

**Aus der Poliklinik für
Zahnerhaltung und Parodontologie
Klinik der Universität München**

Direktor: Prof. Dr. Reinhard HICKEL

**Untersuchung des Einflusses von LL37 auf orale Zellen *in vitro*:
Toxizitätsanalyse, Entzündungskaskade und
mögliches regeneratives Potential**

Dissertation

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

Pamela Keller

aus

Bangkok, Thailand

2023

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Karin Christine Huth, MME

Mitberichterstatter: PD Johann Schredelseker PhD

Mitbetreuung durch
den promovierten Mitarbeiter: PD Dr. Maximilian Kollmuß

Dekan: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 18.10.2023

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	2
1.1	Grundlagen der Parodontitis	2
1.1.1	Anatomie des Zahnhalteapparates	2
1.1.2	Epidemiologie	4
1.1.3	Ätiologie	5
1.1.4	Pathogenese	5
1.1.4.1	Plaqueeentwicklung und beteiligte Bakterien	7
1.1.4.2	Entzündungsreaktion	8
1.2	Antimikrobielle Peptide	10
1.2.1	Einteilung der AMPs	10
1.2.1.1	Defensine	10
1.2.1.2	Cathelicidine	12
1.2.2	Antibakterielle Wirkungsweise	13
1.2.3	Immunmodulierende Funktionen	14
1.2.3.1	Allgemeine immunmodulierende Funktionen von AMPs	14
1.2.3.2	Modulation der Zytokinfreisetzung durch LL37	15
2	Fragestellung und Studienziel	16
3	Material und Methoden	17
3.1	Zellarten	17
3.1.1	Kulturbedingungen	17
3.1.2	Routinearbeiten in der Zellkultur	18
3.1.2.1	Medienwechsel	18
3.1.2.2	Passagieren	18
3.1.2.3	Auftauen von Zellen	19
3.1.2.4	Bestimmung der Zellzahl	19
3.2	Aufbereitung der Proben.....	19

3.3	Spezielle Methoden und Anwendungen	20
3.3.1	Toxizitätstest mittels WST-8 Assay	20
3.3.2	EIA zum Nachweis der PGE ₂ -Konzentration in BHY und hPDLF	22
3.3.3	ELISA zum Nachweis der IL-1 β -Konzentration in BHY und hPDLF	24
3.3.4	ELISA zum Nachweis der IL-6-Konzentration in BHY und hPDLF	27
3.3.5	ELISA zum Nachweis der IL-8-Konzentration in BHY und hPDLF	27
3.3.6	ELISA zum Nachweis der TNF- α -Konzentration in BHY und hPDLF	28
3.4	ELISA zum Nachweis der Osteocalcin-Konzentration in hPDLSC	29
3.5	Statistische Auswertung	29
4	Ergebnisse	30
4.1	Zytotoxizitätsuntersuchungen	30
4.2	Beeinflussung der Entzündungsreaktion	32
4.2.1	EIA auf PGE ₂	32
4.2.2	ELISA auf IL-1 β	34
4.2.3	ELISA auf IL-6	36
4.2.4	ELISA auf IL-8	38
4.3	ELISA auf TNF- α	40
4.4	Wirkung auf die osteogene Differenzierung von Stammzellen	40
5	Diskussion	42
6	Zusammenfassung	52
7	Anhang	54
7.1	Abbildungsverzeichnis	54
7.2	Tabellenverzeichnis	55
7.3	Abkürzungsverzeichnis	56
7.4	Rezepte	57
8	Literaturverzeichnis	58
10	Danksagung	68

1 Einleitung

Der demographische Wandel in Deutschland zeigt ein Älterwerden der Bevölkerung (Konzelmann *et al.*, 2014). Etwa 20% der Deutschen sind 65 Jahre alt oder älter (Cangiano, 2014). Über die Hälfte der deutschen Senioren leidet unter einer parodontalen Erkrankung (Micheelis *et al.*, 2008). In Verbindung mit der besseren medizinischen Versorgung und einem verstärkten gesundheitlichen Bewusstsein, sind diese häufig auch in hohem Alter noch sehr aktiv und fit (Hokema und Scherger, 2016; Mergenthaler *et al.*, 2015). Damit einher geht das Selbstverständnis eines gesunden Gebisses. Herausnehmbarer Zahnersatz wird unbeliebter und der Wunsch nach dem Erhalt eigener Zähne wird immer größer. Die Pflege und das Bewahren eines gesunden Parodontiums ist für die Zahnmedizin eine anspruchsvolle Aufgabe. Stetig werden neue Therapiemöglichkeiten untersucht, um dies zu erreichen. Antimikrobielle Peptide, körpereigene Peptide mit unter anderen antimikrobiellen Eigenschaften, könnten zur Parodontitis-Behandlung in Frage kommen.

1.1 Grundlagen der Parodontitis

Parodontitis ist eine multifaktoriell entzündliche Erkrankung, welche mit dysbiotischem Biofilm assoziiert ist und sich durch die fortlaufende Destruktion des Zahnhalteapparats kennzeichnet (Papapanou *et al.*, 2018).

1.1.1 Anatomie des Zahnhalteapparates

Das Parodontium besteht aus verschiedenen Geweben, welche an dem Halt des Zahnes im Knochen beteiligt sind. Dazu gehören die Gingiva, das Wurzelzement, das parodontale Ligament und der Alveolarknochen (Meyle und Chapple, 2015; Nanci und Bosshardt, 2006).

Die Gingiva umgibt den Alveolarknochen und den zervikalen Anteil des Zahns. Sie besteht aus Epithel und Bindegewebe. In Abhängigkeit der Lokalisation lässt sich das Epithel in orales Epithel, orales Sulkusepithel und Saumepithel unterteilen. Das orale Epithel ist keratinisiert. Dies dient dem Schutz vor chemischen, mechanischen, thermischen und infektiösen Reizen (Rateitschak Klaus, 2003). Das Saumepithel ist über Hemidesmosome direkt mit der Zahnoberfläche verbunden (Cho und Garant, 2000). Dem Saumepithel wird hierbei die wichtige Aufgabe zuteil, das parodontale Gewebe von der keimreichen Mundflora zu isolieren und ist die erste Barriere der

unspezifischen Immunabwehr (Nanci und Bosshardt, 2006). Dies gelingt durch ein Zusammenspiel von epithelialen und nicht-epithelialen Zellen. In den Interzellularräumen des Saumepithels befinden sich neutrophile Granulozyten, Lymphozyten, Makrophagen und antigen-präsentierende Zellen wie Langerhans-Zellen (Bosshardt und Lang, 2005). Zusätzlich besitzt das Saumepithel eine hohe Turn-Over-Rate. Das hat zur Folge, dass durch den beständigen Zellumsatz Zellen, Sulkusflüssigkeit und damit auch Bakterien und Toxine vom Stratum basale zum Sulkus „ausgespült“ werden (Rateitschak Klaus, 2003)

Das Wurzelzement ist avaskuläres mineralisiertes Hartgewebe, welches die Zahnwurzel ummantelt. Die maximale Schichtstärke des Zements lokalisiert sich apikal, während es an der Schmelz-Zement-Grenze am dünnsten ist (Andrei *et al.*, 2018). Die Dicke liegt zwischen 20 und 200 µm (Mariotti, 1993). Es nimmt beim Gesunden in Dicke zeitlebens zu. Wurzelzement ist sowohl Bestandteil des Zahnes als auch ein Element des Parodontiums (Bosshardt und Selvig, 1997). Es besteht zu 50% aus organischen und zu 50% aus anorganischen Stoffen. Typ III Kollagen bildet 90% und Typ I Kollagen bildet 5% des organischen Anteils. Des Weiteren sind geringe Mengen Glykoproteine und Proteoglykane wie Fibronectin und Sialoprotein vorhanden (Mariotti, 1993; Saygin *et al.*, 2000). Der anorganische Teil setzt sich zusammen aus Hydroxylapatit und Calciumphosphat (Andrei *et al.*, 2018). Insgesamt ähnelt der Zement in seiner Zusammensetzung Knochensubstanz (Bosshardt und Selvig, 1997). Wurzelzement lässt sich nach Lokalisation und Organisation in 4 verschiedene Arten einteilen. Azelluläres afibrilläres Zement entsteht während des Schmelzdurchbruchs und ist nur im Bereich der Schmelz-Zement-Grenze vorhanden. Azelluläres Fremdfaserzement wird durch desmodontale Fibroblasten gebildet und liegt im zervikalen Drittel aller Zähne. Hier inserieren die Sharpey-Fasern. Somit ist es hauptverantwortlich für Verankerung des Zahnes in der Alveole. Zelluläres Eigenfaserzement ist im mittleren bis apikalen aber auch furkalem Bereich lokalisiert und enthält Zementozyten, welche in Lakunae eingeschlossen sind. Zelluläres Eigenfaserzement wird gebildet nach Wurzelresorptionen und Frakturen. Deshalb wird es häufig auch als „Reparaturzement“ bezeichnet. Zelluläres Gemischtfaserzement befindet sich im apikalen Bereich und besteht anteilig aus zellulärem Eigenfaserzement und azellulärem Fremdfaserzement. Insgesamt wird bei Therapie der Parodontitis die Wiederherstellung des azellulären Fremdfaserzement angestrebt.

Das parodontale Ligament (PDL) befindet sich zwischen Alveolarknochen und Wurzelzement. Dabei fungiert es als elastische Grenze der Bewegung des Zahnes und verhindert eine Überbelastung durch Druck während der Mastikation. Es besitzt je nach Zahn und Lokalisation an der Wurzel eine Dicke von 0,15 mm und 0,38 mm (Jiang *et al.*, 2016). Sharpey'sche Fasern (Kollagenfasern), die sowohl in Wurzelzement als auch in den Alveolarknochen inserieren, sind an der Verbindung des Zahnes zum Alveolarknochen beteiligt (Andrei *et al.*, 2018). Hauptaufgabe des PDL besteht darin mechanischen Stress während des Kauvorgangs abzufangen und Wurzelzement, Alveolarknochen und PDL über Blutgefäße mit Nährstoffen zu versorgen (Jiang *et al.*, 2016). Das PDL dient auch als sensorischer Rezeptor für die richtige Positionierung der Kiefer zueinander bei Mastikation. Es ist ein Reservoir für Zellen, die an der Geweberegeneration, -homeostase und -reparatur mitwirken. Dabei handelt es sich um Fibroblasten, Makrophagen, Mallassez'sche Epithelreste, Osteoblasten, Osteoklasten, undifferenzierte Mesenchymzellen und Zementoblasten (Nanci und Bosshardt, 2006).

Der Alveolarknochen ist der zahntragende Teil des Kieferknochen (Cho und Garant, 2000). Er lässt sich strukturell in Kortikalis, Spongiosa und Bündelknochen differenzieren. Der Bündelknochen bildet die Alveole. Sharpey'sche Fasern, welche aus Kollagenfasern bestehen, inserieren sowohl über das Wurzelzement in Zahnoberfläche als auch in den Bündelknochen und verankern so den Zahn im Knochen. Durch konstante Umbauprozesse wird der Alveolarknochen den mechanischen Belastungen durch Mastikation gerecht. Es befinden sich Progenitorzellen im parodontalen Ligament, welche zu Osteoblasten differenzieren können, um den Umbauprozess des Alveolarknochens zu ermöglichen (Nanci und Bosshardt, 2006).

1.1.2 Epidemiologie

Bei etwa 40% der erwachsenen Durchschnittsbevölkerung in Deutschland ist eine moderate Ausprägung der Parodontitis vorhanden. Micheelis *et al.* beleuchtet den Zustand der Prävalenz in der deutschen Bevölkerung genauer in seiner Mundgesundheitsstudie von 2016. In der 35-44 jährigen Bevölkerungsgruppe ist eine parodontale Erkrankung mit einer Prävalenz von 52% nachweisbar. 43,3% sind von einer moderaten Parodontitis betroffen und ungefähr 10% weisen eine schwere

Parodontitis auf. 65% der 65- bis 74-Jährigen leiden unter einer parodontalen Erkrankung. Davon handelt es sich bei 44,8% um eine moderate und bei etwa 20% um eine schwere Ausprägung der Krankheit (Micheelis und Jordan, 2016). Im gesamten Europäischen Durchschnitt wurden bei den 35-44 Jährigen Taschensondierungstiefen von 3,5 mm bis 5,5 mm bei 13-54% gemessen. Höhere Sondierungstiefen von 5,5 mm wurden in vielen west-europäischen Ländern bei unter 10% der Bevölkerung der oben genannten Altersgruppe nachgewiesen. Der Durchschnitt lag bei einigen osteuropäischen Ländern deutlich höher (30-40%) (Sheiham und Netuveli, 2002). Höhere Sondierungstiefen (>6 mm) konnten bei 5,0% der deutschen jungen Erwachsenen dokumentiert werden (Micheelis und Jordan, 2016). In einer französischen Studie (Bourgeois *et al.*, 2007), in der Erwachsene im Alter von 35 bis 64 untersucht wurden, konnte ein schwerer Attachmentverlust bei 50% der Erwachsenen errechnet werden. In den USA konnten bei 68% der Erwachsenen bis zu einem Lebensalter von 65 Jahren eine parodontale Erkrankung nachgewiesen werden (Eke *et al.*, 2016).

1.1.3 Ätiologie

Als primärer Faktor zur Entstehung einer Parodontitis wird der bakterielle Biofilm genannt. Jedoch ist die Präsenz des Biofilms alleine nicht ausschlaggebend für die Entwicklung einer Parodontitis. Es handelt sich um eine multifaktoriell bedingte Erkrankung und entsteht aus der komplexen Interaktion zwischen Biofilm und Immunantwort des Wirts (Kornman, 2008). Faktoren, die zur Entwicklung einer Parodontitis beitragen, lassen sich in modifizierbare und nicht-modifizierbare Faktoren einteilen (Van Dyke und Sheilesh, 2005). Rauchen, Alkoholkonsum, hormonelles Ungleichgewicht, systemische Erkrankungen, wie Diabetes und kardiovaskuläre Erkrankungen, psychosoziale Faktoren, wie Stress gehören neben dem Biofilm, der Teil des primären Ursachenkomplexes ist, zu den sekundären Faktoren (Clarke und Hirsch, 1995).

1.1.4 Pathogenese

Im klinisch gesunden Zustand der Gingiva sind geringe Mengen von Abwehrzellen in der Sulkusflüssigkeit nachzuweisen (Bosshardt und Lang, 2005; Van Dyke und Sheilesh, 2005). Dabei handelt es sich um einen physiologischen Abwehrmechanismus gegen die ständige mikrobielle Belastung innerhalb der

Mundhöhle. Sofern der akkumulierte Biofilm nicht entfernt wird, kommt es etwa 14 Tage nach Plaquebildung zur Entwicklung einer frühen Läsion (Wade, 2013). Inflammosomen in Makrophagen und polymorphkernigen Granulozyten (PMN) werden aktiviert und starten die Entzündungsreaktion. Die Freisetzung von Histaminen und der Komplementfaktoren C3a und C5a fördern die Vasodilatation und erhöhen die vaskuläre Permeabilität, sodass es zur Diapedese der neutrophilen Granulozyten ins entzündete Gewebe kommt (Meyle und Chapple, 2015). Es treten vermehrt auch Mastzellen, Makrophagen, Lymphozyten und Plasmazellen auf. Dies führt zu einer höheren Flussrate der Sulkusflüssigkeit und es kommt zu einer Verschiebung des pH-Wertes in einen leicht sauren Bereich (Marsh, 1994). Diese Verhältnisse ermöglichen eine Veränderung des zunächst mehrheitlich gram-positiven Keimspektrums in ein gram-negatives, asachharolytisches Keimspektrum. Die Sulkusflüssigkeit enthält Anteile der Immunabwehr wie Zellen, IgA, aber auch Glykoproteine und ist idealer Nährboden für diese Bakterien. Es kommt zu einer Dysbiose des Mikrobioms (Hajishengallis *et al.*, 2012; Marsh, 1994; Rosier *et al.*, 2018; Van Dyke, 2017). Proteasen wie Gingipain des *Porphyromonas gingivalis* zerstören die Epithelschicht und fördern so die bakterielle Invasion ins Gewebe. Die sich anschließende etablierte Läsion weist sich durch ein Vorherrschen von B-Lymphozyten und extravaskulären Immunoglobulinen aus. Die kollagenolytische Aktivität ist erhöht. Es kommt zur Destruktion des gingivalen Stützgewebes. Saumepithel wandelt sich in keratinisiertes Taschenepithel um. Klinisch liegt eine moderate bis schwere Gingivitis mit gingivaler Blutung, Farb- und Konturveränderung vor. Dieser Zustand kann über mehrere Jahre unverändert bleiben. In der fortgeschrittenen Läsion ist die Destruktion bis auf den Alveolarknochen ausgedehnt. Es bildet sich eine parodontale Tasche. Es hat sich eine Parodontitis etabliert. Bei chronischen Entzündungen liegen Perioden der Exazerbation und Stagnation vor. Dieser ist durch Heilvorgänge (Angiogenese Fibrose) und gleichzeitiger Inflammation charakterisiert, sodass eine nährstoffreiche Umgebung für den pathogenen Biofilm erzeugt wird. Eine Regeneration des Gewebes im Sinne eines Restitutio ad integrum ist das erwünschte Ziel bei der Parodontitis-Therapie.

1.1.4.1 Plaqueentwicklung und beteiligte Bakterien

In der Mundhöhle ist eine Bandbreite an Mikroorganismen zu finden. Archaeen, Bakterien, Pilze, Protozoen und Viren sind Bestandteil der natürlichen Mundflora. Es wurden etwa 1000 bakterielle Spezies entdeckt (Wade, 2013). Der orale Biofilm ist eine dreidimensionale Struktur von bakteriellen Lebensgemeinschaften. Dabei sind die Bakterien in einer extrazellulären Matrix eingebettet, die an Oberflächen wie Zahn- oder Wurzeloberflächen angehaftet sind (Zijnga *et al.*, 2010). Die Matrix, auch als extrazelluläre polymere Substanz (Caton *et al.*) bezeichnet, besteht aus Polysacchariden, Proteinen und extrazellulärer DNA (Zijnga *et al.*, 2012). Die primäre Besiedelung der Zahnoberfläche geschieht auf Basis des Pellicels. Dieses Schmelzoberhäutchen bildet sich aus Glykoproteinen des Speichels auf der sauberen Zahnoberfläche (Hellwig *et al.*, 2013; Wade, 2013). Gram-positive Aerobier und fakultative Anaerobier wie Streptokokken und Actinomyzeten gehören zu den ersten Besiedlern der Zahnoberfläche (Nyvad und Kilian, 1987). In parodontal-unauffälliger Plaque befinden sich *Fusobacterium*, *Actinomyces*, *Streptococcus*, *Neisseria*, *Capnocytophaga*, *Prevotella*, *Corynebacterium* und *Rothia*. Nach einer Woche siedeln sich vermehrt fadenförmige Bakterien auf den bisherigen Kolumnen an. 3 Wochen später besteht der Biofilm fast ausschließlich aus fadenförmigen Bakterien. Die Kokken sind verschwunden. In der reifen Plaque befinden sich Fusobakterien, Treponema und Synergisteten. Nach wenigen Monaten ist die generelle Morphologie des Biofilms unverändert zu seinem 3-wöchigen Zustand (Zijnga *et al.*, 2010). Zellen im Biofilm kommunizieren miteinander. Dieser Vorgang wird als Quorum Sensing bezeichnet. Dabei werden abhängig von der Zelldichte im Biofilm Signalmoleküle freigesetzt, welche die Genexpression beeinflussen. Es kommt zu einer phänotypischen Veränderung der Bakterien, die vorteilhaft für den Biofilm ist. Die Mikroorganismen verändern ihre Funktion und passen sich somit den neuen Umständen an (Wimpenny *et al.*, 2000). Es kommt zu einer Dysbiose. Dies ist ein Ungleichgewicht des Keimspektrums und eine Veränderung hin, zu einer für den Organismus schädliche Flora. Nährstoffe aus entzündlichen Umfeld können für den Stoffwechsel genutzt werden. Dazu gehören Bakterien, die gram-negative, anaerobe, proteolytische und capnophile Eigenschaften besitzen. Zijnga teilt die subgingivale Plaque in 3 unterschiedliche Zonen auf. Direkt an der Wurzeloberfläche aufliegend befinden sich kleine Zellen ohne spezifische Ordnung, eingebettet in eine fibröse

Membran bestehend aus Debris, toten Zellen und Biofilmmatrixbestandteilen. Darauf liegt eine Schicht stäbchen- und fadenförmiger Bakterien. Die äußerste Zone besteht aus palisadenförmig, parallel aneinander gereihten stäbchenförmigen Zellen (Zijnga *et al.*, 2012). Generell zeigt sich im parodontal unauffälligem Biofilm ein höherer Artenreichtum und vermehrte Assoziationen zwischen den Bakterienarten (Meuric *et al.*, 2017). *Porphyromonas gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Tannerella forsythia* und *Treponema denticola* sind häufig mit Entwicklung von Parodontitis assoziiert (Damgaard *et al.*, 2015; Puig-Silla *et al.*, 2017; Zijnga *et al.*, 2012).

1.1.4.2 Entzündungsreaktion

Mikrobielle Bestandteile wie Lipopolysaccharide werden vom Wirt erkannt. Dies initiiert die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren und weiterführend eine Chemokin- und Zytokin-Produktion (Garlet *et al.*, 2003; Lima *et al.*, 2010; Ukai *et al.*, 2008). Die Entzündungsreaktion ist ein komplexes Geschehen aus Signalkaskaden, welche hauptsächlich durch diese Botenstoffe reguliert wird (Cekici *et al.*, 2014). Sie werden unter anderem von Phagozyten, Epithelzellen und Fibroblasten sezerniert (Ara *et al.*, 2009). Prostaglandin E₂ spielt eine wichtige Rolle im Entzündungsprozess, indem es in allen Prozessen, welche zu den typischen Kardinalssymptomen (Calor, Dolor, Rubor, Tumor) einer Entzündung führen, involviert ist (Funk, 2001; Tilley *et al.*, 2001). Prostaglandin E₂ (PGE₂) ist ein Produkt des Cyclooxygenase-Wegs, bei dem aus Arachidonsäure durch Cyclooxygenase Prostaglandin H entsteht und aus diesem durch Prostazyklinsynthese wiederum Prostaglandin E₂ (Park *et al.*, 2006; Smith, 1992). Der Synthese-Vorgang wird stark vereinfacht in Abbildung 1 wiedergegeben.

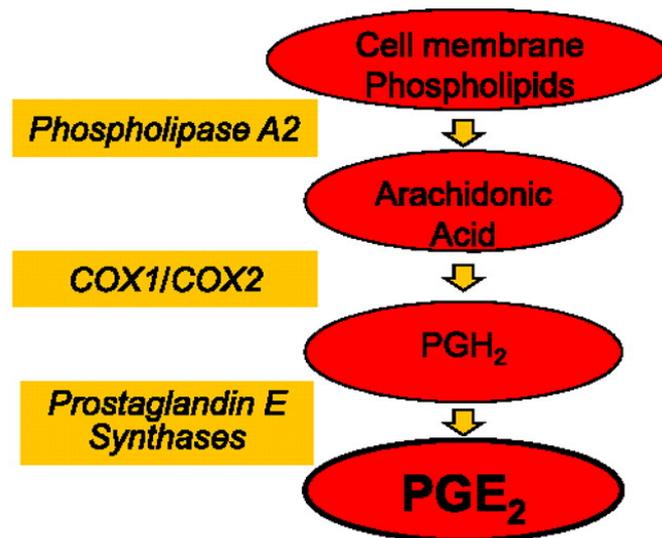


Abbildung 1: Darstellung der Prostaglandin E₂-Synthese (Ausschnitt der Abbildung nach Kalinski, 2012)

Stimuliert wird die PGE₂-Produktion unter anderem durch mikrobielle Bestandteile wie Lipopolysaccharide (LPS). Es wird vor allem in den frühen Phasen der Entzündung sezerniert (Smith, 1989). Zusätzlich beeinflusst es pro- und antiinflammatorische Antworten. Unter anderem reguliert es die Freisetzung von IL-1 β und IL-6 (Ricciotti und FitzGerald, 2011). Ein weiterer wichtiger Botenstoff ist der Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF- α). Er wird hauptsächlich von Makrophagen nach Stimulierung durch Endotoxine produziert. Er ist an der Aktivierung der Apoptose, Differenzierung und Rekrutierung von Zellen beteiligt (Mootoo *et al.*, 2009) (Ehlers, 2003). Auch fördert es die Produktion einiger proinflammatorischer Cytokine (Wajant *et al.*, 2003) (Dinarello, 2000). IL-1 β wird hauptsächlich in dendritischen Zellen, Makrophagen und produziert. Indem es die Genexpression und Synthese von Cyclooxygenase-2, Stickstoffmonoxid-Synthase und Phospholipase-A induziert, generiert es Fieber, eine herabgesetzte Schmerzwahrnehmung und Vasodilatation bei einem entzündlichen Vorgang. Erhöhte Expression von Adhäsionsmolekülen durch Interleukin-1 β ermöglichen eine Leukodiapedese immunkompetenter Zellen aus dem Blutkreislauf in die betroffenen Areale (Dinarello, 2009). IL-1 β ist in erhöhten Konzentrationen in Sulkusflüssigkeit bei Patienten mit parodontalen Erkrankungen zu finden (Heidari *et al.*, 2019). „IL-6 ist ein zentraler Regulator entzündlicher Prozesse“ (Hoge *et al.*, 2013). Während es über den membrangebundenen Rezeptor mIL-6R α lediglich an Hepatozyten und bestimmten Leukozyten wirken kann, ermöglicht ein Komplex aus dem löslichen Rezeptor sIL-6R α und Interleukin-6, welcher an das ubiquitär auf fast

allen Zellen vorkommende gp30-Protein bindet, die Möglichkeit fast alle Zellen zu beeinflussen (Hoge *et al.*, 2013). Zusätzlich steht Interleukin-6 im Zusammenhang mit Knochen-Homöostase, indem es die Osteoklastendifferenzierung über den sIL-6-Rezeptor einleitet (Scheller *et al.*, 2011). TNF- α , IL-1 β und IL-6 sind eine der ersten Zytokine, die bei Parodontalerkrankungen nachweisbar sind (Cekici *et al.*, 2014). Interleukin-8 wird sowohl von Leukozyten, wie Monozyten, natürlichen Killerzellen, neutrophilen Granulozyten, als auch von somatischen Zellen, wie Fibroblasten, endothelialen und epithelialen Zellen, produziert (Mukaida, 2003). Es trägt zur Leukopiadese und Aktivierung von neutrophilen Granulozyten bei (Baggiolini *et al.*, 1989). IL-1, IL-6, IL-8, PGE₂, und TNF- α stehen in engem Zusammenhang mit erhöhtem Knochenverlust bei Parodontitis (Liu *et al.*, 2010).

