

Die Rolle der Phosphatidylinositol-3-Kinase bei der  
*Streptococcus mutans*-stimulierten Genexpression von  
Interleukin-6 und -8 in Odontoblasten-ähnlichen Zellen

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

vorgelegt von  
Madeleine Steglich

aus  
Guben

2008

Angefertigt mit Genehmigung der  
Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. Dr. S. Jepsen, M.S.
2. Gutachter: Prof. Dr. W. Götz

Tag der Mündlichen Prüfung: 18.09.2008

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

Diese Dissertation ist auf dem Hochschulschriftenserver der ULB Bonn unter  
[http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss\\_online](http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss_online) elektronisch publiziert.

Diese Arbeit  
widme ich  
meiner Tochter  
Felicety.



# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>8</b>
<b>1. Einleitung</b>	<b>12</b>
1.1. Der Pulpa-Dentin-Komplex	12
1.2. Karies – die infizierte Zahnhartsubstanz	13
1.3. <i>Streptococcus mutans</i>	13
1.4. Entzündung	15
1.5. Immunreaktion	15
1.6. Zytokine	16
1.7. Interleukine	17
1.7.1. Interleukin-6	18
1.7.2. Interleukin-8	19
1.8. Phosphatidylinositol-3-Kinase	20
1.9. Ziele und Fragestellungen der Arbeit	21
<b>2. Material und Methoden</b>	<b>24</b>
2.1. Übersicht	24
2.2. Reagenzien und Materialien	24
2.3. Kultur Odontoblasten-ähnlicher Zellen	24
2.4. Bestimmung der Zellzahl	25

2.5.	<i>Streptococcus mutans</i> – Kultur	26
2.6.	Hitzebehandlung der Bakterien	26
2.7.	Stimulation mit <i>Streptococcus mutans</i>	26
2.8.	Vorinkubation Odontoblasten-ähnlicher Zellen mit LY294002	27
2.9.	Experimentelle Gruppen	27
2.10.	RNA-Extraktion	28
2.11.	RNA-Konzentrationsbestimmung	28
2.12.	Reverse Transkription	29
2.13.	Polymerasekettenreaktion	30
2.14.	Quantitative Bestimmung der Genexpression (Real-Time-PCR)	30
2.15.	Quantitative Bestimmung der Expression von $\beta$ -Aktin	32
2.16.	Quantitative Bestimmung der Expression von DSPP	33
2.17.	Quantitative Bestimmung der Genexpression von IL-6 und IL-8	34
2.18.	Auswertung der quantitativen Real-Time-PCR	35
2.19.	Zellvitalität - Trypan-Blue <sup>®</sup> -Test	36
2.20.	Statistische Auswertung der Genexpressionsanalyse	37
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>38</b>
3.1	Quantitative Bestimmung der Genexpression des Dentin-Sialophosphoproteins (DSPP) in unstimulierten Odontoblasten-ähnlichen Zellen	38
3.2.	Quantitative Bestimmung der Genexpression von IL-6 nach Stimulation mit <i>Streptococcus mutans</i>	39

3.3.	Quantitative Bestimmung der Genexpression von IL-8 nach Stimulation mit <i>Streptococcus mutans</i>	40
3.4.	Quantitative Bestimmung der Genexpression von IL-6 nach Stimulation mit <i>Streptococcus mutans</i> in mit LY294002 präinkubierten Odontoblasten-ähnlichen Zellen	42
3.5.	Quantitative Bestimmung der Genexpression von IL-8 nach Stimulation mit <i>Streptococcus mutans</i> in mit LY294002 präinkubierten Odontoblasten-ähnlichen Zellen	43
3.6.	Quantitative Bestimmung der Zellüberlebensrate nach Stimulation mit <i>S. mutans</i> und Inkubation mit dem Inhibitor LY294002	44
<b>4.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>46</b>
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>54</b>
<b>6.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>55</b>
<b>7.</b>	<b>Danksagung</b>	<b>65</b>

## Abkürzungsverzeichnis

Abb.	=	Abbildung
Aqua dest.	=	Aqua destilata
ATP	=	Adenosintriphosphat
$\beta$	=	beta
BM	=	Bakterienmedium
$^{\circ}\text{C}$	=	Grad Celsius
cDNA	=	„copy desoxyribonucleic acid“, komplementäre Desoxyribonukleinsäure
$\text{CO}_2$	=	Kohlendioxid
$\text{C}_t$	=	„threshold cycle“, Schwellenzyklus
Da	=	Dalton
DMEM	=	Dulbecco´s Modified Eagle´s-Medium
DMSO	=	Dimethylsulfoxid
DNA	=	„desoxyribonucleic acid“, Desoxyribonukleinsäure
DNase	=	Desoxyribonuklease
dNTP	=	Desoxynukleosidtriphosphat
DSPP	=	Dentin-Sialophosphoprotein
dT	=	Desoxythymine
E	=	Effizienz
EDTA	=	„ethyldiamintetraacetate“, Ethyldiamintetraessigsäure
<i>E. coli</i>	=	<i>Escherichia coli</i>

EGF	=	epidermal growth factor
Fa.	=	Firma
g	=	Gramm
h	=	Stunde
hBD-1	=	humanes $\beta$ -Defensin-1
hBD-2	=	humanes $\beta$ -Defensin-2
IFN	=	Interferon
IL	=	Interleukine
IPs	=	„intracellular glycogen-like polysaccharides“
kDa	=	Kilodalton
LB-Medium	=	Luria-Bertani-Medium
LPS	=	Lipopolysaccharide
LTA	=	„lipoteichoidacid“, Lipoteichonsäure
LY294002	=	4-morpholinyl-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one
MAP	=	“mitogen-activated protein”
min	=	Minute
MIP-3- $\alpha$	=	Makrophagen inflammatorisches Peptid-3-alpha
ml	=	Milliliter
mm	=	Millimeter
mM	=	Millimolar
MOI	=	Multiplicity of Infection
mRNA	=	„messenger ribonucleic acid“, Messenger- Ribonukleinsäure

NaCl	=	Natriumchlorid
NGF	=	nerve growth factor
nm	=	Nanometer
PBS	=	phosphate buffered saline
PCR	=	„polymerase chain reaction“, Polymerasekettenreaktion
PDGF	=	platelet-derived growth factor
pH	=	pondus Hydrogenii
PI	=	Phosphatidylinositol
PI3K	=	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PIP3	=	Phosphoinositol-3,4,5-triphosphat
PKB	=	Protein-Kinase-B
PKC	=	Protein-Kinase-C
RNA	=	„ribonucleic acid“, Ribonukleinsäure
Poly-A +	=	Polyadenylatschwanz der mRNA
PRRs	=	„pattern-recognition receptors“
rpm	=	„revolutions per minute“, Umdrehungen pro Minute
RT	=	Reverse Transkription
RT-PCR	=	Reverse-Transkription-Polymerasekettenreaktion
sec	=	Sekunde
<i>S. mutans</i>	=	<i>Streptococcus mutans</i>
SPSS	=	Superior Performing Software System

<i>Taq</i>	=	<i>Thermus aquaticus</i>
TLR	=	Toll-like Rezeptor
TNF- $\alpha$	=	Tumornekrosefaktor-alpha
U	=	„units“, Einheiten
UV	=	Ultraviolett
$\Delta$	=	delta
$\mu\text{g}$	=	Mikrogramm
$\mu\text{l}$	=	Mikroliter
$\mu\text{m}$	=	Mikrometer
$\mu\text{M}$	=	Mikromolar

# 1. Einleitung

## 1.1. Der Pulpa-Dentin-Komplex

Das Dentin macht den größten Teil des Zahnhartgewebes aus und setzt sich aus verschiedenen Schichten zusammen. Die äußerste etwa 30 µm dicke Dentinschicht, die parallel zur Schmelz-Dentin-Grenze respektive Dentin-Zement-Grenze verläuft, heißt Manteldentin. Die anschließend gebildete Hauptmasse des Dentins wird zirkumpulpaes Dentin genannt. Zur Zahnpulpa hin wird das zirkumpulpaes Dentin von einer noch unmineralisierten organischen Dentinmatrix, dem Prädentin, begrenzt. Besonders charakteristisch für das menschliche Dentin sind die regelmäßig angeordneten Dentinkanälchen (Tubuli), welche die Fortsätze der Odontoblasten (Tomes'sche Fortsätze) enthalten. Diese Dentinkanälchen weisen einen Durchmesser von 0,5 µm bis 200 nm auf und stellen eine direkte Verbindung zum Pulpenkavum dar. Dieser im Innern des Zahnes gelegene Hohlraum enthält die Zahnpulpa und lässt sich anatomisch in einen Kronen- und einen Wurzelbereich untergliedern. Histologisch zeichnet sich die Zahnpulpa durch ein lockeres, stark vaskularisiertes, spezialisiertes Bindegewebe aus. Es finden sich Zellen unterschiedlicher Funktionen und Populationen, wie Odontoblasten, Fibroblasten, undifferenzierte Mesenchymzellen, Histozyten, dendritische Zellen, Perizyten, Lymphozyten, Makrophagen und Plasmazellen (Hellwig et al., 2003). Odontoblasten bilden die periphere Zellschicht der Zahnpulpa mit direktem Kontakt zum Dentin. Beim Zahn des Erwachsenen ragt der Odontoblastenfortsatz nicht weiter als 0,5 mm von der Pulpa-Dentin-Grenze Richtung Dentin-Zement-Grenze (Garberoglio und Brännström, 1976). Dennoch steuern Odontoblasten oder deren Ersatzzellen in der vitalen Pulpa via Exkretion und Resorption des Dentinliquors den Dentinstoffwechsel (Karjalainen und Söderling, 1984).

Verschiedene Erkrankungen des Zahnes (Schmelz-Dentin-Karies oder Wurzelkaries) und des Zahnhalteapparates (Parodontitis, Rezessionen) können zur Exposition von Dentin führen. Dadurch wird den Mikroorganismen der Zutritt zum Wurzelkanal gewährt. Mit zunehmender Demineralisierung und Infektion des Dentins sind die Odontoblasten die ersten Zellen, die den Mikroorganismen und deren Stoffwechselprodukten ausgesetzt sind (Hellwig et al., 2003). Die Pulpa antwortet

auf diesen mikrobiellen Reiz als immunkompetentes Gewebe mit einer lokalen Entzündung (Jontell et al., 1998)

## **1.2. Karies - die infizierte Zahnhartsubstanz**

Die bakteriell bedingte Zahnkaries ist eine der häufigsten Infektionskrankheiten des menschlichen Körpers. Unter Karies versteht man einen dynamischen Demineralisationsprozess der Zahnhartsubstanz durch Stoffwechselprodukte kariogener Mikroorganismen, die sich der Zahnoberfläche in einer Plaquematrix (Biofilm) anlagern (Hellwig et al., 2003). Aus nahrungsbedingten Kohlenhydraten bilden diese Bakterien Säuren, wie zum Beispiel Milchsäure, die zu einem Absinken des pH-Wertes unter die für Schmelz (pH 5,5 – 5,7) und Dentin (pH 6,3 – 6,5) kritische Grenze führen, mit der Folge, dass das Hydroxylapatit der Schmelzoberfläche zunächst chemisch verändert wird und schließlich in Lösung geht. Die Zahnhartsubstanzen werden demineralisiert. Die Anhaftung der kariogenen Mikroorganismen an die Zahnoberfläche innerhalb eines Biofilms, sowie die Bildung und Freisetzung von Säuren sind entscheidend für das kariogene Potential dieser Mikroorganismen (Hamada und Slade, 1980; Tamesada et al., 2004).

Die Änderung der Homöostase innerhalb der Mundhöhle zusammen mit einem übermäßigen Wachstum der kariogenen Mikroorganismen in der Plaquematrix wird als Hauptursache für Zahnkaries anerkannt. Wenn der häufige Verzehr von Kohlenhydraten über einen längeren Zeitraum anhält, ist die Entstehung irreversibler Substanzdefekte unausweichlich. Tiefe kariöse Läsionen verursachen in der Regel eine Entzündungsreaktion im Pulpa-Dentin-Komplex (Jontell et al., 1998; McLachlan et al., 2004).

## **1.3. *Streptococcus mutans***

In der Zahnplaque, die der Zahnoberfläche aufliegt, sind ca. 200-300 verschiedene Mikroorganismen zu finden (Hamilton und Bowden, 2000). Vor allem kommen zahlreiche Anaerobier-Spezies vor. Bereits 1924 konnte Clarke anhand mikrobieller Studien orale *Streptokokken* in der Plaquematrix nachweisen. Fitzgerald und Keyes (1960) entdeckten, dass speziell *Streptokokken*, unter anderem *Streptococcus*

*mutans*, hauptsächlich an der Entstehung der Zahnkaries beteiligt sind. *Streptokokken* sind aerotolerant (fakultativ anaerob), unbeweglich, grampositiv, oxidase- sowie katalase-negativ. Ihre Kohlenhydratverwertung ist fermentativ. Dennoch können *Streptokokken* sehr wohl Sauerstoff metabolisieren. Die wichtigsten mit der Plaque assoziierten säuretoleranten Bakterien sind *S. mutans*, *S. anginosus*, *S. constellatus*, *S. gordonii*, *S. intermedius*, *S. mitis*, *S. oralis*, *S. salivarius* und *S. sanguis* (Svensater et al., 2003).

Vorrangige klinische Bedeutung findet *Streptococcus mutans* in Zusammenhang mit oralem Biofilm, Kariesentstehung und -progression (Donkersloot und Hoerman, 1974; Hamada und Slade, 1980; Loesche, 1986). Dies hängt vor allem zusammen mit der ausgeprägten Säuretoleranz und mit der Fähigkeit, niedermolekulare Zucker abzubauen und kurzkettige Carbonsäuren zu synthetisieren (Drucker und Melville, 1968; Tanzer et al., 1969), die zu einer Demineralisation der Zahnhartsubstanz führen (Shaw, 1987). Zusätzlich ist *S. mutans* in der Lage, Saccharose in langkettige, zum Teil unlösliche Polysaccharide umzuwandeln (Shen et al., 2004). Diese bilden nicht nur ein Nahrungsreservoir für diese Keime, sondern verleihen oralen Biofilmen eine struktur- und volumengebende Matrix, Klebrigkeit und Beständigkeit (Shen et al., 2004). *S. mutans* kann sowohl intrazelluläre Polysaccharide (intracellular glycogen-like polysaccharides, IPSs) als auch extrazelluläre Polysaccharide synthetisieren. Dies trägt entscheidend zur Kariogenität von *S. mutans* bei (Harris et al., 1992).

Neben Saccharose ist *S. mutans* ebenfalls in der Lage, weitere Kohlenhydrate und Zuckeralkohole, wie Glucose, Lactose, Trehalose, Mannitol, Sorbitol, Raffinose und Melibiose, die mit der Nahrung angeboten werden zu verstoffwechseln (Coykendall, 1989).

Die Anhaftung an die Zahnoberfläche wird durch spezifische Oberflächenadhäsionsmoleküle (cell-surface adhesion-like proteins) vermittelt (Russell und Lehner, 1978). Diese unterstützen nicht nur das Anhaften des Bakteriums an die Zahnoberfläche, sondern stellen weitere Bindungsstellen für die Anlagerung weiterer Mikroorganismen dar. Neuere Untersuchungen haben gezeigt, dass eine Supprimierung dieser Proteine eine Virulenzreduktion von *S. mutans* zur Folge hat (Nakano et al., 2006).

#### **1.4. Entzündung**

Profunde kariöse Läsionen führen zu einer Interaktion zwischen *S. mutans* und Pulpazellen, einhergehend mit einer inflammatorischen Reaktion des Pulpa-Dentin-Komplexes (Hahn et al., 2000; Jontell et al., 1998). Unter Entzündung versteht man einen schnellen, aber wohl koordinierten Prozess, der durch eine mikrobielle Infektion oder eine Gewebeschädigung ausgelöst werden kann (Kumar et al., 2007; Nathan, 2002). Dieser Prozess beinhaltet eine Schädigung und Zerstörung körpereigenen Gewebes. Die hauptsächliche Bedeutung einer Entzündung ist, die Infektion zu beseitigen und eine Reparatur des geschädigten Gewebes einzuleiten, so dass der Zustand der Homöostase wieder erreicht wird. Wesentlich für die Effektivität dieses Systems ist die Fähigkeit, eine schnelle Immunantwort einzuleiten, die dem entzündungsauslösenden Reiz adäquat ist, und trotzdem das Gewebe nicht zu stark schädigt. Demzufolge ist die ideale Entzündungsreaktion schnell, destruierend (wenn nötig), spezifisch und selbstlimitierend (Nathan, 2002; Segal et al., 2000).

#### **1.5. Immunreaktion**

Das menschliche Immunsystem beinhaltet sowohl zelluläre als auch humorale Abwehrreaktionen und lässt sich in einen unspezifischen (angeborenen) und einen spezifischen (erworbenen) Teil gliedern. Das angeborene Immunsystem ist das ältere von beiden und in unterschiedlicher Ausprägung in allen Metazoen zu finden (Medzhitov, 2007). Die Zellen des angeborenen Immunsystems, neutrophile Granulozyten und Monozyten, verwenden spezifische Rezeptoren, um eine mikrobielle Infektion zu erkennen und zu signalisieren (Medzhitov, 2007; Takeda et al., 2003). Diese Signale dienen zwei hauptsächlichen Funktionen: Auslösen einer Entzündungskaskade, die letztendlich hilft, die Infektion einzugrenzen, und die Aktivierung des erworbenen Immunsystems. Der spezifische Teil wird durch B- und T-Lymphozyten verkörpert und über Antigen-Antikörper-Reaktionen vermittelt. Dieser Prozess ist effektiver, benötigt allerdings mehr Zeit, bis dieser voll entwickelt ist. Hauptauslöser für eine Entzündungsreaktion ist die Erkennung von Mikroorganismen durch spezifische Rezeptoren der Zellen des unspezifischen Immunsystems (Takeda et al., 2003). Die Kennzeichen einer Entzündung, die mit einer mikrobiellen Infektion

einhergehen (z.B. Rötung, Erwärmung, Schwellung und Schmerz) werden durch das angeborene Immunsystem initiiert. Evolutionär hat sich eine Spezifität an Rezeptoren ausgebildet, die in der Lage sind, viele verschiedene Klassen von potentiellen Pathogenen zu erkennen (Janeway, 1989). So sind die Zellen des angeborenen Immunsystems befähigt, einen großen Bereich der mikrobiellen Vielfalt zu erkennen (Akira et al., 2001; Medzhitov, 2001). Diese Strategie wird „pattern recognition“ (Muster-Erkennung) und die Rezeptoren, die diese anwenden, „pattern recognition receptors“ (PRRs) genannt. Solche mikrobiellen „Muster“ können zum Beispiel Zellwandbestandteile wie Lipopolysaccharide (LPS) und Peptidoglykane gram-negativer und gram-positiver Mikroorganismen sein.

