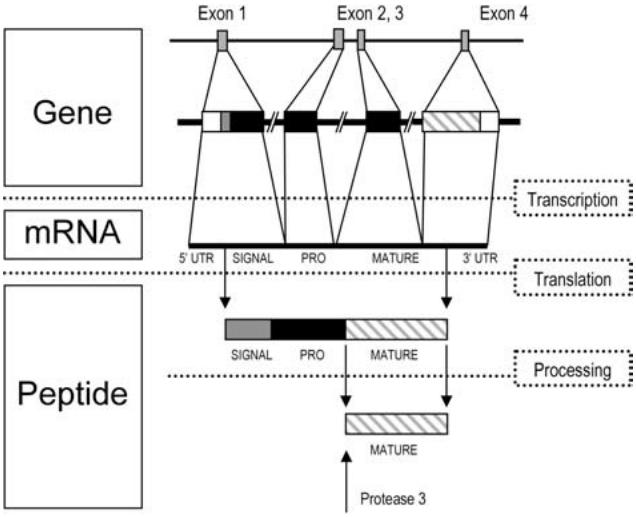

Abbildung 5: Genetische Darstellung von LL-37 (Bals und Wilson, 2003)

Zudem wird das Peptid von Epithelzellen und Makrophagen exprimiert (Tada *et al*., 2017). Bei dem Kostmann-Syndrom handelt es sich um eine kongenitale Neutropenie, wobei die Patienten eine verminderte Anzahl an Defensinen und kein LL-37 aufweisen, wodurch die Pathogenese der Parodontitis begünstigt wird (Pütsep *et al*., 2002). Eine weitere Erkrankung stellt das Papillon-Lefèvre-Syndrom dar, eine autosomal-rezessiv vererbte Hyperkeratose mit frühzeitigem Zahnverlust (Dalgic *et al*., 2011). Infolge einer Genmutation, welches für Cathepsin C kodiert (Toomes *et al*., 1999), wird im Speichel der Patienten zwar hCAP18, aber kein reifes Peptid LL-37 nachgewiesen, was zu schweren Verläufen einer Parodontitis bis hin zu Zahnverlust führt (Eick *et al*., 2014). Frohm und Kollegen belegen die protektive Funktion von LL-37 als Bestandteil der angeborenen Immunabwehr, da Keratinozyten während entzündlicher Dermatosen LL-37 freisetzen (Frohm *et al*., 1997).

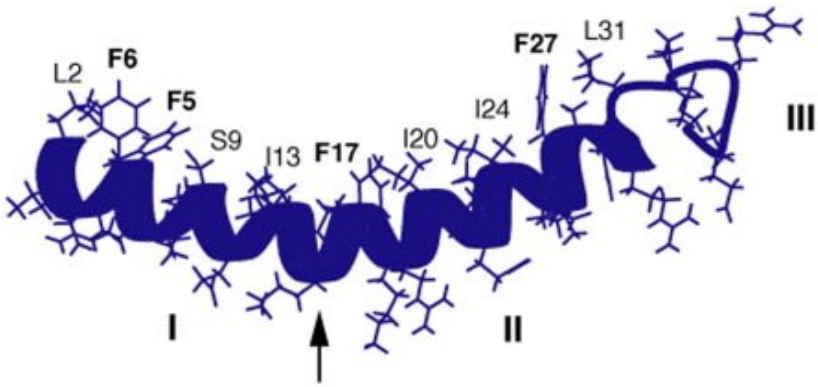

Abbildung 6: Der Pfeil markiert die α-helikale Struktur von LL-37 mit Kennzeichnung der hydrophoben Seitenketten (Wang, 2008).

1.9.3 Wirkungsweise der AMPs

Antimikrobielle Peptide als Bestandteil des angeborenen Immunsystems zeigen gegenüber Pathogenen einen unspezifischen und unmittelbaren Abwehrmechanismus (Dale *et al*., 2006) und spielen besonders für die Mundhöhle, die dauerhaft Mikroorganismen ausgesetzt ist, eine wichtige Rolle (Dale *et al*., 2001). Bereits sehr niedrige LL-37 Konzentrationen, die unter der minimalen Hemmkonzentration (MIC) liegen, beeinträchtigen die Formation des Biofilmes in vitro (Overhage *et al*., 2008). Das Cathelicidin erschwert die initiale Anheftung von *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) an die Oberfläche und veranlasst die Reduktion von Quorum sensing Genen (Overhage *et al*., 2008). Bakterien entwickeln das Quorum sensing, einen genetischen Informationsaustausch, um sich vor äußeren Einflüssen zu schützen (Marsh, 2004). Die antimikrobielle Wirkung der Peptide richtet sich gegen grampositive und gramnegative Bakterien, Pilze und bestimmte Viren (Bals, 2000). Die MIC der AMPs gegenüber den Mikroorganismen kann in vitro höher ausfallen als ihre physiologische Konzentration in der Schleimhaut, die sich für LL-37 und für die β-Defensine auf unter 2 µg/ml beläuft (Lai und Gallo, 2009). Bestimmte Peptide arbeiten synergetisch und steigern dadurch ihre antimikrobielle Aktivität (Nagaoka *et al*., 2000, Yan und Hancock, 2001). In einer Studie von Scott und Kollegen beeinträchtigten kationische Peptide die Wechselwirkung zwischen LPS und dem Lipopolysaccharid bindenden Protein (LBP) und dadurch die TNF-α Freisetzung durch Makrophagen. Allerdings wurde ihre antiinflammatorische Wirkung durch strukturelle Eigenschaften gesteigert, da synthetische Peptide (CP29, CEMA) die TNF-α Ausschüttung um mehr

als 75% reduzierten (Scott *et al*., 2000). Bowdish und Kollegen zeigten, dass Indolicidin und LL-37 die durch LPS induzierte TNF-α Freisetzung hemmten. Zudem beobachteten sie einen synergetischen Effekt der beiden Peptide (Bowdish *et al*., 2005).

Des Weiteren übt LL-37 chemotaktische Wirkung auf Immunzellen aus, indem das Peptid neben Granulozyten, Monozyten und T-Zellen (Agerberth *et al*., 2000, Yang *et al*., 2000) Mastzellen rekrutiert (Niyonsaba *et al*., 2002). HBD-1 und HBD-2 übernehmen über die Chemotaxis dendritischer Zellen und T-Zellen immunstimulierende Funktion (Dale und Fredericks, 2005). Zudem induzieren α-Defensine neben der Rekrutierung unreifer dendritischer Zellen die Migration naiver T-Zellen (Yang *et al*., 2000). Antimikrobielle Peptide nehmen als Bindeglied zwischen dem angeborenem und erworbenem Immunsystem eine wichtige Stellung in der Abwehr bakterieller Infektionen ein (Lai und Gallo, 2009). Antimikrobielle Peptide dringen in den Zellkern ein und verursachen Störungen von Stoffwechselprozessen (Lehrer *et al*., 1989, Pinheiro da Silva *et al*., 2013, Subbalakshmi und Sitaram, 1998). Darüber hinaus stimuliert LL-37 Endothelzellen und induziert die Angiogenese (Koczulla *et al*., 2003). In Abbildung 7 werden die Funktionen des Cathelicidins graphisch zusammengefasst.

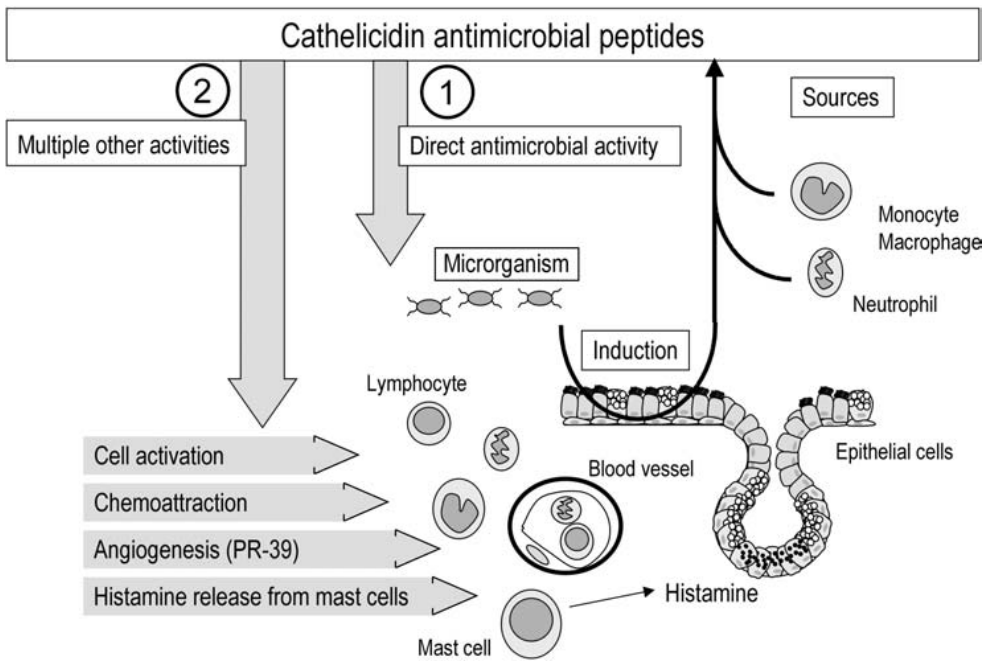

Abbildung 7: Aufgaben des Cathelicidins (Bals und Wilson, 2003**)**

Lehrer und Kollegen zeigten, dass humane Defensine (HNP-1 und HNP-2) sowohl die äußere als auch die innere Bakterienmembran von *Escherichia coli* (*E. coli*) permeabilisierten. Dabei bewirkte die Lyse der inneren Zellmembran einen bakteriziden Effekt. Mithilfe der Elektronenmikroskopie konnten Zellwandablösungen von *E. coli* im periplasmatischen Raum und an der äußeren Bakterienmembran nachgewiesen werden (Lehrer *et al*., 1989).

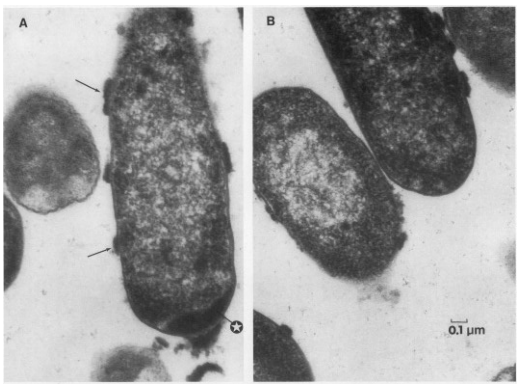

Abbildung 8: (A) Der Stern zeigt auf Zellwandablösungen der inneren Zellmembran im periplasmatischen Raum. Die Pfeile zeigen Ansammlungen an der äußeren Membran. (B) Zellwandablagerungen an der äußeren Bakterienmembran (Lehrer *et al*., 1989)

1.9.4 Wechselwirkung zwischen AMP und bakterieller Membran

Bakterielle Membranen bestehen aus Phospholipiden wie Phosphoglycerid (PG), Cardiolipin (CL) und Phosphatidylserin (PS) und sind negativ geladen, wohingegen eukaryotische Zellen Phosphatidylcholin (PC) und Cholesterin in ihrer Zellmembran enthalten (Yeaman und Yount, 2003). Die negative Oberflächenladung der äußeren Lipidmembran gramnegativer Mikroorganismen und die kationischen antimikrobiellen Peptide führen zu elektrostatischen und hydrophoben Wechselwirkungen (Matsuzaki, 1999). Die Differenz des Transmembranpotentials ist von Prokaryoten bis zu 50% höher als von Eukaryoten, wodurch die Wechselwirkung kationischer AMPs mit Mikroorganismen begünstigt wird (Yeaman und Yount, 2003). Solange das Verhältnis von Peptid- zu Lipidkonzentration (P/L) unter einem bestimmten Schwellenwert liegt, ordnen sich helikale Peptide parallel zur Lipidmembran an (Yang *et al*., 2001). Übersteigt P/L den Schwellenwert, richten sich die Peptide auf und permeabilisieren die Membran (Yang *et al*., 2001). Die transmembrane Porenbildung kann mithilfe von drei unterschiedlichen Modellen, dem toroidal-pore, dem barrel-stave und dem carpet

model, erklärt werden (Brogden, 2005, Wiesner und Vilcinskas, 2010). In Abbildung 9 werden die drei Modelle aufgezeigt, welche die Permeabilisierung der Membran beschreiben.

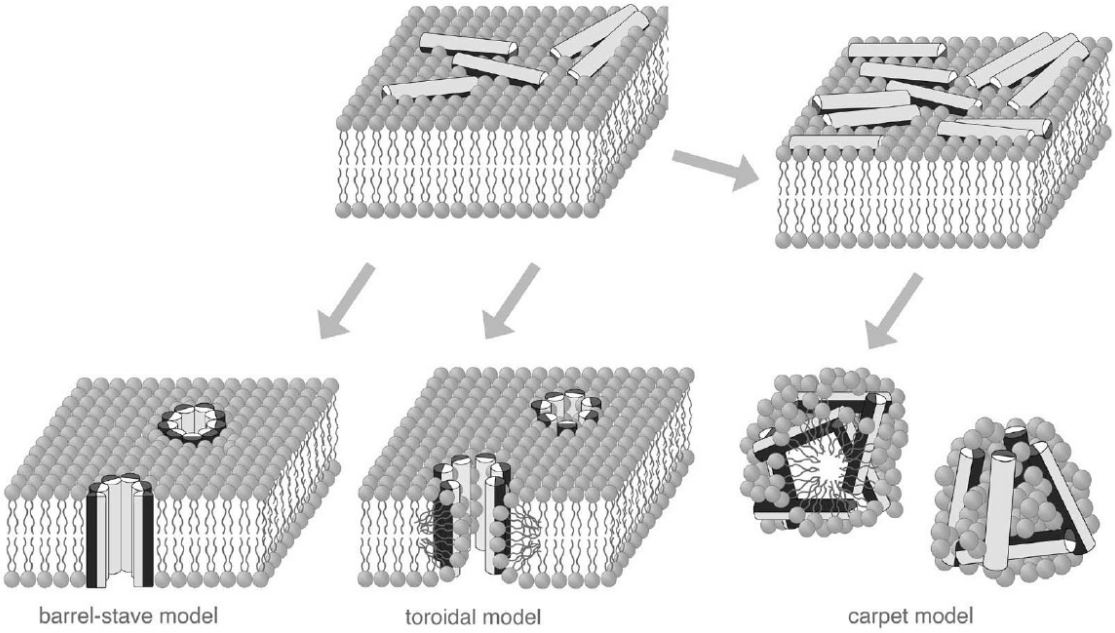

Abbildung 9: Darstellung des barrel-stave, toroidal-pore und carpet models (Wiesner und Vilcinskas, 2010)

Im barrel-stave model fügen sich die Peptide in die Membran ein, wobei sich die hydrophobe Oberfläche den Membranlipiden zuwenden, wohingegen der hydrophile Teil des Peptides das Innere der Pore auskleidet (Oren und Shai, 1998, Wiesner und Vilcinskas, 2010). Im toroidal-pore model assoziieren die Peptide über die gesamte Membran mit den Lipid-Kopfgruppen, und es folgt eine Wurmloch-ähnliche Porenbildung (Wiesner und Vilcinskas, 2010, Yang *et al*., 2001). Beim carpet model binden die Peptide, die sich parallel zur Membran anordnen, an die Lipid-Kopfgruppen und lagern sich wie ein Teppich an (Oren und Shai, 1998, Wiesner und Vilcinskas, 2010). Ist eine Schwellenkonzentration erreicht, permeabilisieren sie die Membran und zerstören diese unter Ausbildung von Mizellen (Oren und Shai, 1998). Henzler Wildman und Kollegen beobachteten eine transmembrane Porenbildung von LL-37 über den toroidal-pore Mechanismus (Henzler Wildman *et al*., 2003). Vogt und Bechinger zeigten, dass der pH-Wert Einfluss auf die Protonierung der Aminosäure Histidin des Peptides LAH_4 nahm und dadurch seine Ausrichtung zur Membran bestimmte. Unter aziden pH-Werten (< 6) ordnete sich das Peptid parallel zur

Membran an, wohingegen es unter alkalischen pH-Werten (> 7) aggregierte und seinen hydrophoben Anteil in die Membran einbaute (Vogt und Bechinger, 1999).

1.10 Definition und Einfluss des pH-Wertes

Die α-helikale Struktur des Peptides LL-37 korreliert mit seiner antimikrobiellen Wirksamkeit und ist von dem vorherrschenden pH-Wert und der Peptidkonzentration abhängig (Johansson *et al*., 1998). Der pH-Wert als logarithmische Größe spiegelt die Konzentration der Hydronium-Ionen (H_3O^+) in der Lösung wider und kann Werte zwischen 0 und 14 annehmen (Atkins und de Paula, 2020, Proksch, 2018). Die Erniedrigung des pH-Wertes um eine Einheit kommt einer Verzehnfachung der molaren Konzentration von Hydronium-Ionen gleich (Atkins und de Paula, 2020, Mortimer und Müller, 2019). Ein pH-Wert von 7 entspricht einer neutralen Lösung, wohingegen in sauren Lösungen Hydronium-Ionen überwiegen und der pH-Wert kleiner als 7 ist (Mortimer und Müller, 2019). Bei einem pH-Wert über 7 liegt eine basische Lösung vor (Mortimer und Müller, 2019). Bickel und Cimasoni ermittelten mit zunehmender Entzündung in der Sulkusflüssigkeit pH-Wert Steigerungen von 6,90 auf etwa 8,66 (Bickel und Cimasoni, 1985). *P. intermedia* und *F. nucleatum* können Säuren neutralisieren und schaffen durch die Alkalisierung des pH-Wertes für säureempfindlichere Bakterien wie *P. gingivalis* geeignete Proliferationsbedingungen (Takahashi *et al*., 1997). Darüber hinaus wirken sich pH-Wert Änderungen auf die Immunantwort aus, da eine steigende Alkalisierung des pH-Wertes die Apoptose von Granulozyten begünstigt (Leblebicioglu und Walters, 1999). Der pH-Wert beeinflusst die Protonierung der beteiligten funktionalen Gruppen abhängig von ihren pKa-Werten und wirkt sich dadurch auf die Nettoladung des Peptides oder der bakteriellen Membran und ihre Wechselwirkung aus (Walkenhorst, 2016, Walkenhorst *et al*., 2013). Bestimmte Aminosäuren der AMPs protonieren unter sauren pH-Werten, wodurch sich die elektrostatische Interaktion zwischen kationischem AMP und bakterieller Membran erhöht (Malik *et al*., 2016). Da die Aminosäure Histidin einen pKa-Wert von ungefähr 6,5 hat, haben histidinreiche Peptide, beispielsweise Clavanine, bei einem pH-Wert von 5,5 eine höhere Nettoladung als bei einem pH-Wert von 7,4 (Lee *et al*., 1997). In einer Studie von Walkenhorst und Kollegen wies das Peptid ARVA bei einem pH-Wert von 4,0 eine Nettoladung von +4 auf, wohingegen es bei einem pH-Wert von 9,0 eine Nettoladung von +3,1 zeigte. Dabei fanden sie heraus, dass sich die MSC für gramnegative Bakterien linear mit der Abnahme des pH-Wertes aufgrund der

Zunahme der Peptidnettoladung reduzierte. Allerdings fiel die MSC für grampositive Bakterien bei sinkenden pH-Werten höher aus, was auf die Zusammensetzung der Bakterienmembran zurückgeführt wurde (Walkenhorst *et al*., 2013). Die Veränderung des pH-Wertes führt in einer Lösung zu einer Änderung der Konzentration an unterschiedlich geladenen Ionen, die in der Gleichung der ionischen Stärke berücksichtigt wird (Walkenhorst, 2016, Walkenhorst *et al*., 2013).

1.11 Definition und Einfluss der ionischen Stärke

Nach der Debye-Hückel-Theorie wird in einer Lösung jedes Ion von einem leichten Überschuss an Ionen entgegengesetzter Ladung umgeben (Atkins und de Paula, 2020). Der Überschuss entsteht durch die thermische Bewegung der Ionen in der Lösung, wobei die Coulomb-Wechselwirkung, bei der sich gleichnamig geladene Ionen abstoßen und entgegengesetzt geladene Ionen anziehen, abgeschwächt wird (Atkins und de Paula, 2020). Allerdings führt die Ionenwolke zur Reduktion des chemischen Potentials des Zentralions (Atkins und de Paula, 2020). Die Ionenstärke (I) berücksichtigt alle auftretenden Ionen in der Lösung (Atkins und de Paula, 2020).

$$I = \frac{1}{2} \sum_i z_i^2 \, b_i \, / b^{\ominus}$$

Abbildung 10: Definition der Ionenstärke (Atkins und de Paula, 2020)

Die antimikrobielle Wirksamkeit der meisten AMPs wird duch das Auftreten von Ionen wie Na^+, Mg^{2+} und Ca^{2+} beeinflusst und erweist sich in Medien geringer ionischer Stärke am effektivsten (Bowdish *et al*., 2006). Im Wasser nimmt LL-37 bei einer Konzentration von 40 µM eine ungeordnete Struktur an, bildet jedoch nach dem Zusatz von 15 mM Na_2SO_4, $NaHCO_3$ oder $NaCF_3CO_2$ eine α-Helix aus, welche mit der antimikrobiellen Wirksamkeit korreliert (Johansson *et al*., 1998). Des Weiteren zeigen Defensine in Medien geringer ionischer Stärke verbesserte antimikrobielle Eigenschaften (Lehrer *et al*., 1993). Allerdings schwächt die Zunahme der ionischen Stärke die elektrostatische Bindung zwischen Peptid und bakterieller Membran (Zasloff, 2002). Es gilt zu Beachten, dass eine Konzentration von 8-60 mM NaCl im Speichel ausreicht, um die Wirkung der β-Defensine zu beeinträchtigen (Gursoy und Könönen, 2012). Tomita und Kollegen beobachteten, dass divalente Kationen die antimikrobielle Wirkung von HBD-2 bereits bei niedrigeren Konzentrationen beeinträchtigten als

monovalente Kationen (Tomita *et al*., 2000). HBD-3 entfaltet bis zu Konzentrationen von 200 mM Na^+ antimikrobielle Wirkung, was möglicherweise auf seine Nettoladung zurückgeführt werden kann (11+), wohingegen HBD-1 bis zu Na^+-Konzentrationen von 100 mM antimikrobielle Wirkung zeigt und damit empfindlicher auf die Veränderung der Ionenkonzentration reagiert (Gursoy und Könönen, 2012). Bei einem Anstieg von 20 mM auf 150 mM NaCl nimmt die antimikrobielle Fähigkeit von HBD-2 gegenüber *E. coli* um das achtfache ab (Bals *et al*., 1998). Eine Studie von Nagaoka und Kollegen demonstrierte, dass die antimikrobielle Wirkung von HNP-1 gegenüber *E. coli* und *S. aureus* bereits bei 150 mM NaCl aufgehoben wurde, wobei diese für LL-37 um das 10-fache reduziert war. Nichtsdestotrotz erzielte das α-Defensin mit dem Cathelicidin einen synergetischen Effekt in der Porenbildung von bakteriellen Membranen (Nagaoka *et al*., 2000). NaCl-Konzentrationen ab 100 mM hemmen die antimikrobielle Wirkung von LL-37 gegenüber *A. actinomycetemcomitans*, wobei ab einer Konzentration von 600 mM kein antimikrobieller Effekt beobachtet werden kann (Tanaka *et al*., 2000). Park und Kollegen machen den Verlust der α-helikalen Struktur des Peptides unter dem Zusatz von NaCl für die eingeschränkte antimikrobielle Aktivität verantwortlich (Park *et al*., 2004).

