

DIE ROLLE DES HUMANEN β -DEFENSINS-2 IN DER REGULATION DER
EXPRESSION VON GENEN DER IMMUNABWEHR IN ODONTOBLASTEN-
ÄHNLICHEN ZELLEN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
Bonn

vorgelegt von:
Charlotte Overgahr genannt Willebrand

Bonn

2007

Angefertigt mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. Dr. S. Jepsen, M.S.
2. Gutachter: Prof. Dr. A. Jäger

Tag der Mündlichen Prüfung: 04.05.2007

Aus der Poliklinik für Parodontologie, Zahnerhaltung und Präventive Zahnheilkunde
des Zentrums für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde des Universitätsklinikums Bonn

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	3
1. Einleitung	8
1.1 Einführung	8
1.2 Antimikrobieller Mechanismus der Defensine	9
1.3 β -Defensine	10
1.3.1 Humanes β -Defensin-1	11
1.3.2 Humanes β -Defensin-2	12
1.4 Mediatorfunktionen humaner β -Defensine	12
1.5 Untersuchte Mediatoren der Immunantwort	14
1.6 Gewebe und Zellen der Zahnpulpa	15
1.7 Fragestellungen und Ziele der Arbeit	16
2. Material und Methoden	18
2.1 Versuchsaufbau	18
2.2 Material und Reagenzien	18
2.3 Probengewinnung oraler Gewebe	19
2.4 Kultur primärer Zellen	19
2.5 Molekularbiologische Experimente zur qualitativen Genexpressionsanalyse	20
2.5.1 Qualitative Genexpressionsdarstellung	20
2.5.2 Standard-Polymerasekettenreaktion	21
2.5.3 Gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte	23
2.6 Stimulation von odontoblasten-ähnlichen Zellen mit rhBD-1 und-2	23
2.7 Quantitative Genexpressionsdarstellung	24
2.7.1 Real-Time-Polymerasekettenreaktion	24
2.8 Gewinnung der PCR-Positivkontrollen	27
2.9 Auswertung der quantitativen PCR	28
2.10 Statistische Auswertung der quantitativen Genexpressionsanalyse	29

3. Ergebnisse	30
3.1 Qualitative Genexpressionsanalyse	30
3.2 Optimierung der Real-Time-PCR	33
3.3 Quantitative Genexpressionsanalyse	34
3.3.1 Genexpression von hBD-1 nach Stimulation mit rhBD-2	34
3.3.2 Genexpression von IL-6 nach Stimulation mit rhBD-2	37
3.3.3 Genexpression von IL-8 nach Stimulation mit rhBD-2	37
3.3.4 Genexpression von cPLA ₂ nach Stimulation mit rhBD-2	42
4. Diskussion	45
5. Zusammenfassung	56
6. Literaturverzeichnis	57
7. Danksagung	64

Abkürzungsverzeichnis

α	=	alpha
Å	=	Ångström
Aqua dest.	=	destilliertes Wasser
β	=	beta
bp	=	Basenpaar
°C	=	Grad Celsius
ca.	=	circa
cDNA	=	komplementäre Desoxyribonukleinsäure (copy deoxyribonucleic acid)
CO ₂	=	Kohlendioxid
Cox-2	=	Cyclooxygenase-2
cPLA ₂	=	zytosolische Phospholipase-2
C _t	=	Schwellenzyklus (threshold cycle)
d.h.	=	das heißt
DMEM	=	Dulbecco's Modified Eagles-Medium
DNA	=	Desoxyribonukleinsäure (deoxyribonucleic acid)
dNTP	=	Desoxynukleosidtriphosphat
DSPP	=	Dentinsialophosphoprotein
dT	=	Desoxythymine
<i>E. coli</i>	=	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	=	Ethylendiamintetraessigsäure (ethylenediaminetetraacetate)
et al.	=	und Mitarbeiter (et alii)
Fa.	=	Firma
FCS	=	Fötales Kälberserum
h	=	Stunde
hBD-1	=	humanes β -Defensin-1
hBD-2	=	humanes β -Defensin-2
HNP-3	=	humanes neutrophiles Peptid-3 (human neutrophil peptide-3)

IFN- β	=	Interferon- β
IL	=	Interleukin
kDa	=	Kilodalton
kg	=	Kilogramm
KGM	=	keratinocyte growth medium
LB-Medium	=	Luria-Bertani-Medium
LTA ₄ H	=	Leukotrien-A ₄ -Hydrolase
MgCl ₂	=	Magnesiumchlorid
min.	=	Minute
MIP-3 α	=	Makrophagen inflammatorisches Peptid-3alpha
ml	=	Milliliter
mm	=	Millimeter
mM	=	Millimolar
mRNA	=	Messenger-Ribonukleinsäure (messenger ribonucleic acid)
NF- κ B	=	Nuklearfaktor-kappa B
ng	=	Nanogramm
NGF	=	nerve growth factor
PBS	=	phosphate buffered saline
PCR	=	Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction)
PDGF	=	platelet-derived growth factor
pH	=	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionen-konzentration
pmol	=	pikomol
rhBD-1	=	rekombinantes humanes β -Defensin-1
rhBD-2	=	rekombinantes humanes β -Defensin-2
RNA	=	Ribonukleinsäure (ribonucleic acid)
rpm	=	Umdrehungen pro Minute (rounds per minute)
RT-PCR	=	Reverse Transkriptase Realtime-Polymerasekettenreaktion
sec	=	Sekunde/n
Θ	=	theta
t	=	Zeit

TBE	=	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TNF- α	=	Tumornekrosefaktor-alpha
U	=	enzymatische Einheit/-en (unit/-s)
μg	=	Mikrogramm
μl	=	Mikroliter

1. Einleitung

1.1 Einführung

Die Oberflächen oraler Epithelien sind mit einer Vielzahl kommensaler Mikroorganismen besiedelt. Hierbei handelt es sich vor allem um eine Ko-Kolonisation von Bakterien und Pilzen, die nebeneinander existieren können, ohne dass klinische Anzeichen einer Entzündung vorliegen. Die Mundhöhle bietet aufgrund ihrer feucht-warmen Umgebung ein gutes Reservoir für diese Mikroorganismen (Lehrer, 2004).

Epithelien der oralen Schleimhäute weisen eine potente physikalische Barriere auf, welche das Eindringen von Mikroorganismen erschwert. Diese physikalische Barriere wird durch einen festen interzellulären Verbund und durch die epitheliale Hornschicht permanent aufrecht erhalten (Dale, 2003). Neben dieser Eigenschaft sind orale Epithelien in der Lage, zusätzlich eine chemische Barriere zu generieren. Hierbei handelt es sich vor allem um die Synthese antimikrobieller Peptide, die neben der direkten, osmotischen Wirkung auf Mikroorganismen auch zytokin-ähnliche Funktionen innerhalb des Epithelverbundes übernehmen (Schröder, 1999a).

Karies ist die häufigste, bakteriell verursachte Erkrankung der menschlichen Mundhöhle. Hierbei kommt es aufgrund bakterieller Stoffwechselprodukte zur Demineralisation und fortschreitend zur Kavitation der Zahnhartsubstanzen. Die Folge ist eine re- oder irreversible Entzündung der pulpalen Zahngewebe, welche unbehandelt zum Verlust des Zahnes führen kann.

Es ist eine neue Erkenntnis, dass Zellen der Zahnpulpa antimikrobielle Peptide synthetisieren (Dommisch et al., 2005a). Die genaue Rolle dieser Peptide in der Zahnpulpa ist bislang weitestgehend ungeklärt.

1.2 Antimikrobieller Mechanismus der Defensine

Defensine sind niedermolekulare, antimikrobielle Peptide und gehören dem angeborenen Immunsystem an (Ganz, 2003).

Zur Familie der Defensine gehören die beiden Subfamilien der α - und β -Defensine, welche sich durch den jeweiligen Cysteingehalt und die entsprechenden intramolekularen Verknüpfungen (Disulfidbrücken) unterscheiden (Ganz & Weiss, 1997). Diese charakteristischen Disulfidbrücken stabilisieren die dreidimensionale Struktur der α - und β -Defensine, zusammengesetzt aus α -Helix- und β -Faltblattstrukturelementen (Hill et al., 1991). Die häufig darin enthaltenen positiven Aminosäuren Lysin und Arginin verleihen den Defensinen eine positive Nettoladung (Kationen). Insgesamt weisen Defensine ein Molekulargewicht von 3,5-5 kDa auf (Hill et al., 1991).

Die Subfamilie der zyklischen θ -Defensine entspricht einer Variante zweier α -Defensine, synthetisiert durch alternative Spleißvorgänge (Tang et al., 1999).

Aufgrund zahlreicher Experimente wird angenommen, dass Defensine eine wichtige Rolle in den ersten Stadien einer Infektion spielen (Initiale Immunantwort) (Lehrer, 2004; Ganz, 2003). Defensine besitzen ein breites antimikrobielles Wirkungsspektrum sowohl gegen grampositive und gramnegative Bakterien, als auch gegenüber Pilzen und einigen membranumgebenen Viren (Ganz & Weiss, 1997). In-vitro-Versuche haben gezeigt, dass Defensine schon bei mikromolaren Konzentrationen eine biologische Aktivität entfalten können. Diese Aktivität ist in Bezug auf die antimikrobiellen Eigenschaften je nach Bakterienstamm abhängig von der Salz- bzw. Plasmaproteinkonzentration (Ganz, 2003).

Der Wirkungsmechanismus antimikrobieller Peptide lässt sich in mehrere Phasen untergliedern. In der Initialphase binden die amphiphilen Defensine mit ihrer positiv geladenen Seite an die äußere, negativ geladene Membran der Bakterien. Anschließend dringen diese, angetrieben durch elektrostatische Kräfte und das vorherrschende transmembranale Potential, mit dem hydrophoben Anteil in die Lipidschicht ein und lagern sich zu einer sogenannten Teppichformation zusammen („carpet-model“) (Hoover et al., 2000; Ganz, 2003). Dieser Mechanismus verändert die Spannung der bakteriellen Membran derart, dass die Defensine zu Oligomeren aggregieren und Poren- bzw. span-

nungsabhängige Kanäle ausbilden können („wormhole-“ oder „pore-model“) (Hill et al., 1991). Die ca. 25Å großen Hohlräume (Ganz, 2003) der Poren bzw. Kanäle werden von den geladenen Anteilen der Moleküle, den kationischen Aminosäuren Arginin und Lysin, flankiert (Schröder, 1999a). Durch diese zylindrische Anordnung der Defensinaggregate (Schröder, 1999a) wird zwar einerseits die Membranspannung wieder herabgesetzt, andererseits wird jedoch die Permeabilität für niedermolekulare Substanzen erhöht (Ganz, 2003). Folglich findet ein vollständiger Ladungs- und Wasseraustausch, sowie Ionen-transport durch die Membran statt und hat letztendlich den osmotischen Zelltod des Mikroorganismus zur Folge (Schröder, 1999a).

Versuche mit Membran-depolarisierenden Substanzen zeigten, dass Defensine ein negatives Membranpotential benötigen, um an die Lipidschicht zu binden (Hill et al., 1991). Ein hoher elektrischer Potentialgradient kann nur durch lebensfähige Bakterien aufrechterhalten werden und ist damit essentiell für die antimikrobielle Wirkung humaner β -Defensine (Schröder, 1999a). Humane Zellen weisen nicht die gleiche Membranzusammensetzung wie Bakterienzellen auf und zeigen dadurch auch Unterschiede in den membranalen Potentialgradienten. Diese Bedingungen schützen körpereigene Zellen vor autotoxischen Reaktionen durch Defensine. Darüber hinaus enthalten humane Zellmembranen einen hohen Anteil an Cholesterol, dem ein hemmender Effekt auf die biologische Aktivität der Defensine nachgewiesen wurde (Schröder, 1999a).

1.3 β -Defensine

Humane β -Defensine werden in Epithelien der Haut bzw. Schleimhaut, der Trachea und des Intestinums, sowie in den Tonsillen, der Zunge, den Speicheldrüsen, in Keratinozyten oraler Gewebe (Dale & Krisanaprakornkit, 2001) und in Pulpazellen exprimiert (Domisch et al., 2005a). Des Weiteren wurden diese in vielen Körperflüssigkeiten wie Urin, Nasensekret, Speichel, Bronchial- und Sulkusflüssigkeit nachgewiesen (Dale & Krisanaprakornkit, 2001; Mathews et al., 1999; Bensch, 1995).

β -Defensine sind kationische, niedermolekulare Peptide mit einer Länge von 35-50 Aminosäuren und weisen eine antiparallele Faltung auf (Schulz et al., 2004). Sie besitzen

sechs Cysteinreste, die untereinander drei charakteristische Disulfidbrücken, auf den Positionen 1:5, 2:4 und 3:6, ausbilden (Miyasaki & Lehrer, 1998).

Humane β -Defensine werden als Präpropeptide synthetisiert (Dale & Krisanaprakornkit, 2001), nach der Reifung in primären, sauren Granula gespeichert und fusionieren später mit Phagozytose-Vesikeln (Ganz, 2003).

Die Präsenz pathogener Mikroorganismen führt zu einer Stimulation der Synthese humaner β -Defensine in gingivalen Epithelzellen. Dieser Mechanismus könnte ausschlaggebend für die Aufrechterhaltung des oralen Milieus im Sinne einer Balance zwischen mikrobieller Besiedelung und epithelialer Abwehr sein (Dale, 2000).

1.3.1 Humanes β -Defensin-1

Das humane β -Defensin-1 ist ein aus 36 Aminosäuren aufgebautes Peptid, mit einem Molekulargewicht von 3,9 kDa (Schröder, 1999b; Liu et al., 2003).

Das humane β -Defensin-1 (hBD-1) wurde erstmals aus dem Plasma von Patienten mit fortgeschrittenen, entzündlichen Nierenerkrankungen isoliert. Dabei wurden die Epithelzellen des Urogenitaltraktes als Syntheseort für hBD-1 identifiziert (Bensch et al., 1995). Die Expression von hBD-1 konnte anschließend auch in Epithelien der Haut (Schröder, 1999b), der Mundschleimhaut (Dunsche et al., 2002), des Gastrointestinaltraktes (Islam et al., 2001), des Respirationstraktes (Harder et al., 1997) und darüber hinaus auch in der Odontoblastenzellschicht der Pulpa nachgewiesen werden (Dommisch et al., 2005a).

HBD-1 wird in den genannten epithelialen Geweben hauptsächlich konstitutiv exprimiert und besitzt antimikrobielle Eigenschaften gegenüber grampositiven und gramnegativen Bakterien und Pilzen (*Candida albicans*) (Bensch et al., 1995; Diamond et al., 2001; Goldmann et al., 1997; O'Neil et al., 1999; Jurevic et al., 2003).

1.3.2 Humanes β -Defensin-2

Das humane β -Defensin-2 hat ein Molekulargewicht von 4 kDa und besteht aus 41 Aminosäuren (Schröder, 1999b).

Erstmalig wurde das humane β -Defensin-2 in der Epidermis von Psoriasis-Patienten entdeckt (Schröder & Harder, 1999). In den Epithelien der Haut, der Mundschleimhaut, des Gastrointestinaltraktes, des Respirationstraktes und ebenfalls in Odontoblasten konnte eine bakteriell induzierbare Expression von hBD-2 gezeigt werden (Schröder, 1999b; Dunsche et al., 2002; Islam et al., 2001; Harder et al., 1997; Dommisch et al., 2005a). Für das humane β -Defensin-2 konnte eine effektive, antimikrobielle Aktivität gegenüber gramnegativen Bakterien und *Candida albicans* nachgewiesen werden, während lediglich bakteriostatische Effekte auf grampositive Bakterien verzeichnet werden konnten.

Im Gegensatz zu den genannten epithelialen Geweben, zeigt das Epithel der Mundschleimhaut und die Odontoblastenzellschicht der Pulpa die Expression von hBD-2 ebenfalls unter gesunden Bedingungen (Dale & Krisanaprakornkit, 2001; Dunsche et al., 2002; Dommisch et al., 2005a/b). Als Faktoren, die unter gesunden Bedingungen zu dieser Expression führen, werden neben dem auch kommensal vorkommenden *Fusobacterium nucleatum*, ebenfalls Zytokine und hormonelle (neuroendokrine) Einflüsse diskutiert (Dale, 2000; Ganz, 2003; Krisanaprakornkit et al., 2000).

1.4 Mediatorfunktionen humaner β -Defensine

Neben antimikrobiellen Eigenschaften gegenüber Mikroorganismen zeigen humane β -Defensine auch chemotaktische und zytokin-ähnliche Mediatorfunktionen im Rahmen des angeborenen Immunsystems (Lehrer, 2004).

Innerhalb des Epithelverbundes konnten direkte Effekte des humanen β -Defensin-2 auf unausgereifte, dendritische Zellen nachgewiesen werden. In diesem Kontext wurde beobachtet, dass hBD-2 maßgeblich an der Ausreifung dendritischer Zellen beteiligt ist. Gemeinsam mit dem Makrophagen inflammatorischen Peptid-3 α (MIP-3 α /CCL-20) wirkt das humane β -Defensin-2 hier über den CC-Chemokin-Rezeptor 6 (CCR6) auf dendritische Zellen. Dieser Mechanismus findet lokal innerhalb des epithelialen Verbundes

statt und führt zu einer Konversion epithelialer, dendritischer Zellen zu antigen-präsentierenden Zellen (Yang et al., 1999 und 2000).

Neben dieser zytokin-ähnlichen Wirkung besitzen humane β -Defensine auch chemotaktische Eigenschaften, welche die lokale Präsenz von Zellen der Immunabwehr fördern. Bislang konnten chemotaktische Einflüsse auf die Rekrutierung von Monozyten, T-Gedächtniszellen (Yang et al., 1999), Mastzellen und neutrophile Granulozyten in Zellkulturexperimenten nachgewiesen werden (Niyonsaba et al., 2004).

