Aus dem Zentrum für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde
Abteilung Parodontologie und Synoptische Zahnheilkunde
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Zellbiologischer Einfluss von Schmelzmatrixproteinen auf die Expression von antimikrobiellen Peptiden und Zytokinen in humanen Epithelzellen (HaCaT)

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Erik Schwarz

aus Berlin

Datum der Promotion: 09.12.2016

Inhaltsverzeichnis

		Seite
1	**Abkürzungsverzeichnis und Tabellen**	**4**
2	**Abstrakt (deutsch, englisch)**	**7**
3	**Einleitung**	**9**
4	**Literaturübersicht**	**11**
4.1	Parodont	11
4.1.1	Anatomie und Physiologie des Parodonts	11
4.1.2	Parodontitis	12
4.1.3	Parodontale Regeneration	13
4.2	Regenerative Parodontaltherapie	15
4.2.1	Einleitung	15
4.2.2	Bestandteile von Schmelzmatrixprotein	17
4.2.3	Zellbiologischer Einfluss von Schmelzmatrixprotein	18
4.2.3.1	In-Vitro-Studien	19
4.2.3.2	In-Vivo-Studien	20
4.3	Antimikrobielle Peptide (AMP's)	23
4.3.1	Cathelicidin LL-37	24
4.3.2	Humane Beta-Defensine: Aufbau und Wirkungsmechanismus	25
4.3.2.1	Humanes Beta-Defensin 1 (hBD-1)	26
4.3.2.2	Humanes Beta-Defensin 2 (hBD-2)	27
4.3.2.3	Humanes Beta-Defensin 3 (hBD-3)	28
5	**Fragestellungen und Ziele der Arbeit**	**30**
6	**Material und Methoden**	**31**
6.1.1	Zellkultivierung	31
6.1.2	Stimulation der Zellen	31

6.1.3 RNA-Isolation und Reverse -Transkriptase - Polymerasekettenreaktion (RT- PCR) 32

6.2.1 Reverse Transkription 32

6.2.2 Real –Time – PCR 33

6.3 Gewinnung der Standardkurven 34

6.4 Bestimmung der quantitativen Genexpression 35

6.5 Quantitative Bestimmung des House-Keeping-Gens 36

6.6 Statistische Auswertung 37

7 Ergebnisse 38

7.1 hBD-1 Genexpression 38

7.2 hBD-2 Genexpression 39

7.3 hBD-3 Genexpression 40

7.4 Cathelicidin LL-37 Genexpression 40

7.5 Interleukin-1β Genexpression 40

7.6 Interleukin-6 Genexpression 41

8 Diskussion 43

8.1 Diskussion der Methodik 43

8.2 Diskussion der Ergebnisse 44

9 Schlussfolgerungen 48

10 Literaturverzeichnis 49

11 Anhang 58

11.1 Danksagung 58

11.2 Eidesstattliche Erklärung 59

11.3 Lebenslauf 60

1 Abkürzungsverzeichnis

A.	*Aggregatibacter*
Abb.	Abbildung
AcNo	Identifikationsnummer der DNA-Sequenzen
AMP's	Antimikrobielle Peptide
° C	Grad Celsius
Ca^{2+}	Calcium
CCR-6	Chemokinrezeptor 6
CD4+	cluster of differentiation 4 Rezeptor
CD14+	cluster of differentiation 14 Rezeptor
cDNA	**c**opy desoxyribonukleinacid, Kopie Desribonukleinsäure
cm^2	Quadratzentimeter
CO2	Kohlenstoffdioxid
CYS	Cystein
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	desribonukleinacid, Desribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
EGF-Rezeptor	Epidermal Growth Factor Receptor
EMD®	enamel matrix derivative, Schmelzmatrixprotein
ERK	Extrazellulär regulierte Kinase, Enzym
F.	Fusobacterium
FCS	Fetal calf serum, fetales Kälberserum
g	Gramm
GAP-DH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase

GTR	guided tissue regeneration, gesteuerte Geweberegeneration
h	Hour, Stunde
HaCaT	human adult low calcium high temperature kreatinocytes, humane Keratinozytenzelllinie
hBD-1,2,3	humane Beta-Defensine 1, 2, 3
HNP's	Human neutrophil peptides
IL-1β	Interleukin 1β
IL-6	Interleukin 6
kDA	Kilodalton
LPS	Lipopolysaccharid
Lsg	Lösung
Mg^{2+}	Magnesium
min	Minute
ml	Milliliter
N2	Stickstoff
Na+	Natrium
NAD+	Nikotinamidadenindinukleotid
NADH	Nikotinamidadenindinukleotid-Dehydrogenase
nm	Nanometer
nM	Nanomol
NK's	Natürliche Killerzellen, Lymphozyten
O2	Molekularer Sauerstoff
P.	Prevotellla
p38	mitogenaktivierte Proteinkinasen
PBS	phosphate buffered saline, Phosphatgepufferte Salzlösung
RNA	ribonucleic acid, Ribonukleinsäure
rpm	Revolutions per minute, Umdrehungen pro Minute
RT-PCR	Reverse-Transkriptase Polymerasekettenreaktion

St.	Streptococcus
Taq	Thermus aquaticus
TAP's	tracheal antimicrobielle Peptide
TLR-1, 2	Toll-like-Rezeptor-1, -2
TNF-α	Tumor Nekrose Faktor alpha
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromol

Abbildungen und Tabellen

Abb. 1 Schematische Darstellung Lage des Saumepithels

Abb. 2 Lichtmikroskopische Darstellung**,** HaCaT-Zellen 2 Tage nach Zellpassagierung

Abb. 3 Standardkurve für LL-37 (beispielhaft)

Abb. 4 Direkte quantitative Auswertung im Programm Rotorgene

Abb. 5 HBD-1 Genexpression

Abb. 6 HBD-2 Genexpression

Abb. 7 IL-1β Genexpression

Abb. 8 IL-6 Genexpression

Tab. 1 Verwendete Primer mit entsprechenden Sequenzen

2 Abstrakt

Einleitung und Fragestellung

Epithelien nehmen in der Mundhöhle als physikochemische Barrieren gegenüber einer Vielzahl von Noxen eine zentrale Stellung in der immunologischen Abwehr ein. Schmelzmatrixproteinderivate (EMD) haben einen positiven Effekt auf parodontale Wundheilungsvorgänge. Die antibakteriellen Eigenschaften von antimikrobiellen Peptiden (AMP's) sowie ihre potentielle Rolle in der Wundheilung sind in der Literatur beschrieben. Jedoch ist unklar, welchen Einfluss Schmelzmatrixproteine auf die lokale Genexpression humaner Beta-Defensine in Epithelzellen haben.

Zielsetzung

Die vorliegende Arbeit untersucht den Einfluss von EMD auf die Genexpression von antimikrobiellen Peptiden und proinflammatorischen Zytokinen in humanen Keratinozyten (HaCaT).

Material und Methoden

HaCaT-Zellen wurden jeweils für 1, 6, 12 und 24 h mit 100 µg/ml EMD stimuliert.
50 ng/ml TNF-α diente als positive Kontrolle. Nach Extraktion der RNA wurde die Genexpression von hBD-1, -2, -3, LL-37, IL-1β, IL-6 quantitativ mittels Real-time-PCR untersucht.

Ergebnisse

Die Ergebnisse zeigen eine statistisch signifikante Hemmung der hBD-1 Expression vor allem in späten Phasen der Stimulation nach 12 h ($p = 0{,}044$) und 24 h ($P = 0{,}048$) durch EMD im Vergleich zu unstimulierten Zellen (negative Kontrolle). Entsprechende Daten zeigen sich nach Stimulation mit TNF-α nach 12 h ($p = 0{,}044$) und 24 h ($p = 0{,}040$). EMD stimuliert statistisch signifikant ($p = 0{,}035$) nach 24 h die Genexpression von IL-1β. HBD-3 und LL-37 wurden nicht reguliert.

Schlussfolgerungen

Entgegen der bisherigen allgemeinen Datenlage, dass hBD-1 in Epithelzellen konstant exprimiert wird, konnte die vorliegende Studie erstmals zeigen, dass EMD die Expression von hBD-1 in HaCaT-Zellen reguliert.

2 Abstract

Introduction

Epithelial tissue lines the oral cavity and its primary functions are to protect from toxins, pathogens and physical destruction. Enamel matrix derivatives (EMD) have been used for periodontal regeneration. Antimicrobial peptides (AMP) are part of the innate immune response and play an important role in wound healing.

Objectives

The aim of the present study was to analyze the effect on AMPs expression in human keratinocytes (HaCaT cells) in presence of EMD.

Materials and methods

HaCaTs were cultured and stimulated with 100 µg/ml EMD an 50 ng/ml TNF-α for 1, 6, 12 and 24 h. Total RNA was extracted and analyzed by real-time RT-PCR for human beta-defensins-1, -2, -3, cathelicidin LL-37 and interleukins IL-1β- and IL-6.

Results

Treatment with EMD caused a significant inhibition of hBD-1 mRNA expression compared to no treatment in HaCaT keratinocytes after 12 h ($p = 0,044$) and 24 h ($p = 0,048$). Simultaneous treatment with TNF-α caused a significant inhibition of hBD-1 mRNA compared to no treatment in HaCaT keratinocytes after 12 h ($p = 0,044$) and 24 h ($p = 0,040$). IL-β was significantly upregulated after 24 h ($p = 0,035$) by stimulating with EMD compared to no treatment in HaCaT keratinocytes. LL-37 was not expressed after stimulation with EMD or TNF-α or no treatment at any time-point measured.

Conclusion

The present study shows a significant inhibition of hBD-1 gene expression in HaCaT kreatinocytes following treatment with EMD.

3 Einleitung

Parodontitis ist eine bakteriell verursachte, entzündliche Erkrankung des Parodonts. Aktuelle Studien zeigen, dass die Prävalenz der schweren Parodontitis in Deutschland leicht abnimmt, jedoch ist sie im Vergleich zu anderen Industrienationen wie den USA oder Japan noch immer hoch (Schützhold et al. 2015; Holtfreter et al. 2009; Hirotomi et al. 2014). So litten laut der 4. Deutschen Mundgesundheitsstudie (DMS IV) im Jahr 2006 insgesamt 73 % der 35-44 Jährigen und 88 % der 65-74 Jährigen an einer Parodontitis. Der mit zunehmendem Alter verbundene Anstieg systemischer Erkrankungen erhöht auch das Risiko an einer Parodontitis zu erkranken, da besonders chronisch entzündliche Erkrankungen wie beispielsweise metabolische, kardiovaskuläre oder entzündlich rheumatische Erkrankungen mit einer Parodontitis assoziiert sind (Pischon et al. 2007; Desvarieux et al. 2010; Boillot et al. 2015; Detert et al. 2010; Silvestre-Rangil et al. 2016).

Die Therapie der Parodontitis umfasst die mechanische Reduktion des parodontalen Biofilms auf der Wurzeloberfläche um ein immunologisches Gleichgewicht zwischen bakteriellem Angriff und Wirtsimmunität einzustellen. Die parodontale Regeneration dient darüber hinaus der Wiederherstellung aller Strukturen des Parodonts, d.h. Desmodont, Alveolarknochen, Wurzelzement und Gingiva (Caton 1997). Je nach knöchernem Defekt des Parodonts stehen dafür verschiedene Therapieansätze zur Wahl. Neben chirurgischen Techniken wie der gesteuerten Geweberegeneration (GTR), finden Knochenersatzmaterialien und Schmelzmatrixproteine (SMP) sowie eine Kombination aus beidem Anwendung.

Schmelzmatrixproteine werden während der Zahnentwicklung von der Hertwig'schen Epithelscheide sezerniert und spielen eine bedeutende Rolle bei der Zementogenese, durch Steuerung und Stimulation der PDL-Zellen, und der Bildung mineralisierter Strukturen, dem Alveolarknochen und des Wurzelzements (Hammarström 1997b). Emdogain® (Biora, AB, Malmö, Schweden) ist das Produkt eines Schmelzmatrixproteins (SMP), welches seit 1997 zur Behandlung intraossärer, parodontaler Defekte eingesetzt wird. Es wirkt als Stimulanz der Geweberegeneration indem es Vorgänge während der Zementogenese imitiert (Rathva 2011). Der positive Effekt von SMP auf die Geweberegeneration ist in in-vitro und in-vivo Studien belegt (Lyngstadaas et al. 2001; Bertl et al. 2009). Epithelzellen zeigen in Anwesenheit von Schmelzmatrixporteinen eine vermehrte Proliferation (Rincon et al. 2005). Desweiteren beschleunigt SMP die epitheliale Wundheilung aufgrund seiner antibakteriellen, anti-

apoptotischen und anti-inflammatorischen Eigenschaften (Lafzi et al. 2011). Außerdem konnte nachgewiesen werden, dass SMP die Proliferation und Zelldifferenzierung von mesenchymalen Zellen wie Osteoblasten und Fibroblasten stimuliert (Pischon et al. 2006; Zeldich et al. 2007).

In den 1980er Jahren wurden erstmals körpereigene, antimikrobiell wirksame Proteine, die antimikrobiellen Peptide (AMP'S), entdeckt, welche gegen eine Vielzahl von bakteriellen Pathogenen wirksam sind (Steiner et al. 1981). Eine besondere Rolle dabei nehmen die humanen Beta-Defensine (hBD's) ein, die in verschiedenen Epithelien des Körpers, wie in der Trachea, im Urogenitaltrakt und der äußeren Haut nachgewiesen wurden. Die Funktion und Wirkungsweise der AMP's wurde bereits in verschiedenen Zelltypen wie Keratinozyten, Endothelzellen und Osteoblasten untersucht (Niyonsaba et al. 2002; Kawsar et al. 2010; Varoga et al. 2009). Sie sind Teil der initialen Immunantwort und haben darüber hinaus Einfluss auf die epitheliale Wundheilung indem sie die Migration und Proliferation von Keratinozyten stimulieren (Niyonsaba et al. 2007). Studien belegen, dass antimikrobielle Peptide einen regulatorischen Einfluss auf Entzündungsmediatoren wie Interleukine und Wachstumsfaktoren haben (Grayson et al. 2006). Zudem wirken humane Beta-Defensine antimikrobiell gegen parodontal pathogene Keime wie *P. intermedia, P. gingivalis, T. forsythia, F. nucleatum* und *A. actinomycetemcomitans* (Gursoy und Könönen 2012). Humane Beta-Defensine -1, -2 und -3 werden auch im gingivalen Epithel exprimiert (Gursoy und Könönen 2012). Es wurden signifikante Unterschiede bei der Exprimierung der hBD‘s in entzündlich veränderter Gingiva beschrieben (Dommisch et al. 2015; Dommisch et al. 2005b; Wang et al. 2015).

In der parodontalen Regeneration nehmen Epithelien als physikochemische Barriere eine besondere Schutzfunktion ein. Mit der Destruktion des Saumepithels beginnen parodontal pathologische Prozesse. Bisher konnte nachgewiesen werden, dass SMP‘s die parodontale Regeneration positiv beeinflussen. Zudem wird angenommen, dass antimikrobielle Peptide eine Rolle in der Wundheilung spielen. Jedoch gibt es keine Studien, die aufzeigen wie sich im Rahmen der parodontalen Regeneration SMP‘s auf die lokale Expression antimikrobieller Peptide in Epithelzellen auswirken. Die vorliegende Arbeit befasst sich mit dem zellbiologischen Einfluss von SMP‘s auf die Expression antimikrobieller Peptide und proinflammatorischer Zytokine in humanen Epithelzellen (HaCaT).

4 Literaturübersicht

4.1 Parodont

4.1.1 Anatomie und Physiologie des Parodonts

Der Begriff Parodont/Periodont wird aus dem Griechischen abgeleitet, wobei para und peri für „neben“ und odontus für „Zahn“ stehen. Es kann folglich „das den Zahn umgebende Gewebe“ abgeleitet werden.

Zum Parodont werden der Alveolarfortsatzknochen, das Desmodont, das Wurzelzement und die Gingiva gezählt. Die Funktionen des Parodonts sind eine feste Verankerung des Zahnes im Knochen, eine Sicherstellung der Eigenbeweglichkeit des Zahnes in der Alveole zur Dämpfung der mechanisch einwirkenden Kräfte und vor allem eine immunologische Barrierefunktion in der Mundhöhle gegenüber verschiedenen Noxen. Eine besondere Stellung nehmen dabei Epithelien, besonders das Saumepithel, als physikochemische Barriere ein.

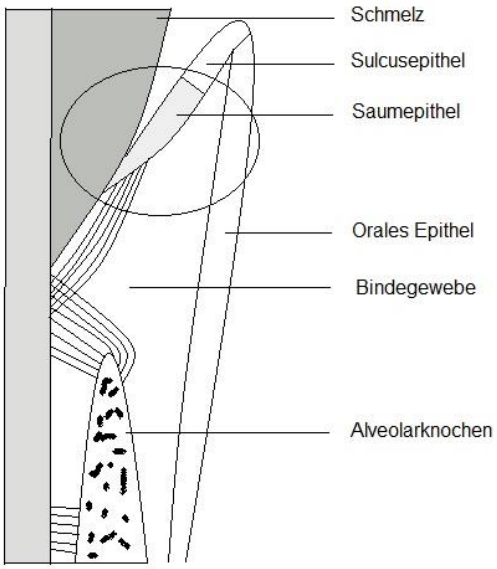

Abb. 1 Schematische Darstellung Lage des Saumepithels

4.1.2 Parodontitis

Die Parodontitis ist eine immuninflammatorische Erkrankung des Zahnhalteapparates, hauptsächlich verursacht durch gram-negative anaerobe Bakterien.

Die Erkrankung beginnt stets mit einer Gingivitis. Diese ist durch entsprechende Mundhygienemaßnahmen des Patienten reversibel. Bei einem Fortschreiten der Gingivitis kommt es zu einer Ausbreitung der Entzündung auf weitere parodontale Strukturen. Gewebedestruktionen des umliegenden Hart- und Weichgewebes sind die Folgen, welche irreversible Schäden darstellen. Zeichen einer manifesten Parodontitis sind gingivale Erytheme und Ödeme, Blutungen durch Sondieren mittels Parodontalsonde, Rezessionen, vermehrte Sulkusflüssigkeit, erhöhte Zahnmobilität und Zahnwanderung (Preshaw et al. 2012).

Schließlich kann durch den inflammatorisch bedingten Attachmentverlust Zahnverlust die Folge sein (Trindade et al. 2014). Nikotin- und Alkoholabusus sowie immunsuprimierende Erkrankungen wie Diabetes (Typ I und II) sind Hauptrisikofaktoren und begünstigen die Entstehung parodontaler Erkrankungen (Deschner et al. 2014; Preshaw et al. 2012).

Zur Destruktion des parodontalen Gewebes kommt es über drei Wege (Tatakis und Kumar 2005). Die Pathogene sezernieren selbst proteolytische Enzyme, die direkt parodontale Strukturen zerstören. Die abgegebenen Enzyme und Toxine der Pathogenen stimulieren in den betroffenen Zellen selbst degenerative Enzyme. Zudem wird durch pathogene Bakterien selbst eine Immunantwort stimuliert, es kommt zur Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine, die eine Gewebsdestruktion bewirken.

Zu den besonders parodontal pathogenen Keimen gehören die anaeroben Bakterien *P. gingivalis, T. denticola und T. forsythia*. Neueste Modelle gehen nicht mehr von einer Destruktion durch individuelle Keime aus, sondern von einem Synergismus der parodontalpathogenen Keime mit anderen Mikroorganismen aus, welche ein Ungleichgewicht des parodontalen Biofilms zur Folge hat (Hajishengallis 2015). Eine symbiotisch mikrobielle Flora gerät in eine „Dysbiose“, in der Anaerobier dominieren. Für eine Homöostase sind immunologische Prozesse im Parodont verantwortlich. Gerät diese Homöstase aus dem Gleichgewicht kommt es zu einem Prozess indem sich Entzündung und Ausbreitung der Pathogene gegenseitig verstärken. Beispielsweise können *P. gingivalis, T. denticola* und *T. forsythia* das Komplementsystem blockieren (Popadiak et al. 2007; Potempa et al. 2009). *P. gingivalis* kann die Funktion der Neutrophilen manipulieren, sodass diese eine Destruktion von parodontalem Gewebe

bewirken. (Hajishengallis 2015). *T. denticola* inhibiert die Produktion humaner ß-Defensine in gingivalem Epithel (Shin et al. 2013).

Eine in Europa verbreitete Klassifikation der Parodontitis ist die Klassifikation nach Armitage (Armitage 2000). Hier unterscheidet man in chronische und aggressive sowie lokale und generalisierte Parodontitiden.