2 Fragestellung und Studienziel

Da antimikrobielle Peptide als Bestandteil des angeborenen Immunsystems eine bedeutende Rolle in der Abwehr von Pathogenen spielen (Dale *et al*., 2006, Hancock und Scott, 2000), ist es von großer Wichtigkeit, verschiedene Umgebungsbedingungen auf ihren Wirkmechanismus zu berücksichtigen.

In dieser Arbeit wurden AMPs (HNP-1, HBD-2, LL-37) in unterschiedlichen Peptidkonzentrationen (5 µg/ml, 50 µg/ml, 200 µg/ml) hinsichtlich ihrer antimikrobiellen Wirksamkeit gegenüber oralpathogenen Mikroorganismen (*P. gingivalis*, *F. nucleatum*, *A. actinomycetemcomitans*) beurteilt. Es wird die erste Arbeitshypothese aufgestellt, dass AMPs unterschiedliche Wirkung auf Monospezieskulturen zeigen.

Um möglichst realistische Bedingungen zu erhalten, wurden der Einfluss der pH-Werte (pH 5,0, pH 6,0, pH 7,0) sowie die ionische Stärke auf die antimikrobielle Wirkung gegenüber den Bakterien untersucht. Dabei kamen Pufferlösungen (0,1 M, 0,2 M) zum Einsatz. Die zweite Arbeitshypothese nimmt an, dass sowohl die pH-Werte als auch die ionische Stärke die antimikrobielle Wirkung beeinflussen.

Es ist anzunehmen, dass sich AMPs in Abhängigkeit von Umweltbedingungen unterschiedlich auf die bakterielle Überlebensrate auswirken.

3 Material und Methode

3.1 Anzucht der Mikroorganismen

In dieser Arbeit wurden gefriergetrocknete Stammkulturen der Bakterien (*A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *F. nucleatum*) verwendet und nach ihrer Anzucht unterschiedlichen Wachstumsbedingungen ausgesetzt. Die Stammkulturen der Mikroorganismen gefroren bei -196°C in der Gasphase eines Stickstofftanks (Therma, Schwerte, Deutschland). Die Bakterienkulturen wurden vor ihrer Anzucht aufgetaut. Die Anzucht von *P. gingivalis* und von *F. nucleatum* erfolgte auf vorreduzierten festen Nährmedien in der Anaerobierbank. Mit der Impföse wurden Bakterien aufgenommen und mithilfe des Dreiösenausstriches auf einer Schädler Agarplatte (Schaedler Agar mit Vitamin K1 und 5% Schafsblut, BD, Heidelberg, Deutschland) ausgestrichen. Nach frühestens 48 Stunden war auf den Agarplatten bakterielles Wachstum sichtbar. Anschließend wurden die Bakterien mithilfe des Dreiösenausstriches auf neue Agarplatten überimpft und bebrütet. In Abbildung 11 bis Abbildung 13 wird das Wachstum der Bakterien dargestellt.

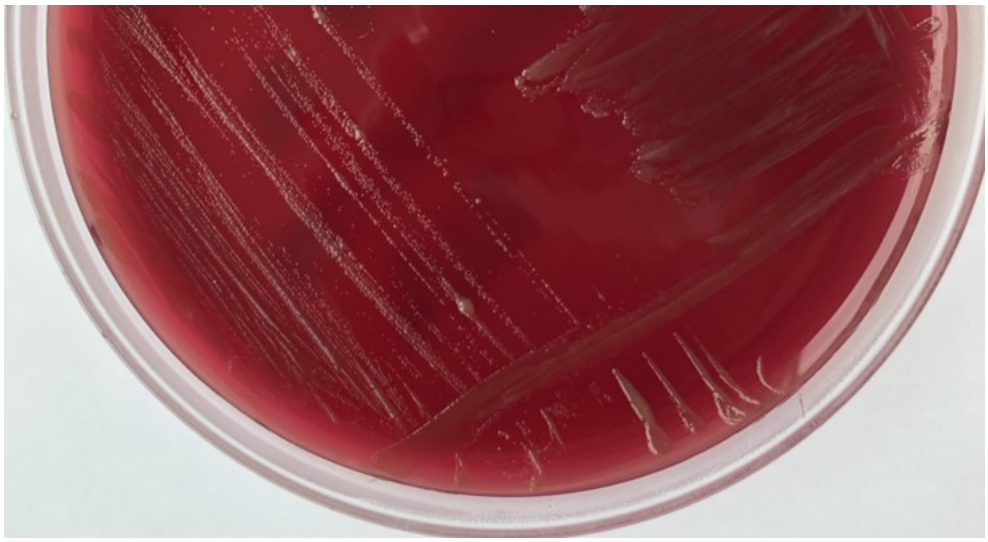

Abbildung 11: Wachstum von *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

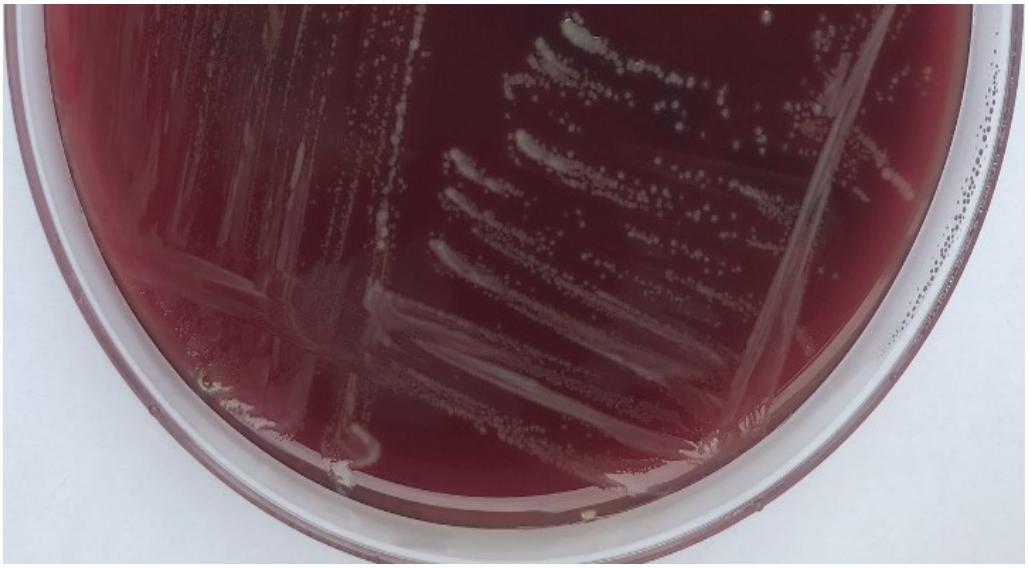

Abbildung 12: Wachstum von *Porphyromonas gingivalis*

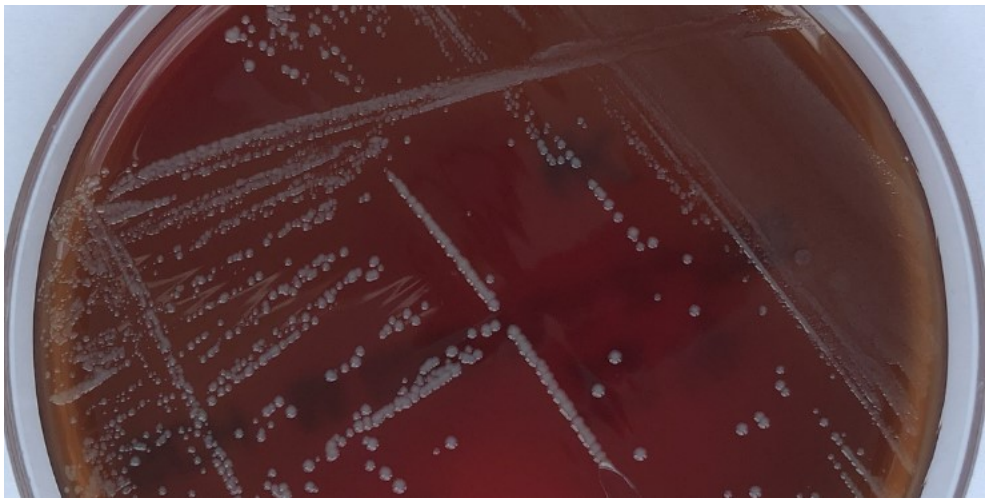

Abbildung 13: Wachstum von *Fusobacterium nucleatum*

3.2 Kulturbedingung von *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

Der fakultative Anaerobier, *A. actinomycetemcomitans*, benötigte für sein Wachstum kein anaerobes Milieu und wurde in einem CO_2-Inkubator (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) bei 60% relativer Luftfeuchtigkeit, 5,8% CO_2 und einer Temperatur von 37°C inkubiert.

3.3 Kulturbedingung anaerober Mikroorganismen

Die Inkubation von *P. gingivalis* und von *F. nucleatum* fand unter Sauerstoffausschluss in einer integrierten Kammer in der Anaerobierbank statt. Das sauerstofffreie Milieu im

Inneren der Werkbank wurde durch ein Gasgemisch (5% H_2, 10% CO_2, 85% N_2) aufrechterhalten. Die Bebrütungstemperatur lag bei 37°C. Zusätzlich wurden die Anaerobier in Töpfen, die mit einem Gaspak (BD, New Jersey, USA) versehen wurden, in einem CO_2-Inkubator (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) außerhalb der Werkbank bebrütet. Auf den genauen Aufbau der anaeroben Werkbank sowie ihrer Funktionsweise wird im Folgenden eingegangen.

3.4 Aufbau und Funktionsweise der anaeroben Sicherheitswerkbank

Das sauerstofffreie Milieu in der Hauptkammer der Werkbank (Bactron II, Sheldon Manufacturing Inc., Cornelius, OR, USA) wurde mithilfe eines Gasgemisches aus 5% H_2, 10% CO_2 und 85% N_2 (Linde, München, Deutschland) aufrechterhalten. Ein Indikatorstreifen (BD, New Jersey, USA) im Arbeitsfeld kontrollierte die anaerobe Atmosphäre. Nach der Befeuchtung mit destilliertem Wasser zeigte der Indikatorstreifen nach ungefähr 9 Stunden einen Farbumschlag von hellblau auf weiß. Der Hauptbereich, an den sich zwei Armports anschlossen, war zusätzlich über ein Fenster mit einem zweiten Zugang, der als Schleuse bezeichnet wurde, verbunden. Unter anaeroben Bedingungen konnten über diese Materialien in das Arbeitsfeld hinein- und heraustransportiert werden. Vor jedem Arbeitsbeginn und wenn in der Schleuse ein anaerobes Milieu geschaffen werden musste, wurde dreimal Vakuum aufgebaut und anschließend mit Gas geflutet. Erst dann durfte der Zugang zum Hauptbereich geöffnet werden. Auf diese Weise wurde die Sauerstoffzufuhr in die Hauptkammer minimiert, um die anaeroben Bedingungen aufrechtzuerhalten. Darüber hinaus absorbierte ein im Inneren der Werkbank angebrachter Katalysator, der Palladium enthielt, den verbliebenen Sauerstoff. Der Katalysator wurde täglich in einem Ofen bei 180°C reaktiviert. Zur zusätzlichen Sauerstoffeliminierung dienten GasPaks (BD, New Jersey, USA), die täglich erneuert wurden.

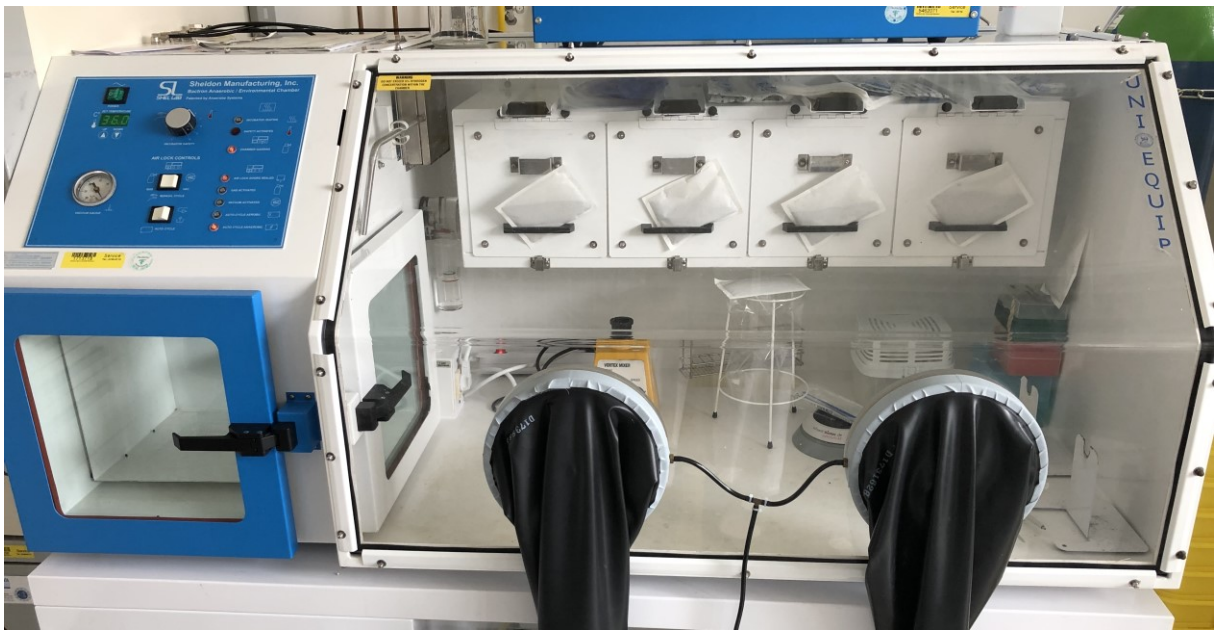

Abbildung 14: Anaerobierbank mit Schleuse und Armports

3.5 Herstellung der Bakteriensuspension

Eine Bakterienkolonie wurde in einem flüssigen Medium gelöst. Das Medium bestand aus 49,5 ml Phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) und 0,5 ml BHI (Walkenhorst *et al.*, 2013). Für das BHI Medium wurde die entsprechende Substanz eingewogen, in destilliertem Wasser gelöst und schließlich zum Kochen gebracht. Es folgte die Autoklavierung mithilfe eines Dampfsterilisators (H+P, München, Deutschland) bei 121° C für 15 Minuten. Im Anhang wird die genaue Zusammensetzung des BHI Mediums dargestellt. Mit einer Impföse wurde eine Bakterienkolonie von der Agarplatte aufgenommen und in 1000 µl flüssigem Medium gelöst und resuspendiert. Anschließend wurden von dieser Suspension 120 µl abpipettiert und mit 1080 µl flüssigem Medium vermischt. Für die Durchführung des Versuchs wurden 60 µl der verdünnten Bakteriensuspension benötigt und in ein Well der 96-Well-Platte pipettiert. In Abbildung 15 wird die Herstellung der verdünnten Bakteriensuspension dargestellt.

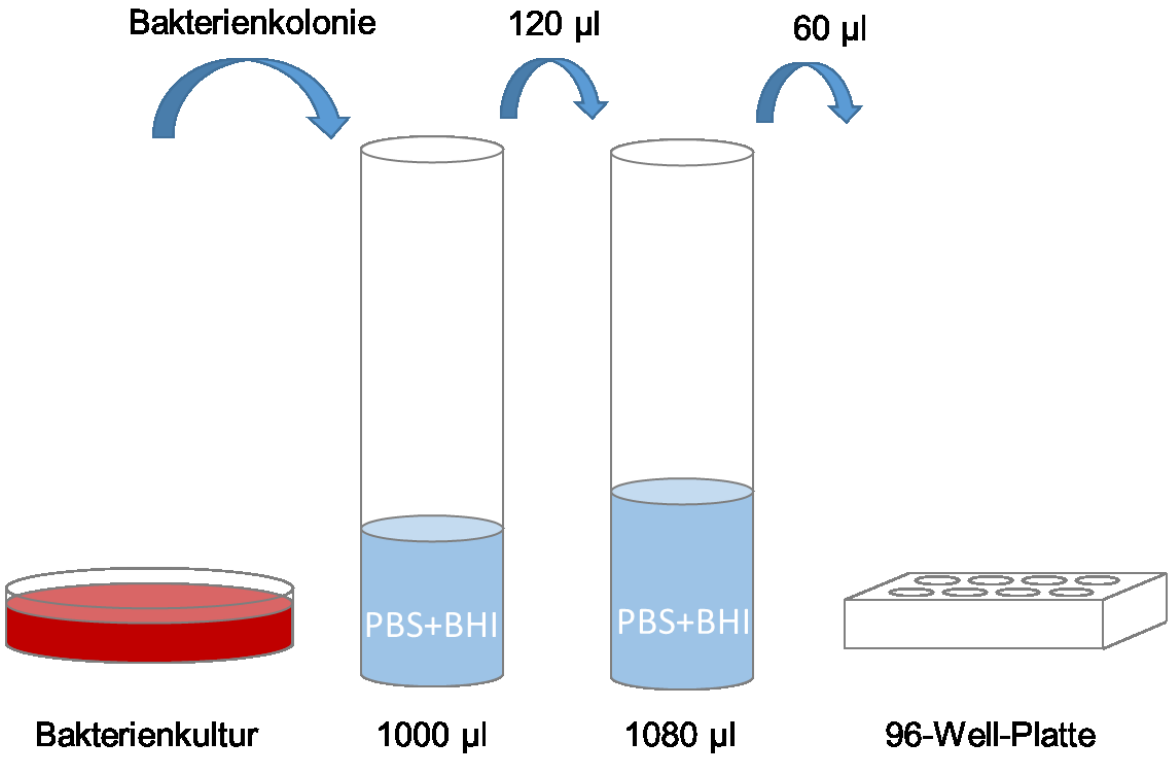

Abbildung 15: Herstellung der verdünnten Bakteriensuspension

3.6 Zubereitung der Pufferlösungen

Der Versuch wurde für die pH-Werte pH 5,0, pH 6,0 und pH 7,0 durchgeführt. Dikaliumhydrogenphosphat (K_2HPO_4) und Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4) dienten zur Herstellung des Phosphatpuffers. Die Stoffmengenkonzentration (c) wurde auf 0,1 M und auf 0,2 M festgelegt. Schließlich wurden molare Pufferlösungen hergestellt. Unter Zuhilfenahme einer Formel wurde die benötigte Masse (m) an K_2HPO_4 und KH_2PO_4 für die jeweilige Pufferlösung (V = 100 ml) berechnet. Des Weiteren war die Kenntnis der molaren Masse (M) von K_2HPO_4 (M = 174,2 g/mol) und von KH_2PO_4 (M = 136,09 g/mol) für die Berechnung von Bedeutung.

$$m = \mathrm{M} * \mathrm{c} * \mathrm{V}$$

Die Zusammensetzung der entsprechenden Pufferlösung kann dem Anhang entnommen werden. Vor der Verwendung wurden die Pufferlösungen in einem Dampfsterilisator (H+P, München, Deutschland) bei 121° C für 15 Minuten autoklaviert. Im Anhang wird eine Übersicht der Versuchsgruppen für die unterschiedlichen pH-Werte dargestellt.

3.7 Herstellung antimikrobieller Peptidlösungen

In der Arbeit wurden HNP-1, HBD-2 und LL-37 als Vertreter der antimikrobiellen Peptide für den Sensibilitätstest der Bakterien verwendet. Die Peptide lagen lyophilisiert vor und wurden von der Firma Peptide Institute (Osaka, Japan) geliefert. In Tabelle 2 ist die Aminosäuresequenz der verwendeten AMPs aufgelistet.

Name des AMPs	Aminosäuresequenz
Human beta defensin 1 (HNP-1)	Ala-Cys-Tyr-Cys-Arg-Ile-Pro-Ala-Cys-Ile-Ala Gly-Glu-Arg-Arg-Tyr-Gly-Thr-Cys-Ile-Tyr-Gln Gly-Arg-Leu-Trp-Ala-Phe-Cys-Cys
Human beta defensin 2 (HBD-2)	Gly-Ile-Gly-Asp-Pro-Val-Thr-Cys-Leu-Lys-Ser Gly-Ala-Ile-Cys-His-Pro-Val-Phe-Cys-Pro-Arg Arg-Tyr-Lys-Gln-Ile-Gly-Thr-Cys-Gly-Leu-Pro Gly-Thr-Lys-Cys-Cys-Lys-Lys-Pro
Cathelicidin (LL-37)	Leu-Leu-Gly-Asp-Phe-Phe-Arg-Lys-Ser-Lys Glu-Lys-Ile-Gly-Lys-Glu-Phe-Lys-Arg-Ile-Val Gln-Arg-Ile-Lys-Asp-Phe-Leu-Arg-Asn-Leu-Val-Pro-Arg-Thr-Glu-Ser

Tabelle 2: Darstellung der Aminosäuresequenzen der verwendeten antimikrobiellen Peptide

Das Cathelicidin LL-37 beinhaltete eine Menge von 1000 µg/ml Peptid pro Flasche. HNP-1 und HBD-2 enthielten 110 µg/ml Peptid pro Flasche. Zunächst mussten die Peptidlösungen zubereitet werden. Hierfür wurden die gefriergetrockneten Defensine mit 110 µl und LL-37 mit 1000 µl der 0,025% Essigsäure versetzt. Die Herstellung der 0,025% Essigsäure erfolgte durch das Lösen von 25 µl einer 100% Essigsäure in 100 ml destilliertem Wasser. Anschließend wurden für alle AMPs Stammlösungen mit den Konzentrationen 5 µg/ml, 50 µg/ml und 200 µg/ml hergestellt. Im Anhang wird eine Übersicht der Stammlösungen in der entsprechenden Konzentration dargestellt.

3.8 Beschreibung des Versuchsaufbaus

Ein Well der 96-Well-Platte enthielt insgesamt 170 µl Suspension. Diese setzte sich aus 60 µl verdünnter Bakteriensuspension, 60 µl molarer Pufferlösung und 50 µl Peptidlösung in der entsprechenden Konzentration zusammen. Die Negativkontrolle beinhaltete 50 µl der 0,025% Essigsäure. Anschließend wurde die 96-Well-Platte in dem eingebauten Brutschrank der anaeroben Werkbank unter ständiger Gasflutung bei 37°C inkubiert. Nach 30 Minuten wurde in jedes Well 120 µl zweifach konzentriertes BHI Medium hinzu pipettiert. Die Zusammensetzung des zweifach konzentrierten BHI Mediums kann dem Anhang entnommen werden. Die 96-Well-Platte wurde in einem Topf zusammen mit einem GasPak (BD, New Jersey, USA) aus der anaeroben Werkbank geschleust und in einem CO_2-Inkubator (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) bei 37°C bebrütet. Nach einer Inkubationszeit von circa 12 Stunden wurde mithilfe der Biolumineszenz die Überlebensrate der Mikroorganismen bestimmt. Insgesamt wurde der Versuch dreimal für jedes Bakterium durchgeführt.