1.2 Antimikrobielle Peptide

Antimikrobielle Peptide (AMP) sind, wie der Name beschreibt, Peptide mit antimikrobiellen Eigenschaften. Sie sind Teil des angeborenen Immunsystems (Ganz, 2003) und kommen in Tieren und Pflanzen vor (Brogden, 2005). Im menschlichen Körper befinden sie sich unter anderem in der Mukosa des respiratorischen Systems, der Mundhöhle und des Verdauungstrakts (Diamond *et al.*, 2008). Dort sind sie unter anderem verantwortlich für den Erhalt einer ausgewogenen bakteriellen Besiedelung (Eubakterie) (Boman, 1995). AMPs sind kleine Peptidmoleküle, die nicht mehr als 100 Aminosäuren umfassen (Ganz, 2003). Es wurden verschiedene Arten AMPs in der Mundhöhle entdeckt. Dazu gehören α -Defensine, β -Defensine, Calprotectin, Adrenomedullin, Histatine, und Cathelicidine (Dale und Fredericks, 2005).

1.2.1 Einteilung der AMPs

Anhand der Aminosäuren-Zusammensetzung und Struktur lassen sich AMPs in verschiedene Gruppen einteilen (Brogden, 2005). Den größten Anteil in der Mundhöhle machen Defensine und Cathelicidine aus (Jin, 2011). Aus diesem Grund wird auf diese beiden Gruppen intensiver eingegangen.

1.2.1.1 Defensine

Defensine sind aufgrund ihrem hohen Arginin-Anteil kationische, 3-5 kDa große Peptide (Diamond *et al.*, 2008). Sie besitzen eine β -Faltblattstruktur mit einem Rahmen aus 6 über 3 Disulfidbrücken verbundenen Cysteinen (Diamond *et al.*, 2008; Ganz,

2003; Jin, 2011). Abbildung 2 zeigt eine Darstellung der Quartärstruktur eines Defensins. Man kann sie anhand der Verteilung der Disulfidbrücken-verbundenen Cysteinen in die zwei Hauptgruppen α - und β -Defensine unterteilen. Bei den α -Defensinen sind die Cysteine 1 mit 6, 2 mit 4 und 3 mit 5 verlinkt, wohingegen bei den β -Defensinen die Cysteine 1 mit 5, 2 mit 4, 3 mit 6 gekoppelt sind (Yang *et al.*, 2004). Zusätzlich sind β -Defensine etwas größer in ihrer Masse als ihre Verwandten (Boman, 1995). Laut Greer sind mindestens 28 β -Defensine beschrieben, wovon Human- β -Defensine 1 bis 4 (HBD) am besten untersucht sind. HBD-1, HBD-2 und HBD-3 sind in der Mundhöhle vertreten (Greer *et al.*, 2013). Während β -Defensine hauptsächlich in Epithelzellen der Zunge, Mukosa, Gingiva und großen Speicheldrüsen (Hans und Madaan Hans, 2014) exprimiert werden, werden α -Defensine in Vakuolen neutrophiler Granulozyten produziert (Greer *et al.*, 2013). Aus diesem Grund besitzen α -Defensine des Menschen den Namen „Human-Neutrophile-Peptides“ (HNP), wovon 4 bekannt sind (HNP 1-4). Generell agieren Defensine gegen eine weite Bandbreite von Bakterien, dabei sind sie effektiver gegen gram-negative Bakterien als gegen gram-positive Bakterien. Ebenso wirken sie gegen Pilze und sind zytotoxisch (Boman, 1995). Gorr beschreibt eine spezifische antibakterielle Wirkung von HNP-1 auf *Streptococcus mutans*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* und *Porphyromonas gingivalis*. Wohingegen HNP-2 und -3 im Speichel und Sulkusflüssigkeit gegen *P. gingivalis* und *A. actinomycetemcomitans* agieren (Gorr und Abdolhosseini, 2011). Hinzuzufügen ist, dass bei Patienten mit aggressiver Parodontitis HNP-1 bis HNP-3 im Vergleich zum Gesunden 15-fach in ihrer Konzentration erhöht waren. Bei Patienten mit chronischer Parodontitis lag die Konzentration bis zu 60-fach höher (Greer *et al.*, 2013).

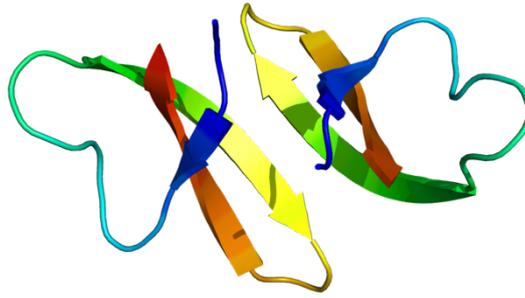


Abbildung 2: Quartärstruktur von HNP-1

1.2.1.2 Cathelicidine

LL37 ist der einzige Vertreter der Cathelicidine im menschlichen Körper (Bucki *et al.*, 2010; Greer *et al.*, 2013; Otto, 2009). Ein weiterer Name für das Peptid ist auch hCAP-18 (Human Cationic Antimicrobial Peptide). Synthesorte sind neben Epithelzellen hauptsächlich neutrophile Granulozyten (Greer *et al.*, 2013; Hans und Madaan Hans, 2014). In der Mundhöhle kann man das Peptid als Produkt von Lymphozytenmigration in bukkaler Mukosa, entzündetem gingivalen Gewebe, Speichel, Sulkusflüssigkeit und Zungenepithel nachweisen (Frohm Nilsson *et al.*, 1999). In Bezug auf Parodontitis ist zu erwähnen, dass die Konzentration von LL37 in der Sulkusflüssigkeit mit Tiefe des Sulkus steigt (Hosokawa *et al.*, 2006). Das Peptid besteht aus 37 Aminosäuren, wovon die ersten beiden Leucin-Aminosäuren sind. Mittig sitzt eine Cathelin-like Domäne und c-terminal eine antimikrobielle Domäne. Die Sekundärstruktur ist eine amphiphile α -Helix, wie in Abbildung 3 dargestellt (Hans und Madaan Hans, 2014). Beeinflusst wird die Produktion von verschiedenen Faktoren. Hierzu gehören die Exposition von bakteriellen Produkten, Zytokinen, die Verfügbarkeit von Sauerstoff und Sonnenlichtexposition, da die Genexpression auch durch Vitamin D aktiviert wird (Bucki *et al.*, 2010). LL37 besitzt eine bakterizide Wirkung gegen gram-positive und gram-negative Bakterien wie *P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans*, *S. gordonii*, *P. intermedia*, *F. nucleatum* und *S. sanguinis* (Gorr und Abdolhosseini, 2011), eine fungizide Wirkung wie beispielsweise gegen *Candida albicans* (Diamond *et al.*, 2008) und es kann bakterielle LPS neutralisieren. Spezifitäten in der oralen antibakteriellen Wirkung zeigt LL-37 gegen *P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans*, *S. gordonii*, *P. intermedia*, *F. nucleatum* und *S. sanguinis* (Bucki *et al.*, 2010). Die Expression von LL37 wird durch die Präsenz von *F. nucleatum* und *P. intermedia* hochreguliert (Gorr und Abdolhosseini, 2011).



Abbildung 3: dreidimensionale Struktur von LL-37

1.2.2 Antibakterielle Wirkungsweise

Es gibt zwei beschriebene Möglichkeiten, die zur Tötung mikrobieller Organismen durch AMPs führen können. Die erste beruht auf der Bildung von transmembranen Poren innerhalb des bakteriellen Bilayer. Die zweite Methode wird als „Carpet-Model“ bezeichnet. Zunächst lagern sich an- oder kationische AMPs über elektrostatische Bindung an bakterielle Oberflächenstrukturen. Bei gram-negativen Bakterien handelt es sich dabei um die LPS, bei gram-positiven Bakterien ist es die Teichonsäure der Bakterienmembran (Weinberg *et al.*, 1998). Nachdem sich die AMPs an die Bakterienoberfläche angelegt haben, können sie die Membran durchdringen und transmembrane Poren bilden. Dies führt zur Veränderung der Zellpermeabilität und somit des osmotischen Gradienten, der transmembranen Ladung und des pH-Werts. Letztendlich hat es die Lyse der Zellen zur Folge (Boman, 1995; Brogden, 2005). Auf diese Weise wirken unter anderem Defensine. Bei Cathelicidinen gibt es widersprüchliche Theorien. Bucki geht davon aus, dass LL37 durch Insertion in die Zellmembran zu deren Zersetzung führt (Bucki *et al.*, 2010), wohingegen Yang behauptet, dass LL37 sich Teppich-artig auf die Membran auflegt und so zur Mizellenbildung führt. Allerdings ist dieser Mechanismus noch nicht genauer geklärt (Yang *et al.*, 2004). Oren beschreibt das Carpet-Model als breitflächige Anlagerung der positiv-geladenen Anteile AMPs an die negativ-geladenen Phospholipide die Doppellipidmembran, wodurch sie so umorganisiert wird, sodass sich diese wie ein Detergent auflöst (Oren und Shai, 1997).

1.2.3 Immunmodulierende Funktionen

1.2.3.1 Allgemeine immunmodulierende Funktionen von AMPs

Neben der antimikrobiellen Wirkung wurde schon des Öfteren eine immunmodulierende Wirkung der AMPs erwähnt. Sie besitzen chemotaktische Fähigkeiten. β -Defensine induzieren die Freisetzung von Chemokinen aus dendritischen Zellen, Monozyten, Makrophagen, Mastzellen, neutrophile Granulozyten und T-Lymphozyten (Hans und Madaan Hans, 2014; Yeung *et al.*, 2011). α -Defensine wirken chemotaktisch auf naive CD-4-T-Zellen und CD-8-T-Zellen (Oppenheim und Yang, 2005). β -Defensine wie HNP 1-3 agieren über die erhöhte Produktion von IL-8 in chemotaktisch auf neutrophile Granulozyten (Van Wetering *et al.*, 1997). Auch LL37 kann chemotaxisch auf neutrophile Granulozyten, Mastzellen, T-Zellen und Monozyten wirken (Yeung *et al.*, 2011) (Bucki *et al.*, 2010). Wie oben bereits beschrieben, ist der Hauptsyntheseort von LL37 neutrophile Granulozyten. Also wird durch die Chemotaxis vermehrt LL37 im Sinne eines positiven Feedbacks freigesetzt. AMPs supprimieren Immunantwort, indem β -Defensine die Produktion von beispielsweise TNF- α und IL-6 inhibieren (Hans und Madaan Hans, 2014). Während α -Defensine die Sekretion von TNF- α und IL-1 erhöhen, besitzen auch sie neben der entzündungsanregenden Wirkung, eine entzündungshemmende Wirkung, durch eine Verringerung der IL-10-Produktion in Monozyten (Yang *et al.*, 2004). Nanomolare Konzentrationen von α -Defensinen inhibieren die Produktion von immunsupprimierenden Glucocorticoiden (Yang *et al.*, 2001). LL37 inhibiert die Aktivierung des Immunsystems durch Lipopolysaccharide und anderer Moleküle mit bakteriellem Ursprung, indem es diese neutralisiert und eine Produktion von entzündungsfördernden Zytokinen unterdrückt wird (Bucki *et al.*, 2010; Into *et al.*, 2010). Abbildung 4 veranschaulicht vereinfachend die verschiedenen immunmodulierenden Funktionen von AMPs wie oben beschrieben.

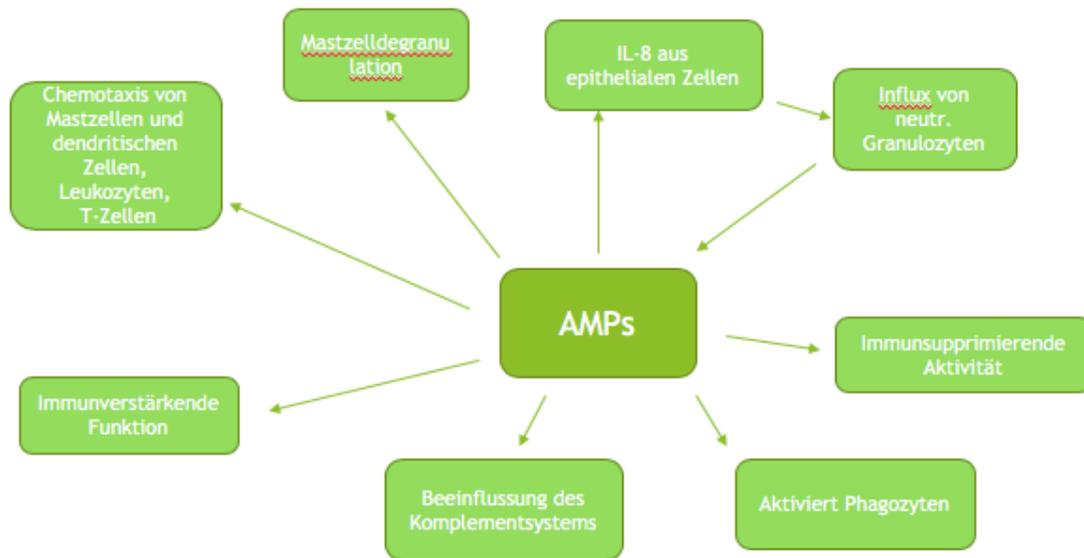


Abbildung 4: Überblick der verschiedenen immunmodulierenden Funktionen der AMPs

1.2.3.2 Modulation der Zytokinfreisetzung durch LL37

LL-37 beeinflusst die Zytokinfreisetzung in Leukozyten. Es induziert die Freisetzung von IL-4, IL-5 und IL-1 β aus Mastzellen (Yoshioka *et al.*, 2008). Interleukin-1 β und LL37 arbeiten synergistisch und erhöhen die Produktion von Interleukin-6 und -10 und Monozyten-chemotaktische-Protein 1 und 3 in peripheren mononuklearen Zellen. In Bezug auf IL-8 und IL-6 gibt es bei unterschiedlichen Zellen differenzierbare Auswirkungen auf die Zytokinfreisetzung. LL37 induziert die Produktion von Interleukin-8 in myeloischen und epithelialen Zellen (Yeung *et al.*, 2011), in glatten Muskelzellen der Atemwege (Zuyderduyn *et al.*, 2006), in Keratinozyten, in bronchialen Epithelzellen (Filewod *et al.*, 2009) und in HGEC (human gingival epithelial cells) (Montreekachon *et al.*, 2014). Boink untersucht LL37 in Bezug auf Keratinozyten und Fibroblasten der Gingiva und zeigt auf, dass IL-6 im Gegensatz zu IL-8 in beiden Zellarten nicht signifikant erhöht wird (Boink *et al.*, 2017). Durch aktivierte Cluster-Gene erhöht LL37 die Produktion von Zytokinen der IL-1-Familie, wozu auch IL-1 β gehört, in humanen epidermalen Keratinozyten (Li *et al.*, 2014). In Humanen Gingivalen Fibroblasten (HGF) wurde die Produktion von COX-2 und PGE₂ erhöht (Chotjumlong *et al.*, 2013).

2 Fragestellung und Studienziel

Um LL37 als Therapie von parodontalen Erkrankungen bestmöglich einsetzen zu können, ist es von Interesse zu ergründen, inwiefern die Zellen des Parodontiums darauf reagieren. Im Sinne einer Risiko-Analyse ist es von Wichtigkeit, eine negative Wirkung durch LL37 auf den Organismus mit einem möglichen therapeutischen Ziel zu vergleichen.

Dabei ist es interessant die Biokompatibilität des Stoffes zu untersuchen. Zur Untersuchung einer möglichen Zytotoxizität wird ein WST-8 Test vorgenommen. Des Weiteren soll die Reaktion von LL37 auf die Entzündungsreaktion von verschiedenen Zellen, die entweder Teil des Parodontiums oder funktionell wichtig für dessen Homöostase sind, genauer beleuchtet werden. Ebenso soll der Einfluss von LL37 sowohl auf die Entzündungsreaktion dieser als auch auf das Regenerationspotential untersucht werden.

3 Material und Methoden

3.1 Zellarten

Im Fokus der Untersuchungen standen BHY-, hPDLF- und hPDSC-htert-Zellen. BHY-Zellen sind Epithelzellen. In diesem Fall wurden Exemplare des Leipzig-Instituts DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Deutschland) verwendet. Sie entstammen einem hochdifferenzierten Plattenepithelkarzinom des Mandibularknochens eines 52-jährigen Japaners. hPDLF-Zellen sind humane Fibroblasten des parodontalen Ligaments. Es wurde mit Zellen der Firma Lonza (Basel, Schweiz) gearbeitet. Sie wurden aus dem Parodontalligament eines Molaren gewonnen. hPDSC-htert sind durch humane Telomerase reverse Transkriptase immortalisierte, humane, adulte Stammzellen des parodontalen Ligaments (Docheva *et al.*, 2010). Diese wurden freundlicherweise Frau Prof. Dr. D. Docheva, Leiterin des Labors für experimentelle Unfallchirurgie am Universitätsklinikum Regensburg, zur Verfügung gestellt. Die Zellen wurden im Zuge einer orthodontischen Extraktion der oberen Prämolaren aus dem Gewebe eines gesunden Individuums, in einem Alter von unter 25 Jahren, entnommen. hPDSC-htert können unter anderem zu Osteoblasten differenzieren, weshalb sie für Untersuchungen zur Beeinflussung von osteogenen Prozessen dienlich sind. In Tabelle 1 wird ein kurzer Überblick der untersuchten Zellen gegeben.

Zelle	Zellart	Ursprung	ATCC-Nr.
BHY	Epithelzelle	Plattenepithelkarzinom	404
hPDLF	Fibroblast	Parodontalligament	nicht vorhanden
hPDSC-htert	Progenitorzelle	Parodontalligament	nicht vorhanden

Tabelle 1: untersuchte Zellen

3.1.1 Kulturbedingungen

Die Zelllinien wurden in Zellkulturflaschen (T75, Starstedt, Nümbrecht, Deutschland) mit verschiedenen Zellkulturmedien kultiviert. Die hPDLF-Zellen wurden in einem α -MEM-Medium (gibco/Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) und sowohl die BHY-Zellen als auch hPDLSC-htert wurden in einem DMEM-Medium high Glucose (gibco/Life Technologies) kultiviert. Beide Zellkulturmedien wurden jeweils mit 10% FBS (Sigma-Aldrich Chemie, München, Deutschland) und einem Gemisch aus Penicillin G und Streptomycin (100 U/ml Penicillin G, 100 μ g/ml Streptomycin) versetzt.

Die Zellkulturflaschen wurden beständig in einem CO₂-Inkubator (Heracell 150i, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) bei 37°C, 5% CO₂-Athmosphäre und 100% relativer Luftfeuchtigkeit inkubiert. Der Umgang mit den Zellkulturen erfolgte stets unter einer Sicherheitswerkbank (Holten LaminAir, Thermo Fischer Scientific).

3.1.2 Routinearbeiten in der Zellkultur

3.1.2.1 Medienwechsel

Alle 3 bis 4 Tage wurde das alte Medium über eine Saugpipette entfernt und durch 20 ml neues Medium ersetzt.

3.1.2.2 Passagieren

Zur Vermeidung der Überwucherung der Zellen in den Zellkulturflaschen oder zur Vermehrung der Zellen für Versuche wurden diese subkultiviert beziehungsweise in eine neue Passage überführt. Dazu wurden die Zellen mit 5 ml PBS (Sigma-Aldrich) gewaschen. Anschließend wurden 2 ml Trypsin (Sigma-Aldrich) auf die Zellen pipettiert und die Zellkulturflaschen in den Inkubator gegeben. Bei einer Temperatur von 37°C spaltete das Trypsin die adhärenenten Verbindungen der Zellen zum Boden der Zellkulturflasche hydrolytisch. Nach wenigen Minuten wurde optisch über ein Mikroskop (Axiovert 40C, Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland) die Lösung der Zellen von der Flaschenwand überprüft. Das Trypsin wurde inaktiviert, indem 2 ml Medium hinzugefügt wurden. Die gelösten Zellen wurden in ein steriles Polypropylen-Röhrchen (Greiner Bio-One International, Kremsmünster, Österreich) überführt und in einer Zentrifuge (Allegra X-15R Centrifuge, Beckman Coulter Life Science GmbH, München, Deutschland) von der Trypsin-Medium-Lösung getrennt, welches auf Grund seiner hydrolytischen Fähigkeiten auf Dauer zu Schäden der Zellen führen kann. Die Zellen wurden für 5 Minuten bei 22°C und 300 g zentrifugiert. Nachdem der flüssige Überstand aus Zellmedium und Trypsin entfernt wurde, wurde das durch Zentrifugieren entstandene Zellpellet im Röhrchenboden in einer Zellkulturflasche resuspendiert. Bei diesem Schritt bestand die Möglichkeit die Zell-Medium-Suspension auf mehrere Kulturflaschen zu verteilen.

3.1.2.3 Auftauen von Zellen

Eingefrorene Zellen wurden in einem Stickstofflagerbehälter bei -196°C gelagert. Um diese aufzutauen, entnahm man sie aus dem Behälter und zentrifugierte die aufgetaute Suspension, sodass der flüssige Überstand abgesaugt werden konnte und säte anschließend die Zellen in frischem Medium in einer Zellkulturflasche aus. Dieser Vorgang diente der Trennung der Zellen von dem toxischen Dimethylsulfoxid. Dimethylsulfoxid wurde verwendet, um die Zellen, während des Einfriervorgangs, vor der Bildung von intrazellulären Kristallen zu schützen.

3.1.2.4 Bestimmung der Zellzahl

Zur Ermittlung der Zellzahl wurde ein optisches Verfahren (Cedex XS, Roche Applied Science, Mannheim, Deutschland) mittels Trypanblau (Trypan Blue Stain 0,4%, Gibco, life technologies) verwendet. Beim Absterben von Zellen wird die Zellmembran permeabel, sodass Trypanblau in die Zelle eindringen kann und diese blau verfärbt, sodass sich intakte und abgestorbene Zellen optisch gegeneinander abgrenzen. 10 μl der Zellsuspension wurden mit 10 μl Trypanblau in eine Durchflusszelle (Roche Applied Science, Mannheim, Deutschland) aus Glas injiziert. Im Anschluss wird der Glasobjektträger ausgelesen (Cedex-2-Software) und die Zellsuspension gegebenenfalls so verdünnt, sodass die gewünschte Zellkonzentration erreicht wurde.

3.2 Aufbereitung der Proben

Es wurden BHY, hPDLF und hPDLSC in 12-Well-Platten ausgesät. Dafür wurde pro Well-Platte alle Zellen in einer Zellkulturflasche verwendet. Nachdem das Medium abpipettiert wurde, wurden die Zellen mit verschiedenen Konzentrationen LL37 (0,1 μM ; 0,5 μM ; 1 μM ; 2 μM ; 5 μM ; 10 μM) 24 h und 48 h für BHY und hPDLF und 72 h für hPDLSC inkubiert. Als Blank diente reines zellfreies Medium. Als Negativkontrolle wurde 1,25 μl TNF- α (50 U/ml) zu den Zellen gegeben. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde der Überstand abgenommen und in 500 μl Portionen eingefroren, sodass diese bis zur Auswertung durch ELISAs konserviert blieben. Abbildung 5 zeigt eine 12-Well-Platte vor Abnahme des Zellkulturüberschusses.