I Gingivopathien

II Chronische Parodontitis (lokalisiert, generalisiert)

III Aggressive Parodontitis (lokalisiert, generalisiert)

IV Parodontitis als Manifestation systemischer Erkrankungen

V Nekrotisierende Parodontalerkrankungen

VI Abszesse des Parodonts

VII Parodontitis im Zusammenhang mit endodontalen Läsionen

VIII Entwicklungsbedingte oder erworbene Deformitäten oder Zustände

4.1.3 Parodontale Regeneration

Regeneration, auch „restitutio ad integrum“ bedeutet Neubildung des Vorhandenen. Eine parodontale Regeneration meint eine Gewebeneubildung, welches dem verlorengegangen Gewebe in Form und Funktion entspricht. Das bedeutet eine Neubildung von Alveolarknochen, Wurzelzement und dem parodontalen Ligament. Im Gegensatz dazu bedeutet Reparation der Ersatz verlorengegangener Strukturen durch beispielsweise Narbengewebe. Um eine Regeneration der betroffenen Gewebe zu erreichen, sollte eine Proliferation des Saumepithels nach apikal vermieden werden. Ein sogenanntes „langes Saumepithel“ führt lediglich zu einer reparativen Heilung und fungiert dann als Ersatzgewebe. Im Gegensatz zu einem physiologischen Saumepithel, scheint ein „langes Saumepithel“ eine geringere Zellproliferationsrate aufzuweisen (Uno et al. 1998).

Epithelien nehmen in der parodontalen Regeneration eine zentrale Stellung ein. Sie bieten Schutz gegen externe Noxen indem sie als physikalische oder chemische

Barriere fungieren. Sie kleiden dabei alle Körperoberflächen und Höhlen aus und regulieren die Homöostase des Körpers über Resorptions- und Sekretionsvorgänge (Coraux et al. 2005).
Das Saumepithel ist der Zahnoberfläche direkt anliegend, bildet den Epithelansatz und hat eine spezielle Schutzfunktion gegenüber parodontalen Pathogenen. Die Veränderung des Saumepithels in Form von Läsionen ist Teil der parodontalen Läsion.

Die Wundheilung der entstandenen Läsionen ist die Voraussetzung der parodontalen Regeneration wird grundsätzlich in drei Phasen unterteilt (Schreml et al. 2010).

- Phase der Entzündung

  Während der inflammatorischen Phase kommt es zur Stabilisierung eines Blutkoagulums mit anschließendem Abbau von Fibrin. Es migirieren Epithelzellen in den Defekt.

- Phase der Proliferation

  Es kommt zur Bildung einer temporären Matrix durch Zellproliferation, Neuvaskularisierung, Zellorganisation und Wundkontraktion. Es bildet sich ein Granulationsgewebe und es kommt zur Fibrinolyse.

- Phase der Maturation

  In der dritten Phase findet eine vermehrte Kollagensynthese und Geweberemodelling statt.

Die parodontale Heilung nimmt eine besondere Stellung ein, da sowohl Weichgewebe (Gingiva, parodontales Ligament) als auch Hartgewebe (Alveolarknochen, Wurzelzement) in komplexer Abstimmung gleichzeitig regenerieren. Verschiedene Zellen und Botenstoffe müssen bei der Zellmigration, Adhäsion, Proliferation und

Differenzierung koordiniert werden. Die Selektion der Zellen entscheidet weitgehend welche Art von Heilung resultiert, Regeneration oder Reparation (Sculean et al. 2015a; Taba et al. 2005).

4.2 Regenerative Parodontaltherapie

4.2.1 Einleitung

Das primäre Ziel der Parodontaltherapie ist die Kontrolle der bakteriellen Infektion um die Progression des Attachementverlustes aufzuhalten. Dies geschieht zunächst mittels individueller bzw. professioneller mechanischer Biofilmentfernung. Nach der Kausaltherapie wird eine Regeneration des Alveolarknochens, des parodontalen Ligaments, des Wurzelzements und des Weichgewebes angestrebt. Zur Anwendung in der parodontalen Regeneration kommen:

- Knochenersatzmaterialen
- Gesteuerte Geweberegeneration (GTR)
- Schmelzmatrixproteine (SMP‘s, Emdogain®, Firma Straumann)

Um die, neben den Weichgewebsdefekten, entstandenen, knöchernen, parodontalen Defekte zu regenerieren, können verschiedene Knochen(-ersatz-)materialen zum Einsatz kommen. Man unterscheidet dabei 4 Gruppen. Bei autogenem Knochen handelt es sich um Eigenknochen des Patienten, intraoral (z.B. Tuberregion) oder extraoral (z.B. Beckenkamm) entnommen. Allogener Knochen ist Material derselben Spezies (z.B. humane Präparate wie DFDBA, demineralized freeze-dried bone allografts, demineralisiertes, gefriergetrocknetes allogenes Knochenersatzmaterial). Xenogenes Knochenersatzmaterial, Material einer anderen Spezies, stammt meist von Rindern oder Schweinen. Zuletzt kommt auch synthetisches/alloplastisches Knochenersatzmaterial zum Einsatz (Benic und Hämmerle 2014). Nach neuesten Auswertungen, kommt man zur Annahme, dass die Chance auf eine komplette parodontale Regeneration bei autogenem Knochen am größten ist, gefolgt von allogenen Materialen. Dagegen scheint es bei xenogenen Ersatzmaterialien nur zu einer partiellen parodontalen Regeneration zu kommen (Sculean et al. 2015b).

Eine weitere, in der parodontalen Heilung eingesetzte Methode ist die gesteuerte Geweberegeneration (GTR). Mittels Membrantechnik werden die Anteile des Parodonts gezielt voneinander getrennt, um eine Einwanderung des schneller proliferierenden Epithels in den knöchernen Defekt und damit die Bildung des Saumepithels nach apikal zu verhindern. Außerdem wird so ein Hohlraum für das Koagulum und die Gewebeheilung während der parodontalen Wundheilung geschaffen. Verwendete Materialien können nicht resorbierbar/synthetisch (z.B. Polytetrafluorethylen) oder resorbierbar/natürlich/synthetisch sein (z.B. Kollagen, Polyglactin), wobei alle nichtresorbierbaren Materialien in einem späteren Zweiteingriff entfernt werden müssen. Meist kommen resorbierbare Membranen aus Kollagen, vom z.B. Schwein, zum Einsatz. Die ideale Membran sollte osteoinduktiv sein und eine eigene Resorptionsrate haben, die der Formationsrate des neuen Knochens entspricht (Bartold et al. 2015).

Die dritte unterstützende, regenerative Methode ist das Einbringen von Schmelzmatrixproteinen. Seit 1997 kann ein Schmelzmatrixproteinderivat, Emdogain® (Straumann, EMD) kommerziell erworben werden, welches einer Hitzebehandlung im Herstellungsprozess unterzogen wurde. Schmelzmatrixproteine wirken als Initiator der Zementogenese, fördern die Bildung von Wurzeldentin und induzieren die Differenzierung der vorhandenen Zellen zu Zementoblasten im Zahnfollikel (Hammarström 1997a).

Hauptbestandteil des Schmelzmatrixprotenderivates ist das Amelogenin, welches von den Ameloblasten sezerniert wird und anschließend die Schmelzbildung fördert. Es wurde beschrieben, dass Amelogenin isoliert eine ähnliche Wirkung hat wie EMD mit allen Fraktionen, nämlich eine Stimulation der Proliferation und Differenzierung von PDL-Zellen (Lyngstadaas, Wohlfahrt et al. 2009). PDL-Zellen sind für die Bildung und Regeneration von Gewebe eines physiologischen Zahnhalteapparates von signifikanter Bedeutung. Sie sind an der Zementogenese beteiligt (Arceo et al. 1991) und produzieren Proteine (z.B. Osteonectin), welche an der Osteogenese mitwirken (Jönsson et al. 2011).

4.2.2. Bestandteile von Schmelzmatrixprotein

Die Zusammensetzung von Schmelzmatrixprotein ist eine Komposition aus verschiedenen Fraktionen. Schmelzmatrixproteine bestehen dabei zum größten Teil aus Amelogenin (90 %), ein hydophobes Protein. Der andere Teil (10 %) setzt sich aus Enamelin, Tuftelin, Amelotin, Ameloblastin (oder Amelin) und verschiedenen Serumproteinen zusammen (Hammarström 1997a).

Amelogenin ist der dominante Proteinkomplex des Schmelzmatrixproteins und spielt in der Schmelzreifung eine bedeutende Rolle. Amelogenine bestehen aus verschiedenen hydrophoben Peptiden, die sich aus Aminosäuren wie Prolin, Leucin, Glutamin und Histidin zusammensetzen (Brookes et al. 1995). Zahnschmelz ist die härteste Substanz des Körpers. Während seiner Bildung scheiden spezielle Epithelzellen, die Ameloblasten, eine Matrix aus. Von dem organischen Teil bestehen 90 % aus Amelogenin, welche vermutlich das Wachstum der Hydroxylapatitkristalle steuern (Termine et al. 1980). Während der sekretorischen Phase wird das Enamelysin direkt von Ameloblasten und Odontoblasten in die Schmelzmatrix abgegeben. Dieses Enzym spaltet vom hydrophilen Amelogenin das carboxy-terminale Segment ab und reduziert damit die Affinität des Amelogenins zu den Hydroxylappatitkristallen (Fukae et al. 1998). Es hat seine optimale Funktion bei neutralem pH-Wert. Anschließend, während der Reifungsphase, ist Kallikrein-4 das dominante Enzym. Kallikrein-4 baut das Amelogenin proteolytisch ab, damit es anschließend leichter aus der Matrix wieder entfernt werden kann (Brookes et al. 1995). Fehler in der Interaktion mit Enamelin können Deformationen im Schmelz zur Folge haben, ein Beispiel hierfür ist die x-chromosomale Amelogenesis imperfecta (Fan et al. 2011).
Amelogenin lässt sich neben der Zahnhartsubstanz zusätzlich im Gehirn und im hämatopoetischen System nachweisen (Deutsch et al. 2006). Einige Studien nehmen an, dass Amelogenin deshalb nicht nur während der Biomineralisation eine Rolle spielt, sondern auch als Signal-Molekül fungiert. Als Hauptbestandteil von EMD fördert es die Proliferation von PDL-Zellen (Zeichner-David et al. 2006).

Tuftelin, ein anionisches Protein, gehört zu den Nicht-Amelogeninen und wurde erstmals von Deutsch 1991 in sich entwickelndem, sowie im ausgereiften Schmelz beschrieben (Deutsch et al. 1991). Es wurde nachgewiesen, dass Tuftelin außerdem im Hoden, in der Nebenniere, in der Niere, in embryonalen Stammzellen, in den Neuronen

des Gehirns und auch im kanzerogenen Weichgewebe exprimiert wird (Leiser et al. 2011), wobei in der Niere und im Hoden die mRNA Exprimierung signifikant höher ist, als in den anderen Geweben (Leiser et al. 2007). Es wird während der Zahnentwicklung bereits im Knospenstadium gebildet und spielt eine Rolle bei der Formation der Schmelzkristalle (Paine et al. 2000).

Enamelin (ca. 5 % des Schmelzmatrixproteins) ist das größte Matrixprotein mit einem Molekulargewicht von 32-kDa. In Interaktion mit Amelogenin steuert es das morphologische Wachstum in der Kristallstruktur während der Biomineralisation (Fan et al. 2011). Ein fehlerhaft kodiertes Gen dieses Proteins kann ebenso wie beim Amelogenin zu einer Fehlbildung des Schmelzes führen (Fan et al. 2011; Kida et al. 2002). Enamelin ist im Gegensatz zum hydrophoben Amelogenin hydrophil. Beide Proteine sind an den Tomes'schen Fasern der Ameloblasten lokalisiert (Gallon et al. 2013).

Ameloblastin (auch Amelin oder Sheathlin) scheint für die Schmelzbildung von besonderer Bedeutung zu sein. Es findet sich während der sekretorischen Phase in den Tomes`schen Fasern der Ameloblasten in den gebildeten Schmelzstäben und in den Zwischenräumen und kann somit eine Funktion in der Biomineralisation des Schmelzes haben. Das kodierende Gen für Ameloblastin befindet sich in der gleichen Region, die mit der autosomal-dominant vererbten Amelogenesis imperfecta in Verbindung gebracht wird. Hieraus lässt sich ableiten, dass Ameloblastin während des Schmelzreifungsprozesses auch in Verbindung mit Zahnfehlbildungen steht (Cerný et al. 1996).
Ameloblastin tritt auch in anderen Geweben wie Osteoblasten, Zementoblasten und PDL-Zellen auf und beeinflusst deren Metabolismus (Zhang et al. 2011).

4.2.3 Zellbiologischer Einfluss des Schmelzmatrixproteinderivates (EMD)

EMD fördert die parodontale Regeneration. Das wurde sowohl in *in-vivo*, als auch in *in-vitro*-Studien nachgewiesen. Das Interesse am parodontal-regenerativen Potential von EMD wurde zunächst durch die Studien von Hammarström begründet (Hammarström et al. 1997).

4.2.3.1 *In-Vivo*-Studien

Klinisch-humane Studien

Zahlreiche, klinische In-vivo-Studien unterstützen den positiven Effekt von EMD bei der parodontalen Wundheilung.

Ein aktueller Review von Sculean gibt einen Überblick über Anwendungen von EMD in der Heilung bei intraossären, parodontalen Defekten (Sculean et al. 2015b). Dabei wurde nach der EMD-Behandlung eine signifikante Bildung neuen Zements, neuen Knochens und eines langen Saumepithels festgestellt. Außerdem wurden histologische Veränderungen hinsichtlich der Formation zellulären Zements, Knochens und parodontalen Ligaments festgehalten. Die Ergebnisse wurden 6-9 Monate nach der EMD-Behandlung erhoben und in verschiedene Typen der Wundheilung (regenerativ, reparativ, Bildung eines langen Saumepithels) eingeteilt. Insgesamt kam es in 45 % der Fälle zu einer partiellen parodontalen Regeneration nach Behandlung mit EMD. Die durchschnittliche Neubildung von Zement lag bei 1,3 mm und von Alveolarknochen bei 0,6 mm. Keine Studie zeigt eine vollständige Heilung des Defektes. In einer Studie kam es nur zur Bildung eines langen Saumepithels nach EMD-Behandlung (Parodi et al. 2000).

Ein Review untersuchte klinische Studien zur Behandlung gingivaler Dehiszenzen (Miller Klasse I und II) mit dem koronalen Verschiebelappen mit und ohne unterstützende Behandlung mit EMD. Dabei konnte gezeigt werden, dass die zusätzliche Applikation von EMD zu einer signifikant höheren Formation von keratinisiertem Gewebe führte als die alleinige Behandlung mit einem koronalen Verschiebelappen. Nach 2 jähriger Reevaluation waren 53 % der zusätzlich mit EMD behandelten Dehiszenzen noch vollständig gedeckt, in der Kontrollgruppe waren es 23 % (Hägewald et al. 2002; Cueva et al. 2004; Spahr et al. 2005).

Eine Studie untersuchte die Wundheilung in Gingivabiopsien nach Applikation von EMD während einer parodontalen Lappenoperation. EMD beschleunigte die Wundheilung aufgrund seiner antibakteriellen, anti-apoptotischen und anti-inflammatorischen Eigenschaften (Lafzi et al. 2011).

4.2.3.1.2 Experimentelle Studien

Viele experimentelle Studien belegen das regenerative Potential von EMD.

Die Bildung von neuem Bindegewebe und die Anzahl von Kollagenfasern sowie die frühe Bildung neuer Muskelzellen ist unter Einfluss von EMD in vivo signifikant erhöht (Al-Hezaimi et al. 2012).

Am Mausmodell konnte in-vivo nach intravenöser Gabe von EMD ein stimulierender Effekt auf die Angiogenese nachgewiesen werden (Thoma et al. 2011).

Auch nach Gabe von EMD in die Chorioallantoismembran (CAM – Membran) des Hühnereis kam es zu einer vermehrten Neuvaskularisation (Kauvar et al. 2010).

EMD hat Einfluss auf die Odontoklastentätigkeit in-vivo und damit auch auf die Wurzelresorption (Yagi et al. 2009). In dieser Studie wurden erste Molaren von Ratten extrahiert und die Wurzeloberfläche vor Replantation mit EMD behandelt. Nach einer Woche wurden die Zähne der getöteten Tiere nach Odontoklastenzahl, Fläche der Odontoklasten pro Wurzeloberfläche und resorbiertem Dentin histologisch untersucht. Die EMD-behandelten Flächen wiesen eine deutlich geringe Zahl an Odontoklasten aus sowie eine verminderte Wurzelresorption an den Odontoklastenoberflächen.

Am Hunde-Modell wurden künstlich geschaffene parodontale Defekte an den Wurzeloberflächen mit EMD oder Orthophosphorsäure (36%) behandelt. Nach 7,14,21 und 28 Tagen fand eine histologische Untersuchung der Hart- und Weichgewebe statt. Dabei war die Anzahl an neugebildetem Zement in der EMD-Gruppe signifikant erhöht (Sakallioğlu et al. 2004).

4.2.3.2 *In-Vitro*-Studien

PDL-Zellen, Endothelien, Osteoblasten, Fibroblasten

Zahlreiche *in-vitro*-Studien untersuchen den Einfluss von EMD Parodontale Ligamentzellen (PDL-Zellen) hinsichtlich regenerativer Prozesse wie Proliferation und Differenzierung. Eine Vielzahl von Autoren beschreibt hier die stimulierende Zellwirkung des EMD.

Gestrelius beschäftigte sich als einer der Ersten mit dem Einfluss von EMD auf PDL-Zellen (Gestrelius et al. 1997). Es konnte nachgewiesen werden, dass EMD einen positiven Einfluss auf die Proliferation sowie die Protein- und Kollagensynthese hat.

EMD erhöhte die Migration von PDL-Zellen und gingivalen Fibroblasten (GF), was auf eine verbesserte Wundheilung im Zellkulturmodell hindeutet (Hoang et al. 2000).
Eine Studie von Nokhbehsaim et al. untersuchte den Einfluss von EMD im Zellkulturmodell auf die Expression von IL-1β, IL-6, IL-8 und COX-2 in PDL-Zellen (Nokhbehsaim et al. 2012). Einen Tag nach Stimulation mit EMD war die Genexpression von IL-1β und COX-2 signifikant vermindert. IL-8 hingegen wurde signifikant stärker exprimiert. Nach 6 Tagen allerdings hatte EMD einen inhibtorischen Effekt auf die Genexpression, sodass IL-6, IL-8 und COX-2 signifikant vermindert waren und IL-1β nicht reguliert wurde.
Weiterhin konnte im Zellkulturmodell mit PDL-Zellen der Einfluss von EMD auf die Expression einer Vielzahl von Zytokinen und Wachstumsfaktoren nachgewiesen werden (Parkar und Tonetti 2004). Von 268 getesteten Genen wurden 125 von PDL-Zellen exprimiert. EMD hemmte, unter anderem, antientzündliche Gene wie IL-4 und IL-13. Darüber hinaus förderte EMD auch gewebe- und knochenstimulierende Gene wie TGF-ß, BMP-1, BMP-4 und CTGF. Außerdem war die endogene TGF-ß Produktion von PDL-Zellen durch eine EMD-Stimulation, insbesondere durch die EMD-Fraktion Amelogenin, erhöht (Grayson et al. 2006). Unsere Arbeitsgruppe untersuchte den Einfluss von EMD auf die CTGF Expression. Eine signifikant erhöhte Genexpression von CTGF wurde sowohl nach 6 als auch nach 12 Stunden gemessen (Heng et al. 2007).

Unter EMD-Einfluss konnte eine signifikante Erhöhung der COX-2 mRNA Expression in PDL-Zellen bei verschiedenen EMD-Konzentrationen (50 µg/ml und 100 µg/ml) nachgewiesen werden. Interessanterweise wurde eine mRNA Inhibition von RANKL bei allen EMD-Konzentrationen (5, 25, 50, 100 µg/ml) festgestellt, was einen regenerativen Prozess durch EMD, hinsichtlich des Knochenstoffwechsels bei der Mineralisation unterstreicht (Takayanagi et al. 2006).
In einer Studie wurden PDL-Zellen auf Schmelzmatrixproteinen kultiviert und hinsichtlich zellulärer Attachmentrate, Proliferation, DNA-Replikation, c-AMP-Titer und autokriner Produktion von bestimmten Wachstumsfaktoren untersucht. Bei Anwesenheit von EMD waren die PDL-Attachmentrate, Wachstum und Metabolismus signifikant erhöht. Ebenfalls konnte eine erhöhte autokrine Produktion von TGF-ß, IL-6 und PDGF-AB nachgewiesen werden. In der Kontrollgruppe wurden die Proliferation und das Wachstum von epithelialen Zellen gehemmt (Lyngstadaas et al. 2001).