3.9 Die Biolumineszenz

Luciferin wird zusammen mit Sauerstoff unter Energieverbrauch über die Enzymaktivität der Luciferase oxidiert und gibt schließlich Licht ab (Arndt, 2013, Finger *et al*., 2013, Thorne *et al*., 2010). In Abbildung 16 wird die Luciferin-Luciferase-Reaktion dargestellt.

$$Luciferin_{red} + O_2 + ATP \xrightarrow[Luciferase]{Mg^{2+}} Luciferin_{ox} + CO_2 + H_2O + AMP + PP_i + hv$$

Abbildung 16: Reaktionsgleichung (Arndt, 2013)

Die Lichtemisson wird mithilfe des Luminometers (Promega, Manheim, Deutschland) erfasst und in der Einheit der Relativen Light Units (RLU) angegeben (Nante *et al*., 2017). Die Luciferin-Luciferase-Reaktion dient dem quantitativen Nachweis von Adenosintriphosphat (ATP) (Arndt, 2013). Dabei spiegelt das zelluläre ATP die Anzahl der Mikroorganismen wider (Nante *et al*., 2017).

Für die Durchführung der Biolumineszenz wurde ein Reagenz hergestellt, das sich aus 10 ml BacTiter-Glo™ Substrat (Promega, Manheim, Deutschland) und aus 10 ml

BacTiter-Glo™ Puffer (Promega, Manheim, Deutschland) zusammensetzte. Das Substrat wurde auf Raumtemperatur gebracht, da Substrat und Puffer ursprünglich lyophilisiert vorlagen und die Temperatur die Anzahl an Luciferase-Reaktionen und dadurch die Stärke der Biolumineszenz beeinflusst.

Die für das BacTiter-Glo™ Assay (Promega, Manheim, Deutschland) verwendete 96-Well-Platte (Glo Max 96 Microplate, Promega, Manheim, Deutschland) war opak mit einem durchsichtigen Boden. Ein Well enthielt 100 µl der zu untersuchenden Suspension und 100 µl Reagenz. Zwei Wells dienten zur Positivkontrolle. Sie beinhalteten 100 µl NaCl und 100 µl Reagenz. Die befüllte 96-Well-Platte wurde an die Raumtemperatur angepasst und anschließend für mindestens 5 Minuten mit einem Vortexmischer (IKA, Deutschland) mit Schüttelbewegungen durchmischt.

Abbildung 17: Darstellung des Vortexmischers

Schließlich erfasste der Luminometer (Promega, Manheim, Deutschland) die Lichtemission.

3.10 Statistische Auswertung

Die Überlebensrate der Bakterien wurde in Prozent der Negativkontrolle dargestellt. Aufgrund der hohen Streuung der Messwerte wurden die Ergebnisse zusätzlich mithilfe von Box-Whisker-Plots abgebildet. Whisker sind Linien, die sich an die Box anschließen und sowohl den Minimal- als auch den Maximalwert angeben. Der schwarze Strich innerhalb des Kastens wird als Median bezeichnet.

Des Weiteren wurde die statistische Auswertung mit einer Statistik-Software durchgeführt (SPSS Version 25, SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Unter Zuhilfenahme des nicht parametrischen Kruskal-Wallis-Tests wurde der Unterschied zwischen den

Gruppen ermittelt (α-Level 0,05). Dabei wurden die Messwerte durch Ränge ersetzt. Verdeutlichte der Kruskal-Wallis-Test einen zentralen Unterschied zwischen den Gruppen ($p < 0,05$), wurde im Anschluss ein Dunn-Bonferroni-Test als Post-hoc-Test paarweise zwischen den Gruppen durchgeführt. Bei der Betrachtung von zwei Gruppen fand der Mann-Whitney-U-Test Anwendung (α-Level 0,05). Um die Aussagekraft der signifikanten Ergebnisse besser beurteilen zu können, wurde mithilfe des Korrelationskoeffizienten (r) die Effektstärke berechnet.

$$r = \left| \frac{z}{\sqrt{n}} \right|$$

Cohen bewertet r = 0,10 als schwachen Effekt, r = 0,30 als mittleren Effekt und r = 0,50 als starken Effekt (Cohen, 1992).

Ferner wurde eine Regressionsanalyse in Form von einer automatischen linearen Modellierung durchgeführt (α-Level 0,05), um einen Zusammenhang zwischen den untersuchten Gruppen und der bakteriellen Überlebensrate zu klären.

4 Ergebnisse

Im Folgenden wird die bakterielle Überlebensrate in Prozent der Negativkontrolle deskriptiv dargestellt. Anhand eines Streu-Punkt-Diagrammes wurden vorab einzelne Ausreißer aus dem Datensatz gefiltert.

4.1 Überlebensrate von *Porphyromonas gingivalis*

In Abbildung 18 wird die Überlebensrate von *P. gingivalis* unabhängig von den pH-Werten und der Stoffmengenkonzentration aufgezeigt. Der Kruskal-Wallis-Test ermittelte einen zentralen Unterschied zwischen den antimikrobiellen Peptiden ($p < 0{,}000$). Daher wurde der Dunn-Bonferroni-Test als Post-hoc-Test angewandt und zeigte, dass HNP-1 sowohl dem Cathelicidin LL-37 als auch HBD-2 in der Reduktion der Überlebensrate von *P. gingivalis* überlegen war (HNP-1-LL-37 $p = 0{,}001$, $r = 0{,}31$; HNP-1-HBD-2 $p < 0{,}000$, $r = 0{,}64$). HBD-2 übte die schwächste antimikrobielle Wirkung gegenüber *P. gingivalis* aus (LL-37-HBD-2 $p = 0{,}001$, $r = 0{,}34$). Die Regressionsanalyse bestätigte den hemmenden Einfluss aller untersuchten AMPs auf die bakterielle Überlebensrate (HNP-1 $p < 0{,}000$; LL-37 $p < 0{,}000$; HBD-2 $p = 0{,}009$).

Für das Cathelicidin belegte der Kruskal-Wallis-Test einen zentralen Unterschied zwischen den Konzentrationen ($p = 0{,}002$). Der folgende Dunn-Bonferroni-Test zeigte, dass 200 µg/ml einer Konzentration von 5 µg/ml überlegen waren ($p < 0{,}000$, $r = 0{,}60$). Bei 5 µg/ml überlebten rund 35% der Anaerobier, während sich die Überlebensrate bei 200 µg/ml auf circa 10% reduzierte.

Die Steigerung der Konzentration bewirkte für HNP-1 keinen signifikanten Mehrwert in der Reduktion der bakteriellen Überlebensrate. So erzielten 5 µg/ml eine Reduktion der Überlebensrate auf etwa 10%, wohingegen eine 10-fache Konzentration benötigt wurde, um die Überlebensrate auf ca. 6% zu verringern. Eine Vervierfachung dieser Konzentration senkte die Überlebensrate lediglich auf etwa 5%.

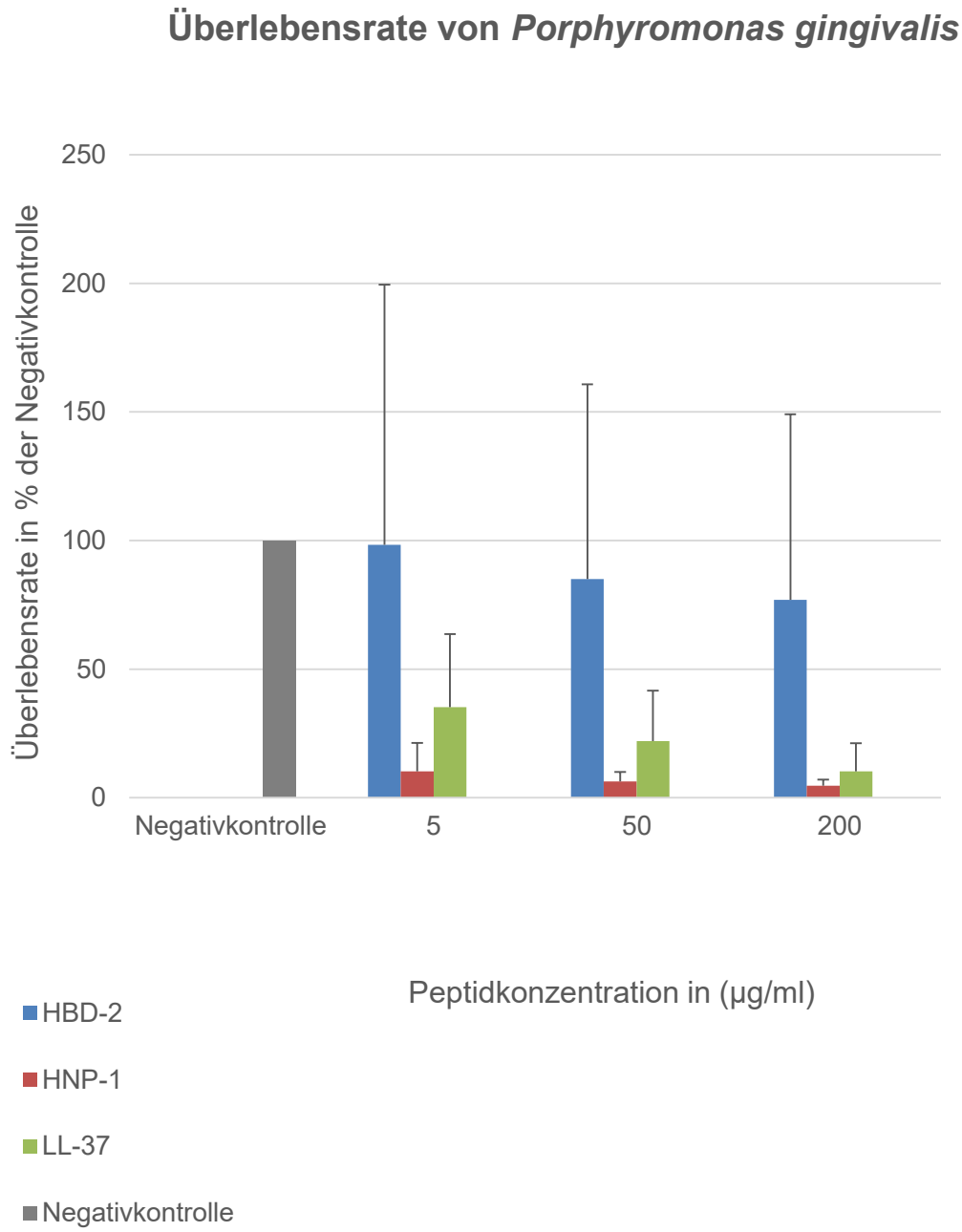

Abbildung 18: Überlebensrate von *P. gingivalis*

Im Folgenden wird die Wirksamkeit der antimikrobiellen Peptide in Abhängigkeit von den pH-Werten dargestellt. Der Kruskal-Wallis-Test stellte sowohl unter HNP-1 als auch unter LL-37 einen zentralen Unterschied zwischen den pH-Werten fest (HNP-1 (pH-Werte) $p < 0{,}000$; LL-37 (pH-Werte) $p = 0{,}015$). Infolgedessen fand der Dunn-Bonferroni-Test Anwendung, der bei einem pH-Wert von 5,0 eine geringere Überlebensrate von *P. gingivalis* als bei einem pH-Wert von 7,0 ermittelte (HNP-1 (pH 5,0-pH 7,0) $p < 0{,}000$, $r = 0{,}70$; LL-37 (pH 5,0-pH 7,0) $p = 0{,}005$, $r = 0{,}47$).

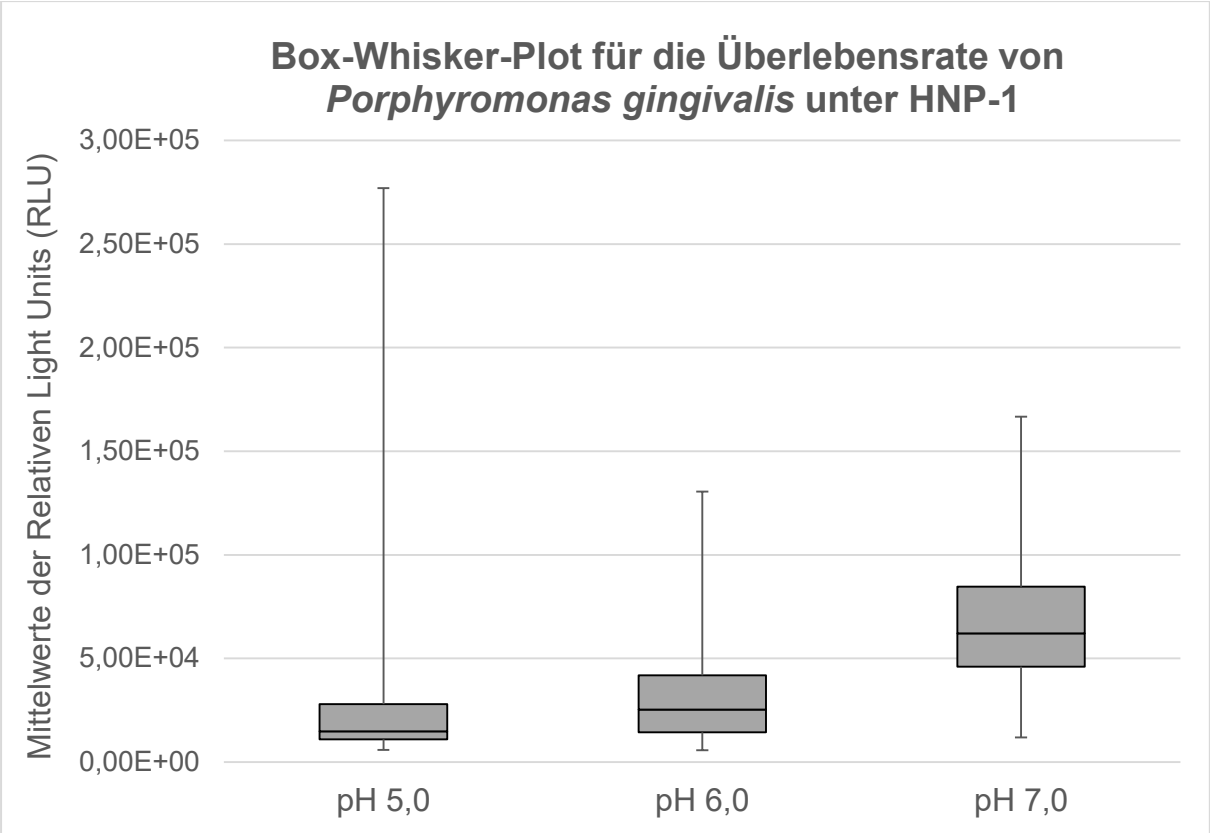

Abbildung 19: Darstellung der Überlebensrate von *P. gingivalis* bei pH 5,0, pH 6,0 und pH-7,0 unter HNP-1

Zudem zeigte der Dunn-Bonferroni-Test für das Peptid HNP-1, dass sich die Überlebensrate von *P. gingivalis* bei einem pH-Wert von 6,0 stärker reduzierte als bei einem pH-Wert von 7,0 ($p = 0{,}001$, $r = 0{,}55$).

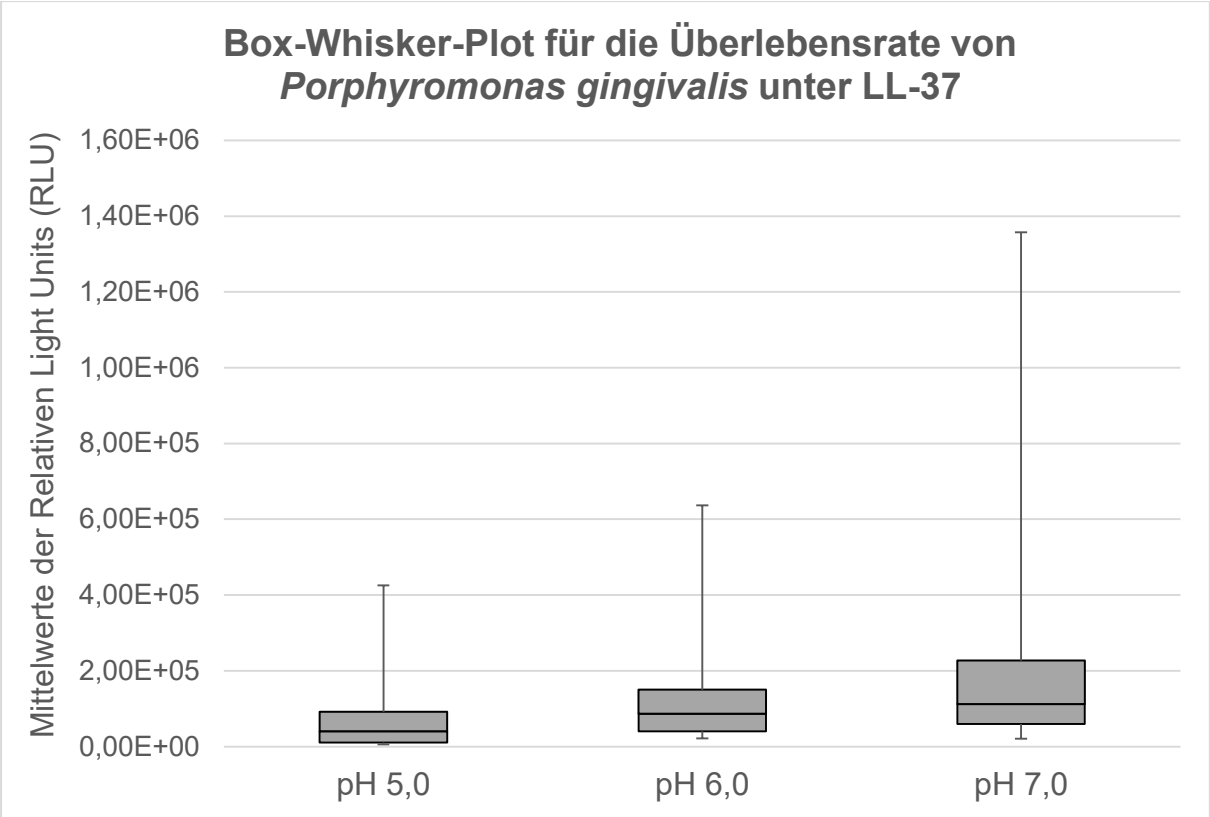

Abbildung 20: Darstellung der Überlebensrate von *P. gingivalis* bei pH 5,0, pH 6,0 und pH 7,0 unter LL-37

Für LL-37 belegte der Dunn-Bonferroni-Test, dass die bakterielle Überlebensrate bei einem pH-Wert von 5,0 geringer als bei einem pH-Wert von 6,0 ausfiel ($p = 0,046$, $r = 0,33$).

Die Regressionsanalyse bestätigte für alle drei Peptide (HNP-1, LL-37, HBD-2) einen Zusammenhang zwischen dem pH-Wert von 5,0 und einer Reduktion der Überlebensrate von *P. gingivalis* (HNP-1 (pH 5,0) $p = 0,018$; LL-37 (pH 5,0) $p = 0,026$; HBD-2 (pH 5,0) $p = 0,027$). Allerdings konnte für HBD-2 kein zentraler Unterschied zwischen den pH-Werten ermittelt werden.

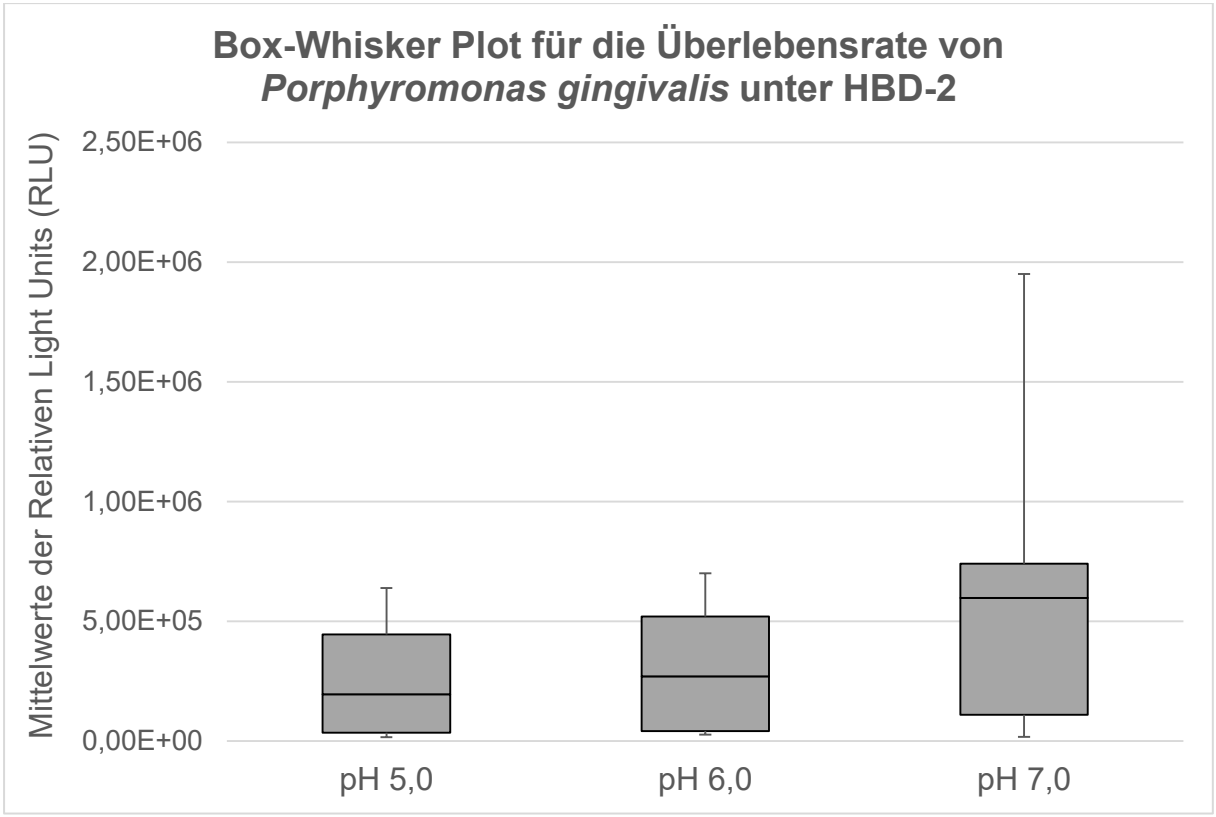

Abbildung 21: Darstellung der Überlebensrate von *P. gingivalis* bei pH 5,0, pH 6,0 und pH 7,0 unter HBD-2

Des Weiteren zeigte der Mann-Whitney-U-Test einen zentralen Unterschied zwischen den molaren Pufferlösungen für HNP-1 ($p = 0{,}003$, $r = 0{,}40$). Die Regressionsanalyse bestätigte sowohl für HNP-1 als auch für LL-37 den Zusammenhang zwischen einem 0,1 M Phosphatpuffer und einer höheren Überlebensrate von *P. gingivalis* (HNP-1 (0,1 M) $p = 0{,}002$; LL-37 (0,1 M) $p = 0{,}047$). In der folgenden Abbildung 22 wird die Überlebensrate von *P. gingivalis* in Abhängigkeit von einem 0,1 M und einem 0,2 M Phosphatpuffer unter der Wirkung von HNP-1 dargestellt.