Pattern recognition Rezeptoren sind in die Immunreaktion involviert (Janeway, 1989; Hoffmann et al., 1999). Besonders relevant bezüglich der Initiation der Entzündung sind PRRs, die bei Erkennung einer mikrobiellen Infektion mit einem pro-inflammatorischen Signal antworten. In diesem Zusammenhang sind die Toll-like-Rezeptoren (TLRs) am besten charakterisiert (Akira et al., 2001). TLRs werden von phagozytierenden Zellen, wie Makrophagen, Neutrophile und dendritischen Zellen exprimiert. Infolge einer mikrobiellen Infektion kommt es zur Aktivierung dieser Zellen (Akira et al., 2001; Medzhitov, 2001) mit anschließender Sekretion pro-inflammatorischer Zytokine, vor allem Interleukinen, welche viele der frühen Signale vermitteln, die eine Entzündung etablieren (Medzhitov, 2007; Mariathasan und Monack, 2007).

## **1.6. Zytokine**

Zytokine, die von verschiedenen Gewebs- und Zelltypen produziert und sezerniert werden, besitzen ein pleiotropes Wirkungsspektrum. Zytokine beeinflussen einander in Bezug auf die Synthese und in diesem Zusammenhang einer additiven, synergistischen oder auch antagonistischen Wirkung. Als Zytokine wurden ursprünglich Faktoren bezeichnet, die von den Zellen des Immunsystems produziert werden und auch diese beeinflussen. Es hat sich aber gezeigt, dass sie auch auf andere Zellen und Gewebe wirken können. Alle Zytokine wirken auf Zielzellen über spezifische Rezeptorsysteme, die Liganden mit hoher Affinität binden können. Nach der Bindung des Zytokins an einen spezifischen Rezeptor kommt es zur Übermittlung

eines Signals in den Zellkern, was zur Induktion der Transkription von Zielgenen führen kann. Man unterteilt die Funktionen der Zytokine in drei Gruppen: Immunregulatorische Wirkung, Entzündung und Akute-Phase-Reaktion, sowie Hämatopoese. Die Regulation des Immunsystems erfolgt meist über Interferone und Interleukine, die die Aktivierung, Differenzierung und Proliferation von B- und T-Lymphozyten induzieren. Die Koordination von Entzündungs- und Akute-Phase-Reaktionen wird vor allem durch die Interleukine IL-1, IL-6, IL-8, durch TNF- $\alpha$  und Interferone (IFN) reguliert (Heinrich et al., 1990). Interleukine und andere Mediatoren sind außerdem an der Reifung von Blutzellen wie Erythrozyten, Thrombozyten, Lymphozyten, Granulozyten und Monozyten beteiligt.

### **1.7. Interleukine**

Interleukine sind Peptidhormone, welche als körpereigene Botenstoffe der Zellen des Immunsystems agieren. Diese wirken immunmodulierend und dienen der Kommunikation der Abwehrzellen untereinander. Interleukine sind sehr kleine Proteine mit einem Molekulargewicht von 8 bis 40.000 Da. Deren biologische Aktivität erlaubt es, verschiedene Klassen zu beschreiben. Interleukine werden in verschiedene Subgruppen unterteilt, die numerisch gekennzeichnet sind (IL-1 bis IL-32). Die Wirkung der Interleukine ist dabei höchst unterschiedlich. So regen Interleukine spezifisch bestimmte Zellen des Immunsystems zu Wachstum, Differenzierung und Teilung an oder verhindern diesen Prozess der Aktivierung. Einige Interleukine wirken pro-inflammatorisch, wogegen andere die Entzündungsreaktion reduzieren und die Heilung fördern (anti-inflammatorisch). Interleukine werden nahezu in allen Zellen synthetisiert. Die meisten Interleukin-Gene werden exprimiert infolge einer speziellen Stimulation mit schädlichen Noxen, wie zum Beispiel UV-Licht, Hyperosmolarität oder die Anhaftung bestimmter Oberflächenmoleküle (Entzündungsmoleküle). Diese aktivieren Proteinkinasen, welche Transkriptionsfaktoren für die Genexpression phosphorylieren.

Immunhistologische Untersuchungen dentalen Pulpagewebes haben eine verstärkte Expression pro-inflammatorischer Mediatoren wie Interleukin-1- $\beta$ , TNF- $\alpha$ , Interleukin-6 (IL-6) und Interleukin-8 (IL-8) in Geweben kariös geschädigter Zähne im Vergleich zu Geweben kariesfreier Zähne gezeigt (McLachlan et al., 2004). Eine erhöhte

Expression von IL-6 und IL-8 als Reaktion auf *S. mutans* konnte bereits in epithelialen Zellen, endothelialen Zellen (Vernier et al., 1996), Monozyten (Soell et al., 1994) und humanen Plasmazellen (Chia et al., 2002) nachgewiesen werden, aber noch nicht in odontoblasten-ähnlichen Zellen. All diese Untersuchungen haben gezeigt, dass die untersuchten Zelltypen auf einen mikrobiellen Reiz als immunkompetentes Gewebe mit einer lokalen Entzündung antworten.

### 1.7.1. Interleukin-6

Interleukin-6 (IL-6) gehört zur Familie der Zytokine, die maßgeblich an der Vermittlung von Entzündungsreaktionen des Organismus beteiligt sind. Durch die komplexe Regelung und Funktion kommt dem Interleukin-6 eine Schlüsselstellung in dem Übergang von Mechanismen der angeborenen Immunität hin zu Mechanismen der erworbenen Immunität innerhalb des Entzündungsprozesses zu. Biologisch aktives IL-6 ist ein 184 Aminosäuren langes Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 26 kDa (Clogston et al. 1989; Gross et al. 1989). Die O- und N-Glykosylierungen sind für die biologische Aktivität wichtig, deglykosyliertes IL-6 ist nur zu 35% aktiv (Dufhues, 1991). IL-6 gehört in die Familie der sogenannten langkettigen 4- $\alpha$ -Helix-Bündel-Zytokine. Charakteristisch für diese Zytokine sind vier antiparallel in einem Bündel angeordnete  $\alpha$ -Helices (Bazan, 1990). Weitere Mitglieder dieser Familie sind u.a. das Wachstumshormon (GH), Prolaktin (PRL), granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF), Erythropoetin (Epo), IL-10, IL-11, IL-12, Interferon  $\alpha/\beta$  (IFN  $\alpha/\beta$ ) und Leptin (Bazan, 1990).

Es kann durch bakterielle Endotoxine, IL-1, Tumornekrosefaktor (TNF) und TNF- $\alpha$ , platelet-derived growth factor (PDGF), Onkostatin M, Interferon(IFN)- $\beta$ , Nerve-growth-factor (NGF), IL-17 und virale Infektionen stimuliert werden (Heinrich et al. 1990; Van Snick und Nordan, 1990). Je nach Zelltyp besteht durch IL-6 eine positive oder negative Rückkopplung auf die eigene Synthese.

Interleukin-6 ist ein pleiotrop wirkendes Zytokin (Heinrich et al., 1990; Kishimoto et al., 1994), das von einer Vielzahl verschiedener Zellen wie z.B. Monozyten, Makrophagen, Kupffer-Zellen, Neutrophile, Mastzellen, Lymphozyten, Fibroblasten, Epithel- und Endothelzellen (Akira et al., 1990; Heinrich et al., 1990; Van Snick und Nordan, 1990), aber auch von Odontoblasten und Pulpafibroblasten (Dommisch et

al., 2007b; Veerayutthwilai et al., 2007) synthetisiert wird. Neben den pleiotropen Wirkungen konnten auch pathobiologische Aktivitäten des IL-6 nachgewiesen werden. So gibt es zum Beispiel Hinweise, dass IL-6 bei inflammatorischen und Autoimmunerkrankungen (z.B. rheumatoide Arthritis), AIDS, B-Zell-Neoplasien (Myelom) und bei der Osteoporose eine Rolle spielt (Akira et al., 1993). Desweiteren ist IL-6 beteiligt an der Differenzierung der B-Zell-Lymphozyten und gilt als eines der bedeutendsten pro-inflammatorischen Mediatoren der Akute-Phase-Reaktion (Ibelgauffs, 2002; Akira et al., 1990). In Monozyten und Lymphozyten, ist bekannt, dass die IL-6-Synthese durch bakterielle Stimulation erhöht werden kann.

In Pulpafibroblasten ist die Expression von IL-6 durch schwarz-pigmentierte *Bacteroides* (*Porphyromonas endodontalis*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*) (Yang et al., 2003) und durch LPS von *Escherichia coli* (Coil et al., 2004) induzierbar. Es konnte gezeigt werden, dass die IL-6-Konzentration in Pulpafibroblasten erhöht ist, wenn diese proinflammatorischen Mediatoren wie IL-1- $\beta$  und TNF- $\alpha$  ausgesetzt werden (Lin et al., 2002). In kultivierten Odontoblasten-ähnlichen Zellen konnte eine Erhöhung der mRNA-Expression für IL-6 als Antwort auf das antimikrobielles Peptid, humane  $\beta$ -Defensin-2 (hBD-2) beobachtet werden (Dommisch et al., 2007b).

### 1.7.2. Interleukin-8

Interleukin-8 ist ein Chemokin und repräsentiert einen induzierbaren chemotaktischen Faktor für eine Vielzahl von Immunzellen und ist besonders an der Aktivierung von polymorphkernigen Leukozyten (Neutrophilen) beteiligt (Schröder und Christophers, 1992). Es erhöht die Chemotaxis für alle bekannten beweglichen Immunzellen. IL-8 wird in Makrophagen, Monozyten, Fibroblasten, Epithelzellen (Schröder und Christophers, 1992), Pulpafibroblasten (Patel et al., 2003) sowie Odontoblasten (Dommisch et al., 2007b; Levin et al., 1999) synthetisiert. Es kann ähnlich wie IL-6 durch Viren, bakterielle Lipopolysaccharide, TNF- $\alpha$  und auch durch Concanavalin A, doppelsträngige RNA, IL-1 $\beta$ , IL-7 und IL-17 induziert werden. In verschiedenen Experimenten mit Pulpafibroblasten konnte die gesteigerte IL-8-Konzentration nach Stimulation mit *Prevotella intermedia* (Tokuda et al., 2002),

*Fusobacterium nucleatum* (Thaweboon et al., 2006), Lipopolysaccharide des Bakteriums *E. coli* (Chang et al., 2005), Substanz P und calcitonin gene-related peptide (Patel et al., 2003) nachgewiesen werden. Auch die Expression von IL-8 in der Odontoblastenzellschicht nach Stimulation mit LPS des *E. coli* wurde demonstriert (Levin et al., 1999). Vergleichbar mit IL-6 konnte die mRNA-Expression von IL-8 in Odontoblasten-ähnlichen Zellen nach Stimulation mit dem antimikrobiellen Peptid hBD-2 beschrieben werden (Dommisch et al. 2007b). Für Odontoblasten der Zahnpulpa konnte gezeigt werden, dass die mRNA-Expression von IL-8 durch LPS von *E. coli* sowie von hBD-2 stimuliert werden kann (Levin et al., 1999).

### **1.8. Phosphatidylinositol-3-Kinase**

Für die Signaltransduktion besitzen Phospholipide als Signalmediatoren eine sehr große Bedeutung (Foster et al., 2003). Die chemische Struktur dieser Phospholipide kann durch verschiedene Enzyme beeinflusst werden. Hierzu zählt die zu den Lipidkinasen gehörende Gruppe der Phosphatidylinositol-3-Kinasen (PI-3-Kinasen) (Foster et al., 2003), die in sämtlichen eukaryotischen Zellen nachgewiesen werden können. PI3K beteiligt sich an einer Vielzahl zellulärer Schlüsselfunktionen, wie Zellwachstum, Proliferation, Migration, Differenzierung, Überleben und Zelladhäsion.

Diese Enzymgruppe phosphoryliert die 3'-Position des Inositolringes der Phosphatidylinositide, und als Ergebnis entstehen verschiedene Phosphatidylinositid-Phosphate. Diese 17 Substrate erfüllen wichtige Funktionen in der Zelle wie zum Beispiel den Proteintransport vom Golgi-Apparat zu den Lysosomen (Fry, 1994). Außerdem werden weitere Enzymkaskaden durch Phosphatidylinositid-Phosphate aktiviert, die wichtig für Proliferations- und Differenzierungsvorgänge, einhergehend mit der Regulation des Zellzyklus und der Proteinbiosynthese sind. Es konnte gezeigt werden, dass 3-phosphorylierte Phosphoinositide ursprünglich in Tumorzellen und mitoseaktivierten Zellen vorhanden sind, so dass man eine Funktion der PI-3-Kinasen in Tumorgängen und in mitotischen Signaltransduktionen annimmt (Sasaki et al., 2000; Fry, 2001). Die PI-3-Kinase ist ein Heterodimer, welches aus einer regulatorischen und einer katalytischen Untereinheit besteht. Die PI-3-Kinasen werden in drei Klassen eingeteilt. Die Enzyme der Klasse I sind in der Lage, alle



In Abb. 1 ist der PI3K/PKB-Signalweg vereinfacht dargestellt. Verschiedene Botenstoffe wirken über spezifische Rezeptoren aktivierend auf die PI3K, welche die in der Plasmamembran befindlichen Phosphatidylinositole an der 3'-Position des Inositolringes phosphoryliert. Das Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat (PIP3) dient anschließend als Bindungsstelle für diverse Enzyme wie die Protein Kinase B (PKB) sowie deren Aktivatoren, die PDKs (phosphatidylinositol-dependent kinases). Durch die Aktivierung der PKB werden eine Reihe von Enzymphosphorylierungen eingeleitet, die für den sog. „Survival-Pathway“ entscheidend sind. Glycogen Synthase Kinase 3 (GSK3) und die Transkriptionsfaktoren FKHR (Forkhead-Transkriptionsfaktoren), CREB (cAMP-responsive-element binding protein) und NFκB (Kernfaktor κB) gehören zu den PKB-Effektorproteinen des sog. „Survival-Pathways“ (Scheid und Woodgett, 2001).

Die PI-3-Kinase-Aktivität kann spezifisch durch den pharmakologischen Inhibitor 4-morpholinyl-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one (LY294002;  $C_{19}H_{17}NO_3$ ) gehemmt werden (Huang et al., 2005b; Huang et al., 2006). LY294002 ist ein zellmembrandurchgängiger Inhibitor, der an der ATP-Bindungsstelle des Enzyms kovalent bindet. Dieser zeigt keinen Effekt bezüglich der Aktivität der EGF-Rezeptor-Kinase, der MAP-Kinase, PKC, PI-4-Kinase und S6 Kinase.

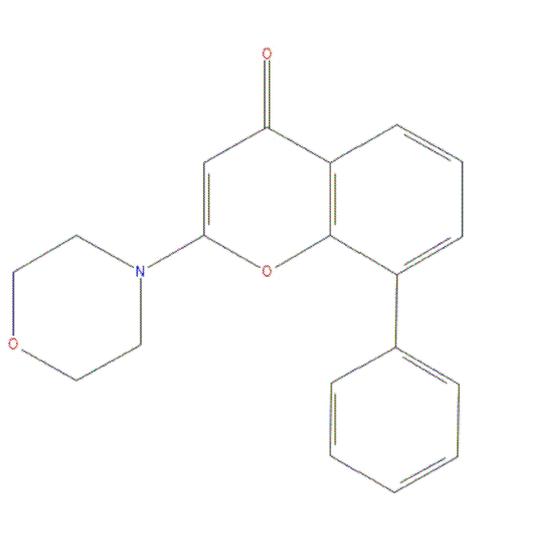


Abb.2

Strukturformel LY 294002 ( $C_{19}H_{17}NO_3$ )

Verschiedene Studien haben an einer Vielzahl von Zelltypen gezeigt, dass PI-3-Kinase an der intrazellulären Signaltransduktion mit nachfolgender IL-6 und IL-8 Expression beteiligt ist (Gobert et al., 2007; Turner et al., 2007; Wrann et al., 2007; Xu et al., 2004; Yadav et al., 2006; Yeh et al., 2006). Bisher sind allerdings noch keine Daten bekannt, die die Inhibition des PI3K-vermittelten Signaltransduktionswegs in Odontoblasten zeigen.

### **1.9. Ziele und Fragestellungen der Arbeit**

Vorherige Untersuchungen konnten zeigen, dass die Zellen der Zahnpulpa spezifisch auf bakterielle Reize (z.B. Karies) mit einer Entzündungsantwort reagieren. Die Odontoblasten repräsentieren die peripherste Zellschicht der Zahnpulpa und stehen damit im Mittelpunkt immunologischen Interesses.

1. Kann die Genexpression für IL-6 und IL-8 mit *Streptococcus mutans* in Odontoblasten-ähnlichen Zellen stimuliert werden?
2. Welchen Einfluss hat die zeitliche Dauer der bakteriellen Stimulation auf die Genexpression der Zielgene in Odontoblasten-ähnlichen Zellen?
3. Welchen Einfluss hat die Hemmung der Phosphatidylinositol-3-Kinase auf die Genexpression von IL-6 und IL-8 in Odontoblasten-ähnlichen Zellen nach Stimulation mit *Streptococcus mutans*?

## **2. Material und Methoden**

### **2.1. Übersicht**

Im Rahmen oralchirurgischer Eingriffe wurden kariesfreie Weisheitszähne (dritte Molaren) gewonnen. Humane Odontoblasten-ähnliche Zellen (kultiviert in Dulbecco's modified Eagle's medium) wurden mit einem spezifischen Inhibitor für PI3K (LY 294002) vorbehandelt und anschließend mit hitzebehandeltem *Streptococcus mutans* über einen Zeitraum von 6 und 24 Stunden stimuliert. Nach der Stimulation wurde RNA aus den untersuchten Zellen extrahiert und die cDNA-Synthese durchgeführt. Die Genexpression von IL-6 und IL-8 wurde mittels Real-Time-Polymerase-Ketten-Reaktion analysiert. Um die Zellüberlebensrate zu bestimmen, wurde ein Vitalitätstest der stimulierten Zellen mit Trypan-Blue<sup>®</sup> durchgeführt.

