

Aus dem Institut für Biochemie  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Etablierung eines inflammatorischen humanen  
3D-Schleimhautäquivalents für präklinische  
Untersuchungen entzündlicher Erkrankungen  
der Mundschleimhaut**

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae dentariae (Dr. med. dent.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Kim Natalie Stolte

aus Salzgitter

Datum der Promotion: 18.12.2020

## **Vorwort**

Teilergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden zur Veröffentlichung eingereicht bei: Clinical Oral Investigations, 2020; Tissue Barriers, 2020.

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abbildungsverzeichnis</b> .....	<b>IV</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b> .....	<b>V</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>VI</b>
<b>1. Abstract</b> .....	<b>1</b>
<b>2. Einleitung</b> .....	<b>4</b>
2.1 Parodontitis .....	4
2.1.1 Epidemiologie der Parodontitis .....	4
2.1.2 Ätiologie und Pathogenese der Parodontitis .....	4
2.1.3 Schlüsselzytokine der Parodontitis .....	5
2.1.4 Ansätze zur Therapie der Parodontitis.....	6
2.2 Nanomedizin als Therapieansatz zur Behandlung entzündlicher Mundschleimhauterkrankungen ..8	
2.2.1 Nanomedizinische Konzepte zur topischen Applikation .....	8
2.2.2 Core-Multishell (CMS)-Nanocarrier.....	9
2.3 <i>In vitro</i> -Rekonstruktionen der Gingiva.....	10
2.3.1 Aufbau der Gingiva .....	11
2.3.2 Zytokeratine und Differenzierungsmarker der humanen Gingiva .....	11
2.3.3 Physikalische Barrierefunktionen der Gingiva .....	12
2.3.4 Humane gingivale Modellsysteme zur Untersuchung pathologischer Prozesse der Gingiva ..14	
2.4 Ziel der Arbeit.....	16
<b>3 Material und Methoden</b> .....	<b>17</b>
3.1 Material .....	17
3.1.1 Kulturzellen und Gewebe .....	17
3.1.2 Geräte .....	17
3.1.3 Verbrauchsmaterialien .....	18
3.1.4 Chemikalien und Reagenzien .....	20
3.1.5 Medien, Lösungen, Zusätze und Puffer .....	22
3.1.6 Antikörper.....	23
3.1.7 Stimulanzien und Arbeitskonzentrationen.....	23
3.1.8 Kits .....	24
3.1.9 Softwares .....	24
3.2 Methoden .....	24
3.2.1 Zellbiologische Methoden .....	24
3.2.2 Biochemische Methoden.....	36
3.2.3 Statistische Analyse .....	40

<b>4. Ergebnisse</b> .....	<b>41</b>
4.1 Charakterisierung gingivaler Epithelzellen .....	41
4.1.1 Morphologische Charakterisierung .....	41
4.1.2 Untersuchung der gingivalen physikalischen Barriere <i>in vitro</i> .....	43
4.2 Etablierung humaner gingivaler 3D-Modelle .....	44
4.2.1 Charakterisierung von Differenzierungsmarkern der gesunden humanen Gingiva .....	44
4.2.2 Etablierung epithelialer gingivaler 3D-Modelle.....	45
4.2.3 Etablierung organotypischer gingivaler 3D-Schleimhautäquivalente .....	48
4.3 Einfluss proinflammatorischer Zytokine auf gingivale Keratinozyten .....	49
4.3.1 Einfluss proinflammatorischer Zytokine auf Proliferation und metabolische Aktivität .....	49
4.3.2 Einfluss von IL-1 $\beta$ auf die Zell-Morphologie .....	50
4.3.3 Einfluss von IL-1 $\beta$ auf die Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen.....	51
4.3.4 Einfluss von IL-1 $\beta$ auf gingivale Barriereeigenschaften .....	53
4.4 Etablierung inflammatorischer humaner gingivaler 3D-Modelle.....	57
4.4.1 Induktion einer Entzündung in epithelialen gingivalen 3D-Modellen.....	57
4.4.2 Induktion einer Entzündung in organotypischen 3D-Schleimhautäquivalenten .....	59
4.5 Einfluss des Nanocarriers CMS 10-E-15-350 auf gingivale Keratinozyten .....	61
4.5.1 Einfluss des CMS-Nanocarriers auf Proliferation und metabolische Aktivität.....	61
4.5.2 Einfluss des CMS-Nanocarriers auf die Zell-Morphologie .....	62
4.5.3 Einfluss des CMS-Nanocarriers auf die Sekretion proinflammatorischer Zytokine.....	63
4.5.4 Einfluss des CMS-Nanocarriers auf gingivale Barriereeigenschaften .....	64
4.5.5 Penetration des CMS-Nanocarriers in organotypische gingivale Schleimhautäquivalente ..	65
<b>5. Diskussion</b> .....	<b>67</b>
5.1 Morphologische und funktionelle Kongruenz h-TERT-immortalisierter und primärer gingivaler Keratinozyten .....	67
5.2 IL-1 $\beta$ induziert eine Entzündung in gingivalen Keratinozyten .....	68
5.3 IL-1 $\beta$ verstärkt die physikalische Barriere gingivaler Keratinozyten.....	70
5.4 Etablierung inflammatorischer humaner gingivaler 3D-Modelle.....	73
5.4.1 Etablierung humaner gingivaler epithelialer 3D-Modelle .....	74
5.4.2 Etablierung humaner organotypischer gingivaler Schleimhautäquivalente .....	75
5.4.3 Gingivale 3D-Modelle repräsentieren morphologisch die native Gingiva .....	76
5.4.4 Gingivale 3D-Modelle zeigen inflammatorische Antwort auf IL-1 $\beta$ .....	77
5.5 CMS-Nanocarrier als therapeutischer Ansatz zur Behandlung entzündlicher Mundschleimhauterkrankungen .....	79
5.5.1 Anwendung von Nanomedizin zur Behandlung der Parodontitis.....	79
5.5.2 CMS 10-E-15-350 zeichnet sich durch hohe Biokompatibilität aus .....	81
5.5.3 CMS-Nanocarrier werden durch gingivale Keratinozyten aufgenommen .....	82
5.6 Ausblick.....	84
5.6.1 Weiterentwicklung gingivaler 3D-Modelle .....	84

5.6.2 Forschung zu Barriereeigenschaften der Gingiva.....	85
5.6.3 CMS-Nanocarrier als Träger-Systeme für antiinflammatorische Wirkstoffe .....	85
<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>87</b>
<b>Appendix .....</b>	<b>97</b>
<b>Eidesstattliche Versicherung .....</b>	<b>103</b>
<b>Lebenslauf .....</b>	<b>104</b>
<b>Publikationsliste.....</b>	<b>105</b>
<b>Danksagung.....</b>	<b>106</b>

## Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Aufbau des CMS-Nanocarriers und Darstellung der topischen Applikation .....	9
Abb. 2: Strukturproteine an mastikatorischer und auskleidender Mundschleimhaut .....	12
Abb. 3: Ultrastruktur von Tight Junctions .....	13
Abb. 4: Messung des transepithelialen elektrischen Widerstands .....	29
Abb. 5: Histologische und immunfluoreszenzanalytische Charakterisierung gingivaler Zellen..	42
Abb. 6: Bestimmung des TEER über die Zeit an GEC und OKG4-Zellen.....	44
Abb. 7: Histologische und immunfluoreszenzanalytische Charakterisierung der Gingiva .....	46
Abb. 8: Differenzierungsmarker werden Stratum-spezifisch in epithelialen gingivalen 3D- Modellen exprimiert .....	47
Abb. 9: Differenzierungsmarker werden Stratum-spezifisch in organotypischen gingivalen 3D- Schleimhautäquivalenten exprimiert .....	48
Abb. 10: IL-1 $\beta$ beeinflusst nicht Zellmasse und metabolische Aktivität gingivaler Keratinozyten .....	50
Abb. 11: IL-1 $\beta$ beeinflusst nicht die Zellmorphologie gingivaler Keratinozyten .....	51
Abb. 12: IL-1 $\beta$ induziert eine Entzündungsreaktion in gingivalen Keratinozyten .....	52
Abb. 13: IL-1 $\beta$ führt zu einer Zunahme des TEER gingivaler Keratinozyten.....	53
Abb. 14: Expression von TJ-Proteinen in humaner adulter Gingiva .....	54
Abb. 15: IL-1 $\beta$ verstärkt die Bildung von TJ-Strängen in gingivalen Keratinozyten .....	55
Abb. 16: IL-1 $\beta$ verstärkt die Expression ausgewählter TJ-Proteine gingivaler Keratinozyten....	56
Abb. 17: Histologische und immunfluoreszenzanalytische Charakterisierung eines inflammatorischen gingivalen epithelialen 3D-Modells .....	58
Abb. 18: Immunologische, histologische und immunfluoreszenzanalytische Charakterisierung inflammatorischer organotypischer gingivaler 3D-Schleimhautäquivalente .....	60
Abb. 19: Einfluss des CMS-Nanocarriers auf die metabolische Aktivität, Zellmasse und Morphologie gingivaler Keratinozyten .....	62
Abb. 20: Zeitabhängige Sekretion proinflammatorischer Zytokine unter CMS-Gabe .....	64
Abb. 21: Einfluss des CMS-Nanocarriers auf die physikalische Barriere gingivaler Zellen .....	65
Abb. 22: Penetration des CMS-Nanocarriers in das Epithel organotypischer gingivaler Schleimhautäquivalente .....	66
Appendix Abb. I: WGA-Fluoreszenz gingivaler Zellen unter Kontroll- und IL-1 $\beta$ -Bedingungen .	99
Appendix Abb. II: Immunfluoreszenzanalyse von TJ-Proteinen in OKG4-Zellen.....	100
Appendix Abb. III: Perinukleäre Akkumulation des CMS-Nanocarriers in gingivalen Zellen....	102

## Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Ablauf der Paraffineinbettung und Reagenzien für die Histologie .....	32
Tab. 2: Immunfluoreszenz an Paraffinschnitten .....	34
Tab. 3: Permeabilisierungs- und Blockierungslösungen für die Immunfluoreszenz.....	34
Tab. 4: Primärantikörper.....	35
Tab. 5: Sekundärantikörper und weitere Fluoreszenz-gekoppelte Substanzen.....	35
Tab. 6: Lösungen für die Western Blot-Analyse.....	38
Tab. 7: Lokalisation von TJ-Proteinen in humaner Gingiva .....	73
Appendix Tab. I: Verdünnungen, Volumina und Inkubationszeiten für den ELISA .....	97
Appendix Tab. II: Zytokinbindungen einer Human Cytokine Antibody Array-Membran .....	97
Appendix Tab. III: SRB-Assay, Auflistung der Daten .....	98
Appendix Tab. IV: SRB-Assay, p-Werte.....	98
Appendix Tab. V: MTT-Assay, Auflistung der Daten.....	98
Appendix Tab. VI: MTT-Assay, p-Werte.....	98
Appendix Tab. VII: Human Antibody Cytokine Array, p-Werte.....	99
Appendix Tab. VIII: ELISA-Versuch an OKG4-Monolayern, Auflistung der Daten .....	100
Appendix Tab. IX: ELISA-Versuch an OKG4-Monolayern, p-Werte .....	100
Appendix Tab. X: Western Blot-Analyse bei IL-1 $\beta$ -Stimulation, Auflistung der Daten .....	101
Appendix Tab. XI: Western Blot-Analyse bei IL-1 $\beta$ -Stimulation, p-Werte .....	101
Appendix Tab. XII: Analyse epithelialer 3D-Modelle .....	101
Appendix Tab. XIII: ELISA-Versuch am 3D-Modell, Auflistung der Daten .....	101
Appendix Tab. XIV: ELISA-Versuch am 3D-Modell, p-Werte .....	102
Appendix Tab. XV: Western Blot-Analyse bei CMS-Stimulation, Auflistung der Daten .....	102
Appendix Tab. XVI: Western Blot-Analyse bei CMS-Stimulation, p-Werte .....	102

## Abkürzungsverzeichnis

<i>Abkürzung</i>	<i>Bedeutung</i>
A	Ampere
AB	Amphotericin B
AK	Antikörper
APS	Ammoniumperoxodisulfat
Aq. dest.	Aqua destillata
BSA	bovine serum albumin, Rinderserumalbumin
CLDN	Claudin
CLSM	confocal laser scanning microscope
CMS	Core-multishell nanocarrier
DAMP	Damage-associated molecular pattern
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
FCS	Fetal calf serum, fetales Kälberserum
GEC	Gingival Epithelial Cells (primäre Keratinozyten)
Glc	Glucose
GS	Goat serum, Ziegenserum
HE	Hämatoxylin-Eosin
HGF	Humane gingivale Fibroblasten (primäre Fibroblasten)
HRP	horseradish peroxidase
hTERT	human telomerase reverse transcriptase
ICC	Indocarbocyanin
IF	Immunfluoreszenz
IHGF	Immortalized human gingival fibroblasts (immortalisierte Fibroblasten)
IL	Interleukin
JAM	Junctional Adhesion Molecule
KRT	Keratin
LPS	Lipopolysaccharid
M-CSF	Macrophagen-Kolonie stimulierender Faktor
MARVEL	myelin and lymphocyte and related protein for vesicle trafficking and membrane link



MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
NEA	Nicht essenzielle Aminosäuren
NFDM	nonfat dry milk, Magermilchpulver
OCLN	Occludin
OKG4	Oral keratinocytes of the gingiva (immortalisierte Keratinozyten)
P/S	Penicillin/ Streptomycin
PAGE	Polyacrylamidgel-Elektrophorese
PBS	Phosphate-buffered saline, phosphatgepufferte Salzlösung ohne Ca <sup>2+</sup> & Mg <sup>2+</sup>
PBS <sup>+/+</sup>	Phosphate-buffered saline, phosphatgepufferte Salzlösung mit 1 mM Ca <sup>2+</sup> & 0,5 mM Mg <sup>2+</sup>
PFA	Paraformaldehyd
rpm	revolutions per minute, Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodium dodecyl sulfate, Natriumdodecylsulfat
SRB	Sulforhodamin B
TAMP	tight junction-associated MARVEL proteins
TBS	Tris-buffered saline
TEER	Transepithelialer elektrischer Widerstand
TEMED	N,N,N',N'- Tetramethylethan-1,2-diamin
TIMP	Tissue inhibitor of metalloproteinases
TJ	Tight Junction(s), <i>Zonula occludens</i>
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
TNF	Tumornekrosefaktor
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Tween <sup>®</sup> 20	Polyoxyethylensorbitanmonolaurat
V	Volt
WB	Western Blot
ZO	Zonula occludens
Ω	Ohm

# 1. Abstract

## Zusammenfassung

Parodontitis ist eine bakteriell induzierte entzündliche Erkrankung des Zahnhalteapparates, von der über die Hälfte der Menschheit weltweit betroffen ist. Das mehrschichtige keratinisierte Epithel der Gingiva, der kontinuierliche Speichelfluss und die Sulkusflüssigkeit stellen jedoch nicht nur eine Barriere für externe Pathogene, sondern ebenfalls für topische Wirkstoffe dar. Core-Multishell (CMS)-Nanocarrier könnten diese Barrieren überwinden, da diese polymeren Konstrukte mit bereits etablierten Wirkstoffen beladen werden und die Adhäsion an bzw. Penetration in die Mundschleimhaut erhöhen können. Die Verfügbarkeit humaner gingivaler Biopsien für diesbezügliche Versuche ist jedoch limitiert. Daher besteht der Bedarf nach einem reproduzierbaren System, das der *in vivo*-Situation der humanen Gingiva möglichst nahekommt. Das Ziel dieser Arbeit war deshalb die Etablierung inflammatorischer gingivaler 3D-Modelle zur Analyse pathologischer Prozesse der Mundschleimhaut und zur Bewertung potenzieller antiinflammatorischer Therapeutika.

Epitheliale Modelle wurden aus immortalisierten (OKG4) und primären gingivalen Keratinozyten (GEC) kultiviert und mittels Immunfluoreszenz (IF) untersucht. Organotypische Schleimhautäquivalente wurden durch die zusätzliche Applikation immortalisierter Fibroblasten in ein Kollagengel etabliert. Proinflammatorische Mediatoren wurden mittels SRB- und MTT-Assay an gingivalen Keratinozyten getestet. Mittels Cytokine-Array und ELISA wurde deren Zytokinsekretion unter Gabe des Parodontitis-assoziierten Zytokins IL-1 $\beta$  untersucht. Der Einfluss von IL-1 $\beta$  auf gingivale Barriereigenschaften wurde durch Messung des transepithelialen elektrischen Widerstands (TEER), IF-Analyse von Tight Junction (TJ)-Proteinen und Quantifizierung ihrer Expression mittels Western Blot untersucht. IL-1 $\beta$ -stimulierte Schleimhautäquivalente wurden hinsichtlich Morphologie und Zytokinsekretion durch IF und ELISA beurteilt. Auswirkungen des Nanocarriers CMS 10-E-15-350 auf gingivale Keratinozyten wurden mittels SRB- und MTT-Assay, sowie ELISA und WGA-Fluoreszenz untersucht. Unter CMS-Gabe wurde der TEER gemessen und die TJ-Proteinexpression mittels Western Blot bestimmt. Indocarbocyanin-gekoppelter CMS-Nanocarrier wurde auf gingivale Schleimhautäquivalente appliziert und die Penetrationsfähigkeit mittels Fluoreszenzmikroskopie analysiert.

IL-1 $\beta$  hatte keinen Einfluss auf Zellmasse, metabolische Aktivität und Morphologie gingivaler Keratinozyten. Jedoch zeigte sich eine zeitabhängige Hochregulation der proinflammatorischen Zytokine IL-6 und IL-8. IL-1 $\beta$  führte weiterhin zu einer Verstärkung der gingivalen Barriere.

Die etablierten Modelle waren der humanen Gingiva im morphologischen Aufbau und Differenzierungsgrad sehr ähnlich. Organotypische Schleimhautäquivalente zeigten eine messbare inflammatorische Reaktion nach IL-1 $\beta$ -Gabe. Der Nanocarrier CMS 10-E-15-350 wies eine sehr gute Biokompatibilität auf und konnte bereits nach fünf Minuten im Epithel organotypischer Schleimhautäquivalente detektiert werden.

Gingivale dreidimensionale *in vitro*-aufgebaute Modelle können die native Gingiva nachahmen, reproduzierbar aufgebaut werden und zugleich Versuche am Tier vermeiden. Diese organotypischen Schleimhautäquivalente eignen sich daher zur Beantwortung grundlagenmedizinischer Fragestellungen, ermöglichen ein besseres Verständnis von Krankheitsprozessen und können für die Testung neuer Therapieansätze zur Behandlung entzündlicher Mundschleimhauterkrankungen herangezogen werden. CMS-Nanocarrier scheinen in diesem Zusammenhang ein vielversprechender Ansatz zu sein.

## Summary

Periodontitis is a bacterial-induced inflammatory disease of the periodontium that affects more than half of the worldwide population. The gingival multi-layered keratinized epithelium, continuous salivary flow and gingival crevicular fluid not only represent a barrier for external pathogens, but also for topical agents. Core-Multishell (CMS) nanocarriers may be an option to overcome these barriers, as they can be loaded with well-established compounds and can increase adhesion to/ penetration into oral mucosa. Since availability of human gingival biopsies is limited, there is a need for reproducible models that mimic the *in vivo* situation of human gingiva. Therefore, the aim of this work was to establish inflammatory gingival models for the analysis of pathological processes of oral mucosa and evaluation of potential therapeutics.

Epithelial models were constructed from immortalized (OKG4) and primary gingival keratinocytes (GEC) and investigated by immunofluorescence analysis. Organotypic mucosal equivalents (OME) were established by additional integration of immortalized fibroblasts. Proinflammatory mediators were tested on keratinocytes using SRB and MTT assays. Cytokine arrays and ELISA were performed to examine their cytokine secretion using periodontitis-associated cytokine IL-1 $\beta$ . The influence of IL-1 $\beta$  on gingival barrier properties was assessed by measuring transepithelial electrical resistance (TEER), immunofluorescence analysis of tight junction (TJ) proteins and quantification of their expression by Western blot method. Morphology and cytokine secretion of IL-1 $\beta$ -stimulated OME were evaluated using immunofluorescence analysis and ELISA. Effects of CMS nanocarrier 10-E-15-350 on keratinocytes were analyzed by SRB and MTT assay, ELISA and WGA fluorescence analysis. In the presence of CMS, TEER was measured and TJ protein

expression was analyzed using Western blot analysis. Penetration of indocarbocyanin-coupled nanocarriers into OME was determined by fluorescence microscopy.

IL-1 $\beta$  showed no influence on cell mass, metabolic activity, and morphology of gingival keratinocytes. However, a time-dependent upregulation of IL-6 and IL-8 was observed. IL-1 $\beta$  further led to a strengthening of the gingival barrier. The established OME were very similar to human gingiva in morphological structure and degree of differentiation. They showed measurable inflammatory responses after IL-1 $\beta$  administration. CMS 10-E-15-350 showed high biocompatibility and could be detected after five minutes in OME epithelium.

Gingival models can mimic native gingiva, be reproducibly constructed, and help to avoid animal experiments. They are therefore suitable for addressing fundamental medical issues, enabling a better understanding of disease processes and evaluating innovative therapeutic approaches for the treatment of inflammatory oral mucosal diseases. CMS nanocarriers seem to be a promising approach in this context.

## **2. Einleitung**

### **2.1 Parodontitis**

#### **2.1.1 Epidemiologie der Parodontitis**

Parodontitis ist eine bakteriell induzierte entzündliche Erkrankung des Zahnhalteapparates, die zur Zerstörung des zahntragenden Gewebes führt und unbehandelt im Zahnverlust resultiert (Page & Kornman, 1997; Petersen & Ogawa, 2012; Preshaw, 2018). Nach der aktuellen fünften deutschen Mundgesundheitsstudie (DMS V) leiden über die Hälfte der jüngeren Erwachsenen zwischen 35 und 44 Jahren an Parodontitis, 43,3 % weisen hierbei eine moderate und 8,2 % eine schwere Form der Parodontitis (severe periodontitis, SP) auf. Menschen über 75 Jahren haben in neun von zehn Fällen eine Parodontitis, davon zu 44,3 % in schwerer Form (Jordan & Micheelis, 2016). Nach epidemiologischen Daten der Studie »Global Burden of Disease« war SP im Jahr 2010 die sechsthäufigste Krankheit der Welt und betraf 743 Millionen Menschen weltweit (Kassebaum et al., 2014). Unbehandelt ist sie mit erhöhten systemischen Entzündungsreaktionen und mit einem erhöhten Risiko für atherosklerotische Herz-Kreislauf-Erkrankungen wie Myokardinfarkt, Schlaganfall und periphere arterielle Erkrankungen verbunden (Tonetti et al., 2013). Die Prävalenz der Parodontitis nimmt mit dem Alter zu, daher ist, insbesondere unter Berücksichtigung des demographischen Wandels und des Trends des zunehmenden Zahnerhaltes im Alter, eine Verstärkung der Belastungen durch Parodontitis anzunehmen (Jepsen et al., 2017; Jordan & Micheelis, 2016; Kassebaum et al., 2014; Tonetti et al., 2017).

#### **2.1.2 Ätiologie und Pathogenese der Parodontitis**

Über viele Jahrzehnte wurde Parodontitis als Infektionserkrankung betrachtet. In der gesunden Mundhöhle existiert auf der Zahnoberfläche ein Biofilm, der in symbiotischer Beziehung mit Reaktionen des Wirtes besteht. Wird dieser Biofilm allerdings nicht regelmäßig beseitigt, akkumulieren Mikroorganismen. Dies führt zu einer veränderten Sauerstoffkonzentration innerhalb des Biofilms. Durch diese Bedingungen bevorzugte Mikroorganismen sind in der Lage, Antigene und Bakterienbestandteile wie LPS freizusetzen und ihre pathogen-assoziierten molekularen Muster (PAMPs) können von speziellen Rezeptoren wie den Toll-like-Rezeptoren (TLRs) auf residenten Zellen als fremd erkannt werden (Meyle & Chapple, 2015). Dies führt zur Aktivierung einer Entzündungskaskade, die sich in einer Aktivierung von Mastzellen und der Freisetzung vasodilatativer Substanzen manifestiert. Polymorphkerniger Granulozyten (PMNs)

können in das permeablere Gewebe einwandern und lysosomaler Enzyme freisetzen. Bis zu diesem Punkt ist der Alveolarknochen intakt und der Gewebsschaden reversibel, sodass eine vollkommene Resolution möglich ist (Tawfig, 2016).

In den letzten Jahren gab es allerdings einen Paradigmenwechsel, bei dem die Rolle der Bakterien zugunsten des Entzündungsprozesses und der Wirtsantwort in den Hintergrund trat. Parodontitis wird daher als Entzündung betrachtet, die initial durch subgingivale Mikroorganismen initiiert wird, bei der jedoch die entzündliche Wirtsantwort für den Gewebeverlust verantwortlich ist (Preshaw, 2018). Übereinstimmend legt ein aktuelles Modell von Meyle und Chapple nahe, dass ein pathogener Biofilm nicht ausreicht, um die Krankheit auszulösen, sondern dass sie aus einer komplexen Wechselwirkung zwischen Biofilm und der entzündlichen Immunantwort resultiert (Meyle & Chapple, 2015). Anfällige Patienten reagieren auf eine beginnende Dysbiose mit einer überproportionalen Immunreaktion, die durch Produktion überschüssiger Zytokine, reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) und Matrix-Metallo-Proteinase (MMPs) gekennzeichnet ist, die die individuellen Schutzmechanismen (Antioxidantien, TIMPs) bezwingen (Hajishengallis et al., 2012; Meyle & Chapple, 2015). Die Monozyten/Makrophagen-Vorläufer differenzieren unter der Regulation durch M-CSF, RANKL und weiteren Signalmolekülen zu Osteoklasten, die den Alveolarknochen degradieren können (Meyle & Chapple, 2015; Tawfig, 2016). Dies führt zur Gewebeschädigung und irreversiblen Knochenverlust. Es wird geschätzt, dass 80 % des parodontalen Gewebeschadens auf eine unangemessene Reaktion des Wirts auf pathogene Bakterien zurückzuführen ist (Scully, 2017). Die Entzündung geht mit einer erhöhten Blutungstendenz einher und die Minderung der Befestigung des Zahnes in der Alveole durch Weichgewebs- und Knochenschwund (Attachmentverlust) führt zur Zahnlockerung und schließlich zum Zahnverlust (Petersen & Ogawa, 2012).

### **2.1.3 Schlüsselzytokine der Parodontitis**

An inflammatorischen Ereignissen im Rahmen der Parodontitis sind sowohl zelluläre als auch humorale Faktoren der angeborenen und adaptiven Immunantwort beteiligt (Yucel-Lindberg & Båge, 2013). Die Wirtsantwort initiiert die Rekrutierung von Leukozyten und die Freisetzung inflammatorischer Mediatoren und Zytokine. Zytokine sind Signalmoleküle, die Zellproliferation und -differenzierung von Zielzellen, die Immunantwort, aber auch die Gewebemöostase regulieren (Okada & Murakami, 1998; Tawfig, 2016).

Im Rahmen der Parodontitis gelten die klassischen proinflammatorische Zytokine IL-1, -6, -8 und TNF $\alpha$  als entscheidende pathologische Faktoren, die nicht nur von immunkompetenten Zellen,

Endothelzellen, Osteoblasten und Fibroblasten, sondern auch von oralen Keratinozyten synthetisiert werden (Andrian et al., 2004; Meyle & Chapple, 2015). Diese Zytokine zeigten sich in bisherigen Studien in der Sulkusflüssigkeit parodontal erkrankter Regionen bzw. Patienten erhöht im Vergleich zu gesunden Regionen bzw. Patienten (Ertugrul et al., 2013; Lagdive et al., 2013; Reinhardt et al., 1993; Thunell et al., 2010). Nach Parodontalthherapie waren diese Parameter reduziert (Masada et al., 1990; Thunell et al., 2010, 2010). IL-1 $\beta$  wird aufgrund der erhöhten Expression bei Parodontitis und aufgrund der Funktion als endogenem Pyrogen und Entzündungsmediator als Marker für Parodontitis angesehen (Dinarello, 1985; Hönig et al., 1989; Masada et al., 1990; McDevitt et al., 2000; Okada & Murakami, 1998; Stashenko et al., 1991).

## **2.1.4 Ansätze zur Therapie der Parodontitis**

### **2.1.4.1 Antimikrobielle Maßnahmen**

Die Behandlung der Parodontitis ist eine lebenslange Therapie, die auf die Resolution der Entzündung, gekennzeichnet durch einen reduzierten Blutungsindex und verminderte Taschentiefen, abzielt (Preshaw, 2018). Der derzeitige Stand der Parodontitisbehandlung sieht nichtchirurgische und chirurgische Strategien vor, die darauf abzielen, die mikrobielle Belastung zu minimieren. Zusätzlich zur mechanischen Behandlung wurden systemische und lokale Antibiotika in das Behandlungskonzept implementiert, um die subgingivale mikrobielle Flora besser zu kontrollieren. Die Analyse der Krankheitsprogression zeigte jedoch eher marginale klinische Gesamteffekte (Harks et al., 2015). Darüber hinaus besteht die Problematik der Resistenzbildung subgingivaler Mikroorganismen gegenüber Antibiotika (Winkelhoff et al., 1996) sowie die eingeschränkte Anwendbarkeit z. B. bei Schwangeren und Kindern (Slots & Rams, 1990). Als weitere Nebenwirkungen können Antibiotika Allergien auslösen sowie die Mikroflora beeinträchtigen. Zudem sind Wechselwirkungen mit Medikamenten oder Nahrungsmitteln (Slots & Rams, 1990), die veränderte bakterielle Zusammensetzung des Biofilms nach Antibiotikagabe, Superinfektionen mit anderen Mikroorganismen, (Helovuo et al., 1993) sowie die rasche Rekolonisierung der Wurzeloberfläche (Winkelhoff et al., 1996) beschrieben. Weiterhin ist man bei der systemischen Gabe der Antibiotika von der Compliance des Patienten abhängig. Um Antibiotika zu umgehen, wurden lokal anwendbare Antiseptika eingeführt. Chlorhexidinguconat (CHX, Chlorhexamed<sup>®</sup>), das wirksam parodontale Pathogene reduziert, ist hierbei der »Goldstandard« (Marsh, 1992). Aber auch CHX weist unerwünschte Nebenwirkungen wie Dysgeusie und Verfärbung der Zähne auf und sollte daher nur eingeschränkt angewendet werden (Slot et al., 2014).

#### 2.1.4.2 Antiinflammatorische Maßnahmen

Der Paradigmenwechsel in der Pathogenese der Parodontitis spiegelte sich auch in neuen Therapieansätzen wider. Diese zielten auf die Behandlung der Entzündung statt der mikrobiellen Infektion ab. Neben der Parodontitis können an der Mundschleimhaut zahlreiche weitere entzündliche Erkrankungen, wie Lichen planus oder das bullöse Pemphigoid auftreten, die einer Therapie bedürfen. Die antiinflammatorische Therapie der Parodontitis wird noch immer kontrovers diskutiert. In den letzten Jahren wurden insbesondere Kortikosteroide (z. B. Prednisolon, Dosisolon®), nichtsteroidale Antirheumatika (NSAIDs, z. B. Aspirin®), Lipidmediatoren (z. B. Lipoxine, wie LXA<sub>4</sub>), monoklonale Antikörper gegen RANKL (z. B. Denosumab, Prolia®), Zytokin-Rezeptorantagonisten (z. B. Anakinra, Kineret®), lösliche Zytokinrezeptoren (z. B. Etanercept, Enbrel®), Anti-Zytokin-Antikörper (z. B. Infliximab, Remicade®) und MMP-Inhibitoren (z. B. Doxycylin, Periostat®) (Cekici et al., 2014; Graves et al., 1998; Preshaw, 2018; Tawfig, 2016; Waykole et al., 2009) untersucht.

Diese Ansätze befinden sich allerdings entweder noch in klinischer Testphase bzw. sind ursprünglich für die Behandlung anderer Erkrankungen konzipiert und nicht zur Behandlung der Parodontitis zugelassen. Langzeitstudien sind nicht für alle Substanzen verfügbar und medikamentenspezifische Nebenwirkungen überwiegen die in Teilen eher marginalen Effekte. Bis heute ist niedrigdosiertes Doxycylin, ein Vertreter der Tetracyklinfamilie, welches durch Chelation des Zn<sup>2+</sup>-Ions von MMPs diese inhibiert, das einzige zugelassene antiinflammatorische Medikament zur Behandlung der Parodontitis. Das Ausmaß des therapeutischen Gewinns variiert nach Studienkonzept und ein eingeschränktes Anwendungsgebiet aufgrund der Kontraindikation z. B. in der Schwangerschaft und in der Stillzeit muss in der Nutzungsabwägung berücksichtigt werden (Preshaw, 2018). Die limitierten und bedingt erfolgreichen Therapieoptionen der Parodontitis und weiterer entzündlicher Erkrankungen der Mundschleimhaut erfordern weitere Forschung, um eine effizientere Behandlung betroffener Patienten zu ermöglichen.



## **2.2 Nanomedizin als Therapieansatz zur Behandlung entzündlicher Mundschleimhauterkrankungen**

### **2.2.1 Nanomedizinische Konzepte zur topischen Applikation**

Der Vorteil der topischen Applikation von Medikamenten liegt in ihrer nicht-invasiven Durchführbarkeit, der Reduktion von Nebenwirkungen und systemischer Effekte im Vergleich zur oralen oder intravenösen Applikation, einer verbesserten Patienten-Compliance und der erhöhten Bioverfügbarkeit durch Vermeidung des hepatischen First-Pass-Effekts (Jager et al., 2018; Volpedo et al., 2019). Problematisch ist jedoch die geringe Permeabilität von Wirkstoffen durch die (Schleim-) Hautbarriere. Daher können nur Medikamente mit speziellen Voraussetzungen, wie beispielsweise einem geringen Molekulargewicht (< 500 Da) die Barriere passieren, die an der Mundschleimhaut durch eine zusätzliche Mukusschicht verstärkt wird (Du et al., 2016; Teubl et al., 2013). Eine weitere Problematik der topischen oralen Applikation ist, dass Medikamente durch den konstanten Speichelfluss, die Sulkusflüssigkeit und den Schluckreflex aus der Mundhöhle entfernt werden, bevor sie den eigentlichen Wirkort erreichen können.

Ein möglicher Weg, um effizientere Maßnahmen für die Therapie der Parodontitis und anderer entzündlicher Erkrankungen der Mundschleimhaut zu schaffen, ist, die Adhäsion an und / oder die Penetration des Wirkstoffes in die Mundschleimhaut zu erhöhen. Die Arbeitsgruppe Nanomedizin des Bundesinstituts für Arzneimittel und Medizinprodukte (BfArM) definierte Nanomedizin wie folgt (Reihlen & Jepsen, 2013):

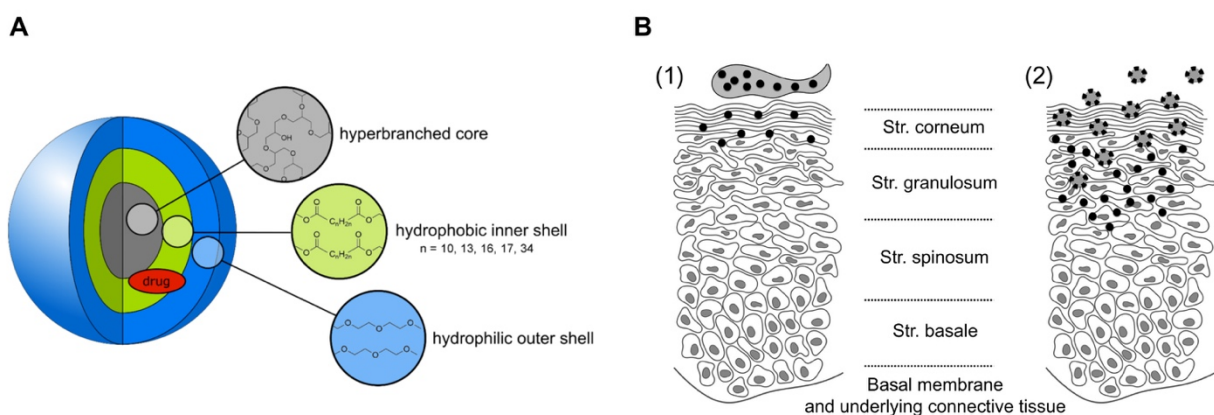
*»Nanomedizin ist die Anwendung von meist synthetisch hergestellten Stoffen und Strukturen, die bedingt durch ihre Größe (< 100 nm) über neue spezifische Eigenschaften verfügen und die für medizinische Zwecke wie Diagnose und Behandlung von Krankheiten im Sinne des Arzneimittelgesetzes bzw. des Medizinproduktegesetzes bestimmt sind.«*

Ein wichtiges Anwendungsfeld ist der gezielte Wirkstofftransport bzw. dessen Freisetzung (Reihlen & Jepsen, 2013). Nanocarrier dienen in diesem Kontext als Vehikel für Wirkstoffe. Zum einen kann ein Wirkstoff durch eine kovalente Bindung mit dem Vehikel gekoppelt werden. Zum anderen kann bei »Drug-Delivery-Systemen« (DDS) der Wirkstoff durch das Vehikel physikalisch eingekapselt werden, was zusätzlich vor dessen vorzeitiger Degradation schützt und die Kontrolle der Wirkstofffreisetzung ermöglicht (Duncan & Gaspar, 2011; Singh & Lillard, 2009; Zhang et al., 2013). Beispiele für DDS sind lipidbasierte Systeme, wie Liposome und Mizellen oder polymere Systeme (Volpedo et al., 2019).

## 2.2.2 Core-Multishell (CMS)-Nanocarrier

Polymerbasierte Nanocarrier zeichnen sich durch eine hohe Biokompatibilität aufgrund ihrer biologischen Abbaubarkeit aus (Singh & Lillard, 2009). Die Entwicklung von Nanocarriern als Vehikel ist zudem im Vergleich zur Entwicklung neuer und effizienterer Wirkstoffe weniger zeit- und kostenaufwändig. Ein weiterer Vorteil ist die verbesserte Bioverfügbarkeit des Wirkstoffes. Dies wird einerseits durch den Schutz der Wirkstoffe vor Degradation und andererseits durch die gezielte Freisetzung des Wirkstoffes am Zielort ermöglicht, die z. B. durch pH-Wert oder Temperatur eingestellt werden kann (Zhang et al., 2013). Auf diese Weise können Nanocarrier die Behandlungseffizienz von Krankheiten aufgrund optimierter Dosierungsanforderungen verbessern (Aminu et al., 2017).

Ein Beispiel für polymerbasierte Nanocarrier sind sogenannte »Core-Multishell« (CMS)-Nanocarrier. Diese bestehen aus einem hyperververzweigten Polyglycerolkern (hPG), der von einer biologisch abbaubaren lipophilen inneren Hülle aus Poly- $\epsilon$ -Caprolacton (PCL) umgeben ist (Abb. 1). Dies ermöglicht, eine bestimmbare Partikelgröße und Wirkstoffbeladungskapazität zu erzielen. Darüber hinaus existiert eine weitere hydrophile äußere Hülle aus Monomethoxypolyethylenglykol (mPEG), welches den CMS-Nanocarrier in wässriger Umgebung stabilisiert und die Bildung größerer Aggregate verhindern kann (Du et al., 2016). Diese Nanocarrier können sowohl mit hydrophoben als auch hydrophilen Arzneimitteln beladen werden und sollen deren Penetration zum Wirkort erhöhen (Du et al., 2016; Hönzke et al., 2016; Jager et al., 2018; Küchler et al., 2009; Volpedo et al., 2019). Damit ist ein therapeutischer Einsatz von Nanocarriern auch an der Mundschleimhaut denkbar.



**Abb. 1: Aufbau des CMS-Nanocarriers und Darstellung der topischen Applikation**

(A) Schematischer Aufbau des Ester-basierten CMS-Nanocarriers mit verzweigtem Polyglycerolkern (hPG), einer inneren hydrophoben (PCL) und einer äußeren hydrophilen (mPEG) Schale (Quelle: Unbehauen et al., 2017); (B) Schematische Darstellung der topischen Medikamentenapplikation mittels einer herkömmlichen Creme (1) und der CMS-Technologie (2); Nanocarrier könnten helfen, die epitheliale Barriere zu überwinden und die Bioverfügbarkeit von

Wirkstoffen zu erhöhen. Neuere Studien zeigen, dass der CMS-Nanocarrier selbst im *Stratum corneum* zu verbleiben scheint, den Wirkstoff jedoch in tiefere viable Schichten freigibt (Alnasif et al., 2014; Du et al., 2016; Pischon et al., 2017); schwarze Punkte kennzeichnen den Wirkstoff (Quelle: Jager et al., 2018).

### **2.2.2.1 CMS 10-E-15-350**

In dieser Arbeit soll der Ester-basierte Nanocarrier CMS 10-E-15-350 untersucht werden. In bisherigen Studien wurde dieser CMS-Typ als besonders biokompatibel identifiziert (Hönzke et al., 2016). Einzelne CMS-Nanocarrier wiesen unbeladen einen hydrodynamischen Radius von  $8,1 \pm 1,2$  nm auf und konnten Aggregate von 100-200 nm bilden (Du et al., 2016; Hönzke et al., 2016). Hönzke und Mitarbeiter beobachteten unter Verwendung des CMS 10-E-15-350 an *ex vivo* Haut eine 7-fache Erhöhung der Penetration des inkorporierten Farbstoffes Nilrot in das *Stratum corneum* (SC) und eine 15-fach erhöhte Penetration in die viable Epidermis im Vergleich zu einer Basiscreme (Hönzke et al., 2016). Neuere Untersuchungen charakterisierten das Penetrationsverhalten an porciner Mundschleimhaut und beobachteten bereits innerhalb von Minuten die Adhäsion des Nanocarriers an der Schleimhaut (Daten der Arbeitsgruppe Prof. Dommisch, noch nicht veröffentlicht). Das mehrschichtige Plattenepithel der Mundschleimhaut stellt aufgrund der Barriere-Eigenschaften und des umgebenden feuchten Milieus besondere Anforderungen an Medikamente. Durch CMS-Nanocarrier können etablierte Wirkstoffe verkapselt, deren Penetration zum Wirkort und so die Wirkstoff-Effizienz erhöht werden. Der Nanocarrier CMS 10-E-15-350 ist daher als Vehikel für Wirkstoffe ein möglicher Ansatz zur topischen Behandlung inflammatorischer Erkrankungen der Mundschleimhaut.

## **2.3 *In vitro*-Rekonstruktionen der Gingiva**

Zur umfangreichen Charakterisierung dieses Nanocarriers und anderer DDS für den potentiellen Einsatz an entzündungsbegleiteten Mundschleimhautflächen bietet es sich an, eine inflammatorische dreidimensionale Rekonstruktion (3D-Modell) der Gingiva *in vitro* zu etablieren. Mittels »Tissue engineering« können auf diese Weise auf verschiedenen Ebenen Erkenntnisse über molekulare Prozesse entzündlicher Erkrankungen der Mundhöhle wie z. B. Parodontitis gewonnen werden und darüber hinaus potentielle Wirkstoffe bzw. Wirkstoff-Träger-Systeme hinsichtlich Biokompatibilität und Effizienz getestet werden.

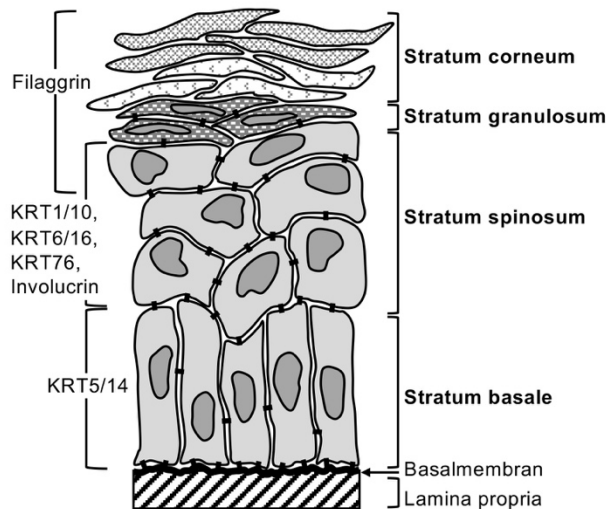
### 2.3.1 Aufbau der Gingiva

Die Gingiva ist sowohl Teil der Mundschleimhaut, als auch des Zahnhalteapparates. Diese bietet eine physikalische und chemische Barriere, die das darunterliegende Gewebe gegen mechanische Reize sowie externe Mikroorganismen, die die Mundhöhle besiedeln und potenziell infizieren können, schützt (Presland & Dale, 2000). Die Gingiva umgibt die Zähne und bedeckt den Alveolarfortsatz (Radlanski, 2011). Je nach Region weist die Gingiva sowohl nicht-keratinisierte als auch keratinisierte Regionen auf (Presland & Dale, 2000). Am koronalsten Punkt der Gingiva, dem *Margo gingivalis*, geht das keratinisierte orale Gingivaepithel in das mehrschichtige, nicht-keratinisierte, orale Sulkusepithel über. Die Verbindung mit der Schmelzoberfläche des Zahnes erfolgt über das nicht-keratinisierte Saumeepithel (Presland & Dale, 2000; Radlanski, 2011). Das orale Gingivaepithel besteht aus einem *Stratum basale* als tiefst liegende Schicht, in der auch die Stammzellen lokalisiert sind und die Differenzierung der Keratinozyten in Keratinozyten startet (Abb. 2). Über dem *Stratum basale* (SB) liegt das *Stratum spinosum* (SS), gefolgt vom *Stratum granulosum* (SG) und dem *Stratum corneum* (SC). Über die Basalmembran ist das Epithel mit dem darunterliegenden fibroblastenreichen Bindegewebe, der *Lamina propria* verzahnt (Radlanski, 2011).

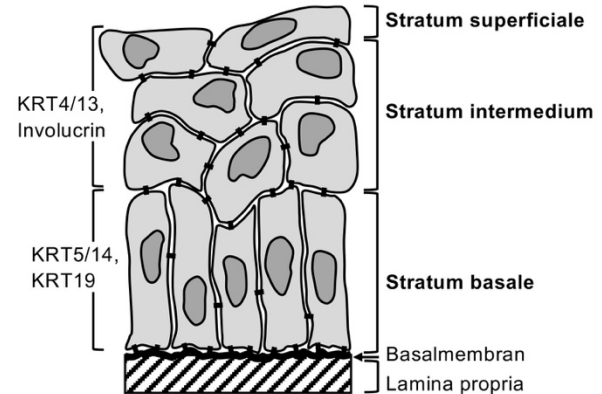
### 2.3.2 Zytokeratine und Differenzierungsmarker der humanen Gingiva

Keratine sind Strukturproteine des epithelialen Zytoskeletts und gehören zur Gruppe der Intermediärfilamente. Die Verteilung von Zytokeratinen ist sehr spezifisch und variiert je nach Epithelart und Differenzierungsgrad, sodass die Keratinexpression ein spezifischer Marker für das Differenzierungsstadium in Epithelzellen ist (Ambatipudi et al., 2013; Moll et al., 1982). In differenzierten Schichten der keratinisierten Gingiva werden die Keratine KRT1/10 exprimiert, während in der nicht-keratinisierten Wangenschleimhaut KRT4/13 lokalisiert sind (Presland & Dale, 2000; Rao et al., 2014; Shetty, 2012). KRT5 und KRT14 finden sich in den basalen Schichten (Abb. 2). Das Protein Ki-67 ist in allen aktiven Phasen des Zellzyklus, aber nicht in ruhenden Zellen vorhanden (Scholzen & Gerdes, 2000). In der Mundschleimhaut markiert es die proliferationsaktiven Zellen im SB. Filaggrin ist ebenfalls ein Strukturprotein und entscheidend für die Bildung von Korneozyten im SC keratinisierter Gingiva (Presland & Dale, 2000).