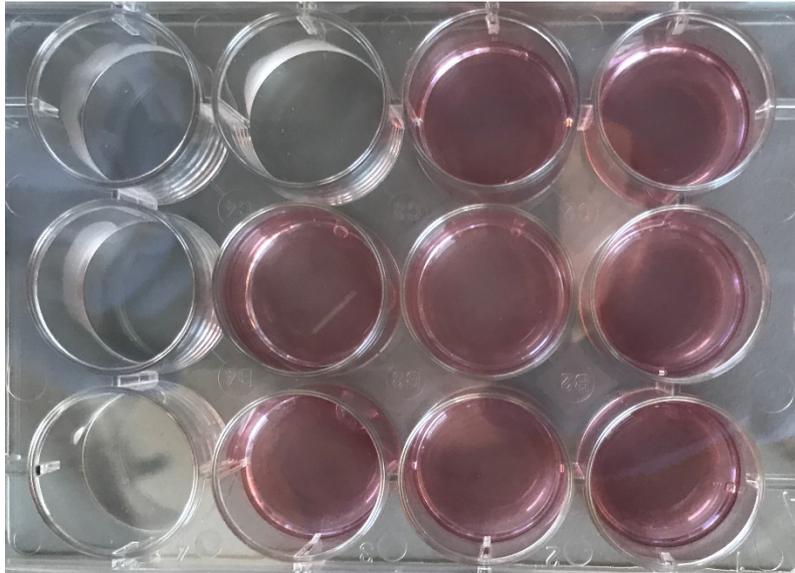


Abbildung 5: Well-Platte mit ausgesäten Zellen

3.3 Spezielle Methoden und Anwendungen

3.3.1 Toxizitätstest mittels WST-8 Assay

Mit dem WST-8-Assay (Colorimetric Cell Viability Kit I, PromoKine, Heidelberg, Deutschland) kann die Zytotoxizität von LL37 auf die Zellen ermittelt werden. WST-8 (water soluble tetrazolium salt-8, 2-(2-methoxy-4-nitrophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium Salz) befindet sich zunächst in einem schwachgelblichen Zustand. In Anwesenheit von mitochondrialen Dehydrogenasen, welche in Zellen mit intakter Atmungskette funktionstüchtig vorhanden sind, und des Elektronen-Carriers 1-Methoxy-5-methylphenazinium-Methyl-Sulfat wird das Salz reduziert. Dabei entsteht die orangene Form des Formazan-Farbstoffes. Die chemische Reaktion wird in Abbildung 6 schematisch dargestellt.

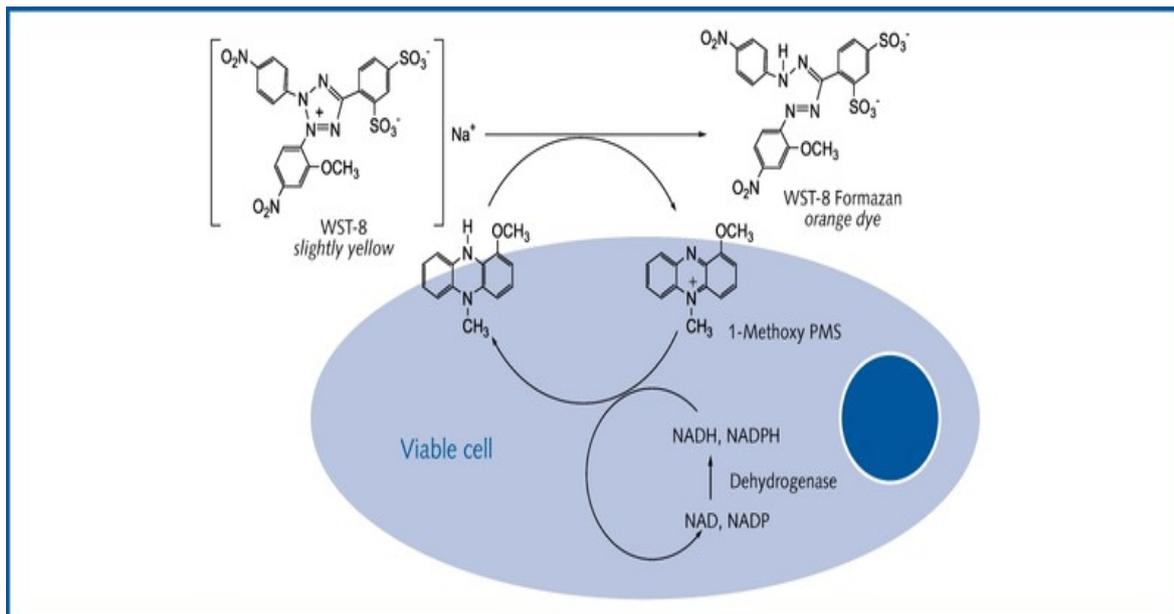


Abbildung 6: Mechanismus der WST-8 Umsetzungen durch Dehydrogenasen in lebenden Zellen (PromoKine, Heidelberg, Deutschland)

Die Menge des Formazan-Farbstoffes ist direkt proportional zur Summe der stoffwechselaktiven Zellen. Für den Test wurden BHY und hPDLF in einer 96-Wellplatte (Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich) so ausgesät, sodass sich 5000 Zellen in einem Well befanden. Die Zellen wurden für 24 h und für 48 h mit LL37 in unterschiedlichen Konzentrationen stimuliert. Als Negativkontrolle wurde den Zellen 1 prozentiges Triton-X-100 (4-(1,1,3,3-Tetramethylbutyl)phenyl-polyethylenglykol, Sigma-Aldrich) und als Blank Medium ohne Zellen verwendet. Triton-X-100 diente als lytischer Stoff zur Permeabilisierung der Zellmembran, wodurch Zellen zerstört wurden. Nachdem das Medium abpipettiert war, wurden 100 µl des WST-8-Reagens zugegeben. Die Auswertung erfolgte durch ein Mikroplattenphotometer bei Wellenlänge 450 nm. Der Toxizitätstest wurde 3-fach innerhalb eines Durchlaufs und mit 3 voneinander unabhängigen Zelllinien ausgeführt. Abbildung 7 zeigt ein Foto eines WST-8-Assays nach dem orangenen Farbumschlag.

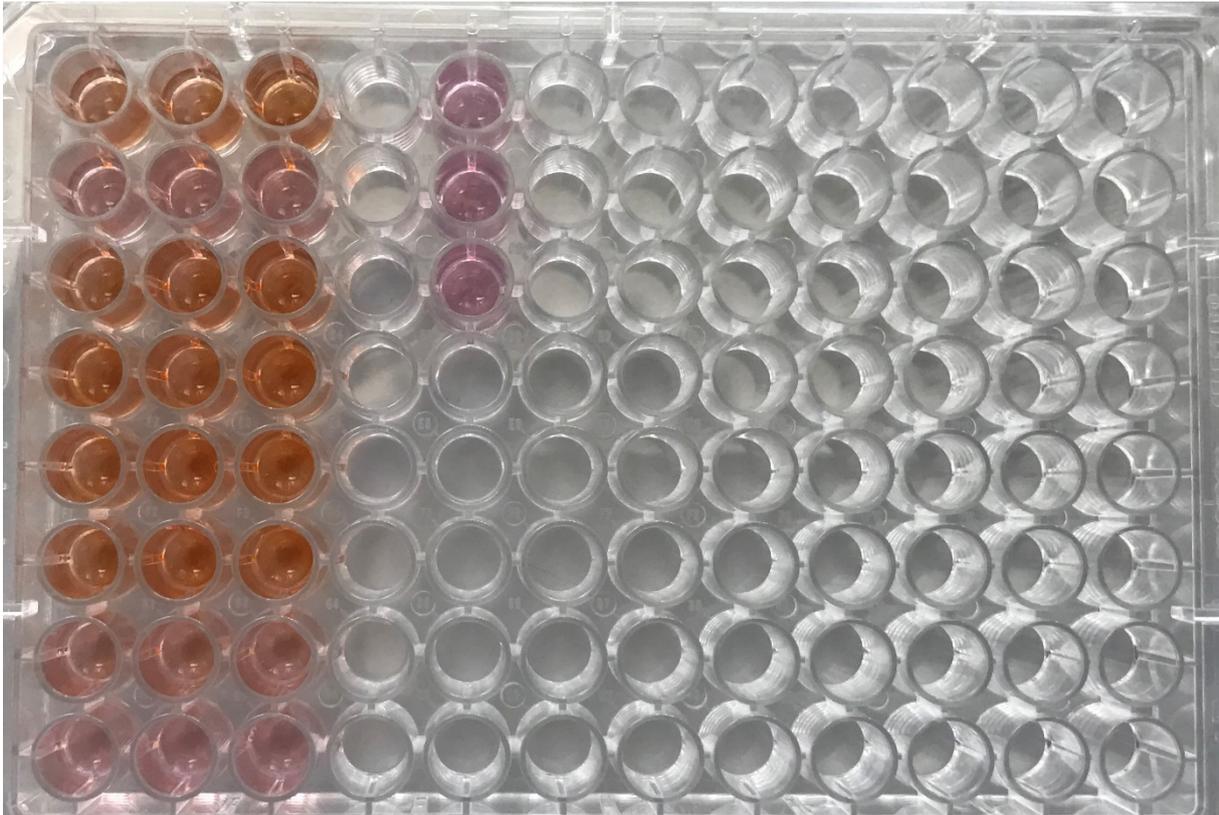


Abbildung 7: 96-Well Platte mit WST-8-Assay

3.3.2 EIA zum Nachweis der PGE₂-Konzentration in BHY und hPDLF

Es wurde das PGE₂ high sensitivity ELISA Kit (Enzo Life Science Inc., Farmingdale, NY, USA) verwendet. Der enzymgekoppelte Immunabsorptionstest (EIA) ist ein kompetitiver Immunassay. Hierbei konkurriert das Prostaglandin E₂ der Probe mit Enzym-gebundenen PGE₂ des Kits um die PGE₂-spezifische-Bindungsstelle des Ziegen-Anti-Maus-IgG-Antikörper, mit welchem die im Kit enthaltene Mikrotiterplatte ausgekleidet ist. Es werden unmarkierte PGE₂-Antikörper- und markierte PGE₂-Antikörper-Komplexe gebildet. Nach Zugabe von Substratlösung kommt es zu einem gelblichen Farbumschlag, durch das Enzym gebunden, an den markierten PGE₂-Antikörper-Komplexen. Dabei handelt es sich um eine alkalische Phosphatase. Durch Abspalten der Phosphatgruppe des Para-Nitrophenylphosphat in der Substratlösung, entsteht gelbes Para-Nitrophenol. Die Intensität der Farbentwicklung, ist umgekehrt proportional zur PGE₂-Konzentration der Probe.

Zunächst wurden die Zellkulturüberstände 1:25 mit Zellkulturmedium verdünnt. Abbildung 8 zeigt ein Foto von verdünnten Proben in Eppendorf-Röhrchen.

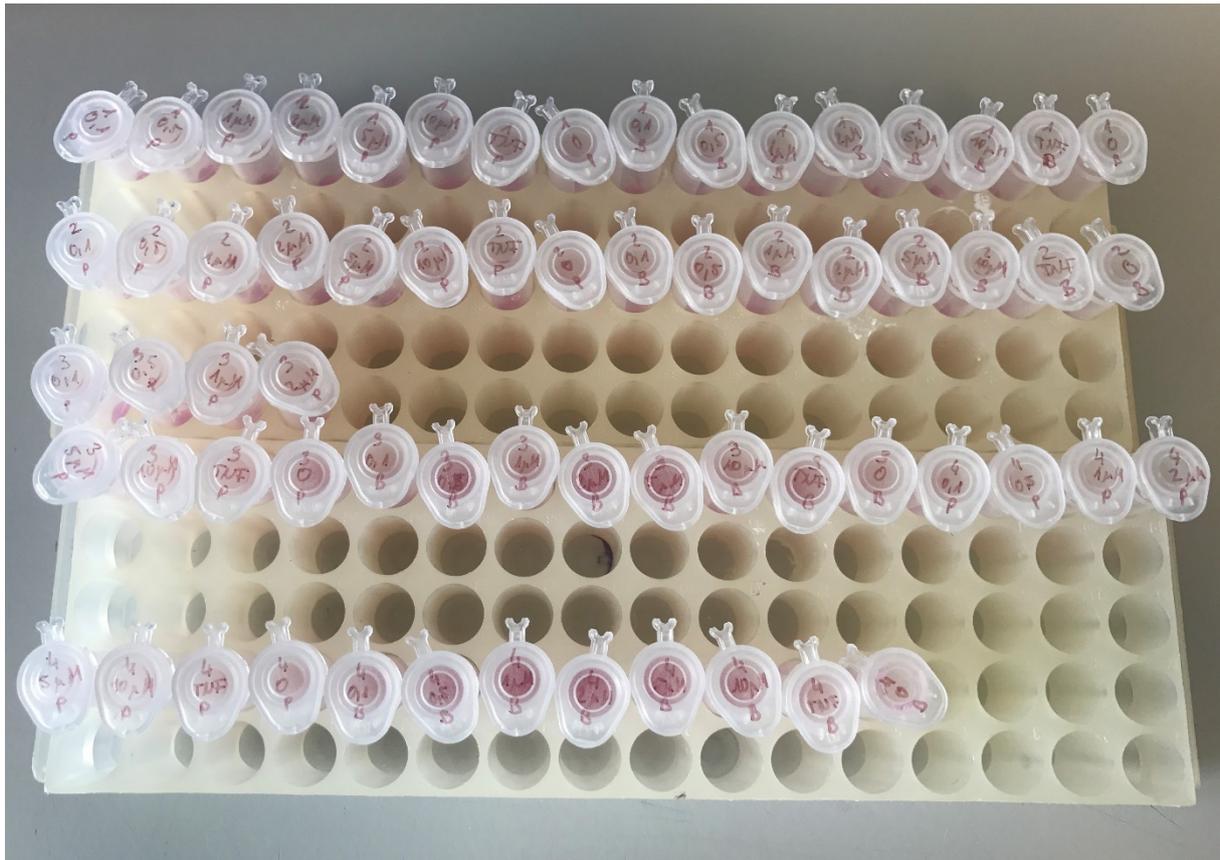


Abbildung 8: verdünnte Proben in Eppendorf-Röhrchen

Zur Herstellung der Standardlösung wurden 8 weitere Eppendorf-Röhrchen mit den Nummern 1 bis 8 beschriftet. Röhrchen Nummer 1 wurde mit 980 μ l Standard-Lösung und die anderen 7 mit jeweils 500 μ l Standard-Lösung befüllt. In das Röhrchen Nummer 1 wurden 20 μ l der 50000pg/ml-PGE2-Standard-Lösung pipettiert und mit einem Vortexmischer gemischt. Dann wurden 500 μ l aus Röhrchen Nummer 1 entnommen und in Röhrchen Nummer 2 gegeben. Nach Mischen wurden 500 μ l aus Röhrchen 2 in Röhrchen 3 gegeben. Dieser Vorgang wiederholt sich bis man zu Röhrchen 8 gelangt ist. Es entsteht eine Standardreihe mit den Konzentrationen: 1000 pg/ml in Röhrchen 1, 500 pg/ml in Röhrchen 2, 250 pg/ml in Röhrchen 3, 125 pg/ml in Röhrchen 4, 62,5 pg/ml in Röhrchen 5, 31,25 pg/ml in Röhrchen 6, 15,63 pg/ml in Röhrchen 7 und 7,81 pg/ml in Röhrchen 8. Diese Standardlösung dient der Kalibrierung des Verfahrens. Die Goat anti-Mouse IgG beschichtete Mikrotiterplatte wurde mit 100 μ l Proben, Standard oder in den NSB- und Bo (0 pg/ml-Standard)-Wells mit 100 μ l Assay-Puffer befüllt. Zusätzlich wurden 50 μ l Assay-Puffer in das NSB-Well und 50 μ l blaues PGE2-ELISA Konjugat in alle Wells, ausgenommen des Total-Activity-Wells und des Blank-Wells, pipettiert. Auch wurden 50 μ l gelbe PGE2-HS-

ELISA-Antikörper-Lösung in jedes Well mit Ausnahme der Blank-, Total-Activity- und NSB-Wells gegeben. Die Platte wurde mit einem Klebestreifen versiegelt und bei 4°C für 24 h inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Mikroplatte gereinigt, indem 400 µl Waschpuffer in die Wells gefüllt wurde und anschließend auf Zellstoff ausgeklopft wurde. Der Waschvorgang wurde insgesamt 3 Mal wiederholt. Schließlich wurden 5 µl blaues Konjugat in die Total-Activity-Wells und 200 µl pNpp-Substrat in alle Wells pipettiert. Daraufhin wurde die Platte versiegelt und für 1 h in dem CO₂-Inkubator bei 37°C inkubiert. Zuletzt wurden 50 µl Stopp-Lösung hinzugegeben und sofort in einem Photometer bei 450 nm Wellenlänge optisch ausgewertet. Abbildung 9 zeigt die Mikrotiterplatte nach Zugabe der Stopp-Lösung kurz vor Auswertung mit dem Photometer.

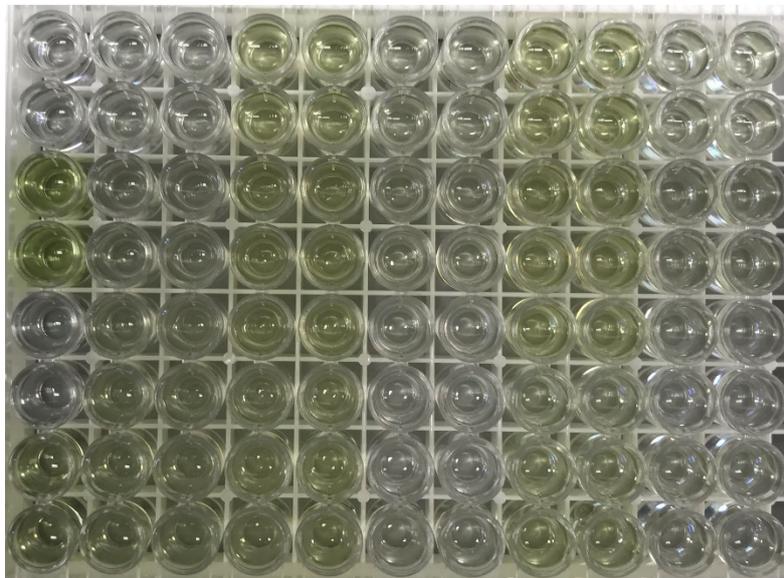


Abbildung 9: Mikrotiterplatte für PGE₂ nach Zugabe der Stopp-Solution

3.3.3 ELISA zum Nachweis der IL-1 β -Konzentration in BHY und hPDLF

Es wurde mit dem Quantikine® ELISA-Kit Human IL-1 β /1F2 (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) gearbeitet. Bei diesem Nachweisverfahren handelt es sich um einen Sandwich-ELISA. Das bedeutet, dass das Antigen von zwei verschiedenen Antikörpern spezifisch gebunden wird, wobei sich die beiden Antikörper nicht gegenseitig blockieren. Die im Kit enthaltene Microtiterplatte ist mit Antikörpern, die humanes IL-1 β binden können, ausgekleidet (Coat-Antikörper). Nach Zugabe der Probe reagiert das IL-1 β mit den spezifischen Bindungsstellen des Coat-Antikörpers. Der nun entstandene IL-1 β -Coat-Antikörper-Komplex wird mit einem zweiten

Antikörper versetzt. Dieser ist mit einer Meerrettich-Peroxidase gekoppelt und bindet an eine andere Stelle am Antigen (IL-1 β). Anschließend wird dem IL-1 β -Coat-Antikörper-Enzym-gekoppelten-Antikörper-Komplex das in der Substratlösung enthaltene Chromogen Tetramethylbenzidin hinzugegeben. Die Oxidation des Chromogens durch die Peroxidase führt zu einem Farbumschlag von blau nach gelb. Die Intensität der Farbe ist proportional zur Konzentration des IL-1 β .

Die Proben wurden in einem Verhältnis von 1:20 mit Calibrator Diluent RD5-5 verdünnt. Dazu wurden 25 μ l Probe in 475 μ l Calibrator Diluent gelöst. Um den Standard herzustellen befüllte man 6 Eppendorf-Gefäße mit jeweils 500 μ l Calibrator Diluent RD5-5. Der mitgelieferte, unverdünnte Standard besitzt eine Konzentration von 250 pg/ml. 500 μ l des unverdünnten Standards wurden in das erste Eppendorf-Gefäß mit dem Calibrator Diluent gefüllt und mit einem Vortex-Mischer vermischt. Anschließend wurden aus dem ersten Eppendorf-Gefäß, welches die verdünnte Lösung beinhaltet, 500 μ l entnommen, in das zweite Eppendorf-Gefäß gegeben und erneut vermischt. Dieses Verfahren wurde bis zum letzten Eppendorf-Gefäß weitergeführt, sodass eine Verdünnungsreihe des Standards entstand. Die Verdünnungsreihe diente der Kalibrierung des Verfahrens. Die beigefügte Abbildung zeigt das Verdünnungsvorgehen und die jeweiligen Konzentrationen der Standardreihe:

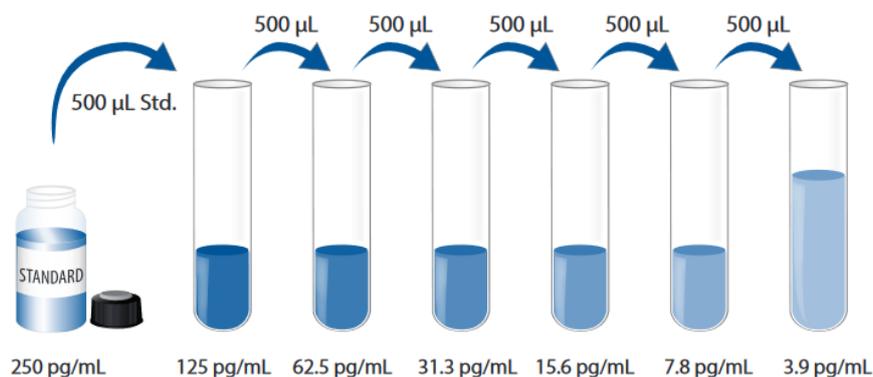


Abbildung 4: Standard-Verdünnungsreihe des Quantikine $^{\text{®}}$ Human IL-1 β /IL-1F2 ELISAs (R&D Systems)

Danach wurden jeweils 200 μ l Standard oder Zellkulturüberstand in die Wells der Mikroplatte, welche mit einem für IL-1 β -spezifischen monoklonalen Antikörper ausgekleidet war, gegeben. Die Mikroplatte wurde mit einem Klebestreifen dicht

verschlossen und für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgte eine Waschung, indem jedes Well mit 400 μ l Waschpuffer ausgespült und anschließend durch ausklopfen auf einem Zellstofftuch getrocknet wurde. Dieser Vorgang wiederholte sich insgesamt 3 Mal. Nach dem Waschvorgang wurden jeweils 200 μ l Human IL-1 β -Konjugat in die einzelnen Wells pipettiert und für 1 h bei Raumtemperatur, mit einem Klebestreifen abgedichtet, inkubiert. Daraufhin erfolgte der gleiche Waschvorgang wie bereits beschrieben. Dann wurden 200 μ l Substrat-Solution in jedes Well hinzugefügt. Abbildung 10 zeigt eine Mikrotiterplatte nach Einfügen der Substrat-Solution nach 20-minütiger Inkubation. Nach einer weiteren Inkubationszeit von 20 Minuten bei Dunkelheit wurden jeweils 50 μ l Stopp-Lösung pro Well zugegeben.

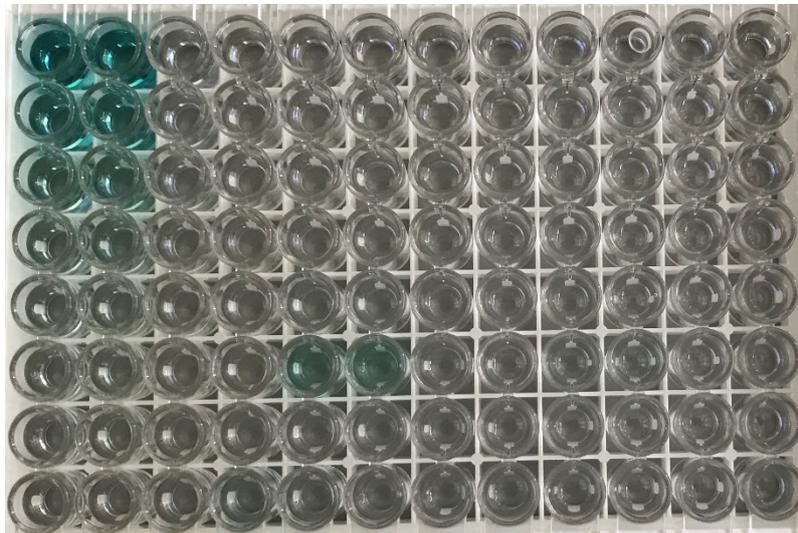


Abbildung 10: Mikrotiterplatte für IL-1 β mit Substrat-Solution nach 20-minütiger Inkubation

Abbildung 11 zeigt eine Mikrotiterplatte nach Hinzufügen der Stopp-Lösung mit gelblichen Farbumschlag, welche bereit zur optischen Auswertung ist. Zeitnah erfolgte die Auswertung durch ein Photometer bei 450 nm Wellenlänge.