Des Weiteren konnte in Studien festgestellt werden, dass humane β -Defensine auch einen direkten Effekt auf Epithelzellen (Keratinocyten) in Bezug auf die Synthese immunmodulatorischer Botenstoffe erzeugen können. Hier konnte der Anstieg der Expression von Interleukin-6, -10 und -18 sowie MIP-3 α (CCL 20) als unmittelbare Antwort auf die Anwesenheit humaner β -Defensine beobachtet werden (Niyonsaba et al., 2007).

Darüber hinaus konnte die Wirkungsweise humaner β -Defensine auf die epitheliale Zelldifferenzierung gezeigt werden. In diesem Zusammenhang wurde die Expression der humanen β -Defensine mit der Synthese von Involukrin und Keratin 10 im Epithelverband in Beziehung gestellt. Beide Faktoren, Involukrin und Keratin 10, werden in höher differenzierten Epithelschichten der Mundschleimhaut synthetisiert (Dale & Krisanaprakornkit, 2001; Abiko et al., 2003). Niyonsaba und seine Mitarbeiter (2007) stellten fest, dass humane β -Defensine positive, direkte Einflüsse auf Migration und Proliferation von Epithelzellen ausüben. In Verbindung mit diesem Phänomen wird eine Funktion humaner β -Defensine während epithelialer Wundheilungsvorgänge diskutiert (Niyonsaba et al., 2007) (siehe Abbildung 1).

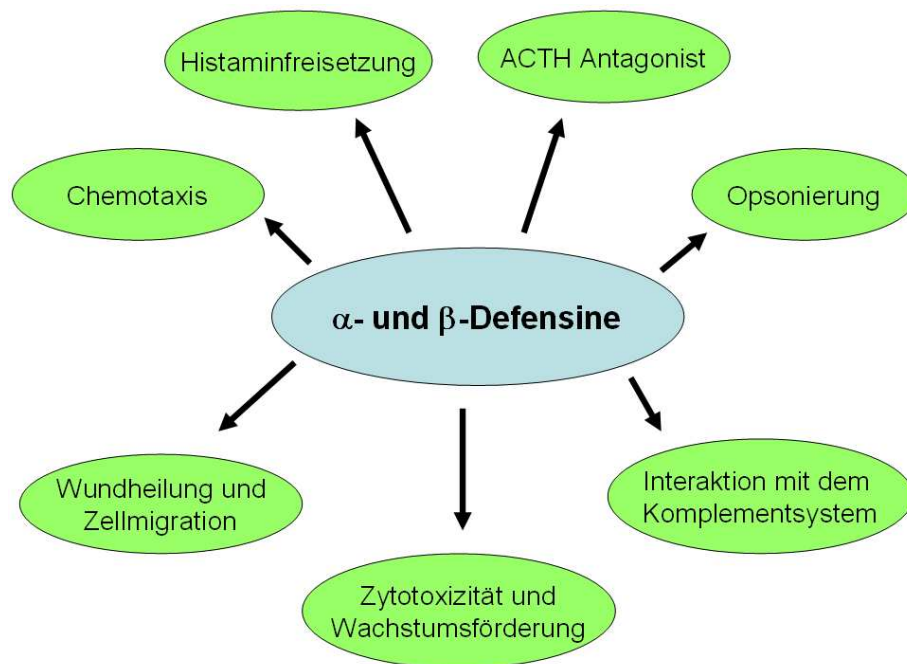


Abbildung 1:

Darstellung verschiedener Mediatorfunktionen humaner Defensine auf Gewebe und Zellen in Anlehnung an Lehrer (2004)

1.5 Untersuchte Mediatoren der Immunantwort

Zytokine sind Proteine, die Wachstum und Differenzierung von Zellen regulieren und an vielen immunologischen Prozessen beteiligt sind (Interleukine, Interferone, Tumornekrosefaktoren). Sie wirken immunmodulierend (pro- oder anti-inflammatorisch) und dienen der Kommunikation der Abwehrzellen untereinander.

Das Interleukin-6 gehört zur Familie der Zytokine und kann durch bakterielle Endotoxine, IL-1, TNF und TNF- α , PDGF, Onkostatin M, IFN- β , NGF, IL-17 und virale Infektionen stimuliert werden. Je nach Zelltyp besteht durch IL-6 eine positive oder negative Rückkopplung auf die eigene Synthese. Neben einer Vielzahl weiterer Funktionen beeinflusst IL-6 antigen-spezifische Abwehrreaktionen und gilt als eines der bedeutendsten pro-inflammatorischen Mediatoren der Akuten-Phase-Reaktion (Ibelgaufs, 2002).

IL-8 ist ein Chemokin und kann ähnlich wie IL-6 durch Viren, bakterielle Lipopolysaccharide, IL-1 und TNF- α induziert werden, aber auch durch Concanavalin A, doppelsträngige RNA, IL-1 β , -7 und -17. Das Interleukin-8 ist, im Gegensatz zu allen anderen Zytokinen, in der Lage, neutrophile Granulozyten zu aktivieren und erhöht die Chemotaxis für alle bekannten beweglichen Immunzellen. Außerdem besitzt IL-8 neben der pro-inflammatorischen Wirkung unter anderem auch eine anti-inflammatorische Komponente, indem es die Adhäsion von Leukozyten an aktivierte Endothelzellen verhindert und somit eine Entzündungsreaktion unterdrücken kann (Ibelgauf, 2002).

CPLA₂ gehört zur Familie der Lysophospholipasen (Balboa et al., 2003). Dieses Enzym trägt durch Abspaltung von Arachidonsäure aus Membranlipiden zur Bildung von Eicosanoiden (Prostaglandin E₂) bei und ist dadurch signalgebend in entzündungsfördernde Prozesse involviert (Ono et al., 2002; Eberhard et al., 2005). Arachidonsäure kann sowohl selbst eine Mediatorfunktion ausüben, als auch als Zwischenprodukt zur Synthese anderer Botenstoffen (Eicosanoide) fungieren. Eicosanoide sind hormonähnliche Substanzen und besitzen immunmodulierende Eigenschaften. Zu dieser Gruppe zählen Prostaglandine, Thromboxane und Leukotriene (Löffler & Petrides, 1998).

1.6 Gewebe und Zellen der Zahnpulpa

Die Zahnpulpa besteht aus Bindegewebe, Blutgefäßen, Nerven, Lymphgefäßen und dentinbildenden Zellen (Odontoblasten) und befindet sich im Inneren der Krone bzw. der Wurzeln (Kronen- und Wurzelpulpa) (Hellwig et al., 2003).

Odontoblasten sind Bindegewebszellen mesenchymalen Ursprungs und sezernieren Prädentin, welches anschließend durch Mineralisation zu Dentin reift. Die Fortsätze dieser Zellen strahlen in die Dentinkanälchen ein und werden als Tomes' sche Fasern bezeichnet. Es wird vermutet, dass Odontoblasten dort mit Nervenfasern in Kontakt stehen und daher bei der Entstehung eines Schmerzreizes eine Rolle spielen. Sie sind in der Lage Sekundär- und Tertiärdentin zu bilden und befinden sich an der Grenze zwischen Pulpa und Dentin. Damit sind sie die ersten Zellen, die in kariösen Läsionen früh einem Antigenkontakt durch Mikroorganismen ausgesetzt sind. Karies ist eine bakteriell be-

dingte, weit verbreitete Erkrankung der Zahnhartsubstanzgewebe und hat unbehandelt in der Regel eine re- oder irreversible Entzündung der Pulpa zur Folge (Hellwig et al., 2003).

Im Falle einer bakteriellen Infektion des Zahnmarkes durch karies-verursachende Bakterien (*Streptococcus mutans*) konnte bereits gezeigt werden, dass in Pulpazellen vermehrt Zytokine (IL-6 und IL-8), sowie Enzyme der Eicosanoidbiosynthese (Cox-2, cPLA₂, LTA₄H) synthetisiert wurden (Hahn et al., 2000; Engels-Deutsch et al., 2003; Dommisch et al., 2007; Eberhard et al., 2005). Dies lässt vermuten, dass pulpale Gewebe in der Lage sind, eine Immunantwort zu initiieren.

1.7 Fragestellungen und Ziele der Arbeit

In einer Vielzahl von Untersuchungen konnte bereits gezeigt werden, dass humane β -Defensine neben antimikrobiellen Eigenschaften auch weit reichende zytokin-ähnliche Funktionen besitzen (Lehrer, 2004). Die Expression humaner β -Defensine konnte in den vergangenen Jahren in allen epithelialen Geweben der Mundhöhle sowie im Speichel nachgewiesen werden (Mathews et al., 1999; Dunsche et al., 2002). Es ist jedoch eine neue Erkenntnis, dass die humanen β -Defensine-1 und -2 in der Odontoblastenzellschicht der gesunden Pulpa exprimiert werden (Dommisch et al., 2005a). Welche Wirkung die β -Defensine dabei auf die Zahnpulpa und deren Zellen haben, wurde bisher noch nicht untersucht.

In Vorversuchen sollte deshalb die Genexpression von Mediatoren des Immunsystems in odontoblasten-ähnlichen Zellen, Pulpafibroblasten der ersten und zweiten Dentition, einer Pulpafibroblastenzelllinie, Zellen des apikalen Zahnsäckchens und Gingivaepithelzellen untersucht werden. Von Interesse waren sowohl die Gene der humanen β -Defensine-1 und -2, als auch die der pro-inflammatorischen Zytokine Interleukin-1 β , -6, -8, des Tumornekrosefaktors- α sowie der Cyclooxygenase-2, der Leukotrien-A4-Hydrolase und der zytosolischen Phospholipase-2 als Gene der Eicosanoidbiosynthese. Zusätzlich wurde die Expression des Odontoblastenmarkers Dentinsialophosphoprotein (DSPP)

untersucht. Im anschließenden Hauptversuch war das Ziel dieser Arbeit, mögliche mediator-ähnliche Funktionen des humanen β -Defensin-2 auf die oben genannten Gene in Anlehnung an die Arbeiten von Niyonsaba und Mitarbeitern (2004 und 2007) in odontoblasten-ähnlichen Zellen zu analysieren. Folgende Fragestellungen sollen im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden:

1. Ist die Expression der humanen β -Defensine-1 und -2 in odontoblasten-ähnlichen Zellen in vitro nachweisbar?
2. Werden die Gene der Interleukine-6 und -8 sowie die Gene von Enzymen der Eicosanoidbiosynthese (Cox-2, cPLA₂, LTA₄H) oder TNF- α und DSPP in odontoblasten-ähnlichen Zellen exprimiert?
3. Zeigt die Applikation der β -Defensine-1 und -2 Effekte auf die Genexpression der humanen β -Defensine-1 und -2?
4. Stimulieren die β -Defensine-1 und -2 die Genexpression von Entzündungsmarkern der Immunabwehr (IL-1 β , -6 und -8)?
5. Beeinflussen die β -Defensine-1 und -2 die Genexpression von Enzymen der Eicosanoidbiosynthese (Cox-2, cPLA₂) oder TNF- α und DSPP?
6. Ist die Wirkungsweise der β -Defensine-1 und -2 abhängig von der Konzentration?
7. Welchen Einfluss hat die zeitliche Dauer der Applikation der β -Defensine-1 und -2 auf die Genexpression der Zielgene in odontoblasten-ähnlichen Zellen?

Zusammenfassend war das Ziel dieser Arbeit, die Rolle der humanen β -Defensine, als Teil des angeborenen Immunsystems, bei der Regulation der Genexpression immunmodulierender Mediatoren in der Zahnpulpa zu untersuchen.

2. Material und Methoden

2.1 Versuchsaufbau

Im Rahmen routinemäßig durchgeführter oralchirurgischer Maßnahmen wurden kariesfreie Zähne der ersten und zweiten Dentition sowie apikale Zahnsäckchen gewonnen (2.3). Mit Hilfe dieser Gewebe wurden odontoblasten-ähnliche Zellen, Pulpafibroblasten der ersten und zweiten Dentition und Zellen des apikalen Zahnsäckchens kultiviert und zusammen mit einer Pulpafibroblastenzelllinie und Gingivaepithelzellen auf die Expression von Mediatoren des Immunsystems untersucht (2.4). Anschließend wurden die odontoblasten-ähnlichen Zellen mit rekombinanten humanen β -Defensinen stimuliert (2.6). Die Auswertung der Genexpression erfolgte mit Hilfe der quantitativen Real-Time-PCR (2.9).

2.2 Material und Reagenzien

Die zur Aufbewahrung und Bearbeitung der gesammelten Proben benötigten Eppendorf-Tubes und Pipettenspitzen waren von der Fa. Sarstedt (Nümbrecht). Das in den Versuchsreihen verwendete Aqua dest. wurde von der Fa. Braun Melsungen AG (Melsungen) verwendet.

Die Kulturschalen und Zellschaber wurden von der Fa. Labomedic GmbH (Bonn) bezogen. Das Zellkulturmedium DMEM (Dulbecco's Modified Eagles-Medium), sowie die Antibiotika Penicillin, Amphotericin und Streptomycin wurden von der Fa. PAA Laboratories GmbH (Cölbe), Trypsininhibitor von der Fa. Roche Diagnostics GmbH (Mannheim), Trypsin-EDTA-Lösung von der Fa. Sigma-Aldrich GmbH (Taufkirchen) und CO₂ von der Fa. Linde (Höllriegelskreuth) bestellt.

2.3 Probengewinnung oraler Gewebe

In die Untersuchungen wurden ausschließlich gesunde Patienten eingeschlossen, die sich aufgrund oralchirurgischer Indikationen in der Behandlung der Poliklinik für Chirurgische Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde (Direktor: Prof. Dr. G. Wahl) im Universitätsklinikum Bonn befanden.

Die Gewebeproben wurden im Rahmen routinemäßig durchgeführter oralchirurgischer Zahn- und Weisheitszahnextraktionen gewonnen und unmittelbar post operationem für die Zellkultur vorbereitet. Ausschließlich Weisheitszähne mit unvollständig abgeschlossenem Wurzelwachstum wurden für die Untersuchung verwendet. Somit war gleichzeitig die Entnahme des apikalen Zahnsäckchens möglich. Alle Patienten wurden darüber aufgeklärt, dass mit ihrem Einverständnis zur Probenentnahme keine zusätzlichen Materialentnahmen verbunden wären. Diese Studie wurde von der Ethikkommission der Universität Bonn geprüft und genehmigt (Antrag Ethikkommission AZ.: 142/05).

Insgesamt wurden die Pulpa der ersten ($n = 3$) und zweiten Dentition ($n = 3$), die Odontoblastenzellschicht der Weisheitszähne ($n = 5$) und das Gewebe des Zahnsäckchens ($n = 5$) für die Zellkulturversuche vorbereitet.

2.4 Kultur primärer Zellen

Die Gewebeproben wurden aseptisch sofort nach der Entnahme in 4 ml Kulturmedium, bestehend aus DMEM, 10% FCS, Penicillin, Streptomycin und Amphotericin von der Fa. PAA Laboratories GmbH (Cölbe), kultiviert.

Extrahierte, nicht-kariöse Zähne wurden mit 70%-igem Ethanol desinfiziert und mit einem sterilen Diamantschleifkörper von parodontalen Strukturen befreit. Die Fissuren wurden ausgeschliffen und der Zahn mit einem Diamanten von der Fa. Hager&Meisinger (Neuss) auf Höhe der Schmelz-Zementgrenze bis Tief ins Dentin kurz vor der Pulpahöhle eingekerbt. Anschließend wurden die Zahnkronen unter der Sterilbank mit einem Skalpell von der Fa. Aesculap (Tuttlingen) aufgebrochen und die Pulpen mit einer Pinzette steril entnommen. Darauf folgend wurden die Gewebe in 4 ml Kulturmedium überführt. Für die Anzucht von odontoblasten-ähnlichen Zellen wurde die Pulpakammer

ebenfalls in 4 ml Kulturmedium eingebracht (Tjäderhane et al., 1998). Die Kultivierung der Zellen erfolgte bei 37°C und 5% CO₂ in einem Inkubator der Fa. Thermo (Dreieich). Das Medium wurde in einem Drei-Tagesrhythmus gewechselt. Die Anzucht einer Zellkultur aus odontoblasten-ähnlichen Zellen benötigte ca. 4 Wochen, während eine Zelllinie aus Fibroblasten ca. 2-3 Wochen in Anspruch nahm. Bei einer Konfluenz von 90% wurden die Zellen in Kryoröhrchen von der Fa. Nalgene CRYOWARE™ (Nunc International, Rochester, NY, USA) bei -80°C eingefroren.

Die Kultur der Gingivaepithelzellen zur Kontrolle der Genexpression der oben genannten Gene wurde im Rahmen vorangegangener Untersuchungen im Labor der Poliklinik für Parodontologie, Zahnerhaltung und Präventive Zahnheilkunde des Zentrums für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde der Rheinischen-Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn etabliert. Die Pulpafibroblastenzelllinie wurde von Prof Shi, National Institute of Dental and Craniofacial Research (NIDCR), Bethesda (USA), zur Verfügung gestellt.

Für die Genexpressionsanalyse wurden die Zellen zu einer Konfluenz von ca. 80%-90% herangezüchtet.

2.5 Molekularbiologische Experimente zur qualitativen Genexpressionsanalyse

2.5.1 Qualitative Genexpressionsdarstellung

Für die qualitative Genexpressionsanalyse von odontoblasten-ähnlichen Zellen, Pulpafibroblasten der ersten und zweiten Dentition, einer Pulpafibroblastenzelllinie, Zellen des apikalen Zahnsäckchens und Gingivaepithelzellen wurde die Gesamt-RNA mit dem RNeasy Protect Mini Kit von der Fa. Qiagen (Hilden) extrahiert. Die Extraktion wurde nach Herstellerprotokoll für humane Zellkulturen durchgeführt. Die Gewebeproben wurden mit dem entsprechenden Äquivalent Lysis-Puffer RLT (10 µl 2-Mercaptoethanol; 990 µl RLT) versetzt und homogenisiert. Anschließend wurden die gelösten Proben auf eine RNeasy-Säule pipettiert und zentrifugiert (10.000 rpm; 15 Sekunden). Nach einer Zugabe von 700 µl RW1-Puffer fand ein weiterer Zentrifugationsschritt statt (10.000 rpm; 15 Sekunden). Daraufhin wurden die Säulen zweimal mit 500 µl RPE-Puffer gewaschen

(10.000 rpm; 2 Minuten). Zuletzt wurde die auf den Säulen gebundene RNA zweimal mit je 50 µl RNase-freiem Aqua dest. eluiert (10.000 rpm; 1 Minute). Das resultierende Volumen von 100 µl Gesamt-RNA wurde bei -80°C gelagert.