### **2.2. Reagenzien und Materialien**

Für die Aufbewahrung und Bearbeitung der gesammelten Proben wurden Eppendorf-Tubes und Pipettenspitzen der Fa. Sarstedt (Nümbrecht) verwendet. Das in den Versuchsreihen benötigte Aqua dest. wurde von der Fa. Braun Melsungen AG (Melsungen), die Kulturschalen und Zellschaber von der Fa. Labomedic GmbH (Bonn) und das Zellkulturmedium DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's-Medium) von der Fa. PAA Laboratories GmbH (Cölbe) bezogen. Die Reaktionskits für die RNA-Extraktion (RNeasy Mini Kit) wurden von der Fa. Qiagen (Hilden), für die reverse Transkription von der Fa. Invitrogen (Karlsruhe) und für die Real-Time-PCR von der Fa. Bio-Rad (Hercules, CA, USA) verwendet.

### **2.3. Kultur Odontoblasten-ähnlicher Zellen**

Die untersuchten Zellen stammen aus gesunden, kariesfreien dritten Molaren mit nicht vollständig abgeschlossenem Wurzelwachstum, die bei routinemäßigen oralchirurgischen Eingriffen in der Poliklinik für Chirurgische Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde (Universitätsklinikum Bonn; Direktor: Prof. Dr. G. Wahl) entfernt wurden. Alle Patienten wurden darüber aufgeklärt, dass mit ihrem Einverständnis zur

Probenentnahme keine zusätzlichen Materialentnahmen verbunden waren und gaben ihr schriftliches Einverständnis. Diese Studie wurde von der Ethikkommission der Universität Bonn geprüft und genehmigt (Antrag Ethikkommission AZ.: 142/05). Vor der Desinfektion der extrahierten Zähne mit 70%-igem Ethanol wurden diese mit einem sterilen Diamantschleifkörper der Fa. Hager & Meisinger GmbH (Neuss) von parodontalen Geweben befreit. Um Wurzelfragment und Zahnkrone zu separieren, wurden die Zähne auf Höhe der Schmelz-Zement-Grenze horizontal getrennt. Das Pulpagewebe wurde mit einer sterilen Pinzette der Fa. Aesculap (Tuttlingen) aus dem Pulpenkavum entfernt. Zur Kultivierung Odontoblasten-ähnlicher Zellen und Pulpafibroblasten wurden die Zahnkronen mit den anheftenden Odontoblasten ins Kulturmedium (DMEM, 10% fetal calf serum, Penicillin, Streptomycin, Amphotericin, PAA, Cölbe, Germany) überführt und bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> in einem Inkubator der Fa. Thermo (Dreieich) kultiviert (Dommisch et al., 2007b; Tjäderhane et al., 1998; Veerayutthilai et al., 2007). Die Zellen wurden bis zur 2. Passage unter Mediumwechsel im Drei-Tages-Rhythmus kultiviert. Nach ca. 4 Wochen wurden die Zellen in Kryoröhrchen von der Fa. Nalgene Nunc International (Rochester, NY, USA) bei -80°C für nachstehende Experimente eingefroren. Für die Stimulationsversuche wurden Zellen der 3. Passage in Kulturschalen (Durchmesser, 35 mm) mit 2 ml Kulturmedium (DMEM) bis zu einer Konfluenz von ca. 80-90 % kultiviert.

#### **2.4. Bestimmung der Zellzahl**

Die Messung der bei 80 % Konfluenz erreichten Zellzahl pro Schale wurde mit Hilfe des Zellzählers der Firma mölab (Hilden) durchgeführt. Dazu wurden 5 ml Zellsuspension in einem 50 ml Flacon-Röhrchen bei 500 x g ca. 3 min zentrifugiert und anschließend der Überstand abgenommen. Die Zellen wurden in 1 ml Phosphate-Buffered-Saline (PBS) resuspendiert. Für die Zellzahlbestimmung wurden 40 µl dieser Zellsuspension in 10 ml Celloton-Lösung (Fa. mölab, Hilden; Nr. 0200003) gemischt und die Messung durchgeführt. Zur Normalisierung der Werte wurde die Celloton-Lösung ohne Zellen verwendet.

## 2.5. *Streptococcus mutans* – Kultur

Wild-Typ *S. mutans* (freundlicherweise bereitgestellt von Prof. Dr. Sahl) wurde in LB-medium (10g Trypton, 5g Hefeextrakt, 10g NaCl, Roth, Karlsruhe, Germany) über Nacht bei 37°C (16 Stunden) kultiviert. Um die Konzentration an *S. mutans* pro µl Bakterienmedium zu bestimmen, wurde photometrisch die optische Dichte mit dem Personal Cell Density Meter CO8000 der Fa. WPA (Corston/Bath, UK) gemessen. Dazu wurden 900 µl des Bakterienmediums mit 100 µl Bakterienzellsuspension in einer speziell für das Messgerät passenden Küvette gemischt. Die Normalisierung der Werte erfolgte, indem die optische Dichte des Bakterienmediums ohne Zellen bestimmt wurde. Eine optische Dichte (OD) von 0,1 entsprach einer *Streptokokken*-Konzentration von  $1,8 \times 10^9$  Zellen pro ml.

## 2.6. Hitzebehandlung der Bakterien

In einem Vorversuch konnte das exponentielle Wachstum von *S. mutans* im verwendeten Medium (DMEM) gezeigt werden. Um die Stimulations-Ratio (Multiplicity of Infection, MOI) während der Stimulationsversuche konstant zu halten, erfolgte eine Hitzebehandlung der Bakterien. Die Bakterienzellsuspension (*S. mutans* + Überstand im Medium) wurde 15 Minuten bei 95°C behandelt (Crupper und Landolo, 1986). Im Anschluß konnte in einem weiteren Versuch keine Zunahme der Bakterienzellzahl in DMEM beobachtet werden.

## 2.7. Stimulation mit *Streptococcus mutans*

Odontoblasten-ähnliche Zellen wurden mit einer Stimulations-Ratio (MOI) von 100 (1 eukaryonte Zelle : 100 Bakterienzellen) stimuliert. Vor der Stimulation erfolgte ein Wechsel zu einem serumfreien Medium. Anschließend wurden 9 Zellschalen mit jeweils 4,25 µl Bakterienzellsuspension, bestehend aus dem Bakterienmedium und den hitzebehandelten *Streptococcus mutans*, zugegeben. Vollkommen unstimulierte Kontrollzellen waren die Grundlage für alle Untersuchungen und wurden später in der Kalkulation für die Real-Time-PCR Ergebnisse als Referenz herangezogen. Weitere „Negativ-Kontrollen“ wurden mit PBS und dem Bakterienmedium

durchgeführt. Alle Stimulationen erfolgten im Dreifachansatz bei 37°C über die Zeit: 6 und 24 Stunden.

## **2.8. Vorinkubation Odontoblasten-ähnlicher Zellen mit LY294002**

Der pharmakologische Inhibitor 4-morpholinyl-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one (LY294002, Calbiochem, Darmstadt, Germany) wurde verwendet, um spezifisch die Phosphatidylinositol-3-kinase-Aktivität zu blockieren. Vor der Stimulation mit *S. mutans* wurden die Zellen für 30 Minuten mit 18, 54 und 163 µM LY294002 präinkubiert (Huang et al., 2005b; Huang et al., 2006). Das Bakterienmedium ohne Zellen und LY294002 (163 µM) dienten als Negativkontrolle für die Stimulationsversuche. Getrennt davon wurde eine weitere Kontrolle mit dem Lösungsmittel Dimethylsulfoxid (DMSO) des Inhibitors (LY294002) durchgeführt. Es zeigten sich keine Unterschiede in Bezug auf die Expression der Zielgene nach Anwendung von DMSO im Vergleich zur Kontrolle mit dem Inhibitor LY294002 (163 µM) gelöst in DMSO.

## **2.9. Experimentelle Gruppen**

- 1) unstimulierte Odontoblasten-ähnliche Zellen (in DMEM; 6 und 24 h)
- 2) mit hitzebehandelten *S. mutans* stimulierte Odontoblasten-ähnliche Zellen (DMEM, hitzebehandelter *S. mutans* (MOI 100:1), Bakterienmedium (LB); 6 und 24 h)
- 3) mit Bakterienmedium (LB) behandelte Odontoblasten-ähnliche Zellen (DMEM, Bakterienmedium ohne *S. mutans*; 6 und 24 h)
- 4) mit LY294002 (163 µM) präinkubierte und mit *S. mutans* stimulierte Odontoblasten-ähnliche Zellen (DMEM, hitzebehandelter *S. mutans* (MOI 100:1), LY294002 (163 µM); Bakterienmedium (LB); 6 und 24 h)
- 5) mit reinem Bakterienmedium und LY294002 (163 µM) vorbehandelte Odontoblasten-ähnliche Zellen (DMEM, Bakterienmedium ohne *S. mutans*, LY294002 (163 µM); 6 h)

- 6) mit LY294002 (163  $\mu\text{M}$ ) präinkubierte Odontoblasten-ähnliche Zellen (DMEM, LY294002 (163  $\mu\text{M}$ ); 6 h)

Alle Versuche wurden im Dreifachansatz ( $n=3$  pro Gruppe) durchgeführt.

### **2.10. RNA-Extraktion**

Die RNA-Extraktion wurde entsprechend der Herstellerangaben mit Hilfe des RNeasy Mini Kits durchgeführt. Nach jeweils 6 h und 24 h wurden die entsprechenden Proben in ein steriles Eppendorf-Tube überführt und unter Zugabe von 300  $\mu\text{l}$  Lysis-Puffer RLT (990  $\mu\text{l}$  RLT und 10  $\mu\text{l}$  Mercaptoethanol) mittels eines sterilen Pistills der Fa. Eppendorf (Hamburg) homogenisiert. Dem Homogenisat wurde jeweils 300  $\mu\text{l}$  1 Vol. 70% Ethanol zugegeben. Anschließend wurde das bereits gemischte Homogenisat auf eine RNeasy-Säule gegeben, welche für 30 sec bei 10.000 rpm zentrifugiert wurde. Dieser bzw. alle nachfolgenden Zentrifugationsschritte erfolgten mit der Zentrifuge der Fa. Eppendorf (Hamburg). Das Filtrat wurde mittels eines sterilen Eppendorf-Tubes aufgefangen und verworfen. Vor dem nächsten Zentrifugationsschritt (10.000 rpm; 30 sec) wurde 700  $\mu\text{l}$  RW1-Puffer auf die RNeasy-Säule gegeben. Im Anschluss wurde ein Volumen von 500  $\mu\text{l}$  RPE-Puffer hinzu gegeben und die Säule bei 10.000 rpm für 2 min gewaschen. Das entstandene Filtrat wurde wieder verworfen. Die Elution der Total-RNA aus der RNeasy-Säule erfolgte mit RNase-freiem Wasser. Hierzu wurde 50  $\mu\text{l}$  RNase-freies Wasser direkt auf das Silica-Gel-Membran der Säule pipettiert und bei 10.000 rpm 1 min zentrifugiert. Dieser Schritt wurde zweimal wiederholt und somit 100  $\mu\text{l}$  Total-RNA eluiert.

### **2.11. RNA – Konzentrationsbestimmung**

Die RNA-Konzentrationsbestimmung erfolgte durch die Messung der optischen Dichte mit dem Power Wave<sup>TM</sup> Microplate Spektrophotometer der Fa. BioTek (Bad Friedrichshall). Zur Leerwertbestimmung wurden 2 Wells mit 100  $\mu\text{l}$  doppeldestilliertem Wasser gefüllt. In die übrigen Wells wurden jeweils 1  $\mu\text{l}$  Total-RNA der jeweiligen Probe und 99  $\mu\text{l}$  doppeldestilliertes Wasser hinzugefügt. Diese Messung wurde im Zweifachansatz durchgeführt. Die Absorption der jeweiligen RNA-Lösung wurde mit 260 nm und 280 nm im Spektralphotometer ermittelt. Die

Konzentrationsbestimmung beruht auf dem Absorptionsmaximum der aromatischen Pyridin- und Pyrimidinringe der Nucleinsäurebasen bei 260 nm. Proteine zeigen aufgrund ihrer aromatischen Aminosäurereste ein Absorptionsmaximum bei 280 nm. Der Quotient aus Absorption bei 260 nm und 280 nm (ratio) sollte bei einer kontaminationsfreien RNA-Lösung zwischen 1,8 und 2,0 liegen.

Die Berechnung der RNA-Konzentration erfolgte nach folgendem Schema:

Konzentration = Absorption x Verdünnung x molarer Extinktionskoeffizient (40 ng/μl)

## 2.12. Reverse Transkription

Unter einer reversen Transkription versteht man das Überschreiben der genetischen Information von einem m-RNA-Strang in eine komplementäre DNA (cDNA). Man spricht von reverser, also umgekehrter Transkription, da es sich im Vergleich zur Mehrzahl zellulärer Transkriptionsvorgänge um genetische Informationsüberschreibung in umgekehrter Richtung handelt. Bei diesem Vorgang wird ein Enzym, die Reverse Transkriptase (RNA-abhängige DNA-Polymerase), benötigt. Ein synthetisches Oligonukleotid des Gens wird als Starter (Primer) für die Reverse Transkriptase benutzt. In der Regel werden Oligonukleotide aus Thyminbasen, sogenannte Oligo-(dT)<sub>20</sub>-Primer verwendet, die üblicherweise aus 15-20 Nucleotiden bestehen. Der Primer muss ein freies 3'-OH-Ende besitzen und komplementär zur RNA sein. Die isolierte Poly-A-RNA wird mit dem Starter-Oligonukleotid hybridisiert und ermöglicht der Reversen Transkriptase die komplementäre cDNA zu synthetisieren. Die reverse Transkription der aus den Proben gewonnenen Total-RNA wurde mit dem SuperScript™ First Strand Synthesensystem für RT-PCR der Fa. Invitrogen (Mannheim) durchgeführt. Die Anwendung erfolgte nach Herstellerangaben. Nach Auftauen der Proben wurden jeweils 10 μl Total-RNA in ein steriles Eppendorf-Tube überführt, 1 μl dNTP-Mix und 1 μl Oligo(dT)-Primer hinzu gegeben. Im Anschluss erfolgte die Inkubation des Gemisches bei 65°C für 5 min im Wärmeblock der Fa. Biometra (Göttingen). Nach Abkühlung auf Eis für ca. 1 Minute wurden 4 μl 5fach RT-Puffer, 2 μl DTT (0,1 mM), 1 μl RNaseOUT (40 U) und 1 μl SuperScript II Reverse Transkriptase (50 U/μl) zugegeben, gemischt, kurz zentrifugiert und bei 42°C für 50 min inkubiert.

Anschließend erfolgte eine weitere Denaturierungsphase bei 72°C für 15 min. Die Entfernung der RNA erfolgte enzymatisch durch Zugabe von 1 µl RNase H (2 U) und Inkubation der Proben bei 37°C für 20 min. Resultat waren 21 µl cDNA für jede Probe. Die so gewonnene cDNA wird als Matrize für die Polymerasekettenreaktion genutzt (Verres et al., 1987).

### **2.13. Polymerasekettenreaktion**

Die 1985 entwickelte Methode zur Vervielfältigung spezifischer DNA-Sequenzen, die Polymerasekettenreaktion (PCR), gestattet die Amplifizierung eines gewünschten DNA-Abschnittes mit zwei spezifischen Oligonukleotiden (Saiki et al., 1985). Die doppelsträngige DNA wird im ersten Schritt der PCR durch Temperaturerhöhung denaturiert. Die Spezifität wird erzielt durch die Hybridisierung der Starter-Oligonukleotide an die denaturierten DNA-Stränge, das sogenannte Annealing (Anlagern der Primer). Die Primer sind kurze einzelsträngige DNA-Abschnitte, die zum Anfang und Ende der zu amplifizierenden Sequenz komplementär sind. Im letzten Schritt wird mit Hilfe von Desoxyribonukleotiden und einer Polymerase eine Neusynthese des definierten DNA-Abschnittes durchgeführt. Diese drei Reaktionsschritte werden solange hintereinander durchgeführt, bis bereits nach wenigen Programmzyklen durch exponentielle Vervielfältigung eine messbare Menge des DNA-Fragments entstanden ist. Die Polymerasekettenreaktion wurde in einem sogenannten Thermocycler durchgeführt. Das heißt, dass die Reagenzien stetig Temperaturschwankungen ausgesetzt waren. Temperaturunempfindliche DNA-Polymerase aus dem thermophilen Bakterium *Thermus aquaticus*, die sogenannte *Taq*-Polymerase, übersteht die Temperaturerhöhungen ohne Inaktivierung. Dadurch wird nahezu kein Leistungsverlust über die Gesamtdauer der Polymerasekettenreaktion gewährleistet (Saiki et al., 1988).

### **2.14. Quantitative Bestimmung der Expression (Real-Time-PCR)**

Die Real-Time-Polymerasekettenreaktion ermöglicht die relativ einfache Quantifizierung der mRNA-Expression. Die Real-Time-PCR-Analyse wurde mit dem Fluoreszenz-Cycler (MyiQ<sup>®</sup>, iCycler<sup>®</sup>) der Fa. Bio-Rad (Hercules, CA, USA) durchgeführt. Die Anwendung als quantitative PCR-Methode basiert die Real-Time-

PCR auf der Fluoreszenz-Detektion bei der Amplifikation des Zielgens (IL-6 und IL-8), wobei die gemessene Fluoreszenz proportional zur Menge an gebildetem PCR-Produkt ist.

Der für die quantitative Analyse verwendete interkalierende Farbstoff SYBR-Green<sup>®</sup> fluoresziert bei einer Wellenlänge von 490 nm nur bei Einlagerung in doppelsträngige DNA. Durch kontinuierliche Temperaturerhöhung wird die DNA denaturiert. Der Doppelstrang wird wieder ein einzelsträngiges Molekül, wodurch der Farbstoff nicht mehr mit der DNA interkalieren kann. Während der Annealing-Phase hybridisieren die Primer an ihrer Zielsequenz und bilden kleine Abschnitte DNA. Der Farbstoff hat wieder die Möglichkeit zu binden. Anschließend folgt die Elongationsphase, in der es durch eine Verlängerung der Primer entlang der DNA-Matrize zu einem Anstieg des an der DNA gebundenen Farbstoffes kommt. Am Ende der Elongationsphase wird ein Maximum an gebundenem SYBR-Green<sup>®</sup>-Farbstoff erreicht. Genau an diesem Punkt eines Zyklus in der Polymerasekettenreaktion wird die Messung im iCycler<sup>®</sup> durchgeführt. In jedem Zyklus wird dieser Vorgang wiederholt. Zyklus für Zyklus kann man so auf dem Monitor das gemessene Fluoreszenzsignal ablesen.

