

**Unterschiedliche immunologische Reaktionen gingivaler und
dermaler Fibroblasten und ihre Bedeutung für die
Nickel-induzierte Hypersensibilität**

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

Elisa Vestewig
aus Lutherstadt Wittenberg

2018

Angefertigt mit der Genehmigung
der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. med. dent. Lina Gölz
2. Gutachter: Prof. Dr. med. dent. James Deschner

Tag der Mündlichen Prüfung: 04.05.2018

Aus der Poliklinik für Kieferorthopädie

Direktor: Prof. Dr. med. dent. Andreas Jäger

Inhaltsverzeichnis

1	Abkürzungsverzeichnis	5
2	Einleitung	8
2.1	Nickel in der Zahnmedizin	9
2.1.1	Nickel in der allgemeinen Zahnmedizin	9
2.1.2	Nickel in der Kieferorthopädie	10
2.2	Metabolismus und Verträglichkeit von Nickel	12
2.3	Nickel-induzierte Hypersensibilität.....	15
2.3.1	Prävalenz und klinische Symptome.....	15
2.3.2	Pathomechanismus.....	16
2.3.3	Allergie versus Toleranz.....	18
2.3.4	Nickel-induzierte Signaltransduktionswege	22
3	Ziele und Problemstellung	28
4	Material – Methoden.....	29
4.1	Verwendete Materialien / Materialienliste	29
4.2	Zellgewinnung.....	37
4.3	Kultur und Kryokonservierung der gingivalen und dermalen Fibroblasten	37
4.4	Charakterisierung der primären Zellen	39
4.4.1	RNA Isolation und cDNA Synthese	40
4.4.2	PCR	41
4.4.3	Agarose-Gelelektrophorese	43
4.5	Limulus Assay und Zytotoxizitätstest.....	43
4.5.1	Limulus Assay.....	43
4.5.2	XTT-Zytotoxizitätstest	45
4.6	Stimulationsexperimente	46
4.7	Genexpressionsanalyse	47
4.7.1	RNA-Isolation und cDNA Synthese	47
4.7.2	Quantitative Real-Time-PCR.....	48
4.8	Proteinanalyse	50

4.8.1	Enzyme-linked Immunosorbent Assays (ELISA)	50
4.8.2	Western Blot	53
4.9	Isolation und Migration dendritischer Zellen	59
4.9.1	Isolation plasmazytoider dendritischer Zellen	59
4.9.2	Migration-Assay	61
4.10	Statistische Auswertung	62
5	Ergebnisse	63
5.1	Ergebnisse des Zytotoxizitätstests	63
5.2	Immunantwort humaner gingivaler und dermaler Fibroblasten unter Nickelstimulation	65
5.2.1	Inflammatorische Immunantwort	65
5.2.2	Antiinflammatorische Immunantwort	68
5.2.3	Hypoxische Immunantwort	70
5.2.4	CCL20-Regulation	73
5.3	Induktion der plasmazytoiden dendritischen Zellmigration	75
6	Diskussion	76
6.1	Unterschiedliche Reaktionen humaner gingivaler und dermaler Fibroblasten unter Nickelstimulation	76
6.1.1	Inflammatorische Immunantwort	76
6.1.2	Antiinflammatorische Immunantwort	78
6.1.3	Hypoxische Immunantwort	79
6.1.4	CCL20 Regulation.....	80
6.2	Induktion der plasmazytoiden dendritischen Zellmigration	81
6.3	Klinische Schlussfolgerung und Ausblick	83
7	Zusammenfassung	86
8	Anhang	88
8.1	Literaturverzeichnis	88
9	Danksagung	110