Zur cDNA-Erststrangsynthese wurden aus jeder Probe jeweils 8 µl Gesamt-RNA mit 1 µl dNTP-Mix (10 mM dATP, dGTP, dTTP, dCTP) und 1 µl Oligo(dT)-Primer (0,5 µg/µl) vermischt und 5 Minuten bei 65°C denaturiert. Nach Abkühlung auf Raumtemperatur wurden 2 µl 10fach RT-Puffer, 4 µl MgCl₂ (25 mM), 2 µl DTT (Dithiothreitol) (100 mM), 1 µl RNaseOUT (40 U/µl), 1 µl SuperScript™ II Reverse Transkriptase (50 U/µl) hinzugeführt und für 50 Minuten bei 42°C inkubiert. Anschließend wurde das Gemisch für 15 Minuten bei 72°C denaturiert. Darauf folgte der RNase-Verdau durch die Zugabe von 1 µl RNase H (2 U/µl) für 20 Minuten bei 37°C. Alle verwendeten Reagenzien wurden von der Fa. Invitrogen GmbH (Karlsruhe) bezogen.

2.5.2 Standard-Polymerasekettenreaction

Für die qualitative Amplifizierung der Gene hBD-1, -2, IL-6, IL-8, TNF-α, Cox-2, LTA₄H, cPLA₂ und DSPP wurden jeweils 1 µl der entsprechenden cDNA mit 5 µl dNTP (1 mM dATP, dGTP, dTTP, dCTP), 5 µl 10fach Puffer, je 1 µl Primer (100 pmol/µl), 1,5 µl MgCl₂ (50 mM), 0,2 µl Taq DNA Pol (5 U/µl) und 35,3 µl Aqua dest. vermischt. Die Reagenzien wurden von der Fa. Invitrogen GmbH (Karlsruhe) bestellt und die Standard-RT-PCR in dem Thermocycler MyCycler™ der Fa Bio-Rad Laboratories (München) durchgeführt.

Zu Beginn der PCR wurde eine Denaturierungsphase von 5 Minuten bei 95°C angesetzt. Innerhalb eines PCR-Zyklus fand zunächst eine Denaturierung der cDNA-Moleküle statt (95 °C; 15 Sekunden). Darauf folgte die Hybridisierung der Primer an die cDNA-Fragmente bei optimaler Annealingtemperatur (je nach Gen 56-64°C; 30 Sekunden). Im Anschluss erfolgte die Elongationsphase (72°C, 60 Sekunden). Insgesamt umfasste die PCR 40 dieser Zyklen (siehe Tabelle 1).

Tabelle 1:

Darstellung der PCR-Primersequenzen und Anzahl der Basenpaare der bei der Standard- und Real-Time-PCR verwendeten Primer

Gen	PCR-Primersequenzen		bp	°C
β-Aktin	►	5'-CATGGATGATGATATCGCCGCG-3'	370	60
	◄	5'-ACATGATCTGGGTCATCTTCTGC-3'		
hBD-1	►	5'-CATGAGAACTTCCTACCTTCTGC-3'	216	56
	◄	5'-TCACTTGCAGCACTTGGCCTT-3'		
hBD-2	►	5'-CATGAGGGTCTTGTATCTCCTCT-3'	213	64
	◄	5'-CCTCCTCATGGCTTTTTGCAGC-3'		
TNFα	►	5'-ATGAGCACTGAAAGCATGATCCG-3	698	63
	◄	5'-CAGGGCAATGATCCCAAAGTAGA-3'		
IL-1β	►	5'-ATGGCAGAAGTACCTGAGCTCGC-3'	809	60
	◄	5'-TTAGGAAGACACAAATTGCATGGTG-3,		
IL-6	►	5'-ATGAACTCCTTCTCCACAAGC-3'	638	60
	◄	5'-CTACATTTGCCGAAGAGCCC-3,		
IL-8	►	5'-ATGACTTCCAAGCTGGCCGTGG-3'	297	60
	◄	5'-TGAATTCTCAGCCCTCTTCAAAAAC-3'		
cPLA ₂	►	5'-CCAAGGGAAACTGAGGAAGA-3'	204	56
	◄	5'-AGGGAAACAGAGCAACGAGA-3'		
LTA ₄ H	►	5'-CAGTGGCTCACTCCTGAACA-3'	199	59
	◄	5'-TCTGGGTCAGGTGTTTCTCC-3'		
Cox-2	►	5'-ATTGACCAGAGCAGGCAGAT-3'	162	60
	◄	5'-CAGGATACAGCTCCACAGCA-3'		
DSPP	►	5'-TCACAAGGGAGAAGGGAATGG-3'	316	60
	◄	5'-CTTGGACAACAGCGACATCCT-3'		

►: Vorwärts-Primer; ◄: Rückwärts-Primer; bp: Basenpaare; °C: Temperaturo ptimum

Die optimale Annealingtemperatur für das jeweilige Gen wurde mit Hilfe eines Temperaturgradienten ermittelt und kontinuierlich mittels der PCR-Negativkontrolle überprüft. Nur bei einer optimalen Annealingtemperatur, die PCR-Negativkontrolle weist dabei kein PCR-Produkt auf, wurde weiterhin bei dieser ermittelten Temperatur die PCR betrieben. Die PCR-Positivkontrolle stellte das klonierte, mit den jeweiligen Primern erhaltene PCR-Fragment dar (siehe 2.8), als PCR-Negativkontrolle diente Wasser.

2.5.3 Gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte

Die Agarose-Gelelektrophorese erfolgte nach Sambrook et al. (1989). 15 µl des PCR-Produktes, gemischt mit 3 µl Auftragspuffer (0,125 g Bromphenolblau, 28,7 g Glycerin, 100 ml Aqua dest.), wurden in einem 2%igen Agarosegel [NuSieve GTG® Agarose: 50 ml 0,5 x Tris-Borsäure-EDTA-Puffer (TBE), 3 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml)] aufgetragen. Die Auftrennung der PCR-Produkte lief über eine Zeit von 30 Minuten bei einer Spannung von 100 Volt in 500 ml 0,5 x TBE-Puffer.

Sowohl die β -Aktin- als auch die Banden für hBD-1, -2, IL-6, IL-8, TNF- α , Cox-2, LTA₄H, cPLA₂ und DSPP wurden durch das zugesetzte Ethidiumbromid unter UV-Licht sichtbar gemacht und mit Hilfe einer Videokamera in einem Computer dokumentiert [Gel-Doc-System von der Fa. Bio-Rad (München)].

2.6 Stimulation von odontoblasten-ähnlichen Zellen mit rhBD-1 und-2

Rekombinante humane β -Defensine wurden von Santa Cruz (Heidelberg) geliefert. Die biologische Aktivität der Peptide konnte bereits zuvor in einer weiteren Promotionsarbeit in der Poliklinik für Parodontologie, Zahnerhaltung und Präventive Zahnheilkunde (Direktor: Prof. Dr. Dr. S. Jepsen) an der Universität Bonn nachgewiesen werden.

Für die Stimulationsversuche wurden Zellen der 2. Passage in Kulturschalen (Durchmesser: 35 mm) mit 2 ml Kulturmedium, bestehend aus DMEM, 10% FCS, Penicillin,

Streptomycin und Amphotericin von der Fa. PAA Laboratories GmbH zu einer Zelldichte von 80-90% Konfluenz gezüchtet. Als Kontrolle wurde PBS (phosphate buffered saline) dem Kulturmedium hinzugefügt. Unmittelbar vor Versuchsbeginn wurde ein Wechsel zu serumfreiem Medium vorgenommen.

Die rekombinanten humanen β -Defensine wurden in einer Konzentration von 15, 50, 150 ng/ml auf odontoblasten-ähnliche Zellen gegeben und bei 37°C inkubiert. Um reproduzierbare bzw. verifizierbare Ergebnisse zu generieren, wurden 3-fach Ansätze erhoben.

Nach Abschluss der Stimulation über den Zeitraum 0, 30, 60, 120 und 240 Minuten wurde das Medium mit samt den rekombinanten humanen β -Defensinen aus der Zellkulturschale aspiriert. Anschließend erfolgte die Zellysis, RNA-Extraktion und cDNA-Synthese wie unter 2.5 beschrieben.

2.7 Quantitative Genexpressionsdarstellung

Die quantitative Genexpressionsanalyse erfolgte in odontoblasten-ähnlichen Zellen, da Odontoblasten in kariösen Läsionen früh einem Antigenkontakt durch Mikroorganismen ausgesetzt sind. Des Weiteren konnte bereits durch Dommisch et al. (2005a) gezeigt werden, dass humane β -Defensine in der Odontoblastenzellschicht exprimiert werden. Im Anschluss an die Stimulationsversuche aus 2.6 wurden die mRNA-Extraktion und cDNA-Synthese für die quantitative Genexpressionsanalyse in odontoblasten-ähnlichen Zellen wie unter Punkt 2.5.1 beschrieben durchgeführt.

2.7.1 Real-Time-Polymerasekettenreaktion

Für die quantitative Amplifizierung der Gene hBD-1, -2, IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α , Cox-2, cPLA₂ und DSPP wurden Real-Time-PCR-Analysen mit dem iCycler der Fa. Bio-Rad (München) durchgeführt.

Die Detektion der PCR-Produkte erfolgte mit dem im Reagenzmix enthaltenen, interkalierenden Fluoreszenzfarbstoff SYBRGreen I[®]. Dieser Farbstoff bindet in der doppelsträngigen DNA und fluoresziert bei einer Wellenlänge von 490 nm. Auf diese Weise konnte eine kontinuierliche Fluoreszenzmessung des PCR-Produktes, Zyklus für Zyklus, aufgezeichnet werden.

Nach einer Denaturierung der DNA wird diese einzelsträngig und verhindert dadurch eine Interkalation mit dem Farbstoff. Während der Annealing-Phase hybridisieren die Primer an ihrer Zielsequenz der DNA-Matrize und generieren in der Elongationsphase einen Doppelstrang, in den sich der Farbstoff mehr und mehr einlagern kann. Am Ende der Elongationsphase stellt sich somit ein Maximum an gebundenem SYBR-Green[®]-Farbstoff dar. Während dieser Phase eines Zyklus in der Polymerasekettenreaktion wird die Messung mit Hilfe der iCycler[®] Kamera durchgeführt. Dieser Ablauf wiederholt sich in jedem Zyklus, so dass auf einem angeschlossenen Computermonitor das gemessene Fluoreszenzsignal zu einem beliebigen Zeitpunkt abgelesen werden kann. Schließlich wird die Polymerasekettenreaktion als exponentielle Funktion graphisch dargestellt. Die iCycler[®]-Software errechnet eine so genannte Schwellenlinie (Baseline), welche den Übergang des Graphen in die exponentielle Phase der Polymerasekettenreaktion markiert. Dieser Übergang beschreibt das Erreichen einer PCR-Produktkonzentration, die höher ist als die Hintergrundfluoreszenz im Reagenzgefäß (Gibson et al., 1996). Wird die exponentielle Phase erreicht, ergibt dieses den so genannten Schwellenwert [„threshold cycle“ (C_t-Wert)]. Dieser C_t-Wert wird anhand der Zyklenzahl festgelegt. Je später, d.h. mit zunehmender Zyklenzahl, die Probe diese Schwelle erreichte, desto geringer fällt die Konzentration der cDNA aus (Higuchi et al., 1993).

Zur quantitativen Amplifizierung wurde jeweils 1 µl der entsprechenden cDNA zu einem Mix aus 0,125 µl Primer (je 100 pmol/µl), 12,5 µl iQ[™]SYBR[®] Green Supermix [MgCl₂ (6 mM)], dNTP (0,4 mM dATP, dGTP, dTTP, dCTP), Taq DNA Pol (50 U/ml), SYBR Green (20 nM), pH 8,4) und 11,375 µl Aqua dest. (RNase-frei) gegeben. Die Reagenzien wurden von der Fa. Bio-Rad (München) bezogen.

Um unterschiedliche Konzentrationen durch ungenaues Pipetieren zu vermeiden, wurde ein Gesamtgemisch („Mastermix“) aus dem iQ[™]SYBR[®] Green Supermix, Aqua dest. und Primern hergestellt.

Zu Beginn der PCR wurde eine Denaturierungsphase von 3 Minuten bei 95°C angesetzt. Innerhalb eines Real-Time-PCR-Zyklus fand zunächst eine Denaturierung der cDNA-Moleküle statt (95 °C; 15 Sekunden). Darauf folgte die Hybridisierung der Primer an die cDNA-Fragmente bei optimaler Annealingtemperatur (je nach Gen 56-64°C; 30 Sekunden). Im Anschluss erfolgte die Elongationsphase (72°C, 30 Sekunden). Insgesamt umfasste die Real-Time-PCR 40 dieser Zyklen.

Die bei der Real-Time-PCR verwendeten Primer waren identisch mit den Primern aus der Standard-PCR (siehe Tab. 1).

Jedes Experiment setzte sich aus einer PCR-Negativkontrolle, sowie der jeweiligen cDNA-Proben und einer Verdünnungsreihe der PCR-Positivkontrolle zusammen. Bei der PCR-Negativkontrolle wurde anstatt cDNA Wasser zum Probenmix gegeben. Es sollte hier keinerlei PCR-Produkt entstehen bzw. gemessen werden.

Um die durch unterschiedliche Primer (z.B. für hBD-1, siehe Abbildung 2) generierten Werte bzw. zwei getrennte Real-Time-Polymerasekettenreaktionen mit einander vergleichen zu können, mussten die Primereffizienzen bestimmt werden. Diese wurden mit Hilfe von Verdünnungsreihen der klonierten cDNA (Standard) über eine Standardkurve ermittelt (siehe Abbildung 2). Diese Standardkurve entspricht einer Linearregression, umgekehrt zur logarithmischen Funktion der Fluoreszenzaufzeichnung aus der PCR. Die Steigung dieser Standardkurve führte schließlich zu einem Wert für die Primereffizienz (Abbildung 2).

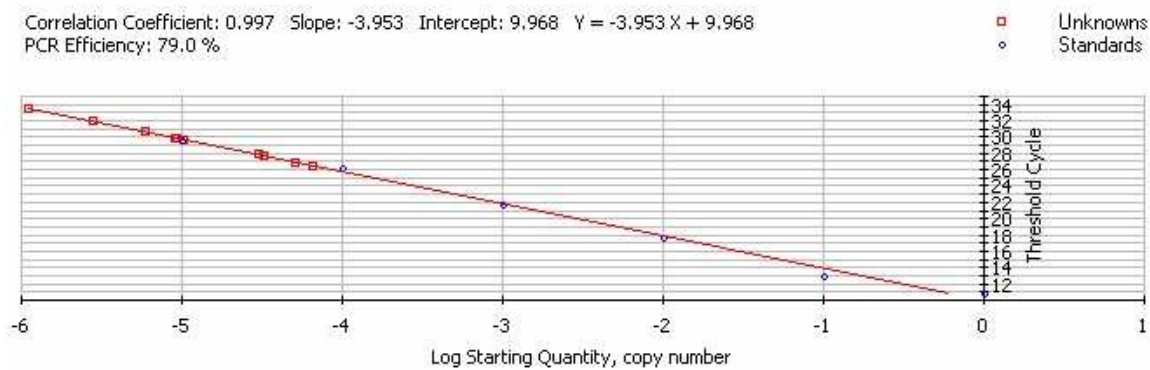


Abbildung 2:

Repräsentative Darstellung der Standardkurve für die Verdünnungsreihe der klonierten cDNA des humanen β -Defensin-1. Die cDNA wurde in einem Verhältnis von 1:1, 1:10, 1:100, 1:1.000, 1:10.000 und 1:100.000 zu Aqua dest. zum Reaktionsmix gegeben. Aus der Steigung der Standardkurve wurde entsprechend die Effizienz der Primer ermittelt (siehe Tabelle 3).

2.8 Gewinnung der PCR-Positivkontrollen

Die PCR-Positivkontrolle wurde als Indikator für eine erfolgreich durchlaufene PCR mitgeführt. Des Weiteren diente diese Kontrolle der Identifizierung des Produkts und der Produktgröße. Die Trennung der DNA-Fragmente (aus 2.5.1) wurde mittels Agarosegelelektrophorese vorgenommen und nach der Entnahme aus dem Gel mit dem QIAEX[®] II Gel Extraction Kit von der Fa. Qiagen (Hilden) isoliert.

Die Klonierungen der PCR-Produkte erfolgten im Labor von PD Dr. R. Probstmeier (Neuro- und Tumorzellbiologie Gruppe, Abt. Nuklearmedizin, Universität Bonn - Direktor: Prof. Dr. Biersack) und wurden mit Hilfe des TOPO TA Cloning[®] Kits von der Fa. Invitrogen (Karlsruhe) vorgenommen. Jeweils 1 μ l des generierten PCR-Produktes wurde mit 1 μ l Salzlösung (1,2 M NaCl, 60mM MgCl₂), 1 μ l TOPO[®] Vektor und 2 μ l Aqua dest. versehen und für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 2 μ l dieses Mixes auf gekühlte *E. coli* Zellen gegeben und 10 Minuten auf Eis gelagert. Darauf-

folgend wurden die Zellen für 30 Sekunden einem Hitzeschock von 42°C ausgesetzt und auf Agar ausplattiert (Transformation). Die Selektion der entstandenen Klone erfolgte mit Hilfe von Ampicillin von der Fa. Sigma (Taufkirchen). Nachfolgend wurden positive Plasmid-DNA-Klone mit QIAprep® Spin Miniprep Kits von der Fa. Qiagen (Hilden) isoliert und eine Analyse auf erfolgreiche Insertion des DNA-Fragmentes durch einen Restriktionsverdau mit EcoRI von der Fa. Roche (Mannheim) vorgenommen. Die positiven Klone wurden mittels DNA-Sequenzierung verifiziert, durchgeführt von der Fa. MWG Biotech AG (Ebersberg).