**A Keratinisierte orale Mukosa,**  
z. B. orales Gingivapithel



**B Nicht-keratinisierte orale Mukosa,**  
z. B. Alveolarmukosa



**Abb. 2: Strukturproteine an mastikatorischer und auskleidender Mundschleimhaut**

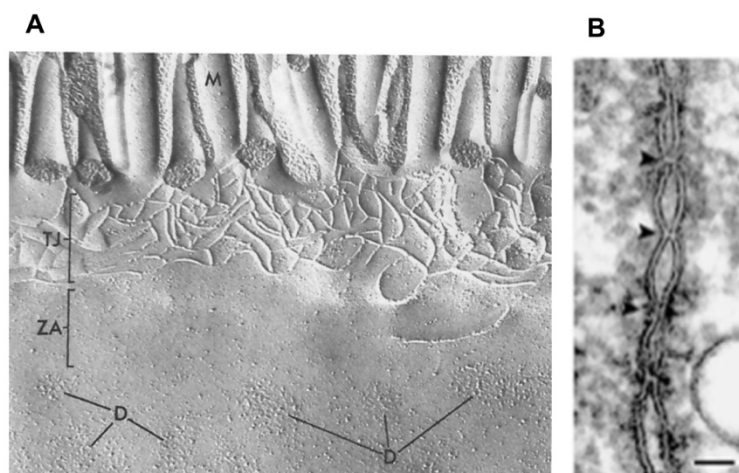
Unterschiedliche Expression von Strukturproteinen in keratinisierter (A) und nicht-keratinisierter oraler Mukosa (B); aus Presland & Dale, 2000, modifiziert nach Ambatipudi et al., 2013; Mackenzie, Rittmann, Gao, Leigh & Lane, 1991; Rao, Patil & Ganavi, 2014; Shetty, 2012.

### 2.3.3 Physikalische Barrierefunktionen der Gingiva

In den letzten Jahren wurde in mehrschichtigen Epithelien wie der Haut, neben dem SC, welches unter anderem eine Permeabilitätsbarriere darstellt, eine zweite Barriereinstanz, die »Tight Junctions« (TJs), identifiziert (Brandner et al., 2015, 2002; Furuse et al., 2002). TJs sind neben Adherens Junctions, Desmosomen und Gap Junctions Zell-Zell-Kontakte, die ein Netzwerk aus transmembranären und peripheren Proteinen bilden. Über Vernietung benachbarter Zellmembranen, sogenannter »Kissing Points« (Abb. 3) stellen TJ eine semipermeable Barriere (*Gate-Funktion*) für den parazellulären Fluss dar (Claude & Goodenough, 1973; Farquhar & Palade, 1963; Staehelin, 1974). Darüber hinaus halten diese die Polarität der Zelle aufrecht (*Fence-Funktion*) (Wan et al., 2018). Die Regulation des parazellulären Transportwegs erfolgt durch spezielle TJ-Proteine (Tsukita et al., 2001). Zu diesen Transmembranproteinen zählen Vertreter der Claudine und der TAMP-Familie, zu der Occludin, Tricellulin und MarvelD3 gehören, sowie die JAMs. Zur intrazellulären Seite sind den Transmembranproteinen periphere Adaptor-Proteine wie ZO-1 angelagert (Gröger & Meyle, 2019; Wan et al., 2018). Im Gegensatz zu einfachen Epithelien bestehen Haut und Gingiva aus mehreren Schichten, deren Zellen sich in unterschiedlichen Stadien der Differenzierung befinden. Einige TJ-Proteine scheinen primär im

SG exprimiert zu sein, wohingegen individuelle TJ-Proteine über das SG hinaus exprimiert werden (Brandner et al., 2002; Haftek et al., 2011; Kirschner et al., 2009; Langbein et al., 2002; Schlüter et al., 2007). In bisher untersuchten mehrschichtigen Epithelien wurden die Transmembranproteine Occludin und Mitglieder der Claudin-Familie identifiziert (Franke & Pape, 2012).

Schroeder und Theilade sowie Meyle und Mitarbeiter belegten das Vorkommen von TJ an humaner Gingiva mittels Elektronenmikroskopie (Meyle et al., 1999; Schroeder & Theilade, 1966). Da gesundes gingivales Exzisat nur limitiert untersucht werden kann, gibt es wenige Daten, die die gesunde humane Situation beschreiben. Die Expression von Claudin-1, -2 und Occludin wurde an primären und immortalisierten gingivalen Keratinozyten gezeigt (Fujita, Yumoto, et al., 2012; Gröger et al., 2008, 2010; Gröger & Meyle, 2019). Genexpressionsanalysen von mehrschichtigen gingivalen Epithelzellkulturen zeigten eine starke Expression von Claudin-1, -4, -12, -17, -25, JAM-A, und Occludin (Belibasakis et al., 2015). Die Infektion primärer und immortalisierter gingivaler Keratinozyten mit *P. gingivalis* führte zu dramatischen Veränderungen des TJ-Musters und zur Denaturierung von Claudin-1, -2 und Occludin (Gröger et al., 2010). In gesunden und erkrankten Bereichen von Parodontitis-Patienten unterschied sich die Expression von TJ-Proteinen (Choi et al., 2014) und an einem Parodontitis-Modell an Ratten wurde gezeigt, dass die Expression von Claudin-1 nach Induktion von Parodontitis abnahm (Fujita, Firth, et al., 2012). Die Regulierung von TJ könnte demnach ein Mittel zur Modulation der Barrierefunktion und somit einen therapeutischen Ansatzpunkt darstellen (Kanda et al., 2018; Tscheik et al., 2013).



**Abb. 3: Ultrastruktur von Tight Junctions**

(A) Laterale Ansicht einer intestinalen Plasmamembran; Mikrovilli (M), Tight Junctions (TJ), Zonula adhaerens (ZA), Desmosom (D), Quelle: Staehelin, 1974; (B) Ultradünnschnitt von TJ-Verbindungen mit »Kissing Points« (Pfeile), Maßstabsbalken 50 nm, Quelle: Tsukita, Furuse & Itoh, 2001.

## **2.3.4 Humane gingivale Modellsysteme zur Untersuchung pathologischer Prozesse der Gingiva**

### **2.3.4.1 Untersuchungen gingivaler Biopsien**

Zur Untersuchung pathologischer Prozesse der Gingiva können gingivale Biopsien herangezogen werden. Biopsien der humanen Mundschleimhaut sind jedoch rar, da ihre Oberfläche z. B. im Vergleich zur Haut deutlich geringer ist. Während die Indikation für Gewebeentnahmen bei Donoren für Haut-Keratinozyten kosmetischer Natur sein kann, liegt die Ursache für Operationen in der Mundhöhle zumeist in der Diagnostik zur Abklärung atypischer Mundschleimhautveränderungen oder in der Entfernung bereits etablierter Krankheitsbilder wie z. B. Plattenepithelkarzinome. Es handelt sich daher häufig um entzündetes bzw. verändertes Gewebe. Eine noch geringere Oberfläche bietet als Teil der Mundschleimhaut die Gingiva, deren Biopsien damit noch seltener sind. Daher wurde in einigen Versuchen auf porcines Mundschleimhautgewebe ausgewichen (Jager et al., 2018). Die Exzision kann *post mortem* vorgenommen werden, wobei es sich dann um avitales Gewebe handelt. Dies erschwert den Erhalt der ursprünglichen Merkmale des Gewebes, sodass Eigenschaften vom vitalen Status abweichen können. Daher eignen sich gingivale Biopsien nur eingeschränkt zur Beantwortung einiger Fragestellungen.

### **2.3.4.2 Untersuchungen an Monolayer-Kulturen aus gingivalen Epithelzellen**

Alternativen zu gingivalen Biopsien sind zweidimensionale (2D-) gingivale Modelle. Diese Modelle bestehen aus nur einem Zelltyp, den gingivalen Epithelzellen, die im Monolayer kultiviert wurden. Dies ermöglicht die Kultivierung der Zellen unter physiologischen Bedingungen durch Verwendung spezifischer Nährmedien sowie unter konstanten Konditionen, wie Temperatur und CO<sub>2</sub>-Konzentration. Unter weitgehendem Ausschluss externer Störfaktoren kann unter diesen Inkubationsbedingungen beispielsweise die Zytotoxizität verschiedener Substanzen auf einzelne Zelltypen untersucht werden. Auch zur Untersuchung der biochemischen Mechanismen im Zusammenhang mit oral-pathologischen Erkrankungen sind derartige Systeme geeignet (Wille et al., 1990). Unter Adjustierung des Ca<sup>2+</sup>-Gehaltes im Medium kann *in vitro* die Zelldifferenzierung induziert werden. Dies erlaubt die Analyse zugrundeliegender Mechanismen und die Beantwortung von Fragestellungen, die Differenzierungsvorgänge betreffen (Brandner & Schulzke, 2015; Wille et al., 1990). 2D-Modelle sind daher geeignete Systeme, um gezielte Fragestellungen im Detail unter standardisierten Bedingungen zu untersuchen.

### 2.3.4.3 Einsatz von gingivalen dreidimensionalen Schleimhautäquivalenten

Die Gingiva ist eine komplexe mehrschichtige Struktur, in der Zellen den Prozess der terminalen Differenzierung durchlaufen. Um die Mehrschichtigkeit sowie die Koexistenz verschiedener Zelltypen in der Gingiva zu berücksichtigen, ermöglicht das Forschungsgebiet des »Tissue Engineering« die Entwicklung eines dreidimensionalen mehrschichtigen Gingivamodells (3D-Modell) und die Überwindung der Limitationen von 2D-Modellen, die die Einflüsse physikalischer und chemischer Interaktionen zwischen den unterschiedlichen Zelltypen der Gingiva nicht berücksichtigen können (Dongari-Bagtzoglou & Kashleva, 2006; Moharamzadeh et al., 2007).

Die Modelle bestehen wie die Gingiva *in vivo* aus einem mehrschichtigen differenzierten Epithel und einer darunterliegenden *Lamina propria* aus in Kollagen gebetteten Fibroblasten. Die Modelle erlauben komplexere Zell-Zell-Interaktionen und darüber hinaus die Kommunikation zwischen Zellen unterschiedlicher Zelltypen, die durch Analyse freigesetzter Moleküle mit geeigneten Verfahren erforscht werden kann. Von Vorteil ist weiterhin der hohe Grad der Differenzierung der Modelle, und die Möglichkeit der histologischen Bewertung und der Untersuchung von Proteinen und mRNA. Die Zugänglichkeit ist bei Verwendung primärer Zellen weniger und bei Nutzung immortalisierter Zellen nicht limitiert und es handelt sich im Vergleich zu Biopsien aus der Mundschleimhaut um vitales Gewebe. Durch Nutzung dieser 3D-Modelle können Versuche am Tier reduziert und daher ethische Bedenken ausgeschlossen werden. Die Kommission der Europäischen Gemeinschaften befürwortet alternative Methoden, wie Hautmodelle, die Tierversuche reduzieren und überflüssig machen (Verordnung (EG) Nr. 440/2008; Verordnung (EU) Nr. 640/2012). Durch die Verwendung humaner Zellen erlaubt es zudem den Blick auf die humane Situation. Anhand solcher 3D-Modelle können grundlegende biologische Phänomene untersucht, aber auch Krankheiten, Wundheilungsprozesse (Brandner et al., 2002; Buskermolen et al., 2016; Dongari-Bagtzoglou & Kashleva, 2006) oder Wirtsreaktionen hinsichtlich Zytotoxizität auf z. B. Dentalmaterialien (Roffel et al., 2019; Vande Vannet et al., 2007) analysiert werden. Diese Modelle bieten sich ebenfalls zur Austestung potentieller Medikamente an. Die Freisetzung von Zytokinen und Wachstumsfaktoren aus 3D-Modellen unterschiedlich von Monolayerkulturen (Xu et al., 2009). *In vitro* aufgebaute 3D-Modelle repräsentieren daher die *in vivo*-Situation wesentlich besser als ein 2D-Modell (Bao et al., 2014; Moharamzadeh et al., 2007; Yadev et al., 2011). Für die Haut sind 3D-Modelle bereits etabliert (Korting et al., 1998), für die Mundschleimhaut gibt es nur begrenzte Veröffentlichungen und kein etabliertes Modell aus gingivalen Zellen, das mittels IL-1 $\beta$  in einen entzündeten Zustand versetzt wurde.



## 2.4 Ziel der Arbeit

Das Hauptziel der vorliegenden Arbeit ist die Etablierung inflammatorischer humaner gingivaler 3D-Modelle, die zur Beantwortung von Fragen zu molekularen Veränderungen im Rahmen der Pathogenese der Parodontitis und zur Bewertung neuartiger Therapieansätze dienen sollen.

Ein Fokus soll auf der Charakterisierung der physikalischen Barriere, die gingivale Epithelzellen unter inflammatorischen Bedingungen bilden, liegen. Da ein Hauptteil der physikalischen Barriere durch TJ gebildet wird, sollte die Expression und die Lokalisation von TJ-Proteinen in der gesunden humanen Gingiva untersucht und der Einfluss von IL-1 $\beta$  auf gingivale Epithelzellen unter Berücksichtigung der Viabilität, Proliferation, Morphologie und der physikalischen Barriere analysiert werden.

Als innovativer Therapieansatz soll die Wirkung des Nanocarriers CMS 10-E-15-350, insbesondere im Hinblick auf eine potenzielle zytotoxische Reaktion, auf die Barriereigenschaften gingivaler Epithelzellen und auf den Aufnahmemechanismus analysiert werden, um den Weg für die Anwendung in der klinischen Praxis zu ebnen.

Daraus ergeben sich die Fragestellungen:

1. Kann mittels IL-1 $\beta$  eine Entzündungsreaktion gingivaler Keratinozyten *in vitro* erzielt werden?
2. Beeinflusst IL-1 $\beta$  gingivale Keratinozyten im Hinblick auf Viabilität, Proliferation, Morphologie und im Hinblick auf die physikalische Barriere?
3. Lässt sich mittels IL-1 $\beta$  ein inflammatorisches gingivales Schleimhautäquivalent *in vitro* etablieren, das für die Beurteilung innovativer Behandlungsansätze und für Fragestellungen, die die Pathogenese der Parodontitis betreffen, herangezogen werden kann?
4. Ist der Nanocarrier CMS 10-E-15-350 ein geeigneter Kandidat für die verbesserte Wirkstoffeffizienz zur Therapie entzündlicher Mundschleimhauterkrankungen?

## 3 Material und Methoden

### 3.1 Material

#### 3.1.1 Kulturzellen und Gewebe

Keratinocyten	<b>OKG4</b>	Immortalisierte humane orale Keratinozyten der Gingiva	hTERT	AG Rheinwald, Boston, Massachusetts, USA; freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. Susan Gibbs, Amsterdam, NL
	<b>GEC</b>	Humane gingivale Epithelzellen	primär	Klinik für Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie, Charité Universitätsmedizin Berlin (Antragsnr. EA2/185/16)
Fibroblasten	<b>IHGF</b>	Immortalisierte humane gingivale Fibroblasten	hTERT	T0026, Applied Biological Materials Inc., Richmond, CDN; freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. Henrik Dommisch, Charité Universitätsmedizin Berlin
	<b>HGF</b>	Humane gingivale Fibroblasten	primär	Klinik für Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie, Charité Universitätsmedizin Berlin (Antragsnr. EA2/185/16)

#### 3.1.2 Geräte

Absaugsystem Vacusafe & Vacuboy	Integra Biosciences	Zizers, CH
Absorbance Microplate Reader Sunrise™	Tecan	Männedorf, CH
Ausrüstungs-Kit Mini Trans-Blot® Electrophoretic Transfer Cell	Bio-Rad Laboratories	Hercules, CA, USA
AxioCam b/w 412-311	Carl Zeiss	Oberkochen, D
BioPhotometer Typ 6131 04825	Eppendorf	Hamburg, D
CO <sub>2</sub> -Inkubator CB220	Binder	Tuttlingen, D
Digital Camera D90	Nikon	Düsseldorf, D
Digital-pH-Meter 646	Knick	Berlin, D
EPLAX VP232-2 Power Supply for Axio Imager Microscope	Carl Zeiss	Oberkochen, D
Flockeneisbereiter AF-10 ASB 0600	Scotsman	Mailand, I
Fluoreszenzkontrollgerät Colibri Controller	Carl Zeiss	Oberkochen, D
Fluoreszenzmikroskop Axiovert 200	Carl Zeiss	Oberkochen, D
Gewebe-Einbettautomat Shandon Duplex Processor	Thermo Fisher	Waltham, MA, USA
Heizplatte/Paraffin Dispenser Shandon WD-4	Thermo Fisher	Waltham, MA, USA
IKA-Combimag RCT, IKAMAG-REO	IKA-Werke	Staufen, D
Illuminator HXP 120 V	Carl Zeiss	Oberkochen, D
Inkubationsbad Typ 1004	GFL	Burgwedel, D

Kammer ENDOHM-12	World Precision Instruments	Sarasota, FL, USA
Konfokales Laser-Scanning-Mikroskop LSM700 MAT	Carl Zeiss	Oberkochen, D
Kühlplatte Shandon CP-4	Thermo Fisher	Waltham, MA, USA
Lichtmikroskop Diavert	Leica	Wetzlar, D
Lichtmikroskop Nikon TMS-F	Nikon	Düsseldorf, D
Micro-Zentrifuge Tomy Capsulefuge PMC-060	Tomy Kogyo	Tokio, J
Microm HM 560 Cryostat	Thermo Fisher	Waltham, MA, USA
Mikrobiologische Sicherheitswerkbank Airstream® Class II Biological Safety Cabinet AC2-4E1	Esco Lifesciences	Friedberg, D
Paraffinstreckbad B24	Medax	Neumünster, D
Photometer-Drucker Thermal Printer DPU-414	Seiko Solutions	Chiba, J
Präzisionswaage Adventurer® Analytical AR2140	Ohaus	Parsippany, NJ, USA
Rotationsschüttler Stuart Gyro-Rocker SSL3	Cole-Parmer	Wertheim, D
Rotationsschüttler Typ 3005	GFL	Burgwedel, D
Schlittenmikrotom Typ 1208	Leitz	Wetzlar, D
Schlittenmikrotom Typ 1208	Leitz	Wetzlar, D
Schüttelinkubator Stuart SI 50	Cole-Parmer	Wertheim, D
Stage Controller XY STEP SMC 2009	Carl Zeiss	Oberkochen, D
Thermomixer 5436	Eppendorf	Hamburg, D
Tube-Rotator	Hartenstein	Würzburg, D
VersaDoc™ Imaging System 4000 MP	Bio-Rad Laboratories	Hercules, CA, USA
Volt-Ohm-Meter Millicell® ERS-2	Merck	Darmstadt, D
Vortex-MixerVortex-Genie®2	Scientific Industries	Bohemia, NY, USA
Waage CHYO MK-2000B Petite Balance	YMC	Kyoto, J
Zentrifuge 1K15	Sigma-Aldrich	St. Louis, MO, USA
Zentrifuge Megafuge® 1.0	Thermo Fisher	Waltham, MA, USA

### 3.1.3 Verbrauchsmaterialien

12 mm Transwell® 0,4 µm Pore, Polyester Membrane Insert, 1,12 cm <sup>2</sup>	Corning	Corning, NY, USA
96-Well Clear Flat Bottom Polystyrene High Bind Microplate	Corning	Corning, NY, USA
BD Plastipak Tuberkulinspritze, 1 ml	Becton Dickinson	Franklin Lakes, NJ, USA
Chromatographiepapier	Whatman	Little Chalfont, UK
Deckgläser ECN 631-1570	VWR International	Radnor, PA, USA
DURAN® Bechergläser und Laborgewindeflaschen	Sarstedt	Nümbrecht, D
Einmal-Küvetten	Brand	Wertheim, D

Einweg-Pasteurpipette aus Glas	Carl Roth	Karlsruhe, D
Einwegklingen #819	Leica Biosystems	Wetzlar, D
Falcon® 6-Well, 12-Well Clear Flat Bottom TC-treated Multiwell Cell Culture Plate,	Corning	Corning, NY, USA
Falcon® 70 µm Cell Strainer	Corning	Corning, NY, USA
Falcon® 96-Well Clear Flat Bottom TC-treated Culture Microplate	Corning	Corning, NY, USA
Falcon® Cell Culture Dishes 100x20 mm; 60x15 mm	Corning	Corning, NY, USA
Falcon® Conical Tubes 15 ml, 50 ml	Corning	Corning, NY, USA
Falcon® Tissue Culture Treated Flasks, 75 cm <sup>2</sup> ; 25 cm <sup>2</sup> ; 12,5 cm <sup>2</sup>	Corning	Corning, NY, USA
Filtropur BT25 250 ml 0,22 µm; S 0,2	Sarstedt	Nümbrecht, D
Fluoromount™ Einbettmedium	Sigma-Aldrich	St. Louis, MO, USA
Immersionsöl	Carl Roth	Karlsruhe, D
ImmunoPen™	Merck	Darmstadt, D
Inkubationscontainer Nunc™ 167063 Nunclon™ 4-Well	Thermo Fisher	Waltham, MA, USA
Laborpipetten	Eppendorf	Hamburg, D
M490 - Histosette® I	Simport Scientific	Belœil, QC, CDN
Menzel-Gläser Deckgläser, 20x26	Menzel	Braunschweig, D
Millicell® Cell Culture Inserts 0,4 µm 30 mm Diameter	Merck	Darmstadt, D
Mr. Frosty™ Gefrierbehälter	Thermo Fisher	Waltham, MA, USA
Nitrocellulosemembranen	Thermo Fisher	Waltham, MA, USA
NORM-JECT® Luer, 20 ml	Henke-Sass, Wolf	Tuttlingen, D
Nunc™ Kryoröhrchen, 1 ml	Thermo Fisher	Waltham, MA, USA
Nunc™ Lab-Tek™ II Chamber Slide™ System, 8 Well / RS-Glass, Permanox Plastic	Thermo Fisher	Waltham, MA, USA
Parafilm "M" Laboratory Film	Pechiney Plastic Packaging	Chicago, IL, USA
Peel-A-Way™ embedding molds S-22	Sigma-Aldrich	St. Louis, MO, USA
Pinsel Red sable brush #1	Henry Schein	Melville, NY, USA
Pipettenspitzen Biosphere® Filter Tips 2,5 µl, 10 µl, 100 µl, 300 µl, 1000 µl	Sarstedt	Nümbrecht, D
Pipettenspitzen epT.I.P.S®, 5 ml	Eppendorf	Hamburg, D
Röhre 5 ml, 57x15,3 mm	Sarstedt	Nümbrecht, D
Rotilabo®-Spritzenfilter 0,45 µm	Carl Roth	Karlsruhe, D
Safe-Lock Tubes 1,5 ml, 2,0 ml	Eppendorf	Hamburg, D
SafeSeal Gefäß 0,5 ml	Sarstedt	Nümbrecht, D
Schwämme für Einbettkassetten, 32x26x2,5 mm	Carl Roth	Karlsruhe, D
Skalpellgriff RS Figur 3	Henry Schein	Melville, NY, USA
Skalpellklingen #11	Schreiber	Fridingen, D
Sterican® Kanüle ø 0,90 x 40 mm; ø 0,80 x 40 mm,	B. Braun Melsungen	Melsungen, D

SuperFrost Ultra Plus™ Adhäsions-Objektträger	Thermo Fisher	Waltham, MA, USA
Tissue Freezing Medium	Leica Biosystems	Wetzlar, D
Tissue-Tek® Mega-Cassette® Einbettkassetten	Sakura Finetek	Alphen aan den Rijn, NL
Tissue-Tek® O.C.T.™ Compound	Sakura Finetek	Alphen aan den Rijn, NL
Zellschaber, 16 cm 2-Pos.-Klinge	Sarstedt	Nümbrecht, D

### 3.1.4 Chemikalien und Reagenzien

Aceton	Avantor	Radnor, PA, USA
APS (Ammoniumperoxodisulfat)	Carl Roth	Karlsruhe, D
Blotting-Grade Blocker, nonfat dry milk (NFDm)	Bio-Rad Laboratories	Hercules, CA, USA
Bradford-Lösung	AppliChem	Darmstadt, D
Bromphenolblau	Serva Electrophoresis	Heidelberg, D
Calciumchlorid-Dihydrat	Merck	Darmstadt, D
Chlorwasserstoffsäure 1 mol/l	AppliChem	Darmstadt, D
Citronensäure-Monohydrat	Carl Roth	Karlsruhe, D
di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat, > 99,5 %	Carl Roth	Karlsruhe, D
Dimethylsulfoxid (DMSO)	AppliChem	Darmstadt, D
DTT (1,4-Dithiothreitol)	Carl Roth	Karlsruhe, D
EDTA	Carl Roth	Karlsruhe, D
EGTA	Carl Roth	Karlsruhe, D
Eosin G-Lösung 0,5 %	Carl Roth	Karlsruhe, D
Essigsäure (Eisessig), 100 %	Merck	Darmstadt, D
Ethanol ≥ 99,5 %; ≥ 96 %, vergällt	Carl Roth	Karlsruhe, D
Glycerin	J.T. Baker	Deventer, NL
Glycin	Serva Electrophoresis	Heidelberg, D
Hämalaunlösung sauer, nach Mayer	Carl Roth	Karlsruhe, D
HEPES	Carl Roth	Karlsruhe, D
Kaliumchlorid, ≥ 99,5 %	Carl Roth	Karlsruhe, D
Magnesiumchlorid-Hexahydrat	Merck	Darmstadt, D
Marker Precision Plus Protein™ Standards Dual Color	Bio-Rad Laboratories	Hercules, CA, USA
Methanol	KMF	Lohmar, D
Milli-Q® hochreines Wasser	Merck	Darmstadt, D
Natriumacetat, ≥ 98,5 %, reinst, wasserfrei	Carl Roth	Karlsruhe, D
Natriumazid	Merck	Darmstadt, D

Natriumchlorid	Carl Roth	Karlsruhe, D
Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat, > 98%	Carl Roth	Karlsruhe, D
Natriumdodecylsulfat (SDS)	AppliChem	Darmstadt, D
Natriumfluorid (NaF)	Merck	Darmstadt, D
Natriumhydrogencarbonat	Merck	Darmstadt, D
Natriumhydroxid	Carl Roth	Karlsruhe, D
Natriumhypochlorit-Lösung 3 %	Aug. Hedinger	Stuttgart, D
Natriumorthovanadat	New England Biolabs	Ipswich, MA, USA
Paraffinwachs, Typ 56-58	Merck	Darmstadt, D
Paraformaldehyd	Carl Roth	Karlsruhe, D
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma-Aldrich	St. Louis, MO, USA
Ponceau S	Carl Roth	Karlsruhe, D
Propan-2-ol ≥ 99 %	Thermo Fisher	Waltham, MA, USA
Protease-Inhibitor Mix HP (PIC)	Serva Electrophoresis	Heidelberg, D
Roti®-Histokitt	Carl Roth	Karlsruhe, D
Roti®-Histol	Carl Roth	Karlsruhe, D
Rotiphorese® Gel 30	Carl Roth	Karlsruhe, D
Saponin	Sigma-Aldrich	St. Louis, MO, USA
Schwefelsäure, 96 %	Carl Roth	Karlsruhe, D
Sulforhodamine B, Pulver	Sigma-Aldrich	St. Louis, MO, USA
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin)	Carl Roth	Karlsruhe, D
Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide	Sigma-Aldrich	St. Louis, MO, USA
TMB-Lösung (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine)	AppliChem	Darmstadt, D
tri-Natriumcitrat Dihydrat	Carl Roth	Karlsruhe, D
Trichloressigsäure (TCA)	Carl Roth	Karlsruhe, D
Tris (Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan)	Carl Roth	Karlsruhe, D
Triton™ X-100	Sigma-Aldrich	St. Louis, MO, USA
Trypan-Blau Lösung, 0,4 %	Sigma-Aldrich	Steinheim, D
Trypsin EDTA 1X, 0,25 % Trypsin, 2,21 mM EDTA	Corning	Corning, NY, USA
Tween® 20	Sigma-Aldrich	St. Louis, MO, USA
Wasserstoffperoxid, 30 %	Carl Roth	Karlsruhe, D
Western Lightning® Plus-ECL	PerkinElmer	Waltham, MA, USA
Xylol	Avantor	Radnor, PA, USA
β-Glycerophosphat Dinatriumsalz Pentahydrat	AppliChem	Darmstadt, D

### 3.1.5 Medien, Lösungen, Zusätze und Puffer

#### 3.1.5.1 Medien, Lösungen und Zusätze

Amphotericin B, 250 µg/ml	Biochrom	Berlin, D
BSA, bovines Serumalbumin	PAN-Biotech	Aidenbach, D
Collagen A	Biochrom	Berlin, D
Collagen IV	Sigma-Aldrich	St. Louis, MO, USA
Collagenase Typ I	Biochrom	Berlin, D
DermaLife K	Lifeline Cell Technology	Frederick, MD, USA
Dispase II	Sigma-Aldrich	St. Louis, MO, USA
Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline (1 mM Ca <sup>2+</sup> + 0,5 mM Mg <sup>2+</sup> ), PBS <sup>+/+</sup>	Corning	Corning, NY, USA
Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline (ohne Ca <sup>2+</sup> + Mg <sup>2+</sup> ), PBS	Corning	Corning, NY, USA
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, 4,5 g/l Glc; 15-017-CVR)	Corning	Corning, NY, USA
FCS, fetales Kälberserum	PAN-Biotech	Aidenbach, D
Nicht-essenzielle Aminosäuren, 100x-Konzentrat	Biochrom	Berlin, D
Nutragen® Type I Bovine Collagen Solution	Advanced BioMatrix	San Diego, CA, USA
Penicillin-Streptomycin (10,000 U/ml; 10 mg/ml)	PAN-Biotech	Aidenbach, D
Stabiles Glutamin (L-Alanyl-L-Glutamin)	PAN-Biotech	Aidenbach, D
Ziegenserum	PAN-Biotech	Aidenbach, D

#### 3.1.5.2 Puffer

1x TBS  
150 mM NaCl  
7,7 mM Tris  
in Aq. dest.  
pH 7,5

10x PBS  
164 g NaCl  
31,2 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
2 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
2 l Aq. dest.  
pH 7,8

### 3.1.6 Antikörper

#### 3.1.6.1 Primärantikörper

<i>Antikörper</i>	<i>Wirt</i>	<i>Hersteller</i>	<i>Sitz des Herstellers</i>
Claudin-1 (37-4900)	Mouse	Thermo Fisher	Waltham, MA, USA
Cytokeratin Pan Type I/II (MA5-13156)	Mouse	Thermo Fisher	Waltham, MA, USA
Cytokeratin-5 (ab52635)	Rabbit	Abcam	Cambridge, UK
E-Cadherin (610181)	Mouse	Becton Dickinson	Franklin Lakes, NJ, USA
Filaggrin (AE21, sc-80609)	Mouse	Santa Cruz Biotechnology	Dallas, TX, USA
Ki-67 (9129S)	Rabbit	Cell Signaling Technology	Frankfurt am Main, D
Occludin (33-1500)	Mouse	Thermo Fisher	Waltham, MA, USA
Occludin (611091)	Mouse	Becton Dickinson	Franklin Lakes, NJ, USA
Occludin (71-1500)	Rabbit	Thermo Fisher	Waltham, MA, USA
Vimentin (bs-0756R)	Rabbit	Bioss Antibodies	Woburn, MA, USA
Vimentin (ab8978)	Mouse	Abcam	Cambridge, UK
ZO-1 (61-7300)	Rabbit	Thermo Fisher	Waltham, MA, USA
ZO-1 (610967, 610966)	Mouse	Becton Dickinson	Franklin Lakes, NJ, USA
β-Actin (A5316)	Mouse	Sigma-Aldrich	St. Louis, MO, USA

#### 3.1.6.2 Sekundärantikörper und weitere Fluoreszenz-markierte Substanzen

<i>Antikörper/ Fluoreszenz-Farbstoff</i>	<i>Hersteller</i>	<i>Sitz des Herstellers</i>
bis-Benzimid Trihydrochlorid H33342	Sigma-Aldrich	St. Louis, MO, USA
Goat anti-Mouse IgG, Alexa Fluor® 488	Thermo Fisher	Waltham, MA, USA
Goat anti-Mouse IgG, Alexa Fluor® 594	Thermo Fisher	Waltham, MA, USA
Goat anti-Rabbit IgG, Peroxidase-Konj.	Sigma-Aldrich	St. Louis, MO, USA
Goat anti-Rabbit IgG, Alexa Fluor® 488	Thermo Fisher	Waltham, MA, USA
Goat anti-Rabbit IgG, Alexa Fluor® 594	Thermo Fisher	Waltham, MA, USA
Sheep anti-Mouse IgG, Peroxidase-Konj.	Sigma-Aldrich	St. Louis, MO, USA
Wheat Germ Agglutinin, Alexa Fluor® 488	Thermo Fisher	Waltham, MA, USA

#### 3.1.7 Stimulanzen und Arbeitskonzentrationen

CMS 10-E-15-350 (CMS-E15-1 #DP001-1148-6); CMS-ICC (CMS-E15-ICC-1; #CMS-E15-ICC-005)	freundlicherweise überlassen von der AG Haag, Freie Universität Berlin		50 µg/ml
Lipopolysaccharide (E. coli)	Sigma-Aldrich	St. Louis, MO, USA	100 ng/ml
rh IL-1β / IL1F2 (E. coli)	ImmunoTools	Friesoythe, D	10 ng/ml
rh TNFα (E. coli)	ImmunoTools	Friesoythe, D	10 ng/ml



### 3.1.8 Kits

Human Cytokine Antibody-Array	Abcam	Cambridge, UK
Human IL-6-ELISA	ImmunoTools	Friesoythe, D
Human IL-8-ELISA	ImmunoTools	Friesoythe, D
MaxBlock™ Autofluorescence Reducing Reagent-Kit	Dianova	Hamburg, D

### 3.1.9 Softwares

Adobe Photoshop® CC 2018	Adobe	San José, CA, USA
AxioVision Release 4.8.2 SP3	Carl Zeiss	Oberkochen, D
ImageJ 1.52a	Wayne Rasband	National Institutes of Health, USA
Magellan™ Data Analysis Software	Tecan	Männedorf, CH
Microsoft® Office 365 University	Microsoft	Redmond, WA, USA
Quantity One® Version 4.6.5	Bio-Rad Laboratories	Hercules, CA, USA
SPSS® Statistics Version 23.0.0.2	IBM	Armonk, NY, USA
ZEN black edition Version 14.0.0.0	Carl Zeiss	Oberkochen, D
ZEN blue edition Version 2.3	Carl Zeiss	Oberkochen, D

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Zellbiologische Methoden

#### 3.2.1.1 Kultivierung von Keratinozyten

##### *Kultivierung immortalisierter gingivaler Keratinozyten*

Die Telomerase-immortalisierten Keratinozyten (OKG4/bmi1/TERT) wurden in serumfreiem Wachstumsmedium DermaLife K mit 1 % Penicillin-Streptomycin (P/S) in Kollagen-IV-beschichteten T75-Zellkulturflaschen kultiviert. Nach Erreichen einer Konfluenz von 70 % wurden die Zellen passagiert. Der Mediumwechsel erfolgte alle zwei bis drei Tage.

### *Präparation und Kultivierung primärer gingivaler Keratinozyten*

Primäre Keratinozyten und Fibroblasten wurden aus Gewebeproben gewonnen, die von Zahnextraktionen in der Abteilung der Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie der Charité Universitätsmedizin Berlin stammten. Für die verwendeten Proben wurden keine zusätzlichen Wunden verursacht, sondern während der Operation entferntes Gewebe verwendet. Ein positives Ethikvotum liegt vor (Antragsnummer EA2/185/16). Die Gewebeproben wurden ausschließlich nach schriftlichem Einverständnis der Patienten verwendet. Nach Exzision wurden die Proben in DMEM (4,5 g/l Glucose) mit 1 % P/S und 1 % Amphotericin B (DMEM/PS/AB) in das Labor transportiert, mit 70 % Ethanol (v/v) in sterilem Aq. dest. desinfiziert und in PBS gespült. Die Proben wurden anschließend auf ein steriles metallenes Gitternetz aufgespannt. Dieses Gitternetz wurde kopfüber in eine sterile Lösung aus 0,5 % Dispase II (m/v) in DMEM gelegt. Nach Inkubation bei 4 °C über Nacht ließ sich das Epithel vom darunter liegenden Gewebe mit der Pinzette trennen. Das Epithel wurde ggf. auf ca. 5 mm<sup>2</sup> getrimmt, in ein Falcon mit 0,25 % Trypsin und 2,21 mM EDTA überführt und anschließend individuell unter Sichtkontrolle zwischen 10 und 30 Minuten bei 37 °C in einem Schüttelinkubator inkubiert. Sobald der Trypsinverdau ersichtlich war, wurde dieser mittels DMEM/PS/AB inhibiert. Die Lösung wurde intensiv resuspendiert (ø 0,80 x 40 mm) und über ein Zellsieb mit einer Porengröße von 70 µm gegeben. Die Suspension wurde bei 900 rpm für 4 Minuten zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in Wachstumsmedium resuspendiert und es erfolgte die Zellzahlbestimmung in einer Neubauer-improved-Zählkammer. Die gewünschte Zellzahl wurde in entsprechender Menge Wachstumsmedium in Kollagen-A-beschichtete Zellkulturflaschen gegeben. Der erste Mediumwechsel erfolgte am nächsten Tag, anschließend wurde das Medium alle zwei bis drei Tage gewechselt.

#### OKG4-Wachstumsmedium.

60 µM Ca<sup>2+</sup>

DermaLife K

1 % (v/v) P/S

#### GEC-Wachstumsmedium.

60 µM Ca<sup>2+</sup>

DermaLife K,

1 % (v/v) P/S

1 % (v/v) AB

#### Differenzierungsmedium.

1,4 mM Ca<sup>2+</sup>

DermaLife K,

1 % (v/v) P/S

1x Calcium Chloride LifeFactor

### **3.2.1.2 Kultivierung von Fibroblasten**

#### *Kultivierung immortalisierter humaner gingivaler Fibroblasten*

Die hTERT-immortalisierte humane gingivale Fibroblastenlinie (IHGF, Nr. T0026) wurde in IHGF-Wachstumsmedium bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert. Bei einer Konfluenz von 70 % wurden die Zellen passagiert.

### *Präparation und Kultivierung primärer gingivaler Fibroblasten*

Die von Epithel befreite Gewebeprobe (s. Präparation primärer gingivaler Keratinozyten) wurde in ca. 5 mm<sup>2</sup> große Anteile geteilt, in ein Falcon mit 5 ml sterilfiltrierter Lösung aus 0,1 % Kollagenase (m/v) in DMEM überführt und 1 h im Schüttelinkubator bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die Suspension mit DMEM/PS/AB verdünnt, über ein Zellsieb (70 µm Porengröße) gegeben und anschließend für 4 Minuten bei 1000 rpm zentrifugiert. Die Zellzahlbestimmung erfolgte in der Neubauer-improved-Zählkammer. Schließlich erfolgte die Aussaat der gewünschten Zellzahl in T75-Zellkulturflaschen.

Alternativ wurden sehr kleine Gewebeproben in eine 100 x 20 mm-Zellkulturschale gelegt und mit Fibroblasten-Wachstumsmedium bedeckt. Am nächsten Tag wurden diese vorsichtig mit PBS gewaschen und das Medium erneuert. Danach erfolgte der Mediumwechsel alle zwei Tage. Nach einigen Tagen konnte ein Auswandern der Fibroblasten beobachtet werden. Dann wurde das jeweilige Gewebestück entfernt und die adhärenen Fibroblasten weiter kultiviert.

#### IHGF-Wachstumsmedium

DMEM 4,5 g/l Glc  
1 % Glutamin  
1 % P/S  
1 % AB  
10 % FCS

#### HGF-Wachstumsmedium

DMEM 4,5 g/l Glc  
1 % Glutamin  
1 % P/S  
1 % AB  
1 % NEA  
10 % FCS

### **3.2.1.3 Zellkultur**

Alle verwendeten Zelllinien wurden bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>-Atmosphäre inkubiert. Als Waschpuffer diente PBS. Zur Ablösung der Zellen erfolgte eine ca. 3-5-minütige Inkubation in 0,25 % Trypsin und 2,21 mM EDTA. Anschließend wurden die Zellen entweder eingefroren oder für Experimente verwendet. Immortalisierte Zelllinien wurden bis Passage 34 verwendet. Primäre Zellen wurden bis zur dritten Passage verwendet.

Zur Inkulturnahme wurden die jeweiligen Phiolen zügig im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut. Zur Neutralisierung des zelltoxischen DMSO wurde die Zellsuspension in 15 ml Wachstumsmedium verdünnt und bei 900 rpm für 4 Minuten zentrifugiert. Das gewonnene Zellpellet wurde anschließend in Wachstumsmedium resuspendiert und die Zellen im jeweiligen Wachstumsmedium in Zellkulturgefäße überführt. Um eine bestimmte Zellzahl zu kultivieren, wurde die resuspendierte Zellsuspension in 0,4 % Trypan-Blau-Lösung 1:10 verdünnt. Die Zellzahl wurde anschließend durch Bildung des Mittelwerts der unter dem Lichtmikroskop

ausgezählten vier Eckquadrate (MW) x 10 (Verdünnungsfaktor) x 10<sup>4</sup> (Kammerfaktor) mittels Neubauer-improved-Zählkammer ermittelt. Zur Kryo-Konservierung wurden Keratinozyten bzw. Fibroblasten bei erreichter Konfluenz mit 0,25 % Trypsin und 2,21 mM EDTA abgelöst und bei 900 rpm für 4 Minuten zentrifugiert. Die Zellzahl wurde bestimmt und die Zellen in gewünschter Zellzahl in einer Lösung aus 10 % DMSO (v/v) in FCS bei -80 °C eingefroren. Für längere Einfrierzeiten wurden die Zellen in einen Flüssigstickstofftank überführt.

### 3.2.1.4 MTT-Assay

Der MTT-Assay ist ein Test zur Bestimmung der metabolischen Aktivität von Zellen (Mosmann, 1983). Hierzu wurden 96-Well-Platten mit einer 20 µg/ml Kollagen-IV-Lösung in PBS bei 4 °C über Nacht beschichtet. Nach einem Waschschrift mit 100 µl Aq. dest. pro Well wurden jeweils 1 x 10<sup>4</sup> Zellen in 100 µl Wachstumsmedium je Vertiefung in 96-Well-Platten ausgesät. Es wurden stets Blanks (Wells ohne Zellen mit Medium), unstimulierte Kontrollen sowie Kontrollen zur maximalen Lyse (Positivkontrolle) mitgeführt. Die Stimulation erfolgte durch entsprechenden Mediumwechsel am darauffolgenden Tag.

Der MTT-Assay wurde jeweils 24 h, 48 h und 72 h nach Stimulation durchgeführt. Für die Kontrolle der maximalen Lyse erfolgte eine 30-minütige Inkubation der entsprechenden Zellen mit je 100 µl einer 4 % Triton™ X-100-Lösung (v/v) in PBS. Anschließend wurden jeweils 10 µl MTT-Lösung in alle Wells gegeben und für 4 h inkubiert. Der Überstand wurde entfernt und durch Applikation von 100 µl »saurem« Isopropanol je Well erfolgte die Reduktion des Farbstoffes zu violettfarbenem Formazan. Die Auslesung der umgesetzten Farbstoffmenge erfolgte mittels Absorptions-Mikroplatten-Reader bei einer Wellenlänge von 570 nm. Jeder Ansatz wurde jeweils in dreifacher technischer Ausführung und in drei unabhängigen Experimenten durchgeführt.

#### Lösung zur maximalen Lyse

4 % Triton™ X-100 (v/v)  
in PBS

#### MTT-Lösung

5 mg/ml Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide  
in PBS

#### »saures« Isopropanol

5 % 1N HCl (v/v)  
in Isopropanol

### 3.2.1.5 Sulforhodamin B-Assay

Der Sulforhodamin B (SRB)-Assay ist ein gebräuchlicher Test zur Bestimmung der Zelldichte durch Messung des zellulären Proteingehalts (Vichai & Kirtikara, 2006). Die Aussaat und Stimulation der Zellen erfolgten analog zum MTT-Assay. Nach Ablauf der entsprechenden Stimulationszeit wurden 100 µl 10 % TCA (m/v) in Aq. dest. pro Well hinzugefügt und für eine Stunde bei 4 °C inkubiert. Es folgten drei Waschschriffe mit jeweils 200 µl Aq. dest. pro Well. Anschließend wurden die Platten bei RT getrocknet. Nach 30-minütiger Inkubation mit 100 µl SRB-Lösung pro Well bei RT wurden alle Wells mit 200 µl 1 % Essigsäure (v/v) in Aq. dest. gewaschen und bei RT getrocknet. Pro Well wurden 200 µl Tris-Lösung hinzugefügt und 15 Minuten bei RT inkubiert. Danach erfolgte die Messung bei einer Wellenlänge von 492 nm im Mikrotiterplatten-Photometer. Drei unabhängige Versuche mit jeweils technischen Triplikaten wurden durchgeführt.

#### SRB-Lösung

0,057 % Sulforhodamin B (m/v)  
in 1 % Essigsäure (v/v)  
in Aq. dest.

#### Tris-Lösung

10 mM Tris-Lösung  
in Aq. dest.  
pH 10,5

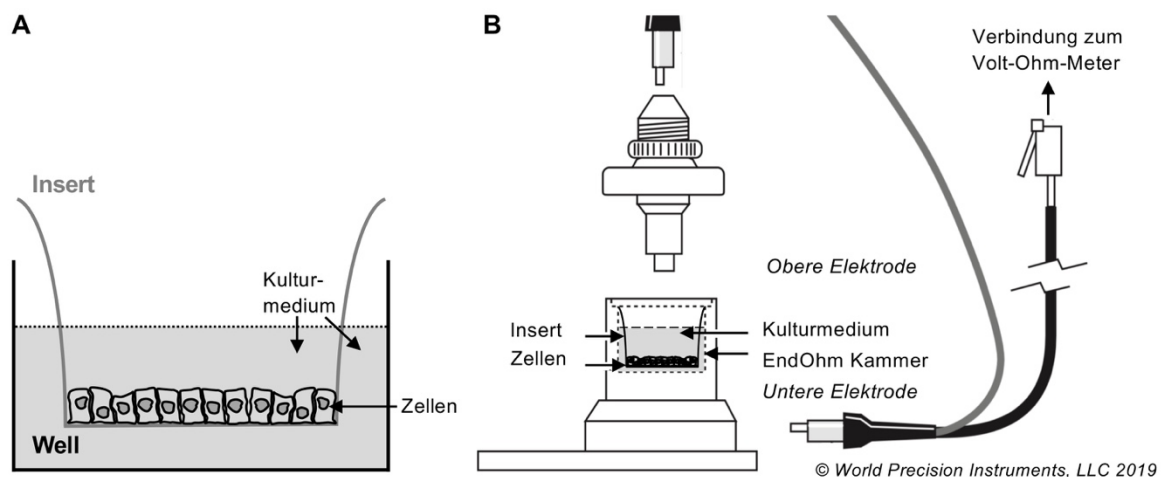
### 3.2.1.6 Bestimmung des transepithelialen elektrischen Widerstands

Der transepitheliale elektrische Widerstand (TEER) ist ein Maß für die Integrität der Zellbarriere (Claude & Goodenough, 1973; Gumbiner & Simons, 1986). Der TEER wurde mittels Millicell<sup>®</sup> ERS-2 Epithelial Volt-Ohm-Meter in Kombination mit einer EndOhm-12-Kammer gemessen (Abb. 4). Auf einen Transwell<sup>®</sup>-Filter mit einer Porengröße von 0,4 µm wurden  $2,7 \times 10^4$  Zellen in 500 µl Wachstumsmedium ausgesät. Der Filter wurde zuvor mit 100 µl einer Kollagen-Lösung über Nacht bei 4°C beschichtet (20 µg/ml Kollagen A (v/v) in PBS für primäre bzw. Kollagen IV für immortalisierte Keratinozyten). Die Transwell<sup>®</sup>-Filter wurden in 12-Well-Kulturplatten gesetzt, sodass die Versorgung der Zellen von apikal (Insert) und basolateral (Well) gewährleistet wurde (Abb. 4A). Der Mediumwechsel erfolgte in der ersten Woche alle zwei Tage und nach einer Woche täglich. Sobald die Zellen Zell-Zell-Kontakte ausbildeten, wurde das Wachstumsmedium ( $60 \mu\text{M Ca}^{2+}$ ) gegen ein Medium mit höherem  $\text{Ca}^{2+}$ -Gehalt ( $1,4 \text{ mM Ca}^{2+}$ ) zur Induktion der Zelldifferenzierung ausgetauscht.