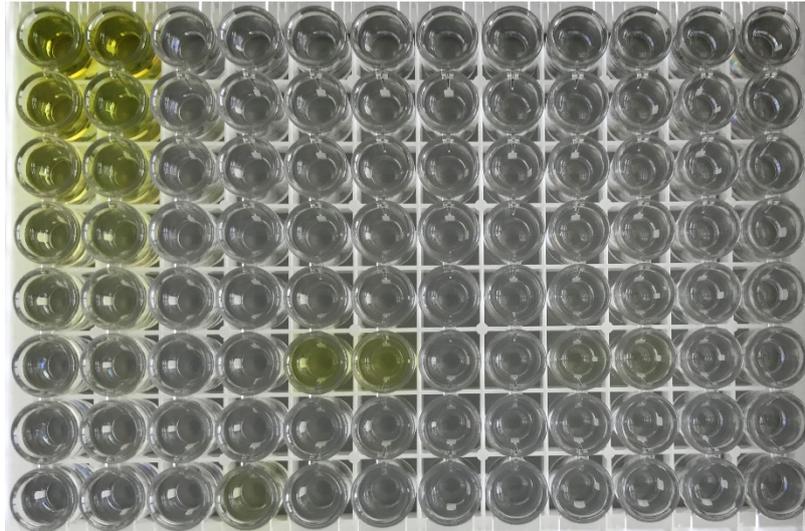


Abbildung 5: Mikrotiterplatte für IL-1 β mit gelben Farbumschlag nach Zugabe der Stopp-Lösung

3.3.4 ELISA zum Nachweis der IL-6-Konzentration in BHY und hPDLF

Zur Durchführung der Bestimmung der IL-6-Konzentrationen wurde das Quantikine® ELISA-Kit Human IL-6 (R&D-Systems) verwendet. Zuerst wurden die Proben in einem Verhältnis von 1:20 verdünnt. Dazu wurden 12,5 μ l Zellkulturüberstand mit 237,5 μ l Calibrator Diluent RD5T vermengt. Die weitere Durchführung des Versuchs erfolgte analog zu 2.3.3.

3.3.5 ELISA zum Nachweis der IL-8-Konzentration in BHY und hPDLF

Die Konzentration von IL-8 im Zellkulturüberschuss wurde mit dem Quantikine® ELISA-Kit Human IL-8/CXCL8 (R&D-Systems) untersucht. Zu Beginn wurden die Proben in einem Verhältnis von 1:40 mit dem Calibrator Diluent RD5P verdünnt. Weiterhin wurde entsprechend zu 2.3.3 verfahren. Abbildung 11 zeigt eine Mikrotiter-Platte des IL-8 ELISAs nach Zugabe der Stopp-Solution.

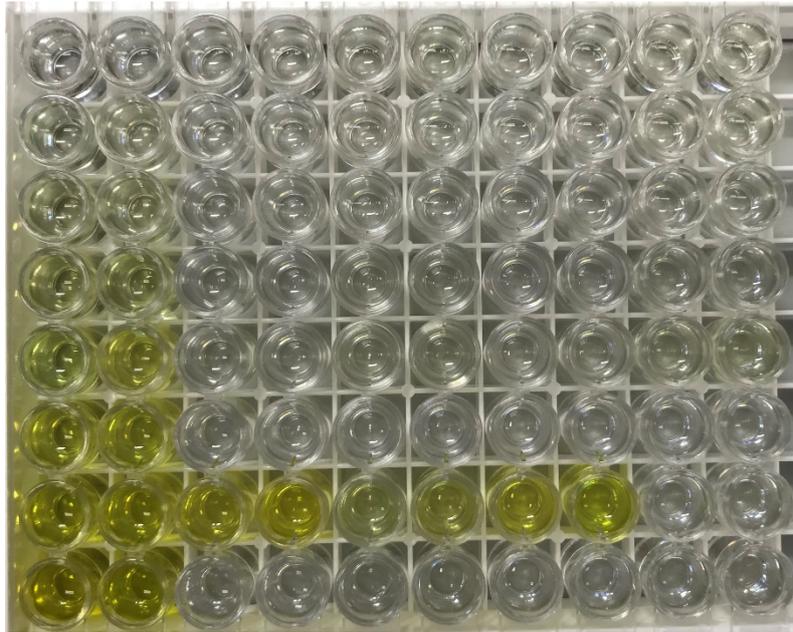


Abbildung 11: IL-8 ELISA nach Zugabe der Stopp-Lösung

3.3.6 ELISA zum Nachweis der TNF- α -Konzentration in BHY und hPDLF

Die TNF- α -Konzentration in den Zellkulturüberschüssen wurde mit dem Quantikine® ELISA-Kit Human TNF- α Immunoassay (R&D-Systems) bestimmt. Zuerst wurden die Proben im Verhältnis von 1:20 mit Calibrator Diluent RD6-35 diluiert. Das weitere Verfahren wurde gemäß 2.3.3 durchgeführt. Abbildung 12 zeigt eine Mikrotiter-Platte des TNF- α -ELISAs nach Zugabe der Stopp-Lösung.

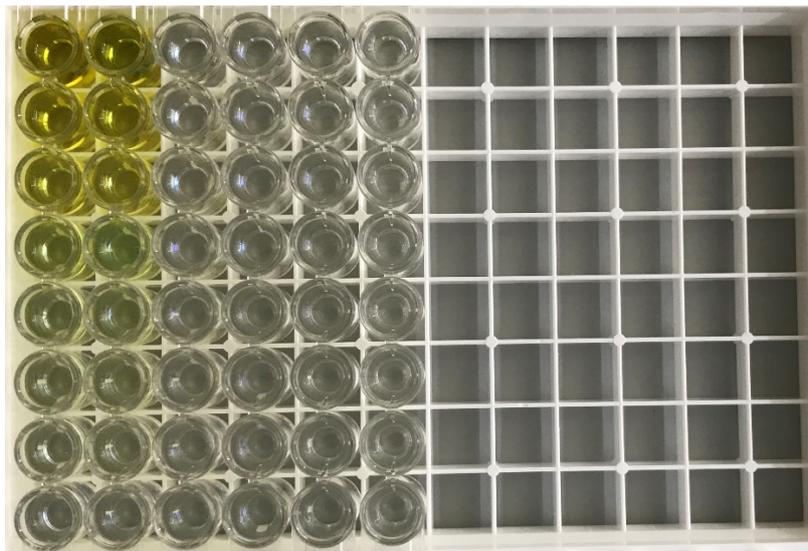


Abbildung 12: TNF- α ELISA nach Zugabe der Stopp-Lösung

3.4 ELISA zum Nachweis der Osteocalcin-Konzentration in hPDLSC

Es wurde mit dem dem Quantikine® ELISA-Kit Human Osteocalcin (R&D-Systems) gearbeitet. Hier wurden die Proben nicht weiter verdünnt. Um die Menge an Osteocalcin in den Proben nachzuweisen wurde der ELISA analog zu 2.3.3 ausgeführt. Abbildung 13 zeigt die Mikrotiterplatte nach Zugabe der Stopp-Solution bereit für die Auswertung durch das Photometer.

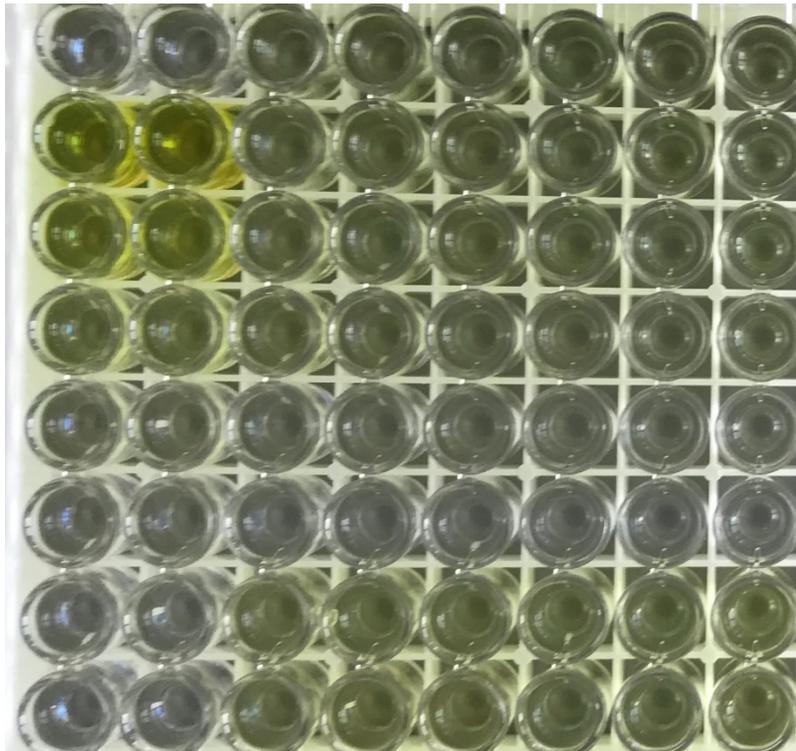


Abbildung 13: Osteocalcin-ELISA nach Zugabe der Stopp-Lösung

3.5 Statistische Auswertung

Die Darstellung der Ergebnisse erfolgte deskriptiv und graphisch. Die statistische Auswertung erfolgte durch den Kruskal-Wallis-Test, einer Varianzanalyse (Signifikanzniveau $\alpha = 0,05$), mit anschließendem Dunn's Post-Hoc-Test (Signifikanzniveau $\alpha = 0,05$). Dadurch konnte ein möglicher Einfluss verschiedener Faktoren auf die messbare Reaktion der Zellen analysiert werden. Zur Durchführung wurde die Software SPSS (v26, SPSS Inc, Chicago, IL, USA) angewendet.

4 Ergebnisse

4.1 Zytotoxizitätsuntersuchungen

Die Zytotoxizität von LL37 auf BHY und hPDLF wurde indirekt mittels WST-8-Assay untersucht. Abbildung 14 zeigt die Zellstoffwechselaktivität von BHY nach 24-stündiger und 48-stündiger Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen von LL37. Zu sehen sind Mittelwerte aus je drei unabhängigen Versuchsreihen. Gegenübergestellt werden die stoffwechselaktiven Zellen in Prozent mit der Positivkontrolle. Als Referenzwert dient die Negativkontrolle mit 100%. Die Negativkontrolle waren unstimulierte Zellen, die lediglich mit Medium in Berührung kamen. Für die Positivkontrolle wurde den Zellen 1-prozentige Triton-X-100-Lösung hinzugefügt. Hier wurden Werte von 4,99% nach 24 h und 33,52% nach 48h verzeichnet. Nach 24-stündiger Inkubation befanden sich die Werte zwischen 58,04% und 105,78 %. Die Viabilität nach 48-stündiger Inkubation lag bei 39,00% bis 146,66%. Generell war eine Aktivität bei den Zellen mit 48-stündiger Inkubation nachzuweisen mit Ausnahme der beiden höchsten LL37-Konzentrationen mit 5 μM und 10 μM . LL37-Konzentrationen von 0,1 μM , 0,5 μM und 1 μM zeigten eine Stabilität des Lebendzellanteils bei beiden Inkubationszeiten mit Werten zwischen 95,45% und 146,66% auf. Eine Tendenz des Abfalls der Werte konnte ab einer Konzentration von 2 μM festgestellt werden, wobei die Minimalwerte der 24-stündigen Inkubation bei jeweils 58,04% mit den Konzentrationen 5 μM und 10 μM lagen. Die Minimalwerte nach 48 h betragen bei 48,27% mit 5 μM LL37 und 39,00% mit 10 μM LL37. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Werten der Negativkontrolle und der Proben.

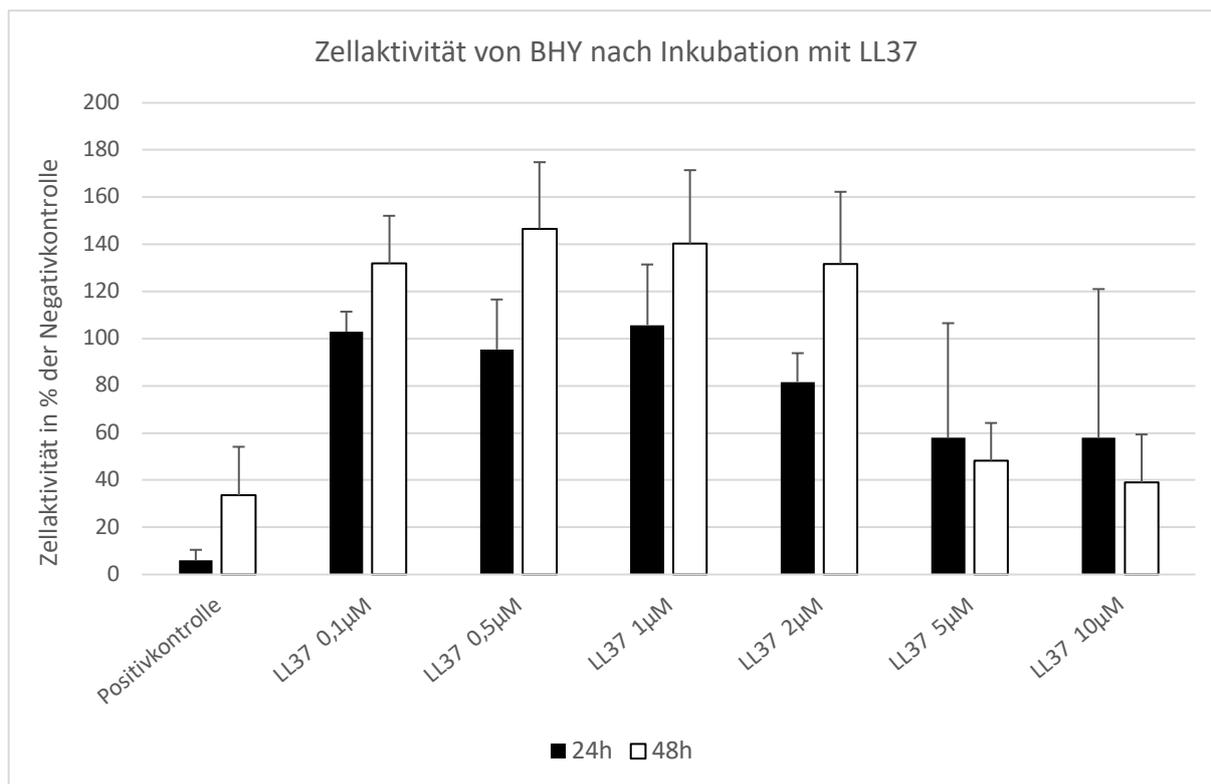


Abbildung 14: Ergebnisse des WST-8-Testes mit BHY zur Untersuchung der Zytotoxizität, n = 3

Die Zytotoxizität des AMPs wurde ebenfalls an hPDLF untersucht. Die Abbildung 15 stellt auch hier die Zellviabilität nach 24-stündiger und 48-stündiger Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen von LL37 in Mittelwerten aus je drei unabhängigen Versuchsreihen dar. Die Positivkontrolle zeigte nach 24 h Werte von 19,33% und nach 48h von 10,88% an. Der Lebendzellanteil nach 24-stündiger Inkubation lag in einem Bereich zwischen 107,04% und 28,09%. Der höchste Wert wurde bei einer Konzentration von 0,1 µM LL37 erreicht. Mit steigender LL37-Konzentration sank die Zellviabilität stetig. Bei einer 48-stündigen Inkubationszeit ließ sich mit 144,63% bei 0,5 µM der höchste Wert feststellen. Der niedrigste Wert betrug 12,79% bei 10 µM. Zunächst stieg mit steigender Konzentration die Viabilität nach 48h leicht an und erreichte ein Plateau, sodass zwischen den Konzentrationen von 0,1 µM und 2 µM relativ stabil in einem Bereich von 130,98% und 144,63% blieben. Ab einer Konzentration von 5 µM kam es zu einem rapiden Abfall des Zellstoffwechsels. Trotz der Tendenz eines Abfalls der Zellviabilität mit steigender LL37-Konzentration, zeigte die statistische Analyse keine signifikanten Unterschiede zwischen den Werten der Negativkontrolle und der Proben.

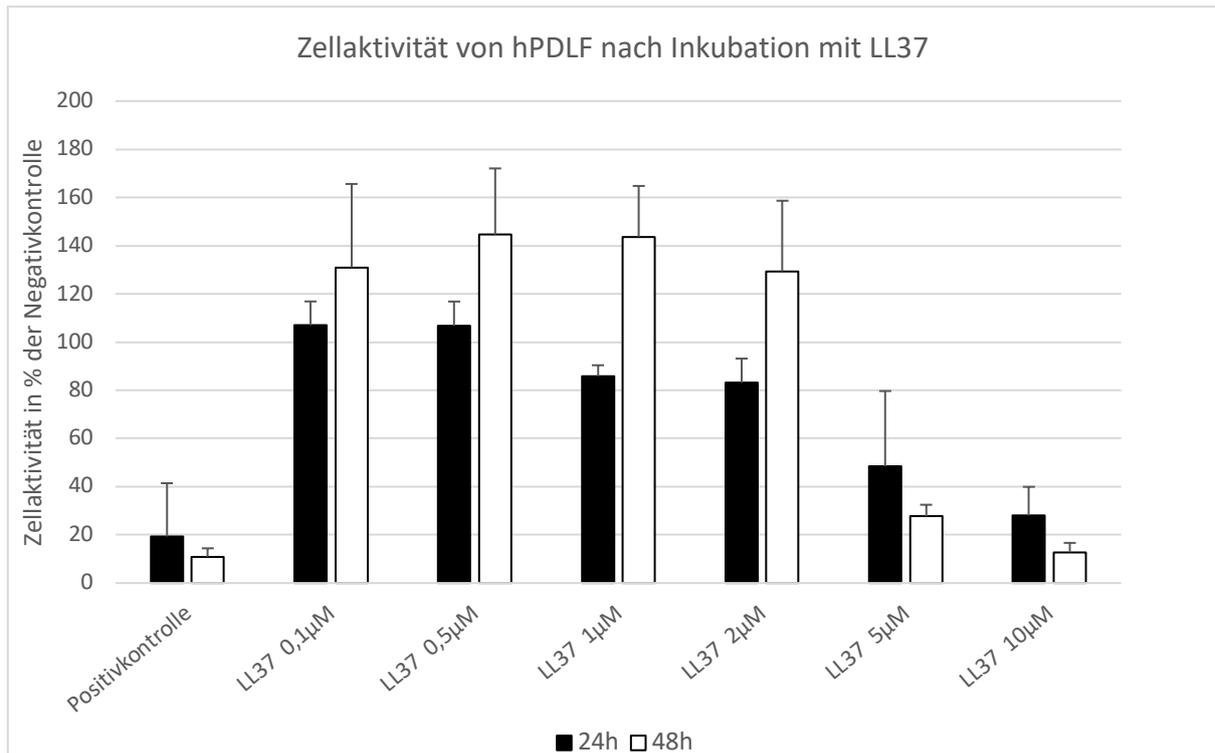


Abbildung 15: Ergebnisse des WST-8-Testes mit hPDLF zur Untersuchung der Zytotoxizität der verschiedenen LL37-Konzentrationen; n = 3

4.2 Beeinflussung der Entzündungsreaktion

4.2.1 EIA auf PGE₂

Es wurde die PGE₂-Konzentration im Zellkulturüberstand von BHY und hPDLF, nachdem sie für 24 h und 48 h mit verschiedenen LL37-Konzentrationen inkubiert wurden, ermittelt. Folgende Diagramme (Abbildung 16 und 17) stellen die Ergebnisse in Form von Mittelwerten aus drei voneinander unabhängigen Versuchsreihen dar. Als Positivkontrolle wurde die Entzündungsreaktion mit TNF- α stimuliert. Reines Kulturmedium diente als Negativkontrolle.

Abbildung 16 beschreibt die Konzentration von PGE₂ bei BHY. Sowohl die entzündlich stimulierten als auch die unstimulierten Proben enthielten PGE₂. Die Positivkontrolle verzeichnete Werte von 13140,00 pg/ml nach 24h und 14587,47 pg/ml nach 48 h. Die Negativkontrolle enthielt 10889,43 pg/ml PGE₂ nach 24h und 9758,10 pg/ml PGE₂ nach 48 h. Bei 24-stündiger Inkubation zeigten die Werte der Proben, die mit 0,1 μ M und 0,5 μ M LL37 stimuliert wurden, geringere PGE₂-Konzentrationen als die

Positivkontrolle. Danach stieg die PGE₂-Konzentration mit steigender LL37-Konzentration bis zu einem Maximalwert von 20122,95 pg/ml bei 5 µM LL37 an. Mit einer Konzentration von 10 µM LL37 sank die PGE₂-Menge auf 14793,86 pg/ml ab. Generell lagen die Werte nach 48 h Inkubationszeit unter den Werten der 24-stündigen Inkubationszeit mit Ausnahme der Werte der 10 µM Probe und der Positivkontrolle. Die PGE₂-Konzentration nach 48 h Inkubation mit 0,1 µM bis 2 µM LL37 lagen unter dem Wert der TNF-α-stimulierten Probe. Mit 5 µM und 10 µM LL37 stimuliert, stiegen die PGE₂-Konzentrationen nach 48 h über die der Positivkontrolle bis zu dem Maximalwert 18431,19 pg/ml (10 µM). Insgesamt konnte aufgrund der statistischen Auswertung kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen als auch zur Positivkontrolle festgestellt werden.

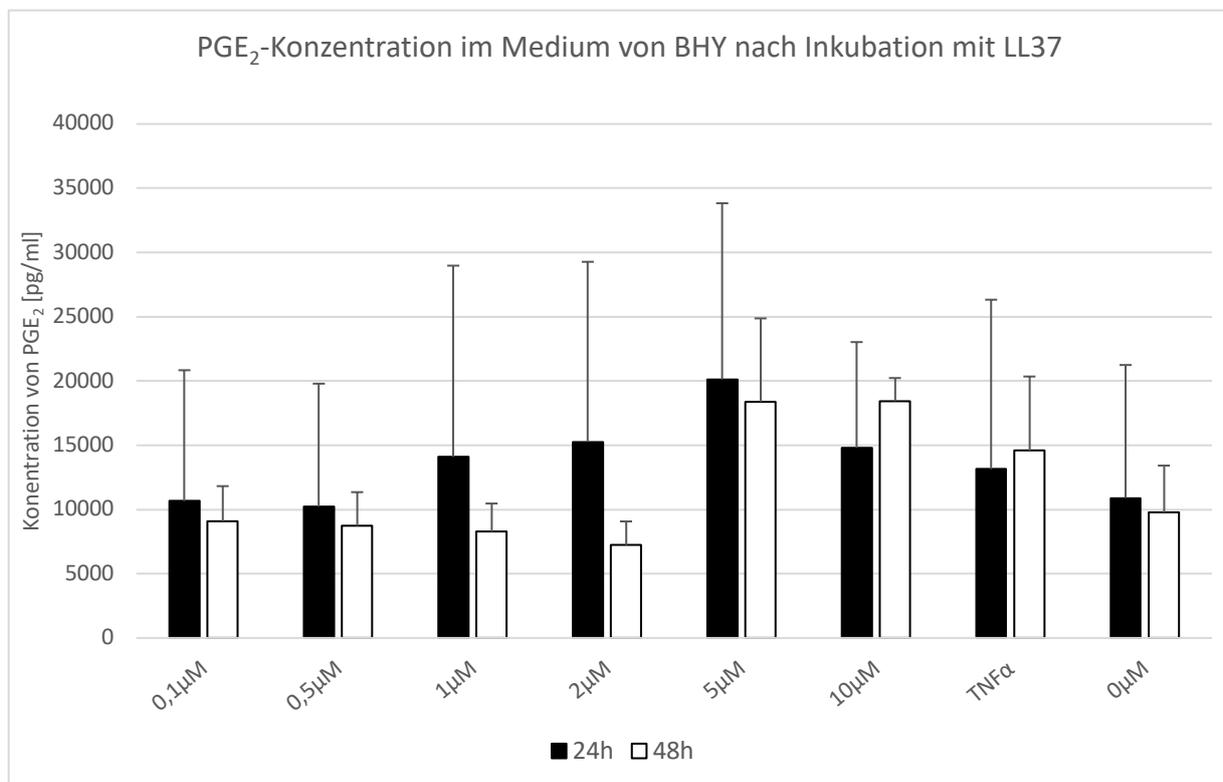


Abbildung 16: Ergebnisse des PGE₂-EIAs mit BHY; n = 3

In Abbildung 17 zu sehen ist die Untersuchung auf PGE₂ mit hPDLF. Auch die unstimulierten Zellen wiesen geringe Mengen PGE₂ auf (24 h = 126,62 pg/ml, 48 h = 102,00). Die Positivkontrolle zeigte nach 24 h mit 58,80 pg/ml eine geringere Menge PGE₂ als die Negativkontrolle. Nach 48 h Inkubation mit TNF-α ließen sich 206,48 pg/ml PGE₂ verzeichnen, was wiederum höher als die Probe ohne LL37-Stimulation

war. Bei einer Inkubationszeit von 24 h mit 0,1 μM bis 2 μM LL37 lag die PGE_2 -Konzentration der Proben unter denen der jeweiligen Kontrollen. Ab einer Konzentration von 5 μM stieg sie über die Kontrollwerte. Das Maximum lag hier bei 335,20 $\mu\text{g/ml}$. Nach 48 h unterschritten die PGE_2 -Konzentrationen der Proben, die mit 0,1 μM , 0,5 μM , 1 μM , 2 μM , 5 μM LL37 stimuliert wurden, die Positivkontrolle. Lediglich die 10 μM Probe überstieg die Positivkontrolle bei Weitem (945,32 $\mu\text{g/ml}$). Auch hier konnten bei der Gesamtheit der Ergebnisse keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden.