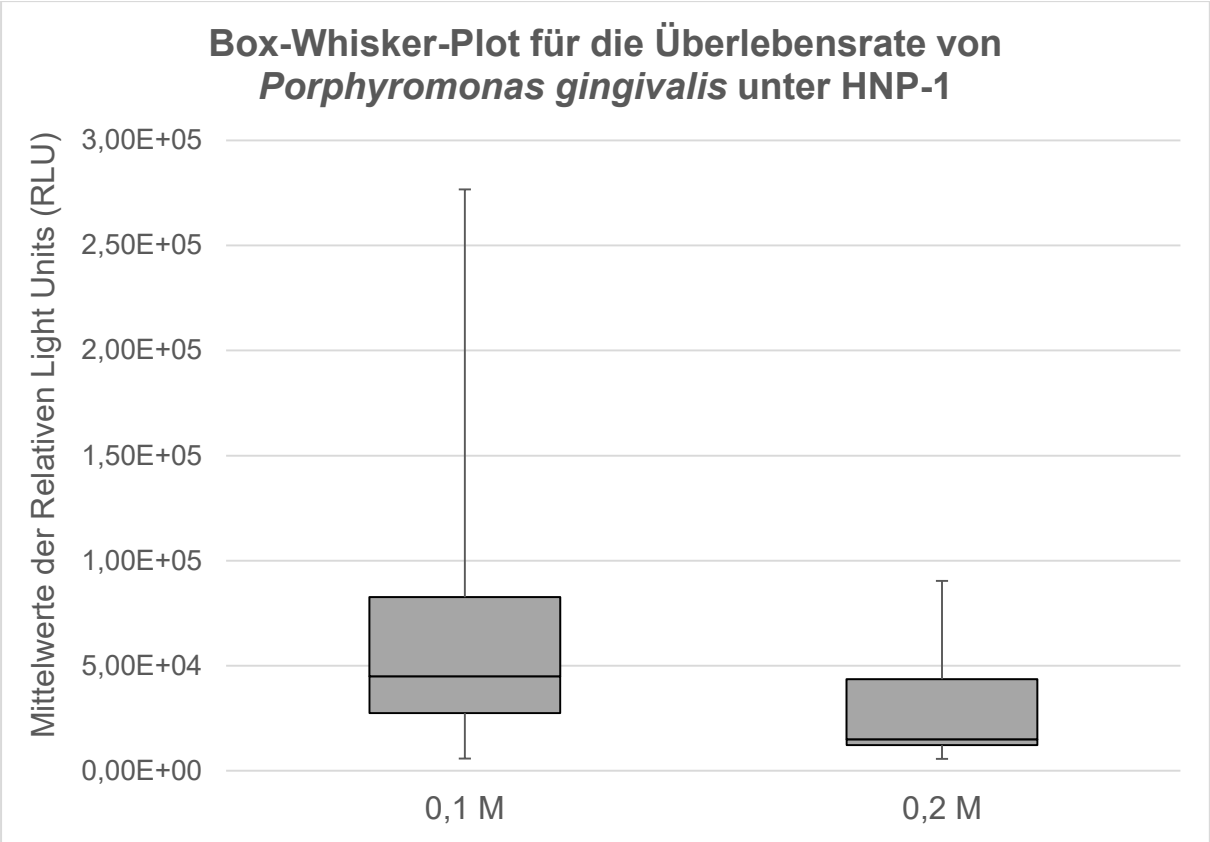

Abbildung 22: Darstellung der Überlebensrate von *P*. *gingivalis* bei 0,1 M und 0,2 M unter der Wirkung von HNP-1

Zusammenfassend lässt sich eine klare Empfehlung zur Bekämpfung von *P. gingivalis* aussprechen. Die stärkste Reduktion der bakteriellen Überlebensrate wurde durch eine Behandlung mit HNP-1 bei einem pH-Wert von 5,0 (0,2 M) erzielt.

4.2 Überlebensrate von *Fusobacterium nucleatum*

In Abbildung 23 wird die Überlebensrate von *F. nucleatum* unabhängig von den pH-Werten und der Stoffmengenkonzentration dargestellt, um signifikante Beziehungen zwischen den Peptiden zu demonstrieren. Der Kruskal-Wallis-Test belegte einen zentralen Unterschied zwischen den antimikrobiellen Peptiden ($p < 0{,}000$). Der im Anschluss durchgeführte Dunn-Bonferroni-Test zeigte, dass LL-37 die bakterielle Überlebensrate signifikant reduzierte und den Defensinen überlegen war (LL-37–HNP-1 $p < 0{,}000$, $r = 0{,}50$; LL-37-HBD-2 $p < 0{,}000$, $r = 0{,}59$). Dabei zeigte das β-Defensin die schwächste antimikrobielle Wirkung.

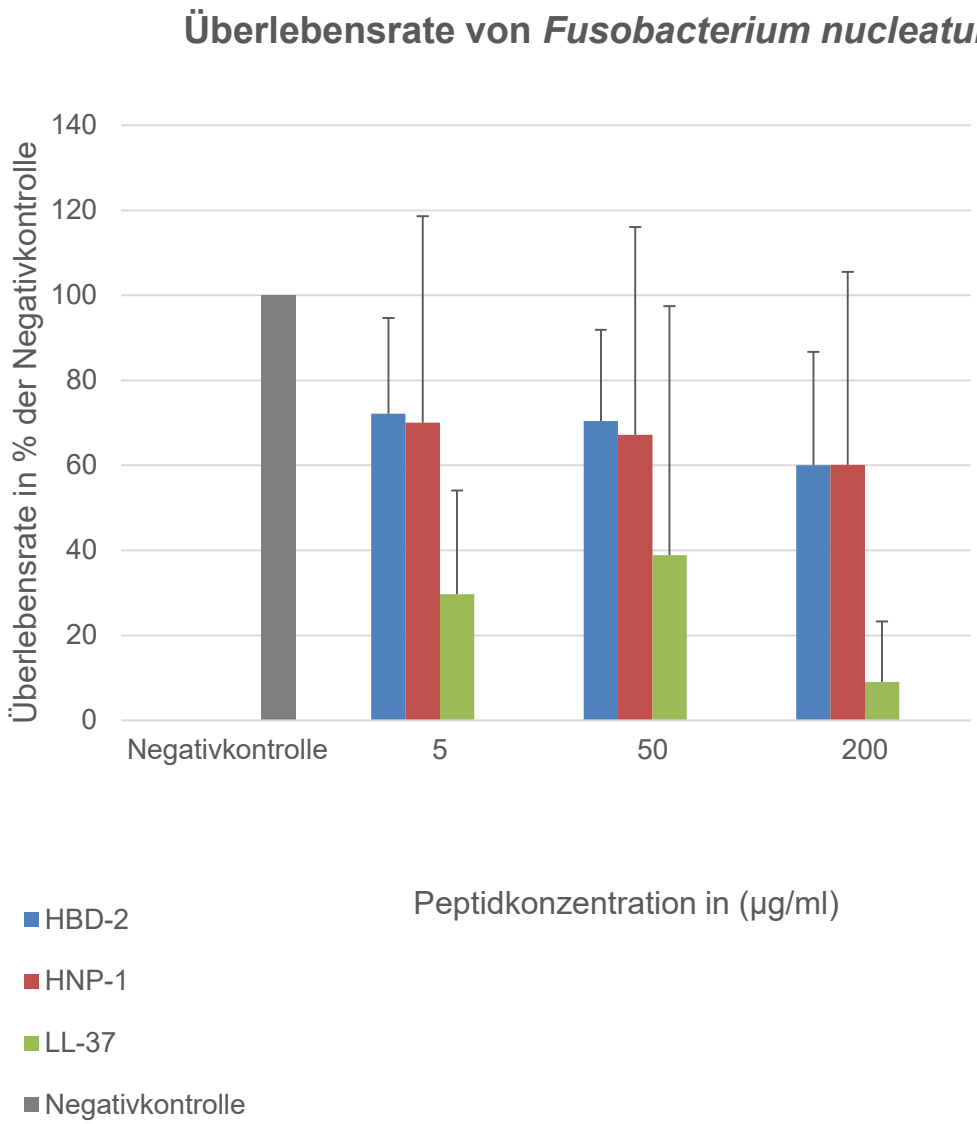

Abbildung 23: Überlebensrate von *Fusobacterium nucleatum*

Die Regressionsanalyse bestätigte den hemmenden Einfluss der Peptide auf die Überlebensrate von *F. nucleatum* (LL-37 $p < 0{,}000$; HNP-1 $p = 0{,}003$; HBD-2 $p = 0{,}007$). Die Steigerung der Peptidkonzentration zeigte für keines der AMPs einen zentralen Unterschied in der Reduktion der bakteriellen Überlebensrate.

In Abbildung 24 und in Abbildung 25 wird die Überlebensrate von *F. nucleatum* in Abhängigkeit von den pH-Werten nach der Behandlung von HNP-1 und HBD-2 dargestellt.

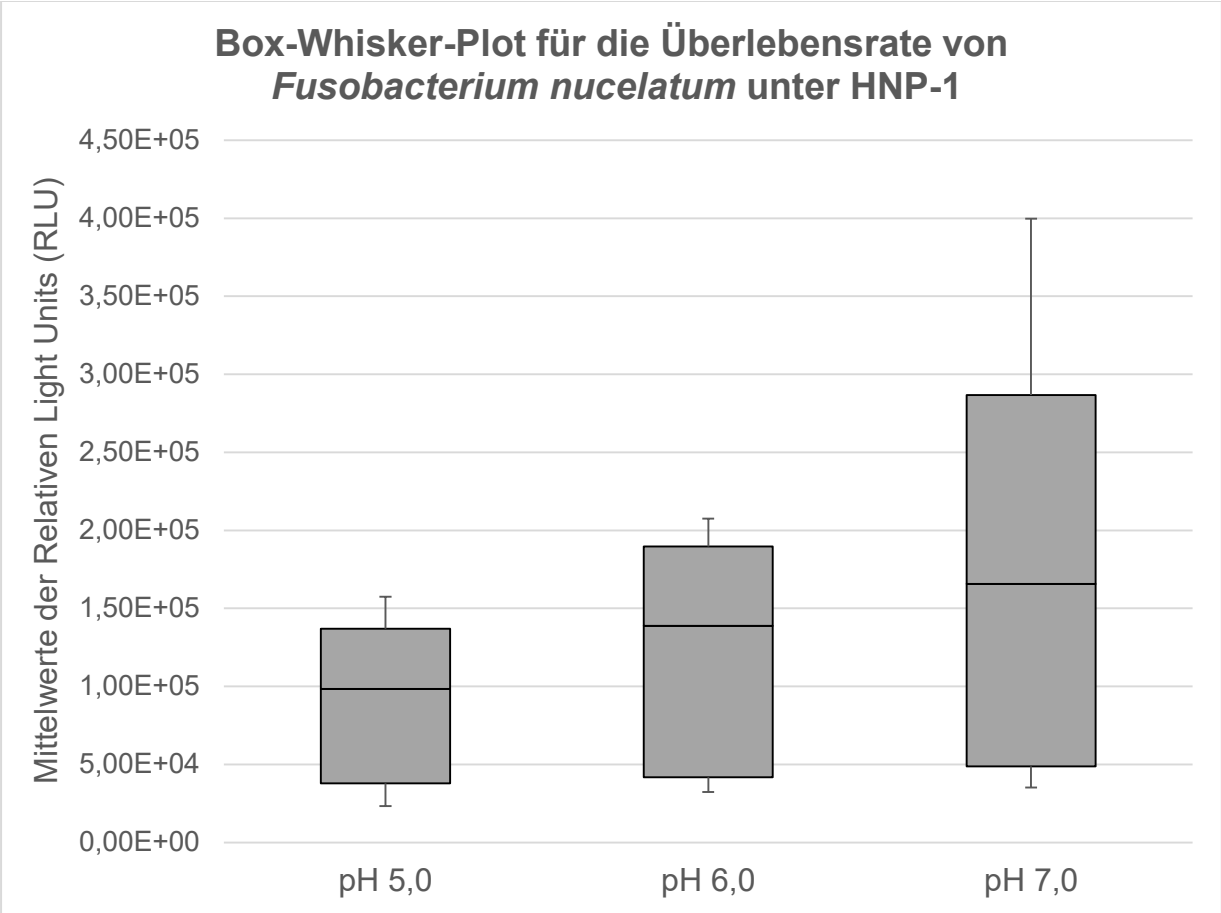

Abbildung 24: Darstellung der Überlebensrate von *F. nucleatum* bei pH 5,0, pH 6,0 und pH 7,0 unter HNP-1

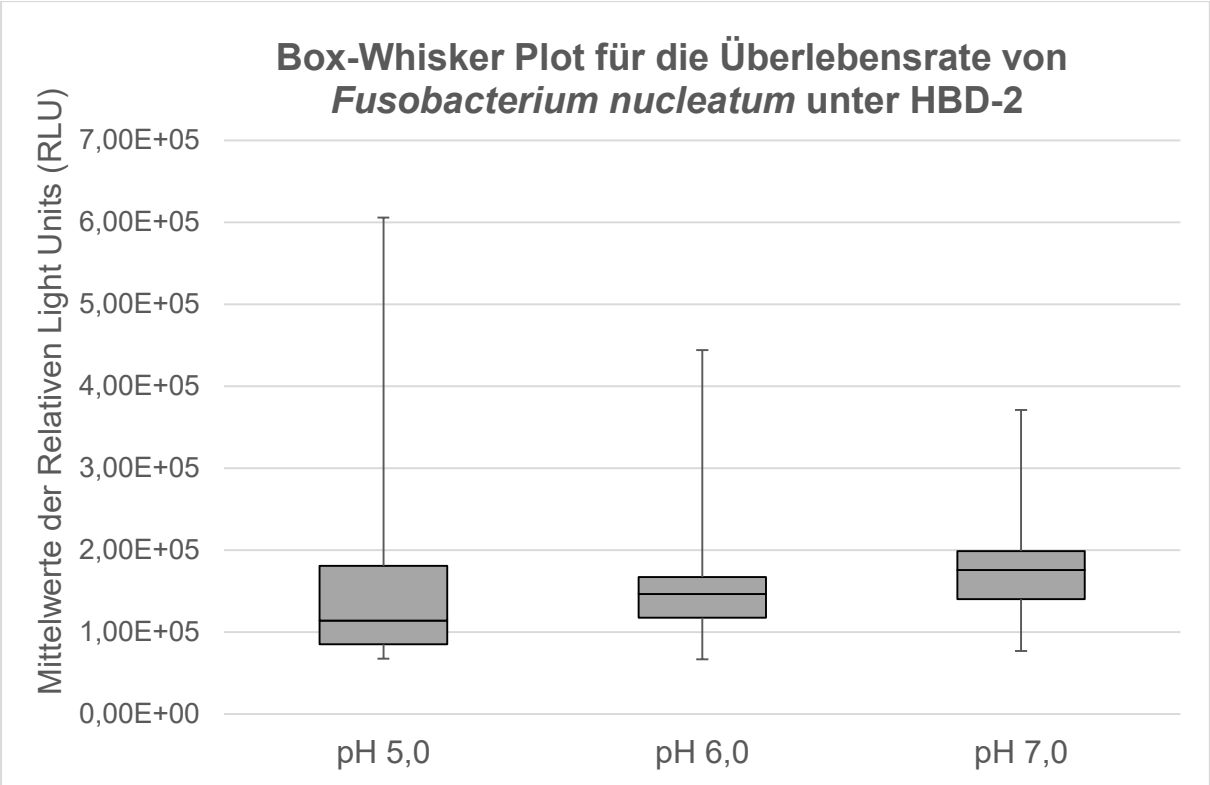

Abbildung 25: Darstellung der Überlebensrate von *F. nucleatum* bei pH 5,0, pH 6,0 und pH 7,0 unter HBD-2

Der Kruskal-Wallis-Test ermittelte sowohl unter der Wirkung von HNP-1 als auch unter HBD-2 einen zentralen Unterschied für die bakterielle Überlebensrate zwischen den pH-Werten (HNP-1 (pH-Werte) p = 0,012; HBD-2 (pH-Werte) p = 0,004). Der im Anschluss folgende Dunn-Bonferroni-Test zeigte, dass bei einem pH-Wert von 5,0 eine geringere Überlebensrate von *F. nucleatum* als bei einem pH-Wert von 7,0 festzustellen war (HNP-1 (pH 5,0-pH 7,0) p = 0,003, r = 0,50; HBD-2 (pH 5,0-pH 7,0) p = 0,001, r = 0,60). Zudem bestätigte die Regressionsanalyse für die Defensine einen signifikanten Zusammenhang zwischen dem pH-Wert von 5,0 und der Abnahme der bakteriellen Überlebensrate (HNP-1 (pH 5,0) p = 0,002; HBD-2 (pH 5,0) p = 0,004).

Allerdings übte das Cathelicidin LL-37 den stärksten antimikrobiellen Effekt auf die Überlebensrate von *F. nucleatum* aus.

4.3 Überlebensrate von *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

In Abbildung 26 wird die Überlebensrate von *A. actinomycetemcomitans* dargestellt.

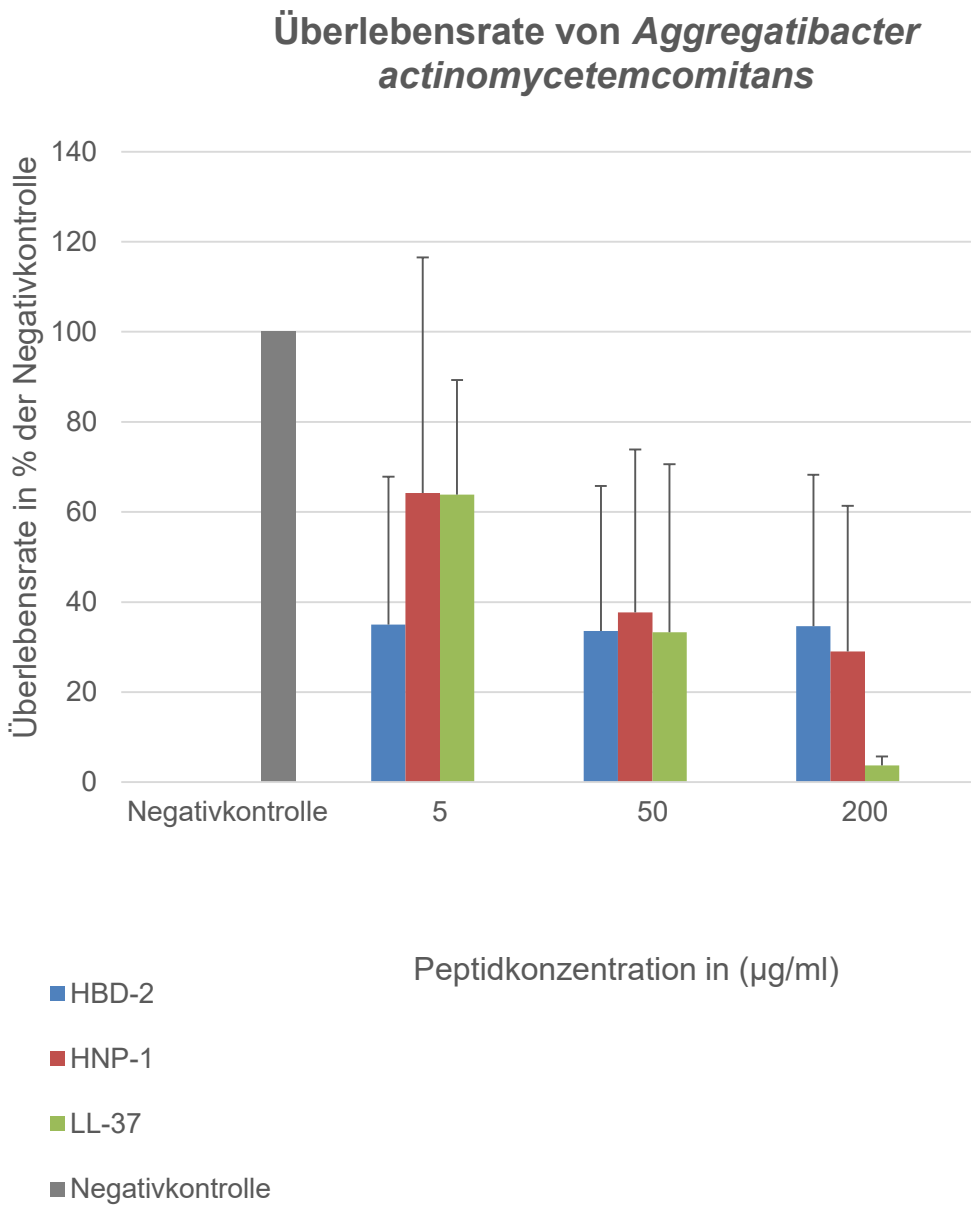

Abbildung 26: Überlebensrate von *A. actinomycetemcomitans*

Die Regressionsanalyse zeigte, dass die antimikrobiellen Peptide eine Reduktion der Überlebensrate von *A. actinomycetemcomitans* bewirkten (LL-37 $p < 0{,}000$; HNP-1 $p < 0{,}000$; HBD-2 $p < 0{,}000$). Für HBD-2 war unabhängig von der gewählten Konzentration eine Überlebensrate von ungefähr 35% festzustellen.

Sowohl für LL-37 als auch für HNP-1 stellte der Kruskal-Wallis-Test einen zentralen Unterschied für die bakterielle Überlebensrate zwischen den Konzentrationen fest (LL-37 (Konzentration) $p < 0,000$; HNP-1 (Konzentration) $p = 0,006$). Der folgende Dunn-Bonferroni-Test belegte, dass eine Konzentration von 200 µg/ml einer Konzentration von 5 µg/ml überlegen war (LL-37 (200 µg/ml-5 µg/ml) $p < 0,000$, $r = 0,93$; HNP-1 (200 µg/ml-5 µg/ml) $p = 0,002$, $r = 0,53$). HNP-1 verringerte die bakterielle Überlebensrate bei 5 µg/ml auf etwa 64%, wohingegen diese bei 200 µg/ml bei circa 29% lag. Unter LL-37 überlebten bei 5 µg/ml etwa 64% der Anaerobier. Bei einer Verwendung der 10-fachen Konzentration von LL-37 wurde die Überlebensrate von *A. actinomycetemcomitans* auf etwa 33% reduziert (5 µg/ml-50 µg/ml $p = 0,005$, $r = 0,47$). Eine Vervierfachung dieser Konzentration verringerte die bakterielle Überlebensrate auf ca. 4% (50 µg/ml-200 µg/ml $p = 0,006$, $r= 0,46$). Tabelle 3 stellt den Einfluss der Konzentration für LL-37 in einer Übersicht dar.