Die Software legt einen Schwellenwert („threshold“) fest, der 5% oberhalb des höchsten Hintergrundfluoreszenzsignal liegt. Wenn die Fluoreszenz beginnt signifikant anzusteigen, ist diese Schwelle erreicht. Als Quantifizierungsparameter der Real-Time-PCR dient der sogenannte  $C_T$ -Wert, welcher auf der Amplifikationskinetik der Polymerasekettenreaktion beruht. Die oben beschriebene Schwelle, also das Erreichen einer PCR-Konzentration, welche eine höhere Fluoreszenz zeigt als die Hintergrundaktivität (Gibson et al., 1996), sowie der Zeitpunkt (Crossing-Point = threshold-cycle ( $C_T$ )), an dem die Schwelle erreicht wird, sind zwei unterschiedliche Parameter, die sich für jede untersuchte Probe ergeben. Mit zunehmender Zyklenzahl ( $C_T$ -Wert) fällt die Konzentration des Templates höher aus (Higuchi et al., 1993).

Die Negativkontrolle dient als Nachweis für den spezifischen Ablauf der PCR. Hierbei wird anstatt der cDNA Wasser zum Probenmix gegeben. Es sollte kein PCR-Produkt entstehen bzw. gemessen werden.

Aus dem Wert des Crossing-Points und dem der Zyklenzahl kalkuliert die Software automatisch nach Abschluss der PCR die relative Transkriptionsproduktmenge (relative transcript level) für jede untersuchte Probe, einschließlich des Standards. Da eine lineare, umgekehrt proportionale Beziehung zwischen Logarithmus der

eingesetzten Menge und dem  $C_T$ -Wert besteht und die Ausgangsmenge bekannt ist, kann eine Standardkurve durch Auftragen des Logarithmus der Ausgangsmenge gegen den  $C_T$ -Wert konstruiert werden. Die Steigung dieser Standardkurve reflektiert den entsprechenden Wert für die spezifische Effizienz der Primer. Der Wert dient der Vergleichbarkeit der einzelnen Polymerasekettenreaktionen untereinander.

## 2.15. Quantitative Bestimmung der Expression von $\beta$ -Aktin

$\beta$ -Aktin ist ein Protein, das als Teil des Cytoskeletts in jeder Zelle des Menschen vorhanden ist. Deshalb wird das Gen für  $\beta$ -Aktin als Housekeeping-Gen bezeichnet. Bei der Auswertung der quantitativen Real-Time-PCR ist die Verwendung von  $\beta$ -Aktin zur Normalisierung der Ergebnisse eine gebräuchliche und anerkannte Methode (Thellin et al., 1999; Bustin, 2000; Ke et al., 2000; Bustin, 2002; Vandesompele et al., 2002).

Zur Kontrolle der reversen Transkription wurde zunächst die Polymerasekettenreaktion mit  $\beta$ -Aktin-Primern für alle Proben durchgeführt.

Es wurde ein Ansatz vorbereitet, in welchem der SYBR-Green-Supermix<sup>®</sup>, die Primer und Aqua dest. zusammenpipettiert wurden (siehe Tabelle 1)

**Tabelle 1** Zusätze für die Durchführung einer Polymerasekettenreaktion

Zusatz	Volumen
SYBR-Green-Supermix <sup>®</sup>	12,5 $\mu$ l
Primer (Sense und Antisense)	0,125 $\mu$ l
Aqua dest.	11,375 $\mu$ l
cDNA	1,0 $\mu$ l

Der Ansatz von 25  $\mu$ l wurde in ein dünnwandiges Amplifikationsgefäß (0,2 ml) der Fa. Bio-Rad (Hercules, CA, USA) pipettiert.

Die eingesetzten Primer (Fa. Metabio, München) für  $\beta$ -Aktin hatten folgende Sequenz:

**β-Aktin (370 Basenpaare):**

Sense: 5`-CAT GGA TGA TGA TAT CGC CGC G-3`

Antisense: 5`- ACA TGA TCT GGG TCA TCT TCT CG-3`

Die Primersequenzen wurden von Dr. J. Winter, Leiter des molekularbiologischen Labors der Poliklinik für Parodontologie, Zahnerhaltung und Präventiven Zahnheilkunde des Zentrums für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, generiert.

Bei jeder Versuchsreihe wurde eine Negativkontrolle mit Aqua dest. angefertigt, die zum Ausschluss einer Kontamination des Ansatzes Verwendung fand. Dabei wurde anstelle der cDNA 1 µl Aqua dest. hinzugefügt.

Anschließend wurden die PCR-Reaktionen im iCycler<sup>®</sup> gestartet und in dem folgenden Programm die gewünschten Produkte vervielfältigt:

95,0°C	3 min	
95,0°C	15 sec	} 35 Zyklen
69,0°C	30 sec	
72,0°C	30 sec	

## 2.16. Quantitative Bestimmung der Expression des Dentin-Sialophosphoproteins (DSPP)

DSPP ist ein Protein, das überwiegend von Odontoblasten synthetisiert und daher als Odontoblastenmarker bezeichnet wird (MacDougall et al. 1997). Mit dem Nachweis der Genexpression von DSPP kann der kultivierte Zelltyp (Odontoblasten-ähnliche Zelle) charakterisiert werden.

Die Zusammensetzung des Zusatzgemisches und der Versuchsaufbau für die quantitative Bestimmung von DSPP wurde entsprechend der Vorgehensweise für β-Aktin, angesetzt.

Die eingesetzten Primer für DSPP hatten folgende Sequenz:

**DSPP (320 Basenpaare):**

Sense: 5`-TCA CAA GGG AGA AGG GAA TGG-3`

Antisense: 5`-CTT GGA CAA CAG CGA CAT CCT-3`

Im iCycler<sup>®</sup> wurde mit folgendem Programm das gewünschte Produkt vervielfältigt:

95,0°C	3 min		
95,0°C	15 sec	}	35 Zyklen
67,0°C	30 sec		
72,0°C	30 sec		

**2.17. Quantitative Bestimmung der Genexpression von IL-6 und IL-8**

Die Zusammensetzung des Zusatzgemisches und der Versuchsaufbau für die quantitative Bestimmung von IL-6 und IL-8 wurde entsprechend der Vorgehensweise für  $\beta$ -Aktin, angesetzt.

Die eingesetzten Primer für IL-6 und IL-8 hatten folgende Sequenz:

**Interleukin-6:**

Sense: 5`-ATG AAC TCC TTC TCC ACA AGC-3`

Antisense: 5`-CTA CAT TTG CCG AAG AGC CC-3`

**Interleukin-8**

Sense: 5`- ATG ACT TCC AAG CTG GCC GTG G-3`

Antisense: 5`-TGA ATT CTC AGC CCT CTT CAA AAA C-3`

Im iCycler<sup>®</sup> wurde mit folgendem Programm das gewünschte Produkt vervielfältigt:

95,0°C	3 min		
95,0°C	15 sec	}	35 Zyklen
68,0°C	30 sec		
72,0°C	30 sec		

## 2.18. Auswertung der quantitativen Real-Time PCR

Alle untersuchten Proben wurden anhand der unstimulierten Kontrolle und des Housekeeping-Gens  $\beta$ -Aktin ausgewertet. Die  $\beta$ -Aktin mRNA wird in allen Zellen in einem nahezu gleichen Verhältnis exprimiert. Bei der Auswertung der quantitativen Real-Time-PCR wurde die Normalisierung der Ergebnisse anhand der Genexpression von  $\beta$ -Aktin-Primern 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 entstehenden Genexpression angegeben (Pfaffl, 2001).

Im ersten Schritt wurde die Primereffizienz der Referenz- und der Zielprimer errechnet. Hierfür wurde folgende Formel angewandt:

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

**Tabelle 2:** Primereffizienzen der Zielgene

Gene	$\beta$ -Aktin	DSPP	IL-6	IL-8
Effizienzen	1.84	1.83	2.02	2.12

In einem zweiten Rechenabschnitt wurden die jeweiligen  $\Delta C_t$ -Werte der einzelnen Proben erarbeitet. Es wurde eine Differenz gebildet, bei welcher der  $\Delta C_t$ -Wert aus dem  $C_t$ -Wert des Housekeeping-Gens und dem Zielgen der unstimulierten Kontrolle ermittelt wurde. Dieses entsprach der Referenz. Die zweite Differenz für den  $\Delta C_t$ -Wert wurde aus dem  $C_t$ -Wert des Housekeeping-Gens 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:

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

(Pfaffl, 2001)

## 2.19. Zellvitalität - Trypan-Blue®-Test

Trypan-Blue®-Tests werden verwendet, um den Anteil vitaler Zellen zu bestimmen. Der Trypan-Blue®-Test (Thaweboon et al., 2006) beruht auf der veränderten Membrandurchlässigkeit abgestorbener Zellen. Der Farbstoff Trypan-Blue® (0,4%, Invitrogen, Karlsruhe), der für die Zellwand normalerweise nicht durchlässig ist, kann von der Zelle aufgenommen werden. Vitale Zellen nehmen diesen Farbstoff nicht auf. Trypan-Blue® ist ein saurer Farbstoff, der als Anion sehr leicht an Proteine binden kann. Bei diesem Test ist zu berücksichtigen, dass möglichst ohne Serumzusatz im Medium gearbeitet werden sollte, da sich die Anzahl der gefärbten Zellen bei zunehmender Serumkonzentration drastisch vermindert und deshalb eine Lebensfähigkeit vortäuschen kann. Vitale Zellen dürfen nicht gefärbt sein, während tote Zellen durchgängig blau angefärbt werden. Auch diejenigen Zellen, die nur schwach blau gefärbt sind, werden als tot betrachtet.

Für den Trypan-Blue®-Test wurden zuvor je 2 Zellproben für 24 Stunden mit *Streptococcus mutans* stimuliert (siehe 2.7.) und 2 Zellproben blieben unbehandelt. Nach der Stimulationsphase wurde das Medium aspiriert, die Zellen trypsiniert (250 µl / Well) und 5 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde jeweils 750 µl serumfreies Medium hinzugefügt und der gesamte Inhalt (1000 µl) in ein steriles Eppendorf-Tube überführt. Die Zellsuspension wurde nun bei 800 x g 5 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das gewonnene Pellet wurde mit 1 ml Medium wieder resuspendiert. Von dieser Zellsuspension wurden jeweils 10 µl entnommen und mit 30 µl Trypan-Blue®-Lösung gemischt. Die Bestimmung der Anzahl vitaler und nicht vitaler Zellen erfolgte mit Hilfe der Neubauer Zählkammer. Dafür wurde die Oberfläche der Zählkammer und das Deckgläschen mit 70 % -igem Ethanol gereinigt. Nach leichtem Anfeuchten des Deckgläschens wurde dieses auf die Zählkammer gelegt. Das Erscheinen der „Newtonringe“ zeigt an, dass das Deckgläschen richtig angebracht und die Tiefe der Zählkammer richtig eingestellt ist

(0,1 mm). Nach dem Füllen der Zählkammer mit der gefärbten Zellsuspension erfolgte die Zählung der Zellen unter dem Mikroskop mit 60-facher Vergrößerung.

Es wurden jeweils immer 4 Quadrate pro Messung gezählt. Den Prozentsatz an vitalen Zellen errechnet man nach folgendem Schema:

$$\% \text{ vitaler Zellen} = \frac{\text{ungefärbte Zellen}}{\text{ungefärbte} + \text{gefärbte Zellen}} \times 100$$

## 2.20. Statistische Auswertung

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

Zunächst wurde eine deskriptive Statistik durchgeführt, wobei der Mittelwert, Minimum, Maximum und die Standardabweichung erhoben worden sind. Unterschiede zwischen zwei Stichproben im Rahmen der Auswertung der Real-Time-PCR Ergebnisse wurden mit Hilfe des gepaarten t-Tests (zweiteilig) analysiert (Brosius, 2002). Die Auswertung des Trypan-Blue<sup>®</sup>-Tests erfolgte mit Hilfe des nicht-parametrischen Kruskal-Wallis-H Tests für Unterschiede verschiedener Gruppen untereinander und Mann-Whitney-Tests für den Vergleich zweier Gruppen. In allen Tests wurde ein Signifikanzniveau von  $p \leq 0,05$  angenommen. Die graphische Darstellung der Ergebnisse aus dem t-Test erfolgte mit Hilfe von Balkendiagrammen, die jeweils den errechneten Mittelwert sowie die Standardabweichung vom Mittelwert für jede Versuchsgruppe angeben. Die nicht-parametrischen Testergebnisse (Kruskal-Wallis-H-Test und Mann-Whitney-Test) wurden mit Hilfe von Boxplotdiagrammen dargestellt. Ein Boxplotdiagramm beinhaltet einen Kasten, der nach oben durch das 75 %- und nach unten durch das 25 %-Perzentil begrenzt wird. Durch eine im Kasten dargestellte Linie, die sich zwischen den beiden Perzentilen befindet, wird der ermittelte Medianwert angezeigt. Zusätzlich zeigt ein Boxplotdiagramm den jeweils größten und kleinsten Wert aus der deskriptiven Statistik an. Die abgeleiteten Ergebnisse sind explorativ zu sehen und sollten als Auffälligkeiten gewertet werden.

### 3. Ergebnisse

Im Rahmen oralchirurgischer Routineeingriffe wurden zunächst kariesfreie dritte Molaren gewonnen. Mit Hilfe der gewonnenen Zähne wurden Kulturen Odontoblasten-ähnlicher Zellen etabliert, welche im Anschluß mit *Streptococcus mutans*, einem wichtigen Bakterium in der Ätiopathogenese der Karies, stimuliert wurden. Ziel war es, die Genexpressionsänderung von Interleukin-6 (IL-6) und Interleukin-8 (IL-8) als Antwort auf *S. mutans* in Odontoblasten-ähnlichen Zellen zu untersuchen. In einem weiteren Ansatz wurde die Änderung der Genexpression von IL-6 und IL-8 nach Stimulation mit hitzebehandeltem *S. mutans* in mit dem Phosphatidylinositol-3-Kinase Inhibitor (PI3K) LY294002 präinkubierten Odontoblasten-ähnlichen Zellen untersucht. Die bakterielle Stimulation erfolgte über einen Zeitraum von 6 und 24 Stunden. Zusätzlich wurde nach der Behandlung mit LY294002 sowie Stimulation mit *S. mutans* die Zellüberlebensrate mit Hilfe des Trypan-Blue®-Tests bestimmt.

#### 3.1 Quantitative Bestimmung der Genexpression des Dentin-Sialophosphoproteins (DSPP) in unstimulierten Odontoblasten-ähnlichen Zellen

In Voruntersuchungen wie auch während der Hauptuntersuchungen wurde der Phänotyp der kultivierten Zellen bestimmt. Hierfür wurde die Genexpression des Dentin-Sialophosphoproteins (DSPP) (Begue-Kirn et al., 1998) mit Hilfe der Real-Time PCR nachgewiesen. Es konnte gezeigt werden, dass die mRNA für DSPP in allen kultivierten Zellen der Zahnpulpa exprimiert wurde und somit die untersuchten Zellen als Odontoblasten-ähnliche Zellen zu charakterisieren waren. Zur vollständigen Ausbildung des Phänotyps der Odontoblasten fehlte die für die Odontoblasten spezifische physiologische Umgebung, charakterisiert durch die Ausbildung von Fortsätzen und damit Verbindung zum Dentin des Zahnes. Daher wurden die in dieser Arbeit untersuchten Zellen als Odontoblasten-ähnliche Zellen bezeichnet. Die Analyse der Genexpression von DSPP zeigte einen zeitabhängigen Anstieg der mRNA nach 24 im Vergleich zu 6 Stunden (siehe Abb. 3).

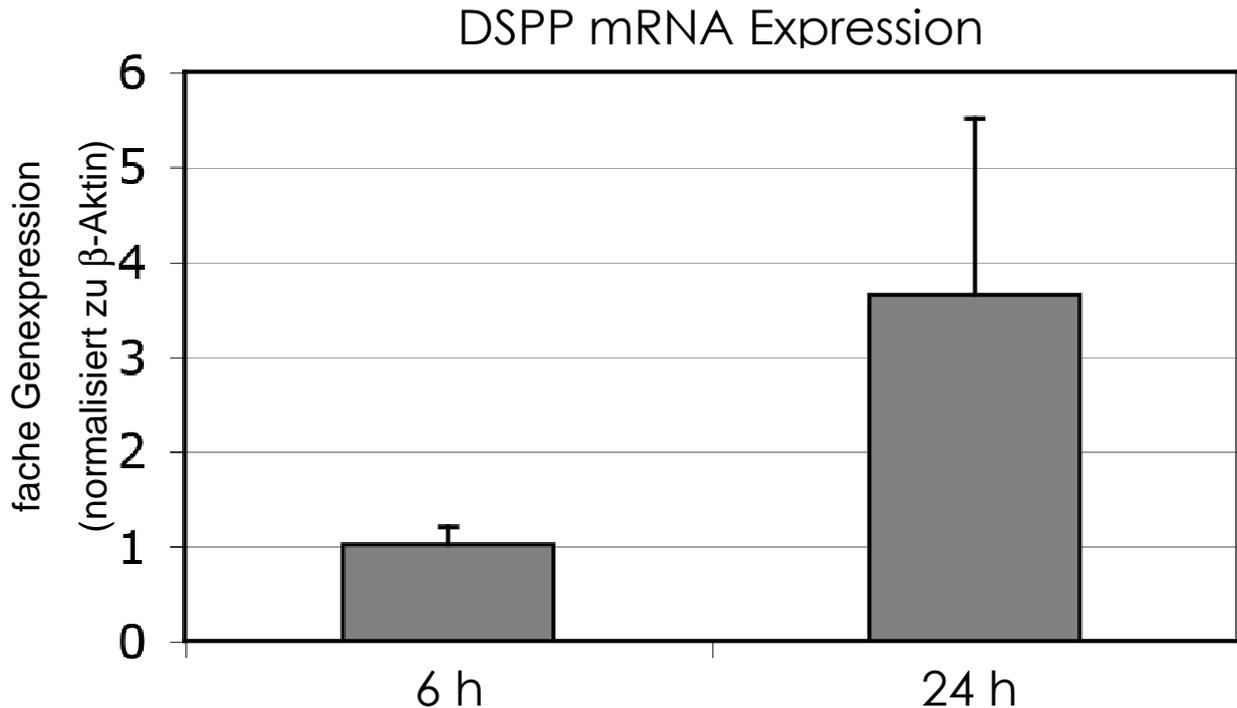


Abb. 3

Darstellung der Genexpression des Dentin-Sialophosphoproteins (DSPP) in Odontoblasten-ähnlichen Zellen nach 6 und 24 Stunden (h) mit Hilfe der Real-Time PCR. Es zeigte sich ein tendenzieller (4-facher) Anstieg der Genexpression von DSPP nach 24 im Vergleich zu 6 Stunden. Die mRNA Expression von DSPP wurde anhand der Genexpression von  $\beta$ -Aktin normalisiert (Pfaffl, 2001).