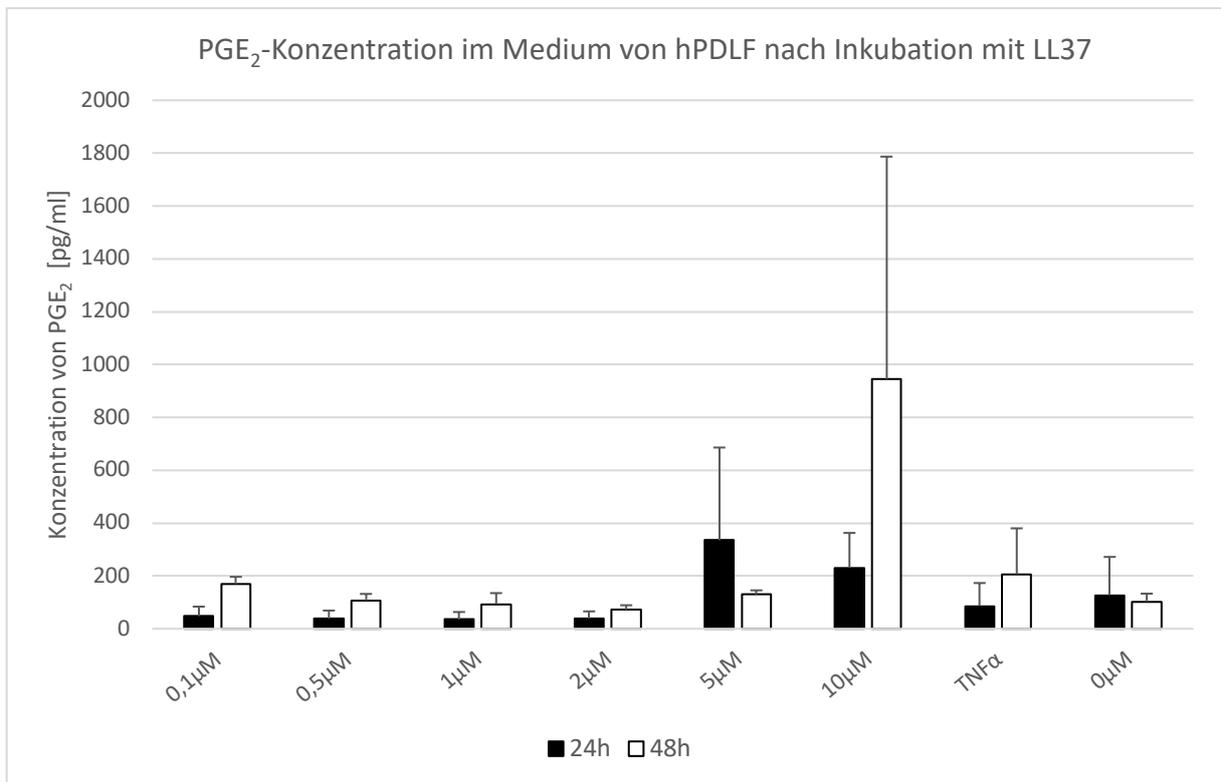


Abbildung 17: Ergebnisse des PGE_2 -EIAs mit hPDLF, $n = 3$

4.2.2 ELISA auf IL-1 β

Wie auch beim PGE_2 -ELISA wurde hier der Zellkulturüberstand von BHY und hPDLF nach 24- und 48-stündiger Inkubationszeit mit verschiedenen LL37-Konzentrationen auf IL-1 β untersucht. Abbildung 18 und Abbildung 19 beschreiben in einem Säulendiagramm IL-1 β -Konzentrationen als Mittelwerte aus 3 voneinander unabhängigen Versuchsreihen mit BHY und hPDLF. Verglichen werden die Werte mit einer Positiv- und Negativkontrolle. Für die Positivkontrolle wurden die Proben mit

TNF- α stimuliert. Für die unstimulierte Negativkontrolle hatten die Zellen lediglich mit Kulturmedium Kontakt.

In Abbildung 18 werden die Ergebnisse des IL-1 β -ELISA mit BHY dargestellt. Bei der Negativkontrolle, und Inkubation mit 0,1 μ M bis 2 μ M ließ sich keine Reaktion nachweisen. Nach 48 h konnte bei der Positivkontrolle eine IL-1 β -Konzentration von 15,47 pg/ml dokumentiert werden. Bei 5 μ M lagen die Werte unter dem Wert der Positivkontrolle (24h = 3,48 pg/ml; 48h = 8,49 pg/ml). Die Höchstwerte ließen sich bei 10 μ M feststellen. Hier lag die Konzentration bei 446,42 pg/ml nach 24h und bei 341,74 pg/ml nach 48h. Die nicht-parametrische Varianzanalyse mit anschließendem Post-Hoc-Test zeigte einen deutlichen Einfluss von LL37 auf die IL-1 β -Expression der BHY-Zellen. Dabei zeigte der Dunn's-Post-Hoc-Test eine signifikant höhere IL-1 β -Konzentration bei einer Inkubation mit 10 μ M LL37 als bei Inkubation mit 0,1 μ M bis 2 μ M LL37-Konzentrationen. Auch in Bezug auf die Negativ-Probe waren bei 10 μ M LL37 signifikant höhere IL-1 β -Werte belegbar.

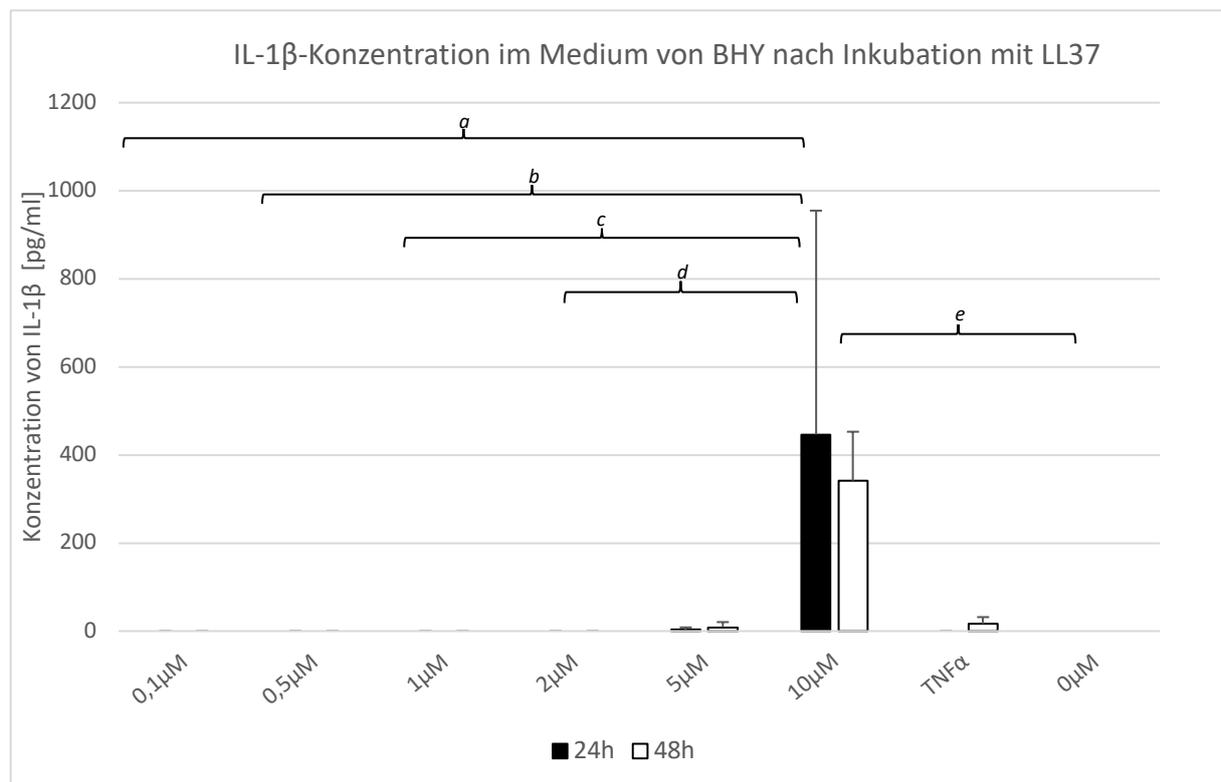


Abbildung 18: Ergebnisse des IL-1 β -ELISAs mit BHY; n = 3; ^a p = 0,015 ; ^b p = 0,14 ; ^c p = 0,12 ; ^d p = 0,11 ; ^e p = 0,16 ;

Abbildung 19 zeigt die Ergebnisse des IL-1 β -ELISA mit hPDLF. Es konnte generell keine IL-1 β -Konzentration mit Ausnahme der Negativkontrolle nach 24h Inkubation

(54,57 pg/ml) nachgewiesen werden. Die Werte unterschieden sich allerdings in ihrer Gesamtheit nicht signifikant voneinander.

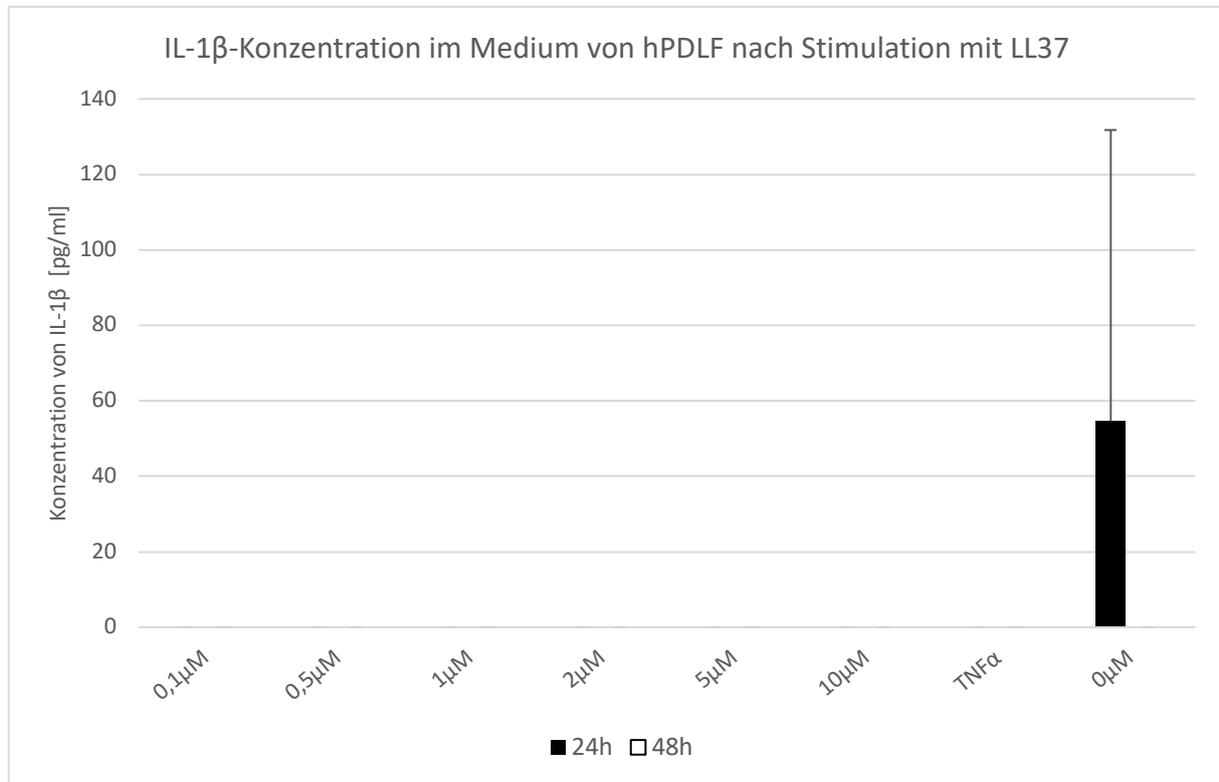


Abbildung 19: Ergebnisse des IL-1-ELISAs mit hPDLF, n = 3

4.2.3 ELISA auf IL-6

Ebenso wurden hPDLF und BHY auf die Bildung von IL-6 unter dem Einfluss von LL37 mittels eines ELISA untersucht. Es wird das Ergebnis aus drei voneinander unabhängigen Versuchsreihen zusammengefasst.

Folgend werden die Ergebnisse des ELISAs von BHY beschrieben. Die unstimulierten Proben wiesen eine IL-6-Konzentration von 150,41 pg/ml nach 24 h und 255,77 pg/ml nach 48 h auf. Deutlich höher lag die Menge von IL-6 bei den TNF- α -stimulierten Proben (24 h = 1300,55 pg/ml, 48 h = 2520,49 pg/ml). Nach 24-stündiger Inkubationszeit mit 0,1 μ M, 0,5 μ M, 1 μ M und 2 μ M LL37 unterlag die Menge an IL-6 der Positivkontrolle. Hierbei hielten sich die Konzentration in Bereichen zwischen 153,56 pg/ml und 427,17 pg/ml auf. Bei einer Konzentration von 10 μ M LL37 konnte kein IL-6 nachgewiesen werden. Mit 5 μ M übertraf die IL-6-Konzentration die TNF- α -

stimulierte Vergleichsprobe (1716,91 pg/ml). Nach 48 waren die Werte alle Proben niedriger als die der Positivkontrolle. Der Maximalwert lag bei 1278,02 pg/ml mit 5 μ M. Der Minimalwert konnte bei der Probe, welche mit 10 μ M LL37 inkubiert wurde, mit 13,81 pg/ml nachgewiesen werden. Bei 0,1 μ M, 0,5 μ M, 1 μ M und 2 μ M konnten IL-6-Konzentrationen zwischen 204,32 pg/ml und 277,61 verzeichnet werden. Dies ist folgend in Abbildung 20 in Form eines Säulendiagramms abgebildet. Die einfaktorielle Varianzanalyse für BHY ergab mit Ausnahme des Wertes der 10 μ M inkubierten Probe keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen. Der Wert war bei der mit 10 μ M LL37 inkubierten Probe signifikant niedriger als die Positivprobe ($p = 0,0001$) und als die mit 5 μ M LL37 inkubierte Probe ($p = 0,012$).

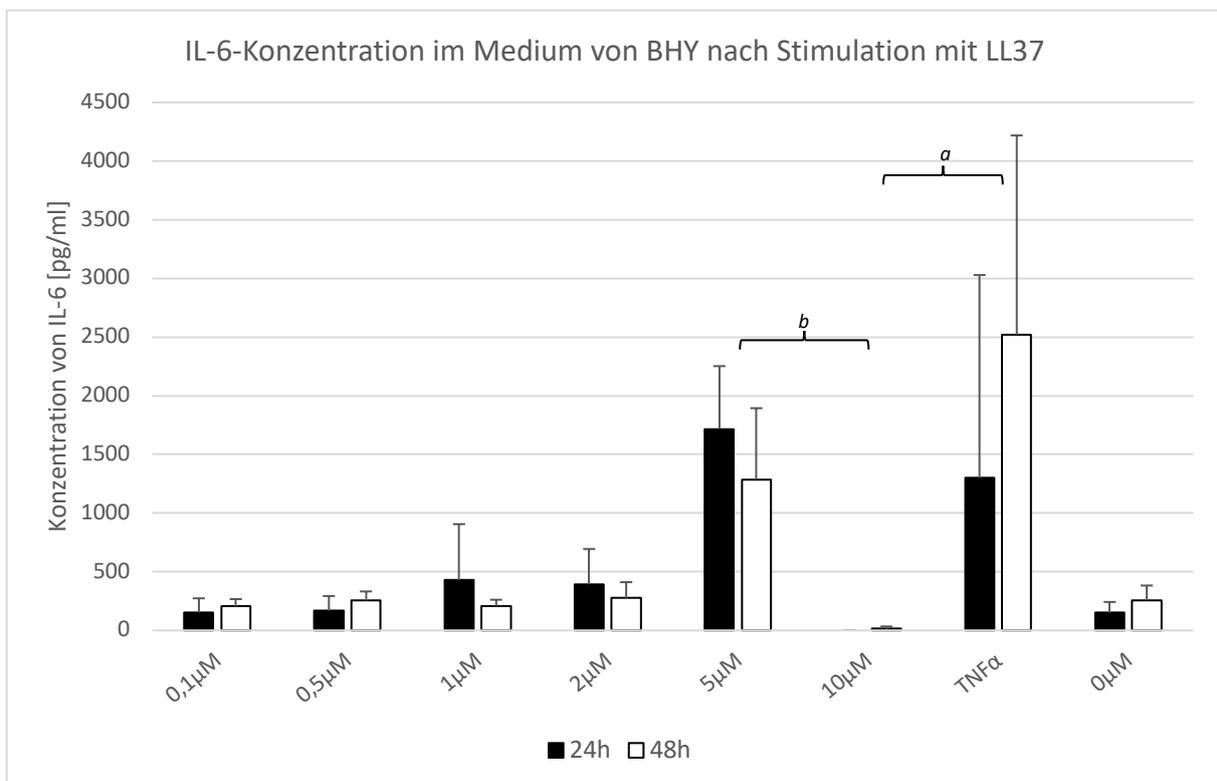


Abbildung 20: Ergebnisse des IL-6-ELISAS mit BHY; $n = 3$; ^a $p = 0,012$; ^b $p = 0,00$;

Abbildung 21 beschreibt die IL-6-Konzentrationen von hPDLF. Bei einer Inkubationszeit von 24 h ließ sich bei der mit TNF- α stimulierten Probe eine Konzentration von 135,07 pg/ml nachweisen. Die anderen Proben wiesen nach 24 h keine IL-6-Werte auf. Eine 48-stündige Inkubation zeigte bei TNF- α -Stimulation den Höchstwert mit 2813,05 pg/ml IL-6. Die unstimulierten hPDLF verzeichneten IL-6-

Konzentrationen von 24,68 pg/ml. Die anderen Proben lagen nach 48 h mit IL-6-Konzentrationen zwischen 35,20 pg/ml und 71,35 pg/ml deutlich unter dem Vergleichswert der Positivkontrolle, aber über der Negativkontrolle. Bei 10 µM LL37 war kein IL-6 festzuhalten. Insgesamt unterschieden sich die Werte nicht signifikant voneinander.

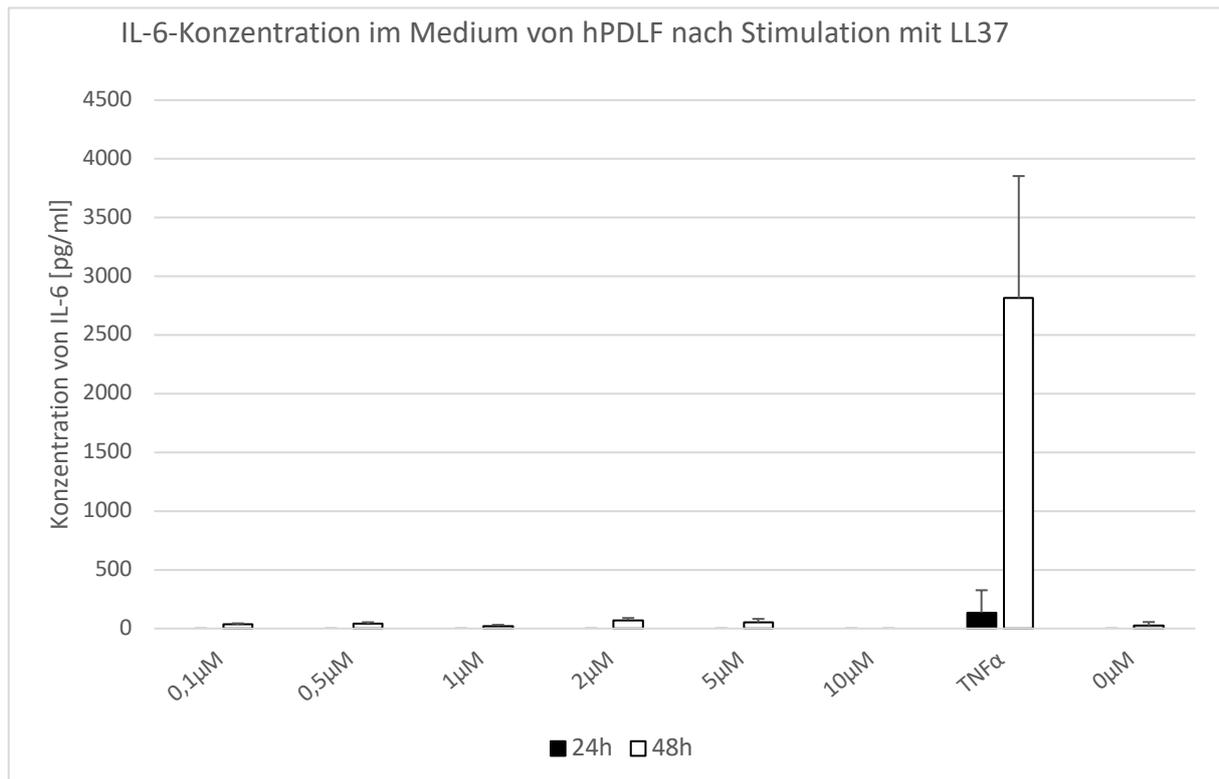


Abbildung 21: Ergebnisse des IL-6-ELISAs mit hPDLF; n = 3

4.2.4 ELISA auf IL-8

Wie in Abbildung 22 zu sehen lagen die IL-8-Werte von BHY nach 48 h generell höher als die Werte nach 24 h Inkubation. Bei der Positivkontrolle waren Konzentrationen von 15500,39 pg/ml nach 24 h und 49796,84 pg/ml nach 48 h zu verzeichnen. Eine geringe IL-8-Produktion konnte auch in der Negativkontrolle nachgewiesen werden (24 h = 1285,87 pg/ml, 48 h = 4309,06 pg/ml). Bei 10 µM ließ sich nach beiden Inkubationszeiten kein IL-8 messen. Nach 24 h lässt sich ein kontinuierlicher Anstieg der IL-8-Konzentration mit steigender LL37-Konzentration beschreiben. Die Werte überstiegen aber die TNF-α-stimulierte Vergleichsprobe nicht. Die anderen Werte nach 48h Inkubation lagen zwischen 3097,86 pg/ml und 6755,55 pg/ml und damit

deutlich unter der Positivkontrolle. Der Kruskal-Wallis-Test zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den Werten. Somit konnte die Kongruenz der Ergebnisse klargestellt werden.

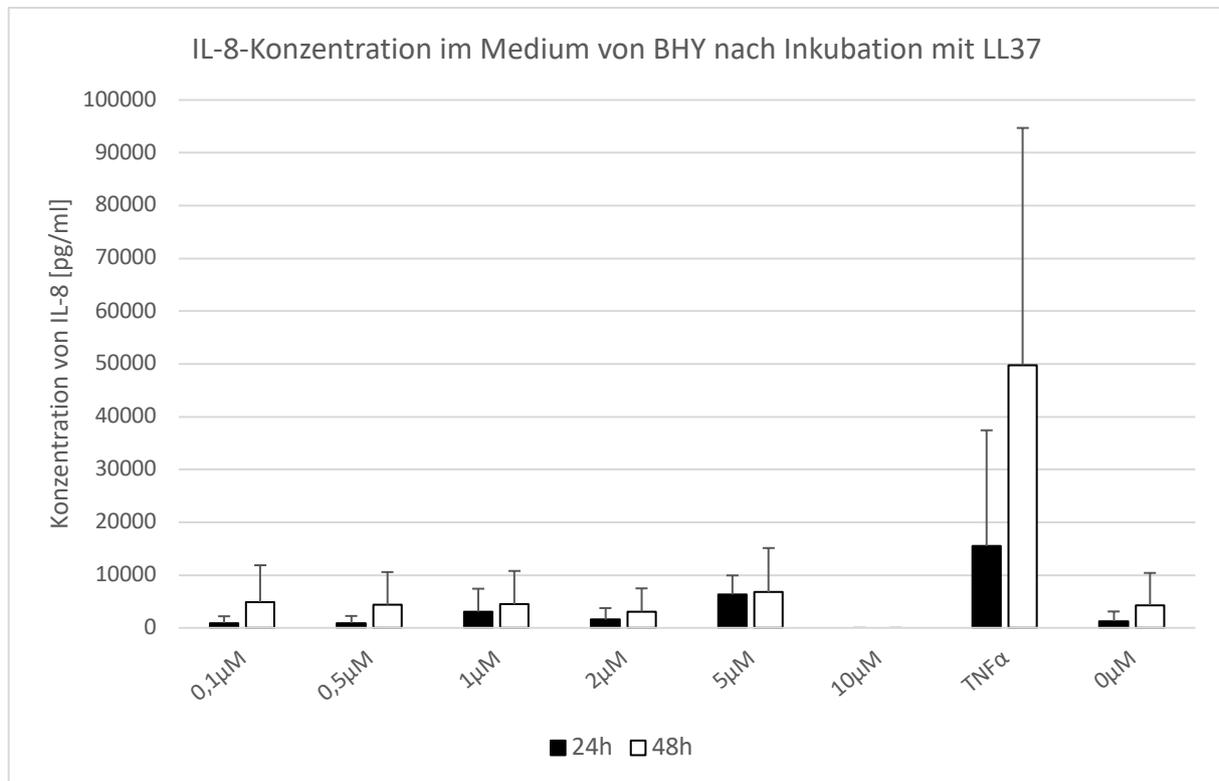


Abbildung 22: Ergebnisse des IL-8-ELISAs mit BHY; $n = 3$

Wie in Abbildung 23 dargestellt, ließ sich IL-8 bei hPDLF lediglich in der Positivkontrolle nachweisen. Nach 24h konnte hier 9009,98 pg/ml IL-8 verzeichnet werden. Die IL-8-Konzentration nach 48 h lag bei 119207,28 pg/ml. Dies bestätigt auch die Varianzanalyse, die einen signifikanten Unterschied zwischen dem Wert der TNF- α -stimulierten Probe und den anderen Gruppen verzeichnet ($p = 0,001$).