2.9 Auswertung der quantitativen PCR

Alle untersuchten Proben wurden anhand der unstimulierten Kontrolle und des House-keeping-Gens β -Aktin ausgewertet. Die β -Aktin mRNA wird in allen Zellen in einem nahezu gleichen Verhältnis exprimiert (Thellin et al., 1999; Bustin, 2000; Ke et al., 2000; Bustin, 2002; Vandesompele et al., 2002). Bei der Auswertung der quantitativen Real-Time-PCR wurde die Normalisierung der Ergebnisse anhand der Genexpression von β -Aktin-Primern zur Normalisierung der Ergebnisse vorgenommen (Thellin et al., 1999; Bustin, 2000; Ke et al., 2000; Bustin, 2002; Vandesompele et al., 2002).

Alle Ergebnisse wurden zunächst durch den oben beschriebenen Schwellenwert (C_t -Wert) dargestellt. Die Methode nach Pfaffl ermittelt die Änderung der Genexpression im Vergleich zum Housekeeping-Gen und zur unstimulierten Kontrolle. Der Wert wird hier als x-fache Änderung der entsprechenden Genexpression angegeben (Pfaffl, 2001). Im ersten Schritt wurde die Primereffizienz der Referenz- und der Zielprimer errechnet. Hierfür wurde folgende Formel angewandt:

$$E = 10^{(-1/\text{Steigung der Standardkurve})} = \text{Effizienz}$$

In einem zweiten Rechenschritt wurden die jeweiligen ΔC_t -Werte der einzelnen Proben erarbeitet. Es wurde eine Differenz gebildet, bei welcher der ΔC_t -Wert aus dem C_t -Wert des House-Keeping-Genes und dem des Zielgens der unstimulierten Kontrolle ermittelt wurde. Dieses entsprach der Referenz.

Die zweite Differenz für den ΔC_t -Wert wurde aus dem C_t -Wert des House-Keeping-Genes und dem des Zielgens der untersuchten Probe (Wert für das Zielgen) berechnet. In einer weiteren Formel wurde dann der entsprechende Quotient ermittelt, welcher die x-fache Änderung der Genexpression angab:

$$\text{Quotient} = (E_{\text{Zielgen}})^{\Delta C_t\text{-Zielgen(Kontrolle-Probe)}} / (E_{\text{Referenz}})^{\Delta C_t\text{-Referenz(Kontrolle-Probe)}}$$

(Pfaffl, 2001)

2.10 Statistische Auswertung der quantitativen Genexpressionsanalyse

Die statistische Auswertung wurde mit dem Programm SPSS (Student Version 14), lizenziert für das Universitätsklinikum Bonn, durchgeführt.

Es wurde zunächst eine rein deskriptive Statistik erhoben, wobei der Mittelwert, Minimum, Maximum und die Standardabweichung angegeben worden sind. In einem zweiten Arbeitsschritt wurde eine Two-Way ANOVA durchgeführt, um die Beziehung zwischen der angewandten Konzentration rekombinanter, humaner β -Defensine und der Änderung der Genexpression zu den gemessenen Zeitpunkten zu ermitteln. Der dritte Test bezog sich auf die Unterschiede zwischen zwei Stichproben (jeweils für die Zeit und die Konzentration getrennt), die direkt mit einander mit Hilfe des gepaarten T-Tests (zweiseitig) verglichen wurden (Brosius, 2002). In allen Tests wurde ein Signifikanzniveau von $p \leq 0,05$ angenommen. Die abgeleiteten Ergebnisse sind explorativ zu sehen und sollten als Auffälligkeiten gewertet werden.

3. Ergebnisse

Im Rahmen oralchirurgischer Routineeingriffe wurden zunächst Pulpagewebeproben gewonnen. Daraufhin wurden aus diesen Proben Zellkulturen aus odontoblasten-ähnlichen Zellen, Pulpafibroblasten der ersten und zweiten Dentition und Zellen des apikalen Zahnsäckchens angezüchtet. Nachfolgend wurde die qualitative Genexpressionsanalyse der humanen β -Defensine-1 und -2 sowie der Interleukine-6 und -8, des Tumornekrosefaktors- α , der Cyclooxygenase-2, der Leukotrien-A4-Hydrolase, der zytosolischen Phospholipase-A2 und des Odontoblastenmarkers DSPP in den oben genannte Zellkulturen sowie in einer Pulpafibroblastenzelllinie und Gingivaepithelzellen (siehe 2.4) vorgenommen. Anschließend erfolgte die quantitative Genexpressionsanalyse von hBD-1, -2, IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α , Cox-2, cPLA₂ und DSPP nach Stimulation von odontoblasten-ähnlichen Zellen mit den rekombinanten, humanen β -Defensinen-1 und -2.

3.1 Qualitative Genexpressionsanalyse

Zur qualitativen Genexpressionsanalyse der humanen β -Defensine-1 und -2, der Interleukine-6 und IL-8, des Tumornekrosefaktors- α , der Cyclooxygenase-2, der Leukotrien-A4-Hydrolase, der zytosolischen Phospholipase-A2 und des Dentinsialophosphoproteins wurden odontoblasten-ähnliche Zellen, Pulpafibroblasten der ersten und zweiten Dentition, eine Pulpafibroblastenzelllinie, Zellen des apikalen Zahnsäckchens und Gingivaepithelzellen auf die Anwesenheit der bereits genannten Gene untersucht. Als Housekeeping-Gen wurde bei allen Versuchen β -Aktin verwendet.

Tabelle 2:

Genexpression von hBD-1, -2, IL-6, IL-8, TNF- α , Cox-2, LTA₄H, cPLA₂ und DSPP in odontoblasten-ähnlichen Zellen, Pulpafibroblasten (Pulpafibroblastenzelllinie und Pulpafibroblasten der ersten und zweiten Dentition), Zellen des apikalen Zahnsäckchens und Gingivaepithelzellen

	odontoblasten- ähnliche Zellen	Pulpafibroblasten	Zellen des apikalen Zahnsäckchens	Gingivaepithelzellen
hBD-1	+	-	-	+
hBD-2	+	-	-	+
IL-6	+	+	+	+
IL-8	+	+	+	+
TNF- α	+	+	+	+
cPLA ₂	+	+	+	+
LTA ₄ H	+	+	+	+
Cox-2	+	+	+	+
DSPP	+	+	+	/

- = nicht detektiert; + = detektiert; / = nicht untersucht

In odontoblasten-ähnlichen Zellen konnte die in vivo Genexpression von hBD-1, -2, IL-6, IL-8, TNF- α , Cox-2, LTA₄H, cPLA₂ und DSPP gezeigt werden. In Pulpafibroblasten konnte die Genexpression von IL-6, IL-8, TNF- α , cPLA₂, LTA₄H, Cox-2 und DSPP nachgewiesen werden. Eine Genexpression der humanen β -Defensine-1 und -2 konnte dort nicht verzeichnet werden. Nach Analyse der Genexpression von hBD-1, -2, IL-6, IL-8, TNF- α , cPLA₂, LTA₄H, Cox-2 und DSPP in Zellen des apikalen Zahnsäckchens wurden IL-6 und -8, TNF- α , cPLA₂, LTA₄H, Cox-2 und DSPP detektiert. Die beiden humanen β -Defensine-1 und -2 konnten ebenfalls nicht gefunden werden. In Gingivaepithelzellen konnte die Expression aller untersuchten Gene nachgewiesen werden (siehe Abbildungen 3 und 4).

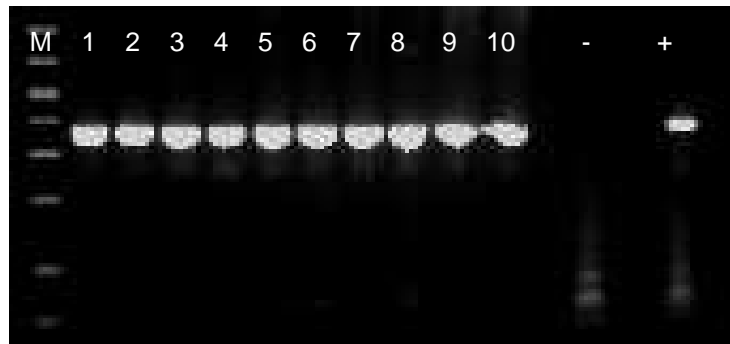


Abbildung 3:

Geldokumentation einer Real-Time-PCR mit cDNA-Proben von β -Aktin (370 bp) [M = Marker (50-1000 bp); 1-2 = odontoblasten-ähnliche Zellen; 3 = Pulpafibroblasten der ersten Dentition; 4 = Pulpafibroblasten der zweiten Dentition; 5-6 = Pulpafibroblastenzelllinie; 7-8 = Zellen des apikalen Zahnsäckchens; 9-10 = Gingivaepithelzellen; - = PCR-Negativkontrolle; + = PCR-Positivkontrolle].

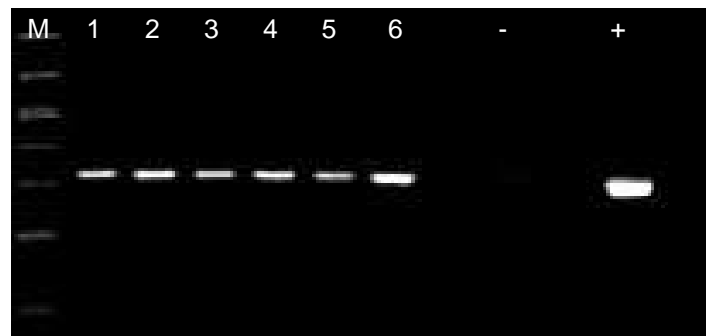


Abbildung 4:

Geldokumentation einer Real-Time-PCR mit cDNA-Proben von DSPP (316 bp) [M = Marker (50-1000 bp); 1-2 = odontoblasten-ähnliche Zellen; 2 = Pulpafibroblasten der ersten Dentition; 3 = Pulpafibroblasten der zweiten Dentition; 4 = Pulpafibroblastenzelllinie; 5 = Zellen des apikalen Zahnsäckchen; - = PCR-Negativkontrolle; + = PCR-Positivkontrolle].

3.2 Optimierung der Real-Time-PCR

Zur Optimierung der Bedingungen der Real-Time-PCR wurden für jedes einzelne Gen mit den entsprechenden klonierten PCR-Produkten die optimalen Temperaturen der dazugehörigen Primer bestimmt. Die Effizienzen zur Berechnung der relativen Genexpressionen nach Pfaffl wurden mit Hilfe von Verdünnungsreihen ermittelt. Diese sind in Tabelle 3 dargestellt.

Unter optimalen Bedingungen generiert die PCR mit cDNA Proben eine einzelne DNA-Bande, die mit der aus der PCR-Positivkontrolle korreliert, wobei gleichzeitig keine Bande mit Wasser als PCR-Negativkontrolle erkennbar ist.

Tabelle 3:

Darstellung der Effizienzen von β -Aktin, hBD-1, -2, IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α , Cox-2, cPLA₂ und DSPP aus der Real-Time-PCR

Gen	Effizienz
β -Aktin	1,835
hBD-1	2,071
hBD-2	2,054
IL-1 β	1,833
IL-8	2,017
IL-6	2,120
TNF- α	2,164
Cox-2	2,173
DSPP	1,833
cPLA ₂	1,969

3.3 Quantitative Genexpressionsanalyse

Aufgrund dieser qualitativen Ergebnisse und der Tatsache, dass Odontoblasten in kariösen Läsionen früh einem Antigenkontakt durch Mikroorganismen ausgesetzt sind, wurden in dem Hauptversuch odontoblasten-ähnliche Zellen mit rhBD-1 und -2 in unterschiedlichen Konzentrationen (15, 50 und 150 ng/ml) in jeweils 3-fach Ansätzen stimuliert. Anschließend wurden die Genexpressionsraten von hBD-1, -2, IL-1 β , -6 und -8, TNF- α , Cox-2, DSPP und cPLA₂ wie unter 2.7-2.10 beschrieben, bestimmt. Alle untersuchten Proben wurden anhand der unstimulierten Kontrolle und des Housekeeping-Gens β -Aktin ausgewertet.

3.3.1 Genexpression von hBD-1 nach Stimulation mit rhBD-2

Nach Stimulation von odontoblasten-ähnlichen Zellen mit rhBD-2 konnte eine Verminderung der Expression von hBD-1 im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle verzeichnet werden.

Bei einer Konzentration von 15 ng/ml kam es nach zwei Stunden zu einer Abnahme der Expression auf ca. ein fünftel des Ausgangswertes ($p = 0,004$) und bei einer Konzentration von 50 ng/ml wurde die Expressionsrate von null bis vier Stunden z.T. auf ca. ein zehntel reduziert (0,5 Stunden: $p = 0,045$; 1 Stunde: $p = 0,047$; 2 Stunden: $p = 0,008$; 4 Stunden $p = 0,0041$).

Die Zugabe des rekombinanten humanen β -Defensins-2 in einer Konzentration von 150 ng/ml führte innerhalb des Zeitversuches zu keiner signifikanten Expressionsänderung (siehe Abbildungen 5 und 6).

Relative mRNA Expression von hBD-1 (50 ng/ml rhBD-2)

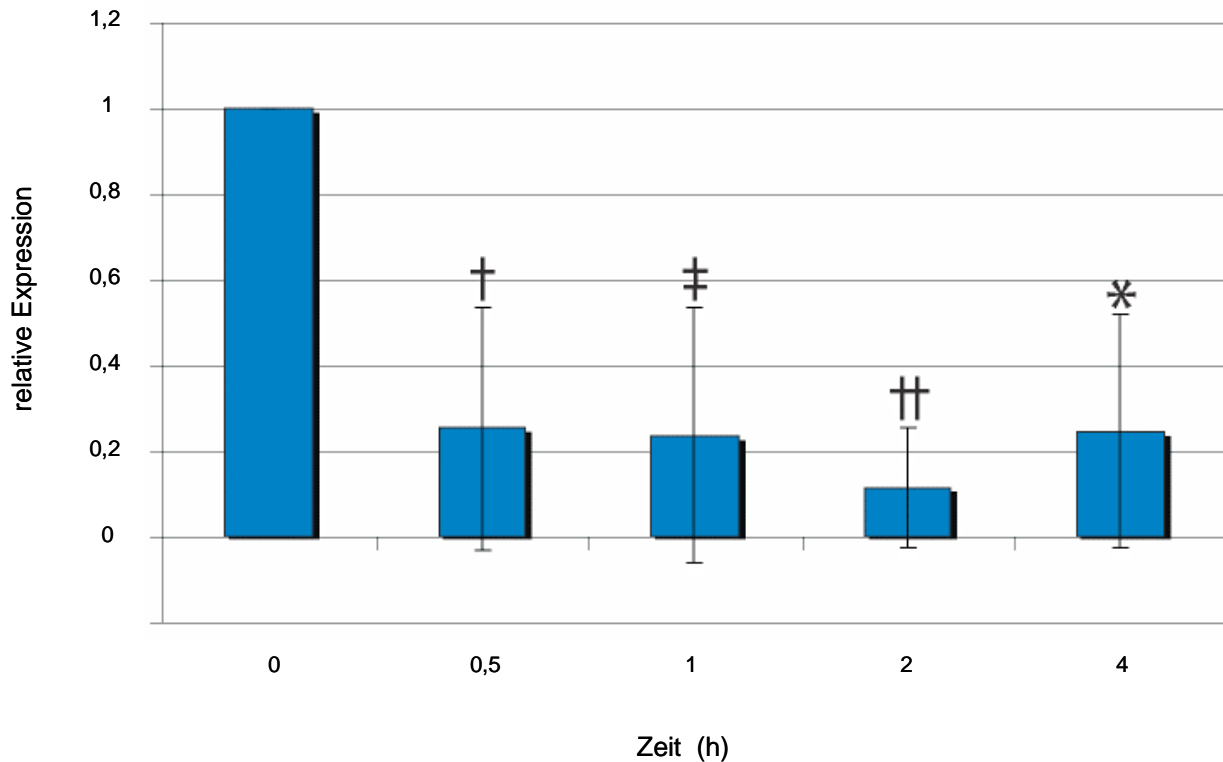


Abbildung 5:

Darstellung der relativen Genexpression (zeitabhängig) von hBD-1 in odontoblasten-ähnlichen Zellen nach Stimulation mit 50 ng/ml rhBD-2. Die Expression wurde nach 0,5 ($^{\dagger}p = 0,045$), 1 ($^{\dagger}p = 0,047$), 2 ($^{\dagger\dagger}p = 0,008$) und 4 ($*p = 0,0041$) Stunden im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle deutlich reduziert.