Schmelzmatrixproteine wirken sich ab einer bestimmten Zeit und Konzentration hemmend auf die Proliferation auf PDL-Zellen in-vitro aus. So erhöhte sich die Proliferationsrate bei EMD Konzentrationen von 25 µg/ml und 50 µg/ml. Konzentrationen von 75 µg/ml und 100 µg/ml in Verbindung mit langen Inkubationszeiten (7-10 Tage) hemmen statistisch signifikant die Proliferation von PDL-Zellen (Davenport et al. 2003).
Des Weiteren stimulierte EMD in Abhängigkeit der extrazellulär regulierte Kinase (ERK) die Proliferation sowohl von gingivalen als auch von dermalen Fibroblasten (Zeldich et al. 2007). Weinberg et al. zeigte, dass EMD in der Lage ist, die über Prostaglandin E2 inhibierte Proliferation von gingivalen Fibroblasten zu unterbinden (Weinberg et al. 2010).
Außerdem konnten Pischon et al. nach Stimulation mit EMD die Förderung der Kollagensynthese in primären humanen Osteoblasten zeigen (Pischon et al. 2006). Eine weitere *in-vitro*-Studie untersuchte das Verhalten humaner Alveolarosteoblasten auf ihre Zellproliferation, ALP Aktivität, mRNA-Expression und das Attachment in An- und Abwesenheit von EMD in verschiedenen Konzentrationen (Jiang et al. 2011). EMD erhöht deutlich die Zellproliferation. Das deutet darauf hin, dass EMD förderlich auf die Wundheilung und Neubildung humaner Osteoblasten wirkt.

Für die Wundheilung spielen Endothelien eine wesentliche Rolle. Untersuchungen an HUVEC-Zellen (Endothelzellen der Umbilicalvene) und HMVEC-Zellen (humane mikrovaskuläre Endothelzellen) zeigen, dass EMD die Proliferation und Migration fördert (Kasaj et al. 2012). Allerdings kann der Effekt nur bei Konzentrationen von 20 µg/ml EMD erreicht werden. Dagegen kommt es bei höheren Konzentrationen (50-100 µg/ml) zu einem inhibitorischen Effekt (Schlueter et al. 2007; Bertl et al. 2009).
In Anwesenheit von EMD (0,1 µg/ml, 25 µg/ml, 50 µg/ml) konnte eine schnellere Wundheilung, d.h. Migration von HUVEC-Zellen, im Vergleich zur Kontrollgruppe nachgewiesen werden. Konzentrationen von 100 µg/ml EMD bewirkten jedoch eine Hemmung der Migration von HUVEC-Zellen. EMD scheint in bestimmten Konzentrationen einen positiven Effekt auf die Angiogenese zu haben (Bertl et al. 2009).

Epithelzellen

Viele Studien deuten darauf hin, dass EMD einen inhibitorischen Effekt auf die Zellproliferation von Epithelien hat (Kawase et al. 2000; Weinberg et al. 2010; Kawase et al. 2001). Dabei scheint TGF-ß der Mediator für diesen eher zytostatischen, nicht zytotoxischen, Effekt zu sein (Kawase et al. 2000; Kawase et al. 2002).

Ameloblastin, eine Fraktion des Schmelzmatrixproteins, welches in der sekretorischen Phase der Ameloblasten freigesetzt wird, hemmt isoliert den Zellzyklus in der G1-Phase von Epithelzellen und damit auch die Zellproliferation (Saito et al. 2014).

Epithelzellen des Mallasez'schen Epithels, ein Abkömmling der Hertwig'schen Epithelscheide, scheinen eine Ausnahme darzustellen. Sie zeigen in Anwesenheit von Schmelzmatrixporteinen eine vermehrte Proliferation (Rincon et al. 2005). Das könnte ein Hinweis darauf sein, dass diese Zellen eine Rolle in der parodontalen Regeneration spielen (Grandin et al. 2012).

4.3 Antimikrobielle Peptide

Antimikrobielle Peptide gehören zur angeborenen Immunantwort und mittlerweile wurden ca. 400 von Ihnen entdeckt. Studien beschäftigten sich anfangs mit der Frage wie sich bestimmte Organismen wirksam gegen Bakterien schützen, wenn sie keine T-Gedächtniszellen oder Antikörper, wie z.B. Insekten, besitzen (Yamaguchi und Ouchi 2012). Antimikrobielle Peptide wurden erstmals 1981 beschrieben (Steiner et al. 1981). Antimikrobiell wirksame Proteine konnten in Pflanzen, wirbellosen Lebensformen und Wirbeltieren sowie beim Menschen nachgewiesen werden (Semple und Dorin 2012). Die ersten beim Menschen entdeckten AMP's, die humanen neutrophilen Peptide (HNP) -1,-2 und -3 wurden den Defensinen zugeschrieben (Ganz et al. 1985), ebenso die, im Respirationstrakt nachgewiesenen, Trachea antimikrobiellen Peptide (TAP) (Diamond et al. 1991), welche später als α-Defensine (HNP's) und Beta-Defensine (TAP's) klassifiziert wurden (Yamaguchi und Ouchi 2012).

Antimikrobielle Peptide, wie z.B. humane Beta-Defensine und Cathelicidine, spielen eine entscheidende Rolle bei der initialen Immunantwort. Sie werden als „natürliches Antibiotikum" bezeichnet und man erhofft sich mit Ihnen die weit verbreiteten Resistenzbildungen verschiedener Bakterienstämme gegen Antibiotika einzudämmen. Antimikrobielle Peptide wirken ähnlich wie Breitbandantibiotika, sowohl gegen gram-

positive, als auch gegen gram-negative Bakterien (Fox et al. 2013). Die antimikrobielle Aktivität humaner Beta-Defensine ist direkt verknüpft mit deren Konzentration und indirekt gekoppelt mit der Albuminkonzentration im Serum (Yadava et al. 2006).

Es gibt auch Vorbehalte gegenüber einer therapeutischen Anwendung antimikrobieller Peptide. Experimentell konnte in einer Studie eine Kreuzresistenzentwicklung bei *S. aureus* mit humanen neutrophilen-Defensin-1 und Pexiganan (Magainin 2) nachgewiesen werden. Ein therapeutischer Einsatz von AMP's könnte das initiale Wirtsimmunsystem stark unterminieren und seine Fähigkeiten mikrobielle Infektionen zu kontrollieren einschränken (Habets, Michelle G J L und Brockhurst 2012).

4.3.1 Cathelicidin LL-37

Ebenfalls zur Gruppe der antimikrobiellen Peptide gehört das humane Cathelicidin LL-37. Es findet sich in neutrophilen Granulozyten und wird außerdem von natürlichen Killerzellen, B-Zellen, Monozyten, Mastzellen, Keratinozyten und verschiedenen Epithelien exprimiert (Niyonsaba et al. 2010).

Physiologisch ist die Zahl von LL-37 in der Haut gering, jedoch kann sie sich in inflammatorisch veränderten Keratinozyten sprunghaft erhöhen (Kim, Kim et al. 2005). Gerade in Bezug auf dermale Erkrankungen wie Psoriasis könnte eine hohe Zahl von LL-37 in Keratinozyten eine Linderung des Krankheitsbildes verschaffen (Akiyama et al. 2014).

Es wurde herausgefunden, dass LL-37 protektiv auf primäre Keratinozyten und HaCaT-Zellen wirkt, indem es die COX-2-Expression stimuliert und somit die Apoptose der Zelle verzögert. Das ist interessant, weil LL-37 dadurch einen positiven Einfluss auf die epitheliale Wundheilung haben könnte (Chamorro et al. 2009).

Weiterhin wurde festgestellt, dass die Konzentration von LL-37 in der Sulkusflüssigkeit bei Patienten mit Gingivitis leicht erhöht und chronischer Parodontitis signifikant erhöht war (Türkoğlu et al. 2009). Die antikbakteriellen Eigenschaften werden auf die Neutralisation von Lipopolysacchariden (LPS) der Bakterienmembran zurückgeführt. Jedoch scheint LL-37 keine antimikrobielle Aktivität gegen *Porphyromonas gingivalis* in humanen gingivalen Fibroblasten zu zeigen (Inomata et al. 2010). Das Bakterium scheint den Wirkungsmechanismus über Proteolyse des CD14+ Rezeptors und des LL-37 selbst zu unterbinden.

LL-37 benötigt allerdings für seine zytoprotektive Wirkung ein Konzentrationsoptimum von ca. 1 µM. In höheren Konzentrationen, >2,5 µM, kann LL-37 zum Zelltod bei Fibroblasten führen (Oudhoff et al. 2010). Generell stimulierte LL-37 die Produktion von Zytokinen, wie IL-1β, IL-4, IL-6, IL-8, IL-31 und TNF-α, welche wiederum andere immunkompetente Zellen wie Makrophagen stimulieren. Dabei fördert es sowohl die Fibroblastenmigration als auch deren Proliferation. Außerdem kommt es zur Unterdrückung der Kollagensynthese (bei Konzentrationen von 10-50 nM) und damit auch zu einer reduzierten fibroblastischen Aktivität (Park et al. 2009).

4.3.2 Aufbau und Wirkungsmechanismus der humanen Beta-Defensine

Humane Beta-Defensine bestehen aus 33-47 Aminosäuren und besitzen 3 intramolekulare Disulfidbrücken bei einer molekularen Masse von 4-6 kDa. Sie gehören zum angeborenen Immunsystem und wirken auch als Mediator zwischen spezifischer und unspezifischer Immunantwort (Schröder und Harder 1999; Dale et al. 2001). So stimuliert, z.B., hBD-2 dendritische Zellen über den CCR6-Rezeptor (Yang et al. 1999) und α-Defensine wirken chemotaktisch auf T-Zellen und Monozyten (Chertov et al. 1996; Yang et al. 2000).

Humane Beta-Defensine sind aus Cysteinbausteinen bestehende antimikrobielle Peptide, die in verschiedenen Epithelien, wie die der Atemwege, Niere, Haut, Cornea und der Gingiva vorkommen (Gursoy und Könönen 2012). Bisher wurden 4 Beta-Defensine näher charakterisiert (hBD-1, -2, -3 und -4), dabei werden jedoch nur hBD-1, -2 und -3 in der Mundhöhle exprimiert (Dale et al. 2001; Diamond et al. 1991; Vardar-Sengul et al. 2007).

Beta-Defensine sind sauerstoffunabhängig, amphiphil und stark positiv geladen. Sie besitzen 3 Disulfidbrücken (Cys I-V, Cys II-IV, Cys III-VI), welche die β-Faltblattstruktur stabilisieren. Sie sind antimikrobiell wirksam gegen Bakterien, Viren und Hefepilze. Als multifunktioneller Mediator nehmen sie im Körper außerdem Einfluss auf die Entwicklung, Fertilität, Wundheilung und Tumorentstehung (Semple und Dorin 2012).

Die antimikrobielle Aktivität der humanen Beta-Defensine beruht auf der starken positiven Eigenladung. Als Kationen binden Beta-Defensine elektrostatisch selektiv an die negativ geladene Bakterienmembran, dort generieren sie Poren, welche die Permeabilität steigern und die Bakterien zugrunde gehen lassen (Yamaguchi und Ouchi

2012). Das hBD-3 inhibiert über die Bindung an die Lipid-Doppel-Membran die bakterielle Zellwandsynthese (Wimley et al. 1994; Semple und Dorin 2012).

Die Aktivität der Beta-Defensine ist stark an die Ionen-Konzentration im Medium gekoppelt. Ihre antimikrobielle Funktion wird in Anwesenheit von Na^+, Mg^{2+} und Ca^{2+} beeinträchtig (Bowdish et al. 2006). Das hBD-3 zeigt dazu die geringste Sensitivität, seine Aktivität ist bis zu einer Konzentration von 200 mM Na^+ unbeeinträchtigt. Das liegt wahrscheinlich an der besonders hohen Eigenladung (+11) des hBD-3 (Ouhara et al. 2005; Gursoy und Könönen 2012).

Beta-Defensine können sowohl proinflammatorisch als auch immunsuppressiv wirken. Aufgrund ihrer hohen positiven Eigenladung können sie elektrostatisch an verschiedene Rezeptoren, wie CCR-6, binden und so zur Chemotaxis von Makrophagen, Monozyten und Neutrophilen beitragen. Außerdem können sie elektrostatisch als Antagonisten an Rezeptoren binden, die sonst von proinflammatorischen Stimulantien besetzt werden und somit auch indirekt antiinflammatorisch wirken (Yang et al. 2000; Semple und Dorin 2012).

Auch in der Wundheilung spielen Beta-Defensine eine Rolle. Sie stimulieren die Migration und Proliferation von Keratinozyten (Niyonsaba et al. 2007).

In der Mundhöhle richtet sich die direkte antimikrobielle Aktivität von hBD-1, -2 und -3 gegen eine Vielzahl parodontalpathogener Bakterien wie *P. intermedia, P. gingivalis, T. forsythia, F. nucleatum und A. actinomycetemcomitans* (Gursoy und Könönen 2012). Das unterstreicht die Bedeutung der Beta-Defensine im Zusammenhang mit parodontalen Erkrankungen.

Es gibt jedoch auch Möglichkeiten der Resistenz oraler Pathogene gegen Beta-Defensine. So können Bakterien ihre Zellhülle verändern, sich mittels Biofilmen schützen oder das Defensin spalten (Campos et al. 2004; Lu et al. 2009). Zudem können orale Bakterien indirekt die Synthese der Beta-Defensine beeinflussen. So unterdrückt beispielsweise *T. denticola* die Expression von TNF-α und TLR-2 und hemmt damit die Sekretion von hBD-2 und hBD-3 (Shin und Choi 2010; Shin et al. 2010).

4.3.2.1 Humanes Beta-Defensin 1 (hBD-1)

Das humane Beta-Defensin-1 wurde erstmal bei Patienten mit Nierenleiden isoliert und später auch im Respirationstrakt und in oralem Epithel nachgewiesen (Bensch et al.

1995; Devine 2003). Anders als bei den anderen humanen Beta-Defensinen, welche durch Viren oder Bakterien stimulierbar sind, scheint das hBD-1 konstitutiv exprimiert zu werden (Dunsche et al. 2002; Froy 2005). Allerdings wurde ein signifikant geringerer Spiegel an hBD-1 in oralen Plattenepithelkarzinomzellen nachgewiesen (Wenghoefer et al. 2008). Gegenteilig zum hBD-2 und hBD-3 scheint das hBD-1 hier hemmend zu wirken (Semple und Dorin 2012). Bei einem Karzinom des Lungengewebes konnte das Gegenteil nachgewiesen werden. Hier wurde neben hBD-2 auch das hBD-1 vermehrt exprimiert. Anscheinend spielt hBD-1 eine Rolle im Wachstum von malignen Tumoren (Arimura et al. 2004).

In der Mundhöhle wurde eine hohe antimikrobielle Aktivität von hBD-1 gegen Candida albicans und gram-positive Anaerobier festgestellt, jedoch nur in der reduzierten Form des hBD-1, nachdem die 3 Disulfidbrücken gespalten wurden (Schroeder et al. 2011). Bei inflammatorisch verändertem oralen Epithel, sowohl bei einer Gingivitis als auch bei einer Parodontitis, konnte kein signifikant erhöhter Spiegel von hBD-1 im Vergleich zur gesunden Gingiva festgestellt werden (Dommisch et al. 2005a). Nach Stimulation mit IL-1β und Nikotin konnte die Genexpression von hBD-1 sogar signifikant gehemmt werden in Keratinozyten (Liu et al. 2013; Wolgin et al. 2012).

Die Aktivität des hBD-1 hängt von seiner Struktur ab. In der oxidierten Form ist die antimikrobielle Aktivität gering. In der reduzierten Form, nach Redoxreaktion, hat hBD-1 eine deutlich potentere antibakterielle Wirkung (Schroeder et al. 2011).

4.3.2.2 Humanes Beta-Defensin 2 (hBD-2)

Anders als das hBD-1, scheint das humane Beta-Defensin 2 (hBD-2) in Keratinozyten-Zellkulturen durch proinflammatorische Entzündungsmediatoren wie TNF-α, IL-1β und IL-8 sowie durch Bakterien stimulierbar (Singh et al. 1998; Harder et al. 2000). HBD-2 wurde auf der Suche nach weiteren Defensinen erstmals 1997 in psoriatischer Haut isoliert (Harder et al. 1997). Es scheint lediglich leicht bakteriostatisch gegen gram-positive Bakterien, wie *S. aureus*, zu wirken, dafür jedoch stärker bakterizid gegen gram-negative Bakterien. Zudem geht man von einem hohen antimykotischen Potential des hBD-2 aus (Harder et al. 1997).

In der Mundschleimhaut wird hBD-2 bei Entzündungsprozessen im Vergleich zu hBD-1 und hBD-3 verstärkt exprimiert. Bei einer Gingivitis konnte ein signifikant höheres hBD-2-Level als bei hBD-1 und hBD-3 nachgewiesen werden, bei einer Parodontitis ein leicht Höheres als bei hBD-3 und ein signifikant Höheres als bei hBD-1 (Dommisch et

al. 2015). In-vivo wirkt das hBD-2 wie das hBD-3 als Proonkogen, indem es das Zellwachstum bei oralen Plattenepithelkarzinomen beschleunigt (Winter et al. 2011).
Das hBD-2 wirkt proinflammatorisch, es ist über eine Interaktion mit dem CCR2-Rezeptor von Makrophagen, Monozyten und Neutrophilen an der Chemotaxis beteiligt (Röhrl et al. 2010). Es kann, aufgrund seiner kationischen Natur, elektrostatisch an eine Vielzahl von Rezeptoren binden. Das hBD-2 kann so z.B. an den CCR-6 Rezeptor binden und induziert die Chemotaxis von CD4+ Zellen und T-Gedächtniszellen (Yang et al. 1999).

4.3.2.3 Humanes Beta-Defensin 3 (hBD-3)

Das humane Beta-Defensin 3 wurde, wie das hBD-2, erstmals aus humaner psoriatischer Haut isoliert und wird außerdem in der Lunge, Ösophagus, Trachea, Plazenta und oralen Keratinozyten gebildet. Es ist stimulierbar mit TNF-α und Interferon-γ (Harder et al. 2001; Jia et al. 2001; García et al. 2001). Das hBD-3 hat eine hohe antimikrobielle Aktivität gegen eine Vielzahl von Pathogenen, auch gegen multiresistente *S. aureus* und ist, anders als die anderen Beta-Defensine, auch bei hohen NaCl-Konzentrationen wirksam (Sass et al. 2010).
Das hBD-3 wirkt selbst proinflammatorisch indem es die Expression von Zytokinen wie TNF-α, IL-1α, IL-6 und IL-8 stimuliert (Funderburg et al. 2011). Außerdem interagiert es mit TLR's von antigenpräsentierenden Zellen. Es aktiviert diese über eine Bindung an TLR-1 und TLR-2 (Funderburg et al. 2007). Wie das hBD-2, interagiert das hBD-3 mit dem CCR-2 Rezeptor und ist so an der Chemotaxis von Makrophagen, Monozyten und Neutrophilen beteiligt (Röhrl et al. 2010). Ähnlich wie andere Beta-Defensine und LL-37 stimuliert es außerdem die Expression von IL-18 über eine Aktivierung von p38 und ERK (Niyonsaba et al. 2002).
Studien zeigen, dass hBD-3 ebenfalls einen immunsuppressiven Effekt haben kann. So inhibiert hBD-3, bei bestimmten Konzentrationen (2,5-5 µg/ml), in Anwesenheit von LPS die Expression von TNF-α und IL-6. Ein proinflammatorischer Effekt konnte erst bei höheren Konzentrationen (20-30 µg/ml) nachgewiesen werden (Niyonsaba et al. 2007; Funderburg et al. 2007).
Das hBD-3 selbst generiert nicht, wie die anderen Beta-Defensine, direkt Poren in der bakteriellen Membran. Sie binden an die Lipid-Doppel-Membran und stören die bakterielle Zellwandsynthese. Es kommt so zu Störungen und Diskontinuitäten in der

Membran, welche dann zur Osmose und zum Untergang des Bakteriums führen (Sass et al. 2010).
Weiterhin scheint das hBD-3 auch stark antiviral wirksam zu sein. So bindet es an ein Oberflächenprotein, das Glykoprotein B, des Herpes Simplex Virus und hindert so das Virus in die Zellen der Zervix-Schleimhaut einzudringen. Über denselben Weg bindet hBD-3 auch an das Influenzavirus (Hazrati et al. 2006; Leikina et al. 2005).
Eine weitere wichtige Aufgabe hat das hBD-3 in der Wundheilung. Es stimuliert die Migration und Proliferation von Keratinozyten unter in-vitro Bedingungen, auch unter der Anwesenheit von pathogenen Keimen, und beschleunigt so den Verschluss des Defektes (Niyonsaba et al. 2007).

Die Rolle von LL-37 und humaner Beta-Defensine in der epithelialen Wundheilung

Studien zeigen, dass LL-37 und die humanen Beta-Defensine 1, 2 und 3 einen Einfluss auf die epitheliale Wundheilung haben (Campbell et al. 2011; Bucki et al. 2010; Niyonsaba et al. 2007).
Differenzierung, Migration und Proliferation sind Eigenschaften, die bei der Reepithelialisierung und damit der parodontalen Wundheilung eine wichtige Rolle spielen. Sowohl LL-37 als auch die Beta-Defensine begünstigen die Migration und Differenzierung von Epithelzellen (Campbell et al. 2011). LL-37 und hBD-3 fördern indirekt die Migration und Proliferation von Keratinozyten über die Induktion des STAT-Proteins sowie der Aktivierung des EGF-Rezeptors (Niyonsaba et al. 2007; Bucki et al. 2010). Das hBD-2 ist ebenfalls in der Lage die Keratinozytenmigration und –proliferation zu steigern und beschleunigt in-vitro im Darm die Wundheilung. LL-37 fördert neben der Reepithelialisierung auch die Angiogenese (Otte et al. 2008).

