

## 7 Zusammenfassung

### **In-vitro- und In-vivo-Untersuchungen zur Wundheilung und Regeneration parodontaler Defekte mit Schmelzmatrixproteinen**

Parodontitis, die entzündliche Erkrankung des Parodonts, stellt eine der Hauptursachen für Zahnverlust beim Erwachsenen dar, indem sie die Verankerung der Zahnwurzel im Alveolarknochen zerstört. Vor kurzem konnte gezeigt werden, dass die Applikation von Schmelzmatrixproteinextrakten (SMP) auf die Wurzeloberflächen von parodontal erkrankten Zähnen die Regeneration der parodontalen Gewebe fördert. Insbesondere kam es zum Wiederaufbau des Zementes mit inserierenden Fasern, eines funktionellen parodontalen Ligaments sowie des alveolären Knochens und der dort verankerten Fasern. Diese grundlegende Erkenntnis begründete den Anfang eines neuen, biologisch orientierten Ansatzes zur parodontalen Regeneration.

In der extrazellulären organischen Matrix während der Schmelzbildung finden sich im Wesentlichen zwei Proteinklassen: hydrophobe Amelogenine und saure Enameline. In der vorliegenden Studie wurden zunächst verschiedene Fraktionen der Schmelzmatrixproteine extrahiert und gereinigt. Dabei resultierten Fraktionen der gesamten Schmelzmatrixproteine, mit Amelogenin und Enamelin angereicherte Fraktionen sowie weiter aufgereinigte Amelogenin-Proteine. Darüber hinaus wurde erstmals humanes Amelogenin in rekombinanter Form im Baculovirus-System exprimiert.

Zunächst wurden diese Proteinfractionen sowie das kommerzielle Präparat Emdogain® (Biora, Schweden) zur Untersuchung biologischer und zellulärer Grundlagen der Regeneration eingesetzt, die bei Wundheilungsvorgängen nach parodontaler Chirurgie eine Rolle spielen. Dazu wurde in vitro der Effekt auf humane Zellkulturen von primären, parodontalen Ligamentzellen (PDL-Zellen) erfasst. Die Wirkungen der SMP auf PDL-Zellkulturen wurden histologisch sowie chemisch und biochemisch hinsichtlich Hart- und Weichgewebsbildung beurteilt. Primäre Parameter in Monolayerkulturen waren Zellproliferation, Kollagensynthese und Induktion biologisch aktiver Mediatoren sowie die Expression spezifischer mRNA von Knochen-assoziierten Proteinen. Untersuchungsparameter für die Hartgewebsbildung in Organoidkulturen war der Kalziumeinbau und der Gehalt an alkalischer Phosphatase bzw. für die

Matrixsynthese die Kollagenbildung anhand des  $^3\text{H}$ -Prolin-Einbaus. Die ultrastrukturelle Morphologie wurde mittels Elektronenmikroskopie dargestellt.

Die verschiedenen Fraktionen der Schmelzmatrixproteine und das Präparat Emdogain<sup>®</sup> wurden dann verwendet, um in vivo die Induktion der parodontalen Geweberegeneration bei experimentell erzeugter Parodontitis am Hund an Furkationsdefekten Grad III zu untersuchen. Das Ausmaß der Neubildung der unterschiedlichen parodontalen Gewebe durch den Einfluss der Schmelzproteinfraktionen wurde klinisch, histomorphometrisch und elektronenmikroskopisch beurteilt.

Die Zellkulturstudien zeigten, dass die Proliferation, die Synthese von Kollagen und Wachstumsfaktoren bei Kokultivierung mit verschiedenen SMP-Fraktionen signifikant gesteigert wurden. Besonders die Stimulierungen mit rekombinantem Amelogenin als singulärem Protein ergaben reproduzierbar signifikante Steigerungen. Die Expression von spezifischer mRNA wurde bei Kokultivierung mit allen SMP nachgewiesen. Erstmals zeigten die Ergebnisse dieser Studie, dass in Anwesenheit von rekombinantem Amelogenin wesentliche Zellfunktionen parodontaler Fibroblasten stimuliert und damit Prozesse unterstützt wurden, die für regenerative Heilung von großer Bedeutung sind.

Im klinischen Versuch förderte insbesondere die zusätzliche Anwendung von rekombinantem humanen Amelogenin im Vergleich zu Kontrollen die histologische Neubildung parodontaler Gewebe in Defekten, die vorher Plaque exponiert waren. Obwohl keine Membranen oder volumetrische Defektfüller verwendet wurden, zeigte sich ein bedeutendes Ausmaß neuen Hart- und Weichgewebes koronal von Rillen, die an den Defektbasen angebracht wurden. In den behandelten Defekten waren die Dimensionen des neu gebildeten parodontalen Ligaments wie auch die Breite des neu geformten Zements identisch zum physiologischen Desmodont. Die über Säulenchromatographie gereinigte Amelogenin-Fraktion, bei der höhermolekulare Bestandteile entfernt wurden, zeigte ein vergleichbares Ausmaß an neu gebildetem Attachment. Die Behandlungen mit anderen Fraktionen der SMP ergaben quantitativ deutlich weniger regenerative Heilung bzw. ein geringeres Ausmaß an neuem Knochen und Zement. Die elektronenmikroskopischen Darstellungen bestätigten die partielle Regeneration des parodontalen Halteapparates nach Stimulierung mit

den Amelogenin-Proteinen, indem sie die Neubildung kollagener Fasern und die Insertion in neues mineralisiertes Gewebe zeigten.