Relative mRNA Expression von hBD-1 (2h)

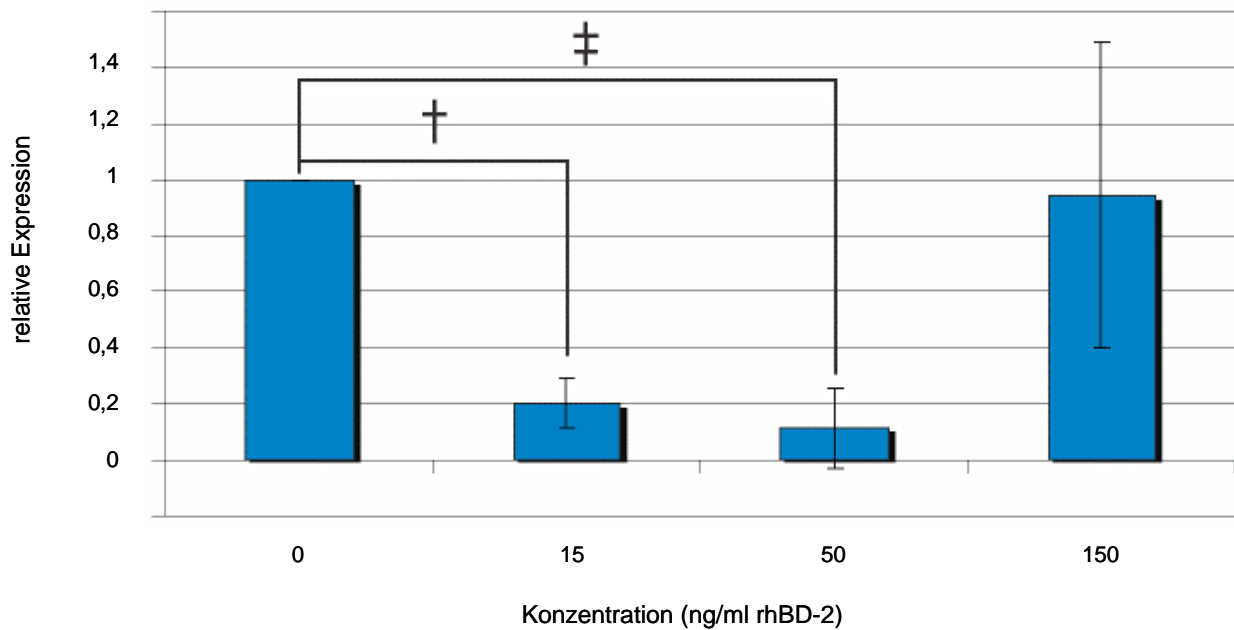


Abbildung 6:

Darstellung der relativen Genexpression von hBD-1 in odontoblasten-ähnlichen Zellen nach Stimulation durch rhBD-2 in den Konzentrationen 15, 50 und 150 ng/ml. Der Stimulationszeitraum betrug zwei Stunden. Es konnte eine dosisabhängige Verminderung der Expression nach Zugabe von 15 ($^{\dagger}p = 0,004$) und 50 ($^{\dagger}p = 0,008$) ng/ml rhBD-2 im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle festgestellt werden. Eine Stimulation mit 150 ng/ml rhBD-2 führte zu keiner Expressionsänderung im Vergleich zur Kontrolle.

3.3.2 Genexpression von IL-6 nach Stimulation mit rhBD-2

Nach Stimulation der odontoblasten-ähnlichen Zellen mit rhBD-2 konnte ein Anstieg der Expression von IL-6 im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle verzeichnet werden:

Bei einer Konzentration von 15 ng/ml rhBD-2 konnte innerhalb der ersten Stunde eine ca. 13-fach erhöhte Expression festgestellt werden (0,5 Stunden: $p = 0,045$; 1 Stunde: $p = 0,036$). Nach zwei Stunden kam es jedoch zu einer signifikanten Reduktion der Expression auf das ca. 6-fache ($p = 0,02$) und stieg nach vier Stunden erneut auf das ca. 12-fache an.

Im Vergleich dazu stellte sich der Expressionsanstieg in der ersten Stunde bei einer Konzentration von 50 ng/ml rhBD-2 auf das ca. 8-fache ($p = 0,025$) verringert dar. Nach Stimulation der Zellen mit einer Konzentration von 150 ng/ml rhBD-2 konnte keine Erhöhung der Expression mehr verzeichnet werden ($p = 0,05$) (siehe Abbildungen 7 und 8).

3.3.3 Genexpression von IL-8 nach Stimulation mit rhBD-2

Nach Stimulation der odontoblasten-ähnlichen Zellen mit rhBD-2 konnte eine Erhöhung der Expression von IL-8 im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle festgestellt werden.

Die Zugabe von 15 ng/ml rhBD-2 führte zu einem kontinuierlichen Anstieg der Expression innerhalb des Zeitversuchs auf das ca. 6-fache (0,5 Stunden: $p = 0,003$; 1 Stunde: $p = 0,025$; 2 Stunden: $p = 0,031$; 4 Stunden $p = 0,0041$). Innerhalb der ersten Stunde kam es mit steigender Konzentration zu einer Verminderung der Expressionsraten im Vergleich zu 15 ng/ml rhBD-2.

Nach der Zugabe von 15 ng/ml rhBD-2 konnte eine ca. 3,5-fach ($p = 0,03$) erhöhte Expression verzeichnet werden, bei 50 ng/ml rhBD-2 ca. noch 2,8-fach und bei einer Konzentration von 150 ng/ml rhBD-2 nur noch ca. 1,5-fach ($p = 0,009$) (siehe Abbildungen 9 und 10).

Relative mRNA Expression von IL-6 (15 ng/ml rhBD-2)

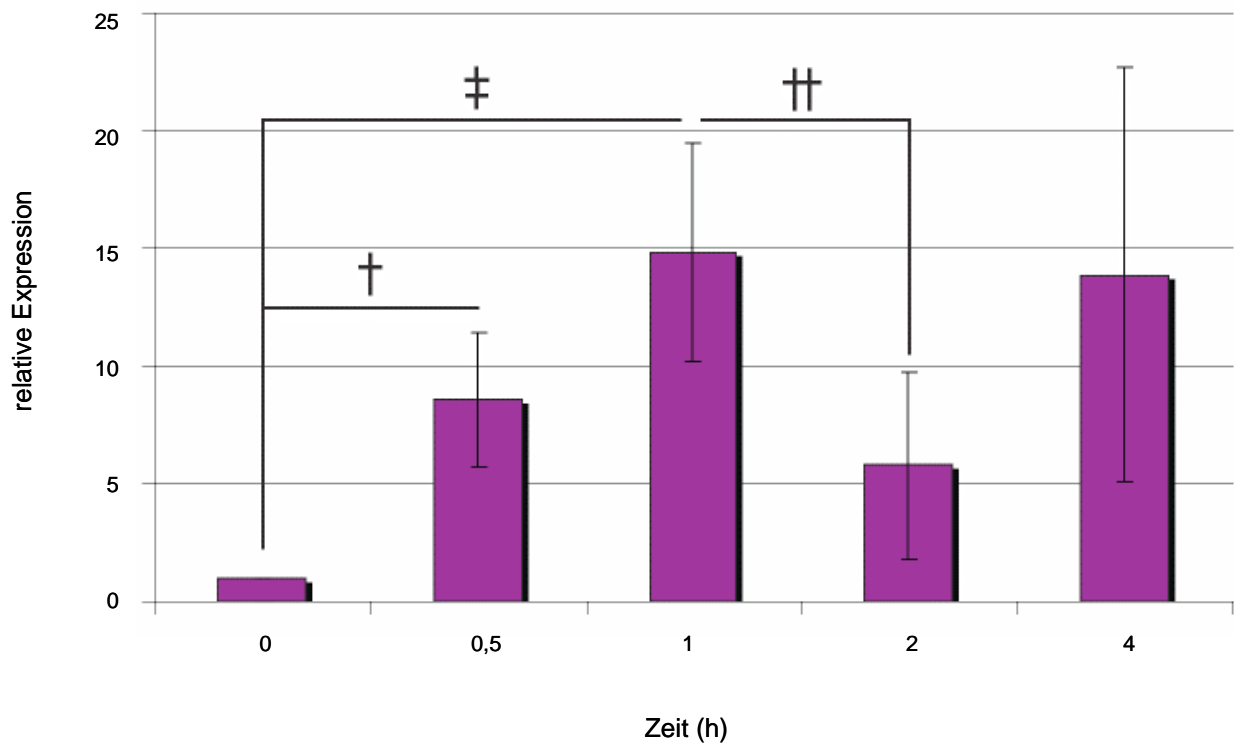


Abbildung 7:

Darstellung der relativen Genexpression (zeitabhängig) von IL-6 in odontoblasten-ähnlichen Zellen nach Stimulation mit 15 ng/ml rhBD-2. Die Expression zeigte nach 0,5 ($^{\dagger}p = 0,045$) und 1 ($^{\ddagger}p = 0,036$) Stunde einen Anstieg im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle. Nach 2 Stunden konnte ein signifikanter Abfall der Expression von IL-6 im Vergleich zur ersten Stunde festgestellt werden ($^{\dagger\dagger}p = 0,02$).

Relative mRNA Expression von IL-6 (1 h)

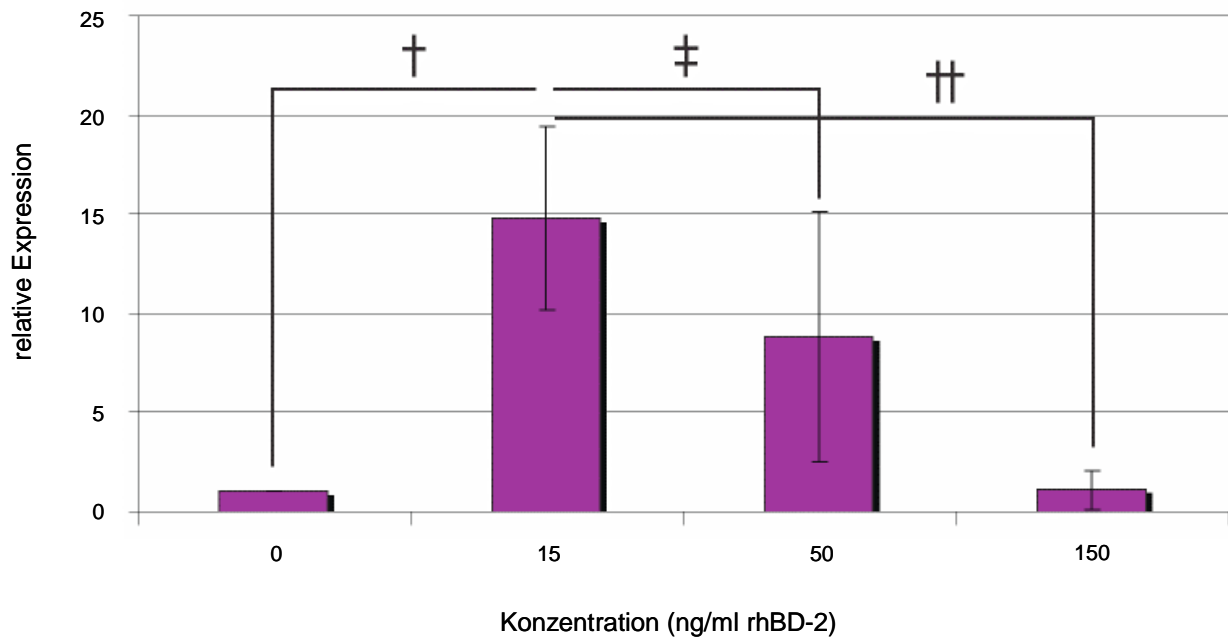


Abbildung 8:

Darstellung der relativen Genexpression von IL-6 in odontoblasten-ähnlichen Zellen nach Stimulation durch rhBD-2 in den Konzentrationen 15, 50 und 150 ng/ml. Der Stimulationszeitraum betrug eine Stunde. Es konnte ein dosisabhängiger Anstieg der Expression in Gegenwart von 15 ng/ml rhBD-2 ($^{\dagger}p = 0,045$) im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle festgestellt werden. In Reaktion auf 50 ng/ml rhBD-2 kam es zu einem Abfall der Genexpression im Vergleich zur Stimulation mit 15 ng/ml rhBD-2 ($^{\ddagger}p = 0,025$). Die Stimulation mit 150 ng/ml rhBD-2 zeigte eine signifikant geringere Expression von IL-6 im Vergleich zur Stimulation mit 15 ng/ml ($^{\dagger\dagger}p = 0,05$), welche der relativen Expression der unstimulierten Kontrolle entsprach.

Relative mRNA Expression von IL-8 (15 ng/ml rhBD-2)

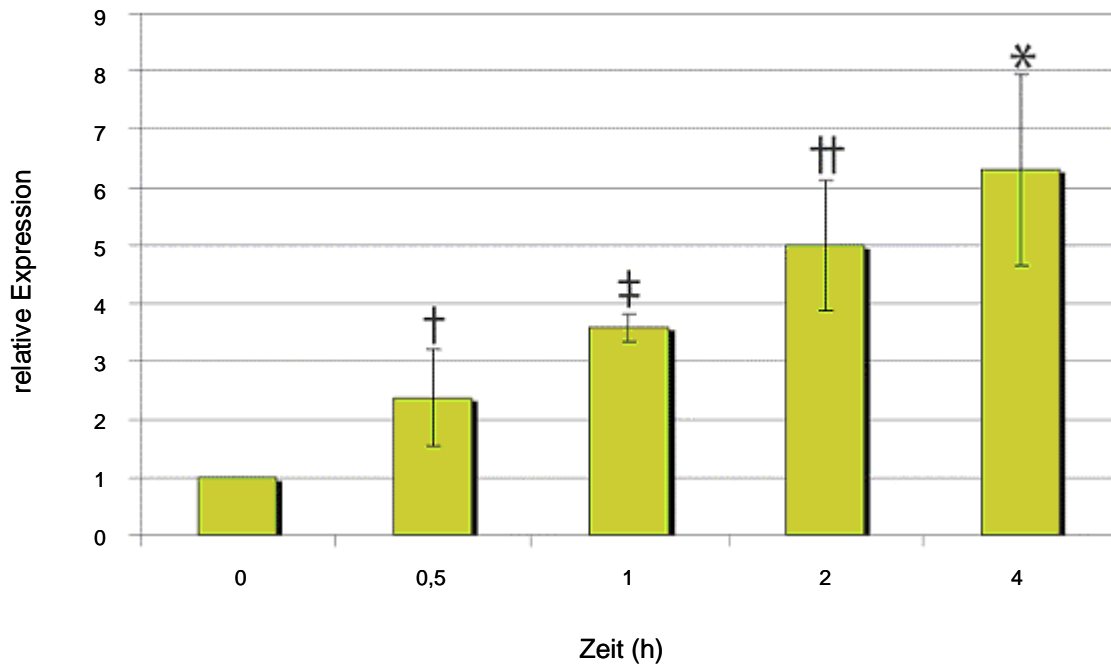


Abbildung 9:

Darstellung der relativen Genexpression (zeitabhängig) von IL-8 in odontoblasten-ähnlichen Zellen nach Stimulation mit 15 ng/ml rhBD-2. Im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle führte die Stimulation zu einem zeitabhängigen Anstieg der Expression nach 1 ($^{\dagger}p = 0,003$), 2 ($^{\dagger\dagger}p = 0,025$) und 4 ($^{\dagger\dagger\dagger}p = 0,031$) Stunden ($^*p = 0,0041$).

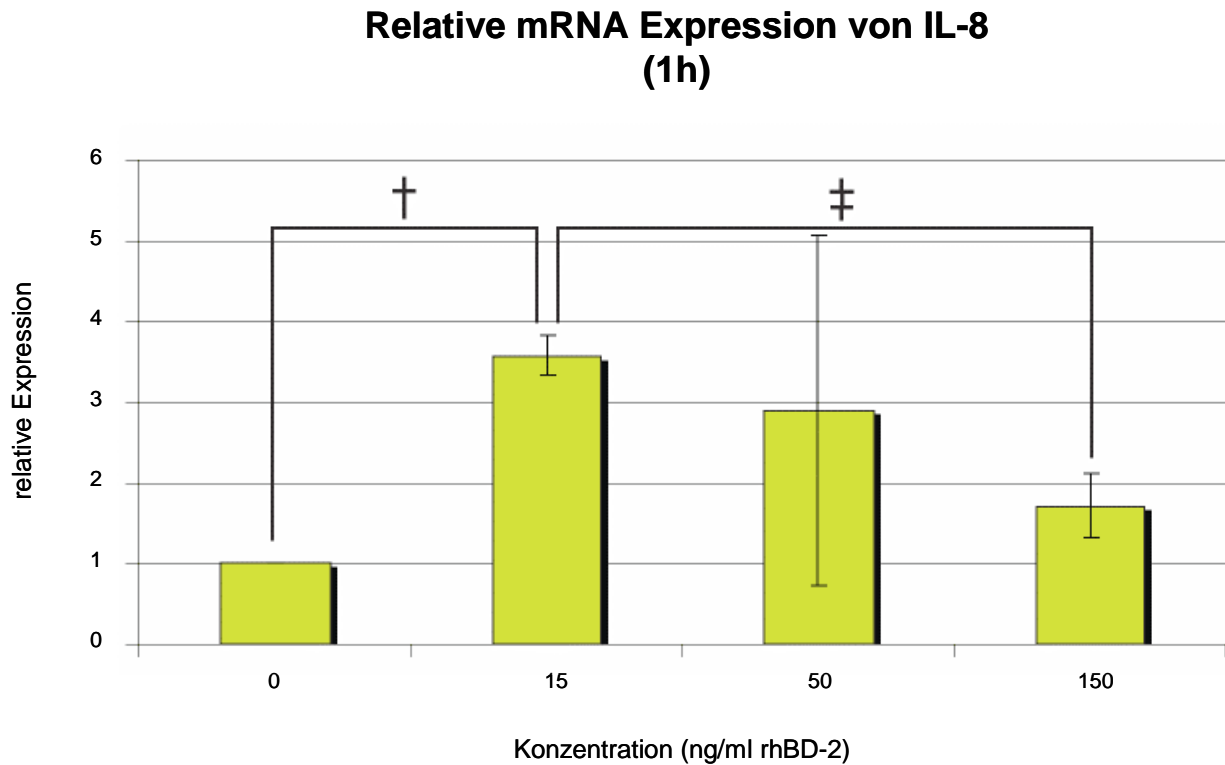


Abbildung 10:

Darstellung der relativen Genexpression von IL-8 in odontoblasten-ähnlichen Zellen nach Stimulation mit rhBD-2 in den Konzentrationen 15, 50 und 150 ng/ml. Der Stimulationszeitraum betrug eine Stunde. Nach Zugabe von 15 ng/ml rhBD-2 ($\dagger p = 0,03$) wurde im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle ein signifikanter Anstieg der Expression festgestellt. Mit steigender Konzentration rhBD-2 konnte ein Abfall der Genexpression im Vergleich zur Stimulation mit 15 ng/ml beobachtet werden. Die Konzentration von 150 ng/ml führte zu einer signifikant geringeren Expression als nach Stimulation mit 15 ng/ml rhBD-2 ($\ddagger p = 0,009$).