1 Abkürzungsverzeichnis

ACD	Allergische Kontaktdermatitis
APZ	Antigen-präsentierende Zellen
BCA	Bicinchoninsäure
CCL20	Chemokin (C-C Motif) Ligand 20
CCR6	CC Chemokin Rezeptor Typ 6
CD	Unterscheidungsgruppen (Cluster of Differentiation)
CHS	Kontakthypersensibilität
CT	Crossing Points
DGZMK	Deutsche Gesellschaft für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMOG	Dimethyloxaloylglycine
DZ	Dendritische Zellen
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EU	Endotoxin-Unit
FBS	Fetal Bovine Serum
FIH	Asparaginy-Hydroxylase Factor inhibiting HIF
h	Stunde
HDF	Humane dermale Fibroblasten
HGF	Humane gingivale (mukosale) Fibroblasten
HIF-1 α	Hypoxie-induzierbare Faktor-1 α
HIF-1 β	Hypoxie-induzierbare Faktor-1 β
IFN- γ	Interferon-gamma
I κ B	Inhibitor of kappa B
I κ K	engl. Inhibitor of kappa B Kinase
IL	Interleukin
LD ₅₀	mittlere letale Dosis
LPS	Lipopolysaccharide
LZ	Langerhans Zellen

MALT	Mukosa-assoziiertes lymphoides Gewebe
MAP	engl. Mitogen-activated Protein
MHC-Moleküle	Haupthistokompatibilitätskomplex (Major Histocompatibility Complex) Moleküle
min	Minute
MyD88	engl. Myeloid differentiation primary response gene (88)
Ni ²⁺	Nickelionen
NK-Zellen	Natürliche Killer Zellen
NF-κB	Nukleärer Faktor (NF)-κB
OH	Hydroxylierung
PBMCs	mononukleäre Zellen des peripheren Blutes
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PDCs	plasmazytoide dendritische Zellen
PHD	Prolyl-Hydroxylase-Domain
P300	E1A binding protein p300, Transkriptionscoaktivator
RT-PCR	Real Time Polymerase-Kettenreaktion
s	Sekunde
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SIK	Serin/Threonin-Kinase
TBST	Tris-buffered saline mit Tween20
Teff	effektorische T-Zellen
TEMED	Tetramethylethylenediamine
TGF-β	engl. Transforming Growth Factor-β
Th-1-Lymphozyten	Typ-1-T-Helferzellen
Th-17-Lymphozyten	Typ-17-T-Helferzellen
TIR-Domäne	Toll/IL-1R-Domäne
TLR	Toll-like (ähnlicher) Rezeptor
TNF-α	Tumornekrosefaktor-α
TRAF 6	TNF receptor associated factor 6
Treg	regulatorische T-Zellen
T-Zellen/T-Lymphozyten	Thymus Zellen, Thymus Lymphozyten
Ub	Ubiquitinierung

VEGF	engl. Vascular Endothelial Growth Factor
VHL	Von-Hippel-Lindau
18S	18S ribosomal Housekeeping gene

2 Einleitung

Nickel, ein Übergangsmetall mit der Ordnungszahl 28, ist das 24-häufigste Element der Erdkruste. Hauptsächlich ist Nickel jedoch im Erdkern zu finden, unerreichbar für den Gebrauch. Nickel gelangt durch Vulkanausbrüche an die Erdoberfläche und ist in allen Böden, Meeresböden und im Meerwasser auffindbar (Stimola, 2007). Etwa 80 % des genutzten Nickels wird industriell zur Herstellung von Edelstahl oder anderen Legierungen zur Erhöhung der Korrosionsbeständigkeit und Härte dieser Metalle verwendet, sowie als Bestandteil von Nickel-Cadmium Akkumulatoren. In der Galvanisierung finden 10 % Verwendung, 5 % in diversen Gießereien und in Druckertinte (Cameron et al., 2011). Nickel ist ein allgegenwärtiges Metall und findet als Legierungsbestandteil in einer Vielzahl von Produkten Verwendung, wie z. B. im Gesundheits-, Transport- und Kommunikationswesen sowie im Haushalt und in Textilien. Ein Nickelkontakt ist also fast unvermeidbar und kann eine Nickel-induzierte Kontaktallergie bzw. Hypersensibilität, im allgemeinen Sprachgebrauch als Nickelallergie bezeichnet, auslösen. Über eine durch Nickel hervorgerufene Kontaktdermatitis wurde erstmals Ende des neunzehnten Jahrhunderts von Arbeitern der Nickelplattierung berichtet. Im Jahr 1925 wurde die Nickel-induzierte Kontaktdermatitis als allergische Reaktion definiert (Rahilly und Price, 2003). Dabei spielt der Lebensstil zur Entwicklung einer Sensibilisierung gegenüber Nickel eine wesentliche Rolle. Häufige Ursachen der Nickelsensibilisierung sind der Hautkontakt mit Nickellegierungen in Reißverschlüssen, Knöpfen, Mobiltelefonen, Münzen oder Modeschmuck, vor allem in Ohrringen (Brandão und Gontijo, 2012). In der industrialisierten Welt spielt die Nickel-induzierte Kontaktallergie als eine der häufigsten Kontaktallergien von Prävalenzen bis zu 30 % in Abhängigkeit vom Alter, Geschlecht und der Herkunft eine entscheidende Rolle (Rietschel et al., 2008; Simonsen et al., 2011). Mit einer Prävalenz von 4,5 bis 39 % ist die Nickelallergie auch ein häufiges Problem bei Kindern und Jugendlichen, insbesondere bei Mädchen (Fors et al., 2008; Kerosuo et al., 1996; Mattila et al., 2001).