Konzentration	**Negativkontrolle**	**5 µg/ml**	**50 µg/ml**	**200 µg/ml**
Überlebensrate	100%	64%	33%	4%

Tabelle 3: Vergleich der Konzentrationen und Überlebensraten von *A. actinomycetemcomitans* bei einem Einsatz von LL-37

Die Regressionsanalyse bestätigte, dass HNP-1 und LL-37 sowohl bei einer Konzentration von 50 µg/ml als auch bei 200 µg/ml einen signifikanten Einfluss auf die Reduktion der Überlebensrate von *A. actinomycetemcomitans* nahmen (HNP-1 (50 µg/ml) $p = 0,014$; HNP-1 (200 µg/ml) $p = 0,003$; LL-37 (50 µg/ml) $p < 0,000$; LL-37 (200 µg/ml) $p < 0,000$).

Zusammenfassend lässt sich für die Reduktion der Überlebensrate von *A. actinomycetemcomitans* eine klare Empfehlung für LL-37 in der Konzentration von 200 µg/ml aussprechen.

Die Übersicht über die Signifikanzen kann den Tabellen des Anhangs (Tabelle 4 bis Tabelle 9) entnommen werden.

5 Diskussion

Die mikrobiologische Arbeit untersucht die Wirkung antimikrobieller Peptide auf die Überlebensrate parodontalpathogener Bakterien. Dabei wurde die Steigerung der Peptidkonzentration berücksichtigt. Da AMPs in der Immunabwehr eine bedeutende Rolle spielen und in verschiedenen Organen des Körpers auftreten (Dale *et al*., 2006, Hancock und Scott, 2000), ist es von großer Wichtigkeit, natürlich vorherrschende Umgebungsbedingungen in ihren Wirkmechanismus einzubeziehen. Deshalb wurde in dieser Studie die Wirkung der antimikrobiellen Peptide (HBD-2, HNP-1, LL-37) in Abhängigkeit von verschiedenen pH-Werten (pH 5,0, pH 6,0, pH 7,0) und der ionischen Stärke auf die bakterielle Überlebensrate geprüft. Hierfür kamen molare Pufferlösungen (0,1 M, 0,2 M) für die entsprechenden pH-Werte zum Einsatz.

Die Ergebnisse der Arbeit verdeutlichten, dass HBD-2 sowohl auf *P. gingivalis* als auch auf *F. nucleatum* die schwächste antimikrobielle Wirkung ausübte. Die Steigerung der Konzentration von HBD-2 erzielte für keines der untersuchten Bakterien einen signifikanten Mehrwert in der Senkung der bakteriellen Überlebensrate, die sich für *P. gingivalis* und für *F. nucleatum* auf ca. 60% bis 75% und für *A. actinomycetemcomitans* auf etwa 35% reduzierte.

Eine Studie von Joly und Kollegen untersuchte die Sensibilität von Anaerobiern und Aerobiern gegenüber HBD-2 und HBD-3. Dabei stellte sich heraus, dass Aerobier im Vergleich zu Anaerobiern empfindlicher auf β-Defensine waren. Die minimale Hemmkonzentration von HBD-2 lag für parodontalpathogene Anaerobier abhängig von dem Bakterienstamm bei über 250 µg/ml (Joly *et al*., 2004). HBD-2 zeigt gegenüber gramnegativen Bakterien bessere antimikrobielle Wirkung als gegenüber grampositiven Bakterien (Harder *et al*., 1997). Ouhara und Kollegen zeigten, dass bestimmte Stämme von *A*. *actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* und *P. intermedia* empfindlicher auf die Wirkung von HBD-3 und LL-37 als auf HBD-1 und HBD-2 reagierten. Darüber hinaus erwies sich *F. nucleatum* verglichen mit anderen parodontalpathogenen Bakterien am empfindlichsten gegenüber LL-37 und HBD-3. Die minimale Hemmkonzentration lag für die beiden Peptide abhängig von dem getesteten Bakterienstamm zwischen 12,5 mg/L und 25 mg/L. Die MIC von LL-37 und von HBD-3 belief sich für die Bakterienstämme von *P. gingivalis*, *P. intermedia* und für

die meisten Stämme von *A. actinomycetemcomitans* auf rund 100 mg/L bis 200 mg/L (Ouhara *et al*., 2005).

Unsere Ergebnisse bestätigten, dass LL-37 für *F. nucleatum* den anderen Peptiden überlegen war (LL-37-HNP-1 $p < 0{,}000$, $r = 0{,}50$; LL-37-HBD-2 $p < 0{,}000$, $r = 0{,}59$). Für die Sensibilität von *A. actinomycetemcomitans* und von *P. gingivalis* spielte die Peptidkonzentration des Cathelicidins eine wichtige Rolle. Unsere Ergebnisse zeigten, dass 5 µg/ml die Überlebensrate von *A. actinomycetemcomitans* auf circa 64% reduzierten, wohingegen die Überlebensrate bei 200 µg/ml etwa 4% betrug ($p < 0{,}000$, $r = 0{,}93$). Lag die Überlebensrate von *P. gingivalis* bei einer Konzentration von 5 µg/ml bei etwa 35%, reduzierte sich diese bei 200 µg/ml auf etwa 10% ($p < 0{,}000$, $r = 0{,}60$).

Altman schilderte eine verminderte Wirksamkeit von LL-37 gegenüber *P. gingivalis* und *A. actinomycetemcomitans* (Altman *et al*., 2006). Bakterielle Proteasen inaktivieren die antimikrobielle Wirksamkeit des Cathelicidins (Schmidtchen *et al*., 2002). Allerdings führten Bachrach und Kollegen die bakterielle Unempfindlichkeit von *P. gingivalis* nicht auf bakterielle Proteasen, sondern auf eine geringe Affinität zu dem positiv geladenen Peptid zurück (Bachrach *et al*., 2008). Die Modifikation der LPS-Struktur durch kationische Moleküle reduziert die negative Oberflächenladung der äußeren Bakterienmembran und hemmt die Bindungsaffinität kationischer antimikrobieller Peptide (Nizet, 2006).

Des Weiteren stellten Raj und Kollegen fest, dass sowohl bestimmte Stämme von *A. actinomycetemcomitans* als auch von *P. gingivalis* bis zu einer Peptidkonzentration von 200 µM nicht sensibel gegenüber α-Defensinen waren (Raj *et al*., 2000). Miyasaki und Mitarbeiter bestätigten, dass α-Defensine keine beachtliche antimikrobielle Wirksamkeit gegenüber *A. actinomycetemcomitans* ausübten (Miyasaki *et al*., 1990).

Unsere Beobachtungen konnten die Ergebnisse der oben dargestellten Studien nicht bestätigen, da HNP-1 bei 5 µg/ml die Überlebensrate von *A. actinomycetemcomitans* auf etwa 64% reduzierte. Eine 40-fache Konzentrationssteigerung auf 200 µg/ml veranlasste eine Senkung der bakteriellen Überlebensrate auf ca. 29% ($p = 0{,}002$, $r = 0{,}53$). Für *P. gingivalis* war HNP-1 sowohl LL-37 als auch HBD-2 überlegen (HNP-1-LL-37 $p = 0{,}001$, $r = 0{,}31$; HNP-1-HBD-2 $p < 0{,}000$, $r = 0{,}64$). Die Überlebensrate von

P. gingivalis sank unabhängig von der ausgewählten α-Defensin Konzentration auf etwa 5%-10%.

Nach unserer Erkenntnis wird die erste Arbeitshypothese angenommen, da AMPs unterschiedliche Wirkung auf Monospezieskulturen zeigten. Die verwendeten Peptidkonzentrationen (5 µg/ml; 50 µg/ml; 200 µg/ml) in der vorliegenden Arbeit richteten sich nach der MIC der AMPs vorausgegangener Studien. Für HBD-2 wurde von einer MIC von über 250 µg/ml für parodontalpathogene Bakterien berichtet (Joly *et al*., 2004).

Die Studien weisen keine übereinstimmenden Ergebnisse in der antimikrobiellen Wirkung von AMPs gegenüber Bakterien auf. Gründe für die uneinheitliche Studienlage können neben der Inkubationszeit der Mikroorganismen auch die Verwendung unterschiedlicher Medien sein. Medien, die eine große Anzahl an Ionen enthalten, ahmen physiologische Gegebenheiten nach. Allerdings ist besonders bei Studien, die verschiedene Umweltfaktoren berücksichtigen, zu beachten, dass bereits im Medium vorhandene Ionen die Wirkung der AMPs beeinflussen können (Walkenhorst, 2016). Deshalb wurde in dieser Arbeit Phosphatgepufferte Salzlösung, die mit 1% BHI Medium versetzt wurde, verwendet (Walkenhorst *et al*., 2013). Des Weiteren spielt die Art der Kultivierung von Mikroorganismen eine wichtige Rolle. Häufig wurde die Sensibilität planktonischer Bakterien gegenüber AMPs getestet. Allerdings werden sämtliche orale Krankheitsbilder mit einem Biofilm assoziiert (Darveau, 2010, Neelakantan *et al*., 2017). Bei einem Biofilm, wie er in der Mundhöhle vorherrscht, akkumulieren und interagieren verschiedene Spezies und ihre Stoffwechselprodukte und organisieren sich zu einem festen Verbund (Costerton *et al*., 1987). Zudem sichern sie ihr Überleben durch das Quorum sensing, ein interbakterieller Informationsaustausch (Marsh, 2004). In unserem Versuch fand ein Monospezies-Biofilmmodell Anwendung, welches nicht dem Aufbau eines oralen Biofilms gleicht. Grund hierfür ist die Testung der Sensibilität einzelner parodontalpathogener Bakterien gegnüber ausgewählten AMPs in Abhängigkeit von verschiedenen Umweltbedingungen. Jedoch gilt zu beachten, dass zahlreiche Faktoren wie der pH-Wert oder die ionische Stärke die antimikrobielle Wirksamkeit beeinflussen (Walkenhorst, 2016). Ionen, die bereits in geringen Konzentrationen im Speichel vertreten sind, nehmen Einfluss auf die antimikrobielle Wirkung der Peptide (Gursoy und Könönen, 2012). Infolgedessen richtete unser Versuch sein Augenmerk

auf die Wirkung der AMPs gegenüber der Überlebensrate von Mikroorganismen in Abhängigkeit von verschiedenen pH-Werten und der ionischen Stärke.

Kationische antimikrobielle Peptide interagieren über elektrostatische und hydrophobe Wechselwirkungen mit den anionischen bakteriellen Membranbestandteilen (Matsuzaki, 1999). Der vorherrschende pH-Wert beeinflusst die Wechselwirkung zwischen Peptid und bakterieller Membran, da die beteiligten funktionalen Gruppen abhängig von ihren pKa-Werten protonieren, und sich dadurch die Nettoladung des Peptides oder der Membran verändert (Walkenhorst, 2016, Walkenhorst *et al*., 2013). Bestimmte Aminosäuren wie Histidin, Asparagin- und Glutaminsäure werden unter sauren pH-Bedingungen protoniert und verleihen dem Peptid eine höhere Kationizität, wodurch sich seine Fähigkeit zur Wechselwirkung mit der negativ geladenen Bakterienmembran verbessert (Malik *et al*., 2016). Ein Beispiel stellen die antimikrobiellen Peptide Clavanine dar. Neben der Sekundärstruktur einer α-Helix zeichnen sich die Peptide durch das Auftreten der Aminosäure Histidin aus. Histidin hat einen pK_a-Wert von etwa 6,5 (Lee *et al*., 1997). Werden saure pH-Werte erreicht, die unter dem pK_a-Wert liegen, wird die Aminosäure Histidin protoniert und das Peptid erweist sich als kationischer und damit antimikrobiell wirkungsvoller (Lee *et al*., 1997). Hitchner und Kollegen bestätigten, dass das C18G-His Peptid bei einem pH-Wert von 5,0 gute, jedoch unter steigenden pH-Werten verminderte antimikrobielle Wirksamkeit gegenüber den getesteten Bakterien (*S. aureus*; *P. aeruginosa*; *A. baumannii*; *E. coli*) ausübte (Hitchner *et al*., 2019). In der Studie von Walkenhorst und Kollegen wiesen kationische Peptide bei sinkenden pH-Werten eine höhere Nettoladung auf, wodurch sich ihre MSC gegenüber gramnegativen Mikroorganismen linear mit abnehmendem pH-Wert reduzierte (Walkenhorst *et al*., 2013). Unsere Studie brachte vergleichbare Ergebnisse hervor. Wir stellten fest, dass sich die Überlebensrate von *P. gingivalis* unter der Wirkung aller Peptide bei einem pH-Wert von 5,0 signifikant verringerte (HNP-1 (pH 5,0) $p = 0{,}018$; LL-37 (pH 5,0) $p = 0{,}026$; HBD-2 (pH 5,0) $p = 0{,}027$). Unter HNP-1 beobachteten wir, dass sich die bakterielle Überlebensrate bei den pH-Werten von 5,0 und 6,0 stärker als bei einem pH-Wert von 7,0 reduzierte (pH 5,0-pH 7,0 $p < 0{,}000$, $r = 0{,}70$; pH 6,0-pH 7,0 $p = 0{,}001$, $r = 0{,}55$). Niedrige pH-Werte förderten die antimikrobielle Wirkung. Unter LL-37 war die Überlebensrate von *P. gingivalis* bei einem pH-Wert von 5,0 geringer als bei den pH-Werten von 6,0 und 7,0 (pH 5,0-pH 6,0 $p = 0{,}046$, $r = 0{,}33$; pH 5,0-pH 7,0 $p = 0{,}005$, $r = 0{,}47$).

Aufgrund der verbesserten Defensinwirkung bei einem sauren pH-Wert konnte für das Bakterium *F. nucleatum* bei einem pH-Wert von 5,0 eine geringere Überlebensrate als bei einem pH-Wert von 7,0 beobachtet werden (HNP-1 (pH5,0-pH 7,0) p= 0,003, r = 0,50; HBD-2 (pH 5,0-pH 7,0) p = 0,001, r = 0,60).

Die α-helikale Struktur von LL-37, die mit der antimikrobiellen Wirksamkeit des Peptides korreliert, nimmt bei pH-Werten unter 5,0 ab (Johansson *et al*., 1998). Die größte Tendenz zur Ausbildung einer α-Helix entfaltet die Aminosäure Alanin (Pace und Scholtz, 1998). Die Erweiterung der Aminosäuresequenz des antimikrobiellen Peptides Magainin-2 um 10 Lysin Aminosäuren am N- oder C-Terminus erhöht seine α-Helizität von 35% auf etwa 62% bis 88% und steigert dadurch seine antimikrobielle Wirkung (Bessalle *et al*., 1992).

Zudem beeinflussen Ionen die Struktur von LL-37 und damit die Wirkung des Peptids (Zelezetsky *et al*., 2006). Die F-Form (unstrukturierte Form) zeigt antimikrobielle Wirkung, wohingegen die A-Form (strukturierte Form) die Immunantwort moduliert (Morgera *et al*., 2009). Ulaeto und Kollegen beobachteten für LL-37, dass die Zunahme der α-helikalen Struktur die antimikrobielle Wirkung gegenüber *E. coli* und *S. aureus* verringerte. Nahm das Peptid eine unstrukturierte Form an, assoziierte es mit der bakteriellen Membran unter Ausbildung einer α-Helix und veranlasste schließlich die Membranpermeabilisierung über eine Porenbildung (Ulaeto *et al*., 2016).

AMPs entfalten in Medien geringer ionischer Stärke gute antimikrobielle Wirksamkeit (Bowdish *et al*., 2006). Singh und Kollegen untersuchten den Einfluss von NaCl auf die antimikrobielle Wirkung von HBD-1 und HBD-2 und verwendeten hierfür NaCl-Konzentrationen zwischen 0 mM und 200 mM. Dabei fanden sie heraus, dass der hemmende Einfluss von NaCl auf die antimikrobielle Wirkung durch eine Steigerung der Peptidkonzentration ausgeglichen werden konnte (Singh *et al*., 1998). Unter niedrigen NaCl-Konzentrationen übt HBD-1 antimikrobielle Wirksamkeit aus, die sich allerdings bei einem NaCl-Anstieg von 50 mM auf 125 mM verringert (Goldman *et al*., 1997).

Unsere Studie untersuchte den Einfluss molarer Pufferlösungen auf die antimikrobielle Wirkung der Peptide. Dabei kamen Peptidkonzentrationen von 5 µg/ml, 50 µg/ml und 200 µg/ml zum Einsatz. Unsere Ergebnisse deckten sich nicht mit den oben

beschriebenen Studien, da bei einer niedrigen Stoffmengenkonzentration (0,1 M) sowohl unter HNP-1 als auch unter LL-37 ein steigender Effekt auf die Überlebensrate von *P. gingivalis* beobachtet werden konnte (HNP-1 (0,1 M) p = 0,002; LL-37 (0,1 M) p = 0,047). Speziell für HNP-1 zeichnete sich ein signifikanter Unterschied für die bakterielle Überlebensrate zwischen den molaren Pufferlösungen ab (p = 0,003, r = 0,40). Allerdings gilt zu beachten, dass die niedrigste Konzentration, die in unserer Studie verwendet wurde, einer 10-fachen Steigerung der Konzentration von Singh und Kollegen entsprach, und wir keine Zufuhr von NaCl, sondern molare Pufferlösungen verwendeten.

Die Zufuhr von NaCl wirkt sich auf die Wechselwirkung zwischen AMP und bakterieller Membran aus (Ouhara *et al*., 2005). Ouhara und Kollegen zeigten, dass 100 mM NaCl die Wirkung von HBD-1 und HBD-2 reduzierten, wohingegen LL-37 und HBD-3 kaum beeinflusst wurden. Erst bei einem Einsatz von 500 mM NaCl wurde für alle Peptide eine verringerte antimikrobielle Wirksamkeit beobachtet (Ouhara *et al*., 2005). Das Peptid HBD-3 zeigt sich unempfindlich auf Na^+-Konzentrationen bis zu 200 mM, was auf seine Nettoladung zurückgeführt werden kann (Gursoy und Könönen, 2012). Nagaoka und Kollegen zeigten, dass HNP-1 bei 150 mM NaCl seine antimikrobielle Wirkung verlor, wohingegen die Wirkung von LL-37 um das 10-fache eingeschränkt war. Allerdings erzielten die beiden Peptide einen synergetischen Effekt in der Membranpermeabilisierung (Nagaoka *et al*., 2000). Der Zusatz von NaCl führt zum Verlust der α-helikalen Peptidstruktur, wodurch die antimikrobielle Wirkung reduziert wird (Park *et al*., 2004). Dorschner und Kollegen stellten in Verbindung mit Natriumhydrogenkarbonat eine erhöhte bakterielle Empfindlichkeit gegenüber antimikrobiellen Peptiden fest (Dorschner *et al*., 2006).

Die zweite Arbeitshypothese kann weitestgehend angenommen werden. Der pH-Wert beeinflusste die antimikrobielle Wirkung gegenüber *P. gingivalis* und *F.* nucleatum, da die Peptide speziell bei einem pH-Wert von 5,0 einen starken Effekt auf die bakterielle Überlebensrate zeigten, indem sie diese signifikant reduzierten (siehe Ergebnisse). Besonders unter einem pH-Wert von 5,0 verbesserte sich die antimikrobielle Wirkung im Vergleich zu einem pH-Wert von 7,0 (siehe Ergebnisse). Für *A. actinomycetemcomitans* konnten wir keinen signifikanten Einfluss der pH-Werte auf die antimikrobielle Wirkung feststellen. Anders als in den oben beschriebenen Studien erhöhte sich die Überlebensrate von *P. gingivalis* unter HNP-1 und LL-37 bei einem

0,1 M Phosphatpuffer. Eine Erklärung hierfür kann die Herstellung der molaren Pufferlösung sein. In unserem Versuch wurden K_2HPO_4 und KH_2PO_4 verwendet. Die Erhöhung der Ionenstärke erfolgte nicht über den Zusatz von NaCl.

Es gibt keine einheitliche Studienlage hinsichtlich der Wirkung von AMPs auf die bakterielle Überlebensrate in Abhängigkeit von den pH-Werten und der ionischen Stärke. Obgleich keinem AMP eine antimikrobielle Wirkung gegenüber allen Bakterien zugesprochen werden kann, tragen sie entscheidend zur Bekämpfung der Mikroorganismen bei. Antimikrobielle Peptide wehren Infektionen ab, indem sich ihre Wirkung gegen Bakterien, Pilze und vereinzelte Viren richtet (Bals, 2000). Klinisch betrachtet können unsere Ergebnisse zu einer verbesserten und frühzeitigen Behandlung oraler Infektionen beitragen. Stellt sich ein AMP als besonders wirksam gegenüber oralpathogenen Mikroorganismen heraus, kann es beispielsweise zur Parodontitistherapie eingesetzt werden. Darüber hinaus ist die Behandlung parodontal erkrankter Patienten von ganzheitlicher Relevanz, da die chronische Entzündung des Zahnhalteapparates die Entstehung kardiovaskulärer Erkrankungen begünstigt (Liccardo *et al*., 2019). Die antimikrobielle Wirksamkeit bestimmter AMPs verbessert sich bei einem sauren pH-Wert infolge der Protonierung von Aminosäuren wie Histidin (Lee *et al*., 1997, Malik *et al*., 2016).

Die ausgeprägte antimikrobielle Wirkung unter sauren pH-Werten kann für den Organismus insbesondere bei Infektionen, Entzündungen oder Abszessen von Bedeutung sein. Aus diesem Grund könnten AMPs bei Entzündungsprozessen iatrogen eingebracht werden, um die antimikrobielle Wirkung zu steigern. Zudem würden sich AMPs als Bestandteil der angeborenen Immunantwort gut als Zusatz in Zahnpflegeprodukten eignen.

Jedoch sind weiterführende Studien notwendig, um einen detaillierten Einblick in die Wirkmechanismen der antimikrobiellen Peptide insbesondere unter dem Einfluss verschiedener Umweltbedingungen zu gewinnen.

6 Zusammenfassung

Oralpathogene Mikroorganismen können in der Mundhöhle Infektionen und bakterienassoziierte Erkrankungen wie die Parodontitis auslösen. Dabei kann antimikrobiellen Peptiden als Bestandteil der angeborenen Immunantwort eine entscheidende Bedeutung in der Abwehr von Bakterien zugeschrieben werden. Da AMPs in unterschiedlichen Organen des Körpers auftreten und zahlreiche Faktoren ihre Wirkung beeinflussen, ist es von großer Wichtigkeit, verschiedene Umweltbedingungen in ihren Wirkmechanismus einzubeziehen.