5 Fragestellung

Epithelien kleiden innere und äußere Körperoberflächen aus. Die Epithelzellen in der Mundhöhle nehmen in der parodontalen Heilung eine zentrale Stellung ein. Einerseits bieten Epithelien Schutz gegen externe Noxen als physikalische und chemische Barriere, darüber hinaus bieten sie antibakteriellen Schutz, insbesondere durch die Expression antimikrobieller Peptide. Antimikrobielle Peptide scheinen die epitheliale Wundheilung zu beeinflussen. Das regenerative Potential von EMD wird in in-vivo- und in in-vitro Studien ebenfalls belegt.

Die vorliegende Arbeit untersucht welchen Einfluss Schmelzmatrixproteinderivate (EMD), die in der parodontalen Wundheilung und Regeneration eingesetzt werden, auf die Expression von antimikrobiellen Peptiden, insbesondere die humanen Beta-Defensine 1, 2, 3 und das Cathelicidin LL-37 in Epithelzellen haben. Außerdem wird untersucht, ob EMD die proinflammatorischen Zytokine IL-1β und IL-6 in Epithelzellen reguliert.

6 Material und Methoden

6.1.1 Zellkultivierung

In der vorliegenden Studie wurde eine immortalisierte, nicht tumorigene Keratinozytenzelllinie, HaCaT, verwendet.

Die HaCaT-Zellen wurden in einem Brutschrank bei 37° C und 21 % O_2, 69 % N_2 und 10 % CO_2 kultiviert.

Zur Kultivierung wurde das Medium DMEM mit 20 % FCS, 1 % Amphotericin B, 1 % Penicillin/Streptomycin, 1 % nicht essentielle Aminosäuren und 1 % Glucoselösung verwendet. Das Starvationsmedium wurde mit stattdessen mit 0,5 % FCS angesetzt[1].

Der Wechsel des Mediums fand alle 2 Tage statt. Bei 80-90 %iger Zellkonfluenz erfolgte die Passage der Zellen. Der Zellmonolayer wurde mit PBS[2] gewaschen und anschließend wurde mittels Trypsin[3] die Verbindung der Zellen zur Oberfläche bei 37°c im Brutschrank gelöst. Das Trypsin wurde danach mit Medium inaktiviert und die Zellen mit PBS gespült. Danach wurde alles in je 50 ml Röhrchen bei 800 rpm 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und die Zellen mit je 20 ml Medium erneut verdünnt und wieder in Zellkulturflaschen ausgesät.

6.1.2 Stimulation der Zellen

Die Zellen wurden in einer Dichte von 67.750/Well auf 6-Well-Platten kultiviert. Anschließend wurden die Zellen mit Stimulationsmedium (DMEM und 0,5 % FCS) mit je 5 ng/ml TNF-α (positive Kontrolle), bzw. mit je 100 µg/ml EMD für 1 h, 6 h, 12 h oder 24 h behandelt. Emdogain®-Gel der Firma Straumann® ist in 0,3 ml Spritzen erhältlich mit einer Konzentration des Schmelzmatrixproteins von 30 mg/ml.

[1] DMEM, FCS, Amphotericin B, Penicillin/Streptomycin, n.e. Aminosäuren (Biochrom, Berlin, Deutschland)
[2] PBS (Biochrom, Berlin, Deutschland)
[3] Trypsin (Biochrom, Berlin, Deutschland)

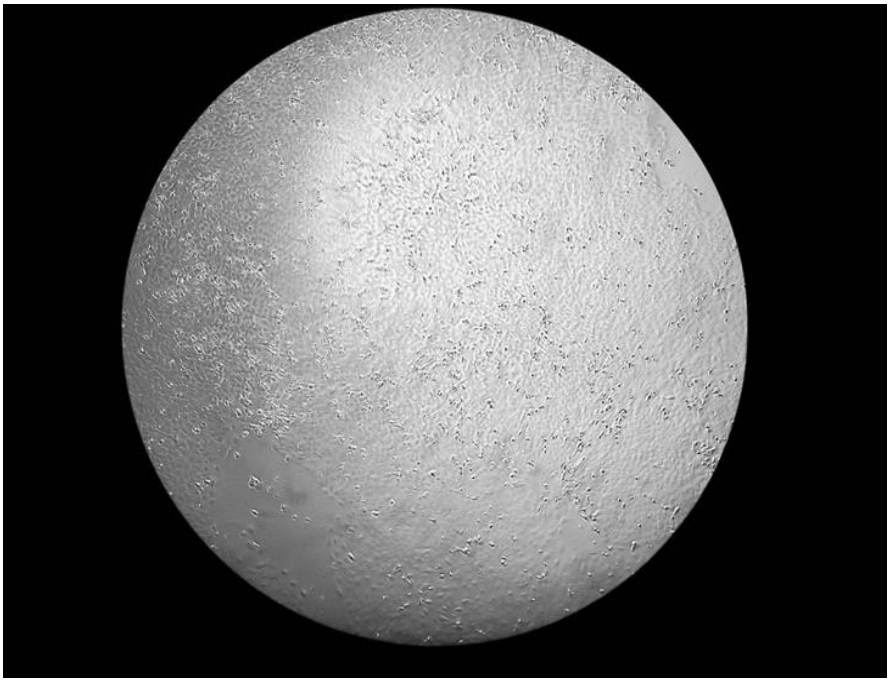

Abb. 2 Lichtmikroskopische Darstellung**,** HaCaT-Zellen 2 Tage nach Zellpassagierung

6.1.3 RNA-Isolation und Reverse-Transkriptase – Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)

Die RNA-Isolation erfolgte mit dem RNeasy Kit (Quiagen, Hilden, Deutschland). Hier wurde das Protokoll des Herstellers zur Isolierung der RNA verwendet.

Im Rahmen der Reverse – Transkriptase - Polymerasekettenreaktion (RT-PCR) wurde zunächst die gewonnene RNA aus den Zellen mittels einer DNA-Polymerase in cDNA umgeschrieben. Um die Synthese der Komplementär-DNA (cDNA) zu ermöglichen benötigte man einen Oligo-d(T)-Primer und Thymin-Basen, zur Hybridisierung des komplementären Poly(A)-Restes der mRNA. Anschließend erfolgte die Amplifizierung der cDNA mit thermostabilen DNA-Polymerasen in einer Polymerasekettenreaktion.

6.2.1 Reverse Transkription

Für die Reverse Transkription wurde das RT-Kit von Promega (Wisconsin, USA) verwendet. Zunächst wurde, je nach Anzahl der vorhandenen Proben (je Probe 10 µl Gesamtvolumen), der RT-Puffer-Mix angesetzt. Für jede Probe benötigte man dazu 2,75 µl aqua bidest, 5 µl Puffer, 1,25 µl 10 mM dNTP und 1 µl des Enzyms Reverse Transkriptase.

Anschließend wurde der RNA-Mix, auf Eis, pipettiert. Dafür wurden je Probe 2 µl oligo-(dT) Primer (je nach fotometrisch ermittelter RNA-Konzentration), eine variable Menge RNA und zuletzt RNAse freies Wasser in ein Röhrchen pipettiert, welches dann ein Gesamtvolumen von 15 µl aufwies.
Der RNA-Mix wurde dann in einen PCR-Cycler (UNO-Thermoblock der Firma Biometra, Göttingen, Deutschland) gegeben. Dort fand die Aufschmelzung der Sekundärstruktur der RNA über 8 min bei 70° C statt.
Jedem Röhrchen des RNA-Mixes wurden nun 10 µl RT-Puffer-Mix beigefügt (Gesamtvolumen 25 µl je Probe). Die Proben wurden zurück in den Thermoblock gegeben und es erfolgte die Reverse Transkription über 60 min bei 42° C, die anschließenden 10 min des Programms wurde das Enzym bei 70° C inaktiviert und zum Schluss die Proben auf 4° C heruntergekühlt. Die Umschreibung der mRNA in cDNA ist nun abgeschlossen. Jede Probe wurde noch mit 18 µl RNAse freiem Wasser verdünnt (Gesamtvolumen je Probe nun 47 µl) und dann bei -20° C aufbewahrt.

6.2.2 Real-Time-PCR

Die quantitative-Echtzeit-PCR (Polymerase-Ketten-Reaktion) ist eine Methode, mit der man bestimmte Gensequenzen vervielfältigen kann. Die gewonnenen Produkte werden dabei nach jedem Reaktionsdurchlauf über eine Fluoreszenzmessung bestimmt und quantitativ-grafisch dargestellt.
Die gewünschten, zu kopierenden, Sequenzen werden mit sogenannten Primern markiert, diese Oligonukleotide dienen als Startmoleküle für die Neusynthese an zwei Einzelsträngen und begrenzen so den zu kopierenden Abschnitt. Weiterhin wurde noch ein Enzym zugefügt, welches die Reaktion katalysiert. Die Taq-Polymerase, gewonnen aus dem Bakterium thermus aquaticus, ist thermophil und selbst bei Temperaturen von bis zu 100° C hitzestabil und behält seine Polymeraseaktivität. Es gibt drei Phasen, die mehrmals zyklisch durchlaufen werden, sodass die Vervielfältigung einen exponentiellen Anstieg erfährt. Zuerst wird bei hohen Temperaturen (ca. 90° C) die DNA denaturiert und dabei die Wasserstoffbrückenbindungen aufgebrochen um die Doppelhelix zu trennen. Anschließend konnte bei einer bestimmten Temperatur, die vom PCR-Cycler gehalten wird, die Primerhybridisierung stattfinden. Bei der darauffolgenden Phase der Elongation, füllte die DNA-Polymerase die freien Plätze auf.
Um die PCR-Produkte zu quantifizieren benötigte man einen DNA-Farbstoff. In der vorliegenden Arbeit wurde QuantiTect SYBRGreen (Qiagen, Hilden, Deutschland) dafür

verwendet. Dieser Farbstoff fügt sich während der Reaktion in die doppelsträngige DNA ein, dadurch steigt dessen Fluoreszenz. Mit jedem Zyklus nimmt die Ziel-DNA zu und dementsprechend steigt auch die Fluoreszenz des Farbstoffes. Während der Bindung kommt es zu einer Lichtemission mit einer Wellenlänge von 490 nm. Die Messung erfolgte dann am Ende jeder Elongationsphase, da hier die maximale Zahl der vervielfältigten, doppelsträngigen DNA vorliegt und die Produktzunahme konnte grafisch dabei am Monitor verfolgt werden. Bei der folgenden Denaturierung des nächsten Zyklus löst sich der Farbstoff wieder aus der DNA und steht für den nächsten Durchlauf wieder zur Verfügung.
Nach Durchlauf aller Zyklen konnte die Auswertung grafisch im dazugehörigen Programm (Rotorgene, Quiagen, Hilden, Deutschland) dargestellt werden.

6.3 Gewinnung der Standardkurven

Die Gewinnung der Standardkurven der verwendeten Gene diente dann später der Quantifizierung der eigentlichen Produkte nach RT-PCR.
Hierfür wurde die cDNA aus den PCR-Produkten nach einem Protokoll aufgereinigt (QIAquick, Quiagen, Hilden, Deutschland) und dann zur Herstellung der Standardkurven genommen. Vorher musste die Menge der entsprechenden cDNA-Kopien (je ml) errechnet werden. Dazu wurde folgende Formel verwendet:

$$\textit{Moleküle/µl} = (\textit{DNA [g/ml]} / \textit{DNA-Länge [Basenpaare x 660]} \times 6{,}022 \times 10^{23}$$

Daraus wurde dann aus jeder Probe eine Verdünnungsreihe mit den Konzentrationen 1×10^{2} bis 1×10^{11} hergestellt (Bongrazio et al. 2006). Bei der folgenden Real-Time-PCR wurde das sogenannte „nested“ (verschachtelte) Prinzip verwendet. Dabei wird bei einer ersten, kurzen PCR in weniger Zyklen mit einem long Primer das Produkt markiert und amplifiziert. Die gewonnene DNA hierfür stammt aus den HaCaT-Zellen. Anschließend können im zweiten Schritt auf dem Produkt aus der ersten PCR die eigentlichen Sequenzen mittels einem short Primer genau amplifiziert werden. Für die Messung der Genexpression der Proben und für die Herstellung der Standardkurven der zu bestimmenden Gene wurden short Primer verwendet.

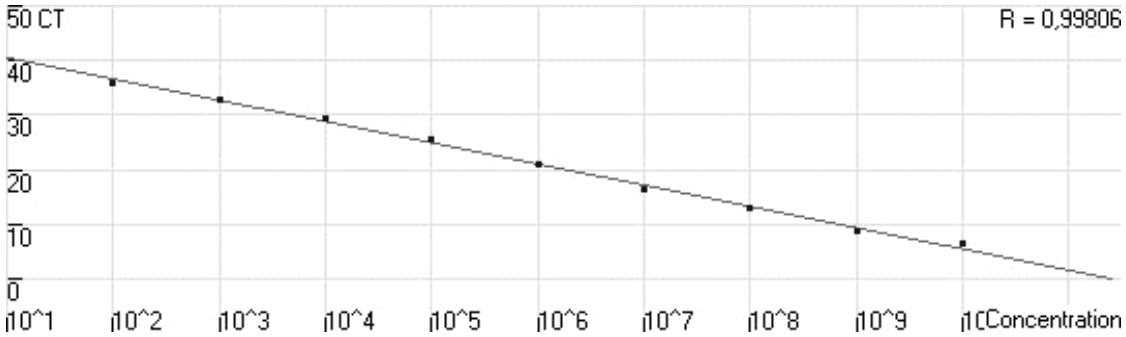

Abb. 3 Standardkurve für LL-37 (beispielhaft)

Gen	AcNo	vorwärts	rückwärts	Produkt-Größe (kb)
hBD-1 (long) hBD-1 (short)	NM 005218	tcattacaattgcgtcagcag ggagggcaatgtctctattctg	ttgcagcacttggccttc ctctgtaacaggtgccttgaa	105 64
hBD-2 (long) hBD-2 (short)	NM 040153	atcagccatgagggtcttgt tcctcttctcgttcctcttca	gagaccacaggtgccaattt agggcaaaagactggatgac	144 102
hBD-3 (long) hBD-3 (short)	NM 018661	agcctagcagctatgaggatc cattatcttctgtttgctttgctc	cttcggcagcattttcggcca cgatctgttcctcctttgga	206 148
IL-1β (long) IL-1β (short)	NM 000576	ctccagggacaggatatgga caacaagtggtgttctccatgt	tctttcaacacgcaggacag gcccaaggccacaggtat	134 72
IL-6 (long) IL-6 (short)	NM 000600	ctggtcttttggagtttgagg agagtagtgaggaacaagccaga	atctgaggtgcccatgct ttgccgaagagccctcag	306 233
GAPDH (long) GAPDH (short)	NM 002046	cctgacctgccgtctagaaa tcaagaaggtggtgaagcag	tactccttggaggccatgtg ccctgttgctgtagccaaat	276 198

Tab. 1 Verwendete Primer mit entsprechenden Sequenzen

6.4 Quantitative Bestimmung der Genexpression

Die quantitative Bestimmung der Genexpression der verwendeten Gene hBD-1, hBD-2, hBD-3, IL-1β, IL-6 und LL-37 erfolgte direkt während der Real-Time-PCR mittels Fluoreszenzmessung nach jedem Durchlauf und kann am Monitor dabei grafisch als Exponentialfunktion abgelesen werden. Ein vom Programm ermittelter Schwellenwert (Threshold) diente der späteren Berechnung der Genexpression aller Werte, die den Schwellenwert überstiegen (ct – Werte = crossing threshold Werte).

In jeder PCR lief eine Kontrollprobe (non template control) mit, welche keine DNA enthielt, sondern ausschließlich SYBR-Green, DEPC Wasser, jeweilige Primer der PCR und statt DNA weiteres DEPC Wasser. Diese diente zur Kontrolle der Reinheit verwendeter Reagenzien.

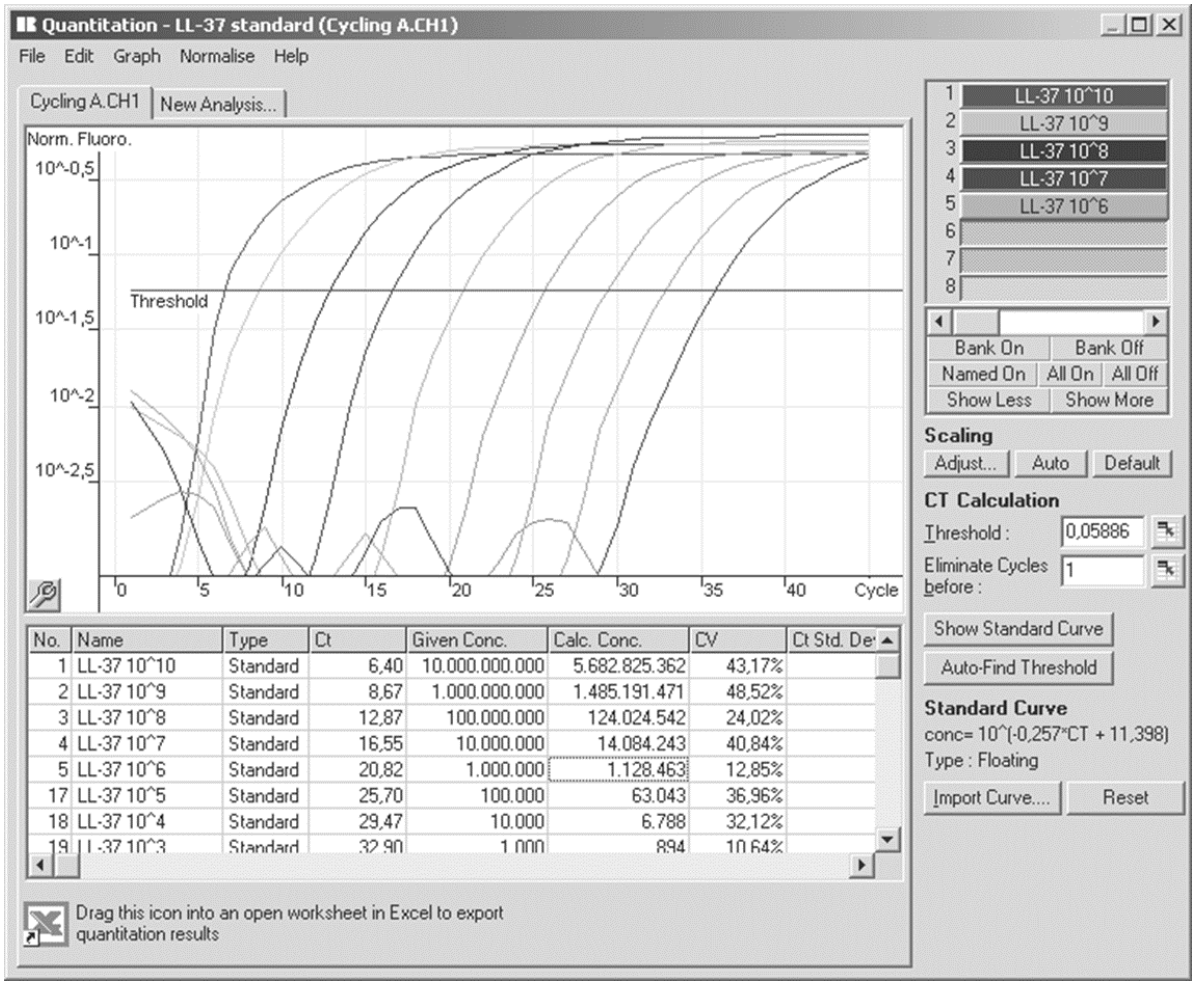

Abb. 4 Direkte quantitative Auswertung im Programm Rotorgene

6.5 Quantitative Bestimmung des Housekeeping-Gens

Zur Normalisierung aller PCR Ergebnisse wurde Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase verwendet. GAPDH ist ein Schlüsselenzym des Stoffwechselweges der Glykolyse, welches Glycerinaldehyd-3-phosphat zu 1,3-Bisphosphoglycerat oxidiert unter Reduzierung von NAD+ zu NADH.

6.6 Statistische Auswertung

Aus den Experimenten wurden mit Hilfe der Software Microsoft Excel® für Windows 2000® die Mittelwerte und Standardabweichungen berechnet.

Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Student-T-Test. Dieser Test ist besonders geeignet die normalverteilten Mittelwerte zweier Proben gleicher Varianz zu vergleichen. Dabei wurden je die Proben der TNF-α -, und der EMD-Stimulation der einzelnen Zeiten mit den entsprechenden Negativkontrollen verglichen um zu untersuchen, ob es statistisch signifikante Abweichungen gibt. Eine Signifikanz von $p \leq 0{,}05$ wurde dabei angenommen.