Zusammenfassend konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass Amelogenin, speziell rekombinantes humanes Amelogenin als singuläres Protein, weitgehend die stimulierenden Effekte der SMP auf parodontale Zellen bestimmt und die parodontale Regeneration auf einer vorher Plaque infizierten Wurzeloberfläche fördern kann. Diese Studie liefert zellbiologische und klinisch-experimentelle Grundlagen für die Regeneration parodontaler Gewebe durch Amelogenin und damit die Basis für den klinischen Einsatz von rekombinantem humanen Amelogenin zur biologischen Steuerung der Heilung parodontaler Defekte.

## 7. 1 Summary

### **In vitro and in vivo studies on wound healing and regeneration of periodontal defects with enamel matrix proteins.**

Periodontitis, the inflammatory disease of the periodontium, is the main reason for tooth loss in adult patients. It destroys the supporting bone and the anchoring fibres. Recently it was shown that the application of enamel matrix protein extracts (EMP) on the root surface of periodontally diseased teeth stimulated the regeneration of the periodontal tissues. In particular, formation of new cementum and new alveolar bone with inserting fibres and a functional periodontal ligament were observed. These fundamental findings opened a new era for a biologically based approach to periodontal regeneration.

There are two main classes of proteins in the extracellular organic matrix during enamel formation: the hydrophobic amelogenins and the acidic enamelin. In the first part of this study, different fractions of EMP were extracted and further purified. The resulting preparations are comprised of fractions of the total enamel matrix proteins, of amelogenin-enriched proteins, of enamelin-enriched proteins and of fractionated amelogenin proteins. Moreover, recombinant human amelogenin was prepared by using the baculovirus system.

Furthermore these protein fractions and the commercial product Emdogain® (Biora, Sweden) were used to examine biological and cellular fundamentals of regeneration with EMP that play a role in wound healing after periodontal surgery. The impact of EMP on cell cultures of human periodontal ligament cells (PDL cells) was determined regarding histological, chemical and biochemical parameters of soft and hard tissue formation. The primary parameters in the monolayer cultures were cell proliferation, collagen synthesis and the induction of biologic active mediators, as well as the expression of mRNA of bone-associated proteins. Hard tissue healing in an organoid culture system was evaluated by calcium incorporation and concentration of alkaline phosphatase. Matrix synthesis was determined by <sup>3</sup>H-prolin incorporation and the ultra structural morphology by electron microscopy.

The different protein fractions and the product Emdogain® were then used to examine the regeneration of periodontal tissues in experimental periodontitis by testing furcation defects degree III in a dog model. The amount of new formation of the periodontal tissues stimulated by EMP fractions was clinically, histomorphometrically and ultra structurally determined.

The cell culture studies showed that the proliferation, synthesis of collagen and growth factors was significantly enhanced when stimulated with different fractions of EMP. In particular, the stimulation with recombinant amelogenin as a single protein resulted in a reproducibly significant increase. The expression of specific mRNA was shown with all EMP tested. Thus, it was shown for the first time that the application of recombinant human amelogenin enhanced relevant functions in PDL cells and supported mechanisms involved in regenerative healing.

In the clinical part of the study the use of EMP especially the application of recombinant human amelogenin increased histologically the new formation of periodontal tissues in defects that were previously exposed to plaque accumulation. Although no membranes or volumetric fillers were used, significant amounts of new hard and soft tissue formation were shown coronally to notches that were made at the bases of the defects. The dimensions of the newly formed periodontal ligament and the width of the new cementum were identical to the physiological periodontium. The fractionated amelogenin-proteins prepared by anionic columns showed a similar amount of newly formed attachment. The treatments with other EMP fractions resulted in lower amounts of regenerative

healing, respectively less formation of new bone or new cementum. The electron microscopic analyses confirmed the regenerative healing of the periodontium when stimulated with the amelogenin proteins. The new formation of collagen fibres inserting into newly formed mineralised tissue was ultra structurally revealed.

In conclusion, it was shown for the first time that amelogenin especially recombinant human amelogenin as a single protein determines the effects of EMP on periodontal cells. Recombinant amelogenin was effective in stimulating periodontal regeneration on a root surface that has been previously exposed to plaque accumulation. This study lays down the biological and clinical bases for the regeneration of periodontal tissues by amelogenin. It supports the clinical use of recombinant human amelogenin to biologically promote the healing of periodontal defects.