Bei jedem Versuch wurden Kontrollfilter mitgeführt, die über die gesamte Zeit in Wachstumsmedium mit geringem  $\text{Ca}^{2+}$ -Gehalt kultiviert wurden. Ein Filter ohne Zellen wurde stets mitgeführt. Dessen TEER-Wert wurde als »Blank« von allen TEER-Werten, die für Filter mit Zellen gemessen wurden, abgezogen. Das im Transwell<sup>®</sup> befindliche Medium wurde vor der

Messung erneuert. Für die Messung wurden in die Kammer 3 ml Medium vorgelegt. Anschließend wurde das Transwell® in die Kammer eingesetzt und der Deckel der EndOhm-Kammer aufgesetzt. Der Stromkreis zum Volt-Ohm-Meter wurde geschlossen und nach Äquilibration wurde die Messung gestartet (Abb. 4B). Stimulationsversuche wurden durch IL-1 $\beta$ - bzw. CMS-Gabe über das Kulturmedium für 24, 48 und 72 h durchgeführt. Alle Versuche wurden mindestens drei Mal durchgeführt. Messungen an primären Zellen erfolgten an Keratinozyten von drei verschiedenen Spendern. Der transepitheliale elektrische Widerstand pro Fläche wurde mittels folgender Formel ermittelt:

$$\text{TEER } [\Omega \times \text{cm}^2] = (\text{gemessener Widerstand } [\Omega] - \text{Blank } [\Omega]) \times 1,12 \text{ cm}^2$$



**Abb. 4: Messung des transepithelialen elektrischen Widerstands**

Die Kultivierung gingivaler Epithelzellen erfolgte auf Transwell®-Filtern (Inserts), die in 12-Well-Platten eingesetzt wurden. Die Versorgung mit Kulturmedium erfolgte von basolateral über das im Well und von apikal über das im Insert befindliche Medium (A, eigene Abbildung). Der TEER gingivaler Keratinozyten wurde mittels Millicell® ERS-2 Epithelial Volt-Ohm-Meter in Kombination mit einer EndOhm-12-Kammer gemessen (B), EndOhm-Grafik freundlicherweise zur Verfügung gestellt von World Precision Instruments, LLC; Abbildung modifiziert nach EndOhm Chamber Manual, World Precision Instruments, LLC.

### 3.2.1.7 Etablierung humaner gingivaler Schleimhautäquivalente

#### *Etablierung epithelialer humaner gingivaler Modelle*

Es wurden  $2,7 \times 10^4$  GEC bzw. OKG4-Zellen auf Transwell®-Filter in Wachstumsmedium ausgesät. Nach Erreichen der Konfluenz wurde die Differenzierung der Zellen durch Medium mit 1,4 mM Ca<sup>2+</sup> induziert. Die Stimulation mit IL-1 $\beta$  erfolgte über 72 h. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Kultivierung wurden die Transwell®-Filter für 4 h bei 4 °C mit 4 % PFA (m/v) und

0,025 % Saponin (m/v) in PBS auf einem Rotationsschüttler fixiert und anschließend in Paraffin eingebettet. Transwell®-Filter mit OKG4-Zellen wurden an den Tagen 9, 11 und 15 und Filter mit GEC an den Tagen 12 und 16 nach Aussaat histologisch analysiert.

### *Etablierung organotypischer gingivaler Schleimhautäquivalente*

Um die native Gingiva naturgetreuer nachbilden zu können, sollte das Modell in einem weiteren Schritt um die *in vivo* unter dem Epithel liegende *Lamina propria* erweitert werden (»full-thickness«). Hierfür wurde zunächst auf dem Filter ein Fibroblasten-Kollagengel aufgebaut. Das geplante Vorgehen, welches eng an das von Dongari-Bagtzoglou und Kashleva (2006) beschriebene Protokoll angelehnt ist, ist im Folgenden beschrieben:

#### 1. Einbettung der Fibroblasten

Zunächst wurde eine azelluläre Kollagen-I-Lösung hergestellt und jeweils 1 ml pro Insert (Millicell®, 0,4 µm Porengröße, ø 30 mm) appliziert. Die Lösung erstarrte unter der Sterilbank für 30 Minuten. Anschließend wurde eine Fibroblasten-Kollagen-Mixtur hergestellt und jeweils 3 ml auf den azellulären Kollagen-Layer aufgebracht. Nach einer Stunde Ruhezeit bei RT wurden die Platten für eine Stunde in den Brutschrank transferiert (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>). Es erfolgte die Gabe von jeweils 3 ml Fibroblasten-Wachstumsmedium in die Inserts und in die Wells. Die entstandenen Gele wurden für 4-7 Tage im Brutschrank inkubiert. In diesem Zeitraum kontrahierten die Kollagen-Gele. Nach 2-3 Tagen wurden die Gele vorsichtig von der Wand des Inserts mit einem sterilen Spatel abgelöst.

#### Azelluläre Kollagen-I-Lösung

6,2 ml Fibroblasten-Wachstumsmedium  
1 ml 10x Reconstitution Buffer  
1,4 ml FCS  
1,3 ml bovines Kollagen I (6 mg/ml)  
auf Eis ansetzen

#### 10x Reconstitution Buffer

22 mg/ml NaHCO<sub>3</sub>  
20 mM HEPES  
in 0,062 NaOH

#### Fibroblasten-Kollagen-I-Lösung

4x10<sup>6</sup> Fibroblasten in 1ml Fibroblasten-Wachstumsmedium  
19,4 ml Fibroblasten-Wachstumsmedium  
3 ml 10x Reconstitution Buffer  
2,5 ml FCS  
3,8 ml bovines Kollagen I (6 mg/ml)  
auf Eis ansetzen

## 2. Applikation der Keratinozyten

Nach Kontraktion der Kollagen-Gele wurde das Medium entfernt. Auf die Gele wurden anschließend  $1 \times 10^6$  Keratinozyten in je 50  $\mu\text{l}$  Wachstumsmedium pro Insert ausgesät. Die Ansätze wurden für 2 Stunden im Brutschank (37 °C, 5 %  $\text{CO}_2$ ) inkubiert. Anschließend wurde Keratinozyten-Wachstumsmedium in die Inserts sowie Fibroblasten-Wachstumsmedium in das Well appliziert, um optimale Bedingungen für beide Zelltypen zu schaffen. Das Medium wurde am nächsten Tag gewechselt und die Ansätze für weitere 2-3 Tage kultiviert. Zur besseren visuellen Kontrolle der epithelialen Konfluenz wurde die gleiche Anzahl Keratinozyten pro Fläche auf einer kollagenbeschichteten 12-Well-Platte ausgesät.

## 3. Induktion der Differenzierung durch »Airlift«

Nach Erreichen der epithelialen Konfluenz wurde das Medium aus den Inserts vorsichtig entfernt. Im Well wurde das Fibroblasten-Wachstumsmedium durch Keratinozyten-Differenzierungsmedium (1,4 mM  $\text{Ca}^{2+}$ ) ersetzt. Hierbei musste der basale Kontakt der Zellen mit dem Kulturmedium hergestellt werden, um eine ausreichende Versorgung zu gewährleisten.

## 4. Induktion einer Entzündung

Zur Induktion einer Entzündung erfolgte die Gabe von 10 ng/ml IL-1 $\beta$  über das Medium. Der Mediumwechsel erfolgte alle zwei Tage, indem die Hälfte des Mediums durch frisches Medium ersetzt wurde. Da es sich im Gegensatz zu Hautmodellen bei der Gingiva um kontinuierlich feucht gehaltenes Gewebe handelt, wurden bei jedem Mediumwechsel 100  $\mu\text{l}$  des Differenzierungsmediums zur Speichelimitation auf die Kulturen von oben appliziert. In diesem Zustand wurden die Modelle weitere acht bis zwölf Tage inkubiert.

## 5. Analyse der Penetration des CMS-Nanocarriers

Der Indocarbocyanin-gekoppelte CMS-Nanocarrier wurde auf etablierte 3D-Modelle aufgetragen und für fünf Minuten inkubiert. Anschließend erfolgte ein Waschschrift mit PBS und die Konservierung in Tissue Freezing Medium durch Flüssigstickstoff. Die Lagerung der Proben erfolgte bei -80 °C, anschließend wurden Gefrierschnitte (7  $\mu\text{m}$ ) angefertigt.



### 3.2.1.8 Herstellung von Präparaten für die Mikroskopie

#### *Paraffinschnitte*

Für die histologische Analyse wurden Biopsien nativer Gingiva zunächst mit 4 % PFA (m/v) in PBS fixiert. Gingivale 3D-Modelle wurden mit 4 % PFA (m/v) und 0,0025 % Saponin (m/v) in PBS fixiert. Die Proben wurden in Einbettkassetten unter fließendem Wasser für zwei Stunden gewaschen. Anschließend wurden sie in einen Einbettautomaten überführt, in welchem eine Dehydrierung mittels Ethanol-Verdünnungen und Aceton erfolgte (Tab. 1). Nach einer Inkubation in Xylol folgte schließlich die Paraffin-Infiltration der Proben und die Herstellung von Paraffinblöcken. Von diesen wurden Paraffinschnitte mit einer Schnittdicke von 4-5 µm hergestellt und auf Objektträger aufgezogen. Die Objektträger wurden über Nacht bei 37 °C getrocknet und anschließend gefärbt. Stets wurde eine HE-Färbung parallel als Übersichtsfärbung hergestellt.

**Tab. 1: Ablauf der Paraffineinbettung und Reagenzien für die Histologie**

<u>Substanz</u>	<u>Dauer</u>	<u>Fixierlösung I (Paraffin)</u>	<u>HE-Färbung</u>	
1. 70 % Ethanol	2 h	4 % PFA (m/v)	99,8 % ETOH	10 min
2. 80 % Ethanol	1,5 h	in PBS	96 %, 70 % ETOH	je 1 min
3. 95 % Ethanol	1,5 h		Hämalaun-Lsg. n.	10 min
4. 95 % Ethanol	2 h	<u>Fixierlösung II (Kryo)</u>	Mayer	
5. 100 % Ethanol	2 h	4 % PFA (m/v)	H <sub>2</sub> O	10 min
6. 100 % Ethanol	3 h	0,0025 % Saponin (m/v)	0,5 % Eosin-Lsg.	5 min
7. Ethanol/ Aceton (1:1)	1,5 h	in PBS	(v/v) in Aq. dest.	
8. Aceton	1 h		96 %, 70 % ETOH	je 1 min
9. Xylol	2 h	<u>Fixierlösung III (Kryo für</u>		
10. Xylol	2 h	<u>TJ-Färbungen)</u>		
11. Paraffin	2 h	4 % PFA (m/v)		
12. Paraffin	2 h	in PBS <sup>+/+</sup>		

#### *Gefrierschnitte*

Alternativ wurden Proben in Tissue Freezing-Medium in eine Peel-A-Way<sup>TM</sup>-Form eingebettet und anschließend mittels Flüssigstickstoff bei -196 °C eingefroren. Die Proben wurden bei -80 °C gelagert. Mittels eines Microm HM 560-Kryostaten wurden Schnitte von 7 µm Dicke angefertigt und mit 4 % PFA (m/v) in PBS<sup>+/+</sup> fixiert. Die Schnitte wurden bei -20°C gelagert. Diejenigen, die von CMS-ICC-behandelten Modellen abstammten, wurden zusätzlich über den gesamten Zeitraum abgedunkelt gelagert.

### *Kulturzellen*

Zur Untersuchung der Aufnahme des CMS-Nanocarriers durch gingivale Keratinozyten und Analyse des Einflusses von Differenzierungsmedium, CMS und IL-1 $\beta$  auf deren Zellmorphologie, Differenzierungsmarker und TJ-Proteine erfolgte die Aussaat von  $1,2 \times 10^4$  Keratinozyten pro Well in kollagenbeschichtete (20  $\mu\text{g/ml}$  Kollagen A (v/v) in PBS für primäre bzw. Kollagen IV für immortalisierte Keratinozyten) Nunc<sup>TM</sup> Lab-Tek<sup>TM</sup> II Chamber Slide<sup>TM</sup> Objektträger in Wachstumsmedium. Nach erreichter Konfluenz der Zellen erfolgte die Umstellung auf Differenzierungsmedium. Zur Stimulation wurde IL-1 $\beta$  (10 ng/ml) oder CMS (50  $\mu\text{g/ml}$ ) in das Kulturmedium für 24 bzw. 72 h gegeben. Bei mehrtägiger Stimulation wurde das Medium täglich erneuert. Um eine mögliche Aufnahme des Nanocarriers durch die Zellen verfolgen zu können, wurde ein Fluoreszenz-gekoppelter Nanocarrier (CMS-ICC) eingesetzt. Als CMS-Kontrolle erfolgte die Applikation des ungelabelten CMS bzw. die Kultivierung in Medium ohne Nanocarrier. Als IL-1 $\beta$ -Kontrolle diente Medium ohne IL- $\beta$ . Nach Abschluss der Inkubationszeit erfolgten drei Waschschrte mit PBS bzw. mit PBS<sup>+/+</sup> für TJ-Färbungen und die anschließende Fixierung für 15 Minuten mit 4 % PFA (m/v) in PBS bzw. PBS<sup>+/+</sup> bei RT.

#### **3.2.1.9 Indirekte Immunfluoreszenz-Analyse**

##### *Indirekte Immunfluoreszenz an Paraffinschnitten*

Für die Immunfluoreszenz-Analyse an Paraffinschnitten wurden die Schnitte zunächst mit Roti<sup>®</sup>-Histol und Ethanol entparaffiniert und hydratisiert (Tab. 2). MaxBlock<sup>TM</sup> diente zur Reduktion der Autofluoreszenz. Wenn erforderlich, wurden Zellen oder Gewebe permeabilisiert (Tab. 3). Für die bessere Zugänglichkeit von Antigenen wurde ein »Antigen-Retrieval« mittels Natrium-Citrat-Puffer durchgeführt (Zusammensetzung: 2,94 g tri-Natriumcitrat Dihydrat auf 1 l Aq. dest.; 0,5 ml Tween<sup>®</sup> 20; 10 mM, pH 6.0). Es erfolgte die antikörperspezifische Blockierung (Tab. 3). Der Primärantikörper wurde in Blockierungslösung oder alternativ in 0,05 % Tween<sup>®</sup> 20 (v/v) in PBS verdünnt und über Nacht bei 4 °C inkubiert (Tab. 4). Ausnahme bildete das Alexa Fluor<sup>®</sup> 488-gekoppelte Wheat Germ Agglutinin (WGA), das eine Inkubationszeit von 10 min benötigte. Die jeweiligen Sekundärantikörper in Blockierungslösung oder 0,05 % Tween<sup>®</sup> 20 (v/v) in PBS wurden hinzugegeben und für 1,5 h in Dunkelheit bei RT inkubiert (Tab. 5). Zur Anfärbung der Zellkerne wurde der Farbstoff bis-Benzimid Trihydrochlorid H33342 (Hoechst; 1:3000) ebenfalls in der Lösung des Sekundärantikörpers verdünnt. Als Spezifitätskontrolle wurde der Sekundär-Antikörper ohne vorherige Primär-Antikörper-Applikation aufgetragen. Als Positivkontrolle für Zellkulturversuche dienten Kryo- bzw. Paraffinschnitte humaner Gingiva.

**Tab. 2: Immunfluoreszenz an Paraffinschnitten**

<i>Protokoll</i>	<i>Agenzien</i>	<i>Applikationszeit</i>
Entparaffinieren	Roti®-Histol	2 x 5 min
Hydratisieren	100 % Ethanol	2 x 3 min
	95 %, 80 %, 70 % Ethanol	1 min
MaxBlock™	Reagenz A	5 min
	60 % Ethanol	1 min
	Aq. dest.	5 min
	0,05 % Tween® 20 (v/v) in PBS	2 x 3 min
Permeabilisierung	antikörperabhängig	antikörperabhängig
Waschen	TBS	1 min
Antigen Retrieval	Natrium-Citrat-Puffer 100 °C	40 min
	Natrium-Citrat-Puffer RT	20 min
Waschen	0,05 % Tween® 20 (v/v) in PBS	2 x 2 min
Blockierung	antikörperabhängig	antikörperabhängig
Primärantikörper	Primärantikörper	antikörperabhängig
Waschen	0,05 % Tween® 20 (v/v) in PBS	3 x 5 min
Sekundärantikörper	Sekundärantikörper	1,5 h
Waschen	0,05 % Tween® 20 (v/v) in PBS	3 x 5 min
MaxBlock™	Aq. dest.	5 min
	Reagenz B	5 min
	Aq. dest.	3 x 2 min
Trocknen	-	2 h
Eindecken	Fluoromount™	-

**Tab. 3: Permeabilisierungs- und Blockierungslösungen für die Immunfluoreszenz**

<i>Antikörper</i>	<i>Permeabilisierungslösung</i>	<i>Zeit</i>	<i>Blockierungslösung</i>	<i>Zeit</i>
Claudin-1 (37-4900)	0,5 % Triton™ X-100 (v/v) in PBS <sup>+/+</sup>	10 min	5 % BSA (m/v) in PBS <sup>+/+</sup>	1 h
Cytokeratin Pan Type I/II (MA5-13156)	0,1 % Triton™ X-100 (v/v) in PBS	10 min	3 % BSA (m/v) in PBS	1 h
Cytokeratin-5 (ab52635)	0,1 % Triton™ X-100 (v/v) in TBS	10 min	1 % BSA (m/v), 10 % GS (v/v), 0,1 % Tween® 20 (v/v) in PBS	1,5 h
Filaggrin (AE21, sc-80609)	-	-	10 % GS (v/v) in PBS	1,5 h
Ki-67 (9129S)	0,1 % Triton™ X-100 (v/v) in TBS	10 min	1 % BSA (m/v), 10 % GS (v/v), 0,1 % Tween® 20 (v/v) in PBS	1 h
Occludin (71-1500)	0,1 % Triton™ X-100 (v/v) in PBS <sup>+/+</sup>	10 min	3 % BSA (m/v) in PBS <sup>+/+</sup>	1 h
Occludin (33-1500)	-	-	5 % BSA (m/v), 0,1% Triton™ X-100 (v/v) in PBS <sup>+/+</sup>	1 h
Vimentin (bs-0756R)	-	-	1 % BSA (m/v), 10 % GS (v/v) in PBS	1 h
Vimentin (ab8978)	0,1 % Triton™ X-100 (v/v) in TBS	5 min	1 % BSA (m/v), 10 % GS (v/v), 0,1 % Tween® 20 (v/v) in PBS	1,5 h
ZO-1 (61-7300)	0,1 % Triton™ X-100 (v/v) in PBS <sup>+/+</sup>	10 min	3 % BSA (m/v) in PBS <sup>+/+</sup>	1 h

**Tab. 4: Primärantikörper**

<i>Antikörper</i>	<i>Wirt</i>	<i>Verdünnung</i>
Claudin-1 (37-4900)	Mouse	IF 1:100 WB 1:167
Cytokeratin Pan Type I/II (MA5-13156)	Mouse	IF 1:150
Cytokeratin-5 (ab52635)	Rabbit	IF 1:300
E-Cadherin (610181)	Mouse	WB 1:5000
Filaggrin (AE21, sc-80609)	Mouse	IF 1:40
Ki-67 (9129S)	Rabbit	IF 1:400
Occludin (33-1500)	Mouse	IF 1:200
Occludin (611091)	Mouse	WB 1:250
Occludin (71-1500)	Rabbit	IF 1:150
Vimentin (bs-0756R)	Rabbit	IF 1:100
Vimentin (ab8978)	Mouse	IF 1:500
ZO-1 (61-7300)	Rabbit	IF 1:150 WB 1:200
ZO-1 (610967, 610966)	Mouse	WB 1:250
β-Actin (A5316)	Mouse	WB 1:5000

**Tab. 5: Sekundärantikörper und weitere Fluoreszenz-gekoppelte Substanzen**

<i>Antikörper/ Farbstoff</i>	<i>Verdünnung</i>
bis-Benzimid Trihydrochlorid H33342	IF 1:3000
Goat anti-Mouse IgG (GAM), Alexa Fluor® 488	IF 1:4000
Goat anti-Mouse IgG (GAM), Alexa Fluor® 594	IF 1:700
Goat anti-Rabbit (GAR) IgG, Peroxidase-Konj.	WB 1:5000
Goat anti-Rabbit IgG (GAR), Alexa Fluor® 488	IF 1:2000
Goat anti-Rabbit IgG (GAR), Alexa Fluor® 594	IF 1:700
Sheep anti-Mouse (SAM) IgG, Peroxidase-Konj.	WB 1:5000
Wheat Germ Agglutinin, Alexa Fluor® 488	IF 1:200

IF – Immunfluoreszenz; WB – Western Blot

#### *Indirekte Immunfluoreszenz an Gefrierschnitten und an Kulturzellen*

Die fixierten Proben wurden durch dreimaliges Waschen mit PBS<sup>+/+</sup> für jeweils 5 Minuten äquilibriert. Die Antikörperinkubation bzw. Färbung der Zellkerne erfolgte analog zum Protokoll der Färbung an Paraffinschnitten. Anschließend wurde bei auf Glas-Objektträgern gewachsenen Kulturzellen das Trenngitter entfernt, Zellen wurden bei RT getrocknet und anschließend mit Fluoromount™ eingedeckt.

#### **3.2.1.10 Dokumentation der Mikroskopie**

Die lichtmikroskopischen Aufnahmen wurden entweder mittels Inversmikroskop Axiovert 200 und zugehöriger AxioCam b/w 412-311 im Hellfeld-Modus oder alternativ am inversen Phasenkontrastmikroskop Nikon TMS-F aufgenommen. Die Inversmikroskop-Aufnahmen wurden mit einem 20x-, 40x- oder 63x-Objektiv und Phasenkontrastmikroskop-Aufnahmen wurden mit 4x- oder 10x-Objektiv aufgenommen. Die Immunfluoreszenz-Analysen wurden

entweder mit dem Inversmikroskop Axiovert 200 in Kombination mit dem Fluoreszenzkontrollgerät Colibri erfasst oder mit dem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop LSM 700 MAT (Zeiss) aufgenommen. Diese Aufnahmen wurden mit 20- oder 63-facher Vergrößerung aufgenommen. Die Aufnahmen erfolgten mittels der Softwares ZEN black und AxioVision Release 4.8.2 SP3, die Weiterbearbeitung und Speicherung der Aufnahmen erfolgte mittels ZEN blue, ImageJ, und/ oder Adobe Photoshop. Gegenübergestellte Aufnahmen wurden mit identischen Belichtungszeiten aufgenommen und identisch bearbeitet.

### 3.2.2 Biochemische Methoden

#### 3.2.2.1 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Zur Analyse der inflammatorischen Wirkung von IL-1 $\beta$  und/ oder CMS auf humane gingivale Keratinozyten wurde die Zytokinexpression von IL-6 und IL-8 mithilfe der Sandwich-ELISA-Technik untersucht. Hierfür wurden  $2,5 \times 10^5$  OKG4-Zellen pro Well in kollagenbeschichte 6-Well-Zellkulturplatten ausplattiert und 24 h in Wachstumsmedium kultiviert. Anschließend erfolgte die Umstellung auf Differenzierungsmedium und weitere 24 h später erfolgte die Stimulation mit 10 ng/ml IL-1 $\beta$  bzw. 50  $\mu$ g/ml CMS durch tägliche Gabe über das Medium. Das Medium stimulierter und unbehandelter Zellen wurde nach 6, 24 und 72 h abgenommen und 4 min bei 900 rpm zentrifugiert. Die Überstände wurden jeweils in Duplikaten aus drei unabhängigen Experimenten gesammelt und bis zur Analyse bei -20 °C gelagert. Weiterhin wurden die Überstände von IL-1 $\beta$ -stimulierten und unstimulierten organotypischen 3D-Modellen 24 h und 8 Tage nach Stimulationsstart in Quadruplikaten (jew. 24 h nach Mediumwechsel) eingesammelt und analysiert. Die Durchführung des ELISA erfolgte nach Herstellerangaben (Appendix Tab. I). Die Auswertung der Daten und Berechnung in Konzentrationen (pg/ml) erfolgte anhand einer mitgeführten, in Duplikaten angesetzten Standardkurve und einer in Microsoft® Excel generierten linearen Regressionskurve.

#### Blockierungspuffer

0,05 % Tween® 20 (v/v)  
2 % BSA (m/v)  
in PBS

#### Waschpuffer

0,05 % Tween® 20 (v/v)  
in PBS

#### TMB-Lösung

10 mg/ml TMB (m/v) in DMSO  
1:100 in Citrat-Acetat-Puffer, pH 6,0  
Zugabe von 4  $\mu$ l 30 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> je 10 ml TMB-Lösung direkt vor TMB-Applikation

#### Stop-Lösung

0,1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

### 3.2.2.2 Human Cytokine Antibody-Array

Im Gegensatz zum ELISA bietet der Cytokine-Array den Vorteil einer breiteren Übersicht der Zytokinexpression mit simultanem Nachweis von 42 Zytokinen (Appendix Tab. II). Die Proben wurden, wie für den ELISA beschrieben, gewonnen und bei -20 °C gelagert. Der Human Cytokine Antibody-Array wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Proben wurden auf Eis aufgetaut und für 10 Minuten bei 10.000 rpm zentrifugiert. Die Inkubation der Array-Membran mit 1 ml Überstand erfolgte über Nacht bei 4 °C. Die Visualisierung der Signale erfolgte mithilfe eines VersaDoc™-Imaging-Systems unter Nutzung des Programms Quantity One. Je nach Signalintensität wurden die Belichtungszeiten zwischen 20 und 80 Sekunden gewählt.

Mittels ImageJ-Plug-in »Protein Array Analyzer« wurde die Gesamtsignaldichte pro festgelegter Flächeneinheit (Spot) ermittelt. Anschließend wurde der Background subtrahiert und die Werte in Bezug zur Positivkontrolle (auf die Membran gedruckte Biotin-konjugierte IgG-Spots) derselben Membran gesetzt. In geringen Konzentrationen sezernierte Zytokine (< 10 % der Positivkontrolle) wurden zur Vermeidung falsch positiver Ergebnisse von der Auswertung ausgeschlossen. Schließlich wurden die Signale der Überstände stimulierter Zellen auf diejenigen der Kontrollzellen bezogen, wobei Kontrollzellen auf 100 % gesetzt wurden. Es wurden drei voneinander unabhängige Experimente mit jeweils technischen Duplikaten, bei denen Mittelwerte gebildet wurden, durchgeführt.

### 3.2.2.3 Western Blot-Analyse

#### 1. Stimulation und Solubilisierung der Zellen

$2,5 \times 10^5$  OKG4-Zellen wurden in Zellkulturschalen mit einem Durchmesser von 60 mm ausgesät. Nach 24 h erfolgte die Umstellung auf Differenzierungsmedium. Die Stimulation mit IL-1 $\beta$  und/oder CMS erfolgte nach weiteren 24 h mittels Gabe über das Medium für 24 bzw. 72 h. Unstimulierte Zellen wurden stets als Kontrollen mitgeführt. Nach Abschluss der Stimulation wurden die Schalen auf Eis mit Homogenisierungspuffer gewaschen und nach Zugabe von 150  $\mu$ l Lysepuffer vom Schalenboden gelöst (Tab. 6). Anschließend erfolgte ein Schwenken der Proben für 45 Minuten bei 4 °C, gefolgt von der Zentrifugation der Lysate für 15 Minuten bei 15.200 rpm.

#### 2. Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford

Die quantitative Gesamtproteinbestimmung der gewonnenen Überstände erfolgte mittels Photometrie mithilfe der Bradford-Methode. Nach Messung des Blanks (800  $\mu$ l Aq. dest + 200  $\mu$ l Bradford-Reagenz) bei 595 nm wurden die Proben (1  $\mu$ l Proben-Überstand + 799  $\mu$ l Aq. dest +

200 µl Bradford-Reagenz) anhand einer Standardreihe analysiert. Die Messungen erfolgten jeweils in Duplikaten.

**Tab. 6: Lösungen für die Western Blot-Analyse**

Homogenisierungspuffer

50 mM  $\beta$ -Glycerophosphat pH 7,6  
1,5 mM EGTA  
1,0 mM EDTA

Lysepuffer

50 mM  $\beta$ -Glycerophosphat pH 7,6  
1,5 mM EGTA  
1,0 mM EDTA  
1 % (v/v) Triton™-X-100  
0,2 % (v/v) Protease Inhibitor Cocktail (PIC)  
0,4 % (v/v) PMSF  
100 mM Natriumvanadat  
500 mM NaF

Lösung A

Fertiglösung  
Rotiphorese® Gel 30

Lösung C

0,4 g SDS  
6,0 g Tris  
100 ml Aq. dest.  
pH 6,8

Trenngel (für 2 Gele), 10%

3 ml Lösung A  
2,25 ml Lösung B  
3,75 ml Aq. dest.  
45 µl 10% APS (m/v) in Aq. dest.  
4,5 µl TEMED

Western Blot Laufpuffer

25 mM Tris, pH 8,3 bis 8,8  
192 mM Glycin  
0,1 % SDS (m/v)  
in Aq. dest.

Ponceau S Färbelösung

0,1 % Ponceau S (m/v)  
in 5 % Essigsäure (v/v) in Aq. dest.

5x Probenpuffer, reduziert

450 µl 5x PP  
50 µl DTT-Lösung (500 mM DTT in Aq. dest.)

5x Probenpuffer (PP)

3,6 g Tris  
12,5 g SDS  
50 ml Glycerin  
100 ml Aq. dest.  
pH 6,8  
0,015 % Bromphenolblau (m/v) in Aq. dest.  
(Zugabe zur Färbung)

Lösung B

0,8 g SDS  
36,3 g Tris  
200 ml Aq. dest.  
pH 8,8

TBST

0,1 % Tween® 20  
in TBS

Sammelgel (für 2 Gele)

0,4 ml Lösung A  
0,75 ml Lösung C  
1,85 ml Aq. dest.  
12 µl, 10 % APS (m/v) in Aq. dest.  
3 µl TEMED

Western Blot Transferpuffer

25 mM Tris pH 8,0 bis 10,5  
192 mM Glycin  
in Aq. dest.

Blockierungslösung

5 % BSA (m/v)  
in TBST

### *3. Auftrennung der Proteine mittels Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)*

Zur Proteinanalyse wurde die SDS-PAGE nach Laemmli genutzt. Es wurde ein Ansatz mit einem Endvolumen von 24 µl aus 60 µg Protein, 4 µl 5x-reduzierter Probenpuffer und adjustierter Menge Aq. dest. vorbereitet, für 5 Minuten auf 95 °C erhitzt und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert. Für die SDS-PAGE wurden schließlich 60 µg denaturiertes Protein auf ein 10 % SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen und eine Spannung von 80-160 V angelegt. Anhand des mitgeführten Bandenmarkers, der auch der Zuordnung des Molekulargewichts diente, wurde die Wanderungsstrecke der Proteine beurteilt und die Elektrophorese zum gewünschten Zeitpunkt abgestoppt.

### *4. Transfer der Proteine auf eine Nitrocellulosemembran im Tankverfahren*

Via Elektrotransfer wurden die zuvor im Gel aufgetrennten Proteine auf eine Nitrocellulosemembran transferiert, indem eine Stromstärke von 0,25 A für eine Stunde angelegt wurde. Zur Überprüfung des Proteintransfers wurden die Proteine auf der Membran reversibel mit einer Ponceau S-Lösung angefärbt. Nach dem Entfärben der Membran wurden unspezifische Bindungsstellen mittels 5 % BSA (m/v) in TBST über Nacht bei 4 °C blockiert. Für den Nachweis von Claudin-1 wurde als Blockierungslösung 5 % NFDM (m/v) in TBST verwendet. Anschließend wurden die jeweiligen Primärantikörper (Tab. 4), gelöst in Blockierungslösung, hinzugefügt und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Der Claudin-1-Antikörper wurde abweichend nur für 3 h bei RT hinzugefügt. Anschließend wurden die Membranen 1 h in TBST bei RT gewaschen. Hierbei wurde der Waschpuffer alle 5 Minuten erneuert. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem jeweiligen Sekundärantikörper für 1 h bei RT (Tab. 5).

Vor der Darstellung der Signale mittels VersaDoc™ Imaging-Systems wurden die Membranen erneut 1 h gewaschen und anschließend mit Chemilumineszenz-Reagenz (Western Lightning® Plus-ECL) benetzt. Abhängig von den Signalintensitäten wurden die Membranen mithilfe der Software Quantity One zwischen 80 und 240 s belichtet. Die Auswertung erfolgte mittels ImageJ. Hierfür wurden die gemessenen Intensitäten der einzelnen Banden auf die der Ladekontrolle bezogen. Weiterhin wurden die Banden IL-1β- bzw. CMS-stimulierter Ansätze in Bezug zur Kontrollgruppe gesetzt. Die abgebildeten repräsentativen Proteinbanden wurden unter identischen Bedingungen mittels Quantity One und/ oder ImageJ bearbeitet.



### 3.2.3 Statistische Analyse

Statistische Unterschiede zwischen zwei Gruppen wurden mithilfe des Student-t-Tests berechnet, wenn eine Normalverteilung der Daten vorlag. Diese wurde mittels Shapiro-Wilk-Test verifiziert. Andernfalls wurden die Signifikanzen durch den Mann-Whitney-U-Test bestimmt. Da die Haupthypothese den Vergleich von Kontroll- und einer Testgruppe erforderte, ergab sich keine Relevanz für multiples Testen. Alle Experimente wurden mindestens dreimal durchgeführt. Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung, wenn nicht anders angezeigt. Das Symbol \* zeigt signifikante Unterschiede zwischen Test- und Kontrollgruppe an (\*  $0,01 \leq p < 0,05$ ; \*\*  $0,001 \leq p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ). Die statistische Analyse erfolgte in Korrespondenz mit dem Institut für Biometrie der Charité Berlin.

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Charakterisierung gingivaler Epithelzellen

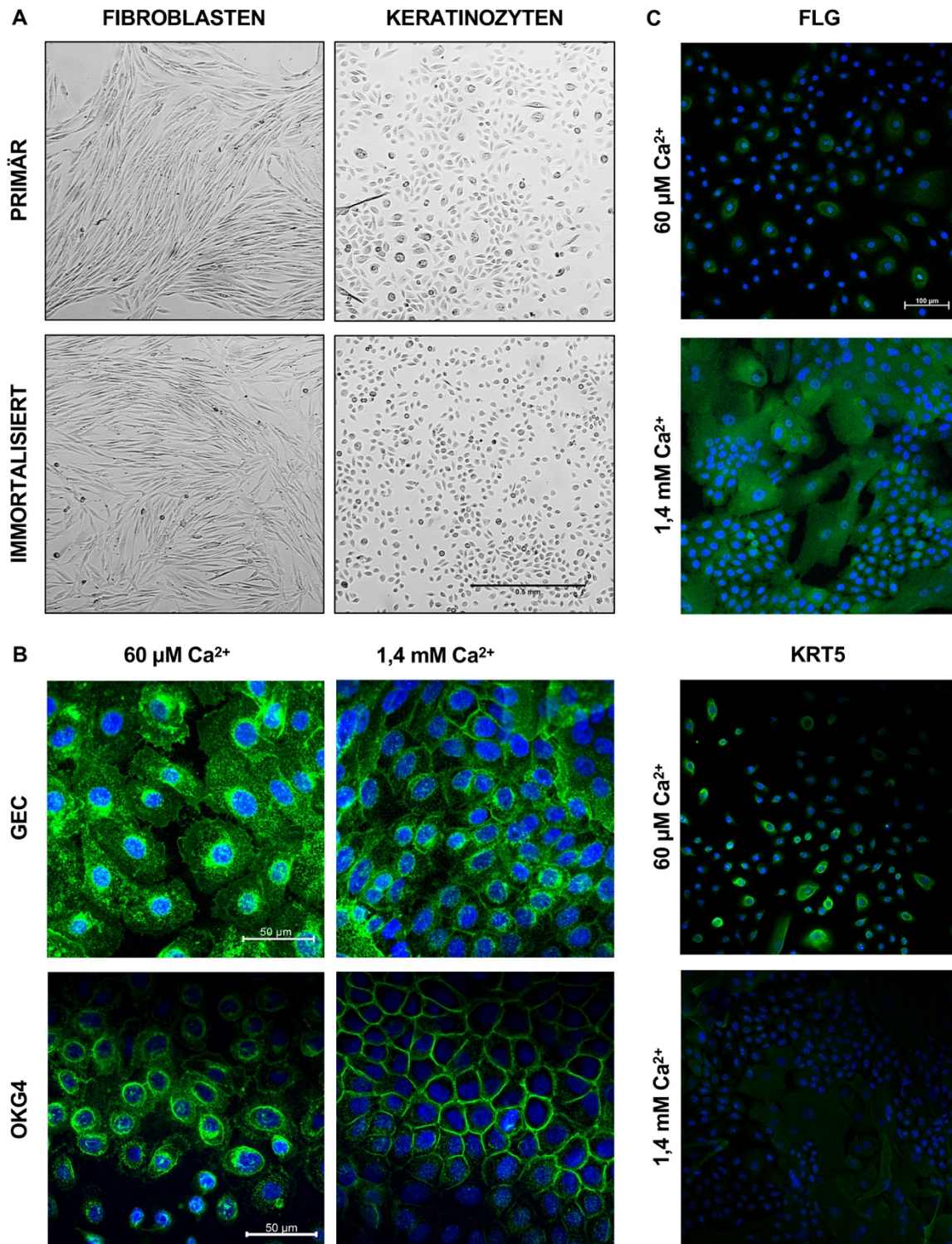
#### 4.1.1 Morphologische Charakterisierung

In dieser Arbeit wurden hTERT-immortalisierte humane gingivale Keratinozyten (OKG4) und Fibroblasten (IHGF) verwendet. Um zu überprüfen, ob diese immortalisierten Zelllinien in wesentlichen Merkmalen mit den entsprechenden primären Zellen übereinstimmen und damit zur Etablierung gingivaler Modelle eingesetzt werden können, wurden primäre Zellen aus Gewebeproben, freundlicherweise zur Verfügung gestellt von der Klinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie, Charité Universitätsmedizin Berlin, im Labor isoliert. Morphologisch waren sich sowohl immortalisierte und primäre Fibroblasten als auch immortalisierte und primäre Keratinozyten sehr ähnlich (Abb. 5A). Allerdings erschienen die primären Keratinozyten etwas heterogener in Form und Größe als die immortalisierten Zellen. Dies mag der Tatsache geschuldet sein, dass bei der Präparation generell Zellen unterschiedlicher Differenzierungsstadien isoliert werden.

Durch Erhöhung der Calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ )-Konzentration kann in gingivalen Keratinozyten die terminale Differenzierung induziert werden (Wille et al., 1990). Mithilfe der Fluoreszenzmikroskopie und des Alexa Fluor<sup>®</sup> 488-gekoppelten Weizenkeim-Agglutinins (WGA), welches an Sialinsäure und N-Acetylglucosamin-Einheiten auf Zelloberflächen bindet und sich somit als Plasmamembranmarker eignet, konnte dieser Differenzierungsprozess in der 2D-Zellkultur an primären und immortalisierten gingivalen Epithelzellen morphologisch erfasst werden (Abb. 5B). In Medium mit hoher  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration (1,4 mM) bildeten sich sowohl in GEC als auch in OKG4 enge Zell-Zell-Kontakte im Vergleich zu Zellen, die in Medium mit geringer  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration (60  $\mu\text{M}$ ) kultiviert wurden.

Immortalisierte Zellen zeigten eine ähnliche Morphologie wie primäre Zellen. Um weiterhin zu überprüfen, ob immortalisierte Keratinozyten auch zur stadienspezifischen Expression von Differenzierungsmarkern befähigt sind, wurden Markermoleküle mithilfe der indirekten Immunfluoreszenz-Analyse untersucht (Abb. 5C). Filaggrin (FLG) als Marker differenzierter Zellen wurde hierbei in wenigen primären gingivalen Keratinozyten in Medium mit niedrigem  $\text{Ca}^{2+}$ -Gehalt exprimiert. Dies liegt vermutlich ebenfalls darin begründet, dass bei der Präparation Zellen aller Differenzierungsstadien, dementsprechend auch differenzierte Zellen, gewonnen wurden. Diese Filaggrin-positiven Zellen zeigten eine rundliche Morphologie und bildeten keine Zell-Zell-Kontakte aus. Mit  $\text{Ca}^{2+}$ -Anstieg nahm die Anzahl Filaggrin-positiver Zellen zu und die Zellen waren in Zellverbänden organisiert. Einige Zellen wiesen ein vergrößertes Zytoplasma sowie Zellausläufer auf, die Zellverbände miteinander vernetzten. Cytokeratin-5 (KRT5), ein basaler

Differenzierungsmarker, konnte in Zellen, die in geringer  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration kultiviert wurden, zytosolisch lokalisiert nachgewiesen werden. Bei Zellen, die in Anwesenheit einer hohen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration kultiviert wurden, war Cytokeratin-5 nicht mehr nachweisbar.



**Abb. 5: Histologische und immunfluoreszenzanalytische Charakterisierung gingivaler Zellen**

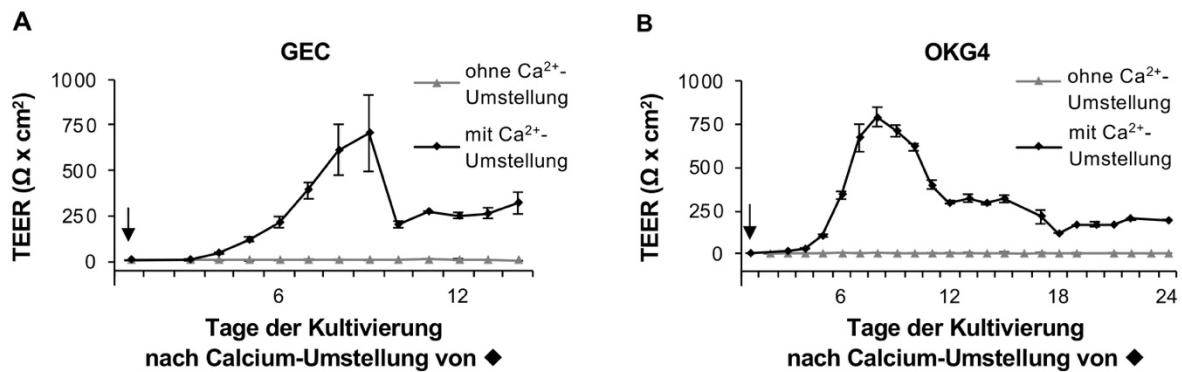
(A) Durchlichtmikroskopie primärer und immortalisierter Zellen in der Zellkultur, Maßstabsbalken 0,5 mm; (B, C) gingivale Keratinozyten wurden in kollagenbeschichteten 8-Kammer-Objekträgern ausgesät und bei Erreichen

einer Konfluenz > 30 % auf Differenzierungsmedium umgestellt oder in Wachstumsmedium belassen und für 48 h kultiviert. Anschließend wurden die Zellen fixiert und mit Fluoreszenz-gekoppeltem WGA oder mit Antikörpern gegen Filaggrin (FLG) und Cytokeratin-5 (KRT5) und dem jeweiligen Sekundär-Antikörper inkubiert (grün). Zellkerne wurden mittels Hoechst 33342 dargestellt (blau). (B) WGA-Fluoreszenz an GEC und OKG4-Zellen, die in Medium mit 60  $\mu\text{M}$  und 1,4 mM  $\text{Ca}^{2+}$  kultiviert wurden, Maßstabsbalken 50  $\mu\text{m}$ . (C) Immunfluoreszenz-Analyse der Differenzierungsmarker FLG und KRT5 an primären gingivalen Keratinozyten, Maßstabsbalken 100  $\mu\text{m}$ . Die Bearbeitung der Bilder erfolgte mit ZEN und ImageJ.

#### 4.1.2 Untersuchung der gingivalen physikalischen Barriere *in vitro*

Gingivale Epithelzellen bilden eine physikalische Barriere aus, um zum einen das Eindringen externer Substanzen und Mikroorganismen und zum anderen das Austreten körpereigener Stoffe wie Wasser zu verhindern. Um zu überprüfen, ob diese Barriere auch *in vitro* von gingivalen Epithelzellen gebildet wird, wurde der transepitheliale elektrische Widerstand (TEER), welcher ein akzeptiertes Maß für die Barriereintegrität eines Gewebes ist, in konfluenten GEC und OKG4-Zellen über die Zeit ermittelt. Mittels Millicell<sup>®</sup> ERS-2 Epithelial Volt-Ohm-Meter in Kombination mit einer EndOhm-12-Kammer wurde der TEER der Zellen in Gegenwart einer niedrigen oder hohen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration bestimmt (Abb. 6).

Für GEC, die unter 60  $\mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$  kultiviert wurden, konnte über einen Zeitraum von 14 Tagen ein durchschnittlichen TEER von  $8,73 \pm 2,54 \Omega \times \text{cm}^2$  ermittelt werden (Abb. 6A). Bei Gabe eines Differenzierungsmediums mit 1,4 mM  $\text{Ca}^{2+}$  (Pfeil) zeigte sich ein biphasischer Verlauf des Widerstands über die Zeit. Zunächst stieg der TEER stetig an und erreichte am Tag 9 nach Erhöhung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration ein Maximum von  $706,50 \pm 470,29 \Omega \times \text{cm}^2$ . Anschließend nahm der TEER ab und blieb zwischen Tag 10 und 14 mit einem Mittelwert von  $264,11 \pm 39,85 \Omega \times \text{cm}^2$  stabil. Die OKG4-Zellen verhielten sich in Bezug auf den TEER sehr ähnlich (Abb. 6B). Bei einem  $\text{Ca}^{2+}$ -Gehalt von 60  $\mu\text{M}$  im Medium lagen die Widerstände bei  $4,98 \pm 1,78 \Omega \times \text{cm}^2$ . Nach Gabe des Differenzierungsmediums stieg der TEER an und zeigte ein Maximum 8 Tage nach  $\text{Ca}^{2+}$ -Umstellung. Hier lagen Widerstände im Mittel bei  $791,73 \pm 176,96 \Omega \times \text{cm}^2$ . Anschließend nahm der Widerstand ab und blieb im Weiteren konstant bei durchschnittlich  $224,55 \pm 68,64 \Omega \times \text{cm}^2$  zwischen Tag 12 und 24.



**Abb. 6: Bestimmung des TEER über die Zeit an GEC und OKG4-Zellen**

Entwicklung des TEER im zeitlichen Verlauf bei GEC (A; 1,4 mM Ca<sup>2+</sup>: n = 14 aus drei unabhängigen Versuchen, 60 μM Ca<sup>2+</sup>: n = 3 aus drei unabhängigen Versuchen, wobei die Zellen von drei verschiedenen Spendern stammten) und OKG4 (B; 1,4 mM Ca<sup>2+</sup>: n = 20 aus drei unabhängigen Versuchen, 60 μM Ca<sup>2+</sup>: n = 3 aus 3 unabhängigen Versuchen); Widerstände der Zellen in Medium mit 60 μM Ca<sup>2+</sup> (▲) bzw. 1,4 mM Ca<sup>2+</sup> (◆); Fehlerbalken repräsentieren Standardfehler des Mittelwerts; TEER wurde mittels EndOhm-12-Kammer und Volt-Ohm-Meter Millicell® ERS-2 bestimmt, der Wert des Blanks wurde subtrahiert und der Widerstand in Bezug zur Transwell®-Fläche gesetzt (Ω x cm<sup>2</sup>).

## 4.2 Etablierung humaner gingivaler 3D-Modelle

Im Rahmen der Arbeit wurden humane gingivale 3D-Modelle etabliert, welche zur Untersuchung grundlagenmedizinischer Fragestellungen bezüglich physiologischer und pathologischer Prozesse der Mundschleimhaut, aber auch für die Charakterisierung neuartiger Wirkstoff-Carrier-Systeme herangezogen werden können. Ein Modell zur Beantwortung unserer Fragestellungen wurde bisher nicht etabliert. Der Fokus des etablierten 3D-Modells dieser Arbeit lag auf der Verwendung humaner gingivaler Fibroblasten und Keratinozyten, der Entwicklung eines mehrschichtigen, differenzierten Epithels und der Induktion und Validierung einer Entzündung.