Wie in epidemiologischen Studien gezeigt wurde, findet die Sensibilisierung gegenüber Nickel in der Regel als Folge eines langfristigen Kontakts der Haut, z. B. nach einem Haut-Piercing statt (Brandão et al., 2010; Dotterud und Smith-Sivertsen 2007). Trotz der hohen Prävalenz der nickel-induzierten Kontaktallergie auf der äußeren Haut werden allergische

Reaktionen auf zahnmedizinische nickelhaltige Apparaturen im Mundraum jedoch nur sehr selten beobachtet (Schuster et al., 2004; Volkmann 2007). Vielmehr deuten Studien daraufhin, dass eine kieferorthopädische Behandlung die Inzidenz einer Nickelallergie reduzieren könnte, besonders wenn dieser kein Ohrpiercing vorausgeht (Fors et al., 2008; Fors et al., 2012; Gölz et al., 2015; Van Hoogstraten et al., 1991). Grundlage dessen könnte die Induktion einer oralen Toleranz gegenüber Nickel (Hyposensibilisierung) sein. Dennoch bestehen Unsicherheiten bei der Verwendung zahnärztlicher nickelhaltiger Materialien auf Seiten der Behandler sowie Befürchtungen auf Seiten der Patienten. Gegenstand der vorliegenden Arbeit ist es daher zugrundeliegende Pathomechanismen der Nickel-induzierten Kontaktallergie und der oralen Toleranz näher zu betrachten.

2.1 Nickel in der Zahnmedizin

2.1.1 Nickel in der allgemeinen Zahnmedizin

In der allgemeinen Zahnmedizin finden Metalle hauptsächlich in Form von Legierungen (Dentallegierungen) für festsitzenden und herausnehmbaren Zahnersatz Verwendung. Dentallegierungen werden nach ihren Hauptbestandteilen in folgende Gruppen eingeteilt: Gold-, Palladium-, Silber-, Kobalt- und Nickellegierungen sowie Quecksilberlegierungen. Dabei dienen Quecksilberlegierungen als Füllungsmaterial (Deutsche Gesellschaft für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde, DGZMK, 1999). Gold und die 6 Elemente der Platingruppe (Ruthenium, Rhodium, Palladium, Osmium, Iridium, Platin) gehören zu den Edelmetalllegierungen und basieren in ihrer Zusammensetzung auf einem dieser Elemente. Nicht-Edelmetalllegierungen für festsitzenden Zahnersatz oder Modellgussprothesen können Legierungen aus Kobalt, Chrom, Molybdän, Wolfram, Silicium, Mangan, Eisen, Tantal, Stickstoff und Kohlenstoff sein (Lindigkeit, 2005). Laut der DGZMK sind die Korrosionsfestigkeiten von hochgoldhaltigen Legierungen, Reintitan und Kobalt-Chrom-Legierungen, welche hauptsächlich für festsitzenden oder herausnehmbaren Zahnersatz verwendet werden, vergleichbar.