7 Ergebnisse

Die Ergebnisse der Polymerase-Kettenreaktion zeigen nach EMD-Stimulation der HaCaT-Zellen statistisch signifikante Unterschiede in der Genexpression beim humanen Beta-Defensin-1 sowie bei den Interleukinen IL-1β und IL-6 (siehe Abb. 5,7,8).

Weder EMD noch TNF-α beeinflussten die hBD-3 und LL-37 Genexpression in HaCaT-Zellen.

7.1 hBD-1 Genexpression

Die Ergebnisse zeigen eine statistisch signifikante Hemmung ($p \leq 0{,}05$) der hBD-1 Expression in späten Phasen der EMD-Stimulation (12 h, $p = 0{,}044$, 24 h, $p = 0{,}048$) im Vergleich zur negativen Kontrolle. Entsprechende Daten zeigen sich nach Stimulation mit der positiven Kontrolle (12 h, $p = 0{,}044$, 24 h, $p = 0{,}040$) im Vergleich zur negativen Kontrolle. Es gibt keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen der EMD-Gruppe und der TNF-α Gruppe.

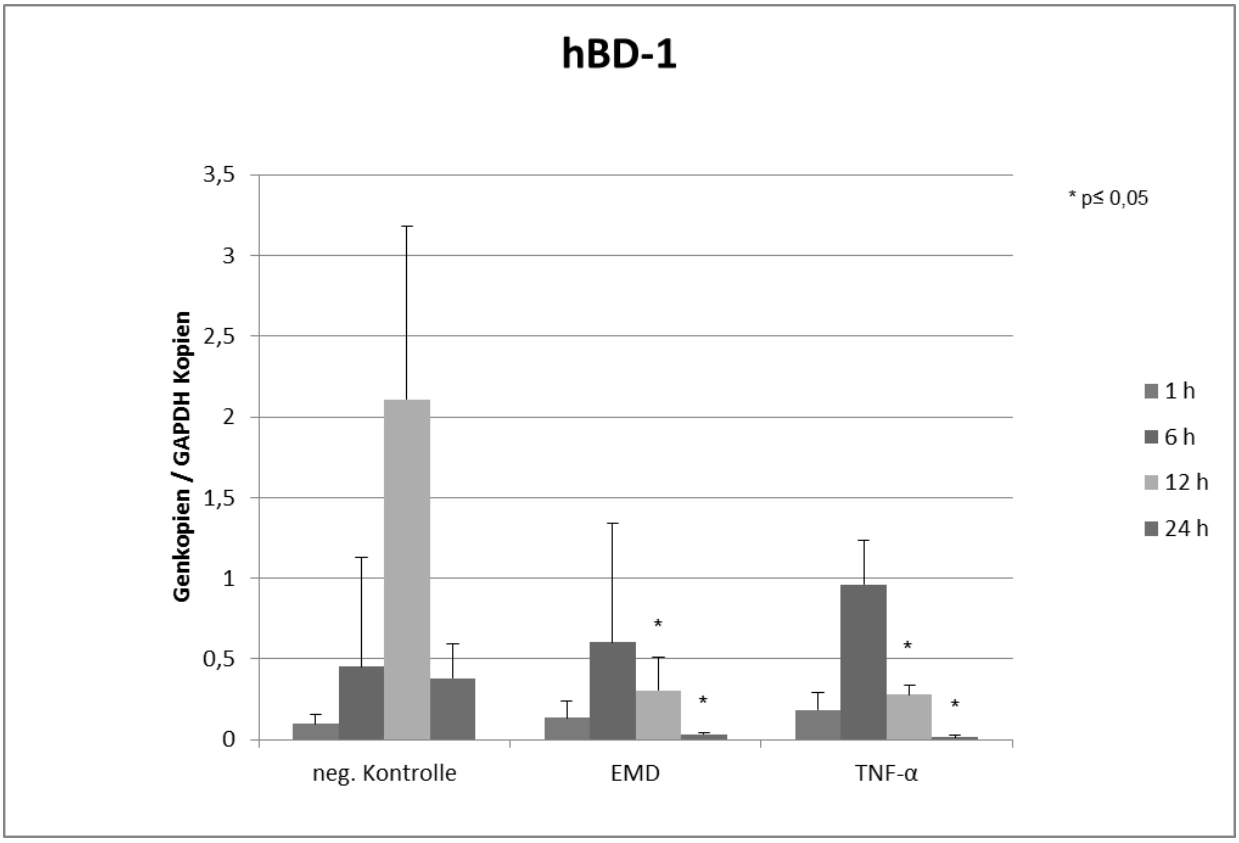

Abb. 5 hBD-1 Genexpression

7.2 hBD-2 Genexpression

EMD hat keinen Einfluss auf die Regulation von hBD-2 in HaCaT-Zellen. TNF-α stimuliert die Expression von hBD-2 an allen gemessen Zeitpunkten (1 h, 6 h, 12 h, 24 h). Die hBD-2 Expression nach TNF-α Stimulation ist im Vergleich zur negativen Kontrolle und zur EMD-Gruppe nicht signifikant verändert. Sowohl in der negativen Kontrollgruppe als auch in der EMD-Gruppe konnte keine Genexpression von hBD-2 nachgewiesen werden.

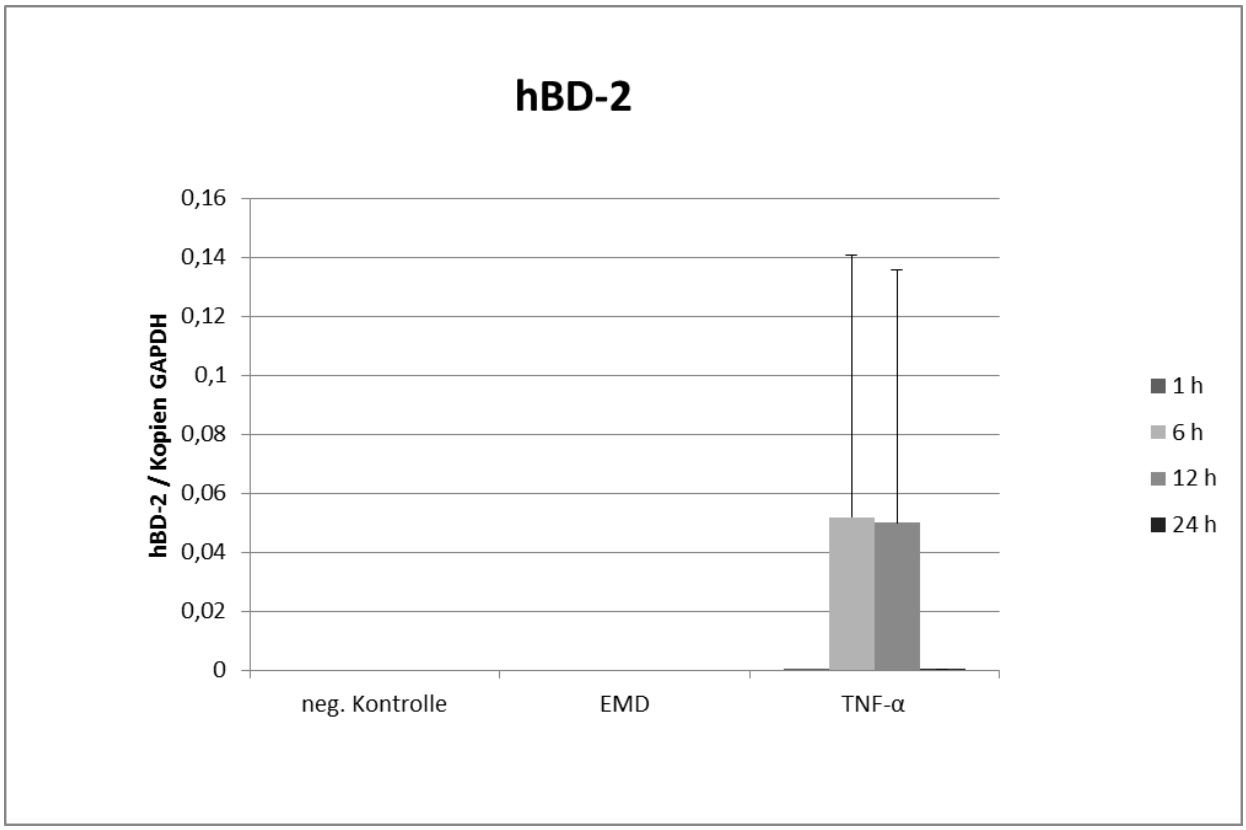

Abb.6 hBD-2 Genexpression

7.3 hBD-3 Genexpression

EMD stimuliert die Genexpression von hBD-3 in HaCaT-Zellen nicht. Zu keinem der gemessenen Zeitpunkte (1 h, 6 h, 12 h, 24 h) konnte ein quantitativer Nachweis der Expression von hBD-3 in der negativen Kontrolle, sowie in den mit TNF-α und EMD stimulierten Proben erbracht werden.

Weder EMD, noch die negative und positive Kontrolle, TNF-α, konnten zu den gemessen Zeitpunkten (1 h, 6 h, 12 h, 24 h) die Expression von hBD-3 regulieren.

7.4 LL-37 Genexpression

EMD stimuliert die Genexpression von LL-37 in HaCaT-Zellen nicht.

Zu keinem der gemessen Zeitpunkte (1 h, 6 h, 12 h, 24 h) konnte ein quantitativer Nachweis der Expression von LL-37 in der negativen Kontrolle, sowie in den mit TNF-α und EMD stimulierten Proben erbracht werden.

7.5 Interleukin-1β Genexpression

EMD stimuliert statistisch signifikant die Expression von IL-1β nach 24 h ($p = 0,001$) im Vergleich zur negativen Kontrolle. TNF-α stimuliert IL-1β statistisch signifikant im Vergleich zur negativen Kontrolle nach 1 h ($p = 0,035$).

Die Genexpression von IL-1β konnte sowohl in der negativen Kontrollgruppe als auch in den Stimulationen mit EMD und TNF-α zu jedem gemessenen Zeitpunkt (1 h, 6 h, 12 h und 24 h) nachgewiesen werden.

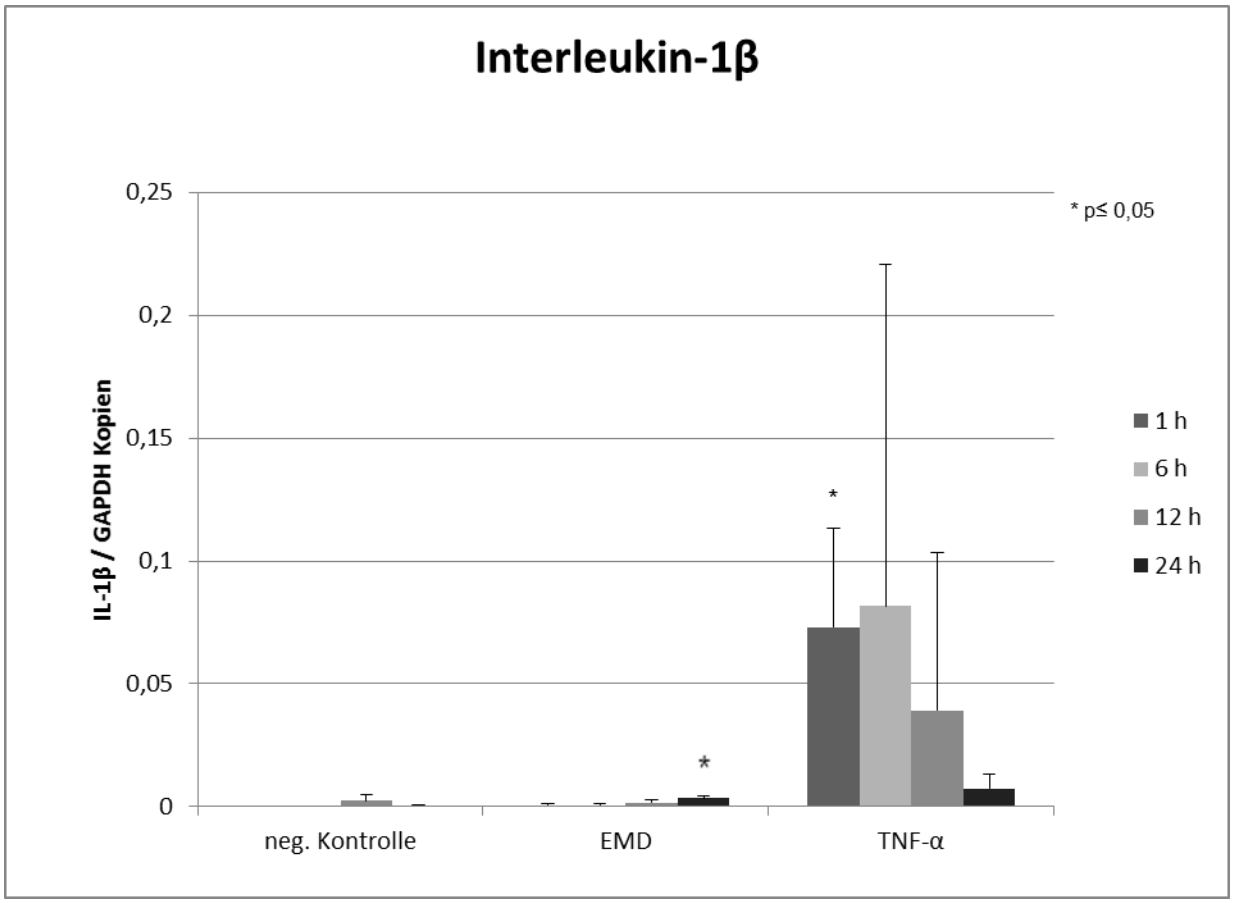

Abb. 7 IL-1β Genexpression

.

7.6 Interleukin-6 Genexpression

EMD hat keinen signifikanten Einfluss auf die Genexpression von IL-6 im Vergleich zur negativen Kontrolle.

TNF-α stimuliert im Vergleich zur negativen Kontrolle statistisch signifikant (p = 0,002) die Expression von IL-6 nach 6 h. Zu allen Zeitpunkten (1 h, 6 h, 12 h und 24 h) konnte in der TNF-α stimulierten Gruppe IL-6 nachgewiesen werden.

In der negativen Kontrollgruppe konnte IL-6 nicht nachgewiesen werden.

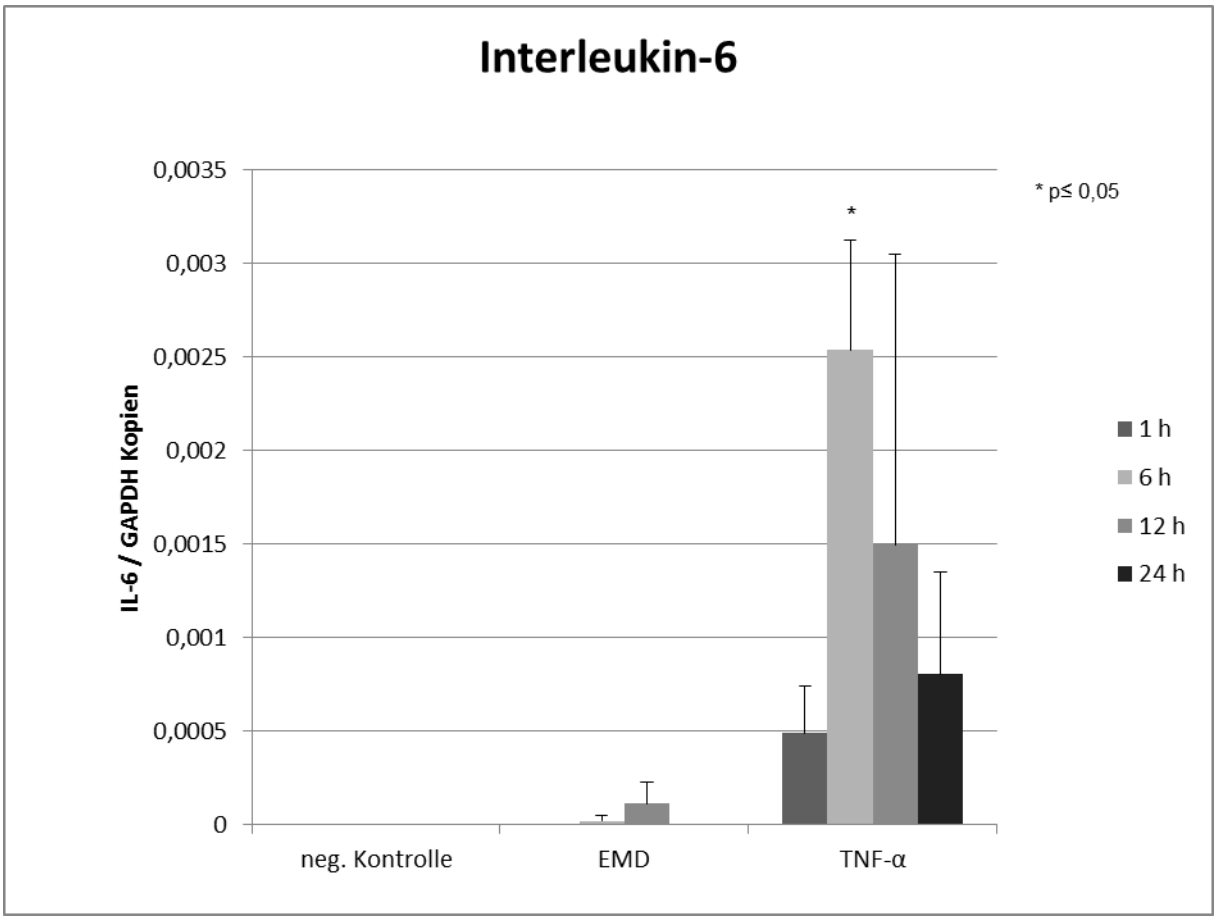

Abb. 8 IL-6 Genexpression

8 Diskussion

8.1 Diskussion der Methodik

Die vorliegende Arbeit hat den Einfluss von EMD auf die Expression antimikrobieller Peptide und proinflammatorischer Zytokine in HaCaT-Zellen untersucht.

In der vorliegenden Studie wurde eine immortalisierte, nicht tumorigene Keratinozytenzelllinie, HaCaT, verwendet.
Sie ersetzt in vielen Studien native, humane Keratinozyten (Fusenig et al. 1990). Die verwendeten Keratinozyten wurden der Peripherie eines primären malignen Melanoms eines 62 jährigen Patienten an der oberen Rückenhaut bei der Nachoperation entnommen. Durch die Arbeitsgruppe von Prof. Fusenig et al konnte nach histologisch gesicherter Benignität die Zelllinie am Deutschen Krebsforschungsinstitut in Heidelberg etabliert werden (Boukamp et al. 1988). Sie unterliegt einem festen Wachstumszyklus, bei dem eine konstante Zellteilung nach 7 Tagen erreicht wird (Wanner et al. 1999). HaCaT steht dabei für Human adult low Calcium high Temperature keratinocytes. In einer Vielzahl von Studien zur Vergleichbarkeit der Eigenschaften von HaCaT und nativen Keratinozyten konnten Gemeinsamkeiten im biochemischen Verhalten ausgemacht werden. Sie verhalten sich in Kultur wie normale Keratinozyten hinsichtlich Differenzierung und Wachstum (Boukamp et al. 1988; Ryle et al. 1989). Auch nach hohen Passagezahlen (>300) konnten keine malignen Transformationen nachgewiesen werden (Boukamp et al. 1997).
Nach Kultivierung der Zellen, wurden diese mit 100 µg/ml EMD stimuliert. Mit dieser Konzentration wurde bereits in zahlreichen in vitro Untersuchungen stimuliert (Nokhbehsaim et al. 2012; Khedmat et al. 2010; Weinberg et al. 2010).

Die RNA-Extraktion erfolgte mittels der RNEasy – Methode (Quiagen, Hildesheim, Deutschland). Diese Methode wurde aus allen etablierten kommerziell erwerblichen Systemen zur RNA Extraktion benutzt, da sie im Vergleich besonders hohe RNA-Konzentrationen und Reinheit der Endprodukte ermöglicht (Metcalf und Weese 2012).
Die RNA der jeweils drei Proben eines Versuches wurden gepoolt und der RNA-Gehalt mit dem Photometer bestimmt. Die gemessenen Konzentrationen wurden vor der Umschreibung in cDNA geeicht (1 µg/µl RNA je Probe) um die Reproduzierbarkeit und Vergleichbarkeit für die anschließende Real-time-PCR zu garantieren.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Amplifizierung der einzelnen Produkte mit Hilfe der Real-time-PCR durchgeführt. Im Vergleich zur konventionellen PCR kann bei dieser Methode jeder Durchlauf der einzelnen Probe gemessen werden und damit eine Echtzeitquantifizierung direkt entnommen werden. Die hohe Sensitivität ermöglicht genaue Ergebnisse ohne die Produkte zusätzlich in einem Agarosegel laufen zu lassen. Die Quantifizierung wird mit Hilfe einer Fluoreszenzmessung vorgenommen. Ein fluoreszierender Farbstoff wird dabei dem PCR-Mastermix zugefügt. In dieser Arbeit wurde dafür der Fluoreszenzfarbstoff SYBR-Green verwendet. Vor der Anwendung mussten Standardkurven der benutzten Primer hergestellt werden, um die Anzahl der jeweiligen Genkopien jeder Probe später berechnen zu können. Hierfür wurden 10er Verdünnungsreihen der PCR-Produkte hergestellt.
Zum Vergleich der Expression der Gene zu jedem Primer wurde das Enzym GAPDH (Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase) verwendet. Es wird als Enzym der Glykolyse in jeder humanen Zelle konstant exprimiert und kann deshalb zur Normalisierung der PCR-Ergebnisse herangezogen werden (Radonić et al. 2004).