### 3.2. Quantitative Bestimmung der Genexpression von IL-6 nach Stimulation mit *Streptococcus mutans*

Im ersten Teil der Untersuchungen wurden Odontoblasten-ähnliche Zellen mit hitzeinaktivierten *Streptococcus mutans* in einem Verhältnis von 100 Bakterienzellen zu einer eukaryonten Zelle (100:1) stimuliert. Nach einem Stimulationszeitraum von 6 bzw. 24 Stunden wurde die RNA aus den Zellen isoliert und das Genexpressionsprofil von Interleukin-6 (IL-6) mit Hilfe der Real-Time PCR analysiert. Es konnte gezeigt werden, dass die Genexpression von IL-6 nach 6- bzw. 24-stündiger Stimulation mit *S. mutans* im Vergleich zu unstimulierten Kontrollzellen signifikant erhöht war ( $p=0,002$  bzw.  $p=0,018$ ). Der Vergleich der Genexpression von IL-6 nach 6 und 24 Stunden zeigte eine signifikant höhere mRNA-Expression nach 6 Stunden Stimulation mit *S. mutans* ( $p=0,019$ ) (siehe Abb. 4). Zur Kontrolle der Stimulationsexperimente mit *S. mutans* wurden Odontoblasten-ähnliche Zellen mit LB-Medium ohne Bakterienzellen inkubiert. Es konnte keine Änderung der

Genexpression von IL-6 als Antwort auf LB-Medium in Odontoblasten-ähnlichen Zellen nach 6 und 24 Stunden beobachtet werden (siehe Abb. 4).

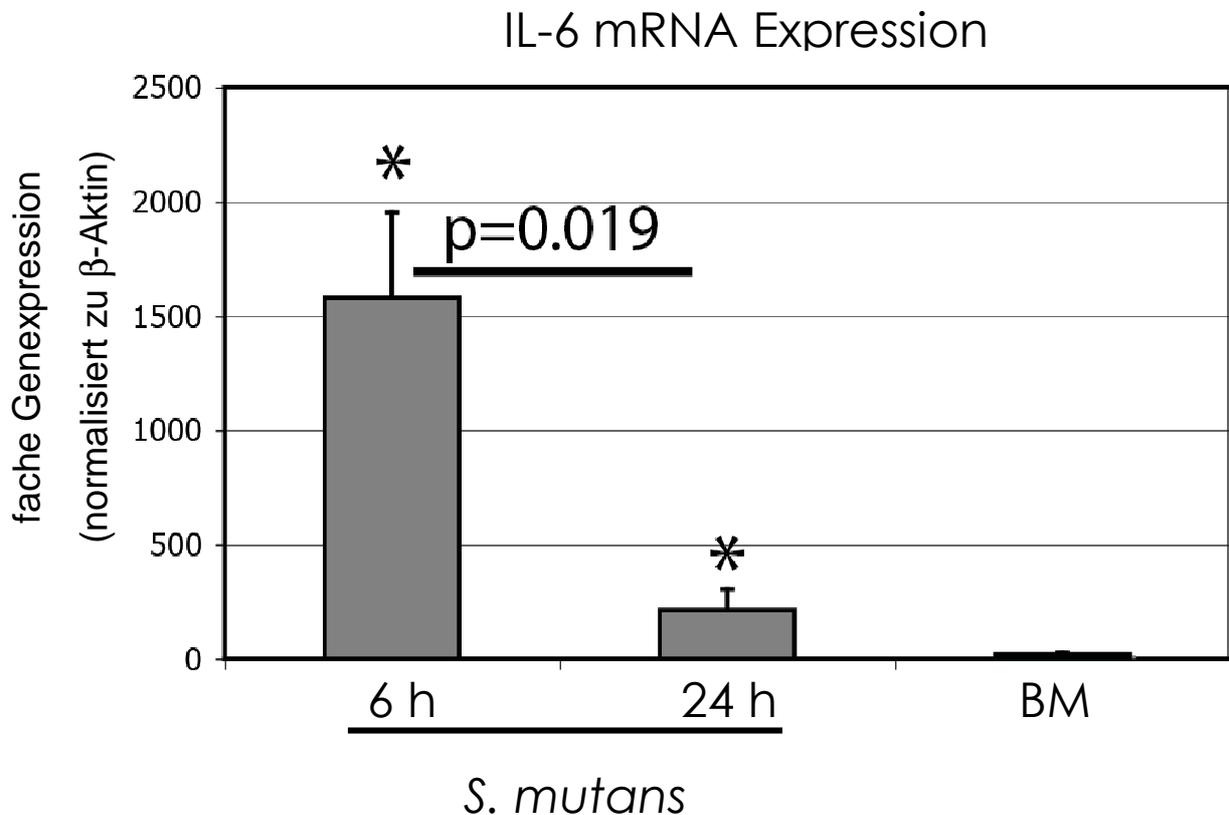


Abb. 4

Darstellung der Genexpression von Interleukin-6 (IL-6) in Odontoblasten-ähnlichen Zellen nach der Stimulation mit hitzeinaktiviertem *Streptococcus mutans* für 6 und 24 Stunden (h) mit Hilfe der Real-Time PCR. Es zeigte sich ein signifikanter Anstieg der Genexpression von IL-6 nach 6 und 24 h im Vergleich zu unstimulierten Odontoblasten-ähnlichen Zellen ( $p=0,002$  bzw.  $p=0,018$ ). Die mRNA-Expression von IL-6 war nach 6 Stunden höher als nach 24 Stunden ( $p=0,019$ ). Die mRNA Expression von IL-6 wurde anhand der Genexpression von  $\beta$ -Aktin normalisiert (Pfaffl, 2001). \*, signifikanter Unterschied (t-Test); BM, Bakterienmedium.

### 3.3. Quantitative Bestimmung der Genexpression von IL-8 nach Stimulation mit *Streptococcus mutans*

Zusätzlich zur Genexpression von IL-6 wurde die mRNA-Expression von Interleukin-8 (IL-8) in mit *S. mutans* stimulierten Odontoblasten-ähnlichen Zellen untersucht. Die Genexpression von IL-8 war nach 6- bzw- 24-stündiger Stimulation mit hitzeinaktiviertem *S. mutans* im Vergleich zu unstimulierten Odontoblasten-ähnlichen

Zellen signifikant erhöht ( $p < 0,001$  bzw.  $p = 0,043$ ). Der Vergleich der Genexpression von IL-8 nach 6 und 24 Stunden zeigte eine signifikant höhere mRNA-Expression nach 6 Stunden Stimulation ( $p < 0,001$ ) (siehe Abb. 5). Odontoblasten-ähnliche Zellen, die zur Kontrolle der Stimulationsexperimente mit LB-Medium ohne Bakterienzellen inkubiert wurden, zeigten keine Änderung der Genexpression von IL-8 nach 6 und 24 Stunden (siehe Abb. 5).

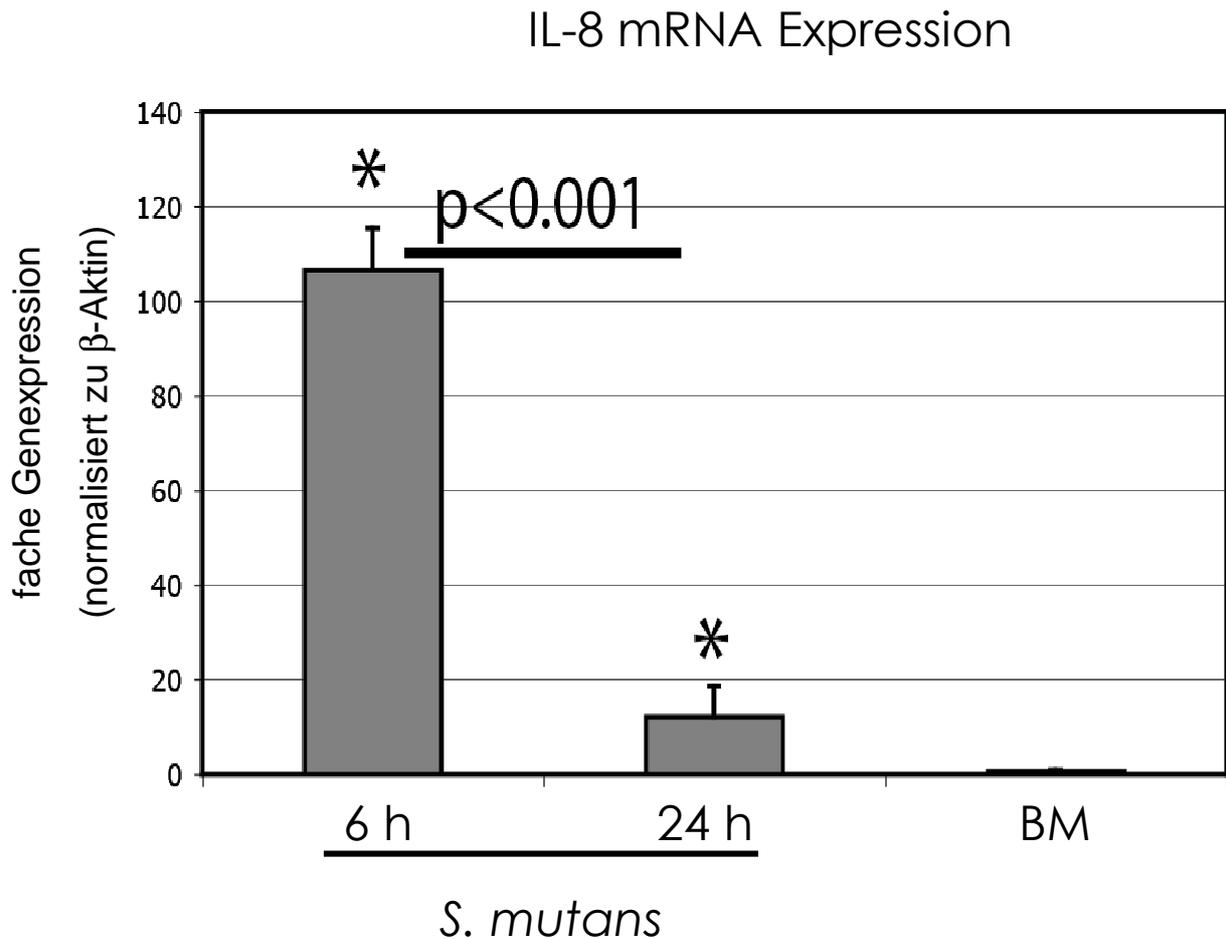


Abb. 5

Darstellung der Genexpression von Interleukin-8 (IL-8) in Odontoblasten-ähnlichen Zellen nach der Stimulation mit hitzeinaktiviertem *Streptococcus mutans* für 6 und 24 Stunden (h) mit Hilfe der Real-Time PCR. Es zeigte sich ein signifikanter Anstieg der Genexpression von IL-8 nach 6 und 24 h im Vergleich zu unstimulierten Odontoblasten-ähnlichen Zellen ( $p < 0,001$  bzw.  $p = 0,043$ ). Die mRNA-Expression von IL-8 war nach 6 Stunden höher als nach 24 Stunden ( $p < 0,001$ ). Die mRNA Expression von IL-8 wurde anhand der Genexpression von  $\beta$ -Aktin normalisiert (Pfaffl, 2001). \*, signifikanter Unterschied (t-Test); BM, Bakterienmedium.

### **3.4. Quantitative Bestimmung der Genexpression von IL-6 nach Stimulation mit *Streptococcus mutans* in mit LY294002 präinkubierten Odontoblasten-ähnlichen Zellen**

Zur Inhibition des Phosphatidylinositol-3-Phosphat (PI3k) - Signaltransduktionsweges wurden Odontoblasten-ähnliche Zellen mit dem spezifischen Inhibitor LY294002 eine Stunde vor der Stimulation mit *S. mutans* inkubiert. Es konnte gezeigt werden, dass die Genexpression von Interleukin-6 nach der Stimulation mit hitzeinaktiviertem *S. mutans* in mit LY294002 präinkubierten Zellen im Vergleich zu nicht präinkubierten, aber stimulierten Odontoblasten-ähnlichen Zellen signifikant niedriger war ( $p=0002$ ) (siehe Abb. 6). Kontrollen mit LB-Medium kombiniert mit dem Inhibitor LY294002 haben nachgewiesen, dass weder das Bakterienmedium noch der Inhibitor LY294002 selbst Einfluss auf die Genexpression von IL-6 in Odontoblasten-ähnlichen Zellen hatten (siehe Abb. 6)

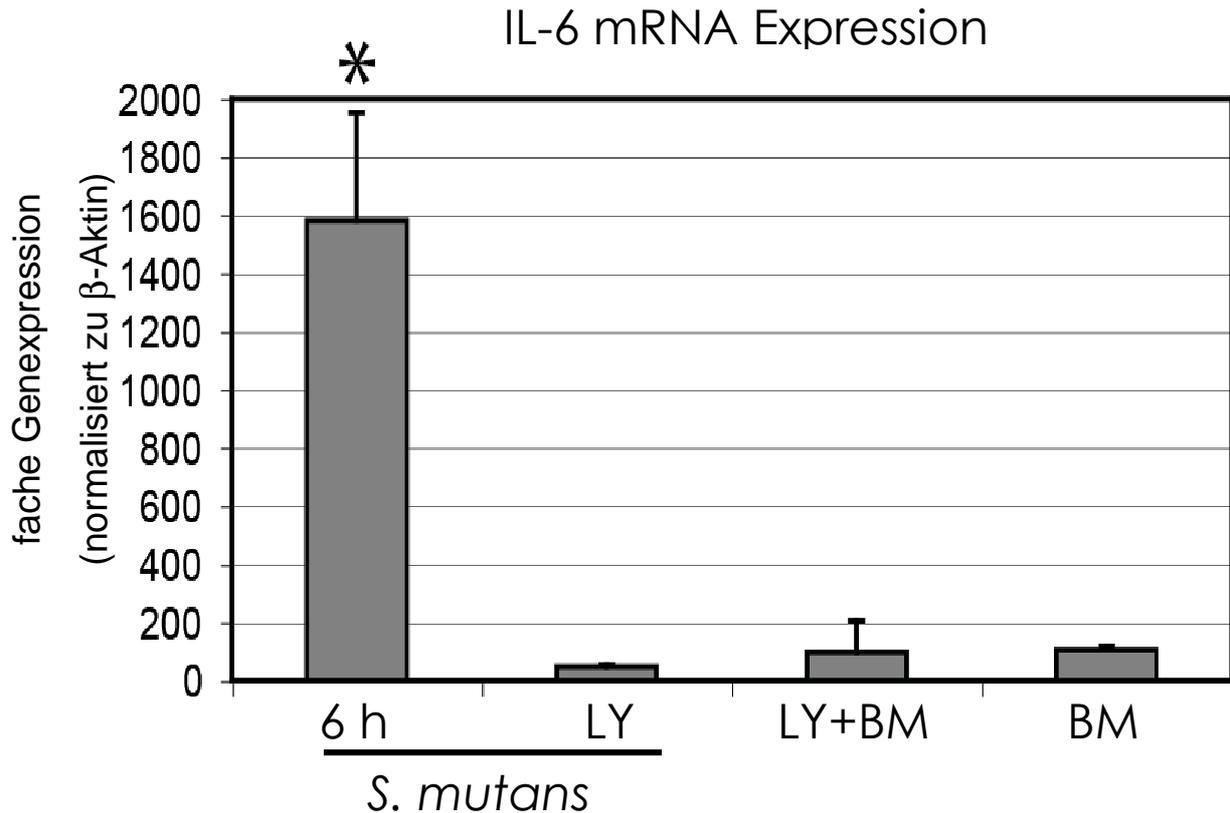


Abb. 6

Darstellung der Genexpression von Interleukin-6 (IL-6) in mit LY294002 präinkubierten Odontoblasten-ähnlichen Zellen nach der Stimulation mit hitzeinaktiviertem *Streptococcus mutans* für 6 Stunden (h) mit Hilfe der Real-Time PCR. Die mRNA-Expression von IL-6 war nach 6 Stunden in den präinkubierten und stimulierten im Vergleich zu den nicht-präinkubierten, aber stimulierten Zellen signifikant erniedrigt ( $p=0,002$ ). Die mRNA Expression von IL-6 wurde anhand der Genexpression von  $\beta$ -Aktin normalisiert (Pfaffl, 2001). \*, signifikanter Unterschied (t-Test); LY, LY294002 (Inhibitor für PI3K) BM, Bakterienmedium.

### 3.5. Quantitative Bestimmung der Genexpression von IL-8 nach Stimulation mit *Streptococcus mutans* in mit LY294002 präinkubierten Odontoblasten-ähnlichen Zellen

Im Weiteren wurde die mRNA-Expression von Interleukin-8 (IL-8) in mit LY294002 präinkubierten Odontoblasten-ähnlichen Zellen nach Stimulation mit *S. mutans* untersucht. Die Expressionsanalyse zeigte, dass die mRNA von IL-8 in präinkubierten im Vergleich zu unbehandelten Zellen signifikant niedriger exprimiert war, wenn mit hitzeinaktivierten *S. mutans* stimuliert wurde ( $p=<0,001$ ) (siehe Abb.

7). Kontrollen mit LB-Medium kombiniert mit dem Inhibitor LY 294002 zeigten keinen Einfluss auf die Genexpression von IL-8 in Odontoblasten-ähnlichen Zellen (siehe Abb. 7).