3.3.4 Genexpression von cPLA₂ nach Stimulation mit rhBD-2

Nach Stimulation der odontoblasten-ähnlichen Zellen mit rhBD-2 in einer Konzentration von 150 ng/ml konnte eine tendenzielle Erhöhung der Expression von cPLA₂ nach 0,5 Stunden ($p = 0,06$) festgestellt werden. Nach einer Stunde kam es zu einem Abfall der Expressionsrate unter die der unstimulierten Kontrolle ($p = 0,05$).

Nach zwei Stunden kam es weder bei 15 noch bei 50 ng/ml rhBD-2 zu einer signifikanten Änderung der Expression. Lediglich bei einer Konzentration von 150 ng/ml rhBD-2 konnte eine Tendenz zu einer Expressionserhöhung gemessen werden (siehe Abbildungen 11 und 12).

Die Expressionsraten des humanen β -Defensins-2, sowie des Interleukins-1 β , des Tumornekrosefaktors- α , der Cyclooxygenase-2 und des Dentinsialophosphoproteins wurden in odontoblasten-ähnlichen Zellen durch die Stimulation mit dem rekombinanten humanen β -Defensin-2 nicht beeinflusst. Nach Stimulation odontoblasten-ähnlicher Zellen mit dem rekombinanten humanen β -Defensin-1 konnten ebenfalls keine signifikanten Expressionsänderungen der untersuchten Gene gezeigt werden.

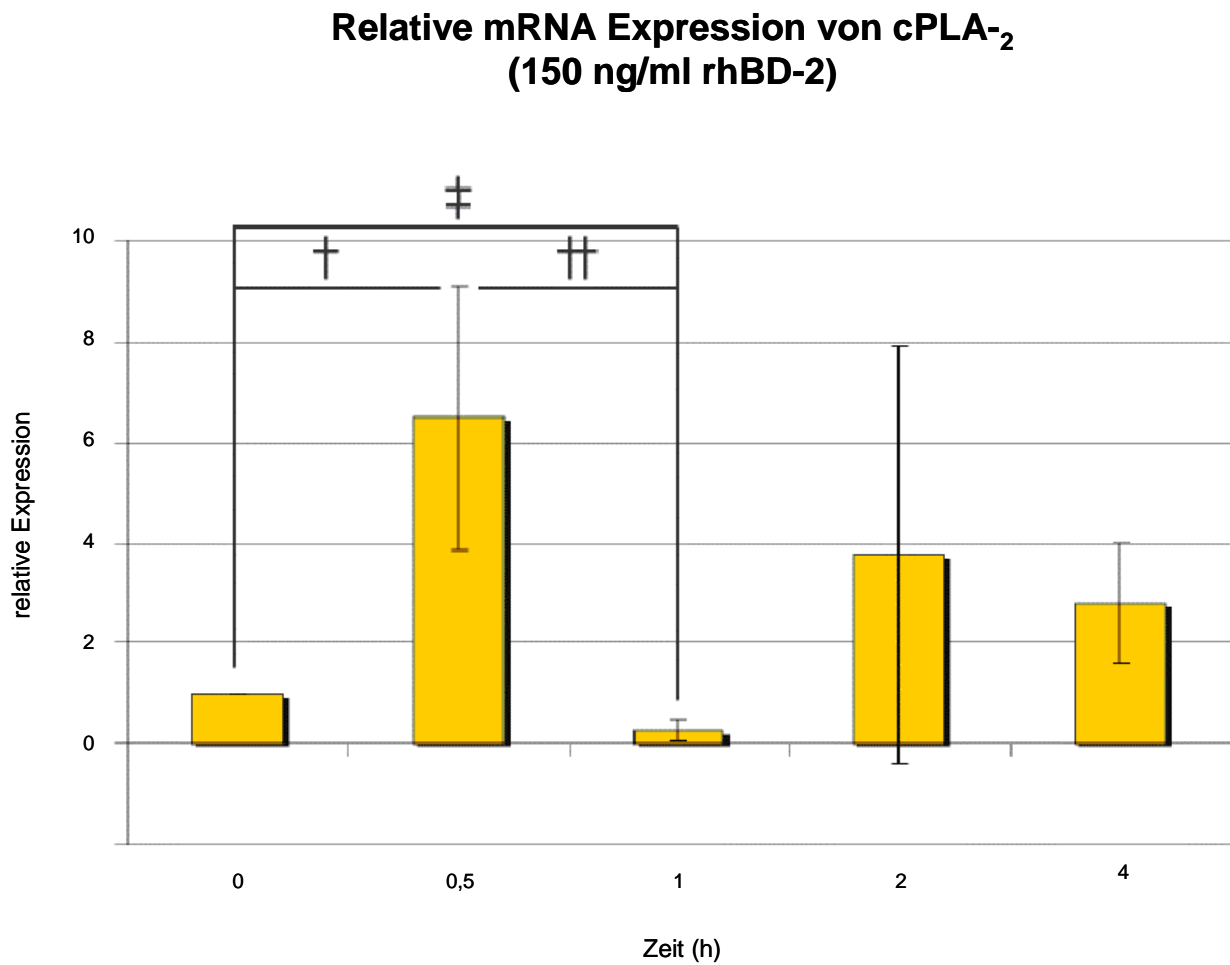


Abbildung 11:

Darstellung der relativen Genexpression (zeitabhängig) von cPLA₂ in odontoblasten-ähnlichen Zellen nach Stimulation mit 150 ng/ml rhBD-2. Die Expression zeigte einen tendenziellen Anstieg nach 0,5 Stunden ($^{\dagger}p = 0,06$) im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle. Nach einer Stunde ($^{\ddagger}p = 0,029$) konnte eine signifikante Reduktion der Expression im Vergleich zu 0,5-Stunden festgestellt werden, auch im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle ($^{\dagger\dagger}p = 0,05$).

Relative mRNA Expression von cPLA₂ (2h)

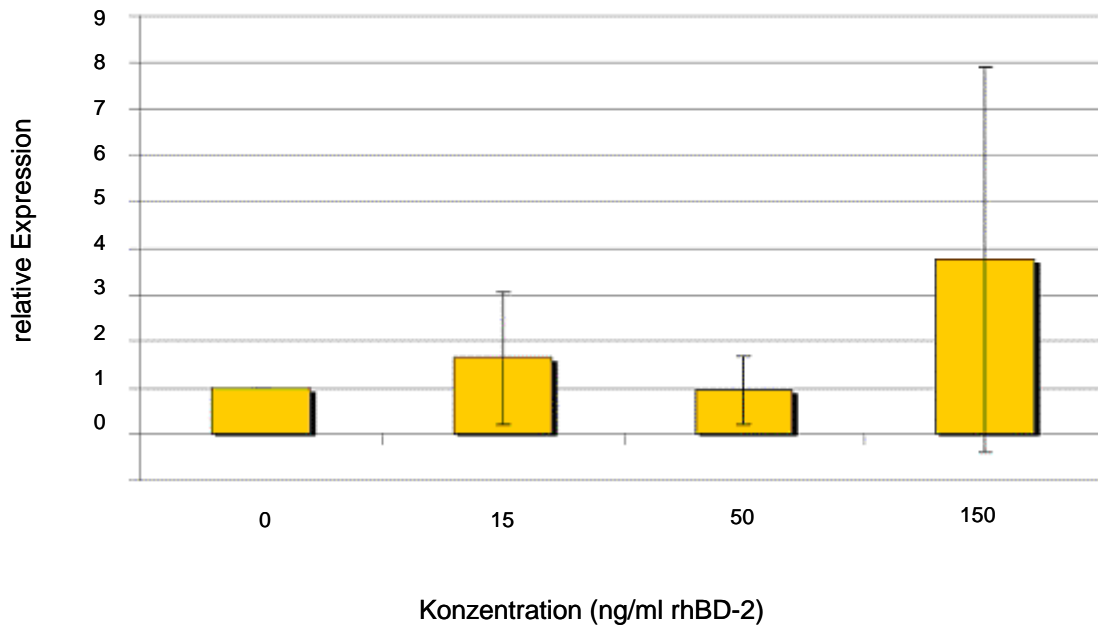


Abbildung 12:

Darstellung der relativen Genexpression von cPLA₂ in odontoblasten-ähnlichen Zellen nach Stimulation mit rhBD-2 in den Konzentrationen 15, 50 und 150 ng/ml. Der Stimulationszeitraum betrug zwei Stunden. Es konnten keine signifikanten Veränderungen verzeichnet werden.

4. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden Untersuchungen an Kulturen von Zellen aus dem Gewebe der Zahnpulpa vorgenommen. Hierbei handelte es sich um odontoblasten-ähnliche Zellen, Pulpafibroblasten der ersten und zweiten Dentition und Zellen des apikalen Zahnsäckchens. Für die Anzucht dieser Zellen konnten im Rahmen routinemäßig durchgeführter oralchirurgischer Eingriffe Zähne der ersten und zweiten Dentition sowie das Zahnsäckchen gewonnen werden. Diese drei Zellarten erfüllen distinkte Aufgaben innerhalb der pulpalen Einheit und im Falle des apikalen Zahnsäckchens ebenfalls in der Entwicklung der Zahnwurzel. Pulpafibroblasten im Allgemeinen repräsentieren diejenige Zellart, die in der Zahnpulpa am häufigsten vertreten ist und daher auch den Aufbau dieses Organs maßgeblich mitbestimmt. Das apikale Zahnsäckchen besteht aus einem Gemisch mittelstark differenzierter Zellen, die durch weitere Differenzierungsvorgänge die Formation der Zahnwurzelstrukturen bestimmen. Diese Zellen differenzieren sich hier im Verlaufe der Entwicklung zu Osteoblasten, Zementoblasten, Fibroblasten, Endothelzellen sowie Odontoblasten und generieren daraufhin die Strukturen, die zur Ausbildung pulpaler und parodontaler Strukturen führen. Die Odontoblasten der Zahnpulpa sind hartschmelzbildende Zellen, die im Verlaufe der Zahnentwicklung die Vorstufe des Zahndentins (Prädentin) synthetisieren (Schroeder, 1992). Anders als bei den Ameloblasten, die den Zahnschmelz nur bis zu einem einzigen Zeitpunkt des Lebens ausbilden, zeigen Odontoblasten die Fähigkeit, zeitlebens Dentin zu generieren (Schroeder, 1992). Odontoblastenzellen grenzen anatomisch direkt an das Dentin und treten im Falle einer kariösen Destruktion der Zahnhartschmelzen und damit bakteriellen Infektion des Dentins als erste Zellen mit Mikroorganismen bzw. deren Stoffwechselprodukten in Wechselwirkung. Die regenerativen Eigenschaften und die neue Erkenntnis, dass Odontoblasten als Teil der angeborenen Immunabwehr antimikrobielle Peptide synthetisieren, unterscheiden diese Zellen von anderen innerhalb der Zahnpulpa (Dommisch et al., 2005a).

Das Ziel dieser Arbeit war es, zunächst die Genexpression der humanen β -Defensine-1, -2, IL-6, IL-8, TNF- α , Cox-2, LTA₄H, cPLA₂ und DSPP in odontoblasten-ähnlichen Zellen, Pulpafibroblasten der ersten und zweiten Dentition, einer Pulpafibroblastenzelllinie,

Zellen des apikalen Zahnsäckchens und Gingivaepithelzellen nachzuweisen. Darauf folgend sollten mögliche mediator-ähnliche Funktionen des humanen β -Defensins-2 auf immunmodulierende Mediatoren (IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α , Cox-2, cPLA₂) und β -Defensine (hBD-1 und -2) in der Zahnpulpa untersucht werden.

Anhand der genannten oralen Zellkulturen wurde zunächst eine qualitative Genexpressionsanalyse von hBD-1, -2, IL-6, IL-8, TNF- α , LTA₄H, Cox-2, cPLA₂ und DSPP mit Hilfe der RT-PCR durchgeführt. Anschließend wurde eine quantitative Genexpressionsanalyse von hBD-1, -2, IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α , Cox-2, cPLA₂ und DSPP nach Stimulation von odontoblasten-ähnlichen Zellen mit den rekombinanten humanen β -Defensinen-1 und -2 in verschiedenen Konzentrationen (15, 50 und 150 ng/ml) unter Anwendung der RT-Real-Time-PCR vorgenommen.

Die Expressionsbestimmung aller untersuchten Gene (hBD-1, -2, IL-6, IL-8, TNF- α , LTA₄H, Cox-2, cPLA₂ und DSPP) erfolgte mit einem thermozyklischen Verfahren, der Polymerasekettenreaktion (PCR). Während dieser Reaktion können kleine Mengen spezifischer DNA-Fragmente mit hoher Ausbeute (exponentiell) amplifiziert werden. Die zur quantitativen Analyse der Genexpressionen verwendete Real-Time-Polymerasekettenreaktion ist wesentlich sensitiver und erlaubt neben der üblichen Amplifizierung der cDNA zusätzlich eine Quantifizierung mit Hilfe von Fluoreszenzmessungen innerhalb eines Zyklus. Die Fluoreszenz nimmt dabei proportional zur Menge der generierten Produkte zu und dient der Datenerhebung, sobald ein Anstieg über die Hintergrund-Fluoreszenz verzeichnet werden kann (Schwellenwertzyklus / „Crossing point“) (Bustin, 2000; Bustin, 2002). Um Artefakte durch unspezifische PCR-Fragmente auszuschließen, wurde im Anschluss an jede PCR eine Schmelzkurve angefertigt. In einer Schmelzkurve besitzen alle PCR-Produkte, je nach Größe und molekularer Zusammensetzung, unterschiedliche Schmelzpunkte und können daher in dieser Kurve voneinander differenziert werden. Zusätzlich wurden die generierten PCR-Produkte in dieser Arbeit gelelektrophoretisch aufgetrennt und auf die entsprechende korrekte Größe bzw. Anzahl der Basenpaare überprüft. Um Ungenauigkeiten beim Pipettieren der einzelnen Volumina zu vermeiden, wurden zuvor Gesamtgemische hergestellt („MasterMix“).

Als interner Standard für alle Polymerasekettenreaktionen wurde β -Aktin gewählt. Es ist als Bestandteil des Zytoskeletts ein häufiges Protein in Eukaryonten und besitzt eine konstitutive, nicht-alternierende Expression. β -Aktin bietet daher die Möglichkeit, den Er-

folg der PCR unmittelbar zu überprüfen. Sollte dieser Standard nicht detektiert werden können, muss davon ausgegangen werden, dass die PCR (oder ein vorangegangener Versuchsanteil wie mRNA-Isolierung und/oder cDNA-Synthese) nicht optimal verlaufen ist. Des Weiteren wird durch Bezugnahme aller ermittelten Werte zu β -Aktin ein Vergleich zwischen den einzelnen Genen ermöglicht, d. h. es findet eine Relativierung statt. Eine Alternative zu β -Aktin stellt ein weiterer interner Standard dar, GAP-DH (Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase). Aufgrund großer Variationen innerhalb der Transkriptionslevel, verursacht durch verschiedene Zellmetabolismen (z. B. Insulinabhängigkeit), wurde GAP-DH in dieser Arbeit nicht verwendet (Bustin et al., 2000).

Orale Gewebe und Zellen, z. B. Gingivaepithelzellen, sind mit einer Vielzahl von Mikroorganismen besiedelt. Dazu gehören grampositive und -negative Bakterien, Pilze und Viren. In diversen Studien konnte bereits gezeigt werden, dass humane β -Defensine in Epithelien der Mundhöhle exprimiert werden (Dale & Krisanaprakornkit, 2001, Dale & Fredericks, 2005; Dommisch et al., 2005a, 2005b; Dunsche et al., 2002; Krisanaprakornkit et al., 1998). Die Genexpression humaner β -Defensine erfolgte dabei nicht nur unter entzündlichen Bedingungen, sondern auch während gesunder oraler Verhältnisse in Anwesenheit der kommensalen Mundflora (Dommisch et al., 2005b; Krisanaprakornkit et al., 2000). Des Weiteren wurde festgestellt, dass die Gene der humanen β -Defensine-1 und -2 auch in der Odontoblastenzellschicht der Zahnpulpa exprimiert werden (Dommisch et al., 2005a). In der vorliegenden Arbeit wurde dieses neue Erkenntnis bestätigt, da die Genexpression der humanen β -Defensine-1 und -2 in der qualitativen Analyse in odontoblasten-ähnlichen Zellen im Gegensatz zu Pulpafibroblasten und Zellen des apikalen Zahnsäckchens nachgewiesen werden konnte (in vitro).

Das Dentinsialophosphoprotein (DSPP) wurde ebenfalls in odontoblasten-ähnlichen Zellen exprimiert. DSPP ist die Bezeichnung für zwei aus einem einzelnen Gen hervorgegangene Proteine und ist in den Mineralisationsprozess des Dentins involviert (Narayanan et al., 2006). In einer Studie von MacDougall et al. (1997) konnte gezeigt werden, dass DSPP überwiegend von Odontoblasten produziert wird und daher auch als Odontoblastenmarker bezeichnet werden kann. Mit dem Nachweis der Genexpression des Odontoblastenmarkers DSPP, konnte der in der vorliegenden Studie kultivierte Zelltyp (odontoblasten-ähnliche Zellen) charakterisiert werden.

Die Genexpression von β -Aktin konnte in allen Proben sowohl im Rahmen der qualitativen als auch quantitativen Analyse nachgewiesen werden. Aufgrund dessen konnten die C_t -Werte der zu untersuchenden Gene hBD-1, -2, IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α , Cox-2, cPLA₂ und DSPP, des Standards β -Aktin und der jeweiligen unstimulierten Kontrollen zusammen mit den entsprechenden Primereffizienzen mittels der Formel nach Pfaffl in Korrelation gebracht und die relativen Expressionen berechnet werden (Pfaffl, 2001).