### 4.2.1 Charakterisierung von Differenzierungsmarkern der gesunden humanen Gingiva

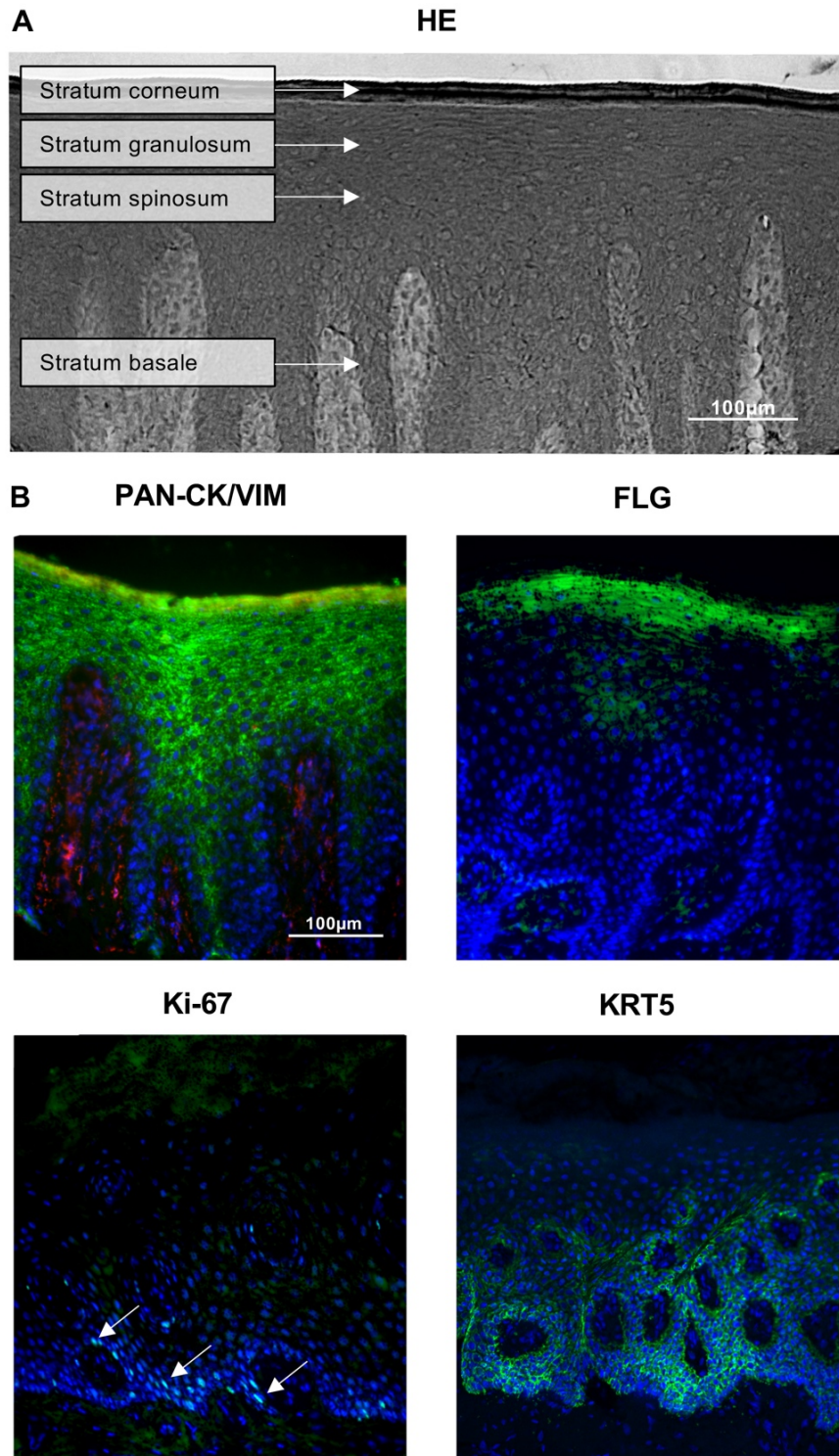
Um die zu etablierenden gingivalen Modelle hinsichtlich Histologie und Differenzierungszustand ausreichend beurteilen zu können, wurden zunächst Mikroschnitte humaner gesunder Gingiva mittels HE-Färbung und indirekter Immunfluoreszenz-Analyse charakterisiert (Abb. 7). Die HE-Färbung ermöglichte die Übersicht des Gewebes sowie die Visualisierung morphologischer Unterschiede im Verlauf der Differenzierung der Keratinozyten, die im *Stratum basale* (SB) eine kubische Form aufwiesen, über das *Stratum spinosum* (SS) hin zum *Stratum granulosum* (SG) abflachten und im *Stratum corneum* (SC) ihren Zellkern verloren (Abb. 7A). Ergänzend wurde die epitheliale Komponente mithilfe eines Pan-Cytokeratin-Antikörpers (PAN-CK, grün), der multiple Keratin-Typen detektiert, visualisiert (Abb. 7B). Das unter dem Epithel liegende Bindegewebe,

die *Lamina propria*, wurde mit einem Antikörper, der das Protein Vimentin (VIM, rot) erkennt, welches spezifisch von Fibroblasten exprimiert wird, dargestellt. Der terminale Differenzierungsmarker Filaggrin (FLG) war hauptsächlich im SG und im SC lokalisiert. Marker basaler Keratinozyten, wie Ki-67 und Cytokeratin-5 (KRT5) zeigten positive Signale in basalen Bereichen des Epithels.

#### **4.2.2 Etablierung epithelialer gingivaler 3D-Modelle**

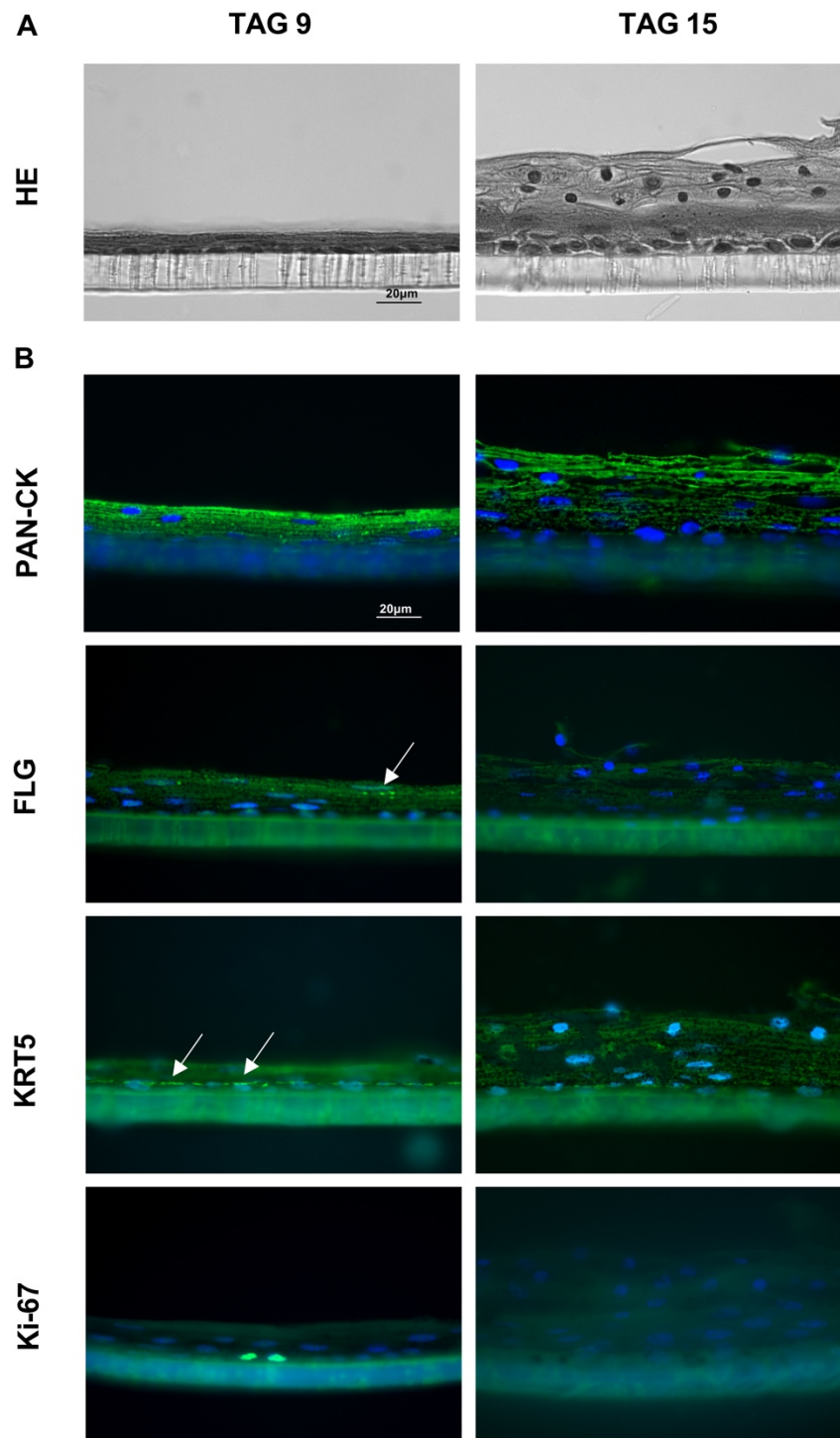
In einem ersten Schritt wurde ein epitheliales 3D-Modell entwickelt. Hierzu wurden gingivale Keratinozyten über neun oder über 15 Tage auf Transwell®-Filtern kultiviert und anschließend fixiert (Abb. 8). Während der Kultivierungsdauer bildeten die Keratinozyten einen mehrschichtigen Aufbau, dessen Höhe über die Zeit signifikant zunahm (Tag 9:  $13,76 \pm 2,92 \mu\text{m}$ ; Tag 15:  $37,32 \pm 7,58 \mu\text{m}$ ;  $p = 0,002$ ; Appendix Tab. XII). Darüber hinaus wiesen die Zellen in unterschiedlichen Schichten unterschiedliche morphologische Eigenschaften auf (Abb. 8A). Analog zur Gingiva (Abb. 7) erschienen die Zellen der basalen Schicht kubisch und die Zellen der apikalen Schichten zeigten eine Abflachung. Im späten Stadium der Kultivierung wurde ein Abschilfern der obersten Zellen beobachtet. Dies legte einen Differenzierungsprozess dieses Modells nahe, welcher detaillierter durch Nachweis unterschiedlicher Differenzierungsmarker in Immunfluoreszenz-Analysen untersucht wurde (Abb. 8B).

Mithilfe eines Pan-Cytokeratin-Antikörpers wurde der epitheliale Ursprung des mehrschichtigen Aufbaus belegt. Die Immunfluoreszenz-Analyse für den terminalen Differenzierungsmarker Filaggrin zeigte zu beiden untersuchten Zeitpunkten in diesem Modell positive Signale ausschließlich in den obersten Zellschichten. Dies deckt sich mit Befunden der Färbung an nativer Gingiva (Abb. 7B). Die basalen Differenzierungsmarker wurden primär an Tag 9 detektiert, nahmen aber mit zunehmender Kultivierungsdauer ab. So zeigte die Färbung der Schnitte mit einem Antikörper gegen Cytokeratin-5 eine spezifische Färbung der basalen Zellen. Diese basale Spezifität war am Tag 15 der Kultivierung reduziert. Ki-67-positive Zellen fanden sich ausschließlich im frühen Stadium der Kultivierung und analog zu den Befunden an humaner Gingiva nur in der basalen Zellschicht.



**Abb. 7: Histologische und immunfluoreszenzanalytische Charakterisierung der Gingiva**

(A) HE-Färbung sowie (B) Nachweis spezifischer Differenzierungsmarker mittels Immunfluoreszenz-Analyse von repräsentativen Schnitten (5-7 µm) der adulten humanen Gingiva. (A) Die HE-Färbung erfolgte mittels Hämalaun-Lösung nach Mayer und 0,5% Eosin-Lösung (v/v) in Aq. dest. und ermöglicht die Übersicht des gingivalen Gewebes, Maßstabsbalken 100 µm. (B) Paraffinschnitte wurden mit dem jeweiligen primären und passenden sekundären Antikörper gefärbt (grün/ rot). Die Zellkerne wurden mit Hoechst 33342 gegengefärbt (blau). Dargestellt sind Färbungen mit Pan-Cytokeratin (grün)/Vimentin (rot), Filaggrin, Ki-67 (grün, Pfeile deuten auf basale Ki-67-positive Zellen) und Cytokeratin-5 (grün); Bildbearbeitung erfolgte mittels ZEN oder AxioVision und Adobe Photoshop; Maßstabsbalken 100 µm.



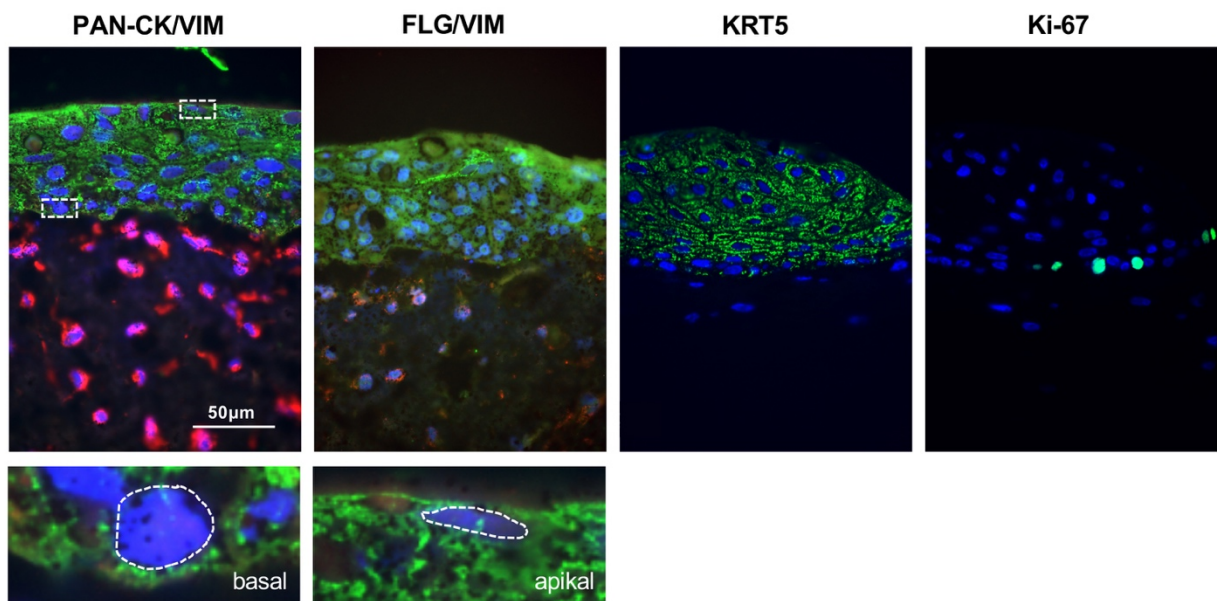
**Abb. 8: Differenzierungsmarker werden Stratum-spezifisch in epithelialen gingivalen 3D-Modellen exprimiert**

HE-Färbung (A) sowie Immunfluoreszenz-Analyse (B) repräsentativer Modelle, aufgebaut aus OKG4-Zellen, an Tag 9 der Kultivierung (Tag 7 nach Erhöhung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration, links) bzw. an Tag 15 der Kultivierung (Tag 13 nach Erhöhung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration, rechts). Nach PFA-Fixierung erfolgte die Paraffineinbettung. 5-7  $\mu\text{m}$ -Schnitte der Modelle wurden hergestellt. (A) Die HE-Färbung erfolgte mittels Hämalaun-Lösung nach Mayer und 0,5 % Eosin-Lösung (v/v) in Aq. dest. (B) Für die Immunfluoreszenz-Analyse wurden Paraffinschnitte mit dem jeweiligen Antikörper inkubiert (grün), die Gegenfärbung der Zellkerne erfolgte mittels Hoechst 33342 (blau). Dargestellt sind Färbungen für Pan-Cytokeratin, Filaggrin, Ki-67 und Cytokeratin-5; Pfeile deuten auf spezifische Signale in obersten (FLG) bzw. basalen (KRT5) Zellschichten. (A, B) Bildbearbeitung und -optimierung erfolgte mittels ZEN oder AxioVision und Adobe Photoshop, Maßstabsbalken 20  $\mu\text{m}$ .



#### 4.2.3 Etablierung organotypischer gingivaler 3D-Schleimhautäquivalente

Der zuvor beschriebene Ansatz des epithelialen Modells bildet eine vereinfachte Version der Gingiva ab. So fehlt in diesem Modell die physiologisch unter dem Epithel liegende *Lamina propria*, ein Bindegewebe, das durch Fibroblasten aufgebaut wird (Abb. 7B). Daher wurde in einem weiteren Schritt das epitheliale Modell zu einem 3D-Modell mit Bindegewebe («full-thickness») erweitert (Abb. 9). Die Pan-Cytokeratin/Vimentin-Übersichtsfärbung belegte die klare Trennung zwischen epithelialer (grün) und bindegewebiger Komponente (rot) des 3D-Modells. Das gebildete Epithel war mehrschichtig und dessen Keratinozyten flachten von basal nach apikal hin ab (Abb. 9). Die Charakterisierung des Modells anhand verschiedener Differenzierungsmarker ergab eine ähnliche Lokalisation innerhalb des epithelialen Aufbaus wie in nativer Gingiva (Abb. 7). Filaggrin wurde ausschließlich in den oberen, differenzierten Schichten exprimiert, wohingegen Cytokeratin-5 weniger spezifisch exprimiert, jedoch verstärkt in der basalen Hälfte des epithelialen Aufbaus beobachtet wurde. Ki-67 wurde ausschließlich in einigen Zellen der basalen Zellschicht nachgewiesen.



**Abb. 9: Differenzierungsmarker werden Stratum-spezifisch in organotypischen gingivalen 3D-Schleimhautäquivalenten exprimiert**

Immunfluoreszenz-Analyse eines repräsentativen gingivalen 3D-Modells; hierfür wurden  $1 \times 10^4$  IHGF-Fibroblasten in einem Kollagengel eingebettet und für 4-7 Tage in Wachstumsmedium kultiviert. Nach Kontraktion des Kollagengels erfolgte die Applikation von  $1 \times 10^6$  OKG4-Keratinozyten und Ko-Kultivierung der Zellen für 2-3 Tage. Anschließend wurde das Modell an die Luft-Flüssigkeitsgrenze angehoben (Airlift) und wurde submers mit Differenzierungsmedium versorgt. Die Kultivierung erfolgte für weitere 8-12 Tage. Die Modelle wurden fixiert und in Paraffin eingebettet. 5 µm-Schnitte wurden für die Immunfluoreszenz-Analyse von Pan-Cytokeratin/Vimentin, Filaggrin/Vimentin, Cytokeratin-5 und Ki-67 verwendet. Die Bildbearbeitung erfolgte mittels AxioVision und Adobe Photoshop, Maßstabsbalken 50 µm.

### **4.3 Einfluss proinflammatorischer Zytokine auf gingivale Keratinozyten**

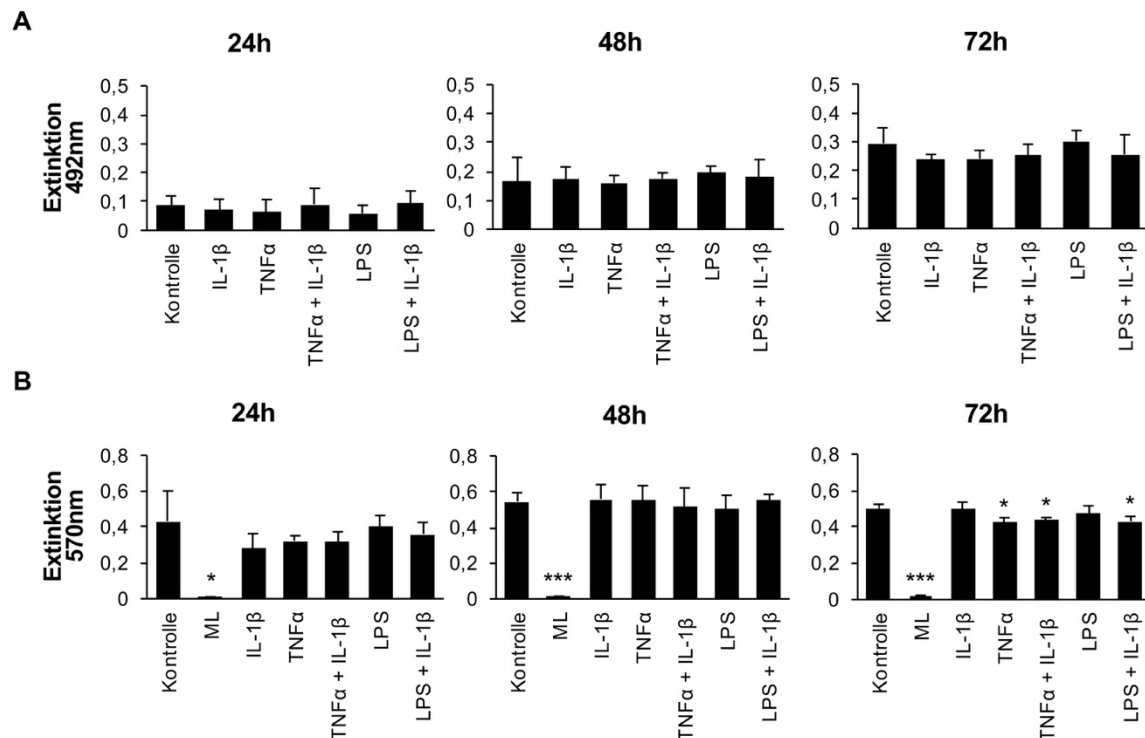
In einem nächsten Schritt sollte ein inflammatorisches 3D-Modell entwickelt werden. Auf diese Weise können einerseits entzündliche Erkrankungen der Gingiva simuliert und untersucht werden und andererseits potenzielle antiinflammatorische Medikamente getestet und bewertet werden. Um einen reproduzierbaren entzündlichen Zustand gingivaler 3D-Modelle zu ermöglichen, der die Viabilität der Zellen unbeeinflusst lassen sollte, wurden zunächst entzündungsauslösende Zytokine und Membranbestandteile von Bakterien an gingivalen Keratinozyten getestet.

#### **4.3.1 Einfluss proinflammatorischer Zytokine auf Proliferation und metabolische Aktivität**

Mithilfe des SRB-Assays, der die Zellmasse und damit die Zellzahl erfasst, konnte gezeigt werden, dass die Anzahl der gingivalen Keratinozyten über die Zeit zunahm (Appendix Tab. III, IV). Nach Zugabe proinflammatorischer Agenzien für 24, 48 und 72 h konnte weder durch IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$  und LPS, noch durch die Kombination von TNF $\alpha$  und IL-1 $\beta$  sowie LPS und IL-1 $\beta$  ein signifikanter Effekt auf die Zellmasse gingivaler Keratinozyten beobachtet werden (Abb. 10A).

Zusätzlich wurde ein MTT-Assay zur Überprüfung der metabolischen Aktivität, die mit der Viabilität korreliert, durchgeführt (Abb. 10B). Eine signifikante Abnahme der metabolischen Aktivität wurde erwartungsgemäß bei der Positivkontrolle (24 h,  $p = 0,016$ ; 48 h,  $p < 0,001$ ; 72 h,  $p < 0,001$ ) beobachtet, bei der die Zellen mit einer Triton<sup>TM</sup> X-100-Lösung maximal lysiert (ML) wurden (Appendix Tab. V, VI). Hier zeigte sich, dass TNF $\alpha$  ( $p = 0,049$ ), sowie die Kombinationen aus TNF $\alpha$  und IL-1 $\beta$  ( $p = 0,033$ ), sowie LPS und IL-1 $\beta$  ( $p = 0,042$ ) die metabolische Aktivität gingivaler Keratinozyten nach 72 h signifikant herabsetzten.

Um gingivale Keratinozyten und davon abgeleitete Modelle in einen entzündeten Zustand zu versetzen, sollte das geeignete Zytokin keine zytotoxischen oder proliferativen Wirkungen verursachen. Diese Voraussetzungen erfüllte das Zytokin IL-1 $\beta$ , das im genannten Zeitraum weder im MTT- noch im SRB-Assay signifikante Effekte auf gingivale Keratinozyten aufzeigte.

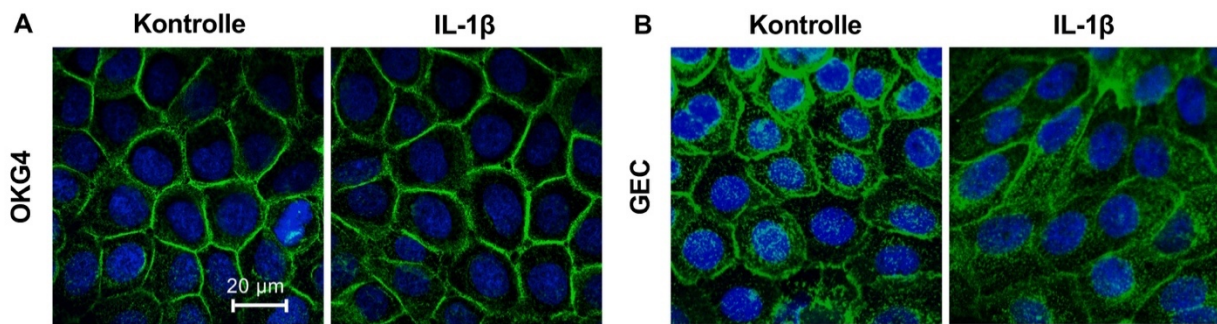


**Abb. 10: IL-1 $\beta$  beeinflusst nicht Zellmasse und metabolische Aktivität gingivaler Keratinozyten**

(A) SRB-Assay;  $1 \times 10^4$  OKG4-Zellen pro Well wurden in kollagenbeschichtete 96-Well-Platten ausgesät und am nächsten Tag mit 10 ng/ml IL-1 $\beta$ , 10 ng/ml TNF $\alpha$ , je 10 ng/ml TNF $\alpha$  + IL-1 $\beta$ , 100 ng/ml LPS oder 100 ng/ml LPS + 10 ng/ml IL-1 $\beta$  stimuliert. Nach 24, 48 und 72 h erfolgte die Applikation von 10 % TCA (m/v) in Aq. dest., die Färbung der Zellen mit SRB-Lösung, Solubilisierung in Tris-Lösung und Messung der Extinktionen bei 492 nm im Photometer. (B) MTT-Assay; Aussaat und Stimulation erfolgten analog zum SRB-Assay. Als Positivkontrolle wurden Zellen mit 4 % Triton™ X-100-Lösung maximal lysiert (ML). Nach Abschluss der Stimulationszeit wurde MTT-Lösung hinzugefügt, gefolgt von »saurem« Isopropanol. Die umgesetzte Farbstoffmenge wurde bei 570 nm im Photometer bestimmt; (A, B) Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung; \* zeigt signifikante Unterschiede zwischen Test- und Kontrollgruppe an (ML 24 h,  $p = 0,016$ ; ML 48 h,  $p < 0,001$ ; ML 72 h,  $p < 0,001$ ; TNF $\alpha$  72 h,  $p = 0,049$ ; TNF $\alpha$ +IL-1 $\beta$  72 h,  $p = 0,033$ ; LPS+IL-1 $\beta$  72 h,  $p = 0,042$ ).

#### 4.3.2 Einfluss von IL-1 $\beta$ auf die Zell-Morphologie

Um den Einfluss von IL-1 $\beta$  auf die Morphologie gingivaler Keratinozyten zu untersuchen, wurden OKG4-Zellen und GEC für 24 h bzw. 72 h mit IL-1 $\beta$  stimuliert oder unstimuliert unter Differenzierungsmedium kultiviert (Abb. 11, Appendix Abb. I). Mithilfe des Lektins WGA und der Fluoreszenz-Analyse konnte gezeigt werden, dass IL-1 $\beta$  keinen Einfluss auf die Morphologie der Zellen hatte. Da IL-1 $\beta$  als Schlüssel-Zytokin in die Pathogenese der Parodontitis involviert ist und das Zytokin gingivale Keratinozyten in der gewählten Konzentration über den untersuchten Zeitraum hinsichtlich Zellmasse, metabolischer Aktivität und Morphologie nicht beeinflusste, wurde dieses Zytokin weiterführend zur Etablierung entzündlicher gingivaler Modelle verwendet.



**Abb. 11: IL-1 $\beta$  beeinflusst nicht die Zellmorphologie gingivaler Keratinozyten**

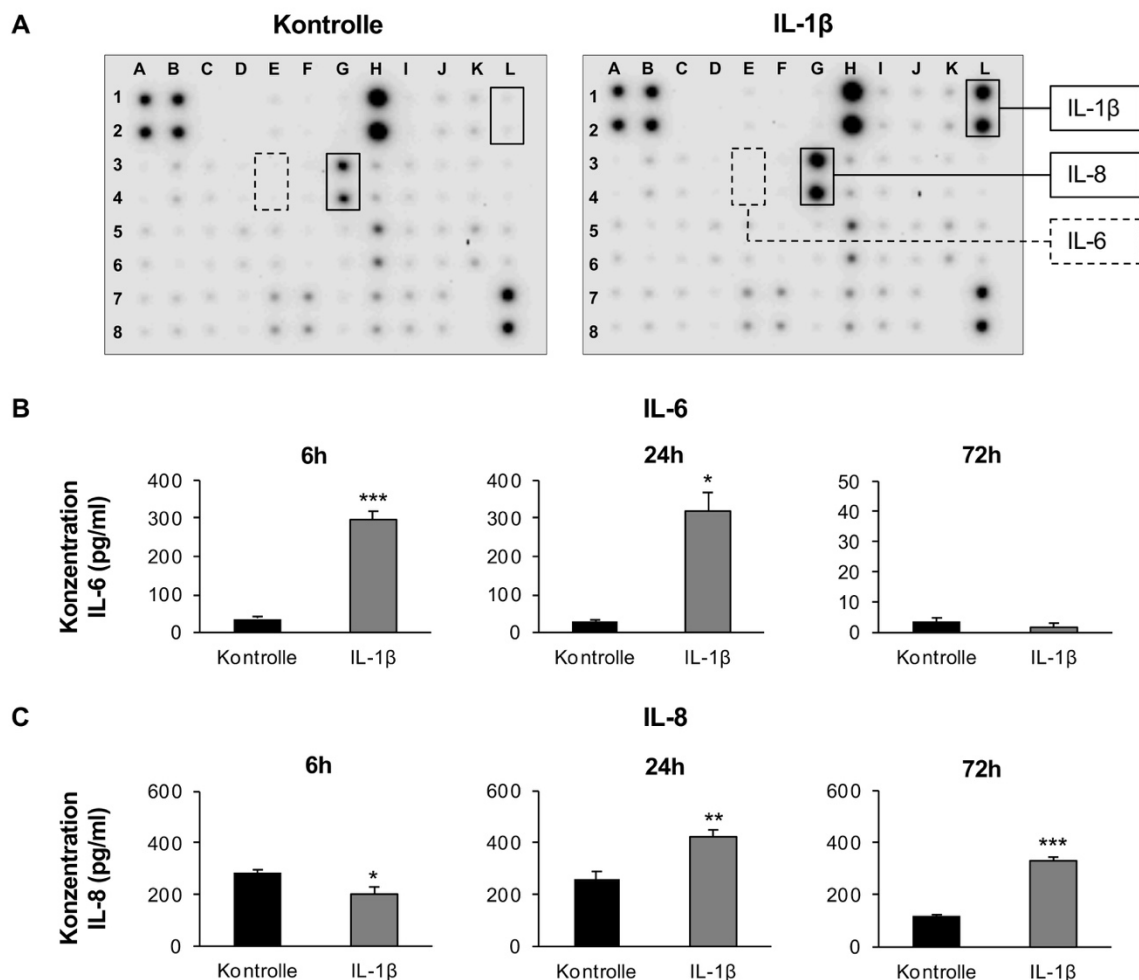
WGA-Fluoreszenz-Analyse an differenzierten OKG4-Zellen (A) und GEC (B) in An- und Abwesenheit von IL-1 $\beta$ .  $1,2 \times 10^4$  OKG4-Zellen bzw. GEC wurden in 8-Kammer-Objektträgern kultiviert und über 24 h (OKG4) bzw. 72 h (GEC, weitere Färbungen s. Appendix Abb. I) mit IL-1 $\beta$  stimuliert oder unstimuliert kultiviert. Nach Ende der Stimulationszeit wurden die Zellen fixiert und mit WGA-Alexa Fluor<sup>®</sup> 488 (grün) sowie Hoechst 33342 (blau) zur Visualisierung von Zellmembranen und -kernen inkubiert. Die Bildbearbeitung erfolgte mit ZEN und ImageJ, Maßstabsbalken 20  $\mu$ m.

#### 4.3.3 Einfluss von IL-1 $\beta$ auf die Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen

Um zu untersuchen, ob IL-1 $\beta$  in gingivalen Keratinozyten eine Entzündungsreaktion auslösen könnte, wurde ein Human Cytokine Antibody-Array eingesetzt, der mit Zellkulturüberstand IL-1 $\beta$ -stimulierter oder unstimulierter Zellen inkubiert wurde. Unterschiedliche Konzentrationen proinflammatorischer Zytokine können durch Vergleich der Array-Membran sichtbar gemacht werden (Abb. 12A, Appendix Tab. II). IL-1 $\beta$  wurde zur Stimulation dem Medium hinzugegeben und konnte nach 72 h in der stimulierten Gruppe in signifikant erhöhter Konzentration nachgewiesen werden ( $p = 0,044$ ; Appendix Tab. VII). Darüber hinaus war auch die Konzentration des Chemokins IL-8 im Kulturmedium unter diesen Bedingungen signifikant erhöht ( $p = 0,04$ ). IL-6, ein klassisches »frühes« proinflammatorisches Zytokin, konnte in beiden Ansätzen nur in geringen Mengen nachgewiesen werden. Daher wurden IL-6 und IL-8 in einem weiteren Verfahren, dem Enzyme-linked Immunosorbent-Assay (ELISA) zu früheren Zeitpunkten genauer untersucht (Abb. 12B, C; Appendix Tab. VIII, IX). Mithilfe des ELISA wurde gezeigt, dass nach 72 h IL-1 $\beta$ -Stimulation der Zellen die Konzentration an IL-8 im Vergleich zu unstimulierten Zellen signifikant erhöht war ( $p < 0,001$ ), während IL-6 in beiden Ansätzen nur in geringen Mengen nachzuweisen war. Diese Ergebnisse bestätigten daher die mittels Cytokine-Array erhobenen Daten. Für IL-8 wurde nach 72 h eine Konzentration von  $118,12 \pm 6,02$  pg/ml in der Kontrollgruppe detektiert. Die IL-1 $\beta$ -Stimulation resultierte in einem signifikanten Anstieg von IL-8 auf  $330,99 \pm 14,39$  pg/ml. IL-6 war in niedrigen Konzentrationen sowohl in der Kontrolle ( $3,66 \pm 1,24$  pg/ml) als auch in der Testgruppe ( $1,77 \pm 1,37$  pg/ml) vorhanden.

Während IL-6 nach 72 h Stimulation kaum nachgewiesen werden konnte, wurde dieses Zytokin nach 24 h in IL-1 $\beta$ -behandelten Zellen ( $319,47 \pm 48,87$  pg/ml) mit signifikant höheren Werten im

Vergleich zur Kontrollgruppe ( $26,86 \pm 6,37$  pg/ml) detektiert ( $p = 0,01$ ). Bereits nach 6 h war die Sekretion von IL-6 in IL-1 $\beta$ -behandelten Zellen ( $296,85 \pm 21,84$  pg/ml) im Vergleich zu Kontrollzellen ( $37,62 \pm 4,32$  pg/ml) signifikant erhöht ( $p < 0,001$ ). IL-8 war in gingivalen Zellen, die mit IL-1 $\beta$  ( $423,73 \pm 26,72$  pg/ml) behandelt wurden, im Vergleich zu Kontrollzellen ( $259,55 \pm 30,32$  pg/ml) ebenfalls nach 24 h signifikant erhöht ( $p = 0,003$ ). Nach 6 h Stimulation zeigten Zellen, die mit IL-1 $\beta$  behandelt wurden, eine signifikant geringere IL-8-Konzentration ( $202,36 \pm 27,91$  pg/ml) im Vergleich zu Kontrollzellen ( $285,29 \pm 11,47$  pg/ml;  $p = 0,013$ ). Damit zeigten die beiden Zytokine IL-6 und IL-8 ein unterschiedliches Muster in Bezug auf den zeitlichen Verlauf, mit dem die gingivalen Zellen diese Mediatoren sezernierten. IL-1 $\beta$  bewirkte eine rasche Ausschüttung von IL-6, die mit der Zeit abnahm. Im Vergleich dazu war die Sekretion von IL-8 verzögert, aber über die Zeit stabiler. Zusammengefasst belegen diese Daten, dass IL-1 $\beta$  eine entzündliche Reaktion in gingivalen Epithelzellen hervorruft.



**Abb. 12: IL-1 $\beta$  induziert eine Entzündungsreaktion in gingivalen Keratinozyten**

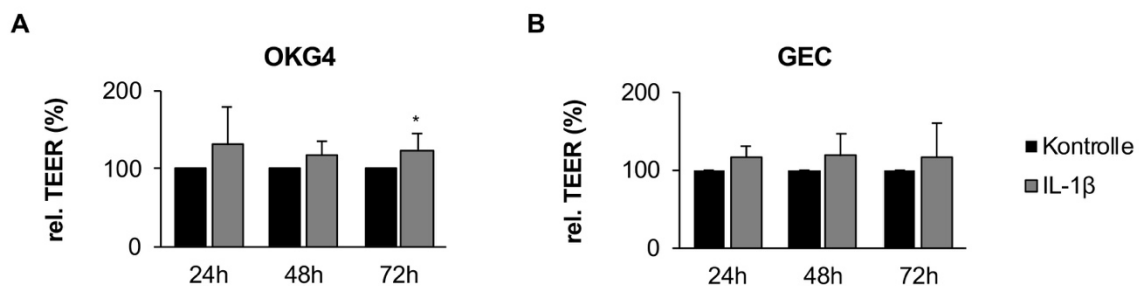
(A) Human Cytokine Antibody-Array;  $2,5 \times 10^5$  OKG4-Zellen wurden in kollagenbeschichtete 6-Well-Platten ausgesät, am nächsten Tag auf Differenzierungsmedium umgestellt und am darauffolgenden Tag durch tägliche Gabe von IL-1 $\beta$  (10 ng/ml) für 72 h stimuliert. Anschließend wurden die Zellkulturmedien gesammelt, zentrifugiert und die Überstände bei  $-20^\circ\text{C}$  gelagert. Die Durchführung des Arrays erfolgte nach Herstellerangaben in drei unabhängigen Versuchen.

Die Abbildung zeigt repräsentative Membranen eines Kontroll- bzw. IL-1 $\beta$ -Versuches, schwarz umrandet sind die Signale der Zytokine, deren Konzentrationen nach IL-1 $\beta$ -Behandlung für 72 h signifikant erhöht waren (IL-1 $\beta$ : p = 0,044, IL-8: p = 0,04), IL-6 (unterbrochene Linie) war in beiden Ansätzen kaum nachweisbar; für eine vollständige Auflistung der Antikörper-Lokalisation auf der Membran siehe Appendix Tab. II. (B, C) ELISA-Analyse der proinflammatorischen Zytokine IL-6 (B) und IL-8 (C) nach 6 h, 24 h, 72 h; Zellkulturüberstände wurden analog zum Array-Experiment in drei unabhängigen Versuchen gewonnen. Die Durchführung des ELISA erfolgte nach Herstellerangaben (Appendix Tab. I), Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung, \* zeigt signifikante Unterschiede zwischen Test- und Kontrollgruppe an (IL-6: 6 h, p < 0,001; 24 h, p = 0,01; IL-8: 6 h, p = 0,013; 24 h, p = 0,003; 72 h, p < 0,001).

#### 4.3.4 Einfluss von IL-1 $\beta$ auf gingivale Barriereigenschaften

##### 4.3.4.1 Einfluss von IL-1 $\beta$ auf den TEER

Da die Mundschleimhaut als primäre Barriere für externe Pathogene eine wesentliche Rolle der Abwehr darstellt, sollten diese Barrierefunktionen auch unter inflammatorischen Bedingungen analysiert werden (Abb. 13). Die Behandlung von OKG4 mit IL-1 $\beta$  resultierte in einem Anstieg des TEER im Vergleich zu Kontrollzellen, welcher nach einer Inkubationszeit von 72 h signifikant war (p = 0,039; Abb. 13A). Dieser Anstieg des TEER nach IL-1 $\beta$ -Behandlung wurde ebenfalls bei GEC beobachtet, wobei diesem Trend die statistische Signifikanz fehlte (Abb. 13B).



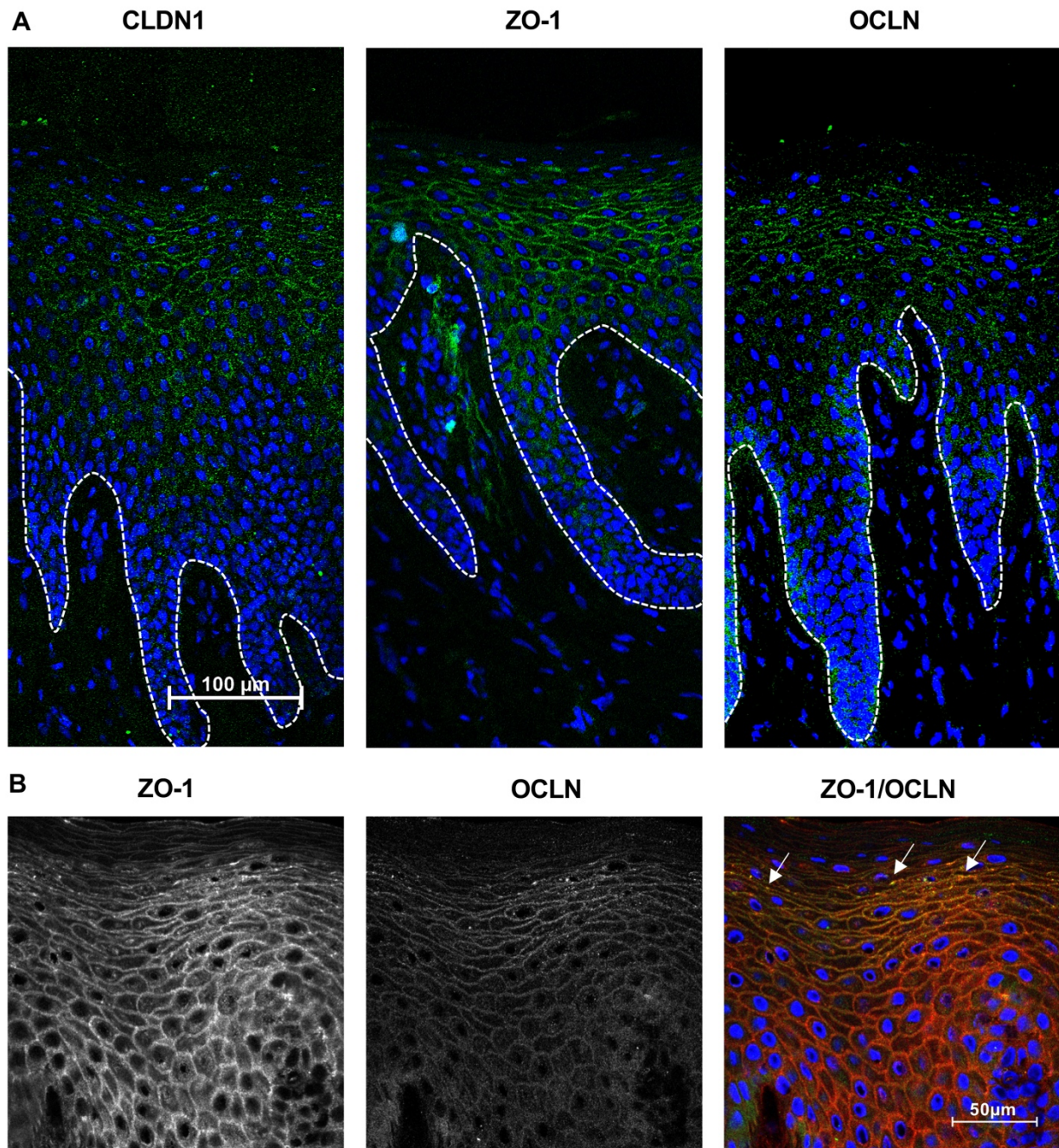
**Abb. 13: IL-1 $\beta$  führt zu einer Zunahme des TEER gingivaler Keratinozyten**

Messung des TEER an OKG4-Zellen (A, pro Gruppe jeweils n = 7 aus 5 unabhängigen Versuchen) und GEC (B, pro Gruppe jeweils n = 9 aus 3 unabhängigen Versuchen) unter Kontroll- und IL-1 $\beta$ -Bedingungen; konfluente Keratinozyten mit einem TEER von > 60  $\Omega \times \text{cm}^2$  wurden mit 10 ng/ml IL-1 $\beta$  stimuliert oder unstimuliert kultiviert. Die Messung erfolgte mittels EndOhm-12-Kammer und Volt-Ohm-Meter Millicell<sup>®</sup> ERS-2, der Blank wurde subtrahiert und der erhobene Widerstand in Bezug zur Filterfläche gesetzt ( $\Omega \times \text{cm}^2$ ). Erhobene TEER-Werte wurden auf den jeweiligen Initial-TEER-Wert (0 h) bezogen. Die Kontrolle wurde jeweils auf 100% normiert und die Testgruppe in Bezug zur Kontrollgruppe gesetzt. GEC stammten von drei verschiedenen Spendern; Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung, \* zeigt signifikanten Unterschied zwischen Test- und Kontrollgruppe an (OKG4 72 h, p = 0,039).

##### 4.3.4.2 Expression ausgewählter Tight Junction-Proteine der humanen Gingiva

Da Tight Junctions (TJs) Teil der physikalischen Barriere sind, sollte untersucht werden, ob der IL-1 $\beta$ -induzierte Anstieg des TEER mit einer veränderten Expression ausgewählter TJ-Proteine in der Gingiva korreliert. Claudin-1 und ZO-1 wurden an der gesunden Gingiva in allen viablen Zellen bis zur suprabasalen Schicht detektiert (Abb. 14A). Insgesamt zeigten sich bei allen

untersuchten TJ-Proteinen eine auf die Zellgrenzen begrenzte Lokalisation im SG, wobei Claudin-1 und ZO-1 diffusere Signale in basaleren Schichten zeigten. Occludin hingegen zeigte eine akzentuierte Färbung spezifisch im SG und wurde deshalb genauer untersucht. Die Ko-Immunfluoreszenz der TJ-Proteine ZO-1 und Occludin zeigte die Ko-Lokalisation (Pfeile) in superfizialen Bereichen des SG (Abb. 14B).