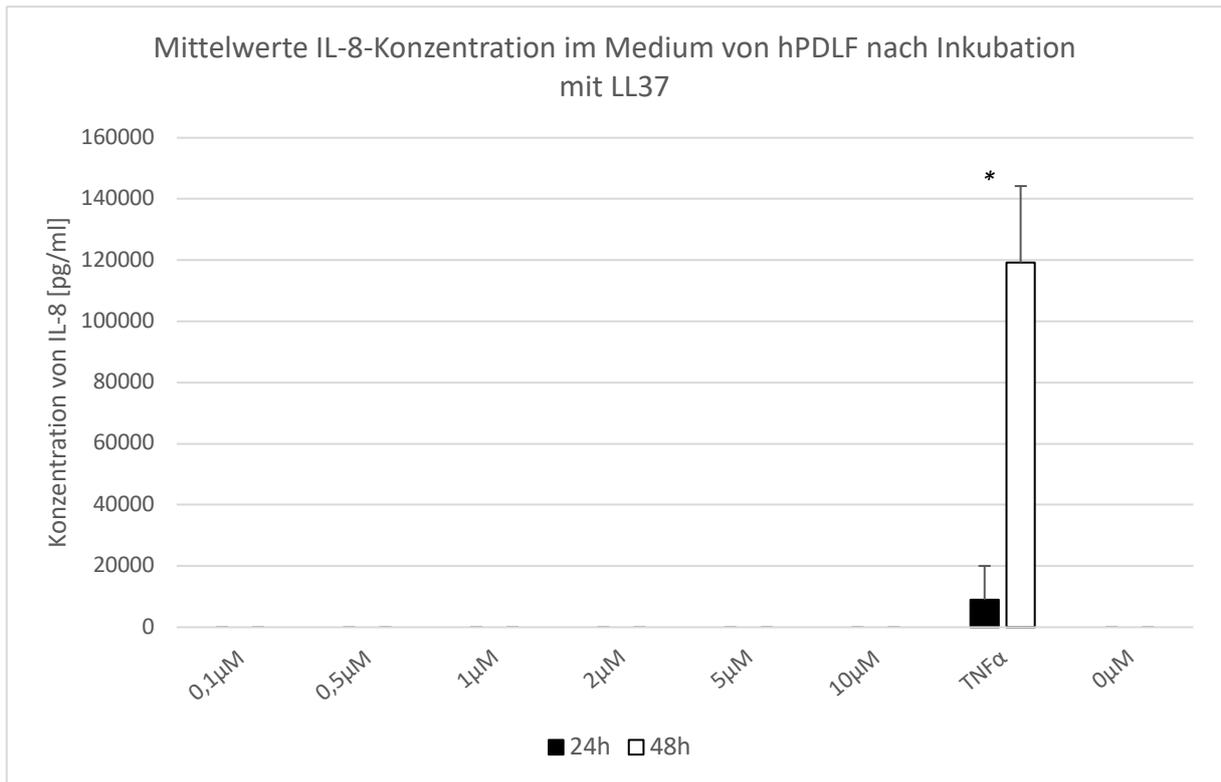


Abbildung 23: Ergebnisse des IL-8-ELISAs mit hPDLF; n = 3; * p = 0,001 zu allen anderen Gruppen

4.3 ELISA auf TNF- α

Bei dieser ELISA konnte in keiner der Proben TNF- α nachgewiesen werden.

4.4 Wirkung auf die osteogene Differenzierung von Stammzellen

Anhand des ELISAS auf Osteocalcin mit Stammzellen wurde der Einfluss von LL37 auf die Bildung von neuem Knochen untersucht. Die Negativkontrolle verzeichnete einen Wert von 21,96 ng/ml. Die Positivkontrolle weist einen Wert von 23,27 ng/ml auf. Der Maximalwert lag bei 19,94 ng/ml bei einer LL37-Konzentration von 0,5 μ M. Ab einer Konzentration von 1 μ M fiel die Osteocalcin-Konzentration der Proben mit steigender AMP-Konzentration, bis ein Minimum von 3,93 ng/ml auf 10 μ M LL37 erreicht war. Dies bestätigte auch die statistische Auswertung, welche signifikant niedrigere Mengen von Osteocalcin bei Inkubation von 10 μ M LL37 im Vergleich zur Positiv- und Negativ-Kontrolle ermittelte.

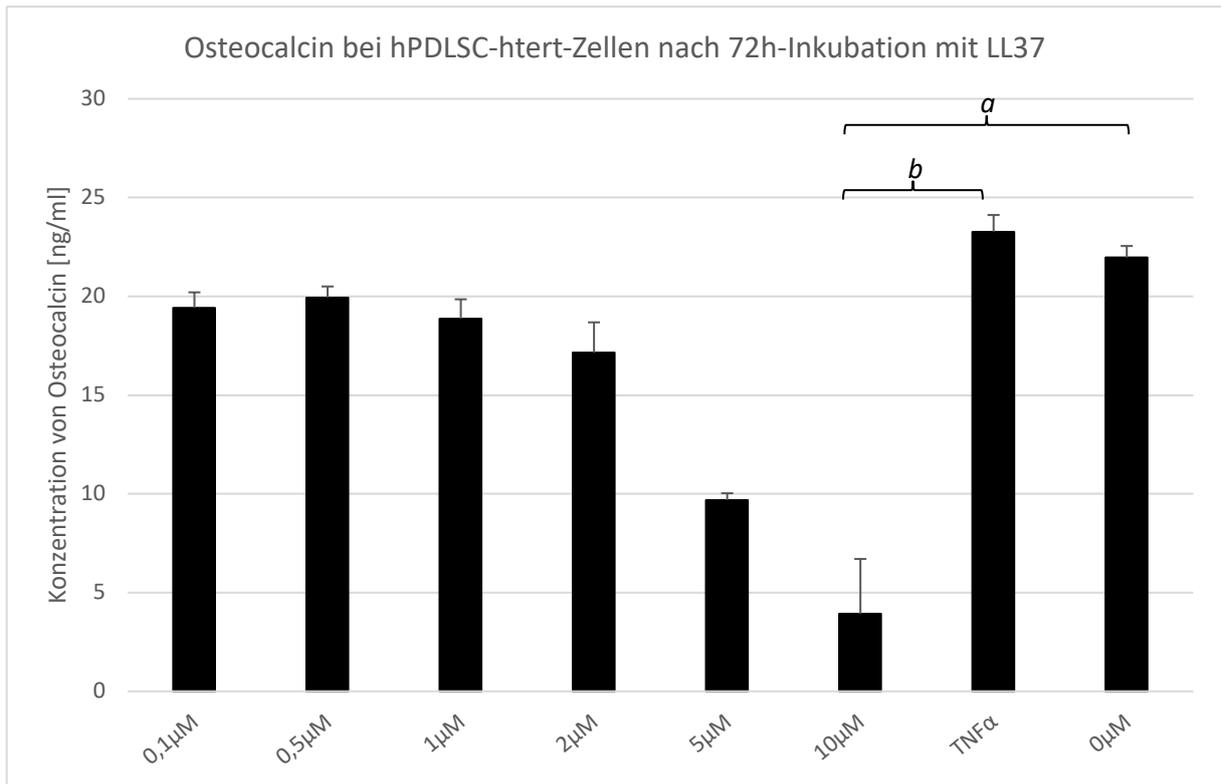


Abbildung 24: Ergebnisse des Osteocalcin-ELISAs; $n = 3$; $^a p = 0,01$; $^b p = 0,42$;

5 Diskussion

Parodontitis ist eine multifaktoriell bedingte Entzündung des Parodonts, welche sich durch die fortlaufende Destruktion des Zahnhalteapparats kennzeichnet (Papapanou *et al.*, 2018). Das Ziel dieser Arbeit war es den Einfluss des AMPs LL37 auf das Entzündungsgeschehen wichtiger Parodontalzellen zu untersuchen. Dabei fokussierte man sich auf die Interleukine IL-1 β , IL-6, IL-8 und das Lokalhormon PGE₂ als wesentliche Komponenten inflammatorischer Vorgänge. Diese Mediatoren zeichnen sich zusätzlich durch eine starke Assoziation mit parodontalen Erkrankungen aus (Cekici *et al.*, 2014; Heidari *et al.*, 2019; Liu *et al.*, 2010). Bei den untersuchten Zellen handelte es sich um Epithelzellen und Fibroblasten des Parodontiums. Ebenso wollte man die Wirkung auf die Knochenregeneration unter LL37-Einfluss beleuchten. Dazu wurde das Potenzial der osteogenen Differenzierung in humanen adulten Stammzellen des parodontalen Ligaments studiert. Die Ergebnisse geben einen Überblick über die Auswirkungen von LL37 auf die Zellaktivität und auf die für Entzündungsprozesse wichtigen Zytokinproduktion, sowie auf das Regenerationspotential parodontaler Stammzellen.

Generell kann man davon ausgehen, dass humane Zellen die natürliche in-vivo-Situation besser widerspiegeln als tierische. Aus diesem Grund hat man sich für einen Versuchsaufbau mit Zellen humanen Ursprungs entschieden. Das Parodontium besteht aus einer Vielfalt verschiedener Strukturen und damit auch einer Vielzahl von Zellen. Epithelzellen sind die erste physikalische Barriere des Gewebes zur Mundhöhle. Somit sind sie als erste Verteidigungslinie gegenüber einer mikrobiellen Invasion von besonderer Bedeutung (Bosshardt und Lang, 2005; Cho und Garant, 2000). Fibroblasten sind der vorherrschende Zelltyp im Parodontium und sind maßgeblich für die Produktion von Bestandteilen der extrazellulären Matrix verantwortlich (Cho und Garant, 2000). Darüber hinaus sezernieren beide Zellarten Entzündungsmediatoren als Reaktion auf pathogene Reize. Das macht sie essentiell für Erhalt und Funktion des Parodonts. In Umgebung der Blutgefäße des Parodontalligaments befinden sich adulte mesenchymale Stammzellen (Chukkapalli und Lele, 2018; Liu *et al.*, 2010; Roberts *et al.*, 1987). Stammzellen des Parodontalligaments (PDSC) sind pluripotente Progenitorzellen mit hohem regenerativen Potential. Diese können unter anderem zu Fibroblasten, Osteoblasten

und Zementoblasten differenzieren (Aydin und Sahin, 2019; McCulloch *et al.*, 1987). In Hinblick auf die Bedeutsamkeit für die Homöostase und Regeneration des parodontalen Ligaments wurden oben genannte Zellen in die Untersuchungen miteinbezogen.

Einer der ausschlaggebenden Faktoren für die Destruktion des Parodonts im Zuge einer Parodontitis ist die überschießende Immunreaktion als Reaktion auf die mikrobielle Invasion, welche weitreichenden Folgen für die Homöostase des Alveolarknochens und des parodontalen Weichgewebes nach sich zieht (Kornman, 2008). Neben der Entfernung subgingivaler Beläge und Wiederherstellung eines apathogenen Biofilms, hat die Parodontitistherapie das Ziel das destruktive Entzündungsgeschehen innerhalb des Parodontiums zu unterbinden. Der Entzündungsprozess ist ein komplexer Mechanismus verschiedener Botenstoffe, Zytokine und Chemokine. Bei einer möglichen Therapie von Parodontitis mit LL-37 ist nicht nur die Wirkung auf parodontalpathogene Keime, sondern auch auf die Signalkaskade des Entzündungsgeschehens zu beleuchten. Aus diesem Grund wurde die Sekretion von Prostaglandin-E₂, Interleukin-1 β , Interleukin-6, und Interleukin-8 als wichtige Faktoren des Entzündungsprozesses untersucht.

Nach der Stagnation der Entzündung ist es Ziel der Parodontitistherapie den ursprünglichen Zustand des Parodontiums, im Sinne einer *restitutio ad integrum*, wiederherzustellen. Eine fortgeschrittene Parodontitis ist durch Verlust des zahntragenden Knochens gekennzeichnet. Für die Regeneration des Knochens ist es essentiell, dass Stammzellen des Parodontalligaments uneingeschränkt osteogen differenzieren. So wird eine Ossifikation und Regeneration des Alveolarknochens möglich. Die therapeutische Anwendung mesenchymaler Stammzellen wurde bereits in anderen Bereichen untersucht. So kann die Knochenheilung atropher Defekte durch Zugabe mesenchymaler Stammzellen sogar verbessert werden (Funk *et al.*, 2007). Patienten mit schwerer Parodontitis (Stadium III) und schneller Progression (Grad C) zeichnen sich durch einen besonders starken und rapiden Verlust von Knochenniveau im Alveolarbereich auch in jungem Lebensalter aus. Bei solchen Fällen ist LL37 in stark verminderter Konzentration in der Sulkusflüssigkeit vorhanden oder fehlt ganz (Puklo *et al.*, 2008). Es erschließt sich ein möglicher Zusammenhang zwischen LL37-Mangel und einem Ungleichgewicht der Homöostase des Knochens. Die

ausgeglichene Knochenhomöostase kennzeichnet sich durch ein Gleichgewicht zwischen Knochenabbau und -anbau aus. Darum war es von großem Interesse die Wirkung von LL37 auf osteogene Prozesse zu beleuchten. Um die osteogene Differenzierung von Stammzellen (PDSC) nachzuweisen, eignet sich Osteocalcin. Das Protein wird ausschließlich in reifen Osteoblasten gebildet (Ducy *et al.*, 2000) und dient somit optimal als Marker. Obwohl seine genaue Funktion bis dato unbekannt ist (Lee *et al.*, 2000), wird es weithin als spezifischer Marker von Osteoblasten akzeptiert (Lumachi *et al.*, 2012; Seibel, 2005).

Beginnend war es wichtig zu reflektieren, ob und in welcher Konzentration LL37 zytotoxisch wirkt. Es kann genutzt werden, um die ideale therapeutische Konzentration zu bestimmen. Durch WST-8-Testung konnte eine leicht abfallende Tendenz der Zellaktivität beobachtet werden, welche aber durch die Varianzanalyse nicht bestätigt werden konnte. So war kein signifikanter Einfluss des AMP auf die Zellaktivität zu bestätigen. Nach 48 h zeigten die vorliegenden Ergebnisse eine größere Anzahl aktiver Zellen als nach 24 h, was durch die weiter bestehende Zellteilung der Lebendzellen unabhängig von LL37 zu erklären ist. In Anbetracht einer weiteren Studie, die sich durch einen ähnlichen Versuchsaufbau kennzeichnet, konnten vergleichbare Ergebnisse beobachtet werden. Eine Stabilität der Lebendzellen war zu erfassen. Allerdings war ein signifikanter Abfall der metabolisch aktiven Zellen ab einer Konzentration von 8 μM zu beschreiben (Montreekachon *et al.*, 2014). Dabei wurde die Zytotoxizität mittels MTT-Assay von LL37 bei HGEC (human gingival epithelial cells) untersucht, wobei der Umfang der Konzentration mit 0 bis 30 μM größer war. Auch eine Analyse von immortalisierten humanen gingivalen Epithelzellen (OBA-9) und humanen gingivalen Fibroblasten zeigte Parallelen. Sie wies bei LL37-Konzentrationen zwischen 0,05 μM und 5 μM keinen zytotoxischen Effekt auf (Bedran *et al.*, 2014). Zuyderduyn und Kollegen untersuchten den Einfluss von LL37 auf die Viabilität glatter Muskelzellen der Atemwege. Deren Aktivität waren ab einer Konzentration von 50 mg/ml (11130 μM) deutlich reduziert (Zuyderduyn *et al.*, 2006). Bei einer weiteren Studie mit Monozyten konnte auch bei Konzentration von 10-20 μM LL37 keine Verminderung der Zellaktivität nachgewiesen werden (Elssner *et al.*, 2004). Hier zeigte sich eine toxische Wirkung bei sehr viel höheren Konzentration LL37 im Vergleich zu der bei unserer Studie verwendeten Konzentration. Eine Toxizitätsuntersuchung der hPDLSC-htert fand nicht statt, da bei den anderen bereits

untersuchten Zellarten sehr ähnliche Ergebnisse zu beobachten waren. Zudem ist hPDLSC-htert eine weitere Parodontalzelle, sodass von einer entsprechenden, den BHY und hPDLF ähnlichen Reaktion auf LL37 ausgegangen werden konnte. Ein gleichwertiges Ergebnis des WST-8-Assay war zu erwarten.

PGE₂ ließ sich bereits bei unstimulierten BHY-Zellen in hohen Konzentrationen nachweisen. Dies ließ auf eine intrinsische COX-1-Aktivität der Zellen schließen. Erst ab höheren Konzentrationen von LL37 zeigte sich eine Tendenz zur Steigerung der PGE₂-Konzentration der Proben. Es war anzunehmen, dass die Steigerung des PGE₂-Gehalts mit einer COX-2-Aktivierung durch LL37 einherging. Insgesamt war jedoch keine signifikante Veränderung der PGE₂-Produktion durch LL37 zu ermitteln. Auch unstimulierte hPDLF sezernierten PGE₂. hPDLF und BHY ähnelten sich in ihrem Verhalten, sodass LL37 keine signifikanter Einfluss auf die PGE₂-Sekretion festzustellen war. Ebenso gibt es keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen LL37-Konzentrationen als auch zur Positiv und Negativprobe. Mehrere Studien wiesen eine fördernde Wirkung durch LL37 auf die PGE₂-Synthese nach. Eine Studie von Chutjumlong und Kollegen verzeichnete erhöhte COX-2-Expression und erhöhte PGE₂-Produktion nach LL37-Exposition bei humanen gingivalen Fibroblasten (Chotjumlong *et al.*, 2013). Diese Feststellung widersprach unseren Ergebnissen. Ebenso wurde eine erhöhte PGE₂-Konzentration bei synovialen Sarkomzellen nach LL37-Inkubation beschrieben. Eine andere Untersuchung sprach von einer erhöhten COX-1-abhängigen PGE₂-Sekretion (Salvado *et al.*, 2013). Allerdings standen bei dieser Studie Endothelzellen im Fokus der Untersuchung. Als Ursache für die Abweichung der Ergebnisse zur letztgenannten Studie war die Verwendung unterschiedlicher Zelllinien vorstellbar. Das machte die beiden Ergebnisse schwer vergleichbar.

IL-1 β wurde bei beiden Zelllinien sowohl stimuliert als unstimuliert nur gering bis gar nicht sezerniert. Ausnahme war hier die mit 10 μ M LL37 stimulierte Probe bei BHY, welche eine signifikant erhöhte IL-1 β -Konzentration auswies. Immunkompetente Zellen wie Monozyten und dendritischen Zellen sind Hauptproduktionsort von IL-1 β . Daher erschloss sich, die allgemein geringe Konzentration des Interleukins in den Proben, vor allem auch bei der Positiv- und Negativ-Probe. Noguchi und Kollegen wiesen eine erhöhte IL-1 β -Freisetzung in Hautmastzellen unter LL37-Einfluss nach

(Noguchi *et al.*, 2002). Eine weitere Studie zeigte eine Produktion und Freisetzung von IL-1 β durch LL37 in Monozyten auf, welche mit LPS stimuliert wurden. Im Vergleich dazu konnten bei den nur durch LPS-induzierten Monozyten ohne LL37 kein IL-1 β nachgewiesen werden (Elssner *et al.*, 2004). Die Nebeneinanderstellung fiel hier schwer, da es sich bei den eben beschriebenen Studien um Monozyten und Mastzellen handelt. Sie sind Teil des zellulären unspezifischen Immunsystems und in ihrer Physiologie different. Bei der Begutachtung von humanen epidermalen Keratinozyten wiederum wurde eine Förderung der Produktion von Zytokinen der IL-1-Familie, wozu auch IL-1 β gehört, durch aktivierte Cluster-Gene über LL37-Inkubation beobachtet werden (Li *et al.*, 2014).

IL-6 wurde in geringer Menge in der nicht-stimulierten Probe von BHY gemessen. Mit steigender Konzentration von LL37 war eine steigende Tendenz der IL-6 Konzentration in den Proben zu beobachten. Die Maximalkonzentration wurde bei 5 μ M erreicht. Ab einer LL37-Konzentration von 10 μ Mol war fast kein IL-6 mehr nachweisbar. Zusammenfassend ließen sich aber keine signifikanten Unterschiede zwischen den IL-6-Konzentration der unterschiedlichen Proben sowohl bei BHY als auch bei hPDLF feststellen. Im Gegensatz dazu zeigte sich bei hPDLF eine kontinuierlich geringere bis keine IL-6-Konzentration im Vergleich zu den Proben bei BHY. Diese unterschiedlichen Auswirkungen auf die zwei untersuchten Zellarten unseres Versuches ließ sich durch die im vorherigen Versuch nachgewiesenen verschiedenen PGE₂-Konzentrationen der BHY- und hPDLF-Proben erklären (Abb. 14, Abb. 15). Es wurden bei BHY eine mehr als 100-fach höhere Konzentration von PGE₂ nachgewiesen. PGE₂ kann eine verstärkte Freisetzung von IL-6 auslösen (Czuszak *et al.*, 1996; Inoue *et al.*, 2002; Noguchi *et al.*, 2002). Die Ergebnisse unserer Studie waren übereinstimmend mit Studien, welche humane gingivale Epithelzellen (HGEC) verglichen (Montreekachon *et al.*, 2014). Dabei konnten ebenso keine signifikant erhöhten IL-6-Werte durch LL37-Stimulation erzielt werden. Bei einer weiteren Untersuchung von gingivalen Fibroblasten konnte ebenfalls keine erhöhte IL-6-Sezernierung als Reaktion auf LL37 bestätigt werden (Boink *et al.*, 2017). Eine Analyse von menschlichen bronchialen Epithelzellen dokumentierte ein vergleichbares Verhalten (Pistolich *et al.*, 2009). Andere Studien beobachteten keinen Einfluss des humanen Cathelicidins allein, sondern in Zusammenhang mit LPS bakteriellen Ursprungs oder auch anderen Interleukinen, vor allem unter dem Blickpunkt eines

möglichen synergistischen Effekts (Filewod *et al.*, 2009; Inomata *et al.*, 2010). Der Vergleich war hier schwierig, weil Filewood und Kollegen bei ihren Untersuchungen sowohl mit bronchialen Epithelzellen als auch mit LPS in Kombination mit LL37 arbeiteten.

Allgemein ist der Gesichtspunkt die Versuche in in-Vivo-ähnlicheren, nicht komplett mikrobiell isolierten Umständen durchzuführen attraktiv. Besonders bei Proben, denen Endotoxine beigefügt wurden, zeigte LL37 entzündungshemmende Reaktion. Dies zeichnete sich durch eine verminderte Produktion von Interleukinen aus (Bucki *et al.*, 2010; Inomata *et al.*, 2010; Mookherjee *et al.*, 2006; Nagaoka *et al.*, 2001).

Bezüglich hPDLF konnte, weder bei der unstimulierten Probe, noch unter Einfluss von LL37 eine IL-8 Sezernierung festgestellt werden. Lediglich die TNF- α -stimulierte hPDLF-Probe wies IL-8 auf. BHY sezernierte in allen Proben bis auf die mit einer Konzentration von 10 μ M LL37 exponierten Probe IL-8. Dabei unterschieden sich die Mengen an produzierten IL-8 nicht signifikant voneinander. Die sehr hohen IL-8-Werte der Positivprobe ließen sich durch Steigerung der Stimulierung IL-8 durch TNF- α erklären (Kim *et al.*, 2009; Namba *et al.*, 2017; Sarir *et al.*, 2010). Vergleichsweise dazu zeigten HGEC (Montreekachon *et al.*, 2014) (Montreekachon *et al.*, 2011), humane glatte Muskelzellen der Atemwege (Zuyderduyn *et al.*, 2006), humane Epithelzellen des Bronchus (Pistollic *et al.*, 2009) und synoviale Sarkomzellen (SW982) ein im Vergleich zu unserer Studie gegensätzliches Verhalten mit einer Steigerung der IL-8-Produktion auf LL37. Die Versuchsbedingungen waren sich sehr ähnlich. Bei den verglichenen Studien wurden allerdings Inkubationszeiten mit LL37 zwischen 1 h bis 24 h verwendet. Sowohl Montreekachon und Kollegen, als auch Zuyderduyn und Kollegen entschieden sich für eine Inkubationszeit von 24 h. Pistollic und Kollegen inkubierte die Zellen für 2 h, 4 h, 6 h, 10 h und 24 h. Lediglich die verwendeten LL37-Konzentrationen hatten eine größere Breite mit bis zu 11130 μ M durch Zuyderduyn und Pistollic.