Nickelhaltige Legierungen finden hingegen bei der Herstellung von provisorischem, herausnehmbarem Zahnersatz (z. B. als Halteelemente von Interimsprothesen) und Wurzelkanalaufbereitungsinstrumenten Anwendung. In der allgemeinen Zahnmedizin spielt demnach Nickel nur noch eine untergeordnete Rolle. Anders jedoch in der

Kieferorthopädie, hier finden nickelhaltige Apparaturen mit einem Nickelanteil von bis zu 55 % eine breite Anwendung (Behr 2003; Spalj et al., 2012).

2.1.2 Nickel in der Kieferorthopädie

Nickel ist aufgrund seiner Eigenschaften eines der am häufigsten verwendeten Metalle in der Kieferorthopädie. Als Bestandteil von Nickel-Titan- sowie Stahldrähten, Brackets, Bändern und Zug- bzw. Druckfedern rangiert der Nickelgehalt hier zwischen 7-55 % (Spalj et al., 2012). Neben der Funktionalität nickelhaltiger Materialien stehen heutzutage zunehmend die Verträglichkeit und Biokompatibilität im Fokus.

Die Biokompatibilität metallischer Werkstoffe ist abhängig von der Korrosionsbeständigkeit der vorhandenen Legierungen. Biokompatibilität ist die Fähigkeit eines Biomaterials seine erwünschte der medizinischen Therapie zugrunde gelegte Funktion auszuführen, ohne unerwünschte lokale oder systemische Effekte auf den Empfänger hervorzurufen und zugleich die vorteilhafteste Zell- oder Gewebereaktion zu generieren sowie den maßgeblichen klinischen Erfolg dieser Therapie zu optimieren (Williams, 2009).

Die Nickelionenfreisetzung in den Mundraum wird hierbei hauptsächlich durch die Korrosion der zahnärztlichen Werkstoffe bedingt. Diese ist wiederum abhängig von der Materialzusammensetzung, der Temperatur, dem pH-Wert der Umgebung, der Friktion, potentiellen Lötstellen, der Abrasion und der Belastung (Jia et al., 1999). Korrosion wird als die von der Oberfläche ausgehende teilweise oder totale Metallzerstörung zwischen einem Metall oder einer Legierung und seiner Umwelt, die durch unbeabsichtigte chemische, elektrochemische oder biochemische Prozesse verursacht wird und dessen Eigenschaften verändert, bezeichnet (DIN/ISO-Norm 10271, 2001; Schatt und Worch, 2003).

Intraorale korrosive Prozesse führen somit unvermeidlich zu einer Freisetzung von Nickelionen. Deshalb wird bei metallischen kieferorthopädischen Werkstoffen besonders auf das Korrosionsverhalten der verwendeten Legierungen geachtet. Die geringe Korrosion von rostfreiem Stahl ist auf das Zulegieren von Chrom zurückzuführen, welches unter Sauerstoff eine Passivschicht an der Oberfläche bildet, sowie von Nickel und Molybdän, welche die Korrosionsfestigkeit gegenüber Säuren erhöhen (Chrom 16-19 %, Nickel 7-15 %, Molybdän 2-2,5 %, Mangan, Silizium, Rest Eisen). Jedoch ist die

Korrosionsbeständigkeit von Chrom-Kobalt-Legierungen (Kobalt 40-45 %, Chrom 18-20 %, Nickel 15-22 %, Eisen 5-17 %) deutlich höher als die der Stahldrähte. Auch Nickel-Titan-Legierungen haben eine gute Bioverträglichkeit, aufgrund des hohen Titangehalts (Nickel 55 %, Titan 45 %), der zu einer Passivierung der Oberfläche führt und eine Korrosion des Nickels weitgehend verhindert. Titan gehört zu den bioverträglichsten und korrosionsfestesten Werkstoffen in der Kieferorthopädie (Titan Molybdän Alloy (TMA), Nickel-Titan (NiTi) sowie Reintitan (Brackets und Bögen)) und Zahnmedizin (Implantate) (Schopf, 2000).

Studien der letzten Jahre haben das Ausmaß dieser Nickelionenfreisetzung in vitro und in vivo näher untersucht. Dabei wurden erhöhte Nickelkonzentrationen im Speichel von Patienten mit festsitzenden kieferorthopädischen Apparaturen (Abb. 1) detektiert (Eliades und Bourauel, 2005; Mikulewicz und Chojnacka, 2010; Mikulewicz und Chojnacka, 2011).