6.2 Diskussion der Ergebnisse

In der parodontalen Heilung nehmen Epithelien eine zentrale Stellung ein, da sie über den physikalischen Schutz hinaus durch die Expression antimikrobieller Peptide einen antibakteriellen Schutz bieten, was insbesondere an der Barriere vom Mundhöhlenepithel zu anderen Gewebearten entscheidend ist. Das parodontale Epithel schützt vor dem Eindringen parodontal pathogener Keime und damit der daraus resultierenden Destruktion des Parodonts. Weiterhin ist ein intaktes Saumepithel entscheidend für die immunologische Abwehr und verhindert ein Eindringen verschiedener Bakterien in den Blutkreislauf. Das ist in Bezug auf die Assoziation sytemischer Erkrankungen mit einer manifestierten Parodontits von besonderer Bedeutung. Das Ziel der Arbeit war es zu untersuchen, ob das seit vielen Jahren in der parodontalen Heilung eingesetzte Proteinderivat, EMD, die Expression von antimikrobiellen Peptiden, sowie proinflammatorischen Zytokinen in der Epithelzelllinie HaCaT reguliert.
In der vorliegenden Studie wurde erstmals gezeigt, dass EMD einen Einfluss auf die Genexpression von humanen Beta-Defensinen in HaCaT-Zellen hat.

Humane Beta-Defensine 1-3 werden im Epithel der Mundhöhle exprimiert (Dale et al. 2001; Gomes und Fernandes 2010; Gursoy und Könönen 2012) und sind ein Teil der initialen Immunantwort gegen Bakterien, Viren und Pilze. Außerdem nehmen Humane Beta-Defensine eine essentielle Rolle neben der körpereigenen Immunantwort auch in Wundheilungsvorgängen über eine Stimulation der Migration und Proliferation von Keratinozyten auch unter Anwesenheit von pathogenen Keimen ein (Niyonsaba et al. 2007).

Schmelzmatrixproteine fördern die Regeneration parodontaler Strukturen indem sie Vorgänge der Zahnentwicklung imitieren (Hammarström 1997a). Im Bereich der parodontalen Regeneration gibt es bisher keine Publikationen die den Einfluss von EMD auf die lokale Expression der humanen Beta-Defensine zeigte, welche selbst bereits in der Mundhöhle nachgewiesen wurden.

In der vorliegenden Studie konnte erstmals eine Regulierung der Genexpression von hBD-1 durch EMD in HaCaT-Zellen nachgewiesen werden. HBD-1 wurde sowohl in der negativen Kontrolle, als auch nach Stimulation mit TNF-α sowie mit EMD in den HaCaT-Zellen exprimiert. Interessanterweise fand eine Regulation der Expression in den späten Phasen der Stimulation mit EMD statt. Die Anzahl der Genkopien ist nach 12 und 24 Stunden statistisch signifikant niedriger in den EMD- und TNF-α-stimulierten Proben im Vergleich zur negativen Kontrolle

Das hBD-1 wird in verschiedenen Zelltypen exprimiert (Gursoy und Könönen 2012). Einige Autoren beschreiben, dass die Expression, trotz Stimulation mit verschiedenen Mediatoren, z.B. TNF-α, LPS, PMA und IL-6, konstant blieb (Zhao et al. 1996). Allerdings wurde eine verminderte Genexpression von hBD-1 in inflammatorisch veränderten gingivalen Keratinozyten nach Stimulation mit IL-1β nachgewiesen (Liu et al. 2013), was die Ergebnisse unserer Arbeit stützt, da die Stimulation mit TNF-α ebenfalls eine signifikant verminderte Genexpression von hBD-1 bewirkte. Dies würde die Annahme, dass humane Beta-Defensine während einer Entzündung vermehrt exprimiert werden (Dale et al. 2001), für hBD-1 nicht bestätigen, da unsere Studie Gegenteiliges zeigt. Jedoch stützen unsere Ergebnisse, die zeigen das TNF-α die Expression von hBD-1 hemmt, andere Studien, in denen hBD-1 ebenfalls bei inflammatorisch veränderten Keratinozyten vermindert exprimiert wird (Liu et al. 2013). Auch bei Nikotinabusus konnte nachgewiesen werden, dass in oralen Epithelzellen hBD-1 und hBD-2 vermindert exprimiert werden (Wolgin et al. 2012).

EMD stimulierte in vorliegender Arbeit nicht die Genexpression von hBD-2. Nur in den mit der positiven Kontrolle, d.h. mit TNF-α stimulierten Proben, konnte hBD-2 überhaupt nachgewiesen werden. Es wurde in vorangegangenen Studien gezeigt, dass hBD-2 durch diverse Entzündungsmediatoren wie IL1ß, IL-8, LPS und TNF-α reguliert wird (Yamaguchi und Ouchi 2012; Liu et al. 2013). Die Ergebnisse der vorliegenden Studie scheinen das zu bestätigen. In der Literatur wird jedoch eine hBD-2-Exprimierung in HaCaT's ohne weitere Stimulation beschrieben, dies konnte hier in der unstimulierten Kontrollgruppe nicht bestätigt werden (Seo et al. 2001). Jedoch ist nicht auszuschließen, dass hBD-2 lediglich unter der Nachweisgrenze exprimiert wurde.

In keinem der Versuche konnten Genkopien von hBD-3 in den HaCaT's nachgewiesen werden. Jedoch bedeutet dies nicht, dass HaCaT's hBD-3 nicht exprimieren. Ein möglicher Grund könnte ein Exprimierungsspiegel unterhalb der Nachweisgrenze sein, d.h. es konnte fotometrisch keine RNA mehr nachgewiesen werden. Andere Studien zeigen, dass die Genexpression von hBD-2 und hBD-3 deutlich geringer ist, als die von hBD-1 und hBD-4 (Paris et al. 2009), was die Ergebnisse in vorliegender Arbeit ebenfalls stützt.

Entsprechend der Datenlage über die Expression von LL-37 in HaCaT-Zellen) konnte das Cathelicidin in keiner Probe dieser Studie nachgewiesen werden (Kim et al. 2005). LL-37 wird sowohl in psoriatischer Haut exprimiert und in primären humamen Keratinozyten (Kim et al. 2005). Unsere Arbeit stützt somit bisherige Studien, in denen keine Stimulation von LL-37 in HaCaT's möglich war.

Es konnte eine signifikante Steigerung der IL-1β Expression nach 24 h nach EMD Stimulation der HaCaT-Zellen nachgewiesen werden. Dies könnte darauf hindeuten, dass EMD nach einer gewissen Zeit proinflammatorisch wirkt. Auch in den späten Phasen (12 h, 24 h) bei hBD-1 wurde eine Regulation sowohl in den EMD-stimulierten, als auch in den TNF-α stimulierten Proben gemessen, die auf eine inflammatorische Reaktion hindeuten. So wurden bereits eine verminderte Expression von hBD-1 nach Stimulation mit IL-1β nachgewiesen (Liu et al. 2013). Zu allen gemessenen Zeiten (1 h, 6 h, 12 h, 24 h) stimulierte in der vorliegenden Studie TNF-α die IL-1β, nach einer Stunde dabei sogar signifikant im Vergleich zur negativen Kontrolle. Jedoch nimmt der Spiegel von IL-1β der TNF-α stimulierten Proben nach 6 h kontinuierlich wieder ab.

EMD scheint keinen regulatorischen Einfluss auf die Genexpression von IL-6 in HaCaT-Zellen zu haben. Ganz ähnlich wie bei IL-1β verhielt es sich bei der Genexpression von IL-6 nach Stimulation mit TNF-α. Auch hier ist der Spiegel in allen gemessenen Zeiten (1 h, 6 h, 12 h, 24 h) höher als im Vergleich zur negativen Kontrolle. Jedoch sinkt er nach 6 h kontinuierlich wieder ab.

Unsere Studie zeigte, dass Emdogain® die Genexpression von hBD-1 signifikant hemmt. Anders, als bei den humanen B-Defensinen-2 und -3, die bei einer Gingivitis bzw. Parodontitis vermehrt exprimiert werden, konnte bereits eine signifikant verminderte Genexpression von hBD-1 während einer Parodontitis in gingivalem Epithel nachgewiesen werden (Dommisch et al. 2005). Das bedeutet, dass hBD-1 während inflammatorischer Prozesse in Epithelien vermindert exprimiert wird. Nach bisheriger Datenlage ist hBD-3 an Wundheilungsvorgängen in Keratinozyten beteiligt (Niyonsaba et al. 2007). HBD-3 wurde, entgegen der Datenlage, in vorliegender Arbeit in keiner der Gruppen exprimiert (Kisich et al. 2007). Da hBD-3 vermehrt bei entzündlichen Prozessen stimuliert wird, wäre in folgenden Studien eine Prästimulation mit proinflammatorischen Mediatoren vor der eigentlichen EMD–Stimulation sinnvoll in Betracht zu ziehen (Dommisch et al. 2005b). Eine solche Prästimulation könnte auch für hBD-1 in Betracht gezogen werden um herauszufinden, ob EMD die Genexpression von hBD-1 in bereits entzündlich verändertem Epithel zusätzlich hemmt.

Die vorliegenden Ergebnisse über die Genexpression humaner Beta-Defensine und proinflammatorischer Zytokine in einer Keratinozytenzelllinie können als Modell für Folgestudien mit Primärkulturen oder klinischen Biopsien aus der Mundhöhle in Bezug auf die Regulation antimikrobieller Peptide herangezogen werden.

9 Schlussfolgerungen

Entgegen der bisherigen Datenlage, dass hBD-1 in Epithelzellen konstant exprimiert wird, konnte die vorliegende Studie erstmals zeigen, dass EMD die Expression von hBD-1 in HaCaT-Zellen nach 12 und 24 h signifikant hemmt. Ähnliche Ergebnisse zeigten sich nach Stimulation mit TNF-α. Auch hier fand eine signifikant geringere Genexpression von hBD-1 im Vergleich zur negativen Kontrolle nach 12 h und 24 h statt.

EMD scheint dagegen keinen regulatorischen Einfluss auf die Genexpression von hBD-2 und hBD-3 aufzuweisen.

Zudem konnte unsere Studie bestätigen, dass das, zu den antimikrobiellen Peptiden gehörende, LL-37 nicht in HaCaT-Zellen exprimiert wird.

Dagegen stimulierte EMD signifikant die Genexpression des proinflammatorischen Zytokins IL-1β.

Das parodontal regenerativ wirkende EMD hat Einfluss auf die Genexpression von AMP’s, speziell hBD-1. Es bleibt noch herauszufinden, ob neben hBD-3 auch hBD-1 in der epithelialen Wundheilung eine Rolle spielt.

.

10 Literaturverzeichnis

1. Akiyama, Toshihiro; Niyonsaba, François; Kiatsurayanon, Chanisa; Nguyen, Toan The; Ushio, Hiroko; Fujimura, Tsutomu et al. (2014): The human cathelicidin LL-37 host defense peptide upregulates tight junction-related proteins and increases human epidermal keratinocyte barrier function. In: *Journal of innate immunity* 6 (6), S. 739–753. DOI: 10.1159/000362789.

2. Al-Hezaimi, Khalid; Al-Askar, Mansour; Al-Fahad, Hamad; Al-Rasheed, Abdulaziz; Al-Sourani, Nabil; Griffin, Terrence et al. (2012): Effect of enamel matrix derivative protein on the healing of standardized epithelial wounds: a histomorphometric analysis in vivo. In: *International wound journal* 9 (4), S. 436–441. DOI: 10.1111/j.1742-481X.2011.00904.x.

3. Arceo, N.; Sauk, J. J.; Moehring, J.; Foster, R. A.; Somerman, M. J. (1991): Human periodontal cells initiate mineral-like nodules in vitro. In: *Journal of periodontology* 62 (8), S. 499–503. DOI: 10.1902/jop.1991.62.8.499.

4. Arimura, Yasuji; Ashitani, Jun-ichi; Yanagi, Shigehisa; Tokojima, Masatoshi; Abe, Koh; Mukae, Hiroshi; Nakazato, Masamitsu (2004): Elevated serum beta-defensins concentrations in patients with lung cancer. In: *Anticancer research* 24 (6), S. 4051–4057.

5. Bartold, P. M.; Gronthos, S.; Ivanovski, S.; Fisher, A.; Hutmacher, D. W. (2015): Tissue engineered periodontal products. In: *Journal of periodontal research. DOI:* 10.1111/jre.12275.

6. Benic, Goran I.; Hämmerle, Christoph H. F. (2014): Horizontal bone augmentation by means of guided bone regeneration. In: *Periodontology 2000* 66 (1), S. 13–40. DOI: 10.1111/prd.12039.

7. Bensch, K. W.; Raida, M.; Mägert, H. J.; Schulz-Knappe, P.; Forssmann, W. G. (1995): hBD-1: a novel beta-defensin from human plasma. In: *FEBS letters* 368 (2), S. 331–335.

8. Bertl, Kristina; An, Na; Bruckmann, Corinna; Dard, Michel; Andrukhov, Oleh; Matejka, Michael; Rausch-Fan, Xiaohui (2009): Effects of enamel matrix derivative on proliferation/viability, migration, and expression of angiogenic factor and adhesion molecules in endothelial cells in vitro. In: *Journal of periodontology* 80 (10), S. 1622–1630. DOI: 10.1902/jop.2009.090157.

9. Boillot, Adrien; Demmer, Ryan T.; Mallat, Ziad; Sacco, Ralph L.; Jacobs, David R.; Benessiano, Joelle et al. (2015): Periodontal microbiota and phospholipases: The Oral Infections and Vascular Disease Epidemiology Study (INVEST). In: *Atherosclerosis* 242 (2), S. 418–423. DOI: 10.1016/j.atherosclerosis.2015.07.039.

10. Bongrazio, M.; Da Silva-Azevedo, L.; Bergmann, E. C.; Baum, O.; Hinz, B.; Pries, A. R.; Zakrzewicz, A. (2006): Shear stress modulates the expression of thrombospondin-1 and CD36 in endothelial cells in vitro and during shear stress-induced angiogenesis in vivo. In: *International journal of immunopathology and pharmacology* 19 (1), S. 35–48.

11. Boukamp, P.; Petrussevska, R. T.; Breitkreutz, D.; Hornung, J.; Markham, A.; Fusenig, N. E. (1988): Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. In: *The Journal of cell biology* 106 (3), S. 761–771.

12. Boukamp, P.; Popp, S.; Altmeyer, S.; Hülsen, A.; Fasching, C.; Cremer, T.; Fusenig, N. E. (1997): Sustained nontumorigenic phenotype correlates with a largely stable chromosome content during long-term culture of the human keratinocyte line HaCaT. In: *Genes, chromosomes & cancer* 19 (4), S. 201–214.

13. Bowdish, D. M. E.; Davidson, D. J.; Hancock, R. E. W. (2006): Immunomodulatory properties of defensins and cathelicidins. In: *Current topics in microbiology and immunology* 306, S. 27–66.

14. Brookes, S. J.; Robinson, C.; Kirkham, J.; Bonass, W. A. (1995): Biochemistry and molecular biology of amelogenin proteins of developing dental enamel. In: *Archives of oral biology* 40 (1), S. 1–14.

15. Bucki, Robert; Leszczyńska, Katarzyna; Namiot, Andrzej; Sokołowski, Wojciech (2010): Cathelicidin LL-37: a multitask antimicrobial peptide. In: *Archivum immunologiae et therapiae experimentalis* 58 (1), S. 15–25. DOI: 10.1007/s00005-009-0057-2.

16. Campbell, Eric L.; Serhan, Charles N.; Colgan, Sean P. (2011): Antimicrobial aspects of inflammatory resolution in the mucosa: a role for proresolving mediators. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 187 (7), S. 3475–3481. DOI: 10.4049/jimmunol.1100150.

17. Campos, Miguel A.; Vargas, Miguel A.; Regueiro, Verónica; Llompart, Catalina M.; Albertí, Sebastián; Bengoechea, José A. (2004): Capsule polysaccharide mediates bacterial resistance to antimicrobial peptides. In: *Infection and immunity* 72 (12), S. 7107–7114. DOI: 10.1128/IAI.72.12.7107-7114.2004.

18. Caton, J. G. (1997): Overview of clinical trials on periodontal regeneration. In: *Annals of periodontology / the American Academy of Periodontology* 2 (1), S. 215–222. DOI: 10.1902/annals.1997.2.1.215.

19. Cerný, R.; Slaby, I.; Hammarström, L.; Wurtz, T. (1996): A novel gene expressed in rat ameloblasts codes for proteins with cell binding domains. In: *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 11 (7), S. 883–891. DOI: 10.1002/jbmr.5650110703.

20. Chamorro, Clara I.; Weber, Günther; Grönberg, Alvar; Pivarcsi, Andor; Ståhle, Mona (2009): The human antimicrobial peptide LL-37 suppresses apoptosis in keratinocytes. In: *The Journal of investigative dermatology* 129 (4), S. 937–944. DOI: 10.1038/jid.2008.321.

21. Chertov, O.; Michiel, D. F.; Xu, L.; Wang, J. M.; Tani, K.; Murphy, W. J. et al. (1996): Identification of defensin-1, defensin-2, and CAP37/azurocidin as T-cell chemoattractant proteins released from interleukin-8-stimulated neutrophils. In: *The Journal of biological chemistry* 271 (6), S. 2935–2940.

22. Coraux, Christelle; Hajj, Rodolphe; Lesimple, Pierre; Puchelle, Edith (2005): Réparation et régénération de l'épithélium respiratoire. In: *Médecine sciences : M/S* 21 (12), S. 1063–1069. DOI: 10.1051/medsci/200521121063.

23. Cueva, Marco A.; Boltchi, Farhad E.; Hallmon, William W.; Nunn, Martha E.; Rivera-Hidalgo, Francisco; Rees, Terry (2004): A comparative study of coronally advanced flaps with and without the addition of enamel matrix derivative in the treatment of marginal tissue recession. In: *Journal of periodontology* 75 (7), S. 949–956. DOI: 10.1902/jop.2004.75.7.949.

24. Dale, B. A.; Kimball, J. R.; Krisanaprakornkit, S.; Roberts, F.; Robinovitch, M.; O'Neal, R. et al. (2001): Localized antimicrobial peptide expression in human gingiva. In: *Journal of periodontal research* 36 (5), S. 285–294.

25. Davenport, D. R.; Mailhot, J. M.; Wataha, J. C.; Billman, M. A.; Sharawy, M. M.; Shrout, M. K. (2003): Effects of enamel matrix protein application on the viability, proliferation, and attachment of human periodontal ligament fibroblasts to diseased root surfaces in vitro. In: *Journal of clinical periodontology* 30 (2), S. 125–131.

26. Deschner, J.; Eick, S.; Damanaki, A.; Nokhbehsaim, M. (2014): The role of adipokines in periodontal infection and healing. In: *Molecular oral microbiology* 29 (6), S. 258–269. DOI: 10.1111/omi.12070.

27. Desvarieux, Moïse; Demmer, Ryan T.; Jacobs, David R.; Rundek, Tatjana; Boden-Albala, Bernadette; Sacco, Ralph L.; Papapanou, Panos N. (2010): Periodontal bacteria and hypertension: the oral infections and vascular disease epidemiology study (INVEST). In: *Journal of hypertension* 28 (7), S. 1413–1421. DOI: 10.1097/HJH.0b013e328338cd36.

28. Detert, Jacqueline; Pischon, Nicole; Burmester, Gerd R.; Buttgereit, Frank (2010): The association between rheumatoid arthritis and periodontal disease. In: *Arthritis research & therapy* 12 (5), S. 218. DOI: 10.1186/ar3106.

29. Deutsch, D.; Palmon, A.; Fisher, L. W.; Kolodny, N.; Termine, J. D.; Young, M. F. (1991): Sequencing of bovine enamelin ("tuftelin") a novel acidic enamel protein. In: *The Journal of biological chemistry* 266 (24), S. 16021–16028.

30. Deutsch, Dan; Haze-Filderman, Amir; Blumenfeld, Anat; Dafni, Leah; Leiser, Yoav; Shay, Boaz et al. (2006): Amelogenin, a major structural protein in mineralizing enamel, is also expressed in soft tissues: brain and cells of the hematopoietic system. In: *European journal of oral sciences* 114 Suppl 1, S. 183-9; discussion 201-2, 381. DOI: 10.1111/j.1600-0722.2006.00301.x.