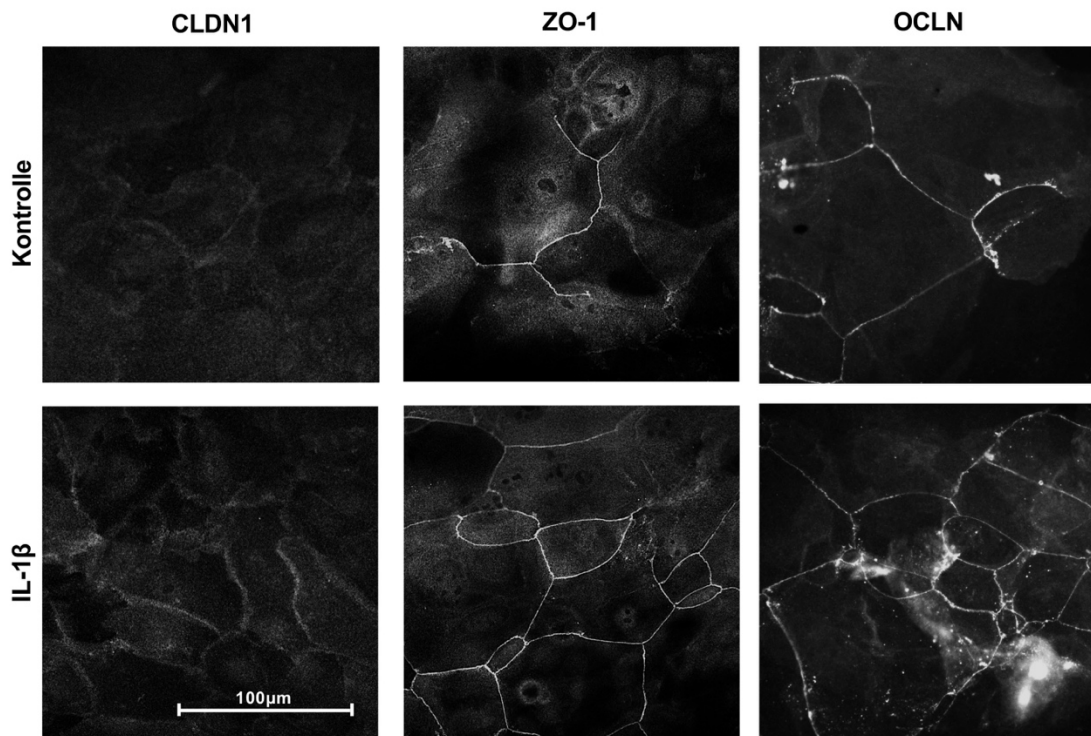
**Abb. 14: Expression von TJ-Proteinen in humaner adulter Gingiva**

(A) Immunfluoreszenz-Analyse (IF) für Claudin-1 (CLDN1), ZO-1 und Occludin (OCLN) an Gefrierschnitten nativer humaner Gingiva; gesunde adulte Gingiva wurde mittels Stanzbiopsie entnommen, in Tissue Freezing-Medium eingebettet und in Flüssigstickstoff fixiert, 7 µm-Schnitte wurden angefertigt und mit den jeweiligen Primär- und Sekundär-Antikörpern inkubiert (grün). Zellkerne wurden mittels Hoechst 33342 visualisiert (blau). Die unterbrochene Linie markiert den Übergang von Epithel zur *Lamina propria*, Maßstabsbalken 100 µm; (B) Ko-Lokalisation (gelb, Pfeile)

von ZO-1 (rot) und Occludin (grün) an humaner Gingiva, IF-Protokoll analog zu (A), wobei durch geeignete Sekundärantikörper ZO-1 rot und Occludin grün markiert wurden, Maßstabsbalken 50 µm.

#### 4.3.4.3 Einfluss von IL-1β auf die Expression von Tight Junctions

Die Immunfluoreszenz-Analyse der TJ-Proteine in gingivalen Zellen zeigte, dass auch *in vitro* die TJ-Proteine Claudin-1, ZO-1 und Occludin in Zell-Zell-Kontakten der Keratinozyten bei Kultivierung in Differenzierungsmedium lokalisiert waren (Abb. 15). In GEC zeigten sich bei Kultivierung TJ-Stränge, die jedoch selten eine gesamte Zelle umschlossen. Die Stimulation mit IL-1β führte im Vergleich mit Kontrollzellen zu ausgeprägteren Strängen, die sowohl ZO-1-, als auch Occludin-positiv waren und gesamte Zellen umschlossen.



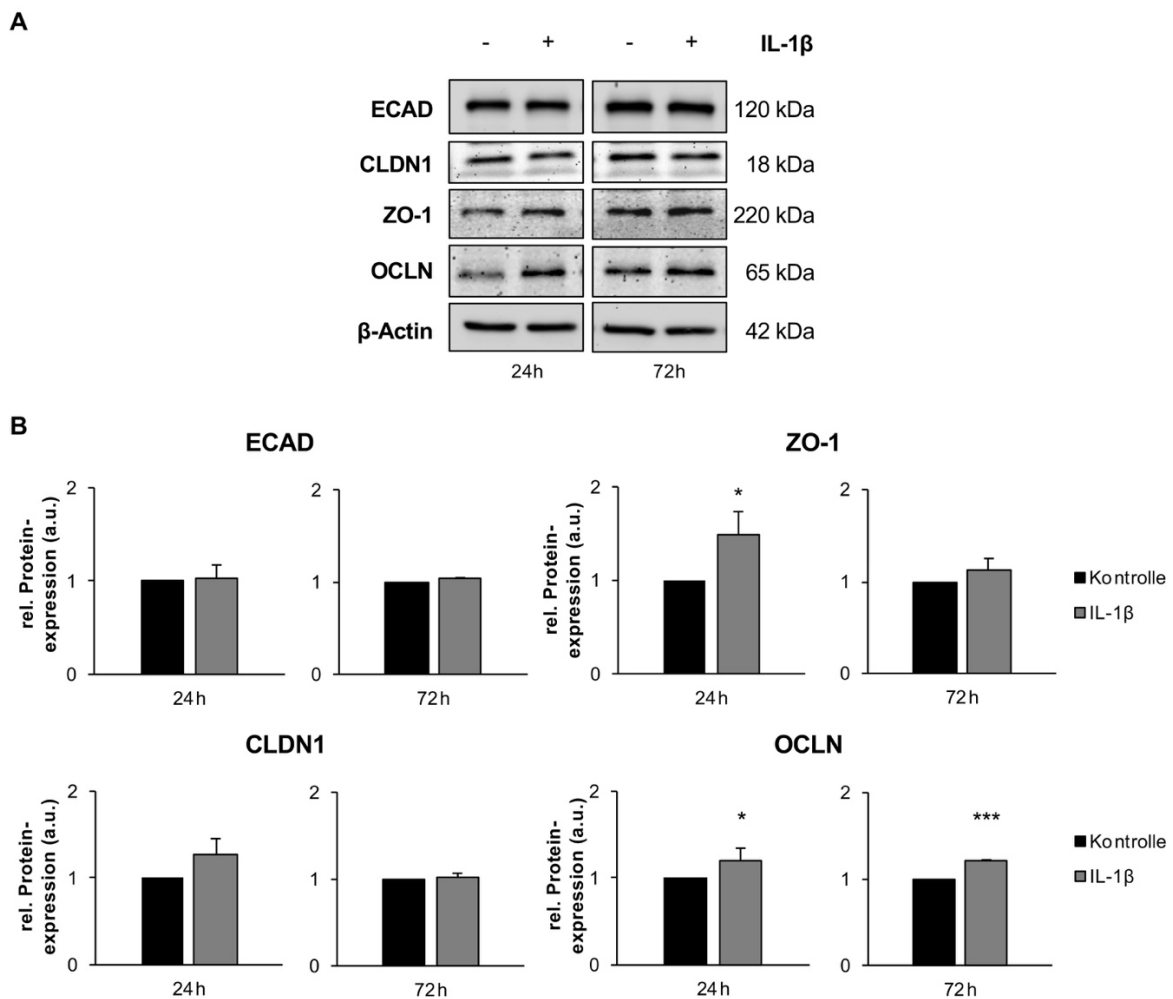
**Abb. 15: IL-1β verstärkt die Bildung von TJ-Strängen in gingivalen Keratinozyten**

Immunfluoreszenz-Analyse für Claudin-1 (CLND1), ZO-1 und Occludin (OCLN) an kultivierten primären gingivalen Keratinozyten. Hierzu wurden  $1,2 \times 10^4$  GEC in 8-Kammer-Objektträgern unter Differenzierungsmedium kultiviert und über 24 h mit IL-1β stimuliert oder unstimuliert kultiviert. Nach Ende der Stimulationszeit wurden die Zellen fixiert und für Claudin-1, ZO-1 und Occludin gefärbt. Zellkerne wurden visualisiert durch Hoechst 33342. Auffällig war eine Zunahme der Signale für ZO-1 und Occludin bei IL-1β-stimulierten Zellen. Die Bildbearbeitung erfolgte mittels ZEN und ImageJ, Maßstabsbalken 100 µm.

Für OKG4 wurden ähnliche Ergebnisse erzielt, wobei die Etablierung von TJ-Strängen bei gleichen Kultivierungszeiten in beiden Ansätzen verzögert schien (Appendix Abb. II). Zur Verifizierung und Quantifizierung dieser Ergebnisse wurde die Expression ausgewählter TJ-Proteine und E-Cadherin als Vertreter der epithelialen Cadherine und Komponente der Adherens



Junctions unter Kontroll- und inflammatorischen Bedingungen mittels Western Blot analysiert (Abb. 16). Die Stimulation gingivaler Keratinozyten mit IL-1 $\beta$  beeinflusste die Proteinexpression von Claudin-1 und E-Cadherin nach 24 h und 72 h nicht (Appendix Tab. X, XI). Nach 24 h konnte in der mit IL-1 $\beta$  stimulierte Gruppe ( $1,49 \pm 0,25$ ) eine signifikant erhöhte Expression von ZO-1 im Vergleich zur Kontrollgruppe (normiert auf 1,0 willkürliche Einheiten, *arbitrary units* (a.u.)) beobachtet werden ( $p = 0,036$ ). Nach 72 h hielt die Tendenz an, war aber nicht signifikant erhöht. Die Expression von Occludin in gingivalen Keratinozyten war nach Stimulation mit IL-1 $\beta$  für 24 h signifikant erhöht ( $1,21 \pm 0,14$ ;  $p = 0,032$ ). Dieser Effekt hielt auch nach 72 h an ( $1,21 \pm 0,01$ ;  $p < 0,001$ ).



**Abb. 16: IL-1 $\beta$  verstärkt die Expression ausgewählter TJ-Proteine gingivaler Keratinozyten**

Analyse der Proteinexpression von TJ-Proteinen und E-Cadherin mittels Western Blot;  $2,5 \times 10^5$  OKG4-Zellen wurden in 60 x 15 mm-Zellkulturschalen ausgesät, auf Differenzierungsmedium umgestellt und unter An- und Abwesenheit von IL-1 $\beta$  für 24 h und 72 h kultiviert. Nach Abschluss der Stimulation wurden die Zellen lysiert, es erfolgte die Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford, 60  $\mu$ g Protein wurde auf ein 10 % SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen und die aufgetrennten Proteine wurden via Elektrotransfer auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Die visuelle Detektion erfolgte mittels Western Lightning<sup>®</sup> Plus-ECL und VersaDoc<sup>™</sup> Imaging System. (A) Repräsentative Blot-Membranen; (B) graphische Zusammenfassung der Proteinexpression aus drei unabhängigen Versuchen. Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung, \* zeigt signifikante Unterschiede zwischen Test- und Kontrollgruppe an (ZO-1 24 h:  $p = 0,036$ ; Occludin 24 h:  $p = 0,032$ ; Occludin 72 h:  $p < 0,001$ ).

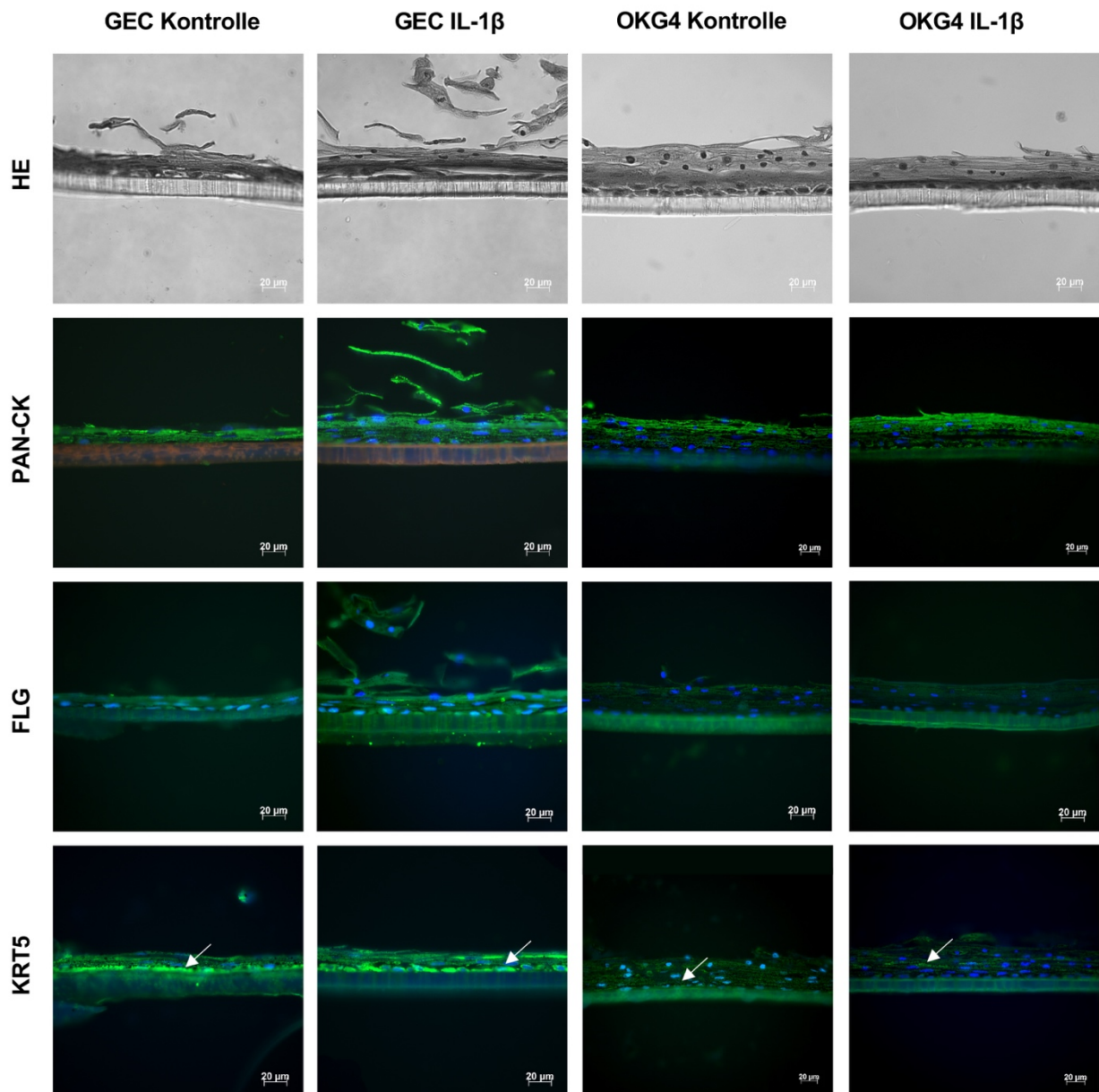
## **4.4 Etablierung inflammatorischer humaner gingivaler 3D-Modelle**

### **4.4.1 Induktion einer Entzündung in epithelialen gingivalen 3D-Modellen**

Es wurde gezeigt, dass das epitheliale Modell hinsichtlich Morphologie und der Lokalisation der untersuchten Differenzierungsmarker der Gingiva nahekommt und somit zur Erforschung grundlagenmedizinischer Fragestellungen herangezogen werden kann. Kultivierte gingivale Keratinozyten zeigten nach Stimulation mit IL-1 $\beta$  eine inflammatorische Reaktion. In einem weiteren Ansatz wurde daher dieses epitheliale Modell auch aus GEC aufgebaut und beide Modelle zusätzlich durch IL-1 $\beta$ -Stimulation in einen entzündeten Zustand versetzt (Abb. 17).

Epitheliale 3D-Modelle, die mit primären gingivalen Zellen gebildet wurden, wiesen hierbei ein ähnliches Differenzierungsmuster auf wie immortalisierte gingivale Keratinozyten auf. Mittels Immunfluoreszenz konnten positive Signale für Filaggrin in den terminal differenzierten Schichten sowohl bei GEC als auch bei OKG4-Zellen nachgewiesen werden. Cytokeratin-5-Signale waren bei GEC eindeutig in den basalen Schichten zu beobachten. In dem OKG4-Modell wurde Cytokeratin-5 weniger spezifisch exprimiert und konnte zu früheren Kultivierungszeiten detektiert werden (s. Abb. 8). Die Quantifizierung der histologischen Schnitte ergab, dass die GEC-Modelle ein signifikant dünneres Epithel bildeten als OKG4-Modelle (Daten nicht gezeigt, Appendix Tab. XII). In der HE-Übersichtsfärbung zeigte sich sowohl bei GEC- als auch bei OKG4-Modellen eine Abflachung der Keratinozyten von basal nach apikal. Insbesondere in GEC-Modellen wurde eine Desquamation von Keratinozyten an der Epitheloberfläche beobachtet.

Die Stimulation mit IL-1 $\beta$  hatte weder einen signifikanten Einfluss auf GEC-basierte noch auf OKG4-basierte Modelle in Bezug auf die Höhe des epithelialen Aufbaus (Daten nicht gezeigt, Appendix Tab. XII). Die Analyse der Zellkernanzahl pro Bild ergab übereinstimmend mit den Ergebnissen des SRB-Assays keinen signifikanten Einfluss auf die Proliferation der Zellen (Daten nicht gezeigt, Appendix Tab. XII). Bei GEC-Modellen zeigte sich eine intensive Cytokeratin-5-Expression in der basalen Schicht, sowohl in den Kontroll- als auch den IL-1 $\beta$ -stimulierten Modellen. Ähnlich wie bei den Kontrollmodellen war Filaggrin nach IL-1 $\beta$ -Behandlung sowohl in den OKG4- als auch in den GEC-Modellen in den terminal differenzierten Schichten des epithelialen Aufbaus zu finden. Damit konnten anhand der histologischen Analysen im untersuchten Zeitraum keine signifikanten Veränderungen im Differenzierungsmuster und in der morphologischen Architektur des epithelialen Aufbaus durch Stimulation mit IL-1 $\beta$  festgestellt werden. Dabei sind die aus primären und immortalisierten Zellen gebildeten Modelle hinsichtlich des Aufbaus und des Differenzierungsprozesses vergleichbar.



**Abb. 17: Histologische und immunfluoreszenzanalytische Charakterisierung eines inflammatorischen gingivalen epithelialen 3D-Modells**

IL-1 $\beta$ -stimulierte epitheliale 3D-Modelle aufgebaut aus GEC (2. Spalte) und OKG4-Zellen (4. Spalte) im Vergleich zu unbehandelten Kontroll-Modellen (GEC, 1. Spalte; OKG4, 3. Spalte; OKG4-Aufnahmen s. auch Abb. 8);  $2,7 \times 10^4$  primäre bzw. immortalisierte Zellen wurden auf Transwell®-Filter ausgesät und nach Erreichen der Konfluenz auf Differenzierungsmedium umgestellt. Die Stimulation mit IL-1 $\beta$  erfolgte für 72 h. Abgebildete Modelle wurden über 15 (OKG4) bzw. 16 Tage (GEC) kultiviert. Nach Abschluss der Stimulation wurden die Modelle fixiert und in Paraffin eingebettet. Mittels Hämalaun-Lösung nach Mayer und Eosin-Lösung erfolgte die histologische Analyse von 5  $\mu$ m-Schnitten (HE). Zusätzlich wurden Schnitte für Pan-Cytokeratin (PAN-CK), Filaggrin (FLG), Cytokeratin-5 (KRT5, Pfeile) gefärbt (grün). Zellkerne wurden mittels Hoechst 33342 visualisiert (blau). Die rote Autofluoreszenz der Filter mit primären Zellen ist bedingt durch eine Doppelfärbung mit PAN-CK (grün) und VIM (rot), einem Fibroblastenmarker, der eine Kontamination der primären Keratinozyten mit Fibroblasten durch eine mögliche unzureichende Separation der Zellen während der Präparation anzeigen würde. Im Zellaufbau wurden keine rotgefärbten Fibroblasten detektiert. Die Bildbearbeitung erfolgte mittels AxioVision und Adobe Photoshop, Maßstabsbalken 20  $\mu$ m.

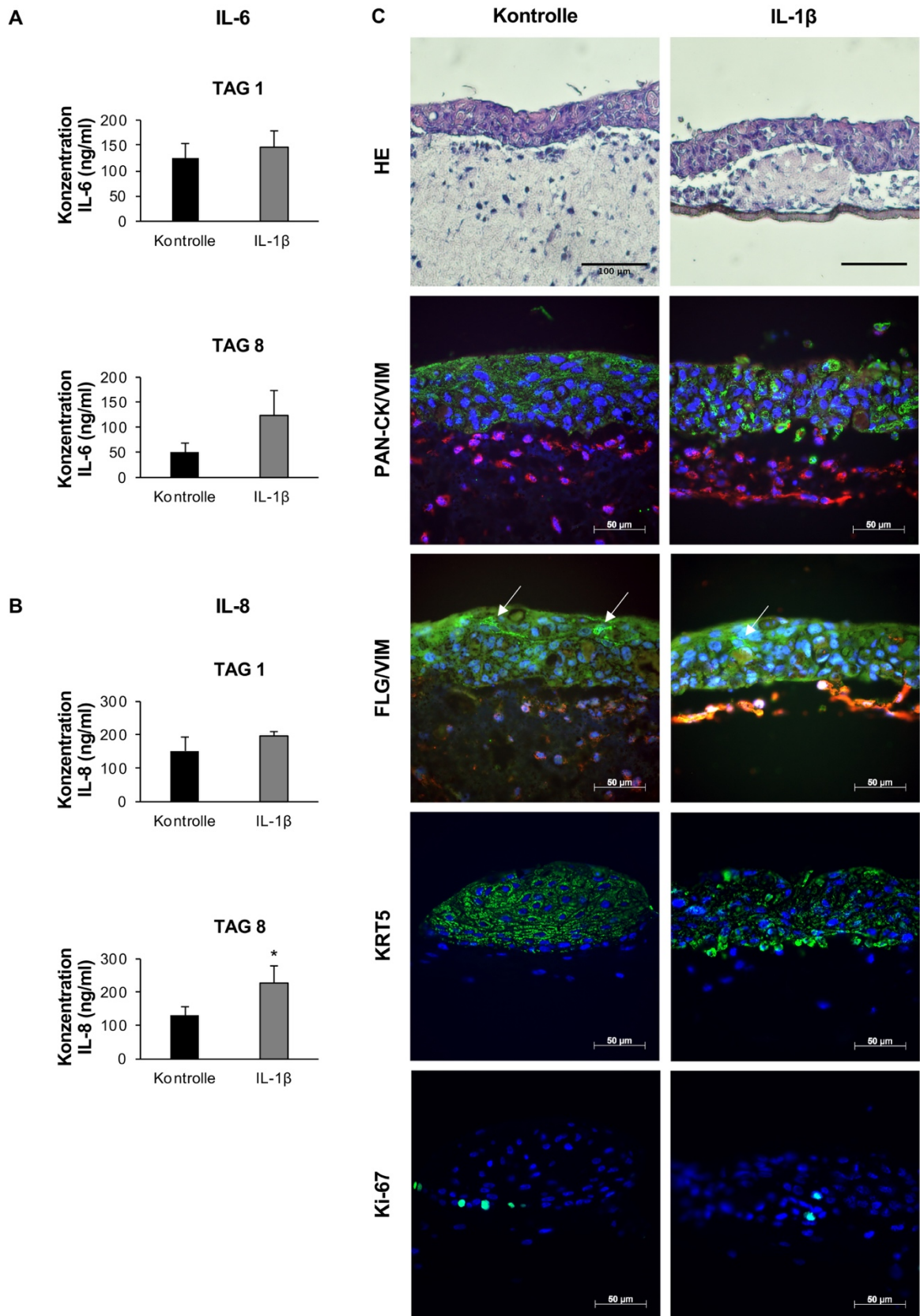
## **4.4.2 Induktion einer Entzündung in organotypischen 3D-Schleimhautäquivalenten**

### **4.4.2.1. Bestimmung proinflammatorischer Zytokine nach IL-1 $\beta$ -Stimulation**

Mittels Cytokine-Array und ELISA wurde gezeigt, dass die Gabe von IL-1 $\beta$  zu einer messbaren Entzündung der gingivalen Keratinozyten führte. Um zu überprüfen, ob durch IL-1 $\beta$  auch eine Entzündung im gingivalen 3D-Modell induziert werden könnte, wurden die Überstände von IL-1 $\beta$ -stimulierten und Kontrollmodellen mittels ELISA analysiert (Abb. 18A, B). Hierfür wurden jeweils die Konzentrationen von IL-6 und IL-8 in Gegenwart und Abwesenheit von IL-1 $\beta$  für 24 h sowie acht Tage mittels ELISA erfasst. Die Stimulation mit IL-1 $\beta$  führte zu beiden Zeitpunkten zu höheren IL-6-Konzentrationen im Vergleich zu den Kontrollen. Dies war jedoch nur ein Trend, der statistisch nicht signifikant war (Abb. 18A; Tag 1,  $p = 0,374$ ; Tag 8,  $p = 0,064$ ; Appendix Tab. XIII, XIV). Im zeitlichen Verlauf war allerdings eine signifikante Abnahme der IL-6-Konzentration unter Kontrollbedingungen zu beobachten ( $p = 0,008$ ). Die IL-8-Konzentrationen der Kontrollen waren im zeitlichen Verlauf konstant (Abb. 18B). Die Stimulation mit IL-1 $\beta$  führte zu einer Erhöhung der IL-8-Ausschüttung, die an Tag 8 der Stimulation signifikant erhöht war im Vergleich zum unstimulierten Modell ( $p = 0,02$ ).

### **4.4.2.2 Morphologische und immunfluoreszenzanalytische Charakterisierung**

Die HE-Übersichtsfärbung zeigte, dass gingivale Keratinozyten bei IL-1 $\beta$ -Stimulation über acht Tage ein mehrschichtiges Epithel ausbildeten (Abb. 18C). Dieses lag einem Fibroblasten-Kollagengel auf, welches unter IL-1 $\beta$ -Gabe dünner erschien. Die Immunfluoreszenz-Analyse für Pan-Cytokeratin ergab, dass die Keratinozyten bei IL-1 $\beta$ -behandelten Modellen weniger organisiert waren und eine Abflachung der Keratinozyten von basal nach apikal, wie bei Kontrollmodellen beobachtet, geringer ausgeprägt war. Ein histologisch und immunfluoreszenzanalytisch sichtbares Abreißen des Epithels vom Fibroblasten-Kollagengel könnte technisch bedingt sein, zeigte sich jedoch stärker ausgeprägt bei IL-1 $\beta$ -Ansätzen. Die Filaggrin-Färbung zeigte bei IL-1 $\beta$ -stimulierten Modellen positive Signale in differenzierten Schichten und war vergleichbar mit unstimulierten 3D-Modellen. Cytokeratin-5 wurde bei IL-1 $\beta$ -stimulierten Ansätzen verstärkt in der basalen Hälfte des epithelialen Aufbaus beobachtet und zeigte sich vergleichbar mit Kontrollmodellen. Ki-67 wurde in basalen und suprabasalen Schichten gefunden. Zusammenfassend wiesen IL-1 $\beta$ -Modelle marginale Unterschiede in der Morphologie im Vergleich zu Kontrollmodellen auf. In Bezug auf die Lokalisation von Differenzierungsmarkern waren die IL-1 $\beta$ -Modelle den unstimulierten Kontrollmodellen und der nativen Gingiva ähnlich.



**Abb. 18: Immunologische, histologische und immunfluoreszenzanalytische Charakterisierung inflammatorischer organotypischer gingivaler 3D-Schleimhautäquivalente**

(A, B) Zytokin-Analyse der Kulturmedien von »full thickness«-3D-Modellen mittels ELISA im zeitlichen Verlauf 24 h und acht Tage nach IL-1 $\beta$ -Stimulation. Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung, \* zeigt signifikante

Unterschiede zwischen Test- und Kontrollgruppe an. Die IL-6-Konzentration (A) der Kontrolle nahm im zeitlichen Verlauf ab ( $p = 0,008$ ). An Tag 8 zeigte sich die IL-6-Konzentration IL- $\beta$ -stimulierter Modelle leicht erhöht, diesem Trend fehlt jedoch die statistische Signifikanz ( $p = 0,064$ ). Die IL-8-Konzentration (B) war nach IL-1 $\beta$ -Stimulation an Tag 8 signifikant erhöht ( $p = 0,002$ ). (C) Für den Aufbau inflammatorischer 3D-Modelle (rechts) wurden  $1 \times 10^4$  IHGF-Fibroblasten in einem Kollagengel eingebettet und für 4-7 Tage in Wachstumsmedium kultiviert. Nach Kontraktion des Kollagengels erfolgte die Applikation von  $1 \times 10^6$  OKG4-Keratinocyten und die Ko-Kultivierung der Zellen für 2-3 Tage. Anschließend wurde das Modell an die Luft-Flüssigkeitsgrenze angehoben (Airlift) und erhielt basal Differenzierungsmedium. Die Kultivierung erfolgte für weitere 8 Tage. Die Stimulation erfolgte ab Airlift durch Gabe von 10 ng/ml IL-1 $\beta$  über das Medium und wurde alle zwei Tage durch Erneuerung des Mediums aufgefrischt. Gezeigt sind histologische Schnitte von Modellen, die acht Tage stimuliert oder unter Kontrollbedingungen (siehe auch Abb. 9) gehalten wurden. Modelle wurden fixiert und in Paraffin eingebettet. 5  $\mu$ m-Schnitte wurden mittels HE-Färbung und indirekter Immunfluoreszenz (IF) für Pan-Cytokeratin (PAN-CK, grün)/ Vimentin (VIM, rot), Filaggrin (FLG, grün), Cytokeratin-5 (KRT5, grün) und Ki-67 (grün) analysiert. Zellkerne wurden mittels Hoechst 33342 visualisiert (blau). Die Bildbearbeitung erfolgte mittels AxioVision und Adobe Photoshop, Maßstabsbalken 100  $\mu$ m (HE) bzw. 50  $\mu$ m (IF).

#### **4.5 Einfluss des Nanocarriers CMS 10-E-15-350 auf gingivale Keratinocyten**

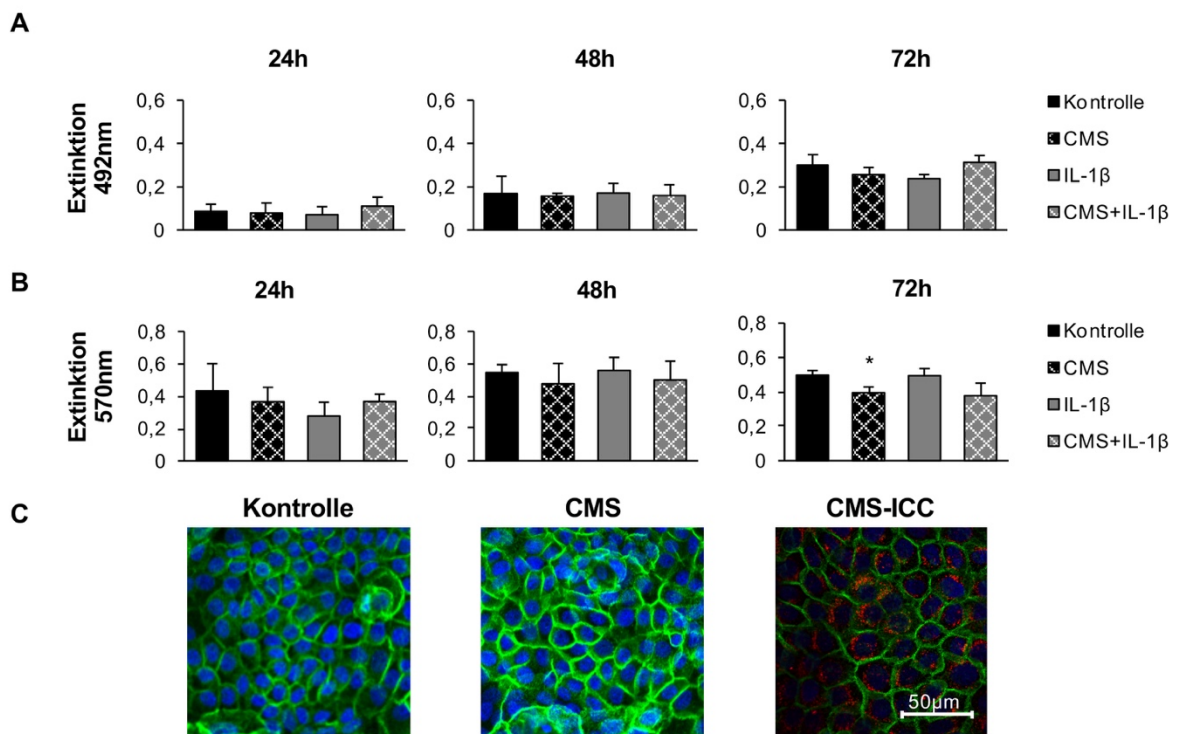
Die Mundschleimhaut stellt als physikalische Barriere nicht nur für Pathogene, sondern auch für potenzielle Medikamente eine Hürde dar. Polymerbasierte Nanocarrier, wie z. B. Core-Multishell (CMS)-Nanocarrier könnten ein neuartiges Vehikel für etablierte Wirkstoffe darstellen und helfen, die Adhäsion etablierter Wirkstoffe, deren Penetration und die Wirkstoff-Freisetzung in die Mundschleimhaut zu verbessern, um so entzündliche Erkrankungen der Mundschleimhaut effektiver behandeln zu können. Der CMS-Nanocarrier 10-E-15-350 erwies sich in bisherigen Studien in anderen Geweben als sehr biokompatibel (Hönzke et al., 2016) und wurde daher im Rahmen dieser Studie untersucht.

##### **4.5.1 Einfluss des CMS-Nanocarriers auf Proliferation und metabolische Aktivität**

Die Gabe von CMS bzw. die Kombination aus CMS und IL-1 $\beta$  ergab bei Applikationszeiten über 24, 48 und 72 h keine signifikanten Effekte gegenüber der Kontrolle hinsichtlich der Zellmasse (Abb. 19A, Appendix Tab. III, IV). Über 72 h zeigte sich eine Zunahme der Extinktion über die Zeit, die die Zunahme der Zellzahl über den beobachteten Zeitraum belegte. Darüber hinaus wurden nach Gabe von CMS und der Kombination von CMS und IL-1 $\beta$  nach 24 h und 48 h gegenüber der Kontrolle keine signifikanten Effekte auf die metabolische Aktivität der Zellen nachgewiesen (Abb. 19B, Appendix Tab. V, VI). Nach 72 h CMS-Applikation zeigte sich eine geringe, jedoch signifikante Abnahme der metabolischen Aktivität ( $p = 0,027$ ). Bei gleichzeitiger Gabe von CMS und IL-1 $\beta$  wurde jedoch keine signifikante Beeinträchtigung der metabolischen Aktivität beobachtet.

#### 4.5.2 Einfluss des CMS-Nanocarriers auf die Zell-Morphologie

Die Applikation von CMS für 72 h hatte keinen Effekt auf die Morphologie gingivaler Keratinozyten (Abb. 19C). Die Inkubation mit einem mittels Fluoreszenzmikroskopie sichtbaren Indocarbocyanin-gekoppelten CMS-Nanocarrier (CMS-ICC) zeigte, dass der Nanocarrier nach 24 h in gingivalen Zellen akkumuliert und dabei perinukleär lokalisiert ist. Die Lokalisation innerhalb der Zelle wurde zusätzlich an primären gingivalen Keratinozyten durch Anfertigung von z-Stack-Aufnahmen mittels CLSM bestätigt (Appendix Abb. III)



**Abb. 19: Einfluss des CMS-Nanocarriers auf die metabolische Aktivität, Zellmasse und Morphologie gingivaler Keratinozyten**

(A) SRB-Assay;  $1 \times 10^4$  OKG4-Zellen pro Well wurden in kollagenbeschichtete 96-Well-Platten ausgesät und am nächsten Tag mit 50  $\mu\text{g/ml}$  CMS, 10 ng/ml IL-1 $\beta$  oder 50  $\mu\text{g/ml}$  CMS + 10 ng/ml IL-1 $\beta$  stimuliert. Nach Ende der angezeigten Stimulationszeiten erfolgte die Applikation von 10 % TCA und die Färbung der Zellen mit SRB-Lösung. Es erfolgte die Solubilisierung in Tris-Lösung und Auslesung bei 492 nm. (B) MTT-Assay; Aussaat und Stimulation erfolgten analog zum SRB-Assay. Nach Abschluss der Stimulationszeit erfolgte die Applikation der MTT-Lösung, anschließend die Lösung in »saurem« Isopropanol und Auslesen der umgesetzten Farbstoffmenge bei 570 nm im Photometer. (A, B) Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung, \* zeigt signifikante Unterschiede zwischen Test- und Kontrollgruppe an (CMS 72 h,  $p = 0,027$ ); (C) WGA-Fluoreszenz an unbehandelten und CMS-behandelten (50  $\mu\text{g/ml}$ ) gingivalen Keratinozyten,  $1,2 \times 10^4$  OKG4-Zellen wurden in 8-Kammer-Objektträgern unbehandelt kultiviert (links) oder über 72 h mit unmarkiertem CMS (Mitte) bzw. über 24 h mit Indocarbocyanin-gekoppeltem CMS (CMS-ICC, rot, rechts) behandelt. Nach Ende der Stimulationszeit wurden die Zellen fixiert und mit Fluoreszenz-markiertem WGA (grün) sowie Hoechst 33342 (blau) gefärbt. Die Bildbearbeitung erfolgte mit ZEN und ImageJ, Maßstabsbalken 50  $\mu\text{m}$ .

#### 4.5.3 Einfluss des CMS-Nanocarriers auf die Sekretion proinflammatorischer Zytokine

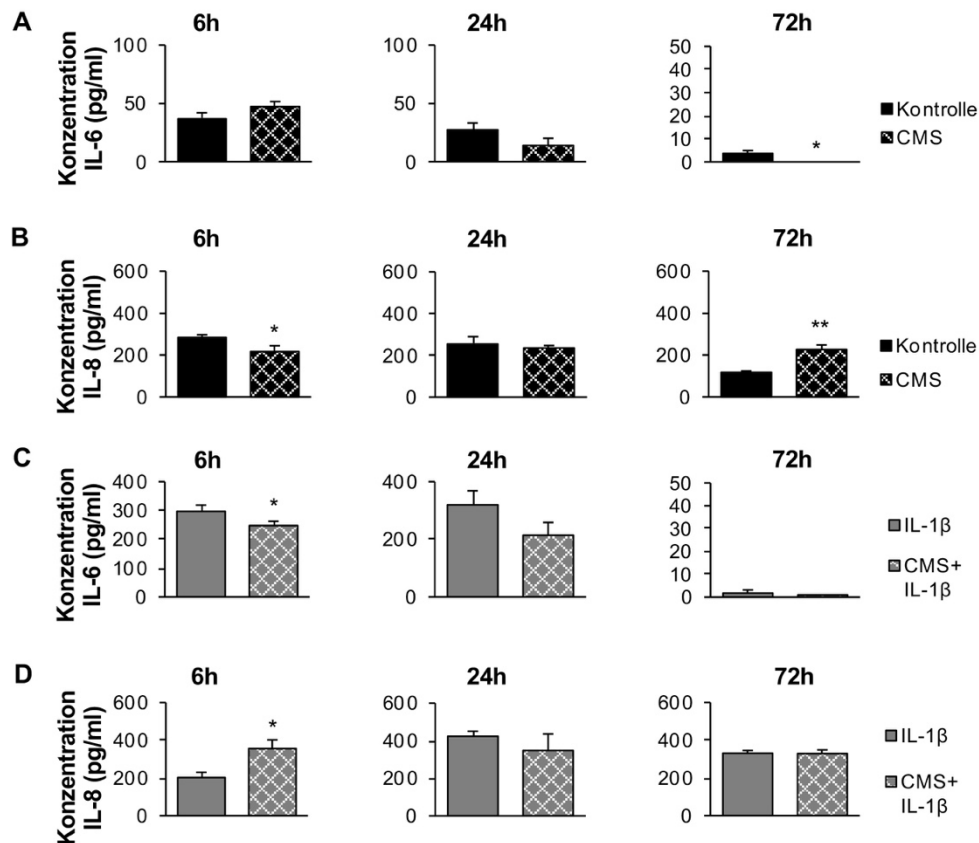
Um zu untersuchen, ob der CMS-Nanocarrier zu Irritationen gingivaler Keratinozyten führen und möglicherweise eine Entzündungsreaktion auslösen könnte, wurde die Ausschüttung der proinflammatorischen Zytokine IL-6 und IL-8 nach Inkubation mit dem Nanocarrier mittels ELISA verfolgt (Abb. 20A, B, Appendix Tab. VIII, IX ).

Nach 6 h und 24 h zeigte sich kein signifikanter Einfluss des Nanocarriers auf die IL-6-Sekretion (Abb. 20A). Nach 72 h war im Kulturmedium CMS-stimulierter Keratinozyten kein IL-6 mehr nachweisbar. Die mittlere Differenz zwischen Kontrollgruppe und CMS-stimulierter Gruppe lag bei 3,66 pg/ml, ergab aber signifikante Effekte ( $p = 0,014$ ). Die IL-8-Konzentration war nach CMS-Gabe ( $216,72 \pm 20,81$  pg/ml) im Vergleich zur unstimulierten Kontrollgruppe ( $285,29 \pm 11,47$  pg/ml) nach 6 h signifikant vermindert ( $p = 0,011$ ; Abb. 20B). Nach 24 h zeigte sich jedoch kein Einfluss des Nanocarriers auf die IL-8-Konzentration. Nach 72 h war die IL-8-Konzentration allerdings bei CMS-behandelten Zellen ( $226,06 \pm 22,08$  pg/ml) im Vergleich zur unstimulierten Kontrollgruppe ( $118,12 \pm 6,02$  pg/ml) signifikant erhöht ( $p = 0,002$ ).

Des Weiteren wurde die Wirkung der Kombination von CMS und IL-1 $\beta$  (CMS+IL-1 $\beta$ ) auf die Keratinozyten im Vergleich zu IL-1 $\beta$ -stimulierten Zellen untersucht, um putative CMS-Effekte unter inflammatorischen Bedingungen zu analysieren (Abb. 20C, D, Appendix Tab. VIII, IX). Die Behandlung der Keratinozyten über 6 h mit CMS+IL-1 $\beta$  ( $247,36 \pm 15,34$  pg/ml) resultierte in signifikant verminderten IL-6-Konzentrationen im Kulturmedium im Vergleich zu allein mit IL-1 $\beta$  stimulierten Zellen ( $296,85 \pm 21,84$  pg/ml,  $p = 0,045$ ). Auch nach 24 h und 72 h zeigte sich dieser Trend weiterhin, dem jedoch die statistische Signifikanz fehlte. Für die IL-8-Konzentration im Medium zeigte sich bei Anwendung der Kombination von CMS+IL-1 $\beta$  ( $355,81 \pm 46,40$  pg/ml) nach 6 h eine signifikante Erhöhung der IL-8-Konzentration im Vergleich zum IL-1 $\beta$ -Ansatz ( $202,36 \pm 27,91$  pg/ml,  $p = 0,012$ ). Diese initiale Erhöhung zeigte sich nach 24 h und 72 h nivelliert und nicht mehr signifikant.

Insgesamt ähnelte das Zytokinsekretionsmuster CMS-behandelter Zellen dem der unbehandelten Kontrollzellen und CMS+IL-1 $\beta$ -behandelte Keratinozyten wiesen ein vergleichbares Muster auf wie IL-1 $\beta$ -behandelte Keratinozyten. Auffällig ist zudem, dass CMS- bzw. CMS+IL-1 $\beta$ -behandelte Zellen tendenziell geringere IL-6-Konzentrationen im Medium aufwiesen verglichen mit unstimulierten Kontrollzellen bzw. IL-1 $\beta$ -stimulierten Zellen.





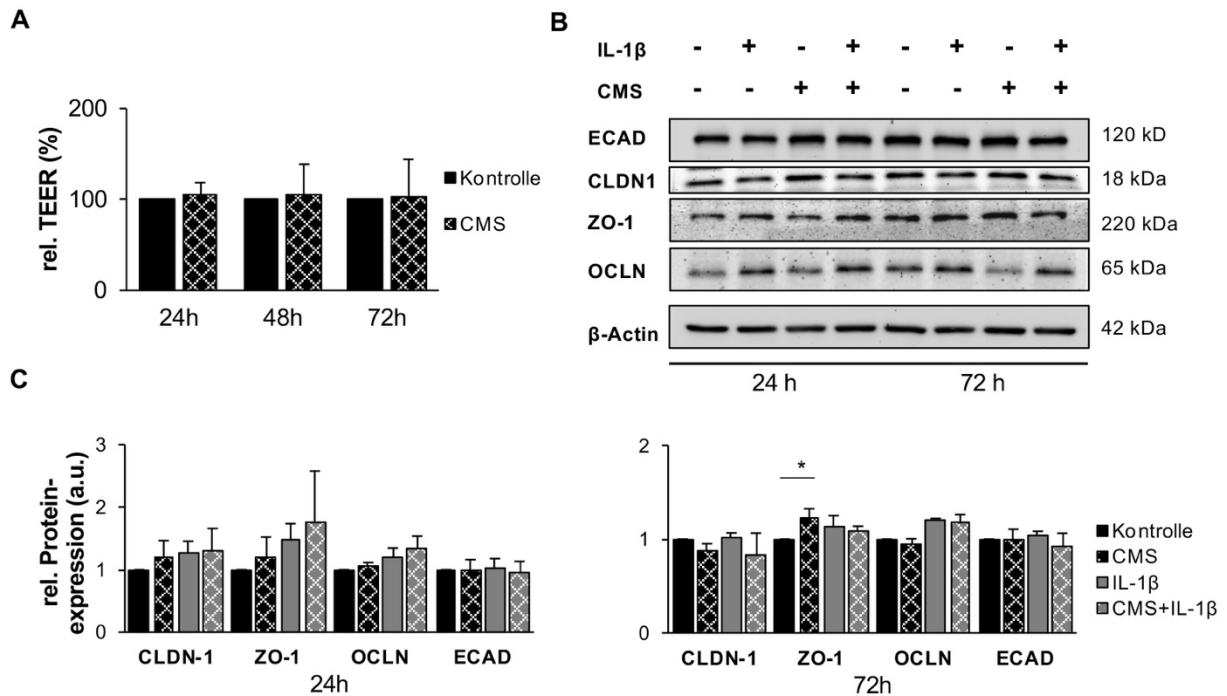
**Abb. 20: Zeitabhängige Sekretion proinflammatorischer Zytokine unter CMS-Gabe**

2,5 x 10<sup>5</sup> OKG4-Zellen wurden in kollagenbeschichtete 6-Well-Platten ausgesät, am nächsten Tag auf Differenzierungsmedium umgestellt und am darauffolgenden Tag mittels 50 µg/ml CMS (A, B), 10 ng/ml IL-1β und 50 µg/ml CMS + 10 ng/ml IL-1β (C, D) für 6 h, 24 h, 72 h bei täglicher Gabe behandelt. Nach Abschluss der Stimulationszeit wurden die Zellkulturmedien eingesammelt, herunterzentrifugiert und die Überstände bei -20 °C gelagert. Die Analyse der Zytokinsekretion erfolgte mittels ELISA für IL-6 (A, C) und IL-8 (B, D) nach Herstellerangaben (Appendix Tab. I) in drei unabhängigen Versuchen; Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung, \* zeigt signifikante Unterschiede zwischen Test- und Kontrollgruppe an ((A) 72 h, p = 0,01; (B) 6 h, p = 0,011; 72 h, p = 0,002; (C) 6 h, p = 0,045; (D) 6 h, p = 0,012).

#### 4.5.4 Einfluss des CMS-Nanocarriers auf gingivale Barriereeigenschaften

Um mögliche Effekte des CMS-Nanocarriers auf die gingivale Barriereintegrität zu untersuchen, wurde der TEER gingivaler Keratinozyten in Anwesenheit des Nanocarriers bestimmt (Abb. 21A). Die CMS-Gabe hatte im untersuchten Zeitraum keinen Einfluss auf den TEER gingivaler Epithelzellen. Gestützt wurde dieser Befund durch die Western Blot-Analyse der TJ-Proteine. Hier konnte gezeigt werden, dass der CMS-Nanocarrier nach 24h keinen Einfluss auf die Proteinexpression von E-Cadherin, Claudin-1, ZO-1 und Occludin in gingivalen Keratinozyten hatte (Abb. 21B, C, Appendix Tab. XV, XVI). Nach 72 h zeigte sich lediglich eine leichte, aber signifikante Erhöhung der ZO-1-Expression im Vergleich zur Kontrollgruppe (p = 0,016). Die Menge der anderen untersuchten Proteine blieb durch den Nanocarrier unbeeinflusst. Auch in

Gegenwart von IL-1 $\beta$  hatte der Nanocarrier keinen Einfluss auf die Expression der untersuchten Proteine.