LL37 beeinflusste die Osteocalcin-Bildung der hPDLSC-htert negativ. Mit steigender Konzentration sank die Osteocalcin-Konzentration der Proben, sodass bei einer Konzentration von 10 μ M eine signifikant geringere Osteocalcin-Konzentration in den Zellüberschüssen nachzuweisen war.

Verschiedene Studien widersprachen unseren Ergebnissen. Bei den verglichenen Untersuchungen wurde von einer Förderung osteogener Prozesse durch LL37 berichtet. Bei einer Analyse von Stammzellen lokalisiert an der apikalen Papille (SCAP) unter Einfluss von 2,5 µg/ml (56 µM) LL37 wurden erhöhte Mengen verschiedener Marker osteogener und odontogener Differenzierung nachgewiesen (Cheng *et al.*, 2020). Allerdings wurde Osteocalcin dabei nicht berücksichtigt. Die Inkubation mesenchymaler Stammzellen von Mäusen mit LL37 zeigte eine Steigerung der osteogenen Differenzierung, durch erhöhte Werte alkalischer Phosphatase, über einen Calcium-Nachweis mit Alizarinrot (Liu *et al.*, 2018; Weinberg *et al.*, 1998). Alkalische Phosphatase diente dabei als Marker für osteogene Differenzierung. Osteocalcin wurde nicht gemessen. Zusätzlich muss beim Vergleich der Resultate bedacht werden, dass unterschiedliche Zellarten verwendet wurde. Ein weiterer signifikanter Unterschied zwischen der zum Vergleich herangezogenen Studien und unserer Untersuchung war, dass die Mausstammzellen über mehrere Tage hinweg Medium zur Unterstützung osteogener Prozesse erhielten. Die Stammzellen unseres Versuches erhielten durchgehend high Glucose DMEM-Medium. Möglicherweise fehlten, in dem von uns verwendetem Medium, Nährstoffe, die bei solchen osteogenen Prozessen von Nöten sind. Erhöhte Osteocalcin-Mengen konnten bei MC3T3-E1 Zellen (Osteoblasten-Progenitorzellen von Mäusen) in Zusammenhang mit LL37 im Vergleich zur Kontrollgruppe, ohne das AMP, dokumentiert werden (Shen *et al.*, 2019). Hierbei war der komplexe Versuchsaufbau der anderen Studie beziehungsweise die sehr unterschiedlichen Versuchsbedingungen zu beachten. Es wurden Nanoröhrchen aus Titan verwendet, welche mit dem AMP (LL37) versetzt wurden. Um einen besseren Vergleich mit oben genannten Studien erheben zu können, wäre es möglich in einem weiteren Versuch hPDLSC-*htert* auch in ein osteogen-förderndes Medium zu überführen. Diese Veränderung könnte die genannten Studien besser mit der unseren vergleichbar machen.

LL37 wurden in mehreren Untersuchungen auch wundheilungsfördernde Eigenschaften zugesprochen. Dabei handelte es sich um angiogenetische (Koczulla *et al.*, 2003), reepithelialisierende (Carretero *et al.*, 2008; Heilborn *et al.*, 2003) Merkmale und Beteiligung an Knochenheilung nach Frakturen (Zhang und Shively, 2010). Auch dieser Aspekt ist, in Bezug auf die von uns verwendeten Parodontalzellen, weiterhin interessant genauer zu beleuchten.

Allgemein konnte auch bei höheren Konzentrationen LL37 keine signifikante Minderung der Zellaktivität beobachtet werden. Bei hoher LL37-Menge bestand lediglich eine erhöhte Interleukin-1 β -Produktion durch BHY-Zellen. hPDLF ließ sich durch hohe LL37-Dosen nicht signifikant beeinflussen, was sich durch eine unveränderte oder insgesamt fehlende Bildung von Interleukinen zeigte.

Bei der Therapie von Parodontitis ist eine Vermeidung einer überschießenden Entzündungsreaktion zur Verminderung der Gewebedestruktion zu erreichen. Bei Konzentrationen von 12-25 μ M konnte eine antimikrobielle Aktivität gegenüber gram-negativer Bakterien und bei Konzentrationen von 0,75-1,5 μ M bei gram-positiven Bakterien nachgewiesen werden (Batoni *et al.*, 2011) (Elssner *et al.*, 2004). Im Vergleich dazu sind bei anderen therapeutischen Ansätzen wie Untersuchungen zur Therapie eines septischen Schockes höhere LL37-Konzentrationen angestrebt (Scott *et al.*, 2002). Dabei handelt es sich aber um eine systemische Anwendung von LL37, wie bei Studien zur Behandlung von Sepsis mit LL37. Septischen Mäusen wurden 2 μ g (Nagaoka *et al.*, 2020) beziehungsweise 50 μ g (Qin *et al.*, 2019) intravenös verabreicht. Dadurch erzielte man eine Verringerung der Entzündungsreaktion.

Weiterführend wäre es interessant zu beleuchten, wie die Reaktion parodontaler Zellen unter bakteriellem Einfluss auf LL37-Exposition reagieren. Bei einigen Studien, die diesen Zusammenhang bereits untersuchten, verminderte LL37 die Entzündungsreaktion der Zellen (Bucki *et al.*, 2010; Into *et al.*, 2010). Insgesamt entspricht unser Versuchsaufbau nicht den in-Vivo-Gegebenheiten der Mundhöhle. Bei unseren Untersuchungen handelt es sich um eine komplett isolierte Monozellkultur. Einerseits kann eine Wechselwirkung zwischen den verschiedenen Zellarten nicht untersucht werden. Andererseits handelt es sich hierbei um einen sterilen Versuchsaufbau. Mikrobielle Exposition wie sie in der Mundhöhle vorkommt, wurde nicht berücksichtigt. Gleichwohl wie oben bereits erwähnt, kann durch Einfluss bakterieller Bestandteile LL37 eine unseren Ergebnissen sehr unterschiedliche Reaktion hervorrufen. Miteinbeziehen bakterieller Bestandteile in den Versuchsaufbau würde aber den Rahmen dieser Studie sprengen. Umso ähnlicher die Gegebenheiten eines Versuchsaufbaus den Umständen der natürlichen Mundhöhle entsprechen, desto mehr Faktoren spielen in das Erreichen der Ergebnisse mit ein, sodass das Ziehen von gezielten Rückschlüssen nicht mehr möglich ist. Daher ist es wichtig auch

Versuche mit wenig Elementen, die einen möglichen Einfluss auf die Ergebnisse haben können, durchzuführen, die dann um einzelne Faktoren erweiterbar sind. Daraus lassen sich wiederum kausale Schlussfolgerungen ziehen.

Ebenso kann man die geringe Breite der LL37-Konzentration der Untersuchung hinterfragen. Auch Versuche mit anderen antimikrobiellen Peptiden des Parodontiums, wie sie oben beschrieben sind, ist vorstellbar. Es würde über den Rahmen dieser Arbeit hinausgehen andere AMPs auf dieselben Entzündungsmarker zu untersuchen.

Ein besseres Verständnis der Mechanismen, die den Reaktionen während einer Entzündung zugrunde liegen, kann die Entwicklung neuer Therapeutika erleichtern.

Mit der Problematik, der immer häufigeren Bildung von Resistenzen durch Bakterien gegen herkömmliche Antibiotika, wird ständig nach Alternativen zur Bekämpfung von bakteriellen Infektionen gesucht. Hierbei bieten die AMPs eine praktikable Option. Eine Untersuchung von Würsching und Kollegen bestätigt eine erhöhte Effektivität von herkömmlichen Antibiotika wie Amoxicillin, Clindamycin und Metronidazol in Kombination mit LL37 oder Lactoferrin auf reife Biofilme (Wuersching *et al.*, 2021). Allerdings muss bedacht werden, dass Bakterien auch Strategien zur Umgehung der Einflussnahme durch AMPs entwickelt haben (Brogden, 2005), die bei weitem aber nicht das Ausmaß der Resistenzen gegen Antibiotika erreichen, da AMPs wiederum selbst Mechanismen besitzen, um diesen weitestgehend zu entgehen (Zasloff, 2002). Zusätzlich kann es durch die schnelle proteolytische Halbwertszeit zu Schwierigkeiten bei der systemischen Anwendung kommen (Marr *et al.*, 2006). Enzyme im menschlichen Körper, wie das „trypsine-like-proteasis“, können AMPs schneller abbauen und somit deren Wirkung beeinträchtigen (Boman, 1995). Nichtsdestotrotz wird von möglichen topischen Anwendungen bei Verbrennungen, Augeninfektionen, diabetischen Wunden berichtet. Sie könnten sich zur Bekämpfung von Insektenverbundenen Krankheiten wie Malaria, Trypanosimiasis oder Filariosen eingesetzt werden (Boman, 1995). Es bietet sich an sie zur Verwendung in Mundspüllösungen, Gelen und Lacken für Patienten mit geschwächtem Immunsystem für die Vorbeugung opportunistischer Infektionen wie Candidiasis oder Gingivostomatitis, aufgrund ihrer antiviralen und antifungalen Wirkung, zu nutzen (Hans und Madaan Hans, 2014). Bei einer randomisierten Placebo-kontrollierten Doppel-Blind-Studie von Giles wurden 332

Patienten mit Iseganan, eine Mundspüllösung, welches ein synthetisches AMP enthielt, behandelt. Diese Patienten erhielten vor der Iseganan-Anwendung eine Chemo- oder Radiotherapie im Mund-Hals-Bereich zur Bekämpfung von Tumoren. Iseganan wurde zur Vorbeugung einer ulzerösen Mukositis verwendet und zeigte im Laufe der Studie eine Verminderung der mukositischen Symptome im Vergleich zur Placebo-Gruppe (Giles *et al.*, 2003). Ebenso sieht man die Möglichkeit zur Vermeidung von topischen bakteriellen Infektionen durch AMPs bei Patienten, die an Psoriasis und zystischer Fibrose erkrankt sind (Weinberg *et al.*, 1998). Zharkova und Kollegen konnten synergistische Wirkung bei Kombinationen aus herkömmlichen Antibiotika und AMPS feststellen (Zharkova *et al.*, 2019). Aufgrund der bereits beschriebenen LPS-neutralisierenden Wirkung von LL37, kann es gut zur Therapie einer Sepsis verwendet werden. Somit zeigt sich, dass AMPs nicht limitiert auf den Einsatz gegen Parodontitis sind, sondern vielfältig eingesetzt werden können.

6 Zusammenfassung

LL37 ist das einzige bisher nachweisbare humane AMP aus der Cathelicidin-Gruppe. Es handelt sich um ein endogen vorkommendes Protein, das antimikrobielle Eigenschaften besitzt. Ebenso weist es immunmodulierende Fähigkeiten auf. Diese Studie geht sowohl dem Einfluss von LL37 auf die Entzündungsreaktion wichtiger parodontaler Zellen, als auch der möglichen osteogenen Differenzierung von Stammzellen des Parodontiums nach.

Im Fokus der Untersuchung standen Kulturen von Zellen, welche Teil parodontaler Strukturen sind. Verwendet wurden Fibroblasten und Epithelzellen der Gingiva und des Parodonts und um Vorläuferzellen von Osteoblasten, wie sie im Bereich des Parodontalligaments vorkommen. Die Zellen wurden je über 24 h und 48 h mit verschiedenen Konzentrationen (0,1 μM , 0,5 μM , 1 μM , 2 μM , 5 μM , 10 μM) LL37 inkubiert. Dabei erfolgten die Versuche in 3 voneinander unabhängigen Durchführungen. Zytotoxizitäts-Analysen wurden unter Verwendung von WST-8-Assays an BHY und hPDLF durchgeführt. Weiterhin wurde die Wirkung des LL37 auf verschiedene zelluläre Entzündungskaskaden (PGE_2 , IL-1 β , IL-6 und IL-8) untersucht, um ein mögliches inflammatorisches Potential von LL37 festzustellen. Diese Zytokine sind stark mit ausgeprägter Parodontitis assoziiert und gelten als grundlegende Elemente inflammatorischer Vorgänge. Der Nachweis der jeweiligen Proteine erfolgte durch EIA beziehungsweise ELISAs. Als weitere Komponente wurden Untersuchungen durchgeführt, welche den Nachweis einer Beeinflussung des AMPs auf das regenerative Potential im Parodontium zum Ziel hatten. Dabei wurden Progenitorzellen (hPDSC-hTERT) mit den oben genannten Konzentrationen LL37 für 72 h inkubiert. Die Menge des sekretorischen osteogenen Markerproteins (Osteocalcin) wurde mittels eines dafür spezifischen ELISAs ermittelt. Hinsichtlich der Beurteilung der Biokompatibilität des AMPs ergaben die Versuche folgende Erkenntnisse: Es war eine Tendenz zur Verringerung der Zellaktivität mit steigender LL37-Konzentration zu erkennen. Bei einer Inkubation mit 0,1 μM LL37 lag die prozentuale Zellaktivität der hPDLF im Vergleich zur Negativprobe nach 24 h bei 107 % und nach 48 h bei 130,98 %. Dagegen lag die prozentuale Zellaktivität derselben Zellreihe bei einer Inkubation mit 10 μM LL37 nach 24 h nur bei 28,09 % und nach 48h nur bei 12,79 %. BHY verhielten sich ähnlich. Trotz dieser Beobachtungen muss darauf

hingewiesen werden, dass sich die Beeinflussung der Zellaktivität durch LL37 nicht im statistisch relevanten Bereich befindet.

In Bezug auf das mögliche proinflammatorische Potential von LL37 konnten für BHY und hPDLF unterschiedliche Reaktionen auf die LL37-Inkubation observiert werden. Die Entzündungsreaktion von hPDLF konnte durch LL37 nicht beeinflusst werden. Insgesamt konnte gerade mit der hohen LL37-Konzentration von 10 μM bei BHY eine besonders starke Ausschüttung von 446,42 pg/ml ($p = 0,16$ zu Negativprobe) des proinflammatorischen Interleukins-1 β beobachtet werden. Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass es insgesamt eine geringe Beeinflussung durch LL-37 auf das Entzündungsgeschehen vermutet werden kann.

Hinsichtlich der Beeinflussung des regenerativen Potentials durch osteogene Aktivitäten zeigte sich eine Hemmung der Osteocalcin-Bildung durch LL37 bei einer Konzentration von 10 μM . Es ließ sich ein Zusammenhang zwischen LL37-Konzentration und Osteocalcin-Konzentration beobachten. Mit steigender LL37-Konzentration sank die Osteocalcinbildung der Osteoblasten-Vorläuferzellen. Die Negativprobe verzeichnete eine Osteocalcin-Konzentration von 21,96 ng/ml, wohingegen unter dem Einfluss von 10 μM LL37 lediglich 3,93 ng/ml gemessen wurde. Im direkten Vergleich zeigte sich eine signifikant geringere ($p = 0,01$) Osteocalcin-Bildung bei hoher LL37 Konzentration.

Für weitergehende Studien könnte eine Untersuchung der Reaktion in einem Versuchsaufbau mit Zellen in einer bakteriellen Umgebung von Interesse sein. Ebenso ließe sich das Parodontium in seiner Komplexität in einer Multizellkultur nachahmen und damit in-Vitro-Studien durchführen. Darüber hinaus wäre eine in-Vivo-Untersuchung mit lokaler AMP-Gabe und anschließender Analyse der Sulkusflüssigkeit vorstellbar. Als Träger erscheinen AMP-haltige Mundspüllösungen oder Gele direkt in den Sulkus appliziert geeignet.

Diese Studie hilft dabei, die komplexen Zusammenhänge zwischen LL37 und der Entzündungsreaktion grundlegender spezifischer Zellen des Parodontiums besser zu verstehen.

7 Anhang

7.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Darstellung der Prostaglandin E ₂ -Synthese (Ausschnitt der Abbildung nach Kalinski, 2012).....	9
Abbildung 2: Quartärstruktur von HNP-1	12
Abbildung 3: dreidimensionale Struktur von LL-37	13
Abbildung 4: Überblick der verschiedenen immunmodulierenden Funktionen der AMPs	15
Abbildung 5: Well-Platte mit ausgesäten Zellen	20
Abbildung 6: Mechanismus der WST-8 Umsetzung durch Dehydrogenasen in lebenden Zellen (PromoKine, Heidelberg, Deutschland).....	21
Abbildung 7: 96-Well Platte mit WST-8-Assay.....	22
Abbildung 8: verdünnte Proben in Eppendorf-Röhrchen	23
Abbildung 9: Mikrotiterplatte für PGE ₂ nach Zugabe der Stopp-Solution.....	24
Abbildung 10: Mikrotiterplatte für IL-1 β mit Substrat-Solution nach 20-minütiger Inkubation	26
Abbildung 11: IL-8 ELISA nach Zugabe der Stopp-Lösung	28
Abbildung 12: TNF- α ELISA nach Zugabe der Stopp-Lösung.....	28
Abbildung 13: Osteocalcin-ELISA nach Zugabe der Stopp-Lösung	29
Abbildung 14: Ergebnisse des WST-8-Testes mit BHY zur Untersuchung der Zytotoxizität, n = 3.....	31
Abbildung 15: Ergebnisse des WST-8-Testes mit hPDLF zur Untersuchung der Zytotoxizität der verschiedenen LL37-Konzentrationen; n = 3.....	32
Abbildung 16: Ergebnisse des PGE ₂ -EIAs mit BHY; n = 3	33
Abbildung 17: Ergebnisse des PGE ₂ -EIAs mit hPDLF, n = 3	34
Abbildung 18: Ergebnisse des IL-1 β -ELISAs mit BHY; n = 3; ^a p = 0,015 ; ^b p = 0,14 ; ^c p = 0,12 ; ^d p = 0,11 ; ^e p = 0,16 ;	35
Abbildung 19: Ergebnisse des IL-1-ELISAs mit hPDLF, n = 3.....	36
Abbildung 20: Ergebnisse des IL-6-ELISAs mit BHY; n = 3; ^a p = 0,012 ; ^b p = 0,00 ;	37
Abbildung 21: Ergebnisse des IL-6-ELISAs mit hPDLF; n = 3.....	38
Abbildung 22: Ergebnisse des IL-8-ELISAs mit BHY; n = 3	39

Abbildung 23: Ergebnisse des IL-8-ELISAs mit hPDLF; n = 3; * p = 0,001 zu allen anderen Gruppen..... 40
Abbildung 24: Ergebnisse des Osteocalcin-ELISAs; n = 3; ^a p = 0,01; ^b p = 0,42; ... 41

7.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: untersuchte Zellen..... 17

7.3 Abkürzungsverzeichnis

α -MEM	minimal essentielles Medium α
%	Prozent
°C	Grad Celsius
AMP	antimikrobielles Peptid
BHY	Plattenepithelkarzinomzellen
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
COX-1/-2	Cyclooxygenase-1/-2
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
EIA	enzymatisches Immunadsorptions-Assay
ELISA	Enzyme-linked-Immunsorbent-Assay
FBS	fötales Kälberserum
HBD	humanes β -Defensin
hCAP	human cationic antimicrobial peptide
HGEC	human gingival epithelial cells
HGF	humaner gingivaler Fibroblast
HNP	humanes neutrophiles Peptid
hPDLF	humane Parodontalligamentfibroblasten
hPDSC-htert	humane Parodontalligamentzelle - humane Telomerase reverse Transkriptase
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
kDa	Kilo-Dalton
LPS	Lipopolysaccharide
ml	Milliliter
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid

PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
pg	Pikogramm
PGE ₂	Prostaglandin E2
TNF- α	Tumor-Nekrose-Faktor α
U	Units
WST	water soluble tetrazolium salt/ wasserlösliches Tetrazolium Salz
α -MEM	minimal essentielles Medium α
μ M	micro-Molar

7.4 Rezepte

Zellmedium:

DMEM-Medium high Glucose (gibco/Life Technologies)

10% fötales Kälberserum (Sigma-Aldrich Chemie, München, Deutschland)

100 U/ml Penicillin G

100 μ g/ml Streptomycin)

α -MEM-Medium (gibco/Life Technologies)

10% fötales Kälberserum (Sigma-Aldrich Chemie, München, Deutschland)

100 U/ml Penicillin G

100 μ g/ml Streptomycin)

LL-37-Stammlösung (10 μ M)

Zur Herstellung 1500 μ l 10 μ M Stammlösung werden 1mg LL-37 in Trockenform in 1000 μ l steriles Reinstwasser. 68 μ l LL-37-Lösung werden mit 1432 μ l penicillinfreies und streptomycinfreie DMEM-Medium high Glucose vermengt.

8 Literaturverzeichnis

1. Andrei M, Dinischiotu A, Didilescu AC, Ionita D, Demetrescu I. Periodontal materials and cell biology for guided tissue and bone regeneration (2018). *Ann Anat* **216**: 164-169.
2. Ara T, Kurata K, Hirai K, Uchihashi T, Uematsu T, Imamura Y, Furusawa K, Kurihara S, Wang PL. Human gingival fibroblasts are critical in sustaining inflammation in periodontal disease (2009). *J Periodontal Res* **44**: 21-27.
3. Aydin S, Sahin F. Stem Cells Derived from Dental Tissues (2019). *Adv Exp Med Biol* **1144**: 123-132.
4. Baggiolini M, Walz A, Kunkel SL. Neutrophil-activating peptide-1/interleukin 8, a novel cytokine that activates neutrophils (1989). *J Clin Invest* **84**: 1045-1049.
5. Batoni G, Maisetta G, Brancatisano FL, Esin S, Campa M. Use of antimicrobial peptides against microbial biofilms: advantages and limits (2011). *Curr Med Chem* **18**: 256-279.
6. Bedran TB, Mayer MP, Spolidorio DP, Grenier D. Synergistic anti-inflammatory activity of the antimicrobial peptides human beta-defensin-3 (hBD-3) and cathelicidin (LL-37) in a three-dimensional co-culture model of gingival epithelial cells and fibroblasts (2014). *PLoS One* **9**: e106766.
7. Boink MA, Roffel S, Nazmi K, Bolscher JGM, Veerman ECI, Gibbs S. Saliva-Derived Host Defense Peptides Histatin1 and LL-37 Increase Secretion of Antimicrobial Skin and Oral Mucosa Chemokine CCL20 in an IL-1alpha-Independent Manner (2017). *J Immunol Res* **2017**: 3078194.
8. Boman HG. Peptide antibiotics and their role in innate immunity (1995). *Annual review of immunology* **13**: 61-92.
9. Bosshardt DD, Lang NP. The junctional epithelium: from health to disease (2005). *J Dent Res* **84**: 9-20.
10. Bosshardt DD, Selvig KA. Dental cementum: the dynamic tissue covering of the root (1997). *Periodontol 2000* **13**: 41-75.
11. Bourgeois D, Bouchard P, Mattout C. Epidemiology of periodontal status in dentate adults in France, 2002-2003 (2007). *J Periodontal Res* **42**: 219-227.
12. Brogden KA. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? (2005). *Nat Rev Micro* **3**: 238-250.
13. Bucki R, Leszczynska K, Namiot A, Sokolowski W. Cathelicidin LL-37: a multitask antimicrobial peptide (2010). *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* **58**: 15-25.

14. Cangiano A. Elder Care and Migrant Labor in Europe: A Demographic Outlook (2014). *Population and Development Review* **40**: 131-154.
15. Carretero M, Escámez MJ, García M, Duarte B, Holguín A, Retamosa L, Jorcano JL, Río MD, Larcher F. In vitro and in vivo wound healing-promoting activities of human cathelicidin LL-37 (2008). *J Invest Dermatol* **128**: 223-236.
16. Caton JG, Armitage G, Berglundh T, Chapple ILC, Jepsen S, Kornman KS, Mealey BL, Papapanou PN, Sanz M, Tonetti MS. A new classification scheme for periodontal and peri-implant diseases and conditions - Introduction and key changes from the 1999 classification (2018). *J Clin Periodontol* **45 Suppl 20**: S1-s8.
17. Cekici A, Kantarci A, Hasturk H, Van Dyke TE. Inflammatory and immune pathways in the pathogenesis of periodontal disease (2014). *Periodontol 2000* **64**: 57-80.
18. Cheng Q, Zeng K, Kang Q, Qian W, Zhang W, Gan Q, Xia W. The Antimicrobial Peptide LL-37 Promotes Migration and Odonto/Osteogenic Differentiation of Stem Cells from the Apical Papilla through the Akt/Wnt/ β -catenin Signaling Pathway (2020). *J Endod* **46**: 964-972.
19. Cho MI, Garant PR. Development and general structure of the periodontium (2000). *Periodontol 2000* **24**: 9-27.
20. Chotjumlong P, Bolscher JG, Nazmi K, Reutrakul V, Supanchart C, Buranaphatthana W, Krisanaprakornkit S. Involvement of the P2X7 purinergic receptor and c-Jun N-terminal and extracellular signal-regulated kinases in cyclooxygenase-2 and prostaglandin E2 induction by LL-37 (2013). *J Innate Immun* **5**: 72-83.
21. Chukkapalli SS, Lele TP. Periodontal cell mechanotransduction (2018). *Open Biol* **8**:
22. Clarke NG, Hirsch RS. Personal risk factors for generalized periodontitis (1995). *J Clin Periodontol* **22**: 136-145.
23. Czuszek CA, Sutherland DE, Billman MA, Stein SH. Prostaglandin E2 potentiates interleukin-1 beta induced interleukin-6 production by human gingival fibroblasts (1996). *J Clin Periodontol* **23**: 635-640.
24. Dale BA, Fredericks LP. Antimicrobial peptides in the oral environment: expression and function in health and disease (2005). *Curr Issues Mol Biol* **7**: 119-133.
25. Damgaard C, Holmstrup P, Van Dyke TE, Nielsen CH. The complement system and its role in the pathogenesis of periodontitis: current concepts (2015). *J Periodontal Res* **50**: 283-293.
26. Diamond G, Beckloff N, Ryan LK. Host defense peptides in the oral cavity and the lung: similarities and differences (2008). *Journal of dental research* **87**: 915-927.
27. Dinarello CA. Proinflammatory cytokines (2000). *Chest* **118**: 503-508.