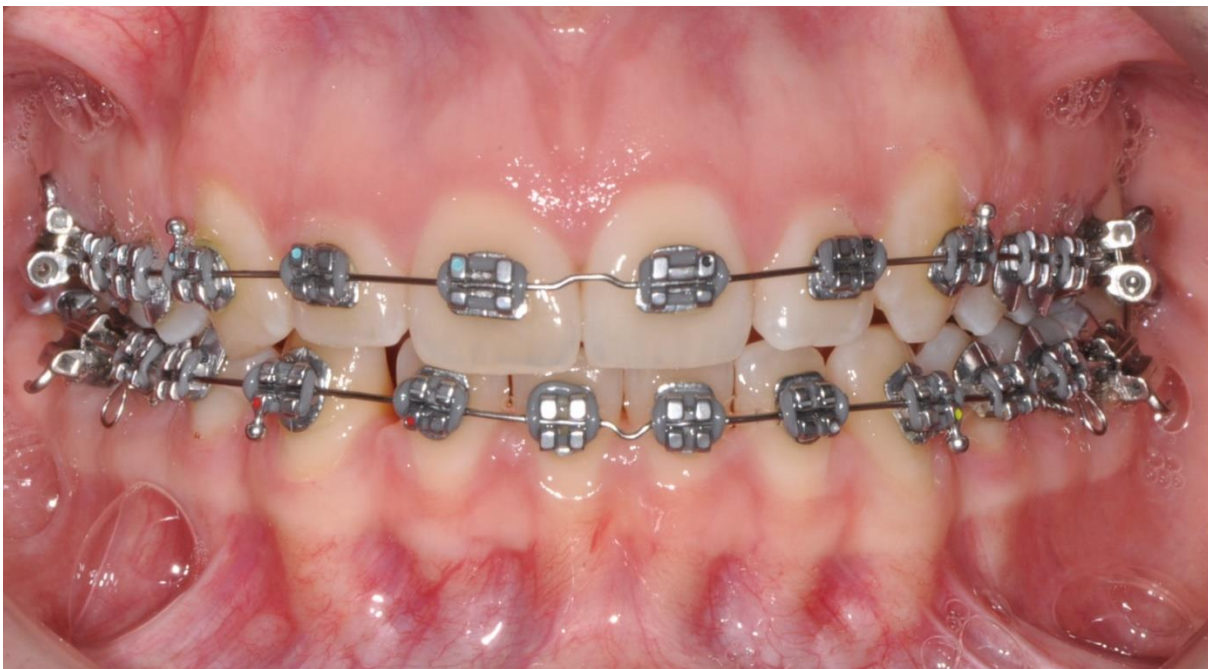


Abb. 1: Festsitzende kieferorthopädische Apparatur im Ober- und Unterkiefer, mit Einverständnis des Patienten von der Poliklinik für Kieferorthopädie des Universitätsklinikums Bonn zur Verfügung gestelltes Behandlungsfoto

Bei der Verwendung von festsitzenden kieferorthopädischen Apparaturen konnte gezeigt werden, dass der Nickelgehalt im Speichel signifikant ansteigt und dass zwischen 22 bis 40 μg Nickel pro Tag (Barrett et al., 1993; Kerosuo et al., 1995; Park und Shearer, 1983) freigesetzt werden. Senkutvan et al. zeigten hingegen, dass die Nickelfreisetzung von