Ebenso konnten auch die beiden Zytokine IL-6 und -8 sowohl in odontoblasten-ähnlichen Zellen, als auch in Pulpafibroblasten der ersten und zweiten Dentition, der Pulpafibroblastenzelllinie, Zellen des apikalen Zahnsäckchens und Gingivaepithelzellen detektiert werden. Zytokine sind maßgeblich an Wachstum und Differenzierung von Zellen beteiligt und repräsentieren wichtige Mediatoren der Immunabwehr. Das menschliche Immunsystem ist ein komplexes Geflecht unterschiedlichster Elemente, deren Zusammenspiel auf mikrobiologischer Ebene auch heute noch zum Teil unerforscht ist. Es beinhaltet sowohl zelluläre als auch humorale Abwehrreaktionen und lässt sich in einen unspezifischen (angeborenen) und einen spezifischen (erworbenen) Teil gliedern. Der spezifische Teil wird durch B- und T-Lymphozyten verkörpert und über Antigen-Antikörper-Reaktionen vermittelt. Der unspezifischen Abwehr gehören neutrophile Granulozyten und Monozyten an, welche zur Phagozytose fähig sind und nach Aktivierung Leukotriene, Thromboxane und Prostaglandine freisetzen können (Auslöser örtlicher Entzündungsreaktionen). Mittels Chemotaxis können Monozyten aus Blutgefäßen in das Gewebe übertreten und dort zu Makrophagen differenzieren. Diese sind dann in der Lage, Zytokine und vor allem Interleukine zu produzieren, welche wiederum stimulierend auf Lymphozyten wirken. Dies stellt eine Verbindung zwischen dem spezifischen und dem unspezifischen Immunsystem dar (Golenhofen, 2002). Die Genexpression von Cox-2, LTA₄H und TNF- α konnte ebenso in odontoblasten-ähnlichen Zellen, Pulpafibroblasten der ersten und zweiten Dentition, der Pulpafibroblastenzelllinie, Zellen des apikalen Zahnsäckchens und in Gingivaepithelzellen gezeigt werden.

In der quantitativen Genexpressionsanalyse dieser Arbeit sollte die Wirkung der humanen β -Defensine-1 und -2 auf odontoblasten-ähnliche Zellen untersucht werden. In Studien von Niyonsaba und Mitarbeitern, sowie Yang und Mitarbeitern konnten zytokin-ähnliche, immunmodulatorische Effekte der humanen β -Defensine gezeigt werden. In Rah-

men dieser Untersuchungen wurden die Einflüsse sowohl auf Epithelzellen als auch auf dendritische Zellen dargestellt (Niyonsaba et al., 2004 und 2007; Yang et al., 1999 und 2000). Immunmodulierende Effekte auf odontoblasten-ähnliche Zellen konnten bislang noch nicht festgestellt werden.

Die in der quantitativen Genexpressionsanalyse verwendeten Konzentrationen von 15, 50 und 150 ng/ml rhBD-1 und -2 wurden im Vergleich zu anderen Studien geringer angesetzt (Niyonsaba et al., 2004; 2007; Sakamoto et al., 2005). In diesem Zusammenhang konnte in früheren Untersuchungen gezeigt werden, dass die Applikation rekombinanter humaner β -Defensine auf Zellen in vitro neben der erwünschten antimikrobiellen Wirkung gegenüber Mikroorganismen auch zytotoxische Effekte auf humane Zellen haben kann, wenn diese in zu hohen Konzentrationen ($> 50 \mu\text{g/ml}$) angewendet werden (Ganz, 2003; Sakamoto et al., 2005).

Nach Stimulation von odontoblasten-ähnlichen Zellen mit rhBD-2 in den Konzentrationen 15 und 50 ng/ml im Rahmen der quantitativen Genexpressionsanalyse konnte innerhalb der ersten zwei Stunden eine Verminderung der Genexpression des humanen β -Defensins-1 um bis zu einem zehntel festgestellt werden und kehrte bei einer Konzentration von 150 ng/ml rhBD-2 wieder auf das Ausgangsniveau zurück. Diese Beobachtung legt nahe, dass hBD-1 nicht in allen Geweben ausschließlich konstitutiv exprimiert wird, sondern in odontoblasten-ähnlichen Zellen regulierbar ist. Diese Beobachtung wurde auch in anderen Studien gemacht (Dommisch et al., 2007; Islam et al., 2001) und lässt vermuten, dass die Expression des humanen β -Defensins-1 nicht nur durch eine entzündliche Umgebung, sondern auch durch die Anwesenheit des induzierbaren humanen β -Defensins-2 beeinflusst werden kann.

Nach Stimulation der odontoblasten-ähnlichen Zellen mit rhBD-2 in der höchsten Konzentration (150 ng/ml) konnte nach zwei Stunden ein Anstieg der Expression auf das Level der unstimulierten Kontrolle verzeichnet werden. Daraus könnte geschlossen werden, dass der regulative Effekt durch rhBD-2 lediglich initial ist und nur bei niedrigen Konzentrationen des Stimulanz ($\leq 50 \text{ ng/ml}$) und kurzen Stimulationszeiten (2 Stunden) auftritt, also zeit- und konzentrationsabhängig ist.

Eine Stimulation der Expression von hBD-2 mit dem rekombinanten humanen β -Defensin-2 konnte in odontoblasten-ähnlichen Zellen nicht beobachtet werden. Obwohl meh-

rere der zu untersuchenden Gene durch rhBD-2 beeinflussbar waren, hatte die Stimulation von odontoblasten-ähnlichen Zellen mit rhBD-1 weder einen autoregulatorischen Einfluss auf das humane β -Defensin-1, noch auf das humane β -Defensin-2.

Das Interleukin-6 wurde im Rahmen der quantitativen Genexpressionsanalyse nach Stimulation mit rhBD-2 in den Konzentrationen 15 und 50 ng/ml deutlich höher exprimiert. Eine Stunde nach Versuchsbeginn kam es bei einer Konzentration von 15 ng/ml rhBD-2 zu einem Anstieg der Expression um das ca. 13-fache und sprach damit am stärksten auf die Stimulation mit dem rekombinanten β -Defensin-2 an. Eine Konzentration von 50 ng/ml rhBD-2 führte noch zu einer Erhöhung der Expression um das 8-fache, eine Stimulation mit 150 ng/ml rhBD-2 führte hier jedoch zu keiner Änderung der mRNA Expression im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle. Das Ergebnis dieses Versuchs lässt vermuten, dass rhBD-2 in Abhängigkeit von der Konzentration in der Lage sein könnte, die Expression des pro-inflammatorischen Interleukins-6 positiv zu beeinflussen. Ähnliches fand eine Arbeitsgruppe um Niyonsaba in Keratinozyten der Epidermis. Nach Stimulation mit Defensinen wurde eine Expressionserhöhung von Interleukin-6 und damit eine verstärkten Immunantwort festgestellt (Niyonsaba et al., 2007).

Die Expressionsrate des Interleukins-8 wurde während der quantitativen Analyse durch die Stimulation mit rhBD-2 in allen 3 Konzentrationen erhöht. Wie im Fall des Interleukins-6 konnte auch hier mit niedrigen Konzentrationen die stärksten Effekte erzielt werden. Innerhalb der ersten Stunde führt eine Konzentration von 15 ng/ml rhBD-2 zu einem 3,5-fachen Anstieg der Expression, 50 ng/ml rhBD-2 zu einem 2,8-fachen und 150 ng/ml rhBD-2 nur noch zu einem 1,5-fachen Anstieg. Daraus könnte geschlossen werden, dass rhBD-2 auch einen positiven Einfluss auf die Expression des pro-inflammatorischen Interleukins-8 besitzt und damit wie IL-6 eine Entzündungsreaktion fördert. Die Wirksamkeit richtet sich auch in diesem Fall nach der Konzentration, d.h. 15 und 50 ng/ml rhBD-2 erzielten die größten biologischen Effekte. In einer gerade veröffentlichten Studie konnte ebenfalls wie in der vorliegenden Arbeit die Expression des Interleukins-8 in Odontoblastenzellen festgestellt werden (Veerayutthilai et al., 2007)

Die Expression von cPLA₂ wurde in der quantitativen Genexpressionsanalyse nach Stimulation durch rhBD-2 in allen 3 Konzentrationen kaum beeinflusst. Lediglich bei einer Konzentration von 150 ng/ml rhBD-2 konnte nach 0,5 Stunden ein tendenzieller Expres-

sionsanstieg verzeichnet werden. Als in der Prostaglandinsynthese beteiligtes Enzym läge die Erwartung nahe, dass cPLA₂ durch die Stimulation des pro-inflammatorisch wirkenden rekombinanten humanen β -Defensins-2 deutlich höher exprimiert wird und damit über Prostaglandin E₂ entzündungsfördernd wirkt. Dieser Effekt konnte hier nur tendenziell dargestellt werden. Als Ursache dafür könnte die in dieser Arbeit gewählte Zeitspanne (0-4 Stunden) des Stimulationsversuches in Frage kommen. Um eine deutliche Änderung der Genexpression der zytosolischen Phospholipase-A₂ verzeichnen zu können, müsste gegebenenfalls ein anderes Stimulationszeitfenster in Betracht gezogen werden (Eberhard et al., 2005). Des Weiteren könnten höhere Konzentrationen der rekombinanten, humanen β -Defensine-1 und -2 erforderlich sein, um als adäquater Stimulus zu fungieren (Niyonsaba et al., 2007).

Neben der Fähigkeit der Zahnpulpa bzw. der Odontoblastenzellschicht als Abwehrreaktion auf bakterielle Mikroorganismen in kariösen Läsionen, Tertiärdentin als eine Art Schutzbarriere zu bilden (Schroeder, 1992), war die Reaktion in der quantitativen Analyse auf immunregulatorischer Ebene eine neue und interessante Entdeckung. Es wird sogar ein Zusammenhang zwischen überschießenden Immunreaktionen, verursacht durch große kariöse Defekte, und gegebenenfalls daraus resultierenden irreversiblen Pulpitiden und periradikulären, entzündlichen Prozessen vermutet (Hellwig et al., 2003).

Eine Regulierung der Expression des Dentinsialophosphoproteins durch rhBD-2 konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht festgestellt werden. Die Ursache für die im Vergleich zu β -Aktin niedrige und scheinbar nicht-beeinflussbare Genexpression des Dentinsialophosphoproteins könnte ebenfalls die gewählte Zeitspanne oder die verwendete Konzentration der rekombinanten humanen β -Defensine-1 und -2 sein. In einer Arbeit von Shiba und Mitarbeitern konnte gezeigt werden, dass die antimikrobiellen Peptide MIP-3 α und hBD-2 die Expression von DSPP beeinflussen können. Diese Studie wurde jedoch an Pulpafibroblasten und nicht an odontoblasten-ähnlichen Zellen durchgeführt. Weiterhin kam es zur Anwendung hoher hBD-2-Konzentrationen (10 μ g/ml) über einen Zeitraum von 14 Tagen. Daher könnte vermutet werden, dass die mRNA Expression von DSPP nicht nur von der Konzentration und der Stimulationszeit abhängig ist, sondern auch von dem untersuchten Pulpazelltyp bestimmt wird (Shiba et al., 2003).

Im Rahmen der quantitativen Genexpressionsanalyse in odontoblasten-ähnlichen Zellen konnte eine Konzentrationsabhängigkeit beobachtet werden. Die Expression des Gens für hBD-1 erfuhr nach Stimulation mit rhBD-2 in den Konzentrationen 15 und 50 ng/ml im Zeitraum von zwei Stunden signifikante Veränderungen im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle, jedoch nicht bei einer Konzentration von 150 ng/ml. Der gleiche Effekt konnte auf die Genexpression von IL-6 in einem Zeitraum von einer Stunde beobachtet werden. Wurde IL-8 mit rhBD-2 stimuliert, konnten nach einer Stunde in allen drei Konzentrationen signifikante Veränderungen der Genexpression im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle festgestellt werden. Mit fallender Konzentration von rhBD-2 konnte dabei ein Anstieg der Expression verzeichnet werden (je niedriger die Konzentration, desto stärker der stimulierende Effekt). Nach Stimulation von cPLA₂ mit rhBD-2 konnte lediglich mit der größten Konzentration von 150 ng/ml nach einem Zeitraum von zwei Stunden eine tendenzielle Veränderung der Genexpression ermittelt werden. Geringere Konzentrationen des rekombinanten humanen β -Defensins-2 hatten keine Wirkung auf die Expression von cPLA₂.

Damit konnte gezeigt werden, dass humane β -Defensine in odontoblasten-ähnlichen Zellen nicht nur wie in bereits zuvor genannten Studien in hohen Konzentrationen wirksam sind (Niyonsaba et al., 2004 und 2007; Sakamoto et al., 2005), sondern auch bei niedrigeren Konzentrationen von 15-50 ng/ml rhBD-2 einen Effekt auf immunmodulierende Mediatoren besitzen können. Einen Grund dafür könnten die anatomischen Gegebenheiten in der Zahnpulpa darstellen. Da eine gesunde Zahnpulpa sowohl durch Dentin als auch durch Schmelz vor Mikroorganismen geschützt ist, könnte die Genexpression von hBD-2 bereits durch minimale Reizen stimuliert werden, so dass auch schon geringe Konzentrationen des humanen β -Defensins-2 ausreichen, um die bereits erwähnten Effekte zu erzielen. Daher könnte vermutet werden, dass sich die angewandten Konzentrationen in Bereichen bewegen, die für entzündliche Bedingungen charakteristisch sind und daher gleichzeitig größer sind als diejenigen, welche unter physiologisch-gesunden Bedingungen herrschen könnten.

Eine Zeitabhängigkeit der quantitativen Genexpressionsanalyse in odontoblasten-ähnlichen Zellen konnte nur bedingt festgestellt werden. Die Stimulation von odontoblasten-ähnlichen Zellen mit 50 ng/ml rhBD-2 führte bereits nach 0,5 Stunden zu einer signifi-

kanten Reduktion der Genexpression von hBD-1 im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle und blieb dann innerhalb des restlichen Zeitversuchs nahezu konstant. Eine Konzentration von 15 ng/ml rhBD-2 hatte innerhalb der ersten Stunde zunächst einen Anstieg der Genexpression von IL-6 im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle zur Folge. Nach zwei Stunden fiel diese wieder signifikant ab, erwies sich aber noch deutlich höher als die Genexpression der unstimulierten Kontrolle. Bei der Stimulation von odontoblasten-ähnlichen Zellen mit 15 ng/ml rhBD-2 konnte mit zunehmender Zeitdauer ein kontinuierlicher Anstieg der Genexpression von IL-8 beobachtet werden. Eine Konzentration von 150 ng/ml rhBD-2 bewirkte im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle innerhalb der ersten 0,5 Stunden ebenfalls zunächst einen signifikanten Anstieg der Genexpression von cPLA₂ in odontoblasten-ähnlichen Zellen. Nach einer Stunde wurde wieder eine Reduktion der Expression verzeichnet und zwar deutlich unter die Expressionsrate der unstimulierten Kontrolle.

Damit konnte gezeigt werden, dass das rekombinante humane β -Defensin-2 je nach Gen eine unterschiedliche Zeitabhängigkeit besitzt. In den meisten Fällen wurde festgestellt, dass die Veränderungen in der Genexpression der genannten Gene in odontoblasten-ähnlichen Zellen zu Beginn, also innerhalb der ersten Stunde, zu beobachten waren.

Die Ergebnisse dieser Arbeit indizieren, dass in dem Gewebe der Zahnpulpa, neben der Expression von Chemokinen, Zytokinen und Enzymen des Eicosanoidstoffwechsels, auch die mRNA humaner β -Defensine präsent ist. Mit der Eigenschaft, β -Defensine zu synthetisieren, besitzen die Odontoblasten des Pulpagewebes auch epithel-ähnliche Attribute im Sinne der angeborenen Immunabwehr (Dale & Krisanaprakornkit, 2001). Während der Zahnentwicklung differenzieren sich distinkte Zellen des oralen Epithels und formieren sich zur Zahnknospe. Ein Teil dieser Zellen übernimmt später die Amelogenese, während der mesenchymale Anteil der Zahnknospe u. a. die Ausbildung von Odontoblasten und somit die Genese des Dentins übernimmt. Die Ausreifung der Odontoblasten erfolgt über induktive Prozesse, ausgehend von den Knospenepithelzellen. Erst nach dieser Induktion kann die Dentinogenese einsetzen (Schroeder, 1992). Diese induktiven Prozesse könnten den ausgereiften Odontoblasten auch die epithelialen Eigenschaften in Bezug auf die angeborene Immunabwehr bzw. die Synthese humaner β -De-

fensine verliehen haben. Der zweite Teil dieser Arbeit zeigte zudem, dass humane β -Defensine eine zytokin-ähnliche Wirkung auf odontoblasten-ähnliche Zellen besitzen. Auch diese Erkenntnis konnte für epitheliale Zellen und Gewebe gewonnen werden. Hier wurde ein Bezug zwischen der epithelialen Differenzierung und der Expression humaner β -Defensine hergestellt (Dale, 2003). Es ist denkbar, dass die Expression und Gegenwart humaner β -Defensine auch im Rahmen der Differenzierung und damit Ausreifung der Odontoblasten eine bedeutende Funktion übernehmen könnte.

Als Resultat der vorliegenden Arbeit konnte die Expression der Gene hBD-1 und -2, IL-6, IL-8, TNF- α , Cox-2, LTA₄H, cPLA₂ und DSPP in einer qualitativen Analyse in mindestens zwei Zellkulturen von odontoblasten-ähnlichen Zellen, Pulpafibroblasten der ersten und zweiten Dentition, einer Pulpafibroblastenzelllinie, Zellen des apikalen Zahnsäckchens und Gingivaepithelzellen gezeigt werden. Im Rahmen einer anschließenden quantitativen Genexpressionsanalyse der genannten Gene in odontoblasten-ähnlichen Zellen konnten nach Stimulation mit dem rekombinanten humanen β -Defensin-2 signifikante, mediator-ähnliche Effekte auf das humane β -Defensin-1, die pro-inflammatorischen Interleukine-6 und -8 und die zytosolische Phospholipase-A2 nachgewiesen werden. Die Genexpression des humanen β -Defensins-2, sowie des Interleukins-1 β , des Tumornekrosefaktors- α , der Cyclooxygenase-2 und des Dentinsialophosphoproteins wurden nicht beeinflusst. Eine Stimulation der odontoblasten-ähnlichen Zellen mit dem rekombinanten humanen β -Defensin-1 führte zu keinen signifikanten Expressionsänderungen der genannten Gene.