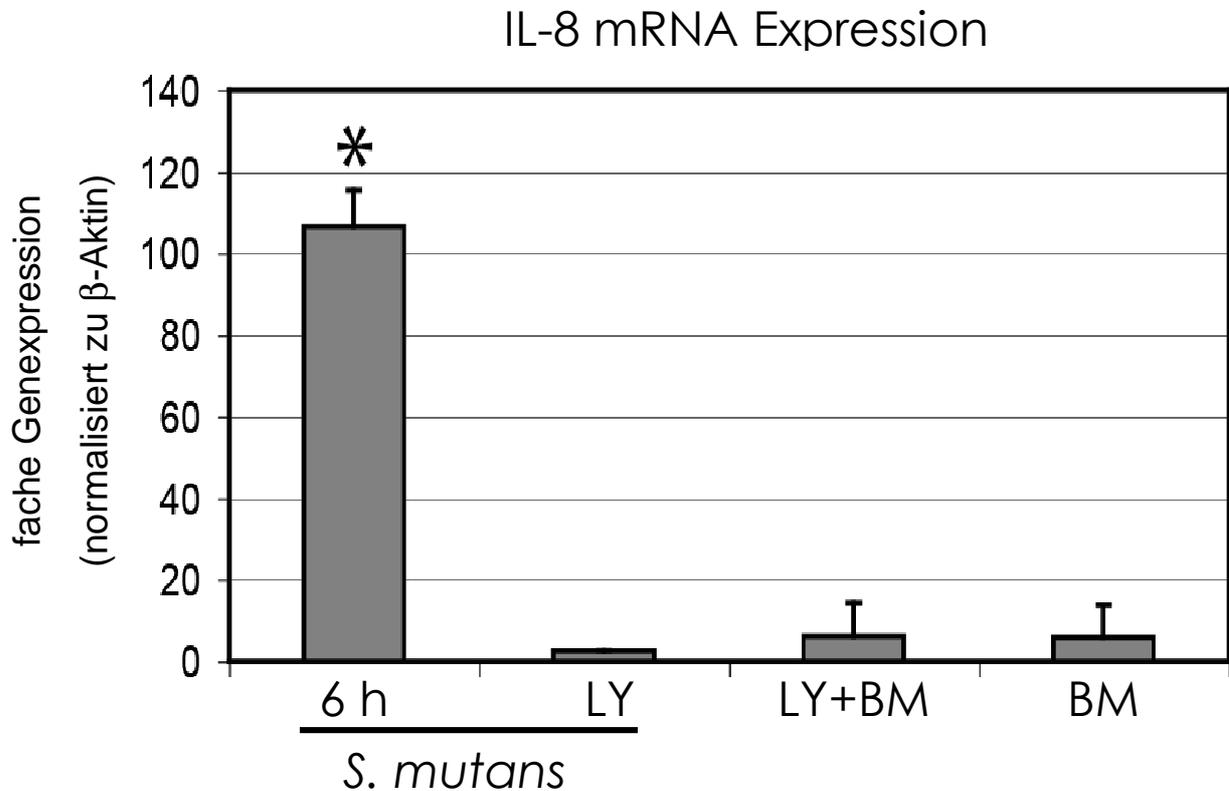


Abb. 7

Darstellung der Genexpression von Interleukin-8 (IL-8) in mit LY294002 präinkubierten Odontoblasten-ähnlichen Zellen nach der Stimulation mit hitzeinaktiviertem *Streptococcus mutans* für 6 Stunden (h) mit Hilfe der Real-Time PCR. Die mRNA-Expression von IL-8 war nach 6 Stunden in den präinkubierten und stimulierten im Vergleich zu den nicht-präinkubierten, aber stimulierten Zellen signifikant erniedrigt ( $p < 0,001$ ). Die mRNA Expression von IL-8 wurde anhand der Genexpression von  $\beta$ -Aktin normalisiert (Pfaffl, 2001). \*, signifikanter Unterschied (t-Test); LY, LY294002 (Inhibitor für PI3K) BM, Bakterienmedium.

### 3.6. Quantitative Bestimmung der Zellüberlebensrate nach Stimulation mit *S. mutans* und Inkubation mit dem Inhibitor LY294002

Nach der Behandlung mit LY294002 sowie der Stimulation mit *Streptococcus mutans* wurde die Zellüberlebensrate mit Hilfe des Trypan-Blue<sup>®</sup>-Tests untersucht. Die Behandlung mit dem Inhibitor LY294002 und die Stimulation mit *S. mutans* zeigten im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle keinen Unterschied in der gemessenen Zahl vitaler bzw. avitaler Odontoblasten-ähnlicher Zellen ( $p = 0,944$  bzw.  $p = 0,306$ ;

Kruskal-Wallis-H-Test) (Abb. 8). Es konnte für jede der untersuchten Gruppen (unstimulierte Zellen; nach Stimulation mit *S. mutans*; nach Stimulation LY294002-präinkubierter Zellen mit *S. mutans*) signifikant mehr vitale Zellen mit Vergleich zur Anzahl avitaler Odontoblasten-ähnlicher Zellen nach 24 Stunden ermittelt werden ( $p < 0.002$ ; Mann-Whitney-Test) (siehe Abb. 8).

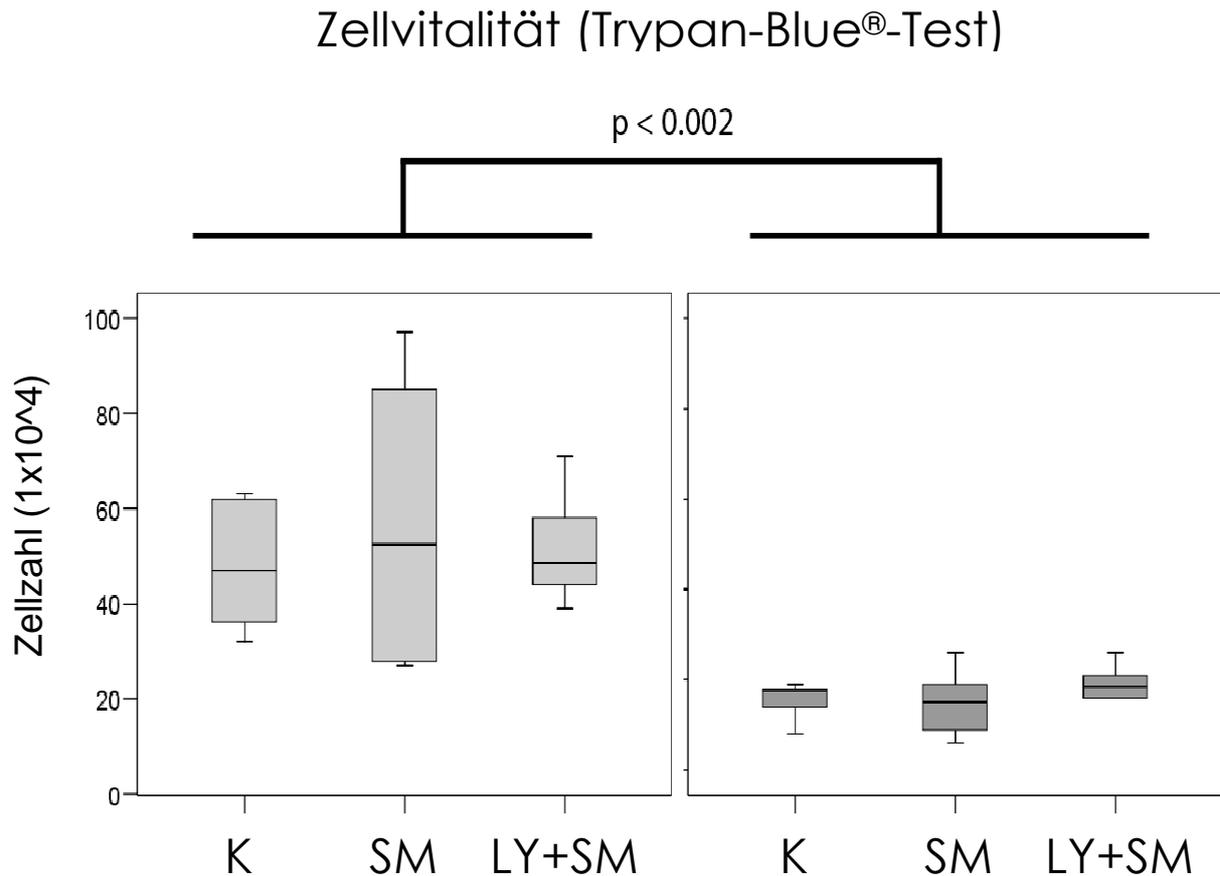


Abb. 8

Darstellung der Zellüberlebensrate in mit LY294002 präinkubierten und mit *Streptococcus mutans*-stimulierten Odontoblasten-ähnlichen Zellen (24 Stunden). Für die untersuchten Gruppen: unstimulierte Zellen (K, Kontrolle), nach Stimulation mit *S. mutans* (SM), nach Stimulation LY294002-präinkubierter Zellen mit *S. mutans* (LY+SM) zeigten sich keine signifikanten Unterschiede sowohl innerhalb der Analyse vitaler als auch avitaler Zellen ( $p = 0.944$  bzw.  $p = 0,306$ ; Kruskal-Wallis-H-Test). Der Vergleich innerhalb der einzelnen Gruppen zeigte, dass signifikant mehr vitale als avitale Zellen nach 24-stündiger Stimulation mit *S. mutans* in allen Versuchsgruppen nachweisbar waren ( $p < 0.002$ ; Mann-Whitney-Test). LY, LY294002 (Inhibitor für PI3K); BM, Bakterienmedium.

## 4. Diskussion

Karies ist eine der häufigsten Infektionskrankheiten des menschlichen Körpers. Voraussetzung für die Bildung einer kariösen Läsion ist die Anhaftung, Akkumulation und Proliferation kariogener Mikroorganismen an der Zahnoberfläche. Dieser Prozess führt letztendlich zur Ausbildung eines festhaftenden Biofilms (Loo et al., 2003). Mikroorganismen, die in Biofilmen vergesellschaftet sind, können enorm ungünstige Voraussetzungen wie antimikrobielle Agenzien, Schwankungen des pH-Wertes, Nährstoff- und Sauerstoffmangel, tolerieren. Kariöse Läsionen resultieren daraus, dass kariogene Mikroorganismen aus niedermolekularen Kohlenhydraten, die mit der Nahrung angeboten werden, verstoffwechseln und Säuren produzieren, die zu einer Zahnhartsubstanzdestruktion führen (Hellwig et al., 2003). *Streptococcus mutans* ist ein Bakterium, das im Rahmen der Kariesätiologie identifiziert werden konnte. Hierbei ist es initial an der Zerstörung der Schmelzoberfläche aber auch während der Kariesprogression beteiligt (Tanzer, 1992). Ätiologisch ist der Zusammenhang der Besiedlung der Zahnoberflächen mit *Streptococcus mutans* und einer vorliegenden Karies bereits seit längerem bekannt (Donkersloot und Hoerman, 1974).

Tiefe kariöse Läsionen verursachen in der Regel eine Entzündungsreaktion im Pulpa-Dentin-Komplex (Jontell et al., 1998; McLachlan et al., 2004). Die äußerste Schicht der Zahnpulpa wird von den zahnhartsubstanzbildenden Odontoblasten repräsentiert. Ihre Fortsätze (Tomes'sche Fasern) ragen bis zu 0,5 mm weit in die angrenzenden Dentinkanälchen (Garberoglio et al., 1976) und treten im Falle einer kariösen Destruktion der Zahnhartsubstanzen und damit bakteriellen Infektion des Dentins als erste Zellen mit Mikroorganismen bzw. deren Stoffwechselprodukten in Wechselwirkung. Entzündungsreaktionen der Zahnpulpa können auch auftreten, obwohl die kariöse Läsion die Pulpakammer noch nicht erreicht hat. Dabei können die bakteriellen Antigene über die Dentintubuli direkt in die Zahnpulpa diffundieren (Izumi et al., 1995). Bakterien und Bakterienbestandteile, die in die Dentinkanälchen eingedrungen sind, können die Odontoblasten und Pulpafibroblasten stimulieren und eine Entzündungsreaktion verursachen (Hahn et al., 2000; Jontell et al., 1998). Die Entzündungsreaktion kann in verschiedene Phasen gegliedert werden: Erkennung einer Infektion, Rekrutierung immunkompetenter Zellen, Eliminierung der

Mikroorganismen und deren Bestandteile, Auflösen der Entzündung und Wiederherstellung der Homöostase (Kumar et al., 2007). In den vergangenen Jahren wuchs das Interesse an der Erforschung der Abwehrmechanismen der Zahnpulpa. Verschiedene Studien haben gezeigt, dass Odontoblasten und Pulpafibroblasten an der Regulation der Immunabwehr durch Expression pro-inflammatorischer Mediatoren beteiligt sind (Dommisch et al., 2007b; Levin et al., 1999; Veerayutthwilai et al., 2007). Auch andere Studien haben gezeigt, dass das Gewebe der Zahnpulpa eine Vielzahl von Immunmechanismen aufweist, die sich gegen eindringende Bakterien richten (Jontell et al., 1998). So konnte gezeigt werden, dass *Streptococcus mutans* die Expression einer Vielzahl von Zytokinen schon nach kurzer Expositionszeit in Pulpazellen induziert (Engels-Deutsch et al., 2003). Ähnliche Erkenntnisse lieferten Untersuchungen mit schwarz-pigmentierten *Bacteriodes* (Yang et al., 2003). T- und B-Lymphozyten wurden ebenfalls in der Zahnpulpa nachgewiesen (Grégoire und Terrié, 1990). Sowohl Zytokine als auch T- und B-Lymphozyten werden dem adaptiven Immunsystem zugerechnet.

Entzündung ist eine allgemeine Bezeichnung, die verwendet wird, um eine Kaskade von Ereignissen, die infolge einer bakteriellen Infektion eintritt, zu beschreiben (Kumar et al., 2007). Bereits vor der modernen Ära der Molekularbiologie versuchte man diese Prozesse zu untersuchen. Hier konnten hauptsächlich aber nur qualitative Aussagen bezüglich der zellulären Reaktion getroffen werden. Dennoch konnten die Untersuchungen in den letzten Jahrzehnten dazu beitragen, unser Wissen über die molekularen Signalwege der frühen Immunantwort enorm zu erweitern (Medzhitov, 2007; Takeda et al., 2003). Besonders Toll-like-Rezeptoren (TLRs) und andere pattern recognition Rezeptoren (PRRs) spielen eine entscheidende Rolle in der Induktion früher Signale, die zu einer Etablierung einer Entzündung führen (Nathan, 2002; Medzhitov, 2007). In dieser Studie an Odontoblasten-ähnlichen Zellen wurde versucht, das wachsende Verständnis für die Signaltransduktionswege im komplexen System der Immunantwort zu integrieren. Die Hauptfunktion des Immunsystems ist es, vor eindringenden Pathogenen und Mikroorganismen zu schützen. Neben dem großen Pool der vielen verschiedenen immunologischen Effektorzellen, spielen die Interleukine eine wichtige Rolle im Rahmen der frühen Immunantwort. Interleukine wie IL-6 und IL-8 sind in pro-inflammatorische Reaktionen involviert und werden infolge bakterieller Infektionen vermehrt induziert (Akira et al., 1990; Schröder und

Christophers, 1992). Beide, Odontoblasten und Pulpafibroblasten, synthetisieren IL-6 und IL-8 nach bakterieller Stimulation oder Stimulation mit bakteriellen Bestandteilen (Chang et al., 2005; Tokuda et al., 2002; Yang et al., 2003). In der vorliegenden Arbeit wurde die mRNA-Expression von IL-6 und IL-8 in Odontoblasten-ähnlichen Zellen untersucht. Das Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluss von hitzebehandelten *Streptococcus mutans* auf die Genexpression von IL-6 und IL-8 in Odontoblasten-ähnlichen Zellen zu untersuchen. Weiterhin war von Interesse, ob die Induktion der IL-6 und IL-8 mRNA-Expression in Odontoblasten-ähnlichen Zellen über den PI3K-Signaltransduktionsweg vermittelt wird.

Um diese Fragen beantworten zu können, wurden die im Zuge routinemäßig durchgeführter oralchirurgischer Eingriffe entnommenen Gewebeproben (dritte Molaren), in Anlehnung an frühere Arbeiten (Dommisch et al., 2005 a, b, c) und bewährte Protokolle (Dommisch et al., 2007b; Tjaderhane et al., 1998; Veerayutthwilai et al., 2007) aufbereitet. In einem Vorversuch konnte das exponentielle Wachstum von *S. mutans* im verwendeten Medium (DMEM) gezeigt werden. Um das Bakterienwachstum während der Stimulationsversuche zu verhindern, erfolgte eine Hitzebehandlung der Bakterien. Aufgrund der Hitzebehandlung besteht die Möglichkeit, Virulenzfaktoren zu reduzieren (Nakano et al., 2006). Jedoch konnte gezeigt werden, dass die Hitzebehandlung von *S. mutans* nur geringfügig die Fähigkeit zur Stimulation pro-inflammatorischer Mediatoren, speziell der Expression von IL-8, beeinflusst (Engels-Deutsch et al., 2003). Diese Erkenntnisse konnten die in dieser Arbeit gewonnenen Daten bestätigen.

Humane Odontoblasten-ähnliche Zellen wurden mit dem spezifischen Inhibitor PI3K (LY294002) vorbehandelt und anschließend mit hitzebehandelten *Streptococcus mutans* stimuliert. Nachdem die mRNA aus den Gewebeproben extrahiert wurde, erfolgte eine RNA-Konzentrationsbestimmung durch Messung der optischen Dichte. So konnte nachgewiesen werden, dass in allen Proben eine nahezu gleiche und angemessene Menge von mRNA vorhanden war. Nach der cDNA-Synthese wurde eine quantitative Genexpressionsanalyse (Real-Time-PCR) von IL-6 und IL-8 durchgeführt. Um eine falsche Interpretation der Experimente auszuschließen, wurde die Zell-Überlebensrate mit Hilfe des Trypan-Blue<sup>®</sup>-Tests durchgeführt (Thaweboon et al., 2006). Es konnte gezeigt werden, dass ca. 75 % der Zellen der Kontrollgruppe und der stimulierten Zellen nach 6 und 24 Stunden noch lebensfähig waren.

Somit konnte ein zusätzlicher Effekt auf die Genexpression von IL-6 und IL-8 aufgrund einer geringen Zellüberlebensrate infolge bakterieller Exposition ausgeschlossen werden.