unbehandelten Nickel-Titan-Drähten $0,93 \pm 0,04 \mu\text{g}$, Stahldrähten $0,66 \pm 0,02 \mu\text{g}$, ionenbeschichteten Nickel-Titan-Drähten $0,67 \pm 0,02 \mu\text{g}$ und kupferbeschichteten Nickel-Titan-Drähten $0,77 \pm 0,05 \mu\text{g}$ durchschnittlich pro Tag betrug (Senkutvan et al., 2014). Eine andere in vitro Studie untersuchte die Nickelkonzentration im Speichel nach der Insertion von selbstligierenden Brackets, Molarenbändern und Nickel-Titan-Bögen. Dabei zeichnete sich eine signifikant erhöhte Nickelkonzentration (4-fach) im Speichel der Patienten nach Bracketinsertion und dem Bogenwechsel im Vergleich zur Ausgangskonzentration ($21,85 \mu\text{g/l}$) ab, welche nach 4 Wochen wieder auf dem Kontrollniveau lag. Die messbaren Nickelkonzentrationen lagen jedoch in mehreren Studien weit unter der durch die Nahrung zugeführten Nickelkonzentration ($8\text{-}760 \mu\text{g/Person/Tag}$) (Gölz et al., 2016; Umweltbundesamt, 2001; Luft et al., 2009; Noël et al., 2003). Dennoch werden in der Literatur verschiedene Nebenwirkungen bedingt durch die Nickelionenfreisetzung diskutiert (Spalj et al., 2012).

2.2 Metabolismus und Verträglichkeit von Nickel

Nickel wird als essentielles Spurenelement mit einer Blutplasmakonzentration von 46 bis 53 nmol/l und einer Gesamtmenge im Körper von 5 mg diskutiert (Kappert und Fitjer, 2002). Laut dem Umweltbundesamt werden üblicherweise 300-500 μg Nickel pro Tag mit der Nahrung aufgenommen, dabei beträgt der Grenzwert für einen Liter Trinkwasser 0,02 mg Nickel, was 10 % der täglich über die Nahrung zugeführten Nickelmenge entspricht (Umweltbundesamt, 2001). Besonders nickelhaltige Nahrungsmittel mit einer Nickelkonzentration von 1-13 $\mu\text{g/g}$ sind: Hafer, Mais, Sojabohnen, Sojamehl, Bohnen, Kakaobohnen, Schokolade und Tee. Der Nickelgehalt von Lebensmitteln wird außerdem beeinflusst durch deren Weiterverarbeitung in z. B. nickelhaltigen Kochgeschirr oder deren Konservierung in nickelhaltigen Dosen. Lebensmittel mit einem geringen Nickelgehalt von unter 1 $\mu\text{g/g}$ sind: Fleisch, Milchprodukte, Eier, Brot, Kartoffeln und Öl (Bunselmeyer et al., 1998; Flyvholm et al., 1984; Pfannhauser, 1988; Veien und Andersen, 1986). Die gastrointestinale Resorptionsrate nickelhaltiger Nahrungsmittel liegt bei unter 15 % (WHO-ICPS, 1991). Der Großteil des aufgenommenen Nickels wird demnach ausgeschieden. Nach Horak und Sundermann beträgt die fäkale Ausscheidung

260 µg/Tag und die Ausscheidung über den Urin 1-10 µg/l (Horak und Sundermann, 1973).

Allerdings werden auch mögliche Nebenwirkungen diskutiert. Anke et al. geben eine Nickelaufnahme von 600-1000 µg Nickel pro Tag als gesundheitsgefährdend an (Anke et al., 2000). Während der zytotoxische Schwellenwert von elementarem Nickel nach Strietzel et al. mit 300 µg pro Tag angegeben wird (Strietzel, 1998). Die Nickeltoxizität beim Menschen wird demnach beeinflusst durch die Art, Dosis und Dauer der Exposition sowie die Löslichkeit der Nickelverbindung. Lunge und Haut sind die Organe mit der höchsten humanen Nিকেexposition (Cameron et al., 2011). Die Nickelkonzentration der Luft kann zudem hohe Werte in der nickelverarbeitenden Industrie erreichen. In europäischen Industriegebieten lagen diese im Mittel bei 50 ng/m³ (Pasanen et al., 2012). Die Nickelkonzentrationen der Luft sind somit abhängig von der Verbrennung fossiler Brennstoffe und in Ballungsräumen und Industriegebieten höher als auf dem Land. Dabei wurden 1998 in der Luft über der Nordsee 0,03 ng Nickel/m³, in ländlichen Regionen 0,6 - 1,7 ng Nickel/m³ und 2,3 - 12,1 ng Nickel/m³ in der Rhein-Ruhr Region gemessen (Fishbein, 1987; UBA, 2000; LUA NRW, 1999).