Die vorliegende Arbeit untersuchte die Wirkung antimikrobieller Peptide (HNP-1, HBD-2, LL-37) in unterschiedlichen Konzentrationen (5 µg/ml, 50 µg/ml, 200 µg/ml) auf die Überlebensrate parodontalpathogener Bakterien (*P. gingivalis*, *F. nucleatum*, *A. actinomycetemcomitans*). Dabei fand ein Monospezies-Biofilmmodell Anwendung. Um verschiedene Umweltbedingungen zu berücksichtigen, wurde der Einfluss der pH-Werte (pH 5,0, pH 6,0, pH 7,0) auf die antimikrobielle Wirkung untersucht. Weiterhin wurde eine molare Pufferlösung (0,1 M, 0,2 M) verwendet, um die ionische Stärke einzubeziehen. Zum Nachweis der bakteriellen Überlebensrate fand eine Biolumineszenz (BacTiter-Glo™ Assay) Anwendung. Über die Enzymaktivität der Luciferase wurde unter ATP-Verbrauch Luciferin oxidiert, woraufhin Lichtemission erfolgte. Über den quantitativen Nachweis von ATP konnte auf die Überlebensrate der Mikroorganismen geschlossen werden.

Die Ergebnisse verdeutlichten, dass keinem AMP eine Überlegenheit gegenüber allen Bakterien zugesprochen werden konnte. LL-37 erwies sich für *F. nucleatum* überlegen, wohingegen HNP-1 die beste antimikrobielle Wirkung gegenüber *P. gingivalis* erzielte. Für die Sensibilität von *A. actinomycetemcomitans* spielte die Höhe der Peptidkonzentration von HNP-1 und von LL-37 eine wichtige Rolle, wobei speziell eine Konzentration von 200 µg/ml einer Konzentration von 5 µg/ml überlegen war (LL-37 (200 µg/ml-5 µg/ml) $p < 0{,}000$, $r = 0{,}93$; HNP-1 (200 µg/ml-5 µg/ml) $p = 0{,}002$, $r = 0{,}53$). Die unterschiedliche Empfindlichkeit der Mikroorganismen könnte auf die in der Literatur beschriebene Bildung von Proteasen zurückgeführt werden.

Ferner beobachteten wir für *P. gingivalis* sowohl unter HNP-1 als auch unter LL-37 eine Steigerung der bakteriellen Überlebensrate unter dem Einfluss einer 0,1 M Pufferlösung (HNP-1 (0,1 M) $p = 0{,}002$; LL-37 (0,1 M) $p = 0{,}047$). In der Literatur wird

häufig der Einfluss von NaCl auf die Wirkung von antimikrobiellen Peptiden beschrieben, wobei die Ionen speziell die antimikrobielle Wirkung von Defensinen beeinträchtigen. Allerdings kann der hemmende Effekt von NaCl durch die Steigerung der Peptidkonzentration ausgeglichen werden.

Ein niedriger pH-Wert verbesserte die antimikrobielle Wirkung der Peptide gegenüber *P. gingivalis* und *F. nucleatum*. Die bakterielle Überlebensrate fiel insbesondere bei einem pH-Wert von 5,0 geringer als bei einem pH-Wert von 7,0 aus. Ein Grund für die verbesserte antimikrobielle Wirkung bei einem pH-Wert von 5,0 liefert die in der Literatur dargestellte Protonierung bestimmter Aminosäuren unter sauren pH-Wert Bedingungen.

Diese Erkenntnis könnte von therapeutischem Nutzen sein, um zusätzlich AMPs bei oralen Entzündungen zur Abwehr inflammatorischer Prozesse iatrogen einzubringen.

Nichtsdestotrotz sind weitere Studien erforderlich, um die Wirkung von antimikrobiellen Peptiden speziell in Abhängigkeit von verschiedenen Umweltbedingungen zu erforschen und bakterieninduzierte Erkrankungen gezielt zu behandeln.

7 Literaturverzeichnis

1. Åberg CH, Kelk P, Johansson A. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*: Virulence of its leukotoxin and association with aggressive periodontitis. Virulence. 2015; 6:188-195.

2. Abiko Y, Saitoh M, Nishimura M, Yamazaki M, Sawamura D, Kaku T. Role of β-defensins in oral epithelial health and disease. Med Mol Morphol. 2007; 40:179-184.

3. Agerberth B, Charo J, Werr J, Olsson B, Idali F, Lindbom L, Kiessling R, Jörnvall H, Wigzell H, Gudmundsson GH. The human antimicrobial and chemotactic peptides LL-37 and α-defensins are expressed by specific lymphocyte and monocyte populations. Blood. 2000; 96:3086-3093.

4. Albandar JM, Susin C, Hughes FJ. Manifestations of systemic diseases and conditions that affect the periodontal attachment apparatus: Case definitions and diagnostic considerations. J Clin Periodontol. 2018; 45 Suppl 20:171-189.

5. Altman H, Steinberg D, Porat Y, Mor A, Fridman D, Friedman M, Bachrach G. In vitro assessment of antimicrobial peptides as potential agents against several oral bacteria. J Antimicrob Chemother. 2006; 58:198-201.

6. Andersson J, Nagy S, Björk L, Abrams J, Holm S, Andersson U. Bacterial Toxin-Induced Cytokine Production Studied at the Single-Cell Level. Immunol Rev. 1992; 127:69-96.

7. Armitage GC. Development of a Classification System for Periodontal Diseases and Conditions. Ann Periodontol. 1999; 4:1-6.

8. Arndt T. Luciferin-Luciferase -System. In: Gressner AM, Arndt T (Hrsg). Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik. 2. Aufl. Berlin, Heidelberg: Springer; 2013.

9. Atkins PW, de Paula J. Kurzlehrbuch Physikalische Chemie: für natur- und ingenieurwissenschaftliche Studiengänge. 5. Aufl. Weinheim: Wiley-VCH Verlag; 2020.

10. Aumüller G, Aust G, Doll A, Engele J, Kirsch J, Mense S, Reißig D, Salvetter J, Schmidt W, Schmitz F, Schulte E, Spanel-Borowski K, Wolff W, Wurzinger LJ, Zilch HG. Duale Reihe Anatomie. 2. Aufl. Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 2010.

11. Bachrach G, Altman H, Kolenbrander PE, Chalmers NI, Gabai-Gutner M, Mor A, Friedman M, Steinberg D. Resistance of *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 to Direct Killing by Antimicrobial Peptides Is Protease Independent. Antimicrob Agents Chemother. 2008; 52:638-642.

12. Baliga S, Muglikar S, Kale R. Salivary pH: A diagnostic biomarker. J Indian Soc Periodontol. 2013; 17:461-465.

13. Bals R. Epithelial antimicrobial peptides in host defense against infection. Respir Res. 2000; 1:141-150.

14. Bals R, Wang X, Wu Z, Freeman T, Bafna V, Zasloff M, Wilson JM. Human β-Defensin 2 Is a Salt-sensitive Peptide Antibiotic Expressed in Human Lung. J Clin Invest. 1998; 102:874-880.

15. Bals R, Wilson JM. Cathelicidins - a family of multifunctional antimicrobial peptides. Cell Mol Life Sci. 2003; 60:711-720.

16. Bar-Shavit Z. The Osteoclast: A Multinucleated, Hematopoietic-Origin, Bone-Resorbing Osteoimmune Cell. J Cell Biochem. 2007; 102:1130-1139.

17. Bardow A, Moe D, Nyvad B, Nauntofte B. The buffer capacity and buffer systems of human whole saliva measured without loss of CO_2. Arch Oral Biol. 2000; 45:1-12.

18. Bergström J. Tobacco smoking and chronic destructive periodontal disease. Odontology. 2004; 92:1-8.

19. Bessalle R, Haas H, Goria A, Shalit I, Fridkin M. Augmentation of the Antibacterial Activity of Magainin by Positive-Charge Chain Extension. Antimicrob Agents Chemother. 1992; 36:313-317.

20. Bickel M, Cimasoni G. The pH of human crevicular fluid measured by a new microanalytical technique. J Periodontal Res. 1985; 20:35-40.

21. Bodet C, Chandad F, Grenier D. *Porphyromonas gingivalis*-induced inflammatory mediator profile in an ex vivo human whole blood model. Clin Exp Immunol. 2006; 143:50-57.

22. Bowdish DME, Davidson DJ, Hancock REW. Immunomodulatory Properties of Defensins and Cathelicidins. Curr Top Microbiol Immunol. 2006; 306:27-66.

23. Bowdish DME, Davidson DJ, Scott MG, Hancock REW. Immunomodulatory Activities of Small Host Defense Peptides. Antimicrob Agents Chemother. 2005; 49:1727-1732.

24. Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL. Osteoclast differentiation and activation. Nature. 2003; 423:337-342.

25. Brogden KA. ANTIMICROBIAL PEPTIDES: PORE FORMERS OR METABOLIC INHIBITORS IN BACTERIA? Nat Rev Microbiol. 2005; 3:238-250.

26. Claesson R, Johansson A, Belibasakis G, Hänström L, Kalfas S. Release and activation of matrix metalloproteinase 8 from human neutrophils triggered by the leukotoxin of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. J Periodontal Res. 2002; 37:353-359.

27. Clarke EV, Tenner AJ. Complement modulation of T cell immune responses during homeostasis and disease. J Leukoc Biol. 2014; 96:745-756.

28. Cohen J. A power primer. Psychol Bull. 1992; 112:155-159.

29. Costerton JW, Cheng KJ, Geesey GG, Ladd TI, Nickel JC, Dasgupta M, Marrie TJ. BACTERIAL BIOFILMS IN NATURE AND DISEASE. Annu Rev Microbiol. 1987; 41:435-464.

30. Cowan MM, Taylor KG, Doyle RJ. Energetics of the Initial Phase of Adhesion of *Streptococcus sanguis* to Hydroxylapatite. J Bacteriol. 1987; 169:2995-3000.

31. Dale BA, Fredericks LP. Antimicrobial Peptides in the Oral Environment: Expression and Function in Health and Disease. Curr Issues Mol Biol. 2005; 7:119-133.

32. Dale BA, Kimball JR, Krisanaprakornkit S, Roberts F, Robinovitch M, O´Neal R, Valore EV, Ganz T, Anderson GM, Weinberg A. Localized antimicrobial peptide expression in human gingiva. J Periodontal Res. 2001; 36:285-294.

33. Dale BA, Krisanaprakornkit S. Defensin antimicrobial peptides in the oral cavity. J Oral Pathol Med. 2001; 30:321-327.

34. Dale BA, Tao R, Kimball JR, Jurevic RJ. Oral Antimicrobial Peptides and Biological Control of Caries. BMC Oral Health. 2006; 6 Suppl 1:S13.

35. Dalgic B, Bukulmez A, Sari S. Pyogenic liver abscess and peritonitis due to *Rhizopus oryzae* in a child with Papillon-Lefevre syndrome. Eur J Pediatr. 2011; 170:803-805.

36. Darveau RP. Periodontitis: a polymicrobial disruption of host homeostasis. Nat Rev Microbiol. 2010; 8:481-490.

37. Darveau RP, Belton CM, Reife RA, Lamont RJ. Local Chemokine Paralysis, a Novel Pathogenic Mechanism for *Porphyromonas gingivalis*. Infect Immun. 1998; 66:1660-1665.

38. Dodds MWJ, Johnson DA, Yeh CK. Health benefits of saliva: a review. J Dent. 2005; 33:223-233.

39. Dorschner RA, Lopez-Garcia B, Peschel A, Kraus D, Morikawa K, Nizet V, Gallo RL. The mammalian ionic environment dictates microbial susceptibility to antimicrobial defense peptides. FASEB J. 2006; 20:35-42.

40. Eick S, Puklo M, Adamowicz K, Kantyka T, Hiemstra P, Stennicke H, Guentsch A, Schacher B, Eickholz P, Potempa J. Lack of cathelicidin processing in Papillon-Lefèvre syndrome patients reveals essential role of LL-37 in periodontal homeostasis. Orphanet J Rare Dis. 2014; 9:148.

41. Fardini Y, Wang X, Témoin S, Nithianantham S, Lee D, Shoham M, Han YW. *Fusobacterium nucleatum* adhesin FadA binds vascular- endothelial cadherin and alters endothelial integrity. Mol Microbiol. 2011; 82:1468-1480.

42. Figueredo CM, Lira-Junior R, Love RM. T and B Cells in Periodontal Disease: New Functions in A Complex Scenario. Int J Mol Sci. 2019; 20:3949.

43. Finger S, Wiegand C, Buschmann HJ, Hipler UC. Antibacterial properties of cyclodextrin-antiseptics-complexes determined by microplate laser nephelometry and ATP bioluminescence assay. Int J Pharm. 2013; 452:188-193.

44. Forcella L, Filippi C, Waltimo T, Filippi A. Measurement of unstimulated salivary flow rate in healthy children aged 6 to 15 years. Swiss Dent J. 2018; 128:962-967.

45. Frohm M, Agerberth B, Ahangari G, Ståhle-Bäckdahl M, Lidén S, Wigzell H, Gudmundsson GH. The Expression of the Gene Coding for the Antibacterial Peptide LL-37 Is Induced in Human Keratinocytes during Inflammatory Disorders. J Biol Chem. 1997; 272:15258-15263.

46. Fujii R, Saito Y, Tokura Y, Nakagawa KI, Okuda K, Ishihara K. Characterization of bacterial flora in persistent apical periodontitis lesions. Oral Microbiol Immunol. 2009; 24:502-505.

47. Gallo RL, Murakami M, Ohtake T, Zaiou M. Biology and clinical relevance of naturally occurring antimicrobial peptides. J Allergy Clin Immunol. 2002; 110:823-831.

48. Ganz T, Lehrer RI. Antimicrobial peptides of vertebrates. Curr Opin Immunol. 1998; 10:41-44.

49. Goldman MJ, Anderson GM, Stolzenberg ED, Kari UP, Zasloff M, Wilson JM. Human β-Defensin-1 Is a Salt-Sensitive Antibiotic in Lung That Is Inactivated in Cystic Fibrosis. Cell. 1997; 88:553-560.

50. Gursoy UK, Könönen E. Understanding the roles of gingival beta-defensins. J Oral Microbiol. 2012; 4:15127.

51. Gursoy UK, Könönen E, Pradhan-Palikhe P, Tervahartiala T, Pussinen PJ, Suominen-Taipale L, Sorsa T. Salivary MMP-8, TIMP-1, and ICTP as markers of advanced periodontitis. J Clin Periodontol. 2010; 37:487-493.

52. Gursoy UK, Könönen E, Uitto VJ. Stimulation of epithelial cell matrix metalloproteinase (MMP-2, -9, -13) and interleukin-8 secretion by fusobacteria. Oral Microbiol Immunol. 2008; 23:432-434.

53. Hajishengallis G, Lamont RJ. Beyond the red complex and into more complexity: the polymicrobial synergy and dysbiosis (PSD) model of periodontal disease etiology. Mol Oral Microbiol. 2012; 27:409-419.

54. Han YW. Fusobacterium nucleatum: a commensal-turned pathogen. Curr Opin Microbiol. 2015; 23:141-147.

55. Hancock REW, Chapple DS. Peptide Antibiotics. Antimicrob Agents Chemother. 1999; 43:1317-1323.

56. Hancock REW, Scott MG. The role of antimicrobial peptides in animal defenses. Proc Natl Acad Sci USA. 2000; 97:8856-8861.

57. Harder J, Bartels J, Christophers E, Schröder JM. A peptide antibiotic from human skin. Nature. 1997; 387:861.

58. Hellwig E, Klimek J, Attin T. Einführung in die Zahnerhaltung: Prüfungswissen Kariologie, Endodontologie und Parodontologie. 6. Aufl. Köln: Deutscher Zahnärzte Verlag; 2013.

59. Henzler Wildman KA, Lee DK, Ramamoorthy A. Mechanism of Lipid Bilayer Disruption by the Human Antimicrobial Peptide, LL-37. Biochemistry. 2003; 42:6545-6558.

60. Herbert BA, Novince CM, Kirkwood KL. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, a potent immunoregulator of the periodontal host defense system and alveolar bone homeostasis. Mol Oral Microbiol. 2016; 31:207-227.

61. Herrera D, Retamal-Valdes B, Alonso B, Feres M. Acute periodontal lesions (periodontal abscesses and necrotizing periodontal diseases) and endo-periodontal lesions. J Clin Periodontol. 2018; 45 Suppl 20: 78-94.

62. Hitchner MA, Santiago-Ortiz LE, Necelis MR, Shirley DJ, Palmer TJ, Tarnawsky KE, Vaden TD, Caputo GA. Activity and characterization of a pH-sensitive antimicrobial peptide. Biochim Biophys Acta Biomembr. 2019; 1861:182984.

63. Hofbauer LC, Lacey DL, Dunstan CR, Spelsberg TC, Riggs BL, Khosla S. Interleukin-1β and Tumor Necrosis Factor-α, But Not Interleukin-6, Stimulate Osteoprotegerin Ligand Gene Expression in Human Osteoblastic Cells. Bone. 1999; 25:255-259.

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

65. Humphrey SP, Williamson RT. A review of saliva: Normal composition, flow, and function. J Prosthet Dent. 2001; 85:162-169.

66. Ishikawa I, Nakashima K, Koseki T, Nagasawa T, Watanabe H, Arakawa S, Nitta H, Nishihara T. Induction of the immune response to periodontopathic bacteria and its role in the pathogenesis of periodontitis. Periodontol 2000. 1997; 14:79-111.

67. Jepsen S, Caton JG, Albandar JM, Bissada NF, Bouchard P, Cortellini P, Demirel K, de Sanctis M, Ercoli C, Fan J, Geurs NC, Hughes FJ, Jin L, Kantarci A, Lalla E, Madianos PN, Matthews D, McGuire MK, Mills MP, Preshaw PM, Reynolds MA, Sculean A, Susin C, West NX, Yamazaki K. Periodontal manifestations of systemic diseases and developmental and acquired conditions: Consensus report of workgroup 3 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. J Clin Periodontol. 2018; 45 Suppl 20:219-229.

68. Jepsen S, Kebschull M, Deschner J. Wechselwirkungen zwischen Parodontitis und systemischen Erkrankungen. Bundesgesundheitsblatt-Gesundheitsforschung- Gesundheitsschutz. 2011; 54:1089-1096.

69. Jewett A, Hume WR, Le H, Huynh TN, Han YW, Cheng G, Shi W. Induction of Apoptotic Cell Death in Peripheral Blood Mononuclear and Polymorphonuclear

Cells by an Oral Bacterium, *Fusobacterium nucleatum*. Infect Immun. 2000; 68:1893-1898.

70. Johansson J, Gudmundsson GH, Rottenberg ME, Berndt KD, Agerberth B. Conformation-dependent Antibacterial Activity of the Naturally Occurring Human Peptide LL-37. J Biol Chem. 1998; 273:3718-3724.

71. Joly S, Maze C, McCray PB Jr, Guthmiller JM. Human β-Defensins 2 and 3 Demonstrate Strain-Selective Activity against Oral Microorganisms. J Clin Microbiol. 2004; 42:1024-1029.

72. Joo HS, Fu CI, Otto M. Bacterial strategies of resistance to antimicrobial peptides. Phil Trans R Soc B. 2016; 371:20150292.

73. Kakehashi S, Stanley HR, Fitzgerald RJ. The effects of surgical exposures of dental pulps in germ-free and conventional laboratory rats. Oral Surg Oral Med Oral Pathol. 1965; 20:340-349.

74. Kelk P, Abd H, Claesson R, Sandström G, Sjöstedt A, Johansson A. Cellular and molecular response of human macrophages exposed to *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* leukotoxin. Cell Death Dis. 2011; 2:e126.

75. Kelk P, Johansson A, Claesson R, Hänström L, Kalfas S. Caspase 1 Involvement in Human Monocyte Lysis Induced by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* Leukotoxin. Infect Immun. 2003; 71:4448-4455.

76. Kinane DF. Causation and pathogenesis of periodontal disease. Periodontol 2000. 2001; 25:8-20.

77. Kist S, Kollmuss M, Jung J, Schubert S, Hickel R, Huth KC. Comparison of ozone gas and sodium hypochlorite/chlorhexidine two-visit disinfection protocols in treating apical periodontitis: a randomized controlled clinical trial. Clin Oral Invest. 2017; 21:995-1005.

78. Koczulla R, von Degenfeld G, Kupatt C, Krötz F, Zahler S, Gloe T, Issbrücker K, Unterberger P, Zaiou M, Lebherz C, Karl A, Raake P, Pfosser A, Boekstegers P, Welsch U, Hiemstra PS, Vogelmeier C, Gallo RL, Clauss M, Bals R. An

angiogenic role for the human peptide antibiotic LL-37/hCAP-18. J Clin Invest. 2003; 111:1665-1672.

79. Kolenbrander PE. *ORAL MICROBIAL COMMUNITIES*: Biofilms, Interactions, and Genetic Systems. Annu Rev Microbiol. 2000; 54:413-437.

80. Kolenbrander PE, Andersen RN, Blehert DS, Egland PG, Foster JS, Palmer RJ Jr. Communication among Oral Bacteria. Microbiol Mol Biol Rev. 2002; 66:486-505.

81. Kolenbrander PE, Andersen RN, Moore LVH. Coaggregation of *Fusobacterium nucleatum*, *Selenomonas flueggei*, *Selenomonas infelix*, *Selenomonas noxia*, and *Selenomonas sputigena* with Strains from 11 Genera of Oral Bacteria. Infect Immun. 1989; 57:3194-3203.

82. Kolenbrander PE, Andersen RN, Moore LVH. Intrageneric Coaggregation among Strains of Human Oral Bacteria: Potential Role in Primary Colonization of the Tooth Surface. Appl Environ Microbiol. 1990; 56:3890-3894.

83. Kolenbrander PE, London J. Adhere Today, Here Tomorrow: Oral Bacterial Adherence. J Bacteriol. 1993; 175:3247-3252.

84. Kornman KS, Page RC, Tonetti MS. The host response to the microbial challenge in periodontitis: assembling the players. Periodontol 2000. 1997; 14:33-53.

85. Krisanaprakornkit S, Kimball JR, Weinberg A, Darveau RP, Bainbridge BW, Dale BA. Inducible Expression of Human β-Defensin 2 by *Fusobacterium nucleatum* in Oral Epithelial Cells: Multiple Signaling Pathways and Role of Commensal Bacteria in Innate Immunity and the Epithelial Barrier. Infect Immun. 2000; 68:2907-2915.

86. Lacroix S, Rivest S. Effect of Acute Systemic Inflammatory Response and Cytokines on the Transcription of the Genes Encoding Cyclooxygenase Enzymes (COX-1 and COX-2) in the Rat Brain. J Neurochem. 1998; 70:452-466.

87. Lai Y, Gallo RL. AMPed Up immunity: how antimicrobial peptides have multiple roles in immune defense. Trends Immunol. 2009; 30:131-141.

88. Lara-Tejero M, Galán JE. Cytolethal distending toxin: limited damage as a strategy to modulate cellular functions. Trends Microbiol. 2002; 10:147-152.

89. Leblebicioglu B, Walters J. Alkaline Conditions Accelerate Polymorphonuclear Leukocyte Apoptosis In Vitro. Infect Immun. 1999; 67:2019-2021.