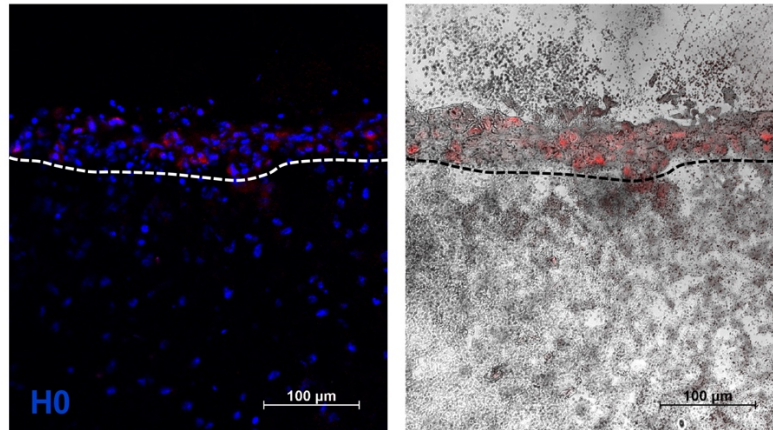
**Abb. 21: Einfluss des CMS-Nanocarriers auf die physikalische Barriere gingivaler Zellen**

(A) Auf Transwells<sup>®</sup> kultivierte OKG4-Zellen wurden unter Kontrollbedingungen kultiviert oder mit 50  $\mu$ g/ml CMS über 24, 48, 72 h behandelt (n = 8 aus 3 unabhängigen Versuchen). Der TEER wurde mittels EndOhm-12-Kammer und Volt-Ohm-Meter Millicell<sup>®</sup> ERS-2 erhoben. Unbehandelte Kontrollen wurden auf 100 % normiert und CMS-Ansätze in Bezug zur Kontrolle gesetzt; Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung. (B,C) Western Blot (WB)-Analyse des Einflusses von 50  $\mu$ g/ml CMS, 10 ng/ml IL-1 $\beta$  und 50  $\mu$ g/ml CMS + 10 ng/ml IL-1 $\beta$  auf die Proteinexpression ausgewählter TJ-Proteine und auf E-Cadherin von OKG4-Zellen;  $2,5 \times 10^5$  OKG4-Zellen wurden in 60 x 15 mm-Zellkulturschalen ausgesät, auf Differenzierungsmedium umgestellt und unter An- und Abwesenheit von CMS und/oder IL-1 $\beta$  für 24 h und 72 h kultiviert. Nach Abschluss der Stimulation wurden die Zellen lysiert, es erfolgte die Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford, 60  $\mu$ g Protein wurde auf ein 10 % SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen und die aufgetrennten Proteine wurden via Elektrotransfer auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Die visuelle Detektion erfolgte mittels Western Lightning<sup>®</sup> Plus-ECL und VersaDoc<sup>™</sup> Imaging System. (B) Repräsentative Blot-Membranen, (C) graphische Zusammenfassung der TJ-Proteinexpression aus drei unabhängigen Versuchen; Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung, \* zeigt signifikante Unterschiede an, verglichen wurde jeweils die Kontroll- mit der CMS-behandelten Gruppe und IL-1 $\beta$ -stimulierte mit CMS + IL-1 $\beta$ -behandelten Zellen (CMS/ZO-1 72 h, p = 0,016).

#### 4.5.5 Penetration des CMS-Nanocarriers in organotypische gingivale Schleimhautäquivalente

Wie in Abb. 19C gezeigt, wurde der ICC-gekoppelte CMS-Nanocarrier von gingivalen Keratinozyten nach 24 h in die Zellen aufgenommen. Weitergehend sollte überprüft werden, ob der Nanocarrier auch von differenzierten Zellen des organotypischen, gingivalen 3D-Modells

aufgenommen wird. In diesem Zusammenhang sollte vor allem eine klinisch umsetzbare Applikationszeit getestet werden (Abb. 22). Die Untersuchung zeigte, dass der CMS-ICC-Nanocarrier bereits nach einer fünfminütigen Inkubation in das Modell eingedrungen war. Die Fluoreszenz war ausschließlich im epithelialen Aufbau nachzuweisen.



**Abb. 22: Penetration des CMS-Nanocarriers in das Epithel organotypischer gingivaler Schleimhautäquivalente**

Penetration des Indocarbocyanin-gekoppelten CMS-Nanocarriers (50 µg/ml) in gingivale »full thickness«-Modelle innerhalb von fünf Minuten. Anschließend erfolgte ein Waschschrift mit PBS und die Modelle wurde in Tissue Freezing-Medium und Flüssigstickstoff eingebettet. 7 µm-Schnitte wurden hergestellt und fixiert, die Zellkernvisualisierung (links) erfolgte mittels Hoechst 33342 (H0, blau). Dunkle Punkte in der Durchlicht-Aufnahme (rechts) stammen von der MaxBlock™-Lösung zur Reduktion der Autofluoreszenz. Die unterbrochene Linie zeigt den Übergang des epithelialen Aufbaus zum Fibroblasten-Kollagengel an. Die Bildbearbeitung erfolgte mittels ZEN und Adobe Photoshop, Maßstabsbalken 100 µm.

## 5. Diskussion

Parodontitis ist eine von bestimmten Bakterienarten ausgelöste entzündliche Erkrankung des Zahnhalteapparates, die durch die Zerstörung des Stützgewebes und in schweren Fällen durch Zahnverlust gekennzeichnet ist. Eine für anfällige Patienten effektive Therapie existiert derzeit nicht. Das Ziel dieser Arbeit war die Etablierung inflammatorischer gingivaler 3D-Modelle zur Untersuchung von Entzündungsvorgängen und Barrierefunktionen der Gingiva *in vitro* und zur Bewertung potenzieller Therapieansätze.

### 5.1 Morphologische und funktionelle Kongruenz h-TERT-immortalisierter und primärer gingivaler Keratinozyten

Die Verfügbarkeit primärer gingivaler Keratinozyten ist im Vergleich zu Keratinozyten der Haut sehr limitiert, da es sich um eine kleinere Fläche handelt und dementsprechend die mögliche Biopsiegröße deutlich geringer ist. Während ausgedehnte Gewebeentnahmen gesunder Haut aus kosmetischen Gründen routinemäßig erfolgen, dienen Gewebeentnahmen aus der Mundhöhle meist der Diagnostik oder der Entfernung von etablierten Mundschleimhautveränderungen. Es handelt sich daher häufig um entzündetes oder verändertes Gewebe. Eine weitere Problematik primärer Keratinozyten ist der rasche Eintritt in die Seneszenz nach wenigen Passagen. Zur Etablierung von Systemen für die Untersuchung der Gingiva *in vitro* wurden daher immortalisierte gingivale Keratinozyten (OKG4/bmi1/TERT) verwendet (Lindberg & Rheinwald, 1990). Telomerase-immortalisierte Keratinozyten, wie die in dieser Arbeit genutzten OKG4-Zellen, zeigten sich in vorherigen Studien ihrem primären Pendant sehr ähnlich (Buskermolen et al., 2016; Dickson et al., 2000). Sowohl durch humane Papillomaviren (HPV) immortalisierte Keratinozyten als auch Tumor-abgeleitete Zelllinien unterschieden sich hingegen in anderen Studien morphologisch und funktionell von ihrem primären Gegenstück (Buskermolen et al., 2016). In dieser Arbeit zeigten Fluoreszenz-Analysen sowie physiologische Versuche wie die TEER-Messung, dass OKG4-Zellen den primären gingivalen Epithelzellen (GEC) sowohl in morphologischer als auch in funktioneller Hinsicht ähnelten.

Die TEER-Messung ist ein Verfahren zur Untersuchung der Permeabilität von Barrieren *in vitro* (Claude & Goodenough, 1973; Gumbiner & Simons, 1986). Meyle und Kollegen beschrieben erstmals den TEER-Verlauf kultivierter gingivaler Keratinozyten. In ihrer Studie erhöhte sich der TEER primärer Epithelzellen zwei Tage nach Erhöhung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration auf bis zu  $374 \Omega \times \text{cm}^2$  (Meyle et al., 1999). Übereinstimmend bildeten in dieser Arbeit sowohl OKG4-Zellen als auch GEC nach Differenzierungssignal eine Barriere mit messbarem Widerstand. Dieser erreichte sein Maximum an Tag 8 (OKG4: ca.  $792 \Omega \times \text{cm}^2$ ) bzw. Tag 9 (GEC: ca.  $707 \Omega \times \text{cm}^2$ ) nach  $\text{Ca}^{2+}$ -Gabe. Anschließend nahm der TEER ab, blieb aber bei ca.  $250 \Omega \times \text{cm}^2$  stabil. Der

Anstieg des TEER nach  $\text{Ca}^{2+}$ -Gabe korrelierte dabei mit einer morphologischen Veränderung und Ausbildung von dichten Zell-Zell-Kontakten immortalisierter wie primärer gingivaler Keratinozyten bei Kultivierung in Medium mit hoher  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration (1,4 mM) im Vergleich zu Zellen, die in Medium mit geringerer  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration (60  $\mu\text{M}$ ) kultiviert wurden.

TEER-Werte, die an anderen oralen epithelialen Zelllinien bestimmt und publiziert wurden, waren niedriger als in diesem System (Bierbaumer et al., 2018). Dies könnte auf unterschiedliche Kulturbedingungen, wie eine abweichende Zellzahl, Temperatur, Porengröße oder Membranformat, Medium oder einen abweichenden  $\text{Ca}^{2+}$ -Gehalt zurückzuführen sein. Ungleiche Messzeitpunkte und die Variationsbreite der Zelllinien, die bedingt sind durch die Region der Gewebeentnahme, Keratinisierungsgrad, Differenzierungszustand sowie Immortalisierungsmethode können ebenfalls ein Grund für die abweichenden Werte sein (Bierbaumer et al., 2018).

Zusammenfassend reagierten GEC und OKG4-Zellen in morphologischer und funktioneller Weise ähnlich auf das Differenzierungssignal, sodass bei Versuchen, die hohe Zellzahlen erforderten, OKG4-Zellen genutzt wurden.

## **5.2 IL-1 $\beta$ induziert eine Entzündung in gingivalen Keratinozyten**

Die Gingiva besteht aus einem mehrschichtigen Plattenepithel, das eine essenzielle physikalische Barriere bildet und verhindert, dass Krankheitserreger in das Gewebe eindringen. Darüber hinaus sind Keratinozyten in der Lage, eine immunologische Barriere aufrechtzuerhalten und eine Vielzahl von Faktoren wie antimikrobielle Peptide (AMPs) und Zytokine zu produzieren (Dommisch & Jepsen, 2015; Okada & Murakami, 1998). Um eine geeignete Stimulanz zur Induktion einer Inflammation in gingivalen Keratinozyten zu finden, die jedoch nicht die Viabilität beeinflussen sollte, wurden eine Vielzahl an Agenzien, wie Zytokine und Bakterienbestandteile sowie Kombinationen getestet. Die Auswahl wäre prinzipiell unbegrenzt und könnte beliebig in Bezug auf Anreize, Stimulationskonzentrationen und -zeiten erweitert werden. Die ausgewählten Zytokine wurden aufgrund ihrer Relevanz bei häufigen Krankheitsbildern in der Mundhöhle, wie z.B. Parodontitis, ausgewählt. In entzündeten parodontalen Geweben und Sulkusflüssigkeit parodontal erkrankter Patienten konnte eine übermäßige Produktion spezieller Zytokine wie IL-1, IL-6, IL-8 und TNF $\alpha$  nachgewiesen werden (Okada & Murakami, 1998; Waykole et al., 2009; Yucel-Lindberg & Båge, 2013). Diese Imbalance der Immunantwort des Wirtes förderte die Freisetzung von Enzymen wie MMPs aus dem Gewebe, die die extrazelluläre Matrix und den Knochen degradierten und führte dadurch zur Progression der Parodontitis (Okada & Murakami, 1998). Hohe Konzentrationen von IL-1 $\beta$  wurden in Geweben von Patienten mit Parodontitis

nachgewiesen (Stashenko et al., 1991) und Parodontitis-assoziierte Krankheitserreger wie *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*) bewirkten ebenfalls eine verstärkte IL-1 $\beta$ -Freisetzung (Stathopoulou et al., 2010). IL-1 $\beta$  scheint deshalb eine Schlüsselrolle in der Pathogenese der Parodontitis einzunehmen (Hönig et al., 1989; Masada et al., 1990; McDevitt et al., 2000; Okada & Murakami, 1998; Stashenko et al., 1991). Übereinstimmend führte die Hemmung der IL-1-Aktivität in einem Primatenmodell zu einer Reduktion der Knochenresorption und des Attachmentsverlustes und verzögerte somit die Progression der Parodontalerkrankung (Delima et al., 2001).

Die Regulation zellulärer Prozesse durch Zytokine ist ein komplexer, dynamischer Prozess, der häufig zahlreiche Proteine umfasst. Um die Rolle spezifischer Mediatoren bei physiologischen und inflammatorischen Prozessen aufzuklären, ist zumeist der Nachweis mehrerer Zytokine erforderlich. Der Human Antibody Cytokine Array bietet daher bei hoher Sensitivität eine globale Übersicht zur Detektion von Schlüsselzytokinen („Protocols Human Cytokine Antibody Array (ab133997)“, o. J.). Zur Verifizierung und Vertiefung der Erkenntnisse wurden signifikant regulierte Zytokine zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Stimulation mittels »Sandwich-ELISA«-Technik untersucht, die die quantitative Messung der Zytokinkonzentrationen ermöglicht.

In dieser Arbeit wurde eine durch IL-1 $\beta$  induzierte inflammatorische Reaktion gingivaler Keratinozyten durch signifikant erhöhte Level der proinflammatorischen Zytokine IL-6 und IL-8 im Medium gingivaler Keratinozyten bestätigt. Dies steht im Einklang mit den Ergebnissen anderer Studien, die zeigten, dass gingivale Epithelzellen die Zytokine IL-6 und IL-8, die als Parodontitis-assoziiert gelten, als Reaktion auf IL-1 $\beta$  produzierten (Eskan et al., 2008; Schaumann et al., 2013). Es zeigte sich ein zeitlich verzögerter Verlauf der Sekretion von IL-6 und IL-8. Bereits nach 6 h wurden in IL-1 $\beta$ -stimulierten Ansätzen signifikant mehr IL-6 als in Kontrollgruppen detektiert. Nach 72 h wurde in beiden Ansätzen kaum IL-6 nachgewiesen. Dies stimmt überein mit bereits publizierten Arbeiten, die IL-6 bereits als frühen Marker der inflammatorischen Wirtsantwort vorgeschlagen hatten (Schaumann et al., 2013; Yamazaki et al., 1994). Die abnehmende IL-6-Zytokinsekretion über die Zeit bei den untersuchten Gruppen könnte in einer initialen Stresssituation der Zellen bedingt sein, die durch das Umsetzen der Zellen oder die Umstellung auf ein Medium mit erhöhtem Ca<sup>2+</sup>-Gehalt ausgelöst wurde. Diese »Gewöhnung« der Zellen an die Umgebung muss bei zukünftigen Versuchen bei der Etablierung gingivaler Modelle berücksichtigt werden. IL-8, auch als CXCL8 bezeichnet, zeigte hingegen erst nach 24 h und 72 h eine signifikante Hochregulation nach IL-1 $\beta$ -Stimulation. Bereits im unstimulierten Zustand sezernierten gingivale Keratinozyten IL-8. Übereinstimmend mit anderen Studien war das Niveau der IL-8-Produktion weitaus höher als das anderer Zytokine, die von Epithelzellen produziert wurden (Eskan et al., 2008; Noh et al., 2013). Eine Korrelation zwischen klinischen Parametern und dem IL-8-Spiegel wurde berichtet (Lagdive et al., 2013), daher könnte IL-8 als langfristiger,

stabiler Marker der parodontalen Entzündung dienen (Lagdive et al., 2013; Schaumann et al., 2013).

Als Schlüsselzytokin der Parodontitis, das in der getesteten Konzentration über 72 h keine Auswirkungen auf die Zellmorphologie, -proliferation und metabolische Aktivität zeigte, jedoch eine zeitabhängige Hochregulation der proinflammatorischen Zytokine IL-6 und IL-8 bewirkte, war IL-1 $\beta$  eine geeignete Stimulanz zur Induktion einer Entzündung in gingivalen Keratinozyten und wurde daher zum Aufbau eines entzündlichen Gingivamodells verwendet.

### **5.3 IL-1 $\beta$ verstärkt die physikalische Barriere gingivaler Keratinozyten**

Neben der immunologischen Barriere stellen die Keratinozyten der Gingiva eine physikalische Barriere bereit, die aus dem *Stratum corneum* (SC) und den Tight Junctions (TJ) besteht, die unter anderem die Penetration von Krankheitserregern verhindert (Brandner & Schulzke, 2015). Um einen Einfluss von IL-1 $\beta$  auf die physikalische Barriere gingivaler Keratinozyten zu untersuchen, wurde der transepitheliale elektrische Widerstand (TEER) bestimmt. Der Vorteil der TEER-Messung, liegt darin, dass es ein nicht-invasives Verfahren ist, das die Möglichkeit bietet, den Widerstand einer einzelnen Probe kontinuierlich und über einen längeren Zeitraum zu verfolgen. Weiterhin können Gewebe anschließend auf DNA-Ebene analysiert oder histologisch ausgewertet werden. Darüber hinaus können Kulturmedien während der Kultivierung gesammelt und anschließend chemisch analysiert werden.

In diesem etablierten Aufbau konnten gingivale Epithelzellen über mehrere Wochen eine Barrierefunktion aufrechterhalten, die durch die Messung des Widerstandes ermittelt wurde. Die histologische Untersuchung belegte die Zellvitalität der gingivalen Keratinozyten über diesen Zeitraum. Daher eignete sich dieses stabile System, um den Einfluss inflammatorischer Reize auf die Integrität der Zellen zu untersuchen. Die Stimulation mit IL-1 $\beta$  führte bei OKG4-Zellen nach 72 h zu einem signifikanten Anstieg des Widerstandes im Vergleich zu unbehandelten Zellen. Bereits nach 24 h und 48 h zeigte sich dieser klare Trend, dem jedoch die statistische Signifikanz fehlte ( $p = 0,065$ ;  $p = 0,058$ ). Bei GEC zeigte sich der TEER ebenfalls erhöht, dies erwies sich jedoch als nicht signifikant. Dies könnte auf die Spendervariabilität zurückzuführen sein. Zellen, die von Spendern stammten, die *per se* einen hohen TEER aufwiesen, reagierten weniger stark auf IL-1 $\beta$  als Zellen von Spendern, die unter Kontrollbedingungen einen niedrigeren TEER entwickelten. Eine mögliche These wäre, dass Zellen, die einen hohen TEER unter Kontrollbedingungen entwickelten, aus Geweben stammten, die bereits leicht entzündet waren. Für zukünftige Versuche wäre ein einheitlicher Bewertungsscore der Proben zur Klassifikation des Entzündungsgrades sinnvoll.

Die Regulation des parazellulären Transportwegs erfolgt durch spezifische TJ-Proteine (Tsukita et al., 2001). Intensiv untersucht wurden einfache Epithelien wie Darm und Niere, in den letzten Jahren wurden auch mehrschichtige Epithelien wie die Haut untersucht. Schroeder und Theilade gelang es mittels Elektronenmikroskopie TJ-Strukturen der humanen Gingiva darzustellen (Schroeder & Theilade, 1966). Auch Meyle und Kollegen konnten die Existenz von TJ in gingivalen Keratinozyten durch Freeze-Fracture-Technik an humanen Gingivabiopsien zeigen (Meyle et al., 1999). In der vorliegenden Arbeit wurden in der gesunden humanen Gingiva erstmalig mit hoher Auflösung die TJ-Proteine Claudin-1, ZO-1 und Occludin identifiziert. Claudin-1 und ZO-1 wurden in suprabasalen viablen Schichten nachgewiesen, während Occludin primär im SG detektiert wurde (Tab. 7). Diese spezifische Lokalisation der TJ-Komponenten wurde bereits für die humane Haut (Brandner et al., 2002; Haftek et al., 2011; Kirschner et al., 2009; Pummi et al., 2001), aber auch für bovine Gingiva beschrieben (Langbein et al., 2002; Schlüter et al., 2007). Aufgrund der unterschiedlichen Komposition in verschiedenen Schichten der Haut und der Gingiva könnten TJ-Proteinen unterschiedliche Funktionen in unterschiedlichen Schichten zukommen. Tracer-Studien wiesen in diesem Zusammenhang auf eine Barrierefunktion des SG hin (Furuse et al., 2002; Hashimoto, 1971). Da Occludin in spezifisch in dieser Schicht nachgewiesen wurde, könnte diesem TJ-Protein in diesem Zusammenhang eine besondere Rolle zukommen.

Einige Studien belegten mithilfe der Immunfluoreszenz-Analyse die Existenz von TJ-Proteinen auch an *in vitro* kultivierten humanen oralen Keratinozyten (Gröger et al., 2008, 2010; Gröger & Meyle, 2019). Andere Gruppen folgerten wiederum aus TEER-Messungen und schwachen Immunfluoreszenz-Färbungen, dass humane gingivale Keratinozyten *in vitro* keine TJ ausbilden (Damek-Poprawa et al., 2013). Mögliche Begründungen für diese gegensätzlichen Ergebnisse könnte ein Unterlassen der Umstellung der Keratinozyten auf ein Differenzierungsmedium mit höherem  $\text{Ca}^{2+}$ -Gehalt sein. Weiterhin erfordert die Markierung von TJ-Proteinen mittels indirekter Immunfluoreszenz besondere Maßnahmen wie den Einsatz von Puffern mit angepasstem  $\text{Ca}^{2+}$ - und  $\text{Mg}^{2+}$ -Gehalt (Matter & Balda, 2003). In dieser Arbeit wurden in Zellmembranen von sowohl kultivierten immortalisierten humanen gingivalen Keratinozyten (OKG4) als auch von GEC, die aus humaner Gingiva isoliert wurden, die TJ-Proteine Claudin-1, ZO-1 und Occludin nachgewiesen. Da TJ Teil der physikalischen Barriere sind, wurde untersucht, ob der IL-1 $\beta$ -induzierte Anstieg des TEER mit einer veränderten TJ-Proteinexpression korreliert. Die Immunfluoreszenz ermöglichte die Bestimmung der zellulären Lokalisation der TJ-Proteine und legten eine Hochregulation spezifischer TJ-Proteine unter IL-1 $\beta$ -Gabe nahe. Um diese Daten zu quantifizieren, erfolgte die Analyse der Expression dieser TJ-Proteine von gingivalen Keratinozyten mittels Western Blot-Methode. Dieses Verfahren besitzt eine hohe Sensitivität und die auf Nitrocellulosemembranen geblottete Proteinbanden können mittels Antikörper-Detektion



auf mehrere Proteine hin untersucht werden. Die Western Blot-Daten zeigten eine Erhöhung der Expression der TJ-Proteine ZO-1 und Occludin nach IL-1 $\beta$ -Stimulation gingivaler Keratinozyten für 24 h. An Schweinehaut und humanen Hautmodellen wurden ebenfalls eine Hochregulation von ZO-1 und Occludin als Reaktion auf IL-1 $\beta$ , welches im Zuge der Pathogenese der entzündungsbegleiteten Psoriasis vermehrt von Keratinozyten produziert wird, beschrieben (Kirschner et al., 2009). Übereinstimmend verursachten pathogene und nichtpathogene Bakterien in der Haut zu Beginn der Infektion eine Hochregulierung von Occludin und ZO-1 (Ohnemus et al., 2008).

*P. gingivalis* ist ein Schlüsselbakterium in der Pathogenese der Parodontitis, welches hohe IL-1 $\beta$ -Reaktionen hervorrufen kann (Stathopoulou et al., 2010) und die physikalische Barriere der Mundschleimhaut beeinträchtigt (Choi et al., 2013; Gröger et al., 2010). Es wurde jedoch belegt, dass in frühen Stadien der *P. gingivalis*-induzierten Entzündung die Expression von TJ-Proteinen verstärkt wurde, resultierend in einer Erhöhung der Barrierefunktion (Gröger et al., 2010; Guo et al., 2018). In Immunfluoreszenz-Analysen an minimal entzündeten Gingivaproben von Parodontitispatienten zeigte sich eine breite Lokalisation von ZO-1 und Occludin über alle Zellschichten des Epithels verglichen mit Befunden dieser Arbeit, für die klinisch gesunde Gingiva analysiert wurde (Ye et al., 2014). Auch an der Haut wurde nach 24 h eine verbreiterte Lokalisation von Occludin und ZO-1 nach IL-1 $\beta$ -Injektion beobachtet (Kirschner et al., 2009).

Eine längere Gabe von IL-1 $\beta$  hingegen führte an kultivierten Keratinozyten der Haut zu einer Abnahme der Expression von Occludin und ZO-1 und zu einer Abnahme des TEER (Kirschner et al., 2009). Übereinstimmend führte eine längere Infektion gingivaler Keratinozyten mit *P. gingivalis* zum Abfall des TEER und zu einer drastischen Veränderung des Molekülmusters der TJ-Proteine Claudin-1, -2 und Occludin (Gröger et al., 2010). In einem Parodontitis-Modell an Ratten zeigte sich eine Abnahme der Expression von Claudin-1 nach Induktion von Parodontitis mittels LPS über acht Wochen (Fujita, Firth, et al., 2012). Immunfluoreszenz-Analysen von Gingivaproben parodontal geschädigter Patienten zeigte eine Herunterregulation von ZO-1, jedoch nicht von Occludin (Choi et al., 2013, 2014). Occludin könnte daher eine Schlüsselrolle im Rahmen entzündungsinduzierter Barrierereaktionen einnehmen. Eine längere Stimulationsdauer oder die Infektion mit virulenteren Substanzen scheint demnach langfristig die Barriere von Keratinozyten der Haut und der Gingiva zu beeinträchtigen. Es wurde in diesem Zusammenhang allerdings nicht geklärt, ob die Infektion eine alleinige Zerstörung der Barrierefunktion oder gar den Zelltod induzierte, der ursächlich für den Abfall des TEER und das veränderte TJ-Muster war. Die Komplexität der Wirkung parodontalpathogener Keime bzw. ihrer Produkte (LPS, Gingipaine) führte möglicherweise zu multiplen und drastischeren Effekten als die alleinige IL-1 $\beta$ -Stimulation, die eine initiale Entzündung gingivalen Gewebes darstellte.

Insgesamt weisen diese Daten auf eine Verstärkung der Barrierefunktion gingivaler Keratinozyten zu frühen Stadien der Entzündung, möglicherweise als präventiver Effekt zur Vermeidung der Invasion weiterer Pathogene, hin (Ohnemus et al., 2008). Die Daten liefern darüber hinaus Einblicke in die Wirtsreaktionen im Frühstadium der Parodontitis sowie Informationen über die TJ-Bildung in humanen gingivalen Keratinozyten und deren Regulation unter entzündlichen Bedingungen. Dies kann dazu beitragen, Arzneimittel bzw. innovative Träger-Systeme zu entwickeln, die effektiv auf die entzündete Barriere abzielen, um die Bioverfügbarkeit von Medikamenten zur Behandlung von Parodontitis zu verbessern.

**Tab. 7: Lokalisation von TJ-Proteinen in humaner Gingiva**

TJ-Protein	Gesunde humane Gingiva				Minimal entzündete Gingiva	Etablierte parodontale Läsion
	SB	SS	SG	SC		
<b>Claudin-1</b>	(+)	+	+	-	n.b.	n.b.
<b>ZO-1</b>	(+)	+	+	-	↑ (Ye et al., 2014)	↓ (Choi et al., 2013)
<b>Occludin</b>	-	(+)	+	-	↑ (Ye et al., 2014)	= (Choi et al., 2014)

+ positiv, (+) schwach positiv, - negativ; SB Stratum basale, SS Stratum spinosum, SG Stratum granulosum, SC Stratum corneum; n.b. nicht beurteilt, ↑ Zunahme, ↓ Abnahme, = keine Veränderung; Ergebnisse zur gesunden humanen Gingiva wurden aus Befunden dieser Arbeit abgeleitet, Daten von erkrankter Gingiva wurden aus gekennzeichnete Literatur herangezogen.

## 5.4 Etablierung inflammatorischer humaner gingivaler 3D-Modelle

Aufgrund der im Vergleich zur Haut geringeren Oberfläche steht die humane Gingiva nur limitiert für Untersuchungen zur Verfügung. Da gesundes gingivales Gewebe nur selten exzidiert wird und es sich bei Entnahme *post mortem* um avitales Gewebe handelt, eignen sich gingivale Biopsien nur eingeschränkt zur Beantwortung einiger Fragestellungen.

Um diese Probleme zu überwinden, wurden »zweidimensionale (2D-) Modelle« herangezogen. Diese Modelle bestehen aus nur einem Zelltyp, der im Monolayer unter konstanten Bedingungen unter weitgehendem Ausschluss externer Störfaktoren kultiviert wurde. Diese Modelle eignen sich zur Untersuchung einfacher Fragestellungen, wie beispielsweise Zytotoxizität verschiedener Substanzen auf einzelne Zelltypen. Diese 2D-Modelle stellen die Situation *in vivo* jedoch nicht korrekt nach, da sie oftmals nicht mehrschichtig sind, Zell-Zell-Kontakte reduziert sind und ihnen immer das Bindegewebe fehlt, von welchem wichtige Signale ausgehen (Karring et al., 1975;

Squier & Kammeyer, 1983). Dadurch kann die Funktion der Zellen und die Antwort auf externe Stimuli im Vergleich zur *in vivo*-Situation verändert sein. Die Gingiva ist jedoch eine komplexe mehrschichtige Struktur, in der Zellen den Prozess der terminalen Differenzierung durchlaufen. Das Forschungsgebiet des »Tissue Engineering« ermöglicht die Überwindung bisheriger Limitationen *in vitro*, da sie die anatomische Situation *in vivo* berücksichtigt (Dongari-Bagtzoglou & Kashleva, 2006; Moharamzadeh et al., 2007).

#### **5.4.1 Etablierung humaner gingivaler epithelialer 3D-Modelle**

Epitheliale 3D-Modelle der Gingiva bestehen aus einem mehrschichtigen Epithel und ermöglichen die Kommunikation von Zellen über einen mehrschichtigen Verband (Ilmarinen et al., 2013; Kimball et al., 2006). In der Literatur finden sich zahlreiche Studien, die TR146-basierte 3D-Modelle verwendeten (Schaller et al., 2004; Vande Vannet et al., 2007). Diese Zelllinie wurde ursprünglich aus einer Biopsieprobe eines Plattenepithelkarzinoms der bukkalen Mundschleimhaut gewonnen, welches einen Lymphknoten infiltriert hatte (Rupniak et al., 1985). Die Zellen wiesen jedoch morphologische und funktionelle Veränderungen im Vergleich zur Ursprungszelle auf und schienen die Komplexität des Mundschleimhautepithels *in vitro* daher nicht nachahmen zu können (Bierbaumer et al., 2018; Moharamzadeh et al., 2007; Yadev et al., 2011). Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein epitheliales Modell sowohl mit primären als auch mit hTERT-immortalisierten gingivalen Keratinozyten entwickelt und histologisch analysiert. Durch die Verwendung immortalisierter Zelllinien ist die Verfügbarkeit nicht beschränkt und Spendervariabilitäten werden ausgeschlossen. Die immortalisierten OKG4-Zellen bildeten hierbei auch in Abwesenheit von Fibroblasten ein mehrschichtiges Epithel, welches einen Übergang von eher kuboidalen Zellen auf der Basalseite zu abgeflachten Zellen an der Oberfläche aufwies. Dieses Epithel ähnelte dem von GEC gebildeten Epithel. GEC-Modelle wiesen jedoch eine geringere Höhe als OKG4-Modelle auf, die durch die beobachtete verstärkte Desquamation, aber auch durch eine verminderte Teilungsfähigkeit primärer Zellen zu erklären sein könnte. Bei im Monolayer kultivierten GEC wurden bereits unter Kultivierung in Medium mit geringerem  $\text{Ca}^{2+}$ -Gehalt Filaggrin-positive Signale beobachtet. Dies könnte auf die Isolierung primärer Zellen aus unterschiedlichen, auch späteren Differenzierungsstadien zurückzuführen sein, die sich in länger kultivierten GEC-Modellen als fortgeschrittene Desquamation zeigte. Sowohl OKG4- als auch GEC-Modelle exprimierten den terminalen Differenzierungsmarker Filaggrin suprabasal und Cytokeratin-5 in eher basalen Schichten. Diese Lokalisation ähnelte der der nativen Gingiva.

In der Literatur sind die analysierten Zeiträume bzw. die Stabilität solcher Systeme in der Kultur sehr begrenzt. Meyle und Kollegen beobachteten nach sieben Tagen eine Abnahme des TEER, die bei weiterer Kultivierung mit dem Ablösen der Keratinozyten von der Filterfläche und

Viabilitätsverlust der Zellen einherging (Meyle et al., 1999). In dem hier etablierten System konnte die als TEER gemessene Barrierefunktion gingivaler Epithelzellen über mehrere Wochen aufrechterhalten werden. Daher eignet sich dieses stabile System, um Fragestellungen, die das Gingivaepithel betreffen, zu untersuchen.

#### **5.4.2 Etablierung humaner organotypischer gingivaler Schleimhautäquivalente**

Die native Gingiva besteht zusätzlich aus einer unter dem Epithel liegenden *Lamina propria*. Es ist seit längerer Zeit bekannt, dass das Bindegewebe unter Epithelien nicht nur deren Wachstum unterstützt, sondern auch die Differenzierung der Epithelien reguliert und deren Morphologie beeinflusst (Karring et al., 1975; Squier & Kammeyer, 1983). Um die natürliche Gingiva naturgetreuer abbilden zu können, sollten 3D-Modelle daher sowohl aus Epithel als auch aus Bindegewebe bestehen (Bao et al., 2014). In dieser Studie wurde für den Aufbau von derartigen »full thickness«-Modellen ein Kollagengel als Grundlage für Bindegewebe genutzt, in das Fibroblasten eingebettet wurden (Dongari-Bagtzoglou & Kashleva, 2006). Der Fokus lag auf einem möglichst naturgetreuen Aufbau der humanen Gingiva, weshalb Modelle bisheriger Studien, die nicht-humane Zelllinien bzw. Kombinationen von humanen und nicht-humanen Zelllinien verwendeten für unsere Fragestellungen nicht geeignet waren (Dongari-Bagtzoglou & Kashleva, 2006; Gosselin et al., 1990; Kinikoglu et al., 2012; McLeod et al., 2014; Pinnock et al., 2014). Eine weitere Besonderheit ist die Spezifität des Gewebes. Die Gingiva stellt nur einen Teil der Mundschleimhaut dar, der allerdings spezifische Eigenschaften, wie Ortho- bzw. Parakeratinisierung aufweist. Die Keratinozyten, die zum Aufbau von 3D-Modellen in anderen Studien genutzt wurden, stammen aufgrund der jeweiligen Fragestellung oder der größeren vorhandenen Oberfläche meist von der auskleidenden Mukosa, z. B. der bukkalen Mukosa oder der Mukosa des Mundbodens, die sich durch eine nicht-keratinisierte und daher permeablere Epithelkomponente auszeichnet (Dongari-Bagtzoglou & Kashleva, 2006; Jennings et al., 2016; Pinnock et al., 2014; Schaller et al., 2004). Keratinisierte Epithelien, wie die Gingiva, wirken als stärkere Barriere gegen das Eindringen verschiedener Substanzen (Thilander & Bloom, 1968). Dies ist insbesondere im Hinblick auf präklinische Penetrationsanalysen mit potenziellen Medikamenten zur Behandlung inflammatorischer Mundschleimhauterkrankungen von Bedeutung.

Kosten und Kollegen zeigten ein Modell, das aus primären gingivalen Keratinozyten und Fibroblasten aufgebaut wurde (Kosten et al., 2015). Aufgrund der geringen Verfügbarkeit und Passagierbarkeit eigneten sich primäre Zellen zum Aufbau von 3D-Modellen nicht für großangelegte *in vitro*-Versuche. Darüber hinaus unterschieden sich Zellen verschiedener Spender in ihren Wachstumsmustern. Dies resultierte in einer unterschiedlichen Anzahl der

Epithelschichten im aufgebauten Modell (Dongari-Bagtzoglou & Kashleva, 2006). 3D-Modelle aus Tumor-abgeleiteten oralen Zelllinien, wie H357 oder TR146 wiesen Abweichungen zum primären Pendant im morphologischen Aufbau und Differenzierungsprozess auf und besaßen nur eine eingeschränkte Fähigkeit zur Ausbildung eines mehrschichtigen Epithels. Daher waren sie für den Aufbau gesunder gingivaler Modelle nicht geeignet (De Ryck et al., 2014; Jennings et al., 2016; Pinnock et al., 2014). Dies traf auch für gingivale Modelle zu, die unter Verwendung HPV-immortalisierter Keratinozyten aufgebaut wurden, die zudem eine Tendenz zur karzinomartigen Invasion in das darunterliegende Bindegewebe aufwiesen. Modelle aus hTERT-immortalisierten Zellen erfüllten die physikalischen und funktionellen Ansprüche primärer Zellen in Bezug auf Morphologie und Barriereigenschaften besser (Bao et al., 2014; Buskermolen et al., 2016). Daher wurden hTERT-immortalisierte OKG4-Zellen zum Aufbau gingivaler 3D-Modelle für präklinische Untersuchungen der Mundschleimhaut verwendet.

Kommerzielle Modelle, z. B. EpiGingival™ (GIN 300-FT, MatTek) sind verfügbar, jedoch kostenintensiv (4769 \$ für 24 Micro-Gewebe (0,6 cm<sup>2</sup>), Stand 07.10.2019). Sie stammen von primären Zellen, sodass ihre Kultivierungsdauer begrenzt ist. Die auch in dieser Arbeit beobachtete Variabilität zwischen verschiedenen Spendern kann die Versuche zusätzlich beeinflussen. Das Gewebe stammt von Spendern, die sich Zahnextraktionen unterzogen haben („EpiOral and EpiGingival in vitro 3D Tissues“, o. J.). Somit ist ungeklärt, ob es sich bei dem entnommenen Gewebe ausschließlich um gesunde Gingiva handelt. Alternativ wurden die Zellen von Leichen entnommen, was zusätzliche ethische Fragen aufwirft. Durch 3D-Modelle, die unter Verwendung immortalisierter Zelllinien, die ihrem primären Pendant nahekommen, etabliert werden, werden diese Problematiken umgangen.

#### **5.4.3 Gingivale 3D-Modelle repräsentieren morphologisch die native Gingiva**

Die Keratinozyten der in dieser Arbeit etablierten organotypischen gingivalen 3D-Modelle waren in der Basalschicht zumeist kubisch, die Zellen Richtung Epitheloberfläche flachten eher ab. Anhand spezifischer Differenzierungsmarker können Gewebe exakt hinsichtlich Epithelart, morphologischem Phänotyp und Stadium der Differenzierung analysiert werden (Moll et al., 1982). In dieser Arbeit wurde das entwickelte 3D-Modell hinsichtlich Differenzierungsstadien durch die spezifischen Strukturproteine Ki-67, Keratin-5 (basal) und Filaggrin (terminal) charakterisiert. Die Lokalisation spezifischer Differenzierungsmarker war hierbei ähnlich der der keratinisierten Gingiva (Mackenzie et al., 1991; Presland & Dale, 2000). Auffällig war, dass das Epithel der 3D-Modelle dünner war als das nativer Gingiva (De Ryck et al., 2014; Kinikoglu et al., 2012; McLeod et al., 2014). Die Abwesenheit von Reteleisten könnte im Ausbleiben

mechanischer Beanspruchung der Modelle und daher fehlender Reize zur Ausbildung dieser Verankerung begründet und sollte Teil zukünftiger Forschung sein (Buskermolen et al., 2016).

Gingivale 3D-Modelle sind demnach in der Lage, der gesunden Gingiva ähnliche Differenzierungsmuster zu entwickeln (Bao et al., 2014; Buskermolen et al., 2016; Gosselin et al., 1990; Tomakidi et al., 1998). Hierbei zeigte sich die Expression zellspezifischer Marker in 3D-Modellen qualitativ und quantitativ ähnlicher der humanen Gingiva als Monolayer-Kulturen (Bao et al., 2014). Dies legt nahe, dass die Verwendung gingivaler 3D-Modelle ein besseres Verständnis von Zell-Zell-Interaktionen, Morphologie und Differenzierungsprozessen der Gingiva ermöglicht als einfache 2D-Monolayer-Kulturen.

#### **5.4.4 Gingivale 3D-Modelle zeigen inflammatorische Antwort auf IL-1 $\beta$**

Studien, die die Zytokinfreisetzung humaner Gingiva untersuchten, sind aufgrund der begrenzten Verfügbarkeit von frischen Biopsien selten (Buskermolen et al., 2016). Daher wurden in dieser Arbeit 3D-Modelle in pathologische Zustände versetzt. Da »full thickness«-Modelle die native Gingiva besser repräsentieren als rein epitheliale Modelle, wurde die Wirkung von IL-1 $\beta$  an diesem Modell genauer untersucht.

In der Literatur finden sich verschiedene Methoden der Infektion oraler/ gingivaler 3D-Modelle (Andrian et al., 2004; Belibasakis et al., 2015; Buskermolen et al., 2016; Mostefaoui et al., 2004). Die Stimulation von 3D-Modellen mit Zytokinen schien weniger drastische Effekte auf die Morphologie zu verursachen im Vergleich zur Infektion mit parodontalpathogenen Bakterienspezies (Andrian et al., 2004; Jennings et al., 2016). Da unterschiedliche Zytokine unterschiedliche Signalwege ansteuern und parodontalpathogene Keime mit einer höheren Virulenz zahlreiche Signalwege aktivieren können, wurde zur Etablierung robuster inflammatorischer gingivaler 3D-Modelle für ein grundlegendes Verständnis das mit der Pathogenese der Parodontitis assoziierte proinflammatorische Zytokin IL-1 $\beta$  zur Stimulation genutzt. Die Stimulation beeinflusste im untersuchten Zeitraum weder die Zellmasse noch die metabolische Aktivität gingivaler Keratinozyten und verursachte übereinstimmend bei Kultivierung als epitheliales Modell weder bei GEC noch bei OKG4 eine Änderung der Zellkernanzahl und der Höhe des epithelialen Aufbaus.

Untersuchte Differenzierungsmarker wurden in ähnlicher Lokalisation wie bei unstimulierten Modellen beobachtet. Jedoch zeigte die Pan-Cytokeratin-Färbung eine beginnende geringere Organisation im Vergleich zur Kontrolle. Es konnten weniger abgeflachte Keratinozyten im apikalen Bereich beobachtet werden. Ein histologisch sichtbares initiales Abreißen des Epithels von der *Lamina propria* ließ einen instabileren Verbund im Vergleich zur Kontrolle vermuten. Dies wurde auch in anderen Studien beobachtet, die orale Modelle infizierten (Andrian et al., 2004).

Auch ein in der Höhe reduziertes Fibroblasten-Kollagengel fiel auf. Die induzierte Entzündung schien demnach auch einen Einfluss auf die *Lamina propria* zu haben. Dieser Effekt ließe sich durch eine entzündungsbedingte Gewebsdestruktion, eine veränderte Fibroblastenproliferation und Zytokinproduktion erklären, welche schon in bereits publizierten Studien beschrieben wurde (Lukens et al., 2012; Okada & Murakami, 1998). Diese Effekte sowie der Einfluss der Dauer der Stimulation auf die verwendeten Zelltypen sollten im Rahmen zukünftiger Forschung Berücksichtigung finden.

In dieser Studie wurden »full thickness«-Modelle über acht Tage mit IL-1 $\beta$  stimuliert. Da in ELISA-Versuchen mit OKG4-Zellen durch IL-1 $\beta$ -Stimulation Effekte auf die Konzentration der Zytokine IL-6 und IL-8 detektiert wurden, wurden die Kulturüberstände von behandelten und unbehandelten 3D-Modellen auf diese Zytokine hin untersucht. Analytierte 3D-Modelle sezernierten einen Tag nach Airlift auch ohne IL-1 $\beta$ -Gabe IL-6 und IL-8. Übereinstimmend zeigten andere Untersuchungen an 3D-Modellen, dass diese Interleukine und TNF $\alpha$  freisetzen können (Buskermolen et al., 2016; Kosten et al., 2015). Durch diese *per se* hohen Zytokinkonzentrationen erschienen nach 24 h die durch IL-1 $\beta$  ausgelösten Effekte nicht signifikant. Die Ko-Kultur mit Fibroblasten könnte zur vermehrten Produktion der Zytokine beitragen, insbesondere die Tatsache, dass die Fibroblasten nach dem Airlift kein Fibroblasten-Wachstumsmedium, sondern Differenzierungsmedium für Keratinozyten von basal erhielten. Im zeitlichen Verlauf nahm die Konzentration der Zytokine ab und konnte durch IL-1 $\beta$ -Gabe erhöht werden. An gingivalen 3D-Modellen führte die Stimulation mit TNF $\alpha$  ebenfalls zu einem Anstieg von Zytokinen, wie IL-6, IL-8 und CCL20 (Buskermolen et al., 2016) und ein *P. gingivalis*-stimuliertes orales Modell zeigte signifikant erhöhte Zytokinkonzentrationen an IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 und TNF $\alpha$  im Vergleich zur Kontrolle (Andrian et al., 2004). Die Reduktion der Zytokinkonzentration über die Zeit könnte als Gewöhnungseffekt der Zellen an die Kultivierungsbedingungen oder als abnehmende Befähigung der Keratinozyten zur Zytokinsekretion gedeutet werden. Die Ergebnisse decken sich mit den ELISA- und Cytokine-Array-Daten der OKG4-Kulturen zu den späteren untersuchten Zeitpunkten, bei dem sich die Effekte durch IL-1 $\beta$ -Gabe auf die IL-8-Konzentration stärker zeigten als auf die des »frühen« proinflammatorischen Zytokins IL-6. Weitere Untersuchungen, z. B. inwiefern sich die Dauer der Kultivierung auf Zytokinspiegel auswirkt und eine Aufschlüsselung des Beitrags der Fibroblasten, erscheinen sinnvoll.

Die Verwendung gingivaler 3D-Modelle ermöglicht ein besseres Verständnis von Zell-Zell-Interaktionen, Morphologie und Differenzierungsprozessen der Gingiva im Vergleich zu 2D-Monolayer-Kulturen. Die Darstellung spezifischer Differenzierungsmarker zeigte die morphologische Kongruenz zu humaner Gingiva. Die statistische Analyse zeigte eine Hochregulation des proinflammatorischen Zytokins IL-8 über die Zeit in IL-1 $\beta$ -stimulierten Modellen, die eine erfolgreiche Induktion einer Entzündung belegt. Jedoch ist für zukünftige

Forschung auch die Reaktion der etablierten Modelle auf antiinflammatorische Wirkstoffe von Interesse. Diesbezügliche Versuche sind essenziell für die Beurteilung der Erfolgsquote der etablierten Modelle und sind Teil weiterführender Forschung.