Dieses Ergebnis stimmt damit mit vorangegangenen Untersuchungen darin überein, dass humane β -Defensine im Rahmen der angeborenen Immunantwort der Zahnpulpa eine bedeutende Rolle spielen könnten (Dommisch et al., 2005a und 2007; Engels-Deutsch et al., 2003; Shiba et al., 2003; Veerayutthilai et al., 2007).

Für zukünftige Untersuchungen wäre es von Interesse, die in der qualitativen Genexpressionsanalyse untersuchten anderen Zelltypen (Pulpafibroblasten der ersten und zweiten Dentition, die Pulpafibroblastenzelllinie, Zellen des apikalen Zahnsäckchens und Gingivaepithelzellen) ebenfalls mit rekombinanten humanen β -Defensinen zu stimulieren und einer quantitativen Genexpressionsanalyse von hBD-1, -2, IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α ,

Cox-2, cPLA₂ und DSPP zu unterziehen. Dabei könnten sowohl andere Konzentrationen der Stimuli berücksichtigt, als auch Veränderungen an der Stimulationsdauer vorgenommen werden.

Zusammenfassend konnte die vorliegende Arbeit stimulierende Effekte auf die Genexpression pro-inflammatorischer Mediatoren in odontoblasten-ähnlichen Zellen als Antwort auf das humane β -Defensin-2 zeigen. Die mRNA des verwandten antimikrobiellen Peptids hBD-1 wurde in Anwesenheit von hBD-2 herunterreguliert. Die Ergebnisse weisen auf immunregulatorische Funktionen von hBD-2 in odontoblasten-ähnlichen Zellen in autokriner oder parakriner Weise hin. Dies bedeutet, dass humane β -Defensine zusätzlich zu ihrer antimikrobiellen Wirkung in Zellen der Zahnpulpa auch eine immunmodulierende Funktion ausüben. Odontoblasten-ähnliche Zellen zeigten eine ausgeprägte Bereitschaft auf hBD-2 anzusprechen, welches als ein induzierbares antimikrobielles Peptid gilt.

Alles in allem deuten die Ergebnisse der vorliegenden Studie darauf hin, dass die Synthese von hBD-2 in Odontoblasten die immun-entzündliche Reaktivität der Zahnpulpa erhöht.

5. Zusammenfassung

Humane β -Defensine sind antimikrobielle Peptide mit einem breiten Wirkungsspektrum gegenüber grampositiven und -negativen Bakterien, Pilzen und einigen Viren. In vielen Untersuchungen konnte bereits gezeigt werden, dass sie in verschiedenen oralen Zellen und Geweben exprimiert werden und zusätzlich ebenfalls mediator-ähnliche Funktionen besitzen. Es ist eine neue Erkenntnis, dass humane β -Defensine in den Odontoblasten der Zahnpulpa exprimiert werden. Die genaue Bedeutung der humanen β -Defensine für die Zellen der Zahnpulpa ist bislang ungeklärt. Ziel der Arbeit war es, mediator-ähnliche Funktionen des humanen β -Defensin-2 auf die Expression immunmodulierender Gene in odontoblasten-ähnlichen Zellen zu untersuchen.

Dazu wurden Kulturen von odontoblasten-ähnlichen Zellen, Pulpafibroblasten der ersten und zweiten Dentition und Zellen des apikalen Zahnsäckchens etabliert. Zusammen mit einer Pulpafibroblastenzelllinie und Gingivaepithelzellen wurden diese einer qualitativen Genexpressionsanalyse der humanen β -Defensine-1 und -2, der Interleukine-1 β , -6, -8, des Tumornekrosefaktors- α , der Cyclooxygenase-2, der Leukotrien-A4-Hydrolase, der zytosolischen Phospholipase-A2 und des Dentinsialophosphoproteins unterzogen und mit Hilfe der RT-PCR analysiert. Anschließend wurde eine quantitative Expressionsanalyse dieser Gene nach Stimulation von odontoblasten-ähnlichen Zellen mit den rekombinanten humanen β -Defensinen-1 und -2 in unterschiedlichen Konzentrationen (15, 50 und 150 ng/ml) über einen Zeitraum von 0-4 Stunden mit Hilfe der Real-Time-PCR vorgenommen.

Diese Analysen ergaben, dass die oben aufgeführten Gene der Immunmediatoren in den untersuchten Zellen der Zahnpulpa exprimiert werden. Die mRNA Expression von hBD-1 und -2 konnte jedoch nur in den odontoblasten-ähnlichen Zellen nachgewiesen werden. Die Stimulation mit rhBD-2 führte in odontoblasten-ähnlichen Zellen einerseits zu einer signifikanten Abnahme der Genexpression von hBD-1 ($p < 0,05$), andererseits zu einem Anstieg der mRNA Expression von IL-6 ($p < 0,05$) und IL-8 ($p < 0,05$).

Die vorliegende Arbeit konnte somit erstmals eine immunmodulierende Wirkung von humanem β -Defensin-2 auf odontoblasten-ähnliche Zellen zeigen.

6. Literaturverzeichnis

Abiko Y, Nishimura M, Kusano K, Yamazaki M, Arakawa T, Takuma T, Katu T. Upregulated expression of human beta defensin-1 and -3 mRNA during differentiation of keratinocyte immortalized cell lines, HaCaT and PHK16-0b. J Dermatol Sci 2003; 31: 225-228

Balboa M A, Pérez R, Balsinde J. Amplification mechanisms of inflammation: paracrine stimulation of arachidonic acid mobilization by secreted phospholipase A2 is regulated by cytosolic phospholipase A2 derived hydroperoxyeicosatetraenoic acid. J Immunol 2003; 171: 989-994

Bensch K W, Raida M, Magert H-J, Schulz-Knappe P, Forssmann W-G. HBD-1: a novel β -defensin from human plasma. FEBS Letters 1995; 368: 331-335

Brosius F. SPSS 11. Mitp-Verlag 2004

Bustin S A. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. J Mol Endocrinol 2000; 25: 169-193

Bustin S A. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. J Mol Endocrinol 2002; 29: 23-39

Dale B A. Periodontal epithelium: a newly recognized role in health and disease. Periodontol 2000; 30: 70-78

Dale B A. Fascination with Epithelia: Architecture, Proteins and Functions. J Dent Res 2003; 82: 866-869

Dale B A, Fredericks L P. Antimicrobial peptides in the oral environment: expression and function in health and disease. Curr Issues Mol Biol 2005; 7: 119-133

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

Diamond D L, Kimball J R, Krisanaprakornkit S, Ganz T, Dale B A. Detection of beta-defensins secreted by human oral epithelial cells. J Immunol Methods 2001; 256: 65-76

Domisch H, Winter J, Açil Y, Dunsche A, Tiemann M, Jepsen S. Human β -defensin (hBD-1, -2) expression in dental pulp. Oral Microbiol Immunol 2005a; 20: 163-166

Domisch H, Açil Y, Dunsche A, Winter J, Jepsen S. Differential gene expression of human β -defensins (hBD-1, -2, -3) in inflammatory gingival diseases. Oral Microbiol Immunol 2005b; 20: 186-190

Domisch H, Winter J, Hacker J, Mintcheva M, Eberhard J, Götz W, Jepsen S. Differential gene expression of cytokines and beta-defensins in dental pulp. Advances Dent Res 2007, in print

Dunsche A, Acil Y, Domisch H, Siebert R, Schröder J-M, Jepsen S. The novel human beta-defensin-3 is widely expressed in oral tissues. Eur J Oral Sci 2002; 110: 121-124

Eberhard J, Zahl A, Domisch H, Winter J, Jepsen S. Heat shock induces the synthesis of the proinflammatory mediator leukotriene B4 in human pulp cells. Int Endod J 2005; 38: 882-888

Engels-Deutsch M, Pini A, Yamashita Y. Insertional inactivation of pac and rmlB genes reduces the release of tumor necrosis factor alpha, interleukin-6, and interleukin-8 induced by *Streptococcus mutans* in monocytic, dental pulp, and periodontal ligament cells. Infect Immun 2003; 71: 5169-5177

Ganz T. Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity. Nat Rev Immunol 2003; 3: 710-720

Ganz T, Weiss J. Antimicrobial peptides of phagocytes and epithelia. *Semin in Hematol* 1997; 343-354

Gibson U E, Heid C A, Williams P M. A novel method for real time quantitative RT-PCR. *Genome Res* 1996; 6: 995-1001

Goldmann M J, Anderson G M, Stolzenberg E D, Kari U P, Zasloff M, Wilson J M. Human β -defensin-1 is a salt-sensitive antibiotic in lung that is inactivated in cystic fibrosis. *Cell* 1997; 88: 553-60

Golenhofen K. *Physiologie*. Stuttgart-New York. Georg Thieme 2002

Hahn C L, Best A M, Tew J G. Cytokine induction by *Streptococcus mutans* and pulpal pathogenesis. *Infect Immun* 2000; 68: 6785-6789

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

Harder J, Schröder J-M. Psoriatic scales: a promising source for the isolation of human skin-derived antimicrobial proteins. *J Leukoc Biol* 2005; 77: 476-486

Hellwig E, Klimek J, Attin T. *Einführung in die Zahnerhaltung*. München-Jena. Urban & Fischer-Verlag 2003

Higuchi R, Fockler C, Dollinger G, Watson R. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnol* 1993; 11: 1026-1030

Hill C P, Yee J, Selsted M E, Eisenberg D. Crystal structure of defensin HNP-3, an amphiphilic dimer: mechanisms of membrane permeabilization. *Science* 1991; 251: 1481-1486

Hoover D M, Rajashankar K R, Blumenthal R, Puri A, Oppenheim J J, Chertov O, Lubkowski J. The structure of human β -defensin-2 shows evidence of higher order oligomerization. *J Biol Chem* 2000; 275: 32911-32918

Ibelgaufts H. Horst Ibelgaufts Cope: cytokines online pathfinder encyclopaedia. JI 2002; 0.014 (www.copewithcytokines.de)

Islam D, Bandholtz L, Nilsson J, Wigzell H, Christensson B, Agerberth B, Gudmundsson GH. Downregulation of bactericidal peptides in enteric infections: A novel immune escape mechanism with bacterial DNA as a potential regulator. *Nat Med* 2001; 7: 180-185

Jurevic R J, Bai M, Chadwick R B, White TC, Dale B A. Single-Nucleotide Polymorphisms (SNPs) in human beta-defensin-1: high-throughput SNP assays and association with *Candida* carriage in type I diabetics and nondiabetic controls. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 90-96

Ke L D, Chen Z, Yung W K. A reliability test of standard-based quantitative PCR: exogenous vs endogenous standards. *Mol Cell Probes* 2000; 14: 127-135

Krisanaprakornkit S, Weinberg A, Perez C N, Dale B A. Expression of the peptide antibiotic human β -defensin 1 in cultured gingival epithelial cells and gingival tissue. *Infect Immun* 1998; 66: 4222-4228

Krisanaprakornkit S, Kimball J R, Weinberg A, Darveau R P, Bainbridge B W, Dale B A. Inducible expression of human beta-defensin 2 by *Fusobacterium nucleatum* in oral epithelial cells: multiple signaling pathways and role of commensal bacteria in innate immunity and the epithelial barrier. *Infect Immun* 2000; 68: 2907-2915

Lehrer R I. Primate defensins. *Nat Rev Microbiol* 2004; 2: 727-738

Liu L, Roberts A A, Ganz T. By IL-1 signaling, monocyte-derived cells dramatically enhance the epidermal antimicrobial response to lipopolysaccharide. *J Immunol* 2003; 170: 575-580

Löffler G, Petrides P E. *Biochemie und Pathobiochemie*. Berlin-Tokio. Springer Verlag 1998

MacDougall M, Simmons D, Luan X, Nydegger J, Feng J, Gu T T. Dentin phosphoprotein and dentin sialoprotein are cleavage products expressed from a single transcript coded by a gene on human chromosome 4. *J Biol Chem* 1997; 272: 835-842

Mathews M, Jia H P, Guthmiller J M, Losh G, Graham S, Johnson G K, Tack B F, McCray Jr P B. Production of β -defensin antimicrobial peptides by the oral mucosa and salivary glands. *Infec Immun* 1999; 67: 2740-2745

Miyasaki K T, Lehrer R I. β -sheet antibiotic peptides as potential dental therapeutics. *Int J Antimicrobial Agents* 1998; 9: 269-280

Narayanan K, Gajjaraman S, Ramachandran A, Hao J, George A. Dentin matrix protein 1 regulates dentin sialophosphoprotein gene transcription during early odontoblast differentiation. *J Biol Chem* 2006; 281: 19064-19071

Niyonsaba F, Ogawa H, Nagaoka I. Human β -defensin-2 functions as a chemotactic agent for tumor necrosis factor- α -treated human neutrophils. *Immunol* 2004; 111: 273-281

Niyonsaba F, Ushio H, Nakano N, Ng W, Sayama K, Hashimoto K, Nagaoka I, Okumura K, Ogawa H. Antimicrobial peptides human β -defensins stimulate epidermal keratinocyte migration, proliferation and production of proinflammatory cytokines and chemokines. *J Invest Dermatol* 2007; 127: 594-604

O'Neil D A, Porter E M, Elewaut D, Anderson G M, Eckmann L, Ganz T, Kagnoff M F. Expression and regulation of the human beta-defensins hBD-1 and hBD-2 in intestinal epithelium. *J Immunol* 1999; 163: 6718-6724

Ono T, Yamada K, Chikazawa Y, Ueno M, Nakamoto S, Okuno T, Seno K. Characterization of a novel inhibitor of cytosolic phospholipase A2 α pyrrophenone. *Biochem J* 2002; 363: 727-735

Pfaffl M W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucl Acids Res* 2001; 29: 2002-2007

Sakamoto N, Mukae H, Fujii T, Ishii H, Yoshioka S, Kakugawa T, Sugiyama K, Mizuta Y, Kadota J, Nakazato M, Kohno S. Differential effects of α - and β -defensin on cytokine production by cultured human bronchial epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2005; 288: L508-L513

Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning: A laboratory Manual*. Cold Spring Harbor-New York: Cold Spring Harbor Laboratory 1989

Schroeder H E. *Orale Strukturbioogie*. Stuttgart-New York. Thieme Verlag 1992

Schröder J-M. Antimikrobielle Peptide - Antibiotika der Zukunft? *Med Monatsschr Pharm* 1999a; 22: 270-276

Schröder J-M. Epithelial peptide antibiotics. *Biochem Pharmacol* 1999b; 57: 121-134

Schröder J-M, Harder J. Human β -defensin-2. *Int J Biochem Cell Biol* 1999; 31: 645-651

Schulz A, Klüver E, Schulz-Maronde S, Aderman K. Engineering disulfide bonds of the novel human β -defensins hBD-27 and hBD-28: Differences in disulfide formation and biological activity among human β -defensins. *Pept Sci* 2005; 80: 34-49

Shiba H, Mouri Y, Komatsuzawa H, Ouhara K, Takeda K, Sugai M, Kinane D F, Kurihara H. Macrophage inflammatory protein-3 α and beta-defensin-2 stimulate dentin sialophosphoprotein gene expression in human pulp cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 306: 867-871

Tang Y-Q, Yuan J, Ösapay G, Ösapay K, Tran D, Miller C J, Ouellette A J, Selsted M E. A cyclic antimicrobial peptide produced in primate leukocytes by the ligation of two truncated α -defensins. *Science* 1999; 286: 498-502

Thellin O, Zorzi W, Lakaye B, De Borman B, Coumans B, Hennen G, Grisar T, Igout A, Heinen E. Housekeeping genes as internal standards: use and limits. *J Biotechnol* 1999; 75: 291-295

Tjäderhane L, Salo T, Larjava H, Larmas M, Overall C M. A novel organ culture method to study the function of human odontoblasts in vitro: gelatinase expression by odontoblasts is differentially regulated by TGF- β 1. *J Dent Res* 1998; 77: 1486-1496

Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by genomic averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* 2002; 3: RESEARCH 0034-1-0034-11

Veerayutthwilai O, Byers M R, Pham T-T T, Darveau R P, Dale B A. Differential regulation of immune responses by odontoblasts. *Oral Microbiol Immunol* 2007; 22: 5-13

Yang D, Chertov O, Bykovskaia S N, Chen Q, Buffo M J, Shogan J, Anderson M, Schröder J M, Wang J M, Howard O M, Oppenheim J J. Beta-defensins: linking innate and adaptive immunity through dendritic and T cell CCR6. *Science* 1999; 286: 525-528

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

7. Danksagung

Herrn Prof. Dr. Dr. S. Jepsen, M.S., Direktor der Poliklinik für Parodontologie, Zahnerhaltung und Präventive Zahnheilkunde des Zentrums für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde der Rheinischen-Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, danke ich für die Bereitstellung des Themas und der finanziellen Mittel zur Durchführung aller Experimente,

Herrn Dr. J. Winter, Leiter des zell- und molekularbiologischen Labors der Poliklinik für Parodontologie, Zahnerhaltung und Präventive Zahnheilkunde des Zentrums für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde der Rheinischen-Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, gilt mein Dank für die Anleitung und Unterstützung bei der Durchführung der zell- und mikrobiologischen Experimente,

Herrn Dr. H. Dommisch, wissenschaftlicher Mitarbeiter der Poliklinik für Parodontologie, Zahnerhaltung und Präventive Zahnheilkunde des Zentrums für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde der Rheinischen-Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, danke ich für die Bereitstellung der finanziellen Mittel über das BONFOR Förderungsprogramm, für die Auswertung der Realtime-PCR und die Korrekturvorschläge in meiner Arbeit,

Frau M. Schulte, medizinisch-technische Assistentin der Universität Bonn, gilt mein Dank für die Hilfe bei der praktischen Durchführung der zell- und molekularbiologischen Versuche,

und Herrn PD Dr. R. Probstmeier, Neuro- und Tumorzellbiologie, Abt. Nuklearmedizin (Direktor: Prof. Dr. Biersack) der Rheinischen-Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, danke ich für die Unterstützung und Bereitstellung seiner Laboratorien für die Klonierungen.