90. Lee IH, Cho Y, Lehrer RI. Effects of pH and Salinity on the Antimicrobial Properties of Clavanins. Infect Immun. 1997; 65:2898-2903.

91. Lehrer RI, Barton A, Daher KA, Harwig SSL, Ganz T, Selsted ME. Interaction of Human Defensins with Escherichia coli. Mechanism of Bactericidal Activity. J Clin Invest. 1989; 84:553-561.

92. Lehrer RI, Ganz T, Selsted ME. Defensins: Endogenous Antibiotic Peptides of Animal Cells. Cell. 1991; 64:229-230.

93. Lehrer RI, Lichtenstein AK, Ganz T. DEFENSINS: Antimicrobial and Cytotoxic Peptides of Mammalian Cells. Annu Rev Immunol. 1993; 11:105-128.

94. Lerner UH. Bone Remodeling in Post-menopausal Osteoporosis. J Dent Res. 2006; 85:584-595.

95. Lerner UH. Inflammation-induced Bone Remodeling in Periodontal Disease and the Influence of Post-menopausal Osteoporosis. J Dent Res. 2006; 85:596-607.

96. Liccardo D, Cannavo A, Spagnuolo G, Ferrara N, Cittadini A, Rengo C, Rengo G. Periodontal Disease: A Risk Factor for Diabetes and Cardiovascular Disease. Int J Mol Sci. 2019; 20:1414.

97. Malik E, Dennison SR, Harris F, Phoenix DA. pH Dependent Antimicrobial Peptides and Proteins, Their Mechanisms of Action and Potential as Therapeutic Agents. Pharmaceuticals. 2016; 9:67.

98. Mangan DF, Taichman NS, Lally ET, Wahl SM. Lethal Effects of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* Leukotoxin on Human T Lymphocytes. Infect Immun. 1991; 59:3267-3272.

99. Marsh PD. Microbial Ecology of Dental Plaque and its Significance in Health and Disease. Adv Dent Res. 1994; 8:263-271.

100. Marsh PD. Dental Plaque as a Microbial Biofilm. Caries Res. 2004; 38:204-211.

101. Mathews M, Jia HP, Guthmiller JM, Losh G, Graham S, Johnson GK, Tack BF, McCray PB Jr. Production of β-Defensin Antimicrobial Peptides by the Oral Mucosa and Salivary Glands. Infect Immun. 1999; 67:2740-2745.

102. Matsuzaki K. Why and how are peptide-lipid interactions utilized for self-defense? Magainins and tachyplesins as archetypes. Biochim Biophys Acta. 1999; 1462:1-10.

103. Meuric V, Martin B, Guyodo H, Rouillon A, Tamanai-Shacoori Z, Barloy-Hubler F, Bonnaure-Mallet M. Treponema denticola improves adhesive capacities of Porphyromonas gingivalis. Mol Oral Microbiol. 2013; 28:40-53.

104. Miyasaki KT, Bodeau AL, Ganz T, Selsted ME, Lehrer RI. In Vitro Sensitivity of Oral, Gram-Negative, Facultative Bacteria to the Bactericidal Activity of Human Neutrophil Defensins. Infect Immun. 1990; 58:3934-3940.

105. Moore WEC, Moore LVH. The bacteria of periodontal diseases. Periodontol 2000. 1994; 5:66-77.

106. Morgera F, Vaccari L, Antcheva N, Scaini D, Pacor S, Tossi A. Primate cathelicidin orthologues display different structures and membrane interactions. Biochem J. 2009; 417:727-735.

107. Mortimer CE, Müller U. Chemie: Das Basiswissen der Chemie. 13. Aufl. Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 2019

108. Nagaoka I, Hirota S, Yomogida S, Ohwada A, Hirata M. Synergistic actions of antibacterial neutrophil defensins and cathelicidins. Inflamm Res. 2000; 49:73-79.

109. Nair PNR. Pathogenesis of Apical Periodontitis and the Causes of Endodontic Failures. Crit Rev Oral Biol Med. 2004; 15:348-381.

110. Nante N, Ceriale E, Messina G, Lenzi D, Manzi P. Effectiveness of ATP bioluminescence to assess hospital cleaning: a review. J Prev Med Hyg. 2017; 58:E177-E183.

111. Neelakantan P, Romero M, Vera J, Daood U, Khan AU, Yan A, Cheung GSP. Biofilms in Endodontics-Current Status and Future Directions. Int J Mol Sci. 2017; 18:1748.

112. Niyonsaba F, Iwabuchi K, Someya A, Hirata M, Matsuda H, Ogawa H, Nagaoka I. A cathelicidin family of human antibacterial peptide LL-37 induces mast cell chemotaxis. Immunology. 2002; 106:20-26.

113. Nizet V. Antimicrobial Peptide Resistance Mechanisms of Human Bacterial Pathogens. Curr Issues Mol Biol. 2006; 8:11-26.

114. Nobbs AH, Lamont RJ, Jenkinson HF. *Streptococcus* Adherence and Colonization. Microbiol Mol Biol Rev. 2009; 73:407-450.

115. Noiri Y, Ehara A, Kawahara T, Takemura N, Ebisu S. Participation of Bacterial Biofilms in Refractory and Chronic Periapical Periodontitis. J Endod. 2002; 28:679-683.

116. Okada H, Murakami S. Cytokine Expression in Periodontal Health and Disease. Crit Rev Oral Biol Med. 1998; 9:248-266.

117. Oren Z, Shai Y. Mode of Action of Linear Amphipathic α-Helical Antimicrobial Peptides. Biopolymers. 1998; 47:451-463.

118. Ouhara K, Komatsuzawa H, Shiba H, Uchida Y, Kawai T, Sayama K, Hashimoto K, Taubman MA, Kurihara H, Sugai M. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* Outer Membrane Protein 100 Triggers Innate Immunity and Production of β-Defensin and the 18-Kilodalton Cationic Antimicrobial Protein through the Fibronectin-Integrin Pathway in Human Gingival Epithelial Cells. Infect Immun. 2006; 74:5211-5220.

119. Ouhara K, Komatsuzawa H, Yamada S, Shiba H, Fujiwara T, Ohara M, Sayama K, Hashimoto K, Kurihara H, Sugai M. Susceptibilities of periodontopathogenic

and cariogenic bacteria to antibacterial peptides, β-defensins and LL-37, produced by human epithelial cells. J Antimicrob Chemother. 2005; 55:888-896.

120. Overhage J, Campisano A, Bains M, Torfs ECW, Rehm BHA, Hancock REW. Human Host Defense Peptide LL-37 Prevents Bacterial Biofilm Formation. Infect Immun. 2008; 76:4176-4182.

121. Pace CN, Scholtz JM. A Helix Propensity Scale Based on Experimental Studies of Peptides and Proteins. Biophys J. 1998; 75:422-427.

122. Papapanou PN, Sanz M, Buduneli N, Dietrich T, Feres M, Fine DH, Flemmig TF, Garcia R, Giannobile WV, Graziani F, Greenwell H, Herrera D, Kao RT, Kebschull M, Kinane DF, Kirkwood KL, Kocher T, Kornman KS, Kumar PS, Loos BG, Machtei E, Meng H, Mombelli A, Needleman I, Offenbacher S, Seymour GJ, Teles R, Tonetti MS. Periodontitis: Consensus report of workgroup 2 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. J Periodontol. 2018; 89 Suppl 1:173-182.

123. Park IY, Cho JH, Kim KS, Kim YB, Kim MS, Kim SC. Helix Stability Confers Salt Resistance upon Helical Antimicrobial Peptides. J Biol Chem. 2004; 279:13896-13901.

124. Payne WA, Page RC, Ogilvie AL, Hall WB. Histopathologic features of the initial and early stages of experimental gingivitis in man. J Periodontal Res. 1975; 10:51-64.

125. Pereira RS, Rodrigues VAA, Furtado WT, Gueiros S, Pereira GS, Avila-Campos MJ. Microbial analysis of root canal and periradicular lesion associated to teeth with endodontic failure. Anaerobe. 2017; 48:12-18.

126. Pihlstrom BL, Michalowicz BS, Johnson NW. Periodontal diseases. Lancet. 2005; 366:1809-1820.

127. Pinheiro da Silva F, Medeiros MCR, dos Santos ÂBG, Ferreira MA, Garippo AL, Chammas R, Caldini E, Velasco IT, Possolo de Souza H, Machado MCC. Neutrophils LL-37 migrate to the nucleus during overwhelming infection. Tissue Cell. 2013; 45:318-320.

128. Potempa J, Banbula A, Travis J. Role of bacterial proteinases in matrix destruction and modulation of host responses. Periodontol 2000. 2000; 24:153-192.

129. Proksch E. pH in nature, humans and skin. J Dermatol. 2018; 45:1044-1052.

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

131. Rai B, Kharb S, Jain R, Anand SC. Biomarkers of periodontitis in oral fluids. J Oral Sci. 2008; 50:53-56.

132. Raj PA, Antonyraj KJ, Karunakaran T. Large-scale synthesis and functional elements for the antimicrobial activity of defensins. Biochem J. 2000; 347:633-641.

133. Rivest S, Lacroix S, Vallières L, Nadeau S, Zhang J, Laflamme N. How the Blood Talks to the Brain Parenchyma and the Paraventricular Nucleus of the Hypothalamus During Systemic Inflammatory and Infectious Stimuli. Proc Soc Exp Biol Med. 2000; 223:22-38.

134. Rosan B, Lamont RJ. Dental plaque formation. Microbes Infect. 2000; 2:1599-1607.

135. Schenkels LCPM, Veerman ECI, Nieuw Amerongen AV. Biochemical Composition of Human Saliva in Relation to Other Mucosal Fluids. Crit Rev Oral Biol Med. 1995; 6:161-175.

136. Schmidtchen A, Frick IM, Andersson E, Tapper H, Björck L. Proteinases of common pathogenic bacteria degrade and inactivate the antibacterial peptide LL-37. Mol Microbiol. 2002; 46:157-168.

137. Schröder JM, Harder J. Human beta-defensin-2. Int J Biochem Cell Biol. 1999; 31:645-651.

138. Scott MG, Vreugdenhil ACE, Buurman WA, Hancock REW, Gold MR. Cutting Edge: Cationic Antimicrobial Peptides Block the Binding of Lipopolysaccharide (LPS) to LPS Binding Protein. J Immunol. 2000; 164:549-553.

139. Singh PK, Jia HP, Wiles K, Hesselberth J, Liu L, Conway BAD, Greenberg EP, Valore EV, Welsh MJ, Ganz T, Tack BF, McCray PB Jr. Production of β-defensins by human airway epithelia. Proc Natl Acad Sci USA. 1998; 95:14961-14966.

140. Slots J, Ting M. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* in human periodontal disease: occurrence and treatment. Periodontol 2000. 1999; 20:82-121.

141. Smith JL, Bayles DO. The Contribution of Cytolethal Distending Toxin to Bacterial Pathogenesis. Crit Rev Microbiol. 2006; 32:227-248.

142. Socransky SS, Haffajee AD. Dental biofilms: difficult therapeutic targets. Periodontol 2000. 2002; 28:12-55.

143. Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent RL Jr. Microbial complexes in subgingival plaque. J Clin Periodontol. 1998; 25:134-144.

144. Sørensen OE, Follin P, Johnsen AH, Calafat J, Tjabringa GS, Hiemstra PS, Borregaard N. Human cathelicidin, hCAP-18, is processed to the antimicrobial peptide LL-37 by extracellular cleavage with proteinase 3. Blood. 2001; 97:3951-3959.

145. Sorsa T, Tjäderhane L, Salo T. Matrix metalloproteinases (MMPs) in oral diseases. Oral Dis. 2004; 10:311-318.

146. Stashenko P, Teles R, D`Souza R. Periapical Inflammatory Responses and Their Modulation. Crit Rev Oral Biol Med. 1998; 9:498-521.

147. Stashenko P, Yu SM, Wang CY. Kinetics of Immune Cell and Bone Resorptive Responses to Endodontic Infections. J Endod. 1992; 18:422-426.

148. Subbalakshmi C, Sitaram N. Mechanism of antimicrobial action of indolicidin. FEMS Microbiol Lett. 1998; 160:91-96.

149. Tada H, Shimizu T, Matsushita K, Takada H. *Porphyromonas gingivalis*-induced IL-33 down-regulates hCAP-18/LL-37 production in human gingival epithelial cells. Biomed Res. 2017; 38:167-173.

150. Takahashi N, Saito K, Schachtele CF, Yamada T. Acid tolerance and acid-neutralizing activity of *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* and *Fusobacterium nucleatum*. Oral Microbiol Immunol. 1997; 12:323-328.

151. Takeuchi H, Hirano T, Whitmore SE, Morisaki I, Amano A, Lamont RJ. The Serine Phosphatase SerB of *Porphyromonas gingivalis* Suppresses IL-8 Production by Dephosphorylation of NF-$_k$B RelA/p65. PLoS Pathog. 2013; 9:e1003326.

152. Tanaka D, Miyasaki KT, Lehrer RI. Sensitivity of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Capnocytophaga* spp. to the bactericidal action of LL-37: a cathelicidin found in human leukocytes and epithelium. Oral Microbiol Immunol. 2000; 15:226-231.

153. Thorne N, Inglese J, Auld DS. Illuminating Insights into Firefly Luciferase and Other Bioluminescent Reporters Used in Chemical Biology. Chem Biol. 2010; 17:646-657.

154. Tomita T, Hitomi S, Nagase T, Matsui H, Matsuse T, Kimura S, Ouchi Y. Effect of Ions on Antibacterial Activity of Human Beta Defensin 2. Microbiol Immunol. 2000; 44:749-754.

155. Tonetti MS, Greenwell H, Kornman KS. Staging and grading of periodontitis: Framework and proposal of a new classification and case definition. J Clin Periodontol. 2018; 45 Suppl 20:149-161.

156. Toomes C, James J, Wood AJ, Wu CL, McCormick D, Lench N, Hewitt C, Moynihan L, Roberts E, Woods CG, Markham A, Wong M, Widmer R, Ghaffar KA, Pemberton M, Hussein IR, Temtamy SA, Davies R, Read AP, Sloan P, Dixon MJ, Thakker NS. Loss-of-function mutations in the cathepsin C gene result in periodontal disease and palmoplantar keratosis. Nat Genet. 1999; 23:421-424.

157. Torabinejad M, Eby WC, Naidorf IJ. Inflammatory and Immunological Aspects of the Pathogenesis of Human Periapical Lesions. J Endod. 1985; 11:479-488.

158. Torneck CD. A report of studies into changes in the fine structure of the dental pulp in human caries pulpitis. J Endod. 1981; 7:8-16.

159. Ulaeto DO, Morris CJ, Fox MA, Gumbleton M, Beck K. Destabilization of α-Helical Structure in Solution Improves Bactericidal Activity of Antimicrobial Peptides: Opposite Effects on Bacterial and Viral Targets. Antimicrob Agents Chemother. 2016; 60:1984-1991.

160. Valore EV, Ganz T. Posttranslational Processing of Defensins in Immature Human Myeloid Cells. Blood. 1992; 79:1538-1544.

161. Vogt TCB, Bechinger B. The Interactions of Histidine-containing Amphipathic Helical Peptide Antibiotics with Lipid Bilayers. THE EFFECTS OF CHARGES AND pH. J Biol Chem. 1999; 274:29115-29121.

162. Walkenhorst WF. Using adjuvants and environmental factors to modulate the activity of antimicrobial peptides. Biochim Biophys Acta. 2016; 1858:926-935.

163. Walkenhorst WF, Klein JW, Vo P, Wimley WC. pH Dependence of Microbe Sterilization by Cationic Antimicrobial Peptides. Antimicrob Agents Chemother. 2013; 57:3312-3320.

164. Wang G. Structures of Human Host Defense Cathelicidin LL-37 and Its Smallest Antimicrobial Peptide KR-12 in Lipid Micelles. J Biol Chem. 2008; 283:32637-32643.

165. Wiesner J, Vilcinskas A. Antimicrobial peptides: the ancient arm of the human immune system. Virulence. 2010; 1:440-464.

166. Wingrove JA, DiScipio RG, Chen Z, Potempa J, Travis J, Hugli TE. Activation of Complement Components C3 and C5 by a Cysteine Proteinase (Gingipain-1) from *Porphyromonas* (*Bacteroides*) *gingivalis*. J Biol Chem. 1992; 267:18902-18907.

167. Yan H, Hancock REW. Synergistic Interactions between Mammalian Antimicrobial Defense Peptides. Antimicrob Agents Chemother. 2001; 45:1558-1560.

168. Yang D, Chen Q, Chertov O, Oppenheim JJ. Human neutrophil defensins selectively chemoattract naive T and immature dendritic cells. J Leukoc Biol. 2000; 68:9-14.

169. Yang D, Chen Q, Schmidt AP, Anderson GM, Wang JM, Wooters J, Oppenheim JJ, 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. J Exp Med. 2000; 192:1069-1074.

170. Yang L, Harroun TA, Weiss TM, Ding L, Huang HW. Barrel-Stave Model or Toroidal Model? A Case Study on Melittin Pores. Biophys J. 2001; 81:1475-1485.

171. Yeaman MR, Yount NY. Mechanisms of Antimicrobial Peptide Action and Resistance. Pharmacol Rev. 2003; 55:27-55.

172. Yew HS, Chambers ST, Roberts SA, Holland DJ, Julian KA, Raymond NJ, Beardsley J, Read KM, Murdoch DR. Association between HACEK bacteraemia and endocarditis. J Med Microbiol. 2014; 63:892-895.

173. Yong X, Chen Y, Tao R, Zeng Q, Liu Z, Jiang L, Ye L, Lin X. Periodontopathogens and human β-defensin-2 expression in gingival crevicular fluid from patients with periodontal disease in Guangxi, China. J Periodontal Res. 2015; 50:403-410.

174. Zanetti M. The Role of Cathelicidins in the Innate Host Defenses of Mammals. Curr Issues Mol Biol. 2005; 7:179-196.

175. Zasloff M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. Nature. 2002; 415:389-395.

176. Zelezetsky I, Pontillo A, Puzzi L, Antcheva N, Segat L, Pacor S, Crovella S, Tossi A. Evolution of the Primate Cathelicidin. CORRELATION BETWEEN STRUCTURAL VARIATIONS AND ANTIMICROBIAL ACTIVITY. J Biol Chem. 2006; 281:19861-19871.

177. Zhang CZ, Cheng XQ, Li JY, Zhang P, Yi P, Xu X, Zhou XD. Saliva in the diagnosis of diseases. Int J Oral Sci. 2016; 8:133-137.

8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Die Entwicklung der Parodontitis (Kinane, 2001)..... 8
Abbildung 2: Darstellung unterschiedlicher Entzündungsmediatoren, welche die Reifung der Osteoklasten und damit die Knochenresorption fördern (Lerner, 2006).. 9
Abbildung 3: Bakterienkomplexe nach Socransky modifiziert nach Socransky und Kollegen (Socransky et al., 1998)..... 11
Abbildung 4: Darstellung von HNP-1 (Hancock und Chapple, 1999)..... 16
Abbildung 5: Genetische Darstellung von LL-37 (Bals und Wilson, 2003)..... 17
Abbildung 6: Der Pfeil markiert die α-helikale Struktur von LL-37 mit Kennzeichnung der hydrophoben Seitenketten (Wang, 2008). 18
Abbildung 7: Aufgaben des Cathelicidins (Bals und Wilson, 2003) 19
Abbildung 8: (A) Der Stern zeigt auf Zellwandablösungen der inneren Zellmembran im periplasmatischen Raum. Die Pfeile zeigen Ansammlungen an der äußeren Membran. (B) Zellwandablagerungen an der äußeren Bakterienmembran (Lehrer *et al*., 1989)20
Abbildung 9: Darstellung des barrel-stave, toroidal-pore und carpet models (Wiesner und Vilcinskas, 2010) 21
Abbildung 10: Definition der Ionenstärke (Atkins und de Paula, 2020)..... 23
Abbildung 11: Wachstum von *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* 26
Abbildung 12: Wachstum von *Porphyromonas gingivalis* 27
Abbildung 13: Wachstum von *Fusobacterium nucleatum* 27
Abbildung 14: Anaerobierbank mit Schleuse und Armports 29
Abbildung 15: Herstellung der verdünnten Bakteriensuspension 30
Abbildung 16: Reaktionsgleichung (Arndt, 2013)..... 32
Abbildung 17: Darstellung des Vortexmischers 33
Abbildung 18: Überlebensrate von *P. gingivalis* 36
Abbildung 19: Darstellung der Überlebensrate von *P. gingivalis* bei pH 5,0, pH 6,0 und pH-7,0 unter HNP-1 37
Abbildung 20: Darstellung der Überlebensrate von *P. gingivalis* bei pH 5,0, pH 6,0 und pH 7,0 unter LL-37..... 38
Abbildung 21: Darstellung der Überlebensrate von *P. gingivalis* bei pH 5,0, pH 6,0 und pH 7,0 unter HBD-2 39
Abbildung 22: Darstellung der Überlebensrate von *P. gingivalis* bei 0,1 M und 0,2 M unter der Wirkung von HNP-1..... 40

Abbildung 23: Überlebensrate von *Fusobacterium nucleatum* 41
Abbildung 24: Darstellung der Überlebensrate von *F. nucleatum* bei pH 5,0, pH 6,0 und pH 7,0 unter HNP-1 42
Abbildung 25: Darstellung der Überlebensrate von *F. nucleatum* bei pH 5,0, pH 6,0 und pH 7,0 unter HBD-2 43
Abbildung 26: Überlebensrate von *A. actinomycetemcomitans* 44

9 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Einteilung der Stadien der Parodontitis modifiziert nach Tonetti und Mitarbeiter (Tonetti *et al*., 2018)..... 10
Tabelle 2: Darstellung der Aminosäuresequenzen der verwendeten antimikrobiellen Peptide 31
Tabelle 3: Vergleich der Konzentrationen und Überlebensraten von *A. actinomycetemcomitans* bei einem Einsatz von LL-37 45
Tabelle 4: Übersicht der Signifikanzen und Effektstärken für *P. gingivalis* 78
Tabelle 5: Übersicht der Signifikanzen und Koeffizienten für *P. gingivalis* 81
Tabelle 6: Übersicht der Signifikanzen und Effektstärken für *F. nucleatum*..... 82
Tabelle 7: Übersicht der Signifikanzen und Koeffizienten für *F. nucleatum*..... 84
Tabelle 8: Übersicht der Signifikanzen und Effektstärken für *A. actinomycetemcomitans* 85
Tabelle 9: Übersicht der Signifikanzen und Koeffizienten für *A. actinomycetemcomitans* 87

10 Abkürzungsverzeichnis

COX-2 mRNA	Cyclooxygenase-2 messenger Ribonukleinsäure
DNA	Desoxyribonukleinsäure
IL-1 β	Interleukin 1 β
IL-6	Interleukin 6
IL-8	Interleukin 8
MSC	Minimal Sterilizing Concentration
MMP-8	Matrix-Metaolloproteinase-8
MMP-9	Matrix-Metaolloproteinase-9
OPG	Osteoprotegerin
RANK	receptor activator of nuclear factor kappaB
RANKL	receptor activator of nuclear factor kappaB ligand
TNF-α	Tumornekrosefaktor α