Die Bestimmung der Genexpression aller untersuchter Gene (IL-6, IL-8,  $\beta$ -Aktin, DSPP) erfolgte mit Hilfe der Real-Time-PCR, einem weiterentwickelten Verfahren der Polymerasekettenreaktion (O'Neil et al., 1999; Bustin, 2000; Harder et al., 2000; Bustin, 2002; Lehmann et al., 2002; Ong et al., 2002; Vandesompele et al., 2002). Die Polymerasekettenreaktion (PCR) ist ein thermozyklisches Verfahren, das 1985 erstmals beschrieben werden konnte (Saiki et al., 1985). Dieses Verfahren ermöglicht eine exponentielle Amplifizierung eines einzigen, spezifischen DNA-Abschnittes (mRNA) mit hoher Ausbeute. Die in der vorliegenden Arbeit angewandte Real-Time-PCR ist ein weitaus sensitiveres Verfahren der Polymerasekettenreaktion, wobei auch wesentlich kleinere Ausgangsmengen an cDNA an einem Monitor „online“ detektiert werden können (Bustin, 2000; 2002). Eine ausreichende mRNA-Ausbeute, besonders in Hinblick auf die Untersuchung der Gene für IL-6 und IL-8, ist die Voraussetzung für das klassische Verfahren der PCR. Darüber hinaus lässt dieses Verfahren der Polymerasekettenreaktion nur eine rein qualitative Aussage (Endpunktbestimmung) in Hinblick auf die Expression eines Genes zu. Im Gegensatz dazu bietet die Real-Time-PCR die Möglichkeit, die enzymatische Reaktion kontinuierlich zu verfolgen und lässt dadurch vergleichende Genexpressionsstudien zu (Bustin, 2000; 2002).

In der vorliegenden Studie wurden alle Untersuchungen mit Hilfe der Real-Time-PCR durchgeführt. Der Vorteil dieser Methode ist es, dass die Amplifizierung in jeder einzelnen zu untersuchenden Probe direkt gemessen und nachvollzogen werden kann. Die Messung erfolgt über die Änderung eines Fluoreszenzsignals, das entweder von fluoreszierenden Primern (z.B. Taq-Man) oder von fluoreszierenden interkalierenden Substanzen (SYBR-Green<sup>®</sup>) ausgesandt wird (Bustin, 2000; 2002). Im Rahmen dieser Arbeit wurde der interkalierende Fluoreszenzfarbstoff SYBR-Green<sup>®</sup> eingesetzt. Für die Anwendung einer interkalierenden (fluoreszierenden) Substanz war es wichtig, zunächst die einzelnen Zyklusabschnitte der Polymerasekettenreaktion zu optimieren (Vandesompele et al., 2002). Die Konzentration der eingesetzten Primer, sowie die Annealingtemperaturen (Anlagerungstemperaturen der Primer) mussten in Vorversuchen optimiert werden,

damit keine unspezifischen Amplifikationen das Interkalieren von SYBR-Green® in Primer-Dimeren ermöglichten (Bustin, 2002; Vandesompele et al., 2002). Dabei können auch entstandene Primerdimere aufgrund eines SYBR-Green®-Fluoreszenzsignal identifiziert werden, wenn das PCR-Produkt entweder fehlt oder nur in einem geringen Maße vorhanden ist (Bustin, 2002).

Die erste Untersuchung bezog sich auf das Gen von  $\beta$ -Aktin.  $\beta$ -Aktin ist ein Protein, das als Bestandteil des Zytoskeletts in nahezu jeder Zelle gleich exprimiert wird und damit eine gute Kontrolle dafür ist, ob die reverse Transkription (cDNA-Synthese) erfolgreich war. Im Zuge dieser Eigenschaft wird  $\beta$ -Aktin, neben einer Reihe weiterer Gene, als sog. Housekeeping-Gen bezeichnet (Bustin, 2002). Neben der Kontrolle der reversen Transkription bietet die quantitative Genexpressionsbestimmung von  $\beta$ -Aktin die Möglichkeit, eine Normalisierung der weiteren zu untersuchenden Gene vorzunehmen (Bustin, 2000; 2002). Dieses Vorgehen ermöglicht es, für alle Proben ein relatives PCR-Produkt zu ermitteln, und alle weiteren zu untersuchenden Gene anhand dessen zu relativieren. In dieser Studie konnte in allen untersuchten Proben die Expression von  $\beta$ -Aktin nachgewiesen werden. Folgende Gene wurden anhand der für  $\beta$ -Aktin ermittelten Werte normalisiert: Interleukin-6 und Interleukin-8. Die  $C_t$ -Werte der zu untersuchenden Gene IL-6, IL-8 und DSPP, des Standards  $\beta$ -Aktin und der jeweiligen unstimulierten Kontrollen konnten zusammen mit den entsprechenden Primereffizienzen mittels einer mathematischen Analyse in Korrelation gebracht und die relative Expression berechnet werden (Pfaffl, 2001).

Eine Alternative zu  $\beta$ -Aktin stellt ein weiterer interner Standard dar, GAP-DH (Glycerin-Aldehyd-3-Phosphat-dehydrogenase). Aufgrund großer Variationen innerhalb der Transkriptionslevel wurde GAP-DH in dieser Arbeit nicht verwendet (Bustin, 2000).

Das Dentin-Sialophosphoprotein (DSPP) wurde ebenfalls in Odontoblasten-ähnlichen Zellen exprimiert. DSPP ist die Bezeichnung für zwei aus einem einzelnen Gen hervorgegangene Proteine, das im Rahmen der Differenzierung dentaler Zellen und in der Ausbildung der Zahnhartgewebe eine entscheidende Rolle einnimmt (Bègue-Kirn et al., 1998; Narayanan et al., 2006; Qin et al., 2004). In einer weiteren Studie konnte gezeigt werden, dass DSPP überwiegend von Odontoblasten synthetisiert wird und daher auch als Odontoblastenmarker bezeichnet werden kann

(MacDougall et al. 1997). Das heißt, nur Odontoblasten exprimieren in der Zahnpulpa das Gen für das Dentin-Sialophosphoprotein (Bègue-Kirn et al., 1998). Zwar wird DSPP auch von Ameloblasten gebildet (Bègue-Kirn et al., 1998), diese werden jedoch in der Zahnpulpa nicht aufgefunden, da sie jenseits des Zahnschmelzes verbleiben und bei Zahndurchbruch verloren gehen (Schroeder, 1992). Mit dem Nachweis der Genexpression des Odontoblastenmarkers DSPP konnte der in der vorliegenden Studie kultivierte Zelltyp (Odontoblasten-ähnliche Zelle) charakterisiert werden.

In der vorliegenden Studie konnte eine erhöhte mRNA-Expression von IL-6 und IL-8 in Odontoblasten-ähnlichen Zellen nach Stimulation mit *Streptococcus mutans* festgestellt werden. Die bakterielle Stimulation erfolgte zum einen über einen Zeitraum von 6 Stunden und in einem weiteren Experiment über 24 Stunden. Dieses Experiment über die Zeiträume 6 und 24 Stunden hat gezeigt, dass die Genexpression von IL-6 und IL-8 nach 6 Stunden deutlicher erhöht war als nach 24 Stunden, was auf eine frühe Immunantwort der Odontoblasten-ähnlichen Zellen schließen lässt. Die erhöhte Expression von IL-6 und IL-8 zu einem frühen Zeitpunkt konnte auch in anderen Studien an Pulpafibroblasten gezeigt werden (Patel et al., 2003; Tokuda et al., 2005; Yang et al., 2003). Es wurde demonstriert, dass die IL-8-Genexpression nach Stimulation mit Lipopolysacchariden von *E. coli* in Odontoblasten gesteigert wird (Levin et al., 1999). Vor kurzem konnte gezeigt werden, dass Odontoblasten pattern recognition Rezeptoren (PRRs) wie Toll-like-Rezeptor-2 (TLR-2) und TLR-4 exprimieren können (Veerayutthwilai et al., 2007). Als Antwort auf die Aktivierung von TLR-2/TLR-4 wurde die Genexpression pro-inflammatorischer Mediatoren (TNF- $\alpha$ , IL-8) und antimikrobieller Peptide (macrophage-inflammatory-peptide-3- $\alpha$ , MIP-3- $\alpha$ ; hBD-2) in Odontoblasten beeinflusst (Veerayutthwilai et al., 2007).

Es ist eine neue Erkenntnis, dass Odontoblasten antimikrobielle Peptide (humanes  $\beta$ -Defensin-1, -2) synthetisieren (Dommisch et al. 2005), welche in der Lage sind, die Immunantwort in der Zahnpulpa zu modulieren (Dommisch et al., 2007b). Stimulationsversuche mit dem rekombinanten humanen  $\beta$ -Defensin in Odontoblasten-ähnlichen Zellen führten zu einer gesteigerten Genexpression von IL-6 und IL-8 (Dommisch et al., 2007b). MIP-3- $\alpha$ /CCL-20 und  $\beta$ -Defensin-2 wirken antimikrobiell gegen *Streptococcus mutans* und *Lactobacilli casei*, welche den

größten ätiologischen Faktor in der Kariesentstehung und –progression darstellen (Shiba et al. 2003).

Um die Fragestellung zu untersuchen, ob PI3K in Odontoblasten-ähnlichen Zellen an der Vermittlung der Genexpression von IL-6 und IL-8 beteiligt ist, sind die Zellen mit einem spezifischen Inhibitor präinkubiert und anschließend mit *Streptococcus mutans* stimuliert worden. Phosphatidylinositol-3-Kinasen (PI-3-Kinase, PI3K) sind Lipidkinasen, die in sämtlichen eukaryotischen Zellen zu finden sind. Diese beteiligen sich an einer Vielzahl zellulärer Schlüsselfunktionen, wie Zellwachstum, Proliferation, Migration, Differenzierung, Überleben und Zelladhäsion. Diese Enzymgruppe kann über Phospholipide als Signalmediatoren in der Zelle verschiedenste Vorgänge beeinflussen (Forster et al. 2003). Die PI-3-Kinase ist verantwortlich für die Produktion von Second messenger-Molekülen. Als Lipidkinase katalysiert diese die Phosphorylierung des Membranbestandteils Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat an der 3`-OH Position des Inositolrings. Dabei entsteht das Lipidprodukt Phosphoinositol-3,4,5-triphosphat (PIP3), welches unter anderem von der Protein-Kinase-B (PKB) als Anker genutzt wird. Dieses Andocken der PKB an die Membran setzt eine Signaltransduktionskaskade in Gang, was zur Induktion der Transkription bestimmter Zielgene führt.

Die PI-3-Kinase-Aktivität kann durch den pharmakologischen Inhibitor 4-morpholinyl-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one (LY294002; C<sub>19</sub>H<sub>17</sub>NO<sub>3</sub>) gehemmt werden (Huang et al., 2005b; Huang et al., 2006). LY294002 ist ein Zellmembran-durchgängiger Inhibitor, der an der ATP-Bindungsstelle des Enzyms agiert. Er zeigt keinen Effekt bezüglich der Aktivität der EGF-Rezeptor-Kinase, der MAP-Kinase, PKC, PI-4-Kinase und S6 Kinase.

Verschiedene Studien haben an einer Vielzahl von Zelltypen gezeigt, dass PI3K an der intrazellulären Signaltransduktion mit nachfolgender IL-6 und IL-8 Expression beteiligt ist (Chia et al., 2002; Gobert et al., 2007; Soell et al., 1994; Turner et al., 2007; Vernier et al., 1996; Wrann et al., 2007; Xu et al., 2004; Yadav et al., 2006; Yeh et al., 2006;). Bisher waren allerdings noch keine Daten bekannt, die die Inhibition des PI3K-vermittelten Signaltransduktionswegs in Odontoblasten zeigten.

In der vorliegenden Arbeit wurden die odontoblasten-ähnlichen Zellen mit dem spezifischen Inhibitor für Phosphatidylinositol-3-Kinase (LY 294002) präinkubiert und anschließend mit hitzebehandelten *S. mutans* stimuliert. Es erfolgte eine quantitative

Genexpressionsanalyse von IL-6 und IL-8. Es konnte gezeigt werden, dass LY294002 den Signaltransduktionsweg, der zu einer Genexpression von IL-6 und IL-8 führt, blockiert. Die Genexpression von IL-6 und IL-8 konnte in den mit dem Inhibitor präinkubierten Zellen signifikant gesenkt werden im Vergleich zu den unbehandelten, aber stimulierten odontoblasten-ähnlichen Zellen. Dies ist ein erster Hinweis darauf, dass die Regulation der Genexpression von IL-6 und IL-8 in Odontoblasten-ähnlichen Zellen nach Stimulation mit *S. mutans* über PI3K-abhängige Signaltransduktionswege reguliert werden könnte. Ähnliche Erkenntnisse konnten im Rahmen einer weiteren Studie, in der endotheliale Zellen mit *Streptokokken* der *Viridans*-Gruppe stimuliert wurden, gewonnen werden (Yeh et al. 2006). Hier konnte gezeigt werden, dass die PI3K-Inhibition die IL-6- und teilweise auch die IL-8-Expression blockiert (Yeh et al. 2006). Darüber hinaus haben weitere Studien den Einfluss von PI3K bei der Vermittlung der Regulation der Genexpression von IL-6 und IL-8 an verschiedenen Zelltypen untersucht (Endothelzellen, Karzinomzellen, kardiale Fibroblasten, Mikrogliazellen, Pigmentzellen der Retina, Fettzellen, Monozyten, Neutrophile) (Ajuwon und Spurlock, 2005; Bian et al., 2004; Huang et al., 2005a; Tang et al., 2007; Turner et al., 2007; Wrann et al., 2007; Xu et al., 2004; Yadav et al., 2006). Diese Studien und die vorliegende Arbeit unterstützen die Bedeutung von PI3K für einen möglichen Signaltransduktionsweg, der an der Regulation der Genexpression von IL-6 und IL-8 beteiligt ist.

Die Daten der vorliegenden Arbeit unterstreichen die Fähigkeit der Odontoblasten, auf pathogene Bakterien mit einer gesteigerten Genexpression für pro-inflammatorische Mediatoren zu reagieren und damit aktiv eine wichtige Rolle im Rahmen der lokalen Immunantwort in der Zahnpulpa zu übernehmen.

## 5. Zusammenfassung

Die Zahnpulpa ist ein durch die Zahnhartsubstanzen Schmelz und Dentin umgebenes Organ, welches somit gut vor dem Eindringen von Bakterien und deren Stoffwechselprodukte geschützt ist. Dennoch kann eine kariöse Infektion des Dentins zu Entzündungsreaktionen im Bereich der Zahnpulpa führen. Die Odontoblasten der Zahnpulpa repräsentieren die peripherste Zellschicht und sind somit die ersten Zellen, die potentiell mit bakteriellen Antigenen in Kontakt kommen können. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Rolle der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) während der durch *Streptococcus mutans* induzierten Genexpression von Interleukin (IL)-6 und IL-8 in Odontoblasten-ähnlichen Zellen zu untersuchen.

Kultivierte humane Odontoblasten-ähnliche Zellen (in Dulbecco's modified Eagle's Medium) wurden mit dem spezifischen Inhibitor LY294002 für die PI3K präinkubiert, bevor die Zellen mit hitzeinaktiviertem *S. mutans* für 6 bzw. 24 Stunden stimuliert wurden. Nach der Stimulation wurde die RNA aus den Zellen extrahiert und die cDNA-Synthese durchgeführt. Die Genexpressionsanalyse von  $\beta$ -Aktin, IL-6, IL-8 und Dentin-Sialophosphoprotein wurde mit Hilfe der Real-Time PCR durchgeführt. Zusätzlich wurde die Zellüberlebensrate (Trypan-Blue<sup>®</sup> Test) für alle Testgruppen bestimmt.

Die Genexpression von IL-6 und IL-8 war nach der 6- bzw. 24-stündigen Stimulation mit hitzeinaktivierten *S. mutans* signifikant erhöht ( $p=0,002$  bzw.  $p=0,018$ , und  $p<0,001$  bzw.  $p=0,043$ ). Nach 6 Stunden war die mRNA-Expression von IL-6 und IL-8 signifikant höher als nach 24-stündiger Stimulation ( $p=0,019$  bzw.  $p<0,001$ ). Die Vorbehandlung mit LY294002 blockierte die durch *S. mutans* induzierte Genexpression von IL-6 und IL-8 signifikant ( $p=0,002$  bzw.  $p<0,001$ ). Im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle konnten keine Unterschiede in der Zellvitalität für *S. mutans* stimulierte bzw. LY294002 vorbehandelte Zellen beobachtet werden.

Die vorliegende Untersuchung zeigte, dass die von *S. mutans* stimulierte Genexpression von IL-6 und IL-8 in Odontoblasten-ähnlichen Zellen über PI3K-abhängige intrazelluläre Signaltransduktionsmechanismen erfolgt. Die Daten deuten darauf hin, dass Odontoblasten auf kariogene Bakterien mit einer gesteigerten Genexpression pro-inflammatorischer Mediatoren reagieren und somit aktiv an der lokalen Immunantwort in der Zahnpulpa teilnehmen können.

## 6. Literaturverzeichnis

Ajuwon KM, Spurlock ME. Palmitate activates the NF-kappaB transcription factor and induces IL-6 and TNFalpha expression in 3T3-L1 adipocytes. *J Nutr.* 2005; 135: 1841-1846.