28. Dinarello CA. Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family (2009). *Annu Rev Immunol* **27**: 519-550.
29. Docheva D, Padula D, Popov C, Weishaupt P, Pragert M, Miosge N, Hickel R, Bocker W, Clausen-Schaumann H, Schieker M. Establishment of immortalized periodontal ligament progenitor cell line and its behavioural analysis on smooth and rough titanium surface (2010). *Eur Cell Mater* **19**: 228-241.
30. Ducy P, Schinke T, Karsenty G. The osteoblast: a sophisticated fibroblast under central surveillance (2000). *Science* **289**: 1501-1504.
31. Ehlers S. Role of tumour necrosis factor (TNF) in host defence against tuberculosis: implications for immunotherapies targeting TNF (2003). *Ann Rheum Dis* **62 Suppl 2**: ii37-42.
32. Eke PI, Wei L, Borgnakke WS, Thornton-Evans G, Zhang X, Lu H, McGuire LC, Genco RJ. Periodontitis prevalence in adults \geq 65 years of age, in the USA (2016). *Periodontol 2000* **72**: 76-95.
33. Elssner A, Duncan M, Gavrilin M, Wewers MD. A novel P2X7 receptor activator, the human cathelicidin-derived peptide LL37, induces IL-1 beta processing and release (2004). *J Immunol* **172**: 4987-4994.
34. Filewod NC, Pistollic J, Hancock RE. Low concentrations of LL-37 alter IL-8 production by keratinocytes and bronchial epithelial cells in response to proinflammatory stimuli (2009). *FEMS Immunol Med Microbiol* **56**: 233-240.
35. Frohm Nilsson M, Sandstedt B, Sorensen O, Weber G, Borregaard N, Stahle-Backdahl M. The human cationic antimicrobial protein (hCAP18), a peptide antibiotic, is widely expressed in human squamous epithelia and colocalizes with interleukin-6 (1999). *Infect Immun* **67**: 2561-2566.
36. Funk CD. Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology (2001). *Science* **294**: 1871-1875.
37. Funk JF, Matziolis G, Krockner D, Perka C. [Promotion of bone healing through clinical application of autologous periosteum derived stem cells in a case of atrophic non-union] (2007). *Z Orthop Unfall* **145**: 790-794.
38. Ganz T. Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity (2003). *Nature Reviews Immunology* **3**: 710-720.
39. Garlet GP, Martins W, Jr., Ferreira BR, Milanezi CM, Silva JS. Patterns of chemokines and chemokine receptors expression in different forms of human periodontal disease (2003). *J Periodontal Res* **38**: 210-217.
40. Giles FJ, Miller CB, Hurd DD, Wingard JR, Fleming TR, Sonis ST, Bradford WZ, Pulliam JG, Anaissie EJ, Beveridge RA, Brunvand MM, Martin PJ. A phase III, randomized, double-blind, placebo-controlled, multinational trial of iseganan for the prevention of oral mucositis in patients receiving stomatotoxic chemotherapy (PROMPT-CT trial) (2003). *Leuk Lymphoma* **44**: 1165-1172.

41. Gorr SU, Abdolhosseini M. Antimicrobial peptides and periodontal disease (2011). *J Clin Periodontol* **38 Suppl 11**: 126-141.
42. Greer A, Zenobia C, Darveau RP. Defensins and LL-37: a review of function in the gingival epithelium (2013). *Periodontol 2000* **63**: 67-79.
43. Hajishengallis G, Darveau RP, Curtis MA. The keystone-pathogen hypothesis (2012). *Nat Rev Microbiol* **10**: 717-725.
44. Hans M, Madaan Hans V. Epithelial antimicrobial peptides: guardian of the oral cavity (2014). *Int J Pept* **2014**: 370297.
45. Heidari Z, Moudi B, Mahmoudzadeh-Sagheb H. Immunomodulatory factors gene polymorphisms in chronic periodontitis: an overview (2019). *BMC Oral Health* **19**: 29.
46. Heilborn JD, Nilsson MF, Kratz G, Weber G, Sørensen O, Borregaard N, Ståhle-Bäckdahl M. The cathelicidin anti-microbial peptide LL-37 is involved in re-epithelialization of human skin wounds and is lacking in chronic ulcer epithelium (2003). *J Invest Dermatol* **120**: 379-389.
47. Hellwig E, Klimek J, Attin T. Einführung in die Zahnerhaltung: Prüfungswissen Kariologie, Endodontologie und Parodontologie. 6. überarbeitete Auflage, 2013: Deutscher Zahnärzte Verlag, Köln.
48. Hoge J, Yan I, Janner N, Schumacher V, Chalaris A, Steinmetz OM, Engel DR, Scheller J, Rose-John S, Mittrucker HW. IL-6 controls the innate immune response against *Listeria monocytogenes* via classical IL-6 signaling (2013). *J Immunol* **190**: 703-711.
49. Hokema A, Scherger S. Working Pensioners in Germany and the UK: Quantitative and Qualitative Evidence on Gender, Marital Status, and the Reasons for Working (2016). *Journal of Population Ageing* **9**: 91-111.
50. Hosokawa I, Hosokawa Y, Komatsuzawa H, Goncalves RB, Karimbux N, Napimoga MH, Seki M, Ouhara K, Sugai M, Taubman MA, Kawai T. Innate immune peptide LL-37 displays distinct expression pattern from beta-defensins in inflamed gingival tissue (2006). *Clin Exp Immunol* **146**: 218-225.
51. Inomata M, Into T, Murakami Y. Suppressive effect of the antimicrobial peptide LL-37 on expression of IL-6, IL-8 and CXCL10 induced by *Porphyromonas gingivalis* cells and extracts in human gingival fibroblasts (2010). *Eur J Oral Sci* **118**: 574-581.
52. Inoue H, Takamori M, Shimoyama Y, Ishibashi H, Yamamoto S, Koshihara Y. Regulation by PGE₂ of the production of interleukin-6, macrophage colony stimulating factor, and vascular endothelial growth factor in human synovial fibroblasts (2002). *Br J Pharmacol* **136**: 287-295.
53. Into T, Inomata M, Shibata K, Murakami Y. Effect of the antimicrobial peptide LL-37 on Toll-like receptors 2-, 3- and 4-triggered expression of IL-6, IL-8 and CXCL10 in human gingival fibroblasts (2010). *Cell Immunol* **264**: 104-109.

54. Jiang N, Guo W, Chen M, Zheng Y, Zhou J, Kim SG, Embree MC, Songhee Song K, Marao HF, Mao JJ. Periodontal Ligament and Alveolar Bone in Health and Adaptation: Tooth Movement (2016). *Front Oral Biol* **18**: 1-8.
55. Jin L. An update on innate defense molecules of human gingiva (2011). *Periodontol 2000* **56**: 125-142.
56. Kim SH, Kim DH, Lavender P, Seo JH, Kim YS, Park JS, Kwak SJ, Jee YK. Repression of TNF-alpha-induced IL-8 expression by the glucocorticoid receptor-beta involves inhibition of histone H4 acetylation (2009). *Exp Mol Med* **41**: 297-306.
57. Koczulla R, von Degenfeld G, Kupatt C, Krotz F, Zahler S, Gloe T, Issbrucker K, Unterberger P, Zaiou M, Lebherz C, Karl A, Raake P, Pfosser A, Boekstegers P, Welsch U, Hiemstra PS, Vogelmeier C, Gallo RL, Clauss M, Bals R. An angiogenic role for the human peptide antibiotic LL-37/hCAP-18 (2003). *J Clin Invest* **111**: 1665-1672.
58. Konzelmann L, Bergmann M, Rattinger H. Demographic Change in Germany - its Political Consequences. 1, 2014: Nomos Verlagsgesellschaft mbH & Co. KG, Baden-Baden.
59. Kornman KS. Mapping the pathogenesis of periodontitis: a new look (2008). *J Periodontol* **79**: 1560-1568.
60. Lee AJ, Hodges S, Eastell R. Measurement of osteocalcin (2000). *Ann Clin Biochem* **37 (Pt 4)**: 432-446.
61. Li N, Yamasaki K, Saito R, Fukushi-Takahashi S, Shimada-Omori R, Asano M, Aiba S. Alarmin function of cathelicidin antimicrobial peptide LL37 through IL-36gamma induction in human epidermal keratinocytes (2014). *J Immunol* **193**: 5140-5148.
62. Lima HR, Gelani V, Fernandes AP, Gasparoto TH, Torres SA, Santos CF, Garlet GP, da Silva JS, Campanelli AP. The essential role of toll like receptor-4 in the control of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* infection in mice (2010). *J Clin Periodontol* **37**: 248-254.
63. Liu YC, Lerner UH, Teng YT. Cytokine responses against periodontal infection: protective and destructive roles (2010). *Periodontol 2000* **52**: 163-206.
64. Liu Z, Yuan X, Liu M, Fernandes G, Zhang Y, Yang S, Ionita CN, Yang S. Antimicrobial Peptide Combined with BMP2-Modified Mesenchymal Stem Cells Promotes Calvarial Repair in an Osteolytic Model (2018). *Mol Ther* **26**: 199-207.
65. Lumachi F, Orlando R, Fallo F, Basso SM. Relationship between bone formation markers bone alkaline phosphatase, osteocalcin and amino-terminal propeptide of type I collagen and bone mineral density in elderly men. Preliminary results (2012). *In Vivo* **26**: 1041-1044.
66. Mariotti A. The extracellular matrix of the periodontium: dynamic and interactive tissues (1993). *Periodontol 2000* **3**: 39-63.

67. Marr AK, Gooderham WJ, Hancock RE. Antibacterial peptides for therapeutic use: obstacles and realistic outlook (2006). *Curr Opin Pharmacol* **6**: 468-472.
68. Marsh PD. Microbial ecology of dental plaque and its significance in health and disease (1994). *Adv Dent Res* **8**: 263-271.
69. McCulloch CA, Nemeth E, Lowenberg B, Melcher AH. Paravascular cells in endosteal spaces of alveolar bone contribute to periodontal ligament cell populations (1987). *Anat Rec* **219**: 233-242.
70. Mergenthaler A, Sackreuther I, Micheel F, Büsch V, Deller J, Staudinger UM, Schneider NF. Übergänge, Lebenspläne und Potenziale der 55-bis 70-Jährigen
Zwischen individueller Vielfalt, kulturellem Wandel und sozialen Disparitäten. In: (Hrsg.). Lebenspläne und Potenziale älterer Menschen beim Übergang in den Ruhestand. 1, 2015: 15-46, Verlag Barbara Budrich,
71. Meuric V, Le Gall-David S, Boyer E, Acuna-Amador L, Martin B, Fong SB, Barloy-Hubler F, Bonnaure-Mallet M. Signature of Microbial Dysbiosis in Periodontitis (2017). *Appl Environ Microbiol* **83**:
72. Meyle J, Chapple I. Molecular aspects of the pathogenesis of periodontitis (2015). *Periodontol 2000* **69**: 7-17.
73. Micheelis W, Hoffmann T, Holtfreter B, Kocher T, Schroeder E. Zur epidemiologischen Einschätzung der Parodontitislast in Deutschland (2008). *Deutsche Zahnärztliche Zeitschrift* **63**: 464-472.
74. Micheelis W, Jordan AR. Fünfte Deutsche Mundgesundheitsstudie (DMS V) (2016). *Journal* 617.
75. Montreekachon P, Chotjumlong P, Bolscher JG, Nazmi K, Reutrakul V, Krisanaprakornkit S. Involvement of P2X(7) purinergic receptor and MEK1/2 in interleukin-8 up-regulation by LL-37 in human gingival fibroblasts (2011). *J Periodontal Res* **46**: 327-337.
76. Montreekachon P, Nongparn S, Sastraruji T, Khongkhunthian S, Chruewkamlow N, Kasinrerak W, Krisanaprakornkit S. Favorable interleukin-8 induction in human gingival epithelial cells by the antimicrobial peptide LL-37 (2014). *Asian Pac J Allergy Immunol* **32**: 251-260.
77. Mookherjee N, Brown KL, Bowdish DM, Doria S, Falsafi R, Hokamp K, Roche FM, Mu R, Doho GH, Pistolic J, Powers JP, Bryan J, Brinkman FS, Hancock RE. Modulation of the TLR-mediated inflammatory response by the endogenous human host defense peptide LL-37 (2006). *J Immunol* **176**: 2455-2464.
78. Mootoo A, Stylianou E, Arias MA, Reljic R. TNF-alpha in tuberculosis: a cytokine with a split personality (2009). *Inflamm Allergy Drug Targets* **8**: 53-62.
79. Mukaida N. Pathophysiological roles of interleukin-8/CXCL8 in pulmonary diseases (2003). *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **284**: L566-577.

80. Nagaoka I, Hirota S, Niyonsaba F, Hirata M, Adachi Y, Tamura H, Heumann D. Cathelicidin family of antibacterial peptides CAP18 and CAP11 inhibit the expression of TNF- α by blocking the binding of LPS to CD14(+) cells (2001). *J Immunol* **167**: 3329-3338.
81. Nagaoka I, Tamura H, Reich J. Therapeutic Potential of Cathelicidin Peptide LL-37, an Antimicrobial Agent, in a Murine Sepsis Model (2020). *Int J Mol Sci* **21**:
82. Namba S, Nakano R, Kitanaka T, Kitanaka N, Nakayama T, Sugiya H. ERK2 and JNK1 contribute to TNF- α -induced IL-8 expression in synovial fibroblasts (2017). *PLoS One* **12**: e0182923.
83. Nanci A, Bosshardt DD. Structure of periodontal tissues in health and disease (2006). *Periodontol 2000* **40**: 11-28.
84. Noguchi K, Shitashige M, Endo H, Kondo H, Ishikawa I. Binary regulation of interleukin (IL)-6 production by EP1 and EP2/EP4 subtypes of PGE2 receptors in IL-1 β -stimulated human gingival fibroblasts (2002). *J Periodontal Res* **37**: 29-36.
85. Nyvad B, Kilian M. Microbiology of the early colonization of human enamel and root surfaces in vivo (1987). *Scand J Dent Res* **95**: 369-380.
86. Oppenheim JJ, Yang D. Alarmins: chemotactic activators of immune responses (2005). *Current opinion in immunology* **17**: 359-365.
87. Oren Z, Shai Y. Selective lysis of bacteria but not mammalian cells by diastereomers of melittin: structure-function study (1997). *Biochemistry* **36**: 1826-1835.
88. Otto M. Bacterial sensing of antimicrobial peptides (2009). *Contrib Microbiol* **16**: 136-149.
89. 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 (2018). *J Clin Periodontol* **45 Suppl 20**: S162-s170.
90. Park JY, Pillinger MH, Abramson SB. Prostaglandin E2 synthesis and secretion: the role of PGE2 synthases (2006). *Clin Immunol* **119**: 229-240.
91. Pistolic J, Cosseau C, Li Y, Yu JJ, Filewod NC, Gellatly S, Rehaume LM, Bowdish DM, Hancock RE. Host defence peptide LL-37 induces IL-6 expression in human bronchial epithelial cells by activation of the NF- κ B signaling pathway (2009). *J Innate Immun* **1**: 254-267.
92. Puig-Silla M, Montiel-Company JM, Dasi-Fernandez F, Almerich-Silla JM. Prevalence of periodontal pathogens as predictor of the evolution of periodontal status (2017). *Odontology* **105**: 467-476.

93. Puklo M, Guentsch A, Hiemstra PS, Eick S, Potempa J. Analysis of neutrophil-derived antimicrobial peptides in gingival crevicular fluid suggests importance of cathelicidin LL-37 in the innate immune response against periodontogenic bacteria (2008). *Oral Microbiol Immunol* **23**: 328-335.
94. Qin X, Zhu G, Huang L, Zhang W, Huang Y, Xi X. LL-37 and its analog FF/CAP18 attenuate neutrophil migration in sepsis-induced acute lung injury (2019). *J Cell Biochem* **120**: 4863-4871.
95. Rateitschak Klaus RE, Wolf Herbert. Parodontologie. Farbatlanten der Zahnmedizin 1. . 3. Auflage, 2003: Thieme, Stuttgart.
96. Ricciotti E, FitzGerald GA. Prostaglandins and inflammation (2011). *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **31**: 986-1000.
97. Roberts WE, Wood HB, Chambers DW, Burk DT. Vascularly oriented differentiation gradient of osteoblast precursor cells in rat periodontal ligament: implications for osteoblast histogenesis and periodontal bone loss (1987). *J Periodontal Res* **22**: 461-467.
98. Rosier BT, Marsh PD, Mira A. Resilience of the Oral Microbiota in Health: Mechanisms That Prevent Dysbiosis (2018). *J Dent Res* **97**: 371-380.
99. Salvado MD, Di Gennaro A, Lindbom L, Agerberth B, Haeggström JZ. Cathelicidin LL-37 induces angiogenesis via PGE2-EP3 signaling in endothelial cells, in vivo inhibition by aspirin (2013). *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **33**: 1965-1972.
100. Sarir H, Mortaz E, Janse WT, Givi ME, Nijkamp FP, Folkerts G. IL-8 production by macrophages is synergistically enhanced when cigarette smoke is combined with TNF-alpha (2010). *Biochem Pharmacol* **79**: 698-705.
101. Saygin NE, Giannobile WV, Somerman MJ. Molecular and cell biology of cementum (2000). *Periodontol 2000* **24**: 73-98.
102. Scheller J, Chalaris A, Schmidt-Arras D, Rose-John S. The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6 (2011). *Biochim Biophys Acta* **1813**: 878-888.
103. Scott MG, Davidson DJ, Gold MR, Bowdish D, Hancock RE. The human antimicrobial peptide LL-37 is a multifunctional modulator of innate immune responses (2002). *J Immunol* **169**: 3883-3891.
104. Seibel MJ. Biochemical markers of bone turnover: part I: biochemistry and variability (2005). *Clin Biochem Rev* **26**: 97-122.
105. Sheiham A, Netuveli GS. Periodontal diseases in Europe (2002). *Periodontol 2000* **29**: 104-121.
106. Shen X, Al-Baadani MA, He H, Cai L, Wu Z, Yao L, Wu X, Wu S, Chen M, Zhang H, Liu J. Antibacterial and osteogenesis performances of LL37-loaded titania nanopores in vitro and in vivo (2019). *Int J Nanomedicine* **14**: 3043-3054.

107. Smith WL. The eicosanoids and their biochemical mechanisms of action (1989). *Biochem J* **259**: 315-324.
108. Smith WL. Prostanoid biosynthesis and mechanisms of action (1992). *Am J Physiol* **263**: F181-191.
109. Tilley SL, Coffman TM, Koller BH. Mixed messages: modulation of inflammation and immune responses by prostaglandins and thromboxanes (2001). *J Clin Invest* **108**: 15-23.
110. Ukai T, Yumoto H, Gibson FC, 3rd, Genco CA. Macrophage-elicited osteoclastogenesis in response to bacterial stimulation requires Toll-like receptor 2-dependent tumor necrosis factor- α production (2008). *Infect Immun* **76**: 812-819.
111. Van Dyke TE. Pro-resolving mediators in the regulation of periodontal disease (2017). *Mol Aspects Med* **58**: 21-36.
112. Van Dyke TE, Sheilesh D. Risk factors for periodontitis (2005). *J Int Acad Periodontol* **7**: 3-7.
113. Van Wetering S, Mannesse-Lazeroms SP, Van Sterkenburg MA, Daha MR, Dijkman JH, Hiemstra PS. Effect of defensins on interleukin-8 synthesis in airway epithelial cells (1997). *Am J Physiol* **272**: L888-896.
114. Wade WG. The oral microbiome in health and disease (2013). *Pharmacol Res* **69**: 137-143.
115. Wajant H, Pfizenmaier K, Scheurich P. Tumor necrosis factor signaling (2003). *Cell Death Differ* **10**: 45-65.
116. Weinberg A, Krisanaprakornkit S, Dale BA. Epithelial antimicrobial peptides: review and significance for oral applications (1998). *Crit Rev Oral Biol Med* **9**: 399-414.
117. Wimpenny J, Manz W, Szewzyk U. Heterogeneity in biofilms (2000). *FEMS Microbiol Rev* **24**: 661-671.
118. Wuerschling SN, Huth KC, Hickel R, Kollmuss M. Targeting antibiotic tolerance in anaerobic biofilms associated with oral diseases: Human antimicrobial peptides LL-37 and lactoferricin enhance the antibiotic efficacy of amoxicillin, clindamycin and metronidazole (2021). *Anaerobe* **71**: 102439.
119. Yang D, Biragyn A, Hoover DM, Lubkowski J, Oppenheim JJ. Multiple roles of antimicrobial defensins, cathelicidins, and eosinophil-derived neurotoxin in host defense (2004). *Annu Rev Immunol* **22**: 181-215.
120. Yang D, Chertov O, Oppenheim JJ. Participation of mammalian defensins and cathelicidins in anti-microbial immunity: receptors and activities of human defensins and cathelicidin (LL-37) (2001). *J Leukoc Biol* **69**: 691-697.
121. Yeung AT, Gellatly SL, Hancock RE. Multifunctional cationic host defence peptides and their clinical applications (2011). *Cell Mol Life Sci* **68**: 2161-2176.

122. Yoshioka M, Fukuishi N, Kubo Y, Yamanobe H, Ohsaki K, Kawasoe Y, Murata M, Ishizumi A, Nishii Y, Matsui N, Akagi M. Human cathelicidin CAP18/LL-37 changes mast cell function toward innate immunity (2008). *Biol Pharm Bull* **31**: 212-216.
123. Zasloff M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms (2002). *Nature* **415**: 389-395.
124. Zhang Z, Shively JE. Generation of novel bone forming cells (monoosteophils) from the cathelicidin-derived peptide LL-37 treated monocytes (2010). *PLoS One* **5**: e13985.
125. Zharkova MS, Orlov DS, Golubeva OY, Chakchir OB, Eliseev IE, Grinchuk TM, Shamova OV. Application of Antimicrobial Peptides of the Innate Immune System in Combination With Conventional Antibiotics-A Novel Way to Combat Antibiotic Resistance? (2019). *Front Cell Infect Microbiol* **9**: 128.
126. Zijngel V, Ammann T, Thurnheer T, Gmur R. Subgingival biofilm structure (2012). *Front Oral Biol* **15**: 1-16.
127. Zijngel V, van Leeuwen MB, Degener JE, Abbas F, Thurnheer T, Gmur R, Harmsen HJ. Oral biofilm architecture on natural teeth (2010). *PLoS One* **5**: e9321.
128. Zuyderduyn S, Ninaber DK, Hiemstra PS, Rabe KF. The antimicrobial peptide LL-37 enhances IL-8 release by human airway smooth muscle cells (2006). *J Allergy Clin Immunol* **117**: 1328-1335.

10 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei Allen bedanken, die mich bei der Erstellung dieser wissenschaftlichen Arbeit begleitet und unterstützt haben.

Zu Beginn möchte ich mich herzlich bei meiner Doktormutter Frau Prof. Dr. Karin Christine Huth für die Überlassung des Themas und Bereitstellen der nötigen Mittel, welche mir die reibungslose Durchführung dieser Arbeit ermöglichten, bedanken.

Zudem bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. Reinhard Hickel, Direktor der Poliklinik für Zahnerhaltung und Parodontologie, dass ich diese Arbeit an seiner Einrichtung durchführen durfte.

Ganz besonderem Dank gilt Herrn Dr. Maximilian Kollmuß für seine höchst engagierte und ausgezeichnete Betreuung. Er begleitete mich während des gesamten Prozesses mit höchster Kompetenz, Engagement und Geduld. Vielen Dank für die Anregungen, produktiven Gespräche und enorme Unterstützung bei der Umsetzung der Arbeit.

Von Herzen möchte ich mich bei meinen Eltern und meiner Schwester bedanken, die mir mit Liebe und uneingeschränktem Halt bereits mein ganzes Leben zu Seite stehen. Zu guter Letzt bedanke ich mich bei meinem Partner Nils für die seelische und moralische Unterstützung.

Eidesstattliche Versicherung

Keller, Pamela

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

**„Untersuchung des Einflusses von des antimikrobiellen Peptids LL37 auf orale
Zellen *in vitro*: Toxizitätsanalysen, Entzündungskaskade und mögliches
regeneratives Potential“**

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

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

München, 24.10.2023

Pamela Keller