11 Anhang

Herstellung der Medien und Pufferstammlösungen

BHI Medium:

11,1 g Brain Heart Infusion auf 300 ml destilliertem Wasser

BHI-Medium (2-fach konzentriert):

22,2 g Brain Heart Infusion auf 300 ml destilliertem Wasser

Stammlösung des 0,1 M (K_2HPO_4) Puffers:

1,74 g K_2HPO_4 auf 100 ml destilliertem Wasser

Stammlösung des 0,2 M (K_2HPO_4) Puffers:

3,48 g K_2HPO_4 auf 100 ml destilliertem Wasser

Stammlösung des 0,1 M (KH_2PO_4) Puffers:

1,36 g KH_2PO_4 auf 100 ml destilliertem Wasser

Stammlösung des 0,2 M K (KH_2PO_4) Puffers:

2,72 g KH_2PO_4 auf 100 ml destilliertem Wasser

Übersicht der Versuchsgruppen (jeweils für 0,1 M/ 0,2 M):

Einstellung des pH-Wertes 5,0: 98,77 ml KH_2PO_4 auf 1,23 ml K_2HPO_4

Einstellung des pH-Wertes 6,0: 86,8 ml KH_2PO_4 auf 13,2 ml K_2HPO_4

Einstellung des pH-Wertes 7,0: 38,5 ml KH_2PO_4 auf 61,5 ml K_2HPO_4

Herstellung der Peptid-Stammlösungen:

5 µg/ml: 17µl Peptid auf 983 µl der 0,025% Essigsäure

50 µg/ml: 170 µl Peptid auf 830 µl der 0,025% Essigsäure

200 µg/ml: 680 µl Peptid auf 320 µl der 0,025% Essigsäure

Übersicht der Signifikanzen

Tabelle 4: Übersicht der Signifikanzen und Effektstärken für *P. gingivalis*

Statistik	Datensatz	Signifikante Größe/ Paarweisevergleich	Signifikanz (p)	Effektstärke (r)	Aussagekraft
Kruskal-Wallis-Test	Alle AMP Konzentration pH-Wert 0,1 M + 0,2 M	AMP-Arten	p < 0,000		
Dunn-Bonferroni-Test	Alle AMP Konzentration pH-Wert 0,1 M + 0,2 M	HNP-1-Negativkontrolle	p < 0,000	r = 0,83	stark
Dunn-Bonferroni-Test	Alle AMP Konzentration pH-Wert 0,1 M + 0,2 M	LL-37-Negativkontrolle	p < 0,000	r = 0,57	stark
Dunn-Bonferroni-Test	Alle AMP Konzentration pH-Wert 0,1 M + 0,2 M	HBD-2-Negativkontrolle	p = 0,022	r = 0,28	schwach
Dunn-Bonferroni-Test	Alle AMP Konzentration pH-Wert 0,1 M + 0,2 M	LL-37-HBD-2	p = 0,001	r = 0,34	mittel
Dunn-Bonferroni-Test	Alle AMP Konzentration pH-Wert 0,1 M + 0,2 M	HNP-1–HBD-2	p < 0,000	r = 0,64	stark
Dunn-Bonferroni-Test	Alle AMP Konzentration pH-Wert 0,1 M + 0,2 M	HNP-1–LL-37	p = 0,001	r = 0,31	mittel
Kruskal-Wallis-Test	Alle AMP Konzentration pH-Wert 0,1 M + 0,2 M	Konzentration	p < 0,000		

Statistik	Datensatz	Signifikante Größe/ Paarweisevergleich	Signifikanz (p)	Effektstärke (r)	Aussagekraft
Dunn-Bonferroni-Test	Alle AMP Konzentration pH-Wert 0,1 M+0,2 M	5 µg/ml-Negativkontrolle	p < 0,000	r = 0,44	mittel
Dunn-Bonferroni-Test	Alle AMP pH-Wert 0,1 M+0,2 M	50 µg/ml-Negativkontrolle	p < 0,000	r = 0,56	stark
Dunn-Bonferroni-Test	Alle AMP Konzentration pH-Wert 0,1 M+0,2 M	200 µg/ml-Negativkontrolle	p < 0,000	r = 0,72	stark
Dunn-Bonferroni-Test	Alle AMP Konzentration pH-Wert 0,1 M+0,2 M	200 µg/ml–5 µg/ml	p = 0,001	r = 0,32	mittel
Kruskal-Wallis-Test	LL-37 Konzentration pH-Wert 0,1 M+0,2 M	Konzentration	p = 0,002		
Dunn-Bonferroni-Test	LL-37 Konzentration pH-Wert 0,1 M+0,2 M	200 µg/ml–5 µg/ml	p < 0,000	r = 0,60	stark
Kruskal-Wallis-Test	Alle AMP Konzentration pH-Wert 0,1 M+0,2 M	pH-Wert	p < 0,000		
Dunn-Bonferroni-Test	Alle AMP Konzentration pH-Wert 0,1 M+0,2 M	pH 5,0-pH 7,0	p < 0,000	r = 0,38	mittel
Dunn-Bonferroni-Test	Alle AMP Konzentration pH-Wert 0,1 M+0,2 M	pH 6,0-pH 7,0	p = 0,018	r = 0,22	schwach

Statistik	Datensatz	Signifikante Größe/ Paarweisevergleich	Signifikanz (p)	Effektstärke (r)	Aussagekraft
Kruskal-Wallis-Test	HNP-1 Konzentration pH-Wert 0,1 M+0,2 M	pH-Wert	p < 0,000		
Dunn-Bonferroni-Test	HNP-1 Konzentration pH-Wert 0,1 M+0,2 M	pH 5,0-pH 7,0	p < 0,000	r = 0,70	stark
Dunn-Bonferroni-Test	HNP-1 Konzentration pH-Wert 0,1 M+0,2 M	pH 6,0-pH 7,0	p = 0,001	r = 0,55	stark
Mann-Whitney-U-Test	HNP-1 Konzentration pH-Wert 0,1 M+0,2 M	0,1 M+0,2 M	p = 0,003	r = 0,40	
Kruskal-Wallis-Test	LL-37 Konzentration pH-Wert 0,1 M+0,2 M	pH-Wert	p = 0,015		
Dunn-Bonferroni-Test	LL-37 Konzentration pH-Wert 0,1 M+0,2 M	pH 5,0-pH 7,0	p = 0,005	r = 0,47	mittel
Dunn-Bonferroni-Test	LL-37 Konzentration pH-Wert 0,1 M+0,2 M	pH 5,0-pH 6,0	p = 0,046	r = 0,33	mittel

Tabelle 5: Übersicht der Signifikanzen und Koeffizienten für *P. gingivalis*

Statistik	Datensatz	Im Modell aufgenommene Prädiktoren	Signifikante Größe	Signifikanz (p)	Koeffizient
Regression	Alle Peptide Konzentration pH-Wert 0,1 M+0,2 M	Alle Peptide pH-Wert 0,1 M+0,2 M	HNP-1	p < 0,000	Negativ (-608.783,333)
Regression	Alle Peptide Konzentration pH-Wert 0,1 M+0,2 M	Alle Peptide pH-Wert 0,1 M+0,2 M	LL-37	p < 0,000	Negativ (-510.056,389)
Regression	Alle Peptide Konzentration pH-Wert 0,1 M+0,2 M	Alle Peptide pH-Wert 0,1 M+0,2 M	HBD-2	p = 0,009	Negativ (-204.764,873)
Regression	Alle Peptide Konzentration pH-Wert 0,1 M+0,2 M	Alle Peptide pH-Wert 0,1 M+0,2 M	0,1 M	p = 0,003	Positiv (129.917,576)
Regression	Alle Peptide Konzentration pH-Wert 0,1 M+0,2 M	Alle Peptide pH-Wert 0,1 M+0,2 M	pH 5,0	p < 0,000	Negativ (-220.526,344)
Regression	Alle Peptide Konzentration pH-Wert 0,1 M+0,2 M	Alle Peptide pH-Wert 0,1 M+0,2 M	pH 6,0	p = 0,002	Negativ (-163.256,958)
Regression	HNP-1 Konzentration pH-Wert 0,1 M+0,2 M	Konzentration pH-Wert 0,1 M+0,2 M	0,1 M	p = 0,002	Positiv (34.188,519)
Regression	HNP-1 Konzentration pH-Wert 0,1 M+0,2 M	Konzentration pH-Wert 0,1 M+0,2 M	pH 5,0	p = 0,018	Negativ (-31.889,167)
Regression	HNP-1 Konzentration pH-Wert 0,1 M+0,2 M	Konzentration pH-Wert 0,1 M+0,2 M	pH 6,0	p = 0,006	Negativ (-37.019,167)

Statistik	Datensatz	Im Modell aufgenommene Prädiktoren	Signifikante Größe	Signifikanz (p)	Koeffizient
Regression	HNP-1 Konzentration pH-Wert 0,1 M+0,2 M	Konzentration pH-Wert 0,1 M+0,2 M	200 µg/ml	p = 0,005	Negativ (-37.957,222)
Regression	HNP-1 Konzentration pH-Wert 0,1 M+0,2 M	Konzentration pH-Wert 0,1 M+0,2 M	50 µg/ml	p = 0,045	Negativ (-26.649,444)
Regression	HBD-2 Konzentration pH-Wert 0,1 M+0,2 M	pH-Wert	pH 5,0	p = 0,027	Negativ (-352.320,556)
Regression	LL-37 Konzentration pH-Wert 0,1 M+0,2 M	Konzentration pH-Wert 0,1 M+0,2 M	pH 5,0	p = 0,026	Negativ (-148.144,167)
Regression	LL-37 Konzentration pH-Wert 0,1 M+0,2 M	Konzentration pH-Wert 0,1 M+0,2 M	200 µg/ml	p = 0,005	Negativ (-191.076,667)
Regression	LL-37 Konzentration pH-Wert 0,1 M+0,2 M	Konzentration pH-Wert 0,1 M+0,2 M	0,1 M	p = 0,047	Positiv (107.307,222)

Tabelle 6: Übersicht der Signifikanzen und Effektstärken für *F. nucleatum*

Statistik	Datensatz	Signifikante Größe/ Paarweisevergleich	Signifikanz (p)	Effektstärke (r)	Aussagekraft
Kruskal-Wallis-Test	Alle AMP Konzentration pH-Wert 0,1 M+0,2 M	AMP-Arten	p < 0,000		
Dunn-Bonferroni-Test	Alle AMP Konzentration pH-Wert 0,1 M+ 0,2 M	HBD-2-Negativkontrolle	p = 0,004	r = 0,36	mittel

Statistik	Datensatz	Signifikante Größe/ Paarweisevergleich	Signifikanz (p)	Effektstärke (r)	Aussagekraft
Dunn-Bonferroni-Test	Alle AMP Konzentration pH-Wert 0,1 M+0,2 M	HNP-1-Negativkontrolle	p < 0,000	r = 0,42	mittel
Dunn-Bonferroni-Test	Alle AMP Konzentration pH-Wert 0,1 M + 0,2 M	LL-37-Negativkontrolle	p < 0,000	r = 0,87	stark
Dunn-Bonferroni-Test	Alle AMP Konzentration pH-Wert 0,1 M+0,2 M	LL-37-HNP-1	p < 0,000	r = 0,50	stark
Dunn-Bonferroni-Test	Alle AMP Konzentration pH-Wert 0,1 M+0,2 M	LL-37-HBD-2	p < 0,000	r = 0,59	stark
Kruskal-Wallis-Test	Alle AMP Konzentration pH-Wert 0,1 M+0,2 M	Konzentration	p < 0,000		
Dunn-Bonferroni-Test	Alle AMP Konzentration pH-Wert 0,1 M+0,2 M	5 µg/ml-Negativkontrolle	p < 0,000	r = 0,50	stark
Dunn-Bonferroni-Test	Alle AMP Konzentration pH-Wert 0,1 M+0,2 M	50 µg/ml-Negativkontrolle	p < 0,000	r = 0,50	stark
Dunn-Bonferroni-Test	Alle AMP Konzentration pH-Wert 0,1 M+0,2 M	200 µg/ml-Negativkontrolle	p < 0,000	r = 0,66	stark
Kruskal-Wallis-Test	HNP-1 Konzentration pH-Wert 0,1 M+0,2 M	pH-Wert	p = 0,012		

Statistik	Datensatz	Signifikante Größe/ Paarweisevergleich	Signifikanz (p)	Effektstärke (r)	Aussagekraft
Dunn-Bonferroni-Test	HNP-1 pH-Wert 0,1 M+0,2 M	pH 5,0–pH 7,0	p = 0,003	r = 0,50	stark
Kruskal-Wallis-Test	HBD-2 pH-Wert 0,1 M + 0,2 M	pH-Wert	p = 0,004		
Dunn-Bonferroni-Test	HBD-2 pH-Wert 0,1 M+0,2 M	pH 5,0–pH 7,0	p = 0,001	r = 0,60	stark

Tabelle 7: Übersicht der Signifikanzen und Koeffizienten für *F. nucleatum*

Statistik	Datensatz	Im Modell aufgenommene Prädiktoren	Signifikante Größe	Signifikanz (p)	Koeffizient
Regression	Alle Peptide Konzentration pH-Wert 0,1 M+0,2 M	Alle Peptide Konzentration pH-Wert	LL-37	p < 0,000	Negativ (-147.698,459)
Regression	Alle Peptide Konzentration pH-Wert 0,1 M+0,2 M	Alle Peptide Konzentration pH-Wert	HNP-1	p = 0,003	Negativ (-63.564,135)
Regression	Alle Peptide Konzentration pH-Wert 0,1 M+0,2 M	Alle Peptide Konzentration pH-Wert	HBD-2	p = 0,007	Negativ (-59.118,576)
Regression	Alle Peptide Konzentration pH-Wert 0,1 M+0,2 M	Alle Peptide Konzentration pH-Wert	pH 5,0	p = 0,001	Negativ (-46.384,948)
Regression	Alle Peptide Konzentration pH-Wert 0,1 M+0,2 M	Alle Peptide Konzentration pH-Wert	pH 6,0	p = 0,026	Negativ (-30.185,346)

Statistik	Datensatz	Im Modell aufgenommene Prädiktoren	Signifikante Größe	Signifikanz (p)	Koeffizient
Regression	HNP-1 Konzentration pH-Wert 0,1 M+0,2 M	pH-Wert	pH 5,0	p = 0,002	Negativ (-96.602,778)
Regression	HNP-1 Konzentration pH-Wert 0,1 M+0,2 M	pH-Wert	pH 6,0	p = 0,039	Negativ (-63.147,222)
Regression	HBD-2 Konzentration pH-Wert 0,1 M+0,2 M	pH-Wert	pH 5,0	p = 0,004	Negativ (-52.564,732)

Tabelle 8: Übersicht der Signifikanzen und Effektstärken für *A. actinomycetemcomitans*

Statistik	Datensatz	Signifikante Größe/ Paarweisevergleich	Signifikanz (p)	Effektstärke (r)	Aussagekraft
Kruskal-Wallis-Test	Alle AMP Konzentration pH-Wert 0,1 M+0,2 M	AMP Arten	p < 0,000		
Dunn-Bonferroni-Test	Alle AMP Konzentration pH-Wert 0,1 M+0,2 M	HBD-2-Negativkontrolle	p < 0,000	r = 0,64	stark
Dunn-Bonferroni-Test	Alle AMP Konzentration pH-Wert 0,1 M+0,2 M	HNP-1-Negativkontrolle	p < 0,000	r = 0,50	stark
Dunn-Bonferroni-Test	Alle AMP Konzentration pH-Wert 0,1 M+0,2 M	LL-37-Negativkontrolle	p < 0,000	r = 0,61	stark

Statistik	Datensatz	Signifikante Größe/ Paarweisevergleich	Signifikanz (p)	Effektstärke (r)	Aussagekraft
Kruskal-Wallis-Test	Alle AMP Konzentration pH-Wert 0,1 M+0,2 M	Konzentration	p < 0,000		
Dunn-Bonferroni-Test	Alle AMP Konzentration pH-Wert 0,1 M+0,2 M	5 µg/ml-Negativkontrolle	p = 0,001	r = 0,38	mittel
Dunn-Bonferroni-Test	Alle AMP Konzentration pH-Wert 0,1 M+0,2 M	50 µg/ml-Negativkontrolle	p < 0,000	r = 0,61	stark
Dunn-Bonferroni-Test	Alle AMP Konzentration pH-Wert 0,1 M+0,2 M	200 µg/ml-Negativkontrolle	p < 0,000	r = 0,77	stark
Dunn-Bonferroni-Test	Alle AMP Konzentration pH-Wert 0,1 M+0,2 M	200 µg/ml–5 µg/ml	p < 0,000	r = 0,45	mittel
Dunn-Bonferroni-Test	Alle AMP Konzentration pH-Wert 0,1 M+0,2 M	50 µg/ml–5 µg/ml	p = 0,006	r = 0,26	schwach
Kruskal-Wallis-Test	HNP-1 Konzentration pH-Wert 0,1 M+0,2 M	Konzentration	p = 0,006		
Dunn-Bonferroni-Test	HNP-1 Konzentration pH-Wert 0,1 M+0,2 M	5 µg/ml–200 µg/ml	p = 0,002	r = 0,53	stark
Dunn-Bonferroni-Test	HNP-1 Konzentration pH-Wert 0,1 M+0,2 M	5 µg/ml–50 µg/ml	p = 0,040	r = 0,34	mittel

Statistik	Datensatz	Signifikante Größe/ Paarweisevergleich	Signifikanz (p)	Effektstärke (r)	Aussagekraft
Kruskal-Wallis-Test	LL-37 Konzentration pH-Wert 0,1 M+0,2 M	Konzentration	p < 0,000		
Dunn-Bonferroni-Test	LL-37 Konzentration pH-Wert 0,1 M+0,2 M	200 µg/ml–50 µg/ml	p = 0,006	r = 0,46	mittel
Dunn-Bonferroni-Test	LL-37 Konzentration pH-Wert 0,1 M+0,2 M	200 µg/ml–5 µg/ml	p < 0,000	r = 0,93	stark
Dunn-Bonferroni-Test	LL-37 Konzentration pH-Wert 0,1 M+0,2 M	50 µg/ml–5 µg/ml	p = 0,005	r = 0,47	mittel

Tabelle 9: Übersicht der Signifikanzen und Koeffizienten für *A. actinomycetemcomitans*

Statistik	Datensatz	Im Modell aufgenommene Prädiktoren	Signifikante Größe	Signifikanz (p)	Koeffizient
Regression	Alle Peptide Konzentration pH-Wert 0,1 M+0,2 M	Alle Peptide Konzentration	LL-37	p < 0,000	Negativ (-587.420,741)
Regression	Alle Peptide Konzentration pH-Wert 0,1 M+0,2 M	Alle Peptide Konzentration	HNP-1	p < 0,000	Negativ (-503.283,704)
Regression	Alle Peptide Konzentration pH-Wert 0,1 M+0,2 M	Alle Peptide Konzentration	HBD-2	p < 0,000	Negativ (-597.921,389)

Statistik	Datensatz	Im Modell aufgenommene Prädiktoren	Signifikante Größe	Signifikanz (p)	Koeffizient
Regression	Alle Peptide Konzentration pH-Wert 0,1 M+0,2 M	Alle Peptide Konzentration	200 µg/ml	p < 0,000	Negativ (-321.928,519)
Regression	Alle Peptide Konzentration pH-Wert 0,1 M+0,2 M	Alle Peptide Konzentration	50µg/ml	p = 0,001	Negativ (-206.550,926)
Regression	HNP-1 Konzentration pH-Wert 0,1 M+0,2 M	Konzentration	200 µg/ml	p = 0,003	Negativ (-346.341,667)
Regression	HNP-1 Konzentration pH-Wert 0,1 M+0,2 M	Konzentration	50 µg/ml	p = 0,014	Negativ (-281.905,556)
Regression	LL-37 Konzentration pH-Wert 0,1 M+0,2 M	Konzentration	200 µg/ml	p < 0,000	Negativ (-601.958,889)
Regression	LL-37 Konzentration pH-Wert 0,1 M+0,2 M	Konzentration	50 µg/ml	p < 0,000	Negativ (-317.032,778)

12 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei allen Menschen bedanken, die mich während der Erstellung der Dissertation begleitet und unterstützt haben.

Besonderer Dank gilt meiner Doktormutter Frau Prof. Dr. Karin Christine Huth MME, Oberärztin der Poliklinik für Zahnerhaltung und Parodontologie der Ludwig-Maximilians-Universität München, für die freundliche Überlassung des interessanten Themas und ihrer kompetenten Betreuung.

Des Weiteren danke ich Herrn Professor Dr. Reinhard Hickel, Direktor der Poliklinik für Zahnerhaltung und Parodontologie, der mir die Durchführung der Arbeit in seiner Abteilung ermöglichte.

Mein besonderer Dank gilt meinem Betreuer Herrn Dr. Maximilian Kollmuß, der mir mit all seinem Wissen zur Seite stand und mich durch seinen unermüdlichen Einsatz allzeit tatkräftig unterstützte. Für seine außerordentlich gute Betreuung möchte ich mich ganz besonders bedanken.

Nicht zuletzt gilt mein Dank meinen Eltern, die mich grenzenlos unterstützten und mir zu jeder Zeit wertvollen Rat boten. An dieser Stelle möchte ich ihnen meinen ganz besonderen Dank aussprechen.

13 Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name	Sophie Laubmeier
Geburtsdatum	29.10.1991
Geburtsort	München

Schulischer Werdegang :

09/2002- 05/2011	Wilhelm-Hausenstein-Gymnasium München Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Universitärer Werdegang:

04/2012- 01/2018	Studium der Zahnmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München
09/2013	Naturwissenschaftliche zahnärztliche Vorprüfung
03/2015	Zahnärztliche Vorprüfung
01/2018	Zahnärztliche Prüfung
02/2018	Zahnärztliche Approbation

Beruflicher Werdegang:

04/2018- 03/2019	Zahnärztliche Vorbereitungsassistentin in der Kinderzahnarztpraxis Dr. Marion Barth in Freising
04/2019- 12/2020	Zahnärztliche Vorbereitungsassistentin in der Zahnarztpraxis Dr. Inge Stövesand in Fürstenfeldbruck
01/2021– 12/2021	angestellte Zahnärztin in der Internationalen Praxis für Kinderzahnheilkunde und Kieferorthopädie in München
11/2021	Elternzeit

Eidesstattliche Versicherung

Laubmeier, Sophie Charlotte

Ich erkläre hiermit an Eides statt,

dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

„Untersuchung der Wirkung von antimikrobiellen Peptiden auf die Formation von parodontalpathogenen Biofilmen in-vitro: Abhängigkeit von Konzentration, Ionenstärke und pH-Wert“

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

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

München, den 15.12.2022 Sophie Charlotte Laubmeier