Akira S, Hirano T, Taga T, Kishimoto T. Biology of multifunctional cytokines: IL 6 and related molecules (IL 1 and TNF). *FASEB J.* 1990; 4: 2860-2867

Akira S, Taga T, Kishimoto T. Interleukin-6 in biology and medicine. *Adv. Immunol.* 1993; 54: 1-78

Akira S, Takeda K, Kaisho T. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat Immunol.* 2001; 2: 675-680

Bazan JF. Structural design and molecular evolution of a cytokine receptor superfamily. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1990; 87: 6934-6938

Bazan JF. Haemopoietic receptors and helical cytokines. *Immunol Today.* 1990; 11; 350-354

Begue-Kirn C, Krebsbach PH, Bartlett JD, Butler WT. Dentin sialoprotein, dentin phosphoprotein, enamelysin and ameloblastin: tooth-specific molecules that are distinctively expressed during murine dental differentiation. *Eur J Oral Sci.* 1998; 106: 963-970

Bian ZM, Elnar SG, Yoshida A, Elnar VM. Differential involvement of phosphoinositide 3-kinase/Akt in human RPE MCP-1 and IL-8 expression. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2004; 45: 1887-1896

Brosius F. SPSS 11. Mitp-Verlag. 2004

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

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

Chang J, Zhang C, Tani-Ishii N, Shi S, Wang CY. NF-kappaB activation in human dental pulp stem cells by TNF and LPS. *J Dent Res*. 2005; 84: 994-998

Chia JS, Lien HT, Hsueh PR, Chen PM, Sun A, Chen JY. Induction of cytokines by glucosyltransferases of *Streptococcus mutans*. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2002; 9: 892-897

Clarke JK. On the bacterial factor in the aetiology of dental caries. *Br J Exp Pathol*. 1924; 5: 141-147

Clogston CL, Boone TC, Crandall BC, Mendiaz EA, Lu HS. Disulfide structures of human interleukin-6 are similar to those of human granulocyte colony stimulating factor. *Arch Biochem Biophys*. 1989; 272: 144-151

Coil J, Tam E, Waterfield JD. Proinflammatory cytokine profiles in pulp fibroblasts stimulated with lipopolysaccharide and methyl mercaptan. *J Endod*. 2004; 30: 88-91

Coykendall AL. Classification and identification of the Viridans streptococci. *Clinical Microbiology Review*. 1989; 2: 315-328

Crupper SS, Iandolo JJ. Purification and partial characterization of a novel antibacterial agent (Bac1829) produced by *Staphylococcus aureus* KSI1829. *Appl Environ Microbiol*. 1996; 62: 3171-3175

Dommisch H, Chung WO, Rohani MG, Williams D, Rangarajan M, Curtis MA, Dale BA. Protease-activated receptor 2 mediates human beta-defensin 2 and CC chemokine ligand 20 mRNA expression in response to proteases secreted by *Porphyromonas gingivalis*. *Infect Immun*. 2007a; 75: 4326-4333

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

Dommisch H, Winter J, Willebrand C, Eberhard J, Jepsen S. Immune regulatory functions of human beta-defensin-2 in odontoblast-like cells. *Int Endod J*. 2007b; 40: 300-307

Donkersloot JA, Hoerman KC. Letter: *S. mutans* and caries. *J Am Dent Assoc*. 1974; 88: 466-467

Drucker DB, Melville JH. Fermentation end products of cariogenic and noncariogenic Streptococci. Arch Oral Biol. 1968; 13: 565-570

Dufhues G. Posttranslationale Modifikation von humanem IL-6: Charakterisierung der Kohlenhydrat-Seitenketten, ihre Lokalisation und Funktion. RWTH Aachen, Med. Dissertation. 1991

Engels-Deutsch M, Pini A, Yamashita Y, Shibata Y, Haikel Y, Schöller-Guinard M, Klein J-P. 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

Fitzgerald RJ, Keyes PH. Demonstration of the etiologic role of streptococci in experimental caries in the hamster. J Am Dent Assoc. 1960; 61: 9-18

Foster FM, Traer CJ, Abraham SM, Fry MJ. The phosphoinositide (PI) 3-kinase family. J Cell Sci. 2003; 116: 3037–3040.

Fry MJ. Structure, regulation and function of phosphoinositide 3-kinases. Biochim Biophys Acta. 1994; 1226

Fry MJ. Phosphoinositide 3-kinase signalling in breast cancer: how big a role might it play? Breast Cancer Res. 2001; 3: 304-312

Garberoglio R, Brännström M. Scanning electron microscopic investigation of human dentinal tubules. Arch Oral Biol. 1976; 21: 355-362.

Gibson UE, Heid CA, Williams PM. A novel method for real-time quantitative RT-PCR. Genome Res. 1996; 6: 995-1001

Gobert AP, Varielle M, Glasser AL, Hindre T, de Sablet T, Martin C. Shiga toxin produced by enterohemorrhagic Escherichia coli inhibits PI3K/NF-kappaB signaling pathway in globotriaosylceramide-3-negative human intestinal epithelial cells. J Immunol. 2007; 178: 8168-8174

Grégoire G, Terriè B. Identification of lymphocyte antigens in human dental pulps. J Oral Pathol Med. 1990; 19: 246-250

- Gross V, Andus T, Castell J, Vom Berg D, Heinrich PC, Gerok W. O- and N-glycosylation lead to different molecular mass forms of human monocyte interleukin-6. *FEBS Lett.* 1989; 247: 323-326
- Hahn CL, Best AM, Tew JG. Cytokine induction by *Streptococcus mutans* and pulpal pathogenesis. *Infect Immun.* 2000; 68: 6785-6789
- Hamada S, Slade HD. Biology, immunology and cariogenicity of *Streptococcus mutans*. *Microbiol Rev.* 1980; 44: 331-384
- Hamilton IR, Bowden GH. Oral microbiology. In: *Encyclopedia of Microbiology* Lederberg J (ed). Academic press, San Diego, CA. 2000; 466-480
- Harder J, Meyer-Hoffert U, Teran LM, Schwichtenberg L, Bartels J, Maune S, Schröder JM. Mucoid *Pseudomonas aeruginosa*, TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$ , but not IL-6 induce human  $\beta$ -defensin-2 in respiratory epithelia. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2000; 22: 714-721
- Harris GS, Michalek SM, Curtiss R III. Cloning of a locus involved in *Streptococcus mutans* intracellular polysaccharide accumulation and virulence testing of an intracellular polysaccharide-deficient mutant. *Infect Immun.* 1992; 60: 3175-3185
- Heinrich PC, Castell JV, Andus T. Interleukin-6 and the acute phase response. *Biochem J.* 1990; 265: 621-636
- Hellwig E, Klimek J, Attin T. *Einführung in die Zahnheilkunde*. München-Jena. Urban & Fischer-Verlag. 2003
- Higuchi R, Fockler C, Dollinger G, Watson R. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology.* 1993; 11: 1026-1030
- Hirano T, Kishimoto T. *Interleukin-6. Peptide Growth Factors and their Receptors*. Springer Verlag Berlin. 1990; 633-665
- Hoffmann JA, Kafatos FC, Janeway CA, Ezekowitz RA. Phylogenetic perspectives in innate immunity. *Science.* 1999; 284: 1313-1318
- Huang FC, Li Q, Cherayil BJ. A phosphatidylinositol-3-kinase-dependent anti-inflammatory pathway activated by *Salmonella* in epithelial cells. *FEMS Microbiol Lett.* 2005a; 243: 265-270

Huang FM, Chen YJ, Chou MY, Chang YC. Examination of the signal transduction pathways leading to upregulation of tissue type plasminogen activator by *Porphyromonas endodontalis* in human pulp cells. *Int Endod J.* 2005b; 38: 860-865

Huang FM, Tsai CH, Chen YJ, Chou MY, Chang YC. Examination of the signal transduction pathways leading to upregulation of tissue type plasminogen activator by interleukin-1alpha in human pulp cells. *J Endod.* 2006; 32: 30-33

Ibelgaufts H. Horst Ibelgaufts Cope: cytokines online pathfinder encyclopaedia. *Jl.* 2002; 0.014 ([www. copewithcytokines.de](http://www.copewithcytokines.de))

Izumi T, Kobayashi I, Okamura K, Sakai H. Immunohistochemical study on the immunocompetent cells of the pulp in human non-carious teeth. *Arch Oral Biol.* 1995; 40: 609-614

Janeway CA Jr. Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 1989; 54: 1-13

Jontell M, Okiji T, Dahlgren U, Bergenholtz G. Immune defense mechanisms of the dental pulp. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1998; 9: 179-200

Karjalainen S, Söderling E. Dentino-pulpal collagen and the incorporation of 3H-proline by sound and carious human teeth in vitro. *J Biol Buccale.* 1984; 12: 309-316.

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

Kemény M. Wirkungsmechanistische Untersuchungen zur Beeinflussung zellulärer Signalübertragungswege durch substituierte Pteridine. Universität Kaiserslautern, Med. Dissertation. 2002

Kishimoto T. The biology of interleukin-6. *Blood.* 1989; 74: 1-10

Kishimoto T, Akira S, Narazaki M, Taga T. Interleukin-6 family of cytokines and gp130. *Blood.* 1995; 86: 1243-1254

Kishimoto T, Taga T, Akira S. Cytokine signal transduction . *Cell.* 1994; 76: 253-262

Kumar V, Abbas AK, Fausto N, Mitchell M. Robins basic pathology. W.B. Saunders. Philadelphia, Pennsylvania, USA. 2007; 960

Lehmann J, Retz M, Harder J, Krams M, Kellner U, Hartmann J, Hohgräwe K, Raffenberg U, Gerber M, Loch T, Weichert-Jacobsen K, Stöckle M. Expression of human beta-defensins 1 and 2 in kidneys with chronic bacterial infection. *BMC Infectious Dis.* 2002; 18: 2-20

Levin LG, Rudd A, Bletsa A, Reisner H. Expression of IL-8 by cells of the odontoblast layer in vitro. *Eur J Oral Sci.* 1999; 107: 131-137

Lin SK, Kuo MY, Wang JS, Lee JJ, Wang CC, Huang S, Shun CT, Hong CY. Differential regulation of interleukin-6 and inducible cyclooxygenase gene expression by cytokines through prostaglandin-dependent and -independent mechanisms in human dental pulp fibroblasts. *J Endod.* 2002; 28: 197-201

Loesche WJ. Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. *Bacteriol. Rev.* 1986; 50: 353-380

MacDougall M, Simmons D, Luan X, Nydegger J, Feng J, Gu TT. 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

Mariathasan S, Monack DM. Inflammasome adaptors and sensors: intracellular regulators of infection and inflammation. *Nat Rev Immunol.* 2007; 7: 31-40

McLachlan JL, Sloan AJ, Smith AJ, Landini G, Cooper PR. S100 and cytokine expression in caries. *Infect Immun.* 2004; 72: 4102-4108

Medzhitov R. Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature.* 2007; 449: 819-826

Medzhitov R. Toll-like receptors and innate immunity. *Nat Rev Immunol.* 2001; 1: 135-145

Nakano K, Tsuji M, Nishimura K, Nomura R, Ooshima T. Contribution of cell-surface protein antigen Pac of *Streptococcus mutans* to bacteremia. *Microbes Infect.* 2006; 8: 114-121

Narayanan K, Gajjeraman 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

Nathan C. Points of control in inflammation. *Nature*. 2002; 420: 846-852

O'Neil DA, Porter EM, Elewaut D, Anderson GM, Eckmann L, Ganz T, Kagnoff MF. Expression and regulation of human beta-defensins hBD-1 and hBD-2 in intestinal epithelium. *J Immunol*. 1999; 163: 6718-6724

Ong PY, Ohtake T, Brandt C, Strickland I, Boguniewicz M, Ganz T, Gallo RL, Leung DY. Antimicrobial peptides and skin infections in atopic dermatitis. *N Engl J Med*. 2002; 347: 1151-1160

Qin C, Baba O, Butler WT. Post-translational modifications of sibling proteins and their roles in osteogenesis and dentinogenesis. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2004; 15: 126-136

Patel T, Park SH, Lin LM, Chiappelli F, Huang GT. Substance P induces interleukin-8 secretion from human dental pulp cells. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2003; 96: 478-485.

Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*. 2001; 29: 45

Poli V, Balena R, Fattori E, Markatos A, Yamamoto M, Tanaka H, Ciliberto G, Rodan GA, Constantini F. Interleukin-6 deficient mice are protected from bone loss caused by estrogen depletion. *EMBO J*. 1994; 13: 1189-1196

Russell MW, Lehner T. Characterization of antigens extracted from cells and culture fluids of *Streptococcus mutans* serotype C. *Arch Oral Biol*. 1978; 23: 7-15

Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Ehrlich HA. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*. 1988; 239: 487-491

Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Ehrlich HA, Arnheim N. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*. 1985; 230: 1350-1354

Sasaki T, Irie-Sasaki J, Horie Y, Bachmaier K, Fata JE, Li M, Suzuki A, Bouchard D, Ho A, Redston M, Gallinger S, Khokha R, Mak TW, Hawkins PT, Stephens L, Scherer SW, Tsao M, Penninger JM. Colorectal carcinomas in mice lacking the catalytic subunit of PI(3)Kgamma. *Nature*. 2000; 406: 897-902.

Scheid MP, Woodgett JR. PKB/Akt: Functional Insights from Genetic Models. *Nature Reviews Mol. Cell Biol.* 2001; 2: 760-768

Schröder JM, Christophers E. The biology of NAP-1/IL-8, a neutrophil-activating cytokine. *Immunol Ser.* 1992; 57: 387-416

Schroeder HE. *Orale Strukturbioogie.* Stuttgart-NewYork: Thieme Verlag. 1992

Segal BH, Leto TL, Gallin JI, Malech HL, Holland SM. Genetic, biochemical, and clinical features of chronic granulomatous disease. *Medicine.* 2000; 79: 170-200

Shaw JH. Causes and control of dental caries. *N Engl J Med.* 1987; 317: 996-1004

Shen S, Samarnayake LP, Yip HK. In-vitro growth, acidogenicity and cariogenicity of predominant human root caries flora. *J Dent.* 2004; 37: 667-678

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

Soell M, Holveck F, Scholler M, Wachsmann RD, Klein JP. Binding of *Streptococcus mutans* SR protein to human monocytes: production of tumor necrosis factor, interleukin 1, and interleukin 6. *Infect Immun.* 1994; 62: 1805-1812

Svensater S, Borgstrom M, Bowden GHW, Edwardsson S. The acid-tolerant microbionota associated with plaque from initial caries and healthy tooth surfaces. *Caries Res.* 2003; 37: 395-403

Takeda K, Kaisho T, Akira S. Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol.* 2003; 21: 335-376

Tamesada M, Kawabata S, Fujiwara T, Hamada S. Synergistic effects of streptococcal glucosyltransferases on adhesive biofilm formation. *J Dent Res.* 2003; 83: 874-879

Tang CH, Lu DY, Yang RS, Tsai HY, Kao MC, Fu WM, Chen YF. Leptin-induced IL-6 production is mediated by leptin receptor, insulin receptor substrate-1, phosphatidylinositol 3-kinase, Akt, NF- $\kappa$ B, and p300 pathway in microglia. *J Immunol.* 2007; 179: 1292-1302.

- Tanzer JM, Krichevsky MI, Keyes PH. The metabolic fate of glucose catabolized by a washed stationary phase caries-conductive *Streptococcus*. *Caries Res.* 1969; 3: 167-177
- Tanzer JM. Microbiology of dental caries. In: Spots and M. A. Taubman (eds), *Contemporary oral microbiology and immunology*. *J Clin Invest.* 1992; 84: 2017-2020
- 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
- Thaweboon B, Thaweboon S, Choonharuangdej S, Suppakpatana P. Effects of sonicated *Prevotella intermedia*, *Fusobacterium nucleatum* and *Lactobacillus casei* extracts on interleukin-8 production by human dental pulp cells. *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* 2006; 37: 523-527
- Tjäderhane L, Salo T, Larjava H, Larmas M, Overall CM. A novel organ culture method to study the function of human odontoblasts in vitro: gelatinase expression by odontoblasts is differentially regulated by TGF-beta1. *J Dent Res.* 1998; 77: 1486-1496
- Tokuda M, Miyamoto R, Sakuta T, Nagaoka S, Torii M. Substance P activates p38 mitogen-activated protein kinase to promote IL-6 induction in human dental pulp fibroblasts. *Connect Tissue Res.* 2005; 46: 153-158
- Tokuda M, Nagaoka S, Torii M. Interleukin-10 inhibits expression of interleukin-6 and -8 mRNA in human dental pulp cell cultures via nuclear factor-kappaB deactivation. *J Endod.* 2002; 28: 177-180
- Turner NA, Mughal RS, Warburton P, O'Regan DJ, Ball SG, Porter KE. Mechanism of TNF-alpha-induced IL-1alpha, IL-1beta and IL-6 expression in human cardiac fibroblasts: Effects of statins and thiazolidinediones. *Cardiovasc Res.* 2007; 76: 81-90
- Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy A, Speleman F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by genomic averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* 2002; 3: RESEARCH0034
- Van Snick J, Nordan RP. Interleukin-6. In: Habenicht A. ed. *Growth factors, differentiation factors and cytokines*. Springer Verlag Berlin. 1990

Veerayutthwilai O, Byers MR, Pham TT, Darveau RP, Dale BA. Differential regulation of immune responses by odontoblasts. *Oral Microbiol Immunol.* 2007; 22: 5-13

Vernier A, Diab M, Soell M, Haan-Archipoff G, Beretz A, Wachsmann D, Klein JP. Cytokine production by human epithelial and endothelial cells following exposure to oral viridians streptococci involves lectin interactions between bacteria and cell surface receptors. *Infect Immun.* 1996; 64: 3016-3022

Verres G, Gibbes RA, Scherer SE, Caskey CT. The molecular basis of the sparse for mouse mutation. *Science.* 1987; 237: 415-417

Wrann CD, Tabriz NA, Barkhausen T, Klos A, van Griensven M, Pape HC, Kendoff DO, Guo R, Ward PA, Krettek C, Riedemann NC. The phosphatidylinositol 3-kinase signaling pathway exerts protective effects during sepsis by controlling C5a-mediated activation of innate immune functions. *J Immunol.* 2007; 178: 5940-5948

Xu L, Pathak PS, Fukumura D. Hypoxia-induced activation of p38 mitogen-activated protein kinase and phosphatidylinositol 3'-kinase signaling pathways contributes to expression of interleukin 8 in human ovarian carcinoma cells. *Clin Cancer Res.* 2004; 10: 701-707

Yadav M, Clark L, Schorey JS. Macrophage's proinflammatory response to a mycobacterial infection is dependent on sphingosine kinase-mediated activation of phosphatidylinositol phospholipase C, protein kinase C, ERK1/2, and phosphatidylinositol 3-kinase. *J Immunol.* 2006; 176: 5494-5503

Yang LC, Tsai CH, Huang FM, Liu CM, Lai CC, Chang YC. Induction of interleukin-6 gene expression by pro-inflammatory cytokines and black-pigmented *Bacteroides* in human pulp cell cultures. *Int Endod J.* 2003; 36: 352-357

Yeh CY, Chen JY, Chia JS. Glucosyltransferases of viridians group streptococci modulate interleukin-6 and adhesion molecule expression in endothelial cells and augment monocytic cell adherence. *Infect Immun.* 2006; 74: 1273-1283

## 7. Danksagung

Herrn Prof. Dr. Dr. S. Jepsen, 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, der finanziellen Mittel zur Durchführung aller 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 möchte ich für die Unterstützung bei der Durchführung, Auswertung und Korrektur der Arbeit sowie für die finanziellen Mittel über das BONFOR-Förderprogramm danken.

Herrn Dr. J. Winter, Leiter des molekular- und zellbiologischen 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 Unterstützung bei der Durchführung der zell- und molekularbiologischen Experimente.

Frau M. Schulte, medizinisch-technische Assistentin der Universität Bonn, möchte ich für die Hilfe bei der praktischen Durchführung der zell- und molekularbiologischen Versuche danken.

Meinen Eltern gilt mein Dank für ihre liebevolle und finanzielle Unterstützung während der Zeit meines Studiums.