Bis heute leiden über die Hälfte der Menschheit weltweit an Parodontitis, die durch eine Entzündung des Zahnhalteapparates sowie Knochenverlust gekennzeichnet ist und unbehandelt im Zahnverlust resultiert. Aufgrund der limitierten Verfügbarkeit sowie bedeutender Nachteile gingivaler Biopsien besteht zur Analyse pathologischer Prozesse der Mundschleimhaut und zur Bewertung potenzieller antiinflammatorischer Therapeutika der Bedarf nach einem reproduzierbaren Konstrukt, das der *in vivo*-Situation der humanen Gingiva möglichst nahekommt. Das Ziel dieser Arbeit war deshalb die Etablierung robuster inflammatorischer gingivaler 3D-Modelle. Durch Verzicht auf die Verwendung Tumor-abgeleiteter Zelllinien und durch Verwendung humaner Zellen wurde ein repräsentatives Modell der *in vivo*-Situation der humanen Gingiva etabliert, bei dem auch die bindegewebige Komponente berücksichtigt wurde. Die etablierten Modelle berücksichtigen die anatomische Struktur und simulieren die klinische Situation daher besser als Monolayer-Modelle. Dieser Vorteil wurde auch in anderen Studien gezeigt (Bao et al., 2014; Moharamzadeh et al., 2007; Yadev et al., 2011). Darüber hinaus wurden spezifisch gingivale Zellen verwendet, die ein differenziertes Epithel ausbildeten. Dies ist insbesondere im Hinblick auf potenzielle Barriereigenschaften sowie Penetrationsmöglichkeiten, durch z. B. Wirkstoff-Träger-Systeme wie Nanocarrier, von Bedeutung. Gingivale 3D-Modelle sind der humanen keratinisierten Gingiva im morphologischen Aufbau und Differenzierungsgrad sehr ähnlich, funktionell regelgerecht im Sinne einer messbaren inflammatorischen Reaktion auf einen externen Reiz durch IL-1 $\beta$ , können kostengünstig reproduzierbar aufgebaut werden und bieten eine ethisch vertretbare Alternative zu kommerziellen Modellen und tierischen wie humanen Biopsien. Die Modelle eignen sich daher zur Beantwortung grundlagenmedizinischer Fragestellungen, ermöglichen ein besseres Verständnis von Krankheitsprozessen und die Forschung an neuen Therapieansätzen zur Behandlung entzündlicher Mundschleimhauterkrankungen.

## **5.5 CMS-Nanocarrier als therapeutischer Ansatz zur Behandlung entzündlicher Mundschleimhauterkrankungen**

### **5.5.1 Anwendung von Nanomedizin zur Behandlung der Parodontitis**

Im medizinischen Kontext wird Nanotechnologie zur Diagnose, Prävention und Heilung von Krankheiten entwickelt (Aminu et al., 2017; Narang & Narang, 2015). Nanomaterialien haben



aufgrund ihrer geringen Größe eine deutlich vergrößerte Oberfläche pro Masseneinheit im Vergleich zu größeren Partikeln. Dies führt zu einzigartigen elektronischen, optischen und magnetischen Eigenschaften. Die physikalisch-chemischen Eigenschaften und Größenbereiche ermöglichen die Unterscheidung unterschiedlicher Nanomedizin-Klassen, z. B. Liposome, Nanopartikel, Polymertherapeutika, Blockcopolymer-Mizellen, Goldnanopartikel und Nanokristalle. Nanopharmazeutika binden den Wirkstoff entweder kovalent oder umschließen und verkapseln ihn nicht-kovalent (Duncan & Gaspar, 2011). Letztere werden als »Drug-Delivery-Systeme« (DDS) bezeichnet.

Aufgrund der zahlreichen verschiedenen Krankheiten, die in der Mundhöhle auftreten können und der Schwierigkeit, eine hohe Konzentration eines indizierten Medikaments im erkrankten Bereich zu erreichen, besteht zweifellos eine große Nachfrage nach neuen DDS für die lokale Behandlung pathologischer Zustände der Mundhöhle. So kann Nanotechnologie zur Früherkennung von Parodontitis genutzt werden, indem Nanostrukturen als Fluoreszenzmarker für Biomoleküle parodontalpathogener Bakterien dienen (Aminu et al., 2017). Auch präventive Nanotechnologie-Ansätze zur Verhinderung der Anlagerung bakterieller Biofilme auf der Zahnoberfläche existieren (Priyadarsini et al., 2018). Eines der wichtigsten Anwendungsfelder nanotechnologischer Systeme ist jedoch die verbesserte Wirkstoffverabreichung. Da die Prävalenz der Parodontitis mit dem Alter zunimmt, ist unter Berücksichtigung des demographischen Wandels und des Trends des zunehmenden Zahnerhaltes im Alter ist eine Verstärkung der Belastungen durch Parodontitis anzunehmen (Jepsen et al., 2017; Jordan & Micheelis, 2016; Kassebaum et al., 2014; Tonetti et al., 2017). Der derzeitige Stand der Parodontitisbehandlung sieht mechanische Strategien vor, um die mikrobielle Belastung innerhalb der Parodontaltasche zu reduzieren. Zusätzlich wurden systemische Antibiotika genutzt, um die subgingivale mikrobielle Flora besser zu kontrollieren. Aufgrund der Nachteile der systemischen Medikamentenverabreichung wurde die ergänzende Therapie in Richtung lokal applizierter Antibiotika und Antiseptika verlagert (Nguyen & Hiorth, 2015). Die Verabreichung lokaler adjunktiver Medikamente an das Zahnfleischepithel war aufgrund der Komplexität der Anatomie und Zugänglichkeit der Parodontaltasche eine Herausforderung (Aminu et al., 2017). Zusätzlich stellt die Mundschleimhaut mit ihrem mehrschichtigen Epithel sowie durch ihr feuchtes Milieu, bereitgestellt durch Speichelfluss, Mukus und Sulkusfluid, sowie durch den Schluckreflex, der potenzielle Medikamente rasch aus der Mundhöhle entfernt, eine zu überwindende Hürde für entsprechende Substanzen dar (Nguyen & Hiorth, 2015). Daher ist das Ziel, die Verweilzeit am Zielort zu verlängern und die Effizienz etablierter Wirkstoffe zu erhöhen (Aminu et al., 2017).

Polymere haben sich aufgrund ihrer hohen physikalischen Stabilität, der Biokompatibilität, der Nichtimmunogenität und der biologischen Abbaubarkeit gegenüber anderen DDS als überlegen erwiesen (Joshi et al., 2016; Poonia et al., 2017). Einige Beispiele für nanotechnologische

Polymere, die als Gerüst für die Verabreichung von Medikamenten in die Parodontaltasche untersucht wurden, sind Chitosan, Poly- $\epsilon$ -Caprolacton (PCL), Polypropylen, Celluloseacetatpropionat und Ethylvinylacetat (Narang & Narang, 2015). Solche Polymere können als Vehikel für etablierte Wirkstoffe dienen und helfen, ihre Adhäsion an und Penetration in die Mundschleimhaut und demnach zum Wirkort, zu erhöhen, um so entzündliche Erkrankungen der Mundschleimhaut effektiver behandeln zu können. Der Wirkstoff wird durch das Vehikel physikalisch umschlossen. Dies schützt zusätzlich vor dessen vorzeitiger Degradation, ermöglicht die Kontrolle der Wirkstofffreisetzung und erhöht die Bioverfügbarkeit (Duncan & Gaspar, 2011; Singh & Lillard, 2009; Zhang et al., 2013). Die Freisetzungsrates des Wirkstoffes am Zielort kann präzise durch z. B. den pH-Wert oder die Temperatur gesteuert werden (Zhang et al., 2013). Diese Verkapselung ermöglicht außerdem den Transport einer Vielzahl verschiedener Medikamente mit unterschiedlichen chemischen Eigenschaften (Du et al., 2016; Hönzke et al., 2016; Volpedo et al., 2019). Einige Wirkstoffe wie Tetrazyklin, Metronidazol und Chlorhexidin wurden in DDS zur Behandlung von Parodontitis eingekapselt (Narang & Narang, 2015). Die lokale Verabreichung hat darüber hinaus Vorteil, dass das Medikament bei niedriger Dosis die Zielregion erreicht und so die Exposition des Medikaments im ganzen Körper minimiert wird (Aminu et al., 2017). Dies reduziert systemische Nebenwirkungen und ermöglicht die Vermeidung des First-Pass-Effektes (Jager et al., 2018; Volpedo et al., 2019). Die Patienten-Compliance wird durch die non-invasive, einfache Anwendung verbessert. Darüber hinaus ist die Entwicklung von Nanocarriern als Vehikel im Vergleich zur Entwicklung neuer und effizienterer Wirkstoffe weniger zeit- und kostenaufwändig (Tiwari et al., 2012). Die verabreichbare Dosis wird zwar durch das verfügbare Volumen der Parodontaltasche begrenzt, jedoch wird durch die geschützte Anatomie die Verweil- und Wirkungsdauer des Systems verlängert. Dies ermöglicht die Reduktion der Verabreichungsfrequenz und Dosis (Joshi et al., 2016).

### **5.5.2 CMS 10-E-15-350 zeichnet sich durch hohe Biokompatibilität aus**

In unserer Arbeitsgruppe wurde bereits der Nanocarrier CMS 10-A-18-350 charakterisiert, welcher gute Eigenschaften hinsichtlich Penetration bzw. Adhäsion an der oralen Schleimhautoberfläche aufzeigte (Jager et al., 2018). Jedoch war bei diesem CMS-Typ das Risiko erhöht, dass sein Abbau nach der Anwendung zur Bildung toxischer Polyglycerolamine führen könnte (Hellmund et al., 2015; Khandare et al., 2010). Daher wurde im Rahmen dieser Studie eine neue Generation des CMS-Nanocarriers, CMS 10-E-15-350, verwendet, bei dem die Amidbindung zwischen dem Polyglycerolkern und der inneren Alkylschale durch eine Esterbindung ersetzt wurde, die die Bioabbaubarkeit verbessern und die Bildung toxischer Polyglycerolamine verhindern sollte (Hönzke et al., 2016; Unbehauen et al., 2017).

CMS-Nanocarrier bestehen aus biokompatiblen und abbaubaren Polymeren (Singh & Lillard, 2009). Der Nanocarrier CMS 10-E-15-350 konnte bislang aus der Reihe der CMS-Nanocarrier als derjenige mit der höchsten Biokompatibilität identifiziert werden. Nach 24 h zeigten sich keine zytotoxischen Effekte auf Keratinozyten der Haut (Hönzke et al., 2016; Pischon et al., 2017). Diese Befunde wurden für gingivale Keratinozyten in dieser Arbeit bestätigt. Lediglich bei höheren Konzentrationen des Nanocarriers und verlängerten Inkubationszeiten zeigte sich in anderen Studien eine Änderung der metabolischen Aktivität gingivaler Keratinozyten (Jager et al., 2018). Die Morphologie gingivaler Keratinozyten zeigte sich bei Applikation von Indocarbocyanin-markiertem (CMS-ICC) und unmarkiertem CMS nicht beeinflusst. Auch in inflammatorischer Umgebung, die durch simultane Gabe von IL-1 $\beta$  simuliert wurde, zeigte der Nanocarrier weder zytotoxische noch proliferative Effekte auf gingivale Keratinozyten. Damit ist ein therapeutischer Einsatz von Nanocarriern auch an der Mundschleimhaut denkbar.

Das Parodontitis-assoziierte Zytokin IL-1 $\beta$  führte zu einer zeitabhängigen Hochregulation von IL-6 und IL-8 von gingivalen Keratinozyten. Daher scheinen IL-6 und IL-8 verlässliche Marker zur Kontrolle der Homöostase gingivaler Epithelzellen zu sein. Der CMS-Nanocarrier hatte nach 24 h weder unter Kontrollbedingungen noch in inflammatorischer Umgebung einen Einfluss auf die IL-6- und die IL-8-Sekretion gingivaler Keratinozyten. Insbesondere für IL-6 zeigte sich allerdings ein Trend der Drosselung der Zytokinsekretion durch CMS im Vergleich zur Kontrolle sowohl in An- als auch in Abwesenheit von IL-1 $\beta$ . Diese verminderte Zytokinausschüttung könnte als antiinflammatorischer Effekt des unbeladenen CMS-Nanocarriers interpretiert werden, die z. B. durch Bindung von Zytokinen auftreten könnte. Ob dieser Effekt auch beim Beladen des Nanocarriers und Blockierung der Bindungsstellen mit einer unwirksamen Last auftritt, muss durch weitere Forschung untersucht werden.

### **5.5.3 CMS-Nanocarrier werden durch gingivale Keratinozyten aufgenommen**

Zur Visualisierung der Lokalisation des CMS-Nanocarriers wurde dieser kovalent an Indocarbocyanin (ICC) gebunden. Der Farbstoff Nilrot kann hingegen vom CMS-Nanocarrier eingekapselt werden und auf diese Weise ein in der Immunfluoreszenz sichtbares »Modell-Medikament« darstellen. Studien an der Haut legen nahe, dass der CMS-Nanocarrier in die Haut penetrierte, jedoch nicht das SC überwinden konnte, sondern dort akkumulierte (Alnasif et al., 2014; Pischon et al., 2017). Es schien jedoch, dass CMS die Penetration des inkorporierten Partners (Nilrot) durch das SC in viable Schichten der Epidermis erhöhen konnte (Pischon et al., 2017). Die Nilrot-Penetration wurde durch CMS in das SC um das 3-8-Fache und in die viable Zellschichten um das 4-15-Fache erhöht, verglichen mit herkömmlicher Creme (Du et al., 2016;

Hönzke et al., 2016; Küchler et al., 2009). Das CMS-Depot im SC könnte zusätzlich einen therapeutischen Nutzen aufgrund der längeren Retentionszeit haben (Pischon et al., 2017).

Nanopharmazeutika können ein Gewebe entweder durch den parazellulären Spalt benachbarter Zellen durchdringen oder transzellulär durch die Zelle hindurch transportiert werden. Die Route des Nanocarriers wurde kontrovers diskutiert (Choi & Han, 2018; Donahue et al., 2019; Du et al., 2016; Küchler et al., 2009). Es wurde vorgeschlagen, dass TJ-Proteine im SG unterhalb des SC eine Abwehr der zweiten Instanz bilden, die für eine Retention des Nanocarriers im SC der Haut ursächlich sein könnte (Pischon et al., 2017). Dies würde einen parazellulären Transport des Nanocarriers nahelegen. An gingivalen Keratinozyten zeigte der Nanocarrier CMS 10-E-15-350 jedoch keine signifikanten Effekte auf die Proteinexpression der untersuchten transmembranären TJ-Proteine und ließ den TEER ebenfalls unbeeinflusst. Die parazelluläre Barriere wurde demnach durch CMS nicht beeinträchtigt. Darüber hinaus zeigten die Uptake-Versuche die intrazelluläre Aufnahme des ICC-gekoppelten CMS-Nanocarriers durch gingivale Keratinozyten. Studien an Keratinozyten der Haut und auch an Langerhans-Zellen unterstützen diese Befunde (Edlich et al., 2018; Küchler et al., 2009). Unter Berücksichtigung bisheriger Ergebnisse wird eine intrazelluläre Route vorgeschlagen, wobei ein parazellulärer Transport nicht ausgeschlossen werden kann. Der Aufnahmemechanismus ist vom Aufbau, von der Partikelgröße und den spezifischen Eigenschaften des jeweiligen Nanocarriers abhängig. Das Verständnis der Nanocarrier-Aufnahme entwickelt sich derzeit, und ist wichtig, um in Zukunft eine effizientere und gezieltere Aufnahme von Nanopartikeln in die gewünschten Zellen ermöglichen (Choi & Han, 2018; Donahue et al., 2019).

In unserer Arbeitsgruppe wurde ein CMS-Nanocarrier (CMS 10-A-18-350) an auskleidender und mastikatorischer Mundschleimhaut von Schweinen getestet (Jager et al., 2018). Hierbei zeigte sich CMS limitiert auf das SC in mastikatorischer Mundschleimhaut bzw. auf superfizielle Schichten auskleidender Mundschleimhaut von Schweinen nach 6 h. Da die Haut von Tieren jedoch wesentliche anatomische und physiologische Unterschiede zur menschlichen Haut aufweist und Tierversuche grundsätzlich reduziert werden sollten, wurden humane *in vitro*-Modelle entwickelt, die diese Limitationen überwinden sollen (Danso et al., 2014; Hönzke et al., 2016). An bisherigen Studien an Haut-Modellen zeigte sich keine Penetration von CMS-ICC in die viable Epidermis. Hingegen war Nilrot in viablen Zellschichten detektierbar (Alnasif et al., 2014). Die langen Applikationszeiten bisheriger Studien bei Penetrationsversuchen des CMS sind in der Praxis nicht anwendbar. Dies gilt insbesondere für zahnmedizinische Anwendungen, da Substanzen rasch durch den Speichelfluss, die Sulkusflüssigkeit und den Schluckreflex aus der Mundhöhle beseitigt werden. Jüngere Studien zeigten an auskleidender und mastikatorischer Schweineschleimhaut innerhalb von fünf Minuten eine Adhäsion des gekoppelten CMS-Nanocarriers (Daten der AG Prof. Dommisch, noch nicht veröffentlicht). Um einen Blick auf die

humane Situation zu erhalten, wurde die Penetration des CMS in »full thickness«-Modelle bei Applikationszeiten von fünf Minuten getestet. Hier zeigte sich eine Penetration in das Epithel, wobei der Übergang zum Fibroblasten-Kollagengel eine Barriere darzustellen schien. Im Gegensatz zu bisherigen Studien an der Haut schien das etablierte gingivale Schleimhautäquivalent eine tiefere Penetration des Nanocarriers zuzulassen. Dies steht im Einklang mit Vergleichsstudien der Haut, die darlegten, dass porcine Haut zwar ein dünneres Epithel als orale Mukosa aufwies, jedoch signifikant weniger permeabel war (Squier & Hall, 1985). Innerhalb von Minuten konnte eine Aufnahme des CMS-Nanocarriers erzielt werden. Dies ermöglicht eine Reduktion der Dosis. Da der CMS 10-E-15-350 sich durch eine hohe Biokompatibilität auszeichnete und biologisch abgebaut werden kann, scheint dieser CMS-Typ ein vielversprechender Ansatz für weiterführende *in vivo*-Versuche zu sein.

## **5.6 Ausblick**

### **5.6.1 Weiterentwicklung gingivaler 3D-Modelle**

»Tissue engineering« ist Teil aktueller Forschung und es gibt zahlreiche Ansätze zur Modifikation und Weiterentwicklung bestehender 3D-Modelle. Eine Erweiterung oraler/ gingivaler 3D-Modelle durch andere Zelltypen, wie Immunzellen (Kosten, 2016) oder Endothelzellen (Heller et al., 2016; Lee et al., 2017) könnte weitere Aufschlüsse zur Pathogenese von Parodontalerkrankungen geben. Auch die zusätzliche Applikation von Mukus (Teubl et al., 2013) oder Biofilmen (Belibasakis et al., 2015) könnte relevante Erkenntnisse über Gewebereaktionen im Zusammenhang mit Parodontalerkrankungen bringen. Defensive Wirtsmechanismen und Veränderungen von Barriereigenschaften in Reaktion auf externe Reize könnten durch Untersuchung antimikrobieller Peptide (AMP) und durch Analyse der Expression und Lokalisation von TJ-Proteinen anhand von 3D-Modellen untersucht werden. Ein weiteres Anwendungsgebiet *in vitro* aufgebauter 3D-Modelle ist die Transplantation (Izumi et al., 2013), wobei unterschiedliche Anforderungen von 3D-Modellen für *in vitro*-Studien, bei welchen die Reproduzierbarkeit im Vordergrund steht, und für klinische Anwendungen, die Robustheit und die Verwendung resorbierbarer Materialien erfordern, berücksichtigt werden müssen (Moharamzadeh et al., 2007). Für die Zukunft erscheint dieses Anwendungsgebiet insbesondere für Indikationsgebiete wie die Verbreiterung befestigter Gingiva und die orale Defektdeckung von Interesse.

### **5.6.2 Forschung zu Barriereeigenschaften der Gingiva**

Die TEER-Messung ist eine verbreitete Technik zur Charakterisierung der Barriereeigenschaften eines Epithels. Der TEER setzt sich allerdings aus sowohl parazellulärem als auch transzellulärem Widerstand zusammen, sodass zwar eine Aussage über den transepithelialen Gesamtwiderstand getroffen werden, jedoch keine genauere Aufschlüsselung nach Anteil der jeweiligen Strukturen erfolgen kann. Hierfür wären weiterführende Experimente wie die Zwei-Wege-Impedanzspektroskopie nötig (Krug et al., 2009). Fragestellungen hinsichtlich para- und transzellulärer Anteile sind daher noch zu adressieren, sowie die Messung der Permeabilität mittels parazellulärer Transportmarker, welche z. B. insbesondere für das Penetrationsverhalten von Nanocarriern von Interesse wäre.

Eine Problematik bestehender Behandlungsstrategien ist die eingeschränkte Penetration von Medikamenten zum Wirkort. Die Penetration von Medikamenten in das Zielgewebe kann transzellulär oder durch parazelluläre Diffusion erfolgen (Tscheik et al., 2013), wobei letztere durch TJ reguliert wird. Daher könnte die Modulation von TJ eine Strategie zur Verbesserung der Wirkstoffeffizienz topisch applizierter Medikamente sein (Kanda et al., 2018; Tscheik et al., 2013). Bisher wurden »full-thickness«-Modelle der Gingiva unzureichend in Bezug auf ihre Barriereeigenschaften *in vitro* charakterisiert (Shimazaki et al., 2009). Neuere Studien belegen, dass spezifische Mikronährstoffe kompositionelle Veränderungen in gingivalen TJ induzierten (Gröger et al., 2016; Rybakovsky et al., 2017). Weitere Forschung ist nötig, um die Rolle einzelner TJ-Proteine zu verstehen. Ein besseres Verständnis des Zusammenhanges zwischen TJ-Regulation, TJ-Signalwegen, Zellproliferation und -differenzierung im Zustand der Gesundheit wie unter inflammatorischen Bedingungen ist Voraussetzung für die Entwicklung neuer Therapieansätze.

### **5.6.3 CMS-Nanocarrier als Träger-Systeme für antiinflammatorische Wirkstoffe**

Der Nanocarrier CMS 10-E-15-350 zeichnete sich in Studien an Keratinozyten der Haut und Gingiva durch eine sehr gute Biokompatibilität aus (Hönzke et al., 2016) und konnte bereits nach fünfminütiger Applikation im Epithel gingivaler 3D-Modelle detektiert werden. Daher sind CMS-Nanocarrier ein vielversprechender Ansatz zur Behandlung entzündlicher Mundschleimhauterkrankungen. In dieser Arbeit lag der Fokus auf der Charakterisierung des unbeladenen CMS-Nanocarriers. Für zukünftige Forschung wäre von Interesse, wie sich beladene Nanocarrier im Vergleich zum reinen CMS-Nanocarrier, z.B. hinsichtlich Größe, Penetrationsfähigkeit und Adhäsionseigenschaften verhalten. Die Röntgenmikroskopie lieferte Hinweise darauf, dass CMS die Penetration von Dexamethason (DXM) in die viable Epidermis

verbessern konnte, während die Nanocarrier selbst weitgehend im SC verblieben (Yamamoto et al., 2016).

Neben der Penetrationsfähigkeit von CMS bzw. geladenen Medikamenten in tiefere Schichten sind die antiinflammatorischen Effekte CMS-inkorporierter Wirkstoffe von Interesse. An auskleidender und mastikatorischer porciner Mundschleimhaut war die Freisetzung von DXM aus dem Nanocarrier der Freisetzung aus einer herkömmlichen Creme überlegen (Jager et al., 2018). Die entzündungshemmende Wirkung von CMS-DXM wurde in TNF $\alpha$ -stimulierten Hautmodellen untersucht, wobei eine signifikante Reduktion des proinflammatorischen Zytokins IL-8 mit deutlich höherer Wirksamkeit beobachtet wurde als bei handelsüblicher DXM-Creme (Hönzke et al., 2016). Das Beladen der CMS-Nanocarrier mit neuartigen Wirkstoffen, wie Tacrolimus könnte eine interessante Alternative zu den topisch applizierten Glukokortikoiden darstellen (Unbehauen et al., 2017). Antiinflammatorische Effekte Wirkstoff-beladener CMS-Nanocarrier wurde an gingivalen 3D-Modellen bzw. humaner Gingiva bisher nicht untersucht.

Wie bei allen wissenschaftlichen Themen existiert ein kontinuierlicher Entwicklungsprozess von Ideen. Der CMS 10-E-15-350 hat sich als robuster, biokompatibler Nanocarrier erwiesen und ist daher ein geeigneter Kandidat für die sichere, effektive, topische Medikamentenverabreichung. Es fehlen jedoch klinische Studien, um die Wirksamkeit der beladenen Nanocarrier zur Behandlung der Parodontitis zu ermitteln (Choi & Han, 2018).

Neuartige Ansätze orientieren sich an der Natur, z. B. an Muschelfüßen, mit denen sich Muscheln auch in feuchter Umgebung an Oberflächen festhalten können. Solche Muschel-inspirierten dendritischen Polymere sollen demnach insbesondere die Adhäsion an feuchten Oberflächen wie der Mundschleimhaut erhöhen (Li et al., 2019; Wei et al., 2014). Wie bei allen Neuerungen darf man hier gespannt sein, ob diese Polymere auch die biokompatiblen Eigenschaften aufweisen und Anforderungen an die Beladungskapazität, Stabilität, Penetration und Abgabe des Wirkstoffes erfüllen werden.

## Literaturverzeichnis

- Alnasif, N., Zoschke, C., Fleige, E., Brodwolf, R., Boreham, A., Rühl, E., Eckl, K.-M., Merk, H.-F., Hennies, H. C., Alexiev, U., Haag, R., Küchler, S. & Schäfer-Korting, M. (2014). Penetration of normal, damaged and diseased skin — An in vitro study on dendritic core–multishell nanotransporters. *Journal of Controlled Release*, 185, 45–50. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2014.04.006>
- Ambatipudi, S., Bhosale, P. G., Heath, E., Pandey, M., Kumar, G., Kane, S., Patil, A., Maru, G. B., Desai, R. S., Watt, F. M. & Mahimkar, M. B. (2013). Downregulation of Keratin 76 Expression during Oral Carcinogenesis of Human, Hamster and Mouse. *PLoS ONE*, 8(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0070688>
- Aminu, N., Chan, S.-Y. & Toh, S.-M. (2017). Roles of Nanotechnological Approaches in Periodontal Disease Therapy. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. <https://doi.org/10.7324/JAPS.2017.70735>
- Andrian, E., Grenier, D. & Rouabhia, M. (2004). In Vitro Models of Tissue Penetration and Destruction by *Porphyromonas gingivalis*. *Infection and Immunity*, 72(8), 4689–4698. <https://doi.org/10.1128/IAI.72.8.4689-4698.2004>
- Bao, K., Akguel, B. & Bostanci, N. (2014). Establishment and Characterization of Immortalized Gingival Epithelial and Fibroblastic Cell Lines for the Development of Organotypic Cultures. *Cells Tissues Organs*, 199(4), 228–237. <https://doi.org/10.1159/000363694>
- Belibasakis, G. N., Kast, J. I., Thurnheer, T., Akdis, C. A. & Bostanci, N. (2015). The expression of gingival epithelial junctions in response to subgingival biofilms. *Virulence*, 6(7), 704–709. <https://doi.org/10.1080/21505594.2015.1081731>
- Bierbaumer, L., Schwarze, U. Y., Gruber, R. & Neuhaus, W. (2018). Cell culture models of oral mucosal barriers: A review with a focus on applications, culture conditions and barrier properties. *Tissue Barriers*, 6(3), 1479568. <https://doi.org/10.1080/21688370.2018.1479568>
- Brandner, J. M., Kief, S., Grund, C., Rendl, M., Houdek, P., Kuhn, C., Tschachler, E., Franke, W. W. & Moll, I. (2002). Organization and formation of the tight junction system in human epidermis and cultured keratinocytes. *European Journal of Cell Biology*, 81(5), 253–263. <https://doi.org/10.1078/0171-9335-00244>
- Brandner, J. M. & Schulzke, J. D. (2015). Hereditary barrier-related diseases involving the tight junction: lessons from skin and intestine. *Cell and Tissue Research*, 360(3), 723–748. <https://doi.org/10.1007/s00441-014-2096-1>
- Brandner, J., Zorn-Kruppa, M., Yoshida, T., Moll, I., Beck, L. & De Benedetto, A. (2015). Epidermal tight junctions in health and disease. *Tissue Barriers*, 3(1–2), e974451. <https://doi.org/10.4161/21688370.2014.974451>
- Buskermolen, J. K., Reijnders, C. M. A., Spiekstra, S. W., Steinberg, T., Kleverlaan, C. J., Feilzer, A. J., Bakker, A. D. & Gibbs, S. (2016). Development of a Full-Thickness Human Gingiva Equivalent Constructed from Immortalized Keratinocytes and Fibroblasts. *Tissue Engineering. Part C, Methods*, 22(8), 781–791. <https://doi.org/10.1089/ten.tec.2016.0066>
- Cekici, A., Kantarci, A., Hasturk, H. & Van Dyke, T. E. (2014). Inflammatory and immune pathways in the pathogenesis of periodontal disease. *Periodontology 2000*, 64(1), 57–80. <https://doi.org/10.1111/prd.12002>
- Choi, Y. H. & Han, H.-K. (2018). Nanomedicines: current status and future perspectives in aspect of drug delivery and pharmacokinetics. *Journal of Pharmaceutical Investigation*, 48(1), 43–60. <https://doi.org/10.1007/s40005-017-0370-4>
- Choi, Y. S., Kim, Y. C., Ji, S. & Choi, Y. (2014). Increased Bacterial Invasion and Differential Expression of Tight-Junction Proteins, Growth Factors, and Growth Factor Receptors in Periodontal Lesions. *Journal of Periodontology*, 85(8), e313–e322. <https://doi.org/10.1902/jop.2014.130740>
- Choi, Y. S., Kim, Y. C., Jo, A. R., Ji, S., Koo, K.-T., Ko, Y. & Choi, Y. (2013). *Porphyromonas Gingivalis* and Dextran Sulfate Sodium Induce Periodontitis Through the Disruption of Physical Barriers in Mice. *European Journal of Inflammation*, 11(2), 419–431. <https://doi.org/10.1177/1721727X1301100212>



- Claude, P. & Goodenough, D. A. (1973). Fracture faces of zonulae occludentes from „tight“ and „leaky“ epithelia. *The Journal of Cell Biology*, 58(2), 390–400.
- Damek-Poprawa, M., Korostoff, J., Gill, R. & DiRienzo, J. M. (2013). Cell Junction Remodeling in Gingival Tissue Exposed to a Microbial Toxin. *Journal of Dental Research*, 92(6), 518–523. <https://doi.org/10.1177/0022034513486807>
- Danso, M. O., van Drongelen, V., Mulder, A., van Esch, J., Scott, H., van Smeden, J., El Ghalbzouri, A. & Bouwstra, J. A. (2014). TNF- $\alpha$  and Th2 cytokines induce atopic dermatitis-like features on epidermal differentiation proteins and stratum corneum lipids in human skin equivalents. *The Journal of Investigative Dermatology*, 134(7), 1941–1950. <https://doi.org/10.1038/jid.2014.83>
- De Ryck, T., Grootaert, C., Jaspert, L., Kerckhof, F.-M., Van Gele, M., De Schrijver, J., Van den Abbeele, P., Swift, S., Bracke, M., Van de Wiele, T. & Vanhoecke, B. (2014). Development of an oral mucosa model to study host-microbiome interactions during wound healing. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(15), 6831–6846. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-5841-1>
- Delima, A. J., Oates, T., Assuma, R., Schwartz, Z., Cochran, D., Amar, S. & Graves, D. T. (2001). Soluble antagonists to interleukin-1 (IL-1) and tumor necrosis factor (TNF) inhibits loss of tissue attachment in experimental periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology*, 28(3), 233–240. <https://doi.org/10.1034/j.1600-051x.2001.028003233.x>
- Dickson, M. A., Hahn, W. C., Ino, Y., Ronfard, V., Wu, J. Y., Weinberg, R. A., Louis, D. N., Li, F. P. & Rheinwald, J. G. (2000). Human Keratinocytes That Express hTERT and Also Bypass a p16INK4a-Enforced Mechanism That Limits Life Span Become Immortal yet Retain Normal Growth and Differentiation Characteristics. *Molecular and Cellular Biology*, 20(4), 1436–1447.
- Dinarelo, C. A. (1985). An update on human interleukin-1: From molecular biology to clinical relevance. *Journal of Clinical Immunology*, 5(5), 287–297. <https://doi.org/10.1007/BF00918247>
- Domisch, H. & Jepsen, S. (2015). Diverse functions of defensins and other antimicrobial peptides in periodontal tissues. *Periodontology 2000*, 69(1), 96–110. <https://doi.org/10.1111/prd.12093>
- Donahue, N. D., Acar, H. & Wilhelm, S. (2019). Concepts of nanoparticle cellular uptake, intracellular trafficking, and kinetics in nanomedicine. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 143, 68–96. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2019.04.008>
- Dongari-Bagtzoglou, A. & Kashleva, H. (2006). Development of a highly reproducible three-dimensional organotypic model of the oral mucosa. *Nature Protocols*, 1(4), 2012–2018. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.323>
- Du, F., Hönzke, S., Neumann, F., Keilitz, J., Chen, W., Ma, N., Hedtrich, S. & Haag, R. (2016). Development of biodegradable hyperbranched core-multishell nanocarriers for efficient topical drug delivery (International Conference on Dermal Drug Delivery by Nanocarriers, Berlin 14-16 March). *Journal of Controlled Release*, 242, 42–49. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.06.048>
- Duncan, R. & Gaspar, R. (2011). Nanomedicine(s) under the microscope. *Molecular Pharmaceutics*, 8(6), 2101–2141. <https://doi.org/10.1021/mp200394t>
- Edlich, A., Volz, P., Brodwolf, R., Unbehauen, M., Mundhenk, L., Gruber, A. D., Hedtrich, S., Haag, R., Alexiev, U. & Kleuser, B. (2018). Crosstalk between core-multishell nanocarriers for cutaneous drug delivery and antigen-presenting cells of the skin. *Biomaterials*, 162, 60–70. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2018.01.058>
- EpiOral and EpiGingival in vitro 3D Tissues. (o. J.). *MatTek Corporation*. Zugriff am 12.12.2019. Verfügbar unter: <https://www.mattek.com/products/epioral-epigingival/>
- Ertugrul, A. S., Sahin, H., Dikilitas, A., Alpaslan, N. & Bozoglan, A. (2013). Comparison of CCL28, interleukin-8, interleukin-1 $\beta$  and tumor necrosis factor-alpha in subjects with gingivitis, chronic periodontitis and generalized aggressive periodontitis. *Journal of Periodontal Research*, 48(1), 44–51. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0765.2012.01500.x>
- Eskan, M. A., Benakanakere, M. R., Rose, B. G., Zhang, P., Zhao, J., Stathopoulou, P., Fujioka, D. & Kinane, D. F. (2008). Interleukin-1 $\beta$  Modulates Proinflammatory Cytokine Production in Human Epithelial Cells. *Infection and Immunity*, 76(5), 2080–2089. <https://doi.org/10.1128/IAI.01428-07>
- Farquhar, M. G. & Palade, G. E. (1963). Junctional complexes in various epithelia. *The Journal of Cell Biology*, 17, 375–412. <https://doi.org/10.1083/jcb.17.2.375>

- Franke, W. W. & Pape, U.-F. (2012). Diverse types of junctions containing tight junction proteins in stratified mammalian epithelia. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1257(1), 152–157. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2012.06504.x>
- Fujita, T., Firth, J. D., Kittaka, M., Ekuni, D., Kurihara, H. & Putnins, E. E. (2012). Loss of claudin-1 in lipopolysaccharide-treated periodontal epithelium: LPS reduces in vivo claudin-1 expression. *Journal of Periodontal Research*, 47(2), 222–227. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0765.2011.01424.x>
- Fujita, T., Yumoto, H., Shiba, H., Ouhara, K., Miyagawa, T., Nagahara, T., Matsuda, S., Kawaguchi, H., Matsuo, T., Murakami, S. & Kurihara, H. (2012). Irsogladine maleate regulates epithelial barrier function in tumor necrosis factor- $\alpha$ -stimulated human gingival epithelial cells. *Journal of Periodontal Research*, 47(1), 55–61. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0765.2011.01404.x>
- Furuse, M., Hata, M., Furuse, K., Yoshida, Y., Haratake, A., Sugitani, Y., Noda, T., Kubo, A. & Tsukita, S. (2002). Claudin-based tight junctions are crucial for the mammalian epidermal barrier. *The Journal of Cell Biology*, 156(6), 1099–1111. <https://doi.org/10.1083/jcb.200110122>
- Gosselin, F., Magloire, H., Joffre, A. & Portier, M.-M. (1990). Cytokeratins as molecular markers in the evaluation of the precise differentiation stage of human gingival epithelium reconstituted in vitro. *Archives of Oral Biology*, 35, S217–S221. [https://doi.org/10.1016/0003-9969\(90\)90162-4](https://doi.org/10.1016/0003-9969(90)90162-4)
- Graves, D. T., Delima, A. J., Assuma, R., Amar, S., Oates, T. & Cochran, D. (1998). Interleukin-1 and Tumor Necrosis Factor Antagonists Inhibit the Progression of Inflammatory Cell Infiltration Toward Alveolar Bone in Experimental Periodontitis. *Journal of Periodontology*, 69(12), 1419–1425. <https://doi.org/10.1902/jop.1998.69.12.1419>
- Gröger, S., Doman, E., Chakraborty, T. & Meyle, J. (2010). Effects of Porphyromonas gingivalis infection on human gingival epithelial barrier function in vitro. *European Journal of Oral Sciences*, 118(6), 582–589. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0722.2010.00782.x>
- Gröger, S., Jarzina, F., Windhorst, A. & Meyle, J. (2016). Influence of retinoic acid on human gingival epithelial barriers. *Journal of Periodontal Research*, 51(6), 748–757. <https://doi.org/10.1111/jre.12351>
- Gröger, S. & Meyle, J. (2019). Oral Mucosal Epithelial Cells. *Frontiers in Immunology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00208>
- Gröger, S., Michel, J. & Meyle, J. (2008). Establishment and characterization of immortalized human gingival keratinocyte cell lines. *Journal of Periodontal Research*, 43(6), 604–614. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0765.2007.01019.x>
- Gumbiner, B. & Simons, K. (1986). A functional assay for proteins involved in establishing an epithelial occluding barrier: identification of a uvomorulin-like polypeptide. *The Journal of Cell Biology*, 102(2), 457–468. <https://doi.org/10.1083/jcb.102.2.457>
- Guo, W., Wang, P., Liu, Z.-H. & Ye, P. (2018). Analysis of differential expression of tight junction proteins in cultured oral epithelial cells altered by Porphyromonas gingivalis, Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide, and extracellular adenosine triphosphate. *International Journal of Oral Science*, 10(1), e8. <https://doi.org/10.1038/ijos.2017.51>
- Hafttek, M., Callejon, S., Sandjeu, Y., Padois, K., Falson, F., Pirot, F., Portes, P., Demarne, F. & Jannin, V. (2011). Compartmentalization of the human stratum corneum by persistent tight junction-like structures. *Experimental Dermatology*, 20(8), 617–621. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0625.2011.01315.x>
- Hajishengallis, G., Darveau, R. P. & Curtis, M. A. (2012). The Keystone Pathogen Hypothesis. *Nature reviews. Microbiology*, 10(10), 717–725. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2873>
- Harks, I., Koch, R., Eickholz, P., Hoffmann, T., Kim, T.-S., Kocher, T., Meyle, J., Kaner, D., Schlagenhaut, U., Doering, S., Holtfreter, B., Gravemeier, M., Harmsen, D. & Ehmke, B. (2015). Is progression of periodontitis relevantly influenced by systemic antibiotics? A clinical randomized trial. *Journal of Clinical Periodontology*, 42(9), 832–842. <https://doi.org/10.1111/jcpe.12441>
- Hashimoto, K. (1971). Intercellular Spaces of the Human Epidermis as Demonstrated with Lanthanum. *Journal of Investigative Dermatology*, 57(1), 17–31. <https://doi.org/10.1111/1523-1747.ep12292052>

- Heller, M., Frerick-Ochs, E. V., Bauer, H.-K., Schiegnitz, E., Flesch, D., Brieger, J., Stein, R., Al-Nawas, B., Brochhausen, C., Thüroff, J. W., Unger, R. E. & Brenner, W. (2016). Tissue engineered pre-vascularized buccal mucosa equivalents utilizing a primary triculture of epithelial cells, endothelial cells and fibroblasts. *Biomaterials*, 77, 207–215. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2015.10.073>
- Hellmund, M., Achazi, K., Neumann, F., Thota, B. N. S., Ma, N. & Haag, R. (2015). Systematic adjustment of charge densities and size of polyglycerol amines reduces cytotoxic effects and enhances cellular uptake. *Biomaterials Science*, 3(11), 1459–1465. <https://doi.org/10.1039/c5bm00187k>
- Helovuo, H., Hakkarainen, K. & Paunio, K. (1993). Changes in the prevalence of subgingival enteric rods, staphylococci and yeasts after treatment with penicillin and erythromycin. *Oral Microbiology and Immunology*, 8(2), 75–79. <https://doi.org/10.1111/j.1399-302X.1993.tb00548.x>
- Hönig, J., Rordorf-Adam, C., Siegmund, C., Wiedemann, W. & Erard, F. (1989). Increased interleukin-1 beta (IL-1 $\beta$ ) concentration in gingival tissue from periodontitis patients. *Journal of Periodontal Research*, 24(6), 362–367. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0765.1989.tb00883.x>
- Hönzke, S., Gerecke, C., Elpelt, A., Zhang, N., Unbehauen, M., Kral, V., Fleige, E., Paulus, F., Haag, R., Schäfer-Korting, M., Kleuser, B. & Hedtrich, S. (2016). Tailored dendritic core-multishell nanocarriers for efficient dermal drug delivery: A systematic top-down approach from synthesis to preclinical testing (International Conference on Dermal Drug Delivery by Nanocarriers, Berlin 14–16 March). *Journal of Controlled Release*, 242, 50–63. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.06.030>
- Ilmarinen, T., Laine, J., Juuti-Uusitalo, K., Numminen, J., Seppänen-Suuronen, R., Uusitalo, H. & Skottman, H. (2013). Towards a defined, serum- and feeder-free culture of stratified human oral mucosal epithelium for ocular surface reconstruction. *Acta Ophthalmologica*, 91(8), 744–750. <https://doi.org/10.1111/j.1755-3768.2012.02523.x>
- Izumi, K., Neiva, R. F. & Feinberg, S. E. (2013). Intraoral Grafting of Tissue-Engineered Human Oral Mucosa. *The International journal of oral & maxillofacial implants*, 28(5), e295–e303.
- Jager, J., Obst, K., Lohan, S. B., Viktorov, J., Staufenbiel, S., Renz, H., Unbehauen, M., Haag, R., Hedtrich, S., Teutloff, C., Meinke, M. C., Danker, K. & Dommisch, H. (2018). Characterization of hyperbranched core-multishell nanocarriers as an innovative drug delivery system for the application at the oral mucosa. *Journal of Periodontal Research*, 53(1), 57–65. <https://doi.org/10.1111/jre.12487>
- Jennings, L. R., Colley, H. E., Ong, J., Panagakos, F., Masters, J. G., Trivedi, H. M., Murdoch, C. & Whawell, S. (2016). Development and Characterization of In Vitro Human Oral Mucosal Equivalents Derived from Immortalized Oral Keratinocytes. *Tissue Engineering Part C: Methods*, 22(12), 1108–1117. <https://doi.org/10.1089/ten.tec.2016.0310>
- Jepsen, S., Blanco, J., Buchalla, W., Carvalho, J. C., Dietrich, T., Dörfer, C., Eaton, K. A., Figuero, E., Frencken, J. E., Graziani, F., Higham, S. M., Kocher, T., Maltz, M., Ortiz-Vigon, A., Schmoeckel, J., Sculean, A., Tenuta, L. M. A., Veen, M. H. van der & Machiulskiene, V. (2017). Prevention and control of dental caries and periodontal diseases at individual and population level: consensus report of group 3 of joint EFP/ORCA workshop on the boundaries between caries and periodontal diseases. *Journal of Clinical Periodontology*, 44(S18), S85–S93. <https://doi.org/10.1111/jcpe.12687>
- Jordan, A. R. & Micheelis, W. (Hrsg.). (2016). *Fünfte Deutsche Mundgesundheitsstudie (DMS V) (IDZ-Materialienreihe) (Band Bd. 35)*. Köln: Deutscher Zahnärzte Verlag DÄV.
- Joshi, D., Garg, T., Goyal, A. K. & Rath, G. (2016). Advanced drug delivery approaches against periodontitis. *Drug Delivery*, 23(2), 363–377. <https://doi.org/10.3109/10717544.2014.935531>
- Kanda, Y., Yamasaki, Y., Sasaki-Yamaguchi, Y., Ida-Koga, N., Kamisuki, S., Sugawara, F., Nagumo, Y. & Usui, T. (2018). TRPA1-dependent reversible opening of tight junction by natural compounds with an  $\alpha,\beta$ -unsaturated moiety and capsaicin. *Scientific Reports*, 8(1), 2251. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-20526-7>
- Karring, T., Lang, N. P. & Løe, H. (1975). The role of gingival connective tissue in determining epithelial differentiation. *Journal of Periodontal Research*, 10(1), 1–11. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0765.1975.tb00001.x>

- Kassebaum, N. J., Bernabé, E., Dahiya, M., Bhandari, B., Murray, C. J. L. & Marcenes, W. (2014). Global Burden of Severe Periodontitis in 1990-2010: A Systematic Review and Meta-regression. *Journal of Dental Research*, 93(11), 1045–1053. <https://doi.org/10.1177/0022034514552491>
- Khandare, J., Mohr, A., Calderón, M., Welker, P., Licha, K. & Haag, R. (2010). Structure-biocompatibility relationship of dendritic polyglycerol derivatives. *Biomaterials*, 31(15), 4268–4277. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.02.001>
- Kimball, J. R., Nittayananta, W., Klausner, M., Chung, W. O. & Dale, B. A. (2006). Antimicrobial barrier of an in vitro oral epithelial model. *Archives of Oral Biology*, 51(9), 775–783. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2006.05.007>
- Kinikoglu, B., Hemar, J., Hasirci, V., Breton, P. & Damour, O. (2012). Feasibility of a porcine oral mucosa equivalent: A preclinical study. *Artificial Cells, Blood Substitutes, and Biotechnology*, 40(4), 271–274. <https://doi.org/10.3109/10731199.2011.644293>
- Kirschner, N., Poetzl, C., von den Driesch, P., Wladykowski, E., Moll, I., Behne, M. J. & Brandner, J. M. (2009). Alteration of Tight Junction Proteins Is an Early Event in Psoriasis. *The American Journal of Pathology*, 175(3), 1095–1106. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2009.080973>
- Korting, H. C., Patzak, U., Schaller, M. & Maibach, H. I. (1998). A model of human cutaneous candidosis based on reconstructed human epidermis for the light and electron microscopic study of pathogenesis and treatment. *Journal of Infection*, 36(3), 259–267. [https://doi.org/10.1016/S0163-4453\(98\)94063-4](https://doi.org/10.1016/S0163-4453(98)94063-4)
- Kosten, I. (2016). MUTZ-3 Langerhans Cell maturation and CXCL12 independent migration in reconstructed human gingiva. *ALTEX*. <https://doi.org/10.14573/altex.1510301>
- Kosten, I. J., Buskermolen, J. K., Spiekstra, S. W., de Gruijl, T. D. & Gibbs, S. (2015). Gingiva Equivalents Secrete Negligible Amounts of Key Chemokines Involved in Langerhans Cell Migration Compared to Skin Equivalents. *Journal of Immunology Research*, 2015, 1–11. <https://doi.org/10.1155/2015/627125>
- Krug, S. M., Fromm, M. & Günzel, D. (2009). Two-Path Impedance Spectroscopy for Measuring Paracellular and Transcellular Epithelial Resistance. *Biophysical Journal*, 97(8), 2202–2211. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2009.08.003>
- Küchler, S., Radowski, M. R., Blaschke, T., Dathe, M., Plendl, J., Haag, R., Schäfer-Korting, M. & Kramer, K. D. (2009). Nanoparticles for skin penetration enhancement – A comparison of a dendritic core-multishell-nanotransporter and solid lipid nanoparticles. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 71(2), 243–250. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2008.08.019>
- Lagdive, S. S., Marawar, P. P., Byakod, G. & Lagdive, S. B. (2013). Evaluation and comparison of interleukin-8 (IL-8) level in gingival crevicular fluid in health and severity of periodontal disease: A clinico-biochemical study. *Indian Journal of Dental Research*, 24(2), 188. <https://doi.org/10.4103/0970-9290.116675>
- Langbein, L., Grund, C., Kuhn, C., Praetzel, S., Kartenbeck, J., Brandner, J. M., Moll, I. & Franke, W. W. (2002). Tight junctions and compositionally related junctional structures in mammalian stratified epithelia and cell cultures derived therefrom. *European Journal of Cell Biology*, 81(8), 419–435. <https://doi.org/10.1078/0171-9335-00270>
- Lee, J., Kim, E. H., Shin, D. & Roh, J.-L. (2017). Accelerated oral wound healing using a pre-vascularized mucosal cell sheet. *Scientific Reports*, 7(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-10991-x>
- Li, M., Schlaich, C., Kulka, M. W., Donskyi, I. S., Schwerdtle, T., Unger, W. E. S. & Haag, R. (2019). Mussel-inspired coatings with tunable wettability, for enhanced antibacterial efficiency and reduced bacterial adhesion. *Journal of Materials Chemistry B*, 7(21), 3438–3445. <https://doi.org/10.1039/C9TB00534J>
- Lindberg, K. & Rheinwald, J. G. (1990). Three distinct keratinocyte subtypes identified in human oral epithelium by their patterns of keratin expression in culture and in xenografts. *Differentiation*, 45(3), 230–241. <https://doi.org/10.1111/j.1432-0436.1990.tb00477.x>
- Lukens, J. R., Gross, J. M. & Kanneganti, T.-D. (2012). IL-1 family cytokines trigger sterile inflammatory disease. *Frontiers in Immunology*, 3. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2012.00315>