31. Devine, Deirdre A. (2003): Antimicrobial peptides in defence of the oral and respiratory tracts. In: *Molecular immunology* 40 (7), S. 431–443.

32. Diamond, G.; Zasloff, M.; Eck, H.; Brasseur, M.; Maloy, W. L.; Bevins, C. L. (1991): Tracheal antimicrobial peptide, a cysteine-rich peptide from mammalian tracheal mucosa: peptide isolation and cloning of a cDNA. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88 (9), S. 3952–3956.

33. Dommisch, H.; Açil, Y.; Dunsche, A.; Winter, J.; Jepsen, S. (2005): Differential gene expression of human beta-defensins (hBD-1, -2, -3) in inflammatory gingival diseases. In: *Oral microbiology and immunology* 20 (3), S. 186–190. DOI: 10.1111/j.1399-302X.2005.00211.x.

34. Dommisch, H.; Açil, Y.; Dunsche, A.; Winter, J.; Jepsen, S. (2005): Differential gene expression of human beta-defensins (hBD-1, -2, -3) in inflammatory gingival diseases. In: *Oral microbiology and immunology* 20 (3), S. 186–190. DOI: 10.1111/j.1399-302X.2005.00211.x.

35. Dommisch, H.; Staufenbiel, I.; Schulze, K.; Stiesch, M.; Winkel, A.; Fimmers, R. et al. (2015): Expression of antimicrobial peptides and interleukin-8 during early stages of inflammation: An experimental gingivitis study. In: *Journal of periodontal research* 50 (6), S. 836–845. DOI: 10.1111/jre.12271.

36. Dommisch, Henrik; Jepsen, Søren (2015): Diverse functions of defensins and other antimicrobial peptides in periodontal tissues. In: *Periodontology 2000* 69 (1), S. 96–110. DOI: 10.1111/prd.12093.

37. Dunsche, Anton; Açil, Yahya; Dommisch, Henrik; Siebert, Reiner; Schröder, Jens M.; Jepsen, Søren (2002): The novel human beta-defensin-3 is widely expressed in oral tissues. In: *European journal of oral sciences* 110 (2), S. 121–124.

38. Fan, Daming; Iijima, Mayumi; Bromley, Keith M.; Yang, Xiudong; Mathew, Shibi; Moradian-Oldak, Janet (2011): The cooperation of enamelin and amelogenin in controlling octacalcium phosphate crystal morphology. In: *Cells, tissues, organs* 194 (2-4), S. 194–198. DOI: 10.1159/000324208.

39. Fox, Ervin R.; Musani, Solomon K.; Singh, Preeti; Bidulescu, Aurelian; Nagarajarao, Harsha S.; Samdarshi, Tandaw E. et al. (2013): Association of plasma B-type natriuretic peptide concentrations with longitudinal blood pressure tracking in African Americans: findings from the Jackson Heart Study. In: *Hypertension* 61 (1), S. 48–54. DOI: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.112.197657.

40. Froy, Oren (2005): Regulation of mammalian defensin expression by Toll-like receptor-dependent and independent signalling pathways. In: *Cellular microbiology* 7 (10), S. 1387–1397. DOI: 10.1111/j.1462-5822.2005.00590.x.

41. Fukae, M.; Tanabe, T.; Uchida, T.; Lee, S. K.; Ryu, O. H.; Murakami, C. et al. (1998): Enamelysin (matrix metalloproteinase-20): localization in the developing tooth and effects of pH and calcium on amelogenin hydrolysis. In: *Journal of dental research* 77 (8), S. 1580–1588.

42. Funderburg, Nicholas; Lederman, Michael M.; Feng, Zhimin; Drage, Michael G.; Jadlowsky, Julie; Harding, Clifford V. et al. (2007): Human -defensin-3 activates professional antigen-presenting cells via Toll-like receptors 1 and 2. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104 (47), S. 18631–18635. DOI: 10.1073/pnas.0702130104.

43. Funderburg, Nicholas T.; Jadlowsky, Julie K.; Lederman, Michael M.; Feng, Zhimin; Weinberg, Aaron; Sieg, Scott F. (2011): The Toll-like receptor 1/2 agonists Pam(3) CSK(4) and human β-defensin-3 differentially induce interleukin-10 and nuclear factor-κB signalling patterns in human monocytes. In: *Immunology* 134 (2), S. 151–160. DOI: 10.1111/j.1365-2567.2011.03475.x.

44. Fusenig, N. E.; Boukamp, P.; Breitkreutz, D.; Hülsen, A.; Petrusevska, S.; Cerutti, P.; Stanbridge, E. (1990): In vitro transformation of human skin epithelial cells: Role of RAS oncogene in malignant progression. In: *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA* 4 (4-5), S. 627–634.

45. Gallon, Victoria; Chen, Lisha; Yang, Xiudong; Moradian-Oldak, Janet (2013): Localization and quantitative co-localization of enamelin with amelogenin. In: *Journal of structural biology* 183 (2), S. 239–249. DOI: 10.1016/j.jsb.2013.03.014.

46. Ganz, T.; Selsted, M. E.; Szklarek, D.; Harwig, S. S.; Daher, K.; Bainton, D. F.; Lehrer, R. I. (1985): Defensins. Natural peptide antibiotics of human neutrophils. In: *The Journal of clinical investigation* 76 (4), S. 1427–1435. DOI: 10.1172/JCI112120.

47. García, J. R.; Jaumann, F.; Schulz, S.; Krause, A.; Rodríguez-Jiménez, J.; Forssmann, U. et al. (2001): Identification of a novel, multifunctional beta-defensin (human beta-defensin 3) with specific antimicrobial activity. Its interaction with plasma membranes of Xenopus oocytes and the induction of macrophage chemoattraction. In: *Cell and tissue research* 306 (2), S. 257–264. DOI: 10.1007/s004410100433.

48. Gestrelius, S.; Andersson, C.; Johansson, A. C.; Persson, E.; Brodin, A.; Rydhag, L.; Hammarström, L. (1997): Formulation of enamel matrix derivative for surface coating. Kinetics and cell colonization. In: *Journal of clinical periodontology* 24 (9 Pt 2), S. 678–684.

49. Gomes, Pedro de Sousa; Fernandes, Maria Helena (2010): Defensins in the oral cavity: distribution and biological role. In: *Journal of oral pathology & medicine : official publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology* 39 (1), S. 1–9. DOI: 10.1111/j.1600-0714.2009.00832.x.

50. Grandin, H. Michelle; Gemperli, Anja C.; Dard, Michel (2012): Enamel matrix derivative: a review of cellular effects in vitro and a model of molecular arrangement and functioning. In: *Tissue engineering. Part B, Reviews* 18 (3), S. 181–202. DOI: 10.1089/ten.TEB.2011.0365.

51. Grayson, Rachel E.; Yamakoshi, Y.; Wood, Edward J.; Agren, Magnus S. (2006): The effect of the amelogenin fraction of enamel matrix proteins on fibroblast-mediated collagen matrix reorganization. In: *Biomaterials* 27 (15), S. 2926–2933.

52. Gursoy, Ulvi Kahraman; Könönen, Eija (2012): Understanding the roles of gingival beta-defensins. In: *Journal of oral microbiology* 4. DOI: 10.3402/jom.v4i0.15127.

53. Habets, Michelle G J L; Brockhurst, Michael A. (2012): Therapeutic antimicrobial peptides may compromise natural immunity. In: *Biology letters* 8 (3), S. 416–418. DOI: 10.1098/rsbl.2011.1203.

54. Hägewald, Stefan; Spahr, Axel; Rompola, Eirini; Haller, Bernd; Heijl, Lars; Bernimoulin, Jean-Pierre (2002): Comparative study of Emdogain and coronally advanced flap technique in the treatment of human gingival recessions. A prospective controlled clinical study. In: *Journal of clinical periodontology* 29 (1), S. 35–41.

55. Hajishengallis, George (2015): Periodontitis: from microbial immune subversion to systemic inflammation. In: *Nature reviews. Immunology* 15 (1), S. 30–44. DOI: 10.1038/nri3785.

56. Hammarström, L. (1997): Enamel matrix, cementum development and regeneration. In: *Journal of clinical periodontology* 24 (9 Pt 2), S. 658–668.

57. Hammarström, L. (1997): The role of enamel matrix proteins in the development of cementum and periodontal tissues. In: *Ciba Foundation symposium* 205, S. 246-55; discussion 255-60.

58. Hammarström, L.; Heijl, L.; Gestrelius, S. (1997): Periodontal regeneration in a buccal dehiscence model in monkeys after application of enamel matrix proteins. In: *Journal of clinical periodontology* 24 (9 Pt 2), S. 669–677.

59. Harder, J.; Bartels, J.; Christophers, E.; Schroder, J. M. (2001): Isolation and characterization of human beta -defensin-3, a novel human inducible peptide antibiotic. In: *The Journal of biological chemistry* 276 (8), S. 5707–5713. DOI: 10.1074/jbc.M008557200.

60. Harder, J.; Bartels, J.; Christophers, E.; Schröder, J. M. (1997): A peptide antibiotic from human skin. In: *Nature* 387 (6636), S. 861. DOI: 10.1038/43088.

61. Harder, J.; Meyer-Hoffert, U.; Teran, L. M.; Schwichtenberg, L.; Bartels, J.; Maune, S.; Schröder, J. M. (2000): Mucoid Pseudomonas aeruginosa, TNF-alpha, and IL-1beta, but not IL-6, induce human beta-defensin-2 in respiratory epithelia. In: *American journal of respiratory cell and molecular biology* 22 (6), S. 714–721. DOI: 10.1165/ajrcmb.22.6.4023.

62. Hazrati, Ehsan; Galen, Benjamin; Lu, Wuyuan; Wang, Wei; Ouyang, Yan; Keller, Marla J. et al. (2006): Human alpha- and beta-defensins block multiple steps in herpes simplex virus infection. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 177 (12), S. 8658–8666.

63. Heng, Nora H. M.; N'Guessan, Philippe D.; Kleber, Bernd-Michael; Bernimoulin, Jean-Pierre; Pischon, Nicole (2007): Enamel matrix derivative induces connective tissue growth factor expression in human osteoblastic cells. In: *Journal of periodontology* 78 (12), S. 2369–2379. DOI: 10.1902/jop.2007.070130.

64. Hirotomi, Toshinobu; Kocher, Thomas; Yoshihara, Akihiro; Biffar, Reiner; Micheelis, Wolfgang; Hoffmann, Thomas et al. (2014): Comparison of periodontal conditions among three elderly populations in Japan and Germany. In: *Journal of clinical periodontology* 41 (7), S. 633–642. DOI: 10.1111/jcpe.12267.

65. Hoang, A. M.; Oates, T. W.; Cochran, D. L. (2000): In vitro wound healing responses to enamel matrix derivative. In: *Journal of periodontology* 71 (8), S. 1270–1277. DOI: 10.1902/jop.2000.71.8.1270.

66. Holtfreter, Birte; Schwahn, Christian; Biffar, Reiner; Kocher, Thomas (2009): Epidemiology of periodontal diseases in the Study of Health in Pomerania. In: *Journal of clinical periodontology* 36 (2), S. 114–123. DOI: 10.1111/j.1600-051X.2008.01361.x.

67. Inomata, Megumi; Into, Takeshi; Murakami, Yukitaka (2010): Suppressive effect of the antimicrobial peptide LL-37 on expression of IL-6, IL-8 and CXCL10 induced by Porphyromonas gingivalis cells and extracts in human gingival fibroblasts. In: *European journal of oral sciences* 118 (6), S. 574–581. DOI: 10.1111/j.1600-0722.2010.00775.x.

68. Jia, H. P.; Schutte, B. C.; Schudy, A.; Linzmeier, R.; Guthmiller, J. M.; Johnson, G. K. et al. (2001): Discovery of new human beta-defensins using a genomics-based approach. In: *Gene* 263 (1-2), S. 211–218.

69. Jiang, S-Y; Shu, R.; Song, Z-C; Xie, Y-F (2011): Effects of enamel matrix proteins on proliferation, differentiation and attachment of human alveolar osteoblasts. In: *Cell proliferation* 44 (4), S. 372–379. DOI: 10.1111/j.1365-2184.2011.00762.x.

70. Jönsson, D.; Nebel, D.; Bratthall, G.; Nilsson, B-O (2011): The human periodontal ligament cell: a fibroblast-like cell acting as an immune cell. In: *Journal of periodontal research* 46 (2), S. 153–157. DOI: 10.1111/j.1600-0765.2010.01331.x.

71. Kasaj, A.; Meister, J.; Lehmann, K.; Stratul, S. I.; Schlee, M.; Stein, J. M. et al. (2012): The influence of enamel matrix derivative on the angiogenic activity of primary endothelial cells. In: *Journal of periodontal research* 47 (4), S. 479–487. DOI: 10.1111/j.1600-0765.2011.01456.x.

72. Kauvar, Amy S.; Thoma, Daniel S.; Carnes, David L.; Cochran, David L. (2010): In vivo angiogenic activity of enamel matrix derivative. In: *Journal of periodontology* 81 (8), S. 1196–1201. DOI: 10.1902/jop.2010.090441.

73. Kawase, T.; Okuda, K.; Momose, M.; Kato, Y.; Yoshie, H.; Burns, D. M. (2001): Enamel matrix derivative (EMDOGAIN) rapidly stimulates phosphorylation of the MAP kinase family and nuclear accumulation of smad2 in both oral epithelial and fibroblastic human cells. In: *Journal of periodontal research* 36 (6), S. 367–376.

74. Kawase, T.; Okuda, K.; Yoshie, H.; Burns, D. M. (2000): Cytostatic action of enamel matrix derivative (EMDOGAIN) on human oral squamous cell carcinoma-derived SCC25 epithelial cells. In: *Journal of periodontal research* 35 (5), S. 291–300.

75. Kawase, Tomoyuki; Okuda, Kazuhiro; Yoshie, Hiromasa; Burns, Douglas M. (2002): Anti-TGF-beta antibody blocks enamel matrix derivative-induced upregulation of p21WAF1/cip1 and prevents its inhibition of human oral epithelial cell proliferation. In: *Journal of periodontal research* 37 (4), S. 255–262.

76. Kawsar, Hameem I.; Ghosh, Santosh K.; Hirsch, Stanley A.; Koon, Henry B.; Weinberg, Aaron; Jin, Ge (2010): Expression of human beta-defensin-2 in intratumoral vascular endothelium and in endothelial cells induced by transforming growth factor beta. In: *Peptides* 31 (2), S. 195–201. DOI: 10.1016/j.peptides.2009.12.008.

77. Khedmat, Sedigheh; Hadjati, Jamshid; Iravani, Azita; Nourizadeh, Maryam (2010): Effects of enamel matrix derivative on the viability, cytokine secretion, and phagocytic activity of human monocytes. In: *Journal of endodontics* 36 (6), S. 1000–1003. DOI: 10.1016/j.joen.2010.02.032.

78. Kida, M.; Ariga, T.; Shirakawa, T.; Oguchi, H.; Sakiyama, Y. (2002): Autosomal-dominant hypoplastic form of amelogenesis imperfecta caused by an enamelin gene mutation at the exon-intron boundary. In: *Journal of dental research* 81 (11), S. 738–742.

79. Kim, Ji Eun; Kim, Beom Joon; Jeong, Mi Sook; Seo, Seong Jun; Kim, Myeung Nam; Hong, Chang Kwun; Ro, Byung In (2005): Expression and modulation of LL-37 in normal human keratinocytes, HaCaT cells, and inflammatory skin diseases. In: *Journal of Korean medical science* 20 (4), S. 649–654.

80. Kisich, Kevin O.; Howell, Michael D.; Boguniewicz, Mark; Heizer, Heather R.; Watson, Nori U.; Leung, Donald Y. M. (2007): The constitutive capacity of human keratinocytes to kill Staphylococcus aureus is dependent on beta-defensin 3. In: *The Journal of investigative dermatology* 127 (10), S. 2368–2380. DOI: 10.1038/sj.jid.5700861.

81. Lafzi, Ardeshir; Chitsazi, Mohammad Taghi; Farahani, Ramin Mostofi Zadeh; Faramarzi, Masoumeh (2011): Comparative clinical study of coronally advanced flap with and without use of plasma rich in growth factors in the treatment of gingival recession. In: *American journal of dentistry* 24 (3), S. 143–147.

82. Leikina, Eugenia; Delanoe-Ayari, Helene; Melikov, Kamran; Cho, Myoung-Soon; Chen, Andrew; Waring, Alan J. et al. (2005): Carbohydrate-binding molecules inhibit viral fusion and entry by crosslinking membrane glycoproteins. In: *Nature immunology* 6 (10), S. 995–1001. DOI: 10.1038/ni1248.

83. Leiser, Yoav; Blumenfeld, Anat; Haze, Amir; Dafni, Leah; Taylor, Angela L.; Rosenfeld, Eli et al. (2007): Localization, quantification, and characterization of tuftelin in soft tissues. In: *Anatomical record (Hoboken, N.J. : 2007)* 290 (5), S. 449–454. DOI: 10.1002/ar.20512.

84. Leiser, Yoav; Silverstein, Nechama; Blumenfeld, Anat; Shilo, Dekel; Haze, Amir; Rosenfeld, Eli et al. (2011): The induction of tuftelin expression in PC12 cell line during hypoxia and NGF-induced differentiation. In: *Journal of cellular physiology* 226 (1), S. 165–172. DOI: 10.1002/jcp.22318.

85. Liu, Jiarong; Du, Xingyan; Chen, Jie; Hu, Li; Chen, Lili (2013): The induction expression of human β-defensins in gingival epithelial cells and fibroblasts. In: *Archives of oral biology* 58 (10), S. 1415–1421. DOI: 10.1016/j.archoralbio.2013.04.013.

86. Lu, Qian; Darveau, Richard P.; Samaranayake, Lakshman P.; Wang, Cun-Yu; Jin, Lijian (2009): Differential modulation of human {beta}-defensins expression in human gingival epithelia by Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide with tetra- and penta-acylated lipid A structures. In: *Innate immunity* 15 (6), S. 325–335. DOI: 10.1177/1753425909104899.

87. Lyngstadaas, S. P.; Lundberg, E.; Ekdahl, H.; Andersson, C.; Gestrelius, S. (2001): Autocrine growth factors in human periodontal ligament cells cultured on enamel matrix derivative. In: *Journal of clinical periodontology* 28 (2), S. 181–188.

88. Metcalf, Devon; Weese, J. Scott (2012): Evaluation of commercial kits for extraction of DNA and RNA from Clostridium difficile. In: *Anaerobe* 18 (6), S. 608–613. DOI: 10.1016/j.anaerobe.2012.10.003.

89. Niyonsaba, François; Iwabuchi, Kazuhisa; Matsuda, Hiroshi; Ogawa, Hideoki; Nagaoka, Isao (2002): Epithelial cell-derived human beta-defensin-2 acts as a chemotaxin for mast cells through a pertussis toxin-sensitive and phospholipase C-dependent pathway. In: *International immunology* 14 (4), S. 421–426.

90. Niyonsaba, François; Ushio, Hiroko; Hara, Mutsuko; Yokoi, Hidenori; Tominaga, Mitsutoshi; Takamori, Kenji et al. (2010): Antimicrobial peptides human beta-defensins and cathelicidin LL-37 induce the secretion of a pruritogenic cytokine IL-31 by human mast cells. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 184 (7), S. 3526–3534. DOI: 10.4049/jimmunol.0900712.

91. Niyonsaba, François; Ushio, Hiroko; Nakano, Nobuhiro; Ng, William; Sayama, Koji; Hashimoto, Koji et al. (2007): Antimicrobial peptides human beta-defensins stimulate epidermal keratinocyte migration,

proliferation and production of proinflammatory cytokines and chemokines. In: *The Journal of investigative dermatology* 127 (3), S. 594–604. DOI: 10.1038/sj.jid.5700599.

92. Nokhbehsaim, Marjan; Deschner, Birgit; Winter, Jochen; Bourauel, Christoph; Jäger, Andreas; Jepsen, Søren; Deschner, James (2012): Anti-inflammatory effects of EMD in the presence of biomechanical loading and interleukin-1β in vitro. In: *Clinical oral investigations* 16 (1), S. 275–283. DOI: 10.1007/s00784-010-0505-8.

93. Otte, Jan-Michel; Werner, Ilka; Brand, Stephan; Chromik, Ansgar M.; Schmitz, Frank; Kleine, Michael; Schmidt, Wolfgang E. (2008): Human beta defensin 2 promotes intestinal wound healing in vitro. In: *Journal of cellular biochemistry* 104 (6), S. 2286–2297. DOI: 10.1002/jcb.21787.

94. Oudhoff, Menno J.; Blaauboer, Marjolein E.; Nazmi, Kamran; Scheres, Nina; Bolscher, Jan G. M.; Veerman, Enno C. I. (2010): The role of salivary histatin and the human cathelicidin LL-37 in wound healing and innate immunity. In: *Biological chemistry* 391 (5), S. 541–548. DOI: 10.1515/BC.2010.057.