- Mackenzie, I. C., Rittman, G., Gao, Z., Leigh, I. & Lane, E. B. (1991). Patterns of cytokeratin expression in human gingival epithelia. *Journal of Periodontal Research*, 26(6), 468–478. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0765.1991.tb01797.x>
- Marsh, P. D. (1992). Microbiological Aspects of the Chemical Control of Plaque and Gingivitis. *Journal of Dental Research*, 71(7), 1431–1438. <https://doi.org/10.1177/00220345920710071501>
- Masada, M. P., Persson, R., Kenney, J. S., Lee, S. W., Page, R. C. & Allison, A. C. (1990). Measurement of interleukin-1 $\alpha$  and -1 $\beta$  in gingival crevicular fluid: Implications for the pathogenesis of periodontal disease. *Journal of Periodontal Research*, 25(3), 156–163. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0765.1990.tb01038.x>
- Matter, K. & Balda, M. S. (2003). Functional analysis of tight junctions. *Methods*, 30(3), 228–234. [https://doi.org/10.1016/S1046-2023\(03\)00029-X](https://doi.org/10.1016/S1046-2023(03)00029-X)
- McDevitt, M. J., Wang, H.-Y., Knobelman, C., Newman, M. G., Giovine, F. S. di, Timms, J., Duff, G. W. & Kornman, K. S. (2000). Interleukin-1 Genetic Association With Periodontitis in Clinical Practice. *Journal of Periodontology*, 71(2), 156–163. <https://doi.org/10.1902/jop.2000.71.2.156>
- McLeod, N. M. H., Moutasim, K. A., Brennan, P. A., Thomas, G. & Jenei, V. (2014). In Vitro Effect of Bisphosphonates on Oral Keratinocytes and Fibroblasts. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 72(3), 503–509. <https://doi.org/10.1016/j.joms.2013.08.007>
- Meyle, J. & Chapple, I. (2015). Molecular aspects of the pathogenesis of periodontitis. *Periodontology 2000*, 69(1), 7–17. <https://doi.org/10.1111/prd.12104>
- Meyle, J., Gütting, K., Rascher, G. & Wolburg, H. (1999). Transepithelial electrical resistance and tight junctions of human gingival keratinocytes. *Journal of Periodontal Research*, 34(4), 214–222. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0765.1999.tb02244.x>
- Moharamzadeh, K., Brook, I. M., Van Noort, R., Scutt, A. M. & Thornhill, M. H. (2007). Tissue-engineered Oral Mucosa: a Review of the Scientific Literature. *Journal of Dental Research*, 86(2), 115–124. <https://doi.org/10.1177/154405910708600203>
- Moll, R., Franke, W. W., Schiller, D. L., Geiger, B. & Krepler, R. (1982). The catalog of human cytokeratins: Patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. *Cell*, 31(1), 11–24. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(82\)90400-7](https://doi.org/10.1016/0092-8674(82)90400-7)
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65(1), 55–63. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4)
- Mostefaoui, Y., Bart, C., Frenette, M. & Rouabhia, M. (2004). Candida albicans and Streptococcus salivarius modulate IL-6, IL-8, and TNF- $\alpha$  expression and secretion by engineered human oral mucosa cells. *Cellular Microbiology*, 6(11), 1085–1096. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2004.00420.x>
- Narang, R. S. & Narang, J. K. (2015). Nanomedicines for dental applications-scope and future perspective. *International Journal of Pharmaceutical Investigation*, 5(3), 121–123. <https://doi.org/10.4103/2230-973X.160843>
- Nguyen, S. & Hiorth, M. (2015). Advanced drug delivery systems for local treatment of the oral cavity. *Therapeutic Delivery*, 6(5), 595–608. <https://doi.org/10.4155/tde.15.5>
- Noh, M. K., Jung, M., Kim, S. H., Lee, S. R., Park, K. H., Kim, D. H., Kim, H. H. & Park, Y. G. (2013). Assessment of IL-6, IL-8 and TNF- $\alpha$  levels in the gingival tissue of patients with periodontitis. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 6(3), 847–851. <https://doi.org/10.3892/etm.2013.1222>
- Ohnemus, U., Kohrmeyer, K., Houdek, P., Rohde, H., Wladykowski, E., Vidal, S., Horstkotte, M. A., Aepfelbacher, M., Kirschner, N., Behne, M. J., Moll, I. & Brandner, J. M. (2008). Regulation of Epidermal Tight-Junctions (TJ) during Infection with Exfoliative Toxin-Negative Staphylococcus Strains. *Journal of Investigative Dermatology*, 128(4), 906–916. <https://doi.org/10.1038/sj.jid.5701070>
- Okada, H. & Murakami, S. (1998). Cytokine Expression in Periodontal Health and Disease. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*, 9(3), 248–266. <https://doi.org/10.1177/10454411980090030101>

- Page, R. C. & Kornman, K. S. (1997). The pathogenesis of human periodontitis: an introduction. *Periodontology 2000*, 14(1), 9–11. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0757.1997.tb00189.x>
- Petersen, P. E. & Ogawa, H. (2012). The global burden of periodontal disease: towards integration with chronic disease prevention and control. *Periodontology 2000*, 60(1), 15–39. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0757.2011.00425.x>
- Pinnock, A., Murdoch, C., Moharamzadeh, K., Whawell, S. & Douglas, C. W. I. (2014). Characterisation and optimisation of organotypic oral mucosal models to study *Porphyromonas gingivalis* invasion. *Microbes and Infection*, 16(4), 310–319. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2014.01.004>
- Pischon, H., Radbruch, M., Ostrowski, A., Volz, P., Gerecke, C., Unbehauen, M., Hönzke, S., Hedtrich, S., Fluhr, J. W., Haag, R., Kleuser, B., Alexiev, U., Gruber, A. D. & Mundhenk, L. (2017). Stratum corneum targeting by dendritic core-multishell-nanocarriers in a mouse model of psoriasis. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 13(1), 317–327. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2016.09.004>
- Poonia, M., Ramalingam, K., Goyal, S. & Sidhu, S. K. (2017). Nanotechnology in oral cancer: A comprehensive review. *Journal of Oral and Maxillofacial Pathology*, 21(3), 407. [https://doi.org/10.4103/jomfp.JOMFP\\_29\\_17](https://doi.org/10.4103/jomfp.JOMFP_29_17)
- Preshaw, P. M. (2018). Host modulation therapy with anti-inflammatory agents. *Periodontology 2000*, 76(1), 131–149. <https://doi.org/10.1111/prd.12148>
- Presland, R. B. & Dale, B. A. (2000). Epithelial Structural Proteins of the Skin and Oral Cavity: Function in Health and Disease. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*, 11(4), 383–408. <https://doi.org/10.1177/10454411000110040101>
- Priyadarsini, S., Mukherjee, S. & Mishra, M. (2018). Nanoparticles used in dentistry: A review. *Journal of Oral Biology and Craniofacial Research*, 8(1), 58–67. <https://doi.org/10.1016/j.jobcr.2017.12.004>
- Protocols Human Cytokine Antibody Array (ab133997). (o. J.). . Zugriff am 27.3.2019. Verfügbar unter: <https://www.abcam.com/cytokine-array-human-cytokine-antibody-array-membrane-42-targets-ab133997-protocols.html>
- Pummi, K., Malminen, M., Aho, H., Karvonen, S.-L., Peltonen, J. & Peltonen, S. (2001). Epidermal Tight Junctions: ZO-1 and Occludin are Expressed in Mature, Developing, and Affected Skin and In Vitro Differentiating Keratinocytes. *Journal of Investigative Dermatology*, 117(5), 1050–1058. <https://doi.org/10.1046/j.0022-202x.2001.01493.x>
- Radlanski, R. J. (2011). 14.4.8. Gingiva (Curriculum). *Orale Struktur- und Entwicklungsbiologie* (1. Auflage, S. 493–508). Berlin: Quintessenz-Verl.
- Rao, R. S., Patil, S. & Ganavi, B. S. (2014). Oral cytokeratins in health and disease. *The journal of contemporary dental practice*, 15(1), 127–136. <https://doi.org/10.5005/jp-journals-10024-1502>
- Reihlen, A. & Jepsen, D. (2013). *FachDialog Nanomedizin - Bericht des BMU zur Nanomedizin, einschließlich der Diskussionsergebnisse des FachDialogs Nanomedizin*. Verfügbar unter: [https://www.bmu.de/fileadmin/Daten\\_BMU/Download\\_PDF/Nanotechnologie/nanodialog\\_4\\_fd1\\_bericht\\_bf.pdf](https://www.bmu.de/fileadmin/Daten_BMU/Download_PDF/Nanotechnologie/nanodialog_4_fd1_bericht_bf.pdf)
- Reinhardt, R. A., Masada, M. P., Kaldahl, W. B., DuBois, L. M., Kornman, K. S., Choi, J.-I., Kalkwarf, K. L. & Allison, A. C. (1993). Gingival fluid IL-1 and IL-6 levels in refractory periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology*, 20(3), 225–231. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051X.1993.tb00348.x>
- Roffel, S., Wu, G., Nedeljkovic, I., Meyer, M., Razafiarison, T. & Gibbs, S. (2019). Evaluation of a novel oral mucosa in vitro implantation model for analysis of molecular interactions with dental abutment surfaces. *Clinical Implant Dentistry and Related Research*, 21(S1), 25–33. <https://doi.org/10.1111/cid.12750>
- Rupniak, H. T., Rowlatt, C., Lane, E. B., Steele, J. G., Trejdosiowicz, L. K., Laskiewicz, B., Povey, S. & Hill, B. T. (1985). Characteristics of four new human cell lines derived from squamous cell carcinomas of the head and neck. *Journal of the National Cancer Institute*, 75(4), 621–635.
- Rybakovsky, E., Valenzano, M. C., Deis, R., DiGuilio, K. M., Thomas, S. & Mullin, J. M. (2017). Improvement of Human-Oral-Epithelial-Barrier Function and of Tight Junctions by Micronutrients. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65(50), 10950–10958. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b04203>

- Schaller, M., Boeld, U., Oberbauer, S., Hamm, G., Hube, B. & Korting, H. C. (2004). Polymorphonuclear leukocytes (PMNs) induce protective Th1-type cytokine epithelial responses in an in vitro model of oral candidosis. *Microbiology*, 150(9), 2807–2813. <https://doi.org/10.1099/mic.0.27169-0>
- Schaumann, T., Kraus, D., Winter, J., Wolf, M., Deschner, J. & Jäger, A. (2013). Potential Immune Modularly Role of Glycine in Oral Gingival Inflammation. *Clinical and Developmental Immunology*, 2013, 1–9. <https://doi.org/10.1155/2013/808367>
- Schlüter, H., Moll, I., Wolburg, H. & Franke, W. W. (2007). The different structures containing tight junction proteins in epidermal and other stratified epithelial cells, including squamous cell metaplasia (Keratinocytes). *European Journal of Cell Biology*, 86(11), 645–655. <https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2007.01.001>
- Scholzen, T. & Gerdes, J. (2000). The Ki-67 protein: From the known and the unknown. *Journal of Cellular Physiology*, 182(3), 311–322. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4652\(200003\)182:3<311::AID-JCP1>3.0.CO;2-9](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4652(200003)182:3<311::AID-JCP1>3.0.CO;2-9)
- Schroeder, H. E. & Theilade, J. (1966). Electron microscopy of normal human gingival epithelium. *Journal of Periodontal Research*, 1(2), 95–119. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0765.1966.tb01850.x>
- Scully, C. (2017). Periodontology. *Churchill's Pocketbooks Clinical Dentistry E-Book* (4. Edition., S. 465). Elsevier Health Sciences.
- Shetty, S. (2012). Keratinization and its Disorders. *Oman Medical Journal*, 27(5), 348–357. <https://doi.org/10.5001/omj.2012.90>
- Shimazaki, J., Higa, K., Kato, N. & Satake, Y. (2009). Barrier Function of Cultivated Limbal and Oral Mucosal Epithelial Cell Sheets. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 50(12), 5672–5680. <https://doi.org/10.1167/iovs.09-3820>
- Singh, R. & Lillard, J. W. (2009). Nanoparticle-based targeted drug delivery. *Experimental and molecular pathology*, 86(3), 215–223. <https://doi.org/10.1016/j.yexmp.2008.12.004>
- Slot, D. E., Berchier, C. E., Addy, M., Velden, U. V. der & Weijden, G. V. der. (2014). The efficacy of chlorhexidine dentifrice or gel on plaque, clinical parameters of gingival inflammation and tooth discoloration: a systematic review. *International Journal of Dental Hygiene*, 12(1), 25–35. <https://doi.org/10.1111/idh.12050>
- Slots, J. & Rams, T. E. (1990). Antibiotics in periodontal therapy: advantages and disadvantages. *Journal of Clinical Periodontology*, 17, 479–493. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2710.1992.tb01220.x>
- Squier, C. A. & Hall, B. K. (1985). The Permeability of Skin and Oral Mucosa to Water and Horseradish Peroxidase as Related to the Thickness of the Permeability Barrier. *Journal of Investigative Dermatology*, 84(3), 176–179. <https://doi.org/10.1111/1523-1747.ep12264711>
- Squier, Christopher A. & Kammeyer, Gregory A. (1983). The role of connective tissue in the maintenance of epithelial differentiation in the adult. *Cell and Tissue Research*, 230(3), 615–630. <https://doi.org/10.1007/BF00216205>
- Staehelin, L. A. (1974). Structure and Function of Intercellular Junctions. In G.H. Bourne, J.F. Danielli & K.W. Jeon (Hrsg.), *International Review of Cytology* (Band 39, S. 191–283). Academic Press. [https://doi.org/10.1016/S0074-7696\(08\)60940-7](https://doi.org/10.1016/S0074-7696(08)60940-7)
- Stashenko, P., Fujiyoshi, P., Obernesser, M. S., Probst, L., Haffajee, A. D. & Socransky, S. S. (1991). Levels of interleukin 1 beta in tissue from sites of active periodontal disease. *Journal of Clinical Periodontology*, 18(7), 548–554.
- Stathopoulou, P. G., Benakanakere, M. R., Galicia, J. C. & Kinane, D. F. (2010). Epithelial cell pro-inflammatory cytokine response differs across dental plaque bacterial species. *Journal of Clinical Periodontology*, 37(1), 24–29. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051X.2009.01505.x>
- Tawfig, N. (2016). Proinflammatory Cytokines and Periodontal Disease. *Journal of Dental Problems and Solutions*, 012–017. <https://doi.org/10.17352/2394-8418.000026>
- Teubl, B. J., Absenger, M., Fröhlich, E., Leitinger, G., Zimmer, A. & Roblegg, E. (2013). The oral cavity as a biological barrier system: Design of an advanced buccal in vitro permeability model. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 84(2), 386–393. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2012.10.021>

- Thilander, H. & Bloom, G. D. (1968). Cell contacts in oral epithelia. *Journal of Periodontal Research*, 3(2), 96–110. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0765.1968.tb01909.x>
- Thunell, D. H., Tymkiw, K. D., Johnson, G. K., Joly, S., Burnell, K. K., Cavanaugh, J. E., Brogden, K. A. & Guthmiller, J. M. (2010). A multiplex immunoassay demonstrates reductions in gingival crevicular fluid cytokines following initial periodontal therapy. *Journal of periodontal research*, 45(1), 148–152. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0765.2009.01204.x>
- Tiwari, G., Tiwari, R., Sriwastawa, B., Bhati, L., Pandey, S., Pandey, P. & Bannerjee, S. K. (2012). Drug delivery systems: An updated review. *International Journal of Pharmaceutical Investigation*, 2(1), 2–11. <https://doi.org/10.4103/2230-973X.96920>
- Tomakidi, P., Breikreutz, D., Fusenig, N. E., Zöller, J., Kohl, A. & Komposch, G. (1998). Establishment of oral mucosa phenotype in vitro in correlation to epithelial anchorage. *Cell and Tissue Research*, 292(2), 355–366. <https://doi.org/10.1007/s004410051066>
- Tonetti, M. S., Bottenberg, P., Conrads, G., Eickholz, P., Heasman, P., Huysmans, M.-C., López, R., Madianos, P., Müller, F., Needleman, I., Nyvad, B., Preshaw, P. M., Pretty, I., Renvert, S., Schwendicke, F., Trombelli, L., van der Putten, G.-J., Vanobbergen, J., West, N., Young, A. & Paris, S. (2017). Dental caries and periodontal diseases in the ageing population: call to action to protect and enhance oral health and well-being as an essential component of healthy ageing - Consensus report of group 4 of the joint EFP/ORCA workshop on the boundaries between caries and periodontal diseases. *Journal of Clinical Periodontology*, 44 Suppl 18, S135–S144. <https://doi.org/10.1111/jcpe.12681>
- Tonetti, M. S., Van Dyke, T. E. & Arbeitsgruppe 1 des EFP/AAP Workshops. (2013). Periodontitis and atherosclerotic cardiovascular disease: consensus report of the Joint EFP/AAP Workshop on Periodontitis and Systemic Diseases. *Journal of Periodontology*, 84(4 Suppl), S24–29. <https://doi.org/10.1902/jop.2013.1340019>
- Tscheik, C., Blasig, I. E. & Winkler, L. (2013). Trends in drug delivery through tissue barriers containing tight junctions. *Tissue Barriers*, 1(2). <https://doi.org/10.4161/tisb.24565>
- Tsukita, S., Furuse, M. & Itoh, M. (2001). Multifunctional strands in tight junctions. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 2(4), 285–293. <https://doi.org/10.1038/35067088>
- Unbehauen, M. L., Fleige, E., Paulus, F., Schemmer, B., Mecking, S., Moré, S. D. & Haag, R. (2017). Biodegradable Core–Multishell Nanocarriers: Influence of Inner Shell Structure on the Encapsulation Behavior of Dexamethasone and Tacrolimus. *Polymers*, 9(8), 316. <https://doi.org/10.3390/polym9080316>
- Vande Vannet, B., Hanssens, J.-L. & Wehrbein, H. (2007). The use of three-dimensional oral mucosa cell cultures to assess the toxicity of soldered and welded wires. *European Journal of Orthodontics*, 29(1), 60–66. <https://doi.org/10.1093/ejo/cjl063>
- Verordnung (EG) Nr. 440/2008 der Kommission vom 30. Mai 2008 zur Festlegung von Prüfmethode gemäß der Verordnung (EG) Nr. 1907/2006 des Europäischen Parlaments und des Rates zur Registrierung, Bewertung, Zulassung und Beschränkung chemischer Stoffe (REACH). (2008, Mai 31). OJ L. Zugriff am 30.7.2019. Verfügbar unter: <http://data.europa.eu/eli/reg/2008/440/oj/deu>
- Verordnung (EU) Nr. 640/2012 der Kommission vom 6. Juli 2012 zur Änderung der Verordnung (EG) Nr. 440/2008 zur Festlegung von Prüfmethode gemäß der Verordnung (EG) Nr. 1907/2006 des Europäischen Parlaments und des Rates zur Registrierung, Bewertung, Zulassung und Beschränkung chemischer Stoffe (REACH) zwecks Anpassung an den technischen Fortschritt. (2012, Juli 20). OJ L. Zugriff am 30.7.2019. Verfügbar unter: <http://data.europa.eu/eli/reg/2012/640/oj/deu>
- Vichai, V. & Kirtikara, K. (2006). Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. *Nature Protocols*, 1(3), 1112–1116. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.179>
- Volpedo, G., Costa, L., Ryan, N., Halsey, G., Satoskar, A. & Oghumu, S. (2019). Nanoparticulate drug delivery systems for the treatment of neglected tropical protozoan diseases. *The Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases*, 25. <https://doi.org/10.1590/1678-9199-JVATITD-1441-18>



- Wan, H., Gadmor, H. & Brown, L. (2018). Cell-Cell Interactions in the Oral Mucosa: Tight Junctions and Gap Junctions. *Oral Mucosa in Health and Disease* (S. 19–30). Springer, Cham. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-56065-6\\_2](https://doi.org/10.1007/978-3-319-56065-6_2)
- Waykole, Y. P., Doiphode, S. S., Rakhewar, P. S. & Mhaske, M. (2009). Anticytokine therapy for periodontal diseases: Where are we now? *Journal of Indian Society of Periodontology*, 13(2), 64–68. <https://doi.org/10.4103/0972-124X.55837>
- Wei, Q., Achazi, K., Liebe, H., Schulz, A., Noeske, P.-L. M., Grunwald, I. & Haag, R. (2014). Mussel-Inspired Dendritic Polymers as Universal Multifunctional Coatings. *Angewandte Chemie International Edition*, 53(43), 11650–11655. <https://doi.org/10.1002/anie.201407113>
- Wille, J. J., Månsson-Rahemtulla, B. & Rahemtulla, F. (1990). Characterization of human gingival keratinocytes cultured in a serum-free medium. *Archives of Oral Biology*, 35(12), 967–976. [https://doi.org/10.1016/0003-9969\(90\)90016-4](https://doi.org/10.1016/0003-9969(90)90016-4)
- Winkelhoff, A. J. V., Rams, T. E. & Slots, J. (1996). Systemic antibiotic therapy in periodontics. *Periodontology 2000*, 10(1), 45–78. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0757.1996.tb00068.x>
- Xu, Q., Izumi, K., Tobita, T., Nakanishi, Y. & Feinberg, S. E. (2009). Constitutive Release of Cytokines by Human Oral Keratinocytes in an Organotypic Culture. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 67(6), 1256–1264. <https://doi.org/10.1016/j.joms.2009.02.003>
- Yadev, N. P., Murdoch, C., Saville, S. P. & Thornhill, M. H. (2011). Evaluation of tissue engineered models of the oral mucosa to investigate oral candidiasis. *Microbial Pathogenesis*, 50(6), 278–285. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2010.11.009>
- Yamamoto, K., Klossek, A., Flesch, R., Ohigashi, T., Fleige, E., Rancan, F., Frombach, J., Vogt, A., Blume-Peytavi, U., Schrade, P., Bachmann, S., Haag, R., Hedtrich, S., Schäfer-Korting, M., Kosugi, N. & Rühl, E. (2016). Core-multishell nanocarriers: Transport and release of dexamethasone probed by soft X-ray spectromicroscopy (International Conference on Dermal Drug Delivery by Nanocarriers, Berlin 14-16 March). *Journal of Controlled Release*, 242, 64–70. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.08.028>
- Yamazaki, K., Nakajima, T., Gemmell, E., Polak, B., Seymour, G. J. & Hara, K. (1994). IL-4- and IL-6-producing cells in human periodontal disease tissue. *Journal of Oral Pathology & Medicine: Official Publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology*, 23(8), 347–353.
- Ye, P., Yu, H., Simonian, M. & Hunter, N. (2014). Expression patterns of tight junction components induced by CD24 in an oral epithelial cell-culture model correlated to affected periodontal tissues. *Journal of Periodontal Research*, 49(2), 253–259. <https://doi.org/10.1111/jre.12102>
- Yucel-Lindberg, T. & Båge, T. (2013). Inflammatory mediators in the pathogenesis of periodontitis. *Expert Reviews in Molecular Medicine*, 15, e7. <https://doi.org/10.1017/erm.2013.8>
- Zhang, Y., Chan, H. F. & Leong, K. W. (2013). Advanced materials and processing for drug delivery: the past and the future. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 65(1), 104–120. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2012.10.003>

## Appendix

**Appendix Tab. I: Verdünnungen, Volumina und Inkubationszeiten für den ELISA**

Schritt	Verdünnung für Arbeitslösung	Verdünnungsmittel	Arbeitslösung pro Well	Inkubationszeit	Bedingungen
<b>Capture-AK</b>	1:100	PBS	100 µl	Über Nacht	RT
Entfernen des <i>Capture</i> -Antikörpers					
<b>Blockierung</b>	-	-	300 µl	1 h	RT
Entfernen der Blockierungslösung					
<b>Standard</b>	0-600 pg/ml	Blockierung	100 µl	2 h	RT
<b>Proben</b>	OKG4: - 3D: 1:750				
5x Waschen mit 0,05 % Tween® 20 (v/v) in PBS					
<b>Detector-AK</b>	1:100	Blockierung	100 µl	Über Nacht	4 °C
5x Waschen mit 0,05 % Tween® 20 (v/v) in PBS					
<b>Poly-HRP-SA</b>	1:1000	Blockierung	100 µl	30 min	RT
5x Waschen mit 0,05 % Tween® 20 (v/v) in PBS					
<b>TMB-Lösung</b>	-	-	100 µl	bis suffiziente Farbreaktion	RT
<b>0,1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b>	-	-	100 µl	-	RT
Auslesen im Photometer bei 450 nm					

Quelle modifiziert nach: <http://www.immunotools.de/html/elisa/31670069.pdf> (Zugriff am 14.12.2019)

**Appendix Tab. II: Zytokinbindungen einer Human Cytokine Antibody Array-Membran**

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L
<b>1</b>	Pos	Pos	Neg	Neg	ENA-78	GCSF	GM-CSF	GRO	GRO-α	I-309	IL-1α	IL-1β
<b>2</b>												
<b>3</b>	IL-2	IL-3	IL-4	IL-5	IL-6	IL-7	IL-8	IL-10	IL-12 p40/p70	IL-13	IL-15	IFN-γ
<b>4</b>												
<b>5</b>	MCP-1	MCP-2	MCP-3	MCSF	MDC	MIG	MIP-1 δ	RANTES	SCF	SDF-1	TARC	TGF-β1
<b>6</b>												
<b>7</b>	TNF-α	TNF-β	EGF	IGF-I	Angiogenin	Onco-statin M	Thrombopoietin	VEGF	PDGF BB	Leptin	Neg	Pos
<b>8</b>												

Quelle: <https://www.abcam.com/cytokine-array-human-cytokine-antibody-array-membrane-42-targets-ab133997-protocols.html> (Zugriff am 12.08.2018)

**Appendix Tab. III: SRB-Assay, Auflistung der Daten**

<b>SRB</b> Extinktion (492nm)	<i>Kontrolle</i>	<i>IL-1<math>\beta</math></i>	<i>TNF<math>\alpha</math></i>	<i>TNF<math>\alpha</math> + IL-1<math>\beta</math></i>	<i>LPS</i>	<i>LPS + IL-1<math>\beta</math></i>	<i>CMS</i>	<i>CMS + IL-1<math>\beta</math></i>
24 h	0,09 $\pm 0,03$	0,07 $\pm 0,04$	0,06 $\pm 0,04$	0,09 $\pm 0,06$	0,06 $\pm 0,03$	0,09 $\pm 0,04$	0,08 $\pm 0,05$	0,11 $\pm 0,04$
48 h	0,17 $\pm 0,08$	0,17 $\pm 0,04$	0,16 $\pm 0,03$	0,18 $\pm 0,02$	0,20 $\pm 0,02$	0,18 $\pm 0,06$	0,16 $\pm 0,01$	0,16 $\pm 0,05$
72 h	0,29 $\pm 0,05$	0,24 $\pm 0,02$	0,24 $\pm 0,03$	0,25 $\pm 0,04$	0,30 $\pm 0,04$	0,26 $\pm 0,07$	0,26 $\pm 0,03$	0,31 $\pm 0,03$

**Appendix Tab. IV: SRB-Assay, p-Werte**

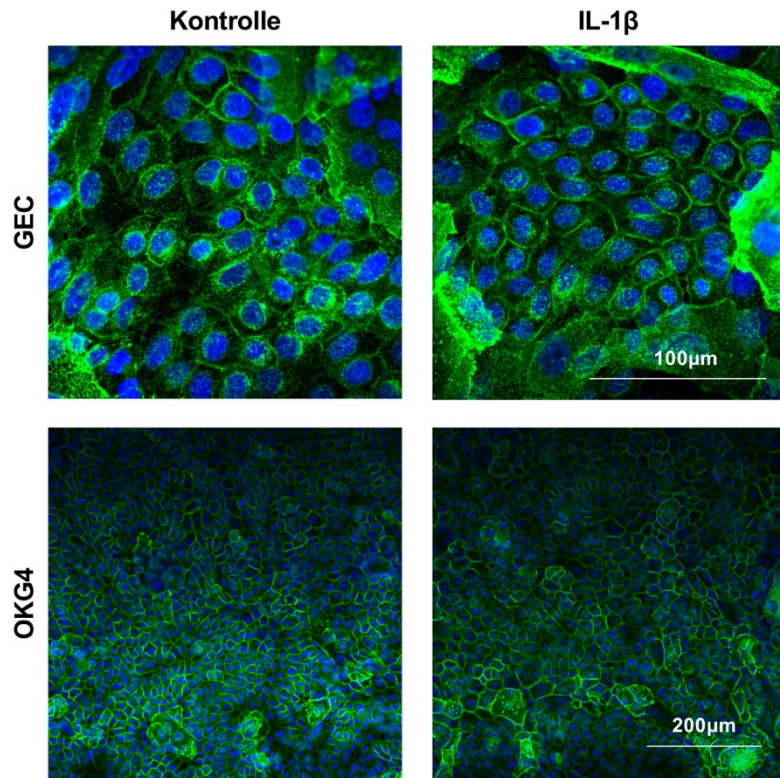
<b>SRB</b> p-Werte	<i>IL-1<math>\beta</math></i>	<i>TNF<math>\alpha</math></i>	<i>TNF<math>\alpha</math> + IL-1<math>\beta</math></i>	<i>LPS</i>	<i>LPS + IL-1<math>\beta</math></i>	<i>CMS</i>	<i>CMS + IL-1<math>\beta</math></i>
24 h	0,633	0,541	0,94	0,327	0,85	0,792	0,588
48 h	0,916	0,954	0,861	0,607	0,851	0,865	0,917
72 h	0,19	0,265	0,386	0,816	0,507	0,414	0,639

**Appendix Tab. V: MTT-Assay, Auflistung der Daten**

<b>MTT</b> Extinktion (570nm)	<i>Kontrolle</i>	<i>ML</i>	<i>IL-1<math>\beta</math></i>	<i>TNF<math>\alpha</math></i>	<i>TNF<math>\alpha</math> + IL-1<math>\beta</math></i>	<i>LPS</i>	<i>LPS + IL-1<math>\beta</math></i>	<i>CMS</i>	<i>CMS + IL-1<math>\beta</math></i>
24 h	0,43 $\pm 0,17$	0,01 $\pm 0,00$	0,28 $\pm 0,09$	0,32 $\pm 0,03$	0,32 $\pm 0,06$	0,40 $\pm 0,06$	0,36 $\pm 0,06$	0,37 $\pm 0,09$	0,37 $\pm 0,05$
48 h	0,55 $\pm 0,05$	0,01 $\pm 0,00$	0,56 $\pm 0,08$	0,55 $\pm 0,08$	0,51 $\pm 0,11$	0,50 $\pm 0,08$	0,55 $\pm 0,03$	0,48 $\pm 0,13$	0,50 $\pm 0,12$
72 h	0,50 $\pm 0,03$	0,02 $\pm 0,01$	0,49 $\pm 0,04$	0,42 $\pm 0,03$	0,44 $\pm 0,01$	0,47 $\pm 0,04$	0,43 $\pm 0,03$	0,40 $\pm 0,03$	0,38 $\pm 0,07$

**Appendix Tab. VI: MTT-Assay, p-Werte**

<b>MTT</b> p-Werte	<i>ML</i>	<i>IL-1<math>\beta</math></i>	<i>TNF<math>\alpha</math></i>	<i>TNF<math>\alpha</math> + IL-1<math>\beta</math></i>	<i>LPS</i>	<i>LPS + IL-1<math>\beta</math></i>	<i>CMS</i>	<i>CMS + IL-1<math>\beta</math></i>
24 h	0,016	0,269	0,368	0,359	0,806	0,561	0,615	0,579
48 h	< 0,001	0,838	0,922	0,687	0,546	0,804	0,477	0,599
72 h	< 0,001	0,919	0,049	0,033	0,506	0,042	0,027	0,078



**Appendix Abb. I: WGA-Fluoreszenz gingivaler Zellen unter Kontroll- und IL-1 $\beta$ -Bedingungen**

WGA-Fluoreszenz-Analyse an differenzierten GEC und OKG4-Zellen in An- und Abwesenheit von IL-1 $\beta$ .  $1,2 \times 10^4$  OKG4-Zellen bzw. GEC wurden in 8-Kammer-Objektträgern (OT) kultiviert und über 24 (GEC) bzw. 72 h (OKG4) mit IL-1 $\beta$  stimuliert oder unstimuliert kultiviert. Nach Ende der Stimulationszeit wurden die Zellen auf dem OT fixiert. Anschließend wurden die Zellen mit WGA-Alexa Fluor<sup>®</sup> 488 sowie Hoechst 33342 zur Visualisierung von Zellmembranen und -kernen inkubiert. Die Bildbearbeitung erfolgte mit ZEN und ImageJ, Maßstabsbalken 100  $\mu$ m (GEC) bzw. 200  $\mu$ m (OKG4).

**Appendix Tab. VII: Human Antibody Cytokine Array, p-Werte**

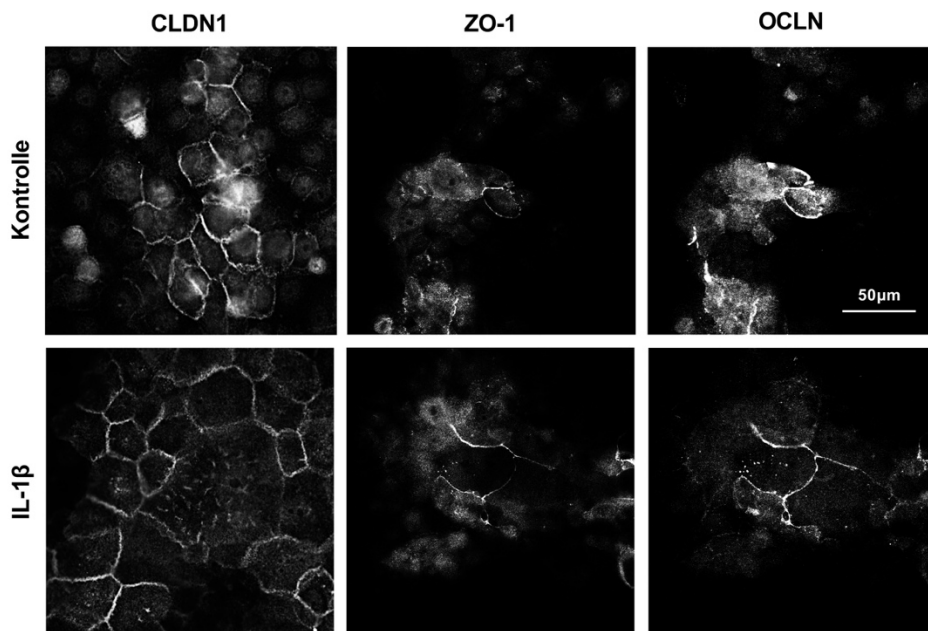
Zytokine	p-Werte	Zytokine	p-Werte	Zytokine	p-Werte	Zytokine	p-Werte
ENA-78	n.b.	IL-5	n.b.	MCP-2	n.b.	TGF- $\beta$ 1	0,259
GM-CSF	n.b.	IL-6	n.b.	MCP-3	n.b.	TNF- $\alpha$	n.b.
GRO	0,09	IL-7	n.b.	MCSF	n.b.	TNF- $\beta$	n.b.
GRO- $\alpha$	0,05	IL-8	0,04	MDC	n.b.	EGF	n.b.
I-309	n.b.	IL-10	0,423	MIG	n.b.	IGF-I	n.b.
IL-1 $\alpha$	0,981	IL-12 p40/p70	n.b.	MIP-1 $\delta$	n.b.	Angiogenin	0,341
IL-1 $\beta$	0,044	IL-13	n.b.	RANTES	0,319	Oncostatin M	0,195
IL-2	n.b.	IL-15	n.b.	SCF	0,224	Thrombopoietin	n.b.
IL-3	0,071	IFN- $\gamma$	n.b.	SDF-1	n.b.	VEGF	0,51
IL-4	n.b.	MCP-1	0,531	TARC	0,276	PDGF BB	0,117
n.b., nicht berücksichtigt, da Werte < 10 % der Positivkontrolle						Leptin	n.b.

**Appendix Tab. VIII: ELISA-Versuch an OKG4-Monolayern, Auflistung der Daten**

ELISA		IL-6				IL-8			
Monolayer									
Daten (pg/ml)	Kontrolle	IL-1 $\beta$	CMS	CMS + IL-1 $\beta$	Kontrolle	IL-1 $\beta$	CMS	CMS + IL-1 $\beta$	
6 h	37,62 ±4,32	296,85 ± 21,84	47,26 ±4,34	247,36 ±15,34	285,29 ±11,47	202,36 ±27,91	216,72 ±20,81	355,81 ±46,40	
24 h	26,86 ±6,37	319,47 ±48,87	13,91 ±6,19	214,08 ±44,59	259,55 ±30,32	423,73 ±26,72	235,69 ±11,73	347,79 ±88,12	
72 h	3,66 ±1,24	1,77 ±1,37	0,00 ±0,00	0,24 ±0,25	118,12 ±6,02	330,99 ±14,39	226,06 ±22,08	329,14 ±19,43	

**Appendix Tab. IX: ELISA-Versuch an OKG4-Monolayern, p-Werte**

ELISA		IL-6			IL-8	
Monolayer						
p-Werte	Kontrolle/ IL-1 $\beta$	Kontrolle/ CMS	IL-1 $\beta$ / CMS + IL-1 $\beta$	Kontrolle/ IL-1 $\beta$	Kontrolle/ CMS	IL-1 $\beta$ / CMS + IL-1 $\beta$
6 h	<0,001	0,071	0,045	0,013	0,011	0,012
24 h	0,01	0,087	0,069	0,003	0,319	0,27
72 h	0,188	0,014	0,225	<0,001	0,002	0,911



**Appendix Abb. II: Immunfluoreszenzanalyse von TJ-Proteinen in OKG4-Zellen**

Immunfluoreszenz-Analyse für Claudin-1 (CLND1), ZO-1 und Occludin (OCLN) an kultivierten OKG4-Zellen. Hierzu wurden  $1,2 \times 10^4$  OKG4-Zellen in 8-Kammer-Objektträgern kultiviert und über 24 h mit IL-1 $\beta$  stimuliert oder unstimuliert ( $1,4 \text{ mM Ca}^{2+}$ ) kultiviert. Nach Ende der Stimulationszeit wurden die Zellen fixiert und für Claudin-1, ZO-1 und Occludin gefärbt. Die Bildbearbeitung erfolgte mittels ZEN und ImageJ, Maßstabsbalken  $100 \mu\text{m}$ .

**Appendix Tab. X: Western Blot-Analyse bei IL-1 $\beta$ -Stimulation, Auflistung der Daten**

Western Blot Daten (% der Kontrolle)	IL-1 $\beta$			
	ECAD	CLDN1	ZO-1	OCLN
24 h	1,03 $\pm 0,14$	1,27 $\pm 0,19$	1,49 $\pm 0,25$	1,21 $\pm 0,14$
72 h	1,03 $\pm 0,05$	1,02 $\pm 0,04$	1,13 $\pm 0,12$	1,21 $\pm 0,01$

**Appendix Tab. XI: Western Blot-Analyse bei IL-1 $\beta$ -Stimulation, p-Werte**

Western Blot p-Werte	IL-1 $\beta$			
	ECAD	CLDN1	ZO-1	OCLN
24 h	0,674	0,076	0,036	0,032
72 h	0,368	0,483	0,231	<0,001

**Appendix Tab. XII: Analyse epithelialer 3D-Modelle**

Vergleich der Modelle im zeitlichen Verlauf				Vergleich von OKG4- und GEC-Modellen			
Höhe Modelle ( $\mu\text{m}$ )	OKG4 Tag 9	OKG4 Tag 15	p-Wert	Höhe Modelle ( $\mu\text{m}$ )	OKG4 Tag 15	GEC Tag 16	p-Wert
Kontrolle	13,76 $\pm 2,92$	37,32 $\pm 7,58$	0,002	Kontrolle	37,32 $\pm 7,58$	18,12 $\pm 4,35$	0,016
				IL-1 $\beta$	33,86 $\pm 3,96$	22,38 $\pm 4,50$	0,022

Analyse der IL-1 $\beta$ -Einwirkung				Zellkerne			
Höhe Modelle ( $\mu\text{m}$ )	Kontrolle	IL-1 $\beta$	p-Wert	Modelle (Anzahl/Bild)	Kontrolle	IL-1 $\beta$	p-Wert
OKG4 Tag 15	37,32 $\pm 7,58$	33,68 $\pm 3,96$	0,483	OKG4 Tag 15	39,33 $\pm 2,88$	40,33 $\pm 8,50$	0,405
GEC Tag 16	18,12 $\pm 4,35$	22,38 $\pm 4,50$	0,351	GEC Tag 16	16,33 $\pm 3,14$	23,33 $\pm 7,71$	0,263

**Appendix Tab. XIII: ELISA-Versuch am 3D-Modell, Auflistung der Daten**

ELISA 3D-Modell Daten (ng/ml)	IL-6		IL-8	
	Kontrolle	IL-1 $\beta$	Kontrolle	IL-1 $\beta$
Tag 1	123,68 $\pm 30,06$	146,53 $\pm 32,19$	152,16 $\pm 41,46$	196,86 $\pm 13,04$
Tag 8	49,98 $\pm 18,75$	123,84 $\pm 49,72$	129,57 $\pm 27,27$	227,83 $\pm 51,30$

**Appendix Tab. XIV: ELISA-Versuch am 3D-Modell, p-Werte**

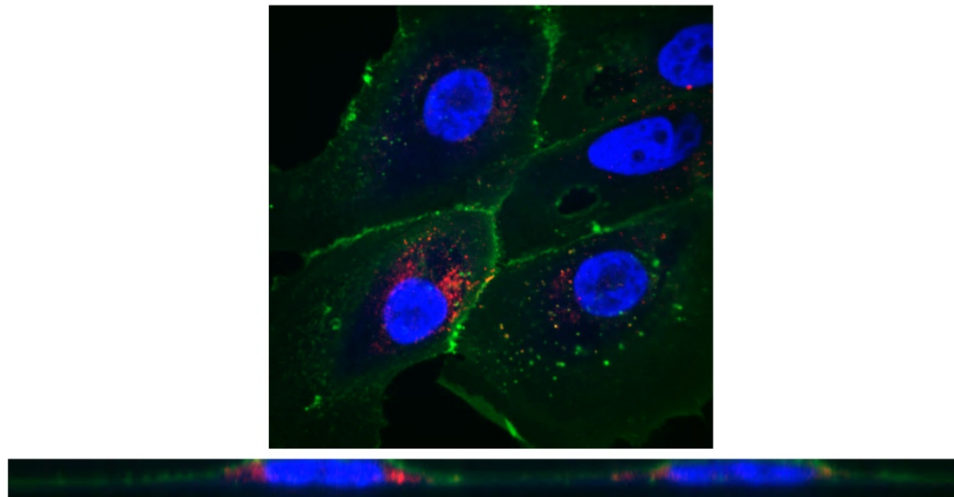
ELISA 3D-Modell	IL-6	IL-8	
p-Werte			
Tag 1	0,374	0,138	
Tag 8	0,064	0,020	
p-Werte	Tag 1/Tag 8	p-Werte	Tag 1/Tag 8
<i>IL-6 Kontrolle</i>	0,008	<i>IL-8 Kontrolle</i>	0,431
<i>IL-6 IL-1<math>\beta</math></i>	0,505	<i>IL-8 IL-1<math>\beta</math></i>	0,320

**Appendix Tab. XV: Western Blot-Analyse bei CMS-Stimulation, Auflistung der Daten**

Western Blot	CMS				CMS + IL-1 $\beta$			
	ECAD	CLDN1	ZO-1	OCLN	ECAD	CLDN1	ZO-1	OCLN
Daten (% der Kontrolle)								
24 h	0,98 $\pm 0,18$	1,19 $\pm 0,27$	1,19 $\pm 0,33$	1,06 $\pm 0,06$	0,95 $\pm 0,18$	1,31 $\pm 0,35$	1,77 $\pm 0,81$	1,34 $\pm 0,19$
72 h	0,98 $\pm 0,12$	0,87 $\pm 0,08$	1,23 $\pm 0,09$	0,94 $\pm 0,06$	0,92 $\pm 0,14$	0,84 $\pm 0,23$	1,08 $\pm 0,05$	1,18 $\pm 0,08$

**Appendix Tab. XVI: Western Blot-Analyse bei CMS-Stimulation, p-Werte**

Western Blot	Kontrolle/CMS				IL-1 $\beta$ /CMS + IL-1 $\beta$			
p-Werte	ECAD	CLDN1	ZO-1	OCLN	ECAD	CLDN1	ZO-1	OCLN
24 h	0,869	0,284	0,352	0,135	0,523	0,865	0,552	0,331
72 h	0,881	0,061	0,016	0,212	0,298	0,29	0,568	0,642



**Appendix Abb. III: Perinukleäre Akkumulation des CMS-Nanocarriers in gingivalen Zellen**

WGA-Fluoreszenz an mit Indocarbocyanin-gekoppelten CMS (CMS-ICC, 50  $\mu\text{g/ml}$ ) behandelten primären gingivalen Keratinozyten.  $1,2 \times 10^4$  gingivale Zellen wurden in 8-Kammer-Objektträgern kultiviert und über 6 h mit CMS-ICC (rot) behandelt. Die Objektträger wurden fixiert und WGA-Farbstoff (grün) sowie Hoechst 33342 (blau) appliziert. Es wurden Schnitte in der z-Achse (z-Stacks) der Objekte mit einer Schnittdicke von 0,34  $\mu\text{m}$  mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie angefertigt. Die Bildbearbeitung erfolgte mit ZEN oder ImageJ, Vergrößerung 60x. Balken zeigt XZ-Ansicht zur Lokalisation des Carriers innerhalb der Zelle.

## Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Kim Natalie Stolte, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: »Etablierung eines inflammatorischen humanen 3D-Schleimhautäquivalents für präklinische Untersuchungen entzündlicher Erkrankungen der Mundschleimhaut« selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren/innen beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der gemeinsamen Erklärung mit der Betreuerin, angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; [www.icmje.org](http://www.icmje.org)) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass ich mich zur Einhaltung der Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis verpflichte.

Weiterhin versichere ich, dass ich diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits an einer anderen Fakultät eingereicht habe.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift



## **Lebenslauf**

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

## Publikationsliste

Labus, J., Wöltje, K., **Stolte, K. N.**, Häckel, S., Kim, K. S., Hildmann, A. & Danker, K. (2018). IL-1 $\beta$  promotes transendothelial migration of PBMCs by upregulation of the FN/ $\alpha$ 5 $\beta$ 1 signalling pathway in immortalised human brain microvascular endothelial cells. *Experimental Cell Research*, 373(1), 99–111. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2018.10.002>

## **Danksagung**

Die Danksagung wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.