95. Ouhara, Kazuhisa; Komatsuzawa, Hitoshi; Yamada, Sakuo; Shiba, Hideki; Fujiwara, Tamaki; Ohara, Masaru et al. (2005): Susceptibilities of periodontopathogenic and cariogenic bacteria to antibacterial peptides, {beta}-defensins and LL37, produced by human epithelial cells. In: *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 55 (6), S. 888–896. DOI: 10.1093/jac/dki103.

96. Paine, C. T.; Paine, M. L.; Luo, W.; Okamoto, C. T.; Lyngstadaas, S. P.; Snead, M. L. (2000): A tuftelin-interacting protein (TIP39) localizes to the apical secretory pole of mouse ameloblasts. In: *The Journal of biological chemistry* 275 (29), S. 22284–22292. DOI: 10.1074/jbc.M000118200.

97. Paris, Sebastian; Wolgin, Michael; Kielbassa, Andrej Michael; Pries, Axel; Zakrzewicz, Andreas (2009): Gene expression of human beta-defensins in healthy and inflamed human dental pulps. In: *Journal of endodontics* 35 (4), S. 520–523. DOI: 10.1016/j.joen.2008.12.015.

98. Park, Hyun Jeong; Cho, Dae Ho; Kim, Hee Jung; Lee, Jun Young; Cho, Baik Kee; Bang, Sa Ik et al. (2009): Collagen synthesis is suppressed in dermal fibroblasts by the human antimicrobial peptide LL-37. In: *The Journal of investigative dermatology* 129 (4), S. 843–850. DOI: 10.1038/jid.2008.320.

99. Parkar, Mohamed H.; Tonetti, Maurizio (2004): Gene expression profiles of periodontal ligament cells treated with enamel matrix proteins in vitro: analysis using cDNA arrays. In: *Journal of periodontology* 75 (11), S. 1539–1546. DOI: 10.1902/jop.2004.75.11.1539.

100. Parodi, R.; Liuzzo, G.; Patrucco, P.; Brunel, G.; Santarelli, G. A.; Birardi, V.; Gasparetto, B. (2000): Use of Emdogain in the treatment of deep intrabony defects: 12-month clinical results. Histologic and radiographic evaluation. In: *The International journal of periodontics & restorative dentistry* 20 (6), S. 584–595.

101. Pischon, N.; Heng, N.; Bernimoulin, J-P; Kleber, B-M; Willich, S. N.; Pischon, T. (2007): Obesity, inflammation, and periodontal disease. In: *Journal of dental research* 86 (5), S. 400–409.

102. Pischon, Nicole; Zimmermann, Bernd; Bernimoulin, Jean-Pierre; Hägewald, Stefan (2006): Effects of an enamel matrix derivative on human osteoblasts and PDL cells grown in organoid cultures. In: *Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics* 102 (4), S. 551–557. DOI: 10.1016/j.tripleo.2005.08.040.

103. Popadiak, Katarzyna; Potempa, Jan; Riesbeck, Kristian; Blom, Anna M. (2007): Biphasic effect of gingipains from Porphyromonas gingivalis on the human complement system. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 178 (11), S. 7242–7250.

104. Potempa, Michal; Potempa, Jan; Kantyka, Tomasz; Nguyen, Ky-Anh; Wawrzonek, Katarzyna; Manandhar, Surya P. et al. (2009): Interpain A, a cysteine proteinase from Prevotella intermedia, inhibits complement by degrading complement factor C3. In: *PLoS pathogens* 5 (2), S. e1000316. DOI: 10.1371/journal.ppat.1000316.

105. Preshaw, P. M.; Alba, A. L.; Herrera, D.; Jepsen, S.; Konstantinidis, A.; Makrilakis, K.; Taylor, R. (2012): Periodontitis and diabetes: a two-way relationship. In: *Diabetologia* 55 (1), S. 21–31. DOI: 10.1007/s00125-011-2342-y.

106. Radonić, Aleksandar; Thulke, Stefanie; Mackay, Ian M.; Landt, Olfert; Siegert, Wolfgang; Nitsche, Andreas (2004): Guideline to reference gene selection for quantitative real-time PCR. In: *Biochemical and biophysical research communications* 313 (4), S. 856–862.

107. Rathva, Vandana J. (2011): Enamel matrix protein derivatives: role in periodontal regeneration. In: *Clinical, cosmetic and investigational dentistry* 3, S. 79–92. DOI: 10.2147/CCIDEN.S25347.

108. Rincon, J. C.; Xiao, Y.; Young, W. G.; Bartold, P. M. (2005): Enhanced proliferation, attachment and osteopontin expression by porcine periodontal cells exposed to Emdogain. In: *Archives of oral biology* 50 (12), S. 1047–1054.

109. Röhrl, Johann; Yang, De; Oppenheim, Joost J.; Hehlgans, Thomas (2010): Human beta-defensin 2 and 3 and their mouse orthologs induce chemotaxis through interaction with CCR2. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 184 (12), S. 6688–6694. DOI: 10.4049/jimmunol.0903984.

110. Ryle, C. M.; Breitkreutz, D.; Stark, H. J.; Leigh, I. M.; Steinert, P. M.; Roop, D.; Fusenig, N. E. (1989): Density-dependent modulation of synthesis of keratins 1 and 10 in the human keratinocyte line HACAT and in ras-transfected tumorigenic clones. In: *Differentiation; research in biological diversity* 40 (1), S. 42–54.

111. Saito, Noriko; Ariyoshi, Wataru; Okinaga, Toshinori; Kamegawa, Mariko; Matsukizono, Miho; Akebiyama, Yasuo et al. (2014): Inhibitory effects of ameloblastin on epithelial cell proliferation. In: *Archives of oral biology* 59 (8), S. 835–840. DOI: 10.1016/j.archoralbio.2014.05.010.

112. Sakallioğlu, Umur; Açikgöz, Gökhan; Ayas, Bülent; Kirtiloğlu, Tuğrul; Sakallioğlu, Eser (2004): Healing of periodontal defects treated with enamel matrix proteins and root surface conditioning--an experimental study in dogs. In: *Biomaterials* 25 (10), S. 1831–1840.

113. Sass, Vera; Schneider, Tanja; Wilmes, Miriam; Körner, Christian; Tossi, Alessandro; Novikova, Natalia et al. (2010): Human beta-defensin 3 inhibits cell wall biosynthesis in Staphylococci. In: *Infection and immunity* 78 (6), S. 2793–2800. DOI: 10.1128/IAI.00688-09.

114. Schlueter, Scott R.; Carnes, David L.; Cochran, David L. (2007): In vitro effects of enamel matrix derivative on microvascular cells. In: *Journal of periodontology* 78 (1), S. 141–151. DOI: 10.1902/jop.2007.060111.

115. Schreml, Stephan; Szeimies, Rolf-Markus; Prantl, Lukas; Landthaler, Michael; Babilas, Philipp (2010): Wound healing in the 21st century. In: *Journal of the American Academy of Dermatology* 63 (5), S. 866–881. DOI: 10.1016/j.jaad.2009.10.048.

116. Schröder, J. M.; Harder, J. (1999): Human beta-defensin-2. In: *The international journal of biochemistry & cell biology* 31 (6), S. 645–651.

117. Schroeder, Bjoern O.; Wu, Zhihong; Nuding, Sabine; Groscurth, Sandra; Marcinowski, Moritz; Beisner, Julia et al. (2011): Reduction of disulphide bonds unmasks potent antimicrobial activity of human β-defensin 1. In: *Nature* 469 (7330), S. 419–423. DOI: 10.1038/nature09674.

118. Schützhold, Svenja; Kocher, Thomas; Biffar, Reiner; Hoffmann, Thomas; Schmidt, Carsten O.; Micheelis, Wolfgang et al. (2015): Changes in prevalence of periodontitis in two German population-based studies. In: *Journal of clinical periodontology* 42 (2), S. 121–130. DOI: 10.1111/jcpe.12352.

119. Sculean, Anton; Chapple, Iain L. C.; Giannobile, William V. (2015): Wound models for periodontal and bone regeneration: the role of biologic research. In: *Periodontology 2000* 68 (1), S. 7–20. DOI: 10.1111/prd.12091.

120. Sculean, Anton; Nikolidakis, Dimitris; Nikou, George; Ivanovic, Aleksandar; Chapple, Iain L. C.; Stavropoulos, Andreas (2015): Biomaterials for promoting periodontal regeneration in human intrabony defects: a systematic review. In: *Periodontology 2000* 68 (1), S. 182–216. DOI: 10.1111/prd.12086.

121. Semple, Fiona; Dorin, Julia R. (2012): β-Defensins: multifunctional modulators of infection, inflammation and more? In: *Journal of innate immunity* 4 (4), S. 337–348. DOI: 10.1159/000336619.

122. Seo, S. J.; Ahn, S. W.; Hong, C. K.; Ro, B. I. (2001): Expressions of beta-defensins in human keratinocyte cell lines. In: *Journal of dermatological science* 27 (3), S. 183–191.

123. Shin, Ji Eun; Baek, Keum Jin; Choi, Yun Sik; Choi, Youngnim (2013): A periodontal pathogen Treponema denticola hijacks the Fusobacterium nucleatum-driven host response. In: *Immunology and cell biology* 91 (8), S. 503–510. DOI: 10.1038/icb.2013.35.

124. Shin, Ji Eun; Choi, Youngnim (2010): Treponema denticola suppresses expression of human beta-defensin-2 in gingival epithelial cells through inhibition of TNFalpha production and TLR2 activation. In: *Molecules and cells* 29 (4), S. 407–412. DOI: 10.1007/s10059-010-0048-5.

125. Shin, Ji Eun; Kim, Young Sook; Oh, Ju-Eun; Min, Byung-Moo; Choi, Youngnim (2010): Treponema denticola suppresses expression of human {beta}-defensin-3 in gingival epithelial cells through inhibition of the toll-like receptor 2 axis. In: *Infection and immunity* 78 (2), S. 672–679. DOI: 10.1128/IAI.00808-09.

126. Silvestre-Rangil, Javier; Bagán, Leticia; Silvestre, Francisco Javier; Bagán, José Vicente (2016): Oral manifestations of rheumatoid arthritis. A cross-sectional study of 73 patients. In: *Clinical oral investigations. DOI:* 10.1007/s00784-016-1745-z.

127. Singh, P. K.; Jia, H. P.; Wiles, K.; Hesselberth, J.; Liu, L.; Conway, B. A. et al. (1998): Production of beta-defensins by human airway epithelia. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95 (25), S. 14961–14966.

128. Spahr, Axel; Haegewald, Stefan; Tsoulfidou, Fotini; Rompola, Eirini; Heijl, Lars; Bernimoulin, Jean-Pierre et al. (2005): Coverage of Miller class I and II recession defects using enamel matrix proteins versus coronally

advanced flap technique: a 2-year report. In: *Journal of periodontology* 76 (11), S. 1871–1880. DOI: 10.1902/jop.2005.76.11.1871.

129. Steiner, H.; Hultmark, D.; Engström, A.; Bennich, H.; Boman, H. G. (1981): Sequence and specificity of two antibacterial proteins involved in insect immunity. In: *Nature* 292 (5820), S. 246–248.

130. Taba, M.; Jin, Q.; Sugai, J. V.; Giannobile, W. V. (2005): Current concepts in periodontal bioengineering. In: *Orthodontics & craniofacial research* 8 (4), S. 292–302. DOI: 10.1111/j.1601-6343.2005.00352.x.

131. Takayanagi, Kazuaki; Osawa, Ginko; Nakaya, Hiroshi; Cochran, David L.; Kamoi, Kyuich; Oates, Thomas W. (2006): Effects of enamel matrix derivative on bone-related mRNA expression in human periodontal ligament cells in vitro. In: *Journal of periodontology* 77 (5), S. 891–898. DOI: 10.1902/jop.2006.050244.

132. Tatakis, Dimitris N.; Kumar, Purnima S. (2005): Etiology and pathogenesis of periodontal diseases. In: *Dental clinics of North America* 49 (3), S. 491-516, v. DOI: 10.1016/j.cden.2005.03.001.

133. Termine, J. D.; Belcourt, A. B.; Christner, P. J.; Conn, K. M.; Nylen, M. U. (1980): Properties of dissociatively extracted fetal tooth matrix proteins. I. Principal molecular species in developing bovine enamel. In: *The Journal of biological chemistry* 255 (20), S. 9760–9768.

134. Thoma, Daniel S.; Villar, Cristina C.; Carnes, David L.; Dard, Michel; Chun, Yong-Hee Patricia; Cochran, David L. (2011): Angiogenic activity of an enamel matrix derivative (EMD) and EMD-derived proteins: an experimental study in mice. In: *Journal of clinical periodontology* 38 (3), S. 253–260. DOI: 10.1111/j.1600-051X.2010.01656.x.

135. Trindade, Fábio; Oppenheim, Frank G.; Helmerhorst, Eva J.; Amado, Francisco; Gomes, Pedro S.; Vitorino, Rui (2014): Uncovering the molecular networks in periodontitis. In: *Proteomics. Clinical applications* 8 (9-10), S. 748–761. DOI: 10.1002/prca.201400028.

136. Türkoğlu, Oya; Emingil, Gülnur; Kütükçüler, Necil; Atilla, Gül (2009): Gingival crevicular fluid levels of cathelicidin LL-37 and interleukin-18 in patients with chronic periodontitis. In: *Journal of periodontology* 80 (6), S. 969–976. DOI: 10.1902/jop.2009.080532.

137. Uno, T.; Hashimoto, S.; Shimono, M. (1998): A study of the proliferative activity of the long junctional epithelium using argyrophilic nucleolar organizer region (AgNORs) staining. In: *Journal of periodontal research* 33 (5), S. 298–309.

138. Vardar-Sengul, S.; Demirci, T.; Sen, B. H.; Erkizan, V.; Kurulgan, E.; Baylas, H. (2007): Human beta defensin-1 and -2 expression in the gingiva of patients with specific periodontal diseases. In: *Journal of periodontal research* 42 (5), S. 429–437. DOI: 10.1111/j.1600-0765.2006.00964.x.

139. Varoga, D.; Klostermeier, E.; Paulsen, F.; Wruck, C.; Lippross, S.; Brandenburg, L. O. et al. (2009): The antimicrobial peptide HBD-2 and the Toll-like receptors-2 and -4 are induced in synovial membranes in case of septic arthritis. In: *Virchows Archiv : an international journal of pathology* 454 (6), S. 685–694. DOI: 10.1007/s00428-009-0780-4.

140. Wang, P.; Duan, D.; Zhou, X.; Li, X.; Yang, J.; Deng, M.; Xu, Y. (2015): Relationship between expression of human gingival beta-defensins and levels of periodontopathogens in subgingival plaque. In: *Journal of periodontal research* 50 (1), S. 113–122. DOI: 10.1111/jre.12187.

141. Wanner, R.; Wolff, B.; Glowacki, F.; Kolde, G.; Wittig, B. (1999): The loss of desmosomes after retinoic acid treatment results in an apparent inhibition of HaCaT keratinocyte differentiation. In: *Archives of dermatological research* 291 (6), S. 346–353.

142. Weinberg, E.; Topaz, M.; Dard, M.; Lyngstadaas, P.; Nemcovsky, C.; Weinreb, M. (2010): Differential effects of prostaglandin E(2) and enamel matrix derivative on the proliferation of human gingival and dermal fibroblasts and gingival keratinocytes. In: *Journal of periodontal research* 45 (6), S. 731–740. DOI: 10.1111/j.1600-0765.2010.01293.x.

143. Wenghoefer, M.; Pantelis, A.; Dommisch, H.; Reich, R.; Martini, M.; Allam, J-P et al. (2008): Decreased gene expression of human beta-defensin-1 in the development of squamous cell carcinoma of the oral cavity. In: *International journal of oral and maxillofacial surgery* 37 (7), S. 660–663. DOI: 10.1016/j.ijom.2008.02.003.

144. Wimley, W. C.; Selsted, M. E.; White, S. H. (1994): Interactions between human defensins and lipid bilayers: evidence for formation of multimeric pores. In: *Protein science : a publication of the Protein Society* 3 (9), S. 1362–1373. DOI: 10.1002/pro.5560030902.

145. Winter, Jochen; Pantelis, Annette; Reich, Rudolf; Martini, Markus; Kraus, Dominik; Jepsen, Soeren et al. (2011): Human beta-defensin-1, -2, and -3 exhibit opposite effects on oral squamous cell carcinoma cell proliferation. In: *Cancer investigation* 29 (3), S. 196–201. DOI: 10.3109/07357907.2010.543210.

146. Wolgin, Michael; Liodakis, Stylianos; Pries, Axel R.; Zakrzewicz, Andreas; Kielbassa, Andrej M. (2012): HBD-1 and hBD-2 expression in HaCaT keratinocytes stimulated with nicotine. In: *Archives of oral biology* 57 (6), S. 814–819. DOI: 10.1016/j.archoralbio.2011.11.018.

147. Wolgin, Michael; Liodakis, Stylianos; Ulrich, Ina; Zakrzewicz, Andreas; Kielbassa, Andrej M.; Pries, Axel R. (2012): Gene expression of human beta defensins-1 and -2 is significantly reduced in non-inflamed keratinized oral tissue of smokers. In: *Journal of dentistry* 40 (11), S. 949–954. DOI: 10.1016/j.jdent.2012.07.017.

148. Yadava, Preeti; Zhang, Chun; Sun, Jing; Hughes, Jeffrey A. (2006): Antimicrobial activities of human beta-defensins against Bacillus species. In: *International journal of antimicrobial agents* 28 (2), S. 132–137. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2006.02.021.

149. Yagi, Y.; Suda, N.; Yamakoshi, Y.; Baba, O.; Moriyama, K. (2009): In vivo application of amelogenin suppresses root resorption. In: *Journal of dental research* 88 (2), S. 176–181. DOI: 10.1177/0022034508329451.

150. Yamaguchi, Yasuhiro; Ouchi, Yasuyoshi (2012): Antimicrobial peptide defensin: identification of novel isoforms and the characterization of their physiological roles and their significance in the pathogenesis of diseases. In: *Proceedings of the Japan Academy. Series B, Physical and biological sciences* 88 (4), S. 152–166.

151. Yang, D.; Chen, Q.; Chertov, O.; Oppenheim, J. J. (2000): Human neutrophil defensins selectively chemoattract naive T and immature dendritic cells. In: *Journal of leukocyte biology* 68 (1), S. 9–14.

152. Yang, D.; Chertov, O.; Bykovskaia, S. N.; Chen, Q.; Buffo, M. J.; Shogan, J. et al. (1999): Beta-defensins: linking innate and adaptive immunity through dendritic and T cell CCR6. In: *Science (New York, N.Y.)* 286 (5439), S. 525–528.

153. Zeichner-David, Maggie; Chen, Li-Sha; Hsu, Zhengyan; Reyna, Julia; Caton, Javier; Bringas, Pablo (2006): Amelogenin and ameloblastin show growth-factor like activity in periodontal ligament cells. In: *European journal of oral sciences* 114 Suppl 1, S. 244-53; discussion 254-6, 381-2. DOI: 10.1111/j.1600-0722.2006.00322.x.

154. Zeldich, E.; Koren, R.; Nemcovsky, C.; Weinreb, M. (2007): Enamel matrix derivative stimulates human gingival fibroblast proliferation via ERK. In: *Journal of dental research* 86 (1), S. 41–46.

155. Zhang, Xu; Diekwisch, Thomas G. H.; Luan, Xianghong (2011): Structure and function of ameloblastin as an extracellular matrix protein: adhesion, calcium binding, and CD63 interaction in human and mouse. In: *European journal of oral sciences* 119 Suppl 1, S. 270–279. DOI: 10.1111/j.1600-0722.2011.00889.x.

156. Zhao, C.; Wang, I.; Lehrer, R. I. (1996): Widespread expression of beta-defensin hBD-1 in human secretory glands and epithelial cells. In: *FEBS letters* 396 (2-3), S. 319–322.

11.1 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich zuerst bei Frau PD Dr. Nicole Pischon für die Überlassung des interessanten Themas, das Mitwirken in ihrer Arbeitsgruppe und die angenehme Betreuung während der Arbeit bedanken.
Herrn Dr. Michael Wolgin danke ich für die Einführung in die Methodik sowie für interessante theoretische und praktische Hinweise zur Versuchsdurchführung.

Mein besonderer Dank gilt Frau Verena Kanitz für die Hilfestellung in der Arbeit im Zellkulturlabor.

Abschließend möchte ich mich bei meinen Eltern, Birgit und Thomas Schwarz, sowie bei meinen Großeltern bedanken, die mir das Studium erst ermöglichten und mich fortwährend unterstützten.

11.2 Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Erik Schwarz, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: **„Zellbiologischer Einfluss von Schmelzmatrixproteinen auf die Expression von Antimikrobiellen Peptiden und Zytokinen in humanen Epithelzellen (HaCaT)“** 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 beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -*www.**icmje**.org*) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

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

Berlin, den 09.12.2016 Erik Schwarz

11.3 Lebenslauf

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