Außerdem befindet sich Nickel im Zigarettenrauch. Raucher nehmen demnach pro Packung Zigaretten 4 µg Nickel auf. Die inhalative Nickelaufnahme in der Stadt beträgt zwischen 0,2 und 1 µg Nickel pro Tag (Caruso et al., 2014; Grandjean, 1984). Die inhalative Nিকেexposition, abhängig von der Partikelgröße, wird mit pulmonaler Inflammation, epithelialer Hyperplasie, Fibrose, Asthma und Lungenkrebs in Verbindung gebracht. Die primär durch Nickel geschädigten Organe sind Lunge und Nieren. Andere Organe wie Leber, Milz, Herz und Hoden können in einem geringeren Ausmaß beeinträchtigt werden. Nickelstaub und -aerosol in Form von Nickelmetall, Nickelsulfid, Nickeloxid und Nickelkarbonat haben nach der inhalativen Aufnahme eine humankanzerogene Wirkung und verursachen irreversible DNA-Schäden (Goodman et al., 2011; Lü et al., 2010; Pietruska et al., 2011). In Deutschland beträgt der Grenzwert für Nickel und schwerlösliche Nickelverbindungen am Arbeitsplatz 500 µg/m³ Nickel in der Luft. Wenn Nickel in Form von atembaren Tröpfchen vorliegt, beträgt der Grenzwert 50 µg/m³. Außerdem gibt die WHO für eine Nickelkonzentration in der Luft von 1 µg/m³ ein zusätzliches Krebsrisiko von 4×10^{-4} an (Kommission HBM-UBA, 2001; WHO-ICPS, 1991).

Am häufigsten treten jedoch allergische Reaktionen durch den Kontakt mit Nickel auf (Cameron et al., 2011). Es wurde gezeigt, dass die Schwelle zur Entwicklung einer Nickel-induzierten Kontaktdermatitis 10-1000 fach höher ist im Vergleich zu einer bereits stattgefundenen Sensibilisierung (Menné, 1994). Die Nickelkonzentrationen bei Menschen, die bereits mit Nickel in Kontakt kamen, betragen im Schweiß 0,1-1 mM, Speichel 10 nM bis 1 μ M und Blut 1 μ M (Eliades et al., 2003; Lidén et al., 2008; Petoumenou et al., 2009). Bando et al. haben außerdem im Mausmodell gezeigt, dass diese Nickelkonzentrationen in Verbindung mit Kunststoffmonomeren (Methyl-Methacrylate oder 2-Hydroxyethyl-Methacrylate) ausreichend sind, um eine Sensibilisierung gegenüber Nickel auszulösen. Kunststoffmonomere könnten also die Entstehung einer Nickel-induzierten allergischen Kontaktdermatitis begünstigen. Dabei könnte eine Sensibilisierung durch Nickel oder eine allergische Reaktion bei Nickelallergikern in Verbindung mit Kunststoffmonomeren schon bei geringeren Nickelkonzentrationen ausgelöst werden. Zur Sensibilisierung gegenüber Nickel haben 10 mM Nickelchlorid ausgereicht. In Verbindung mit 1 % Monomeren konnte bereits bei einer Konzentration von 5 μ M - 50 μ M eine Sensibilisierung beobachtet werden. Bei einer bereits stattgefundenen Sensibilisierung löste eine Nickelchlorid-Konzentration von 10 μ M eine allergische Reaktion aus. In Verbindung mit 1 % Monomeren geschah dies bei einer Konzentration von 10 nM-100 nM (Bando et al., 2014).

Im Gegensatz dazu zeigten Fors et al., dass eine juvenile Nickelexposition z. B. durch Zahnsparren die Inzidenz einer Kontaktdermatitis senkten (Fors et al., 2008; Fors et al., 2012). Eine aktuelle systematische Literaturrecherche inklusive einer Meta-Analyse konnte die Arbeiten bestätigen, wonach eine kieferorthopädische Behandlung mit nickelhaltigen Apparaturen die Häufigkeit einer Nickel-induzierten Kontaktallergie reduzieren kann insbesondere dann, wenn die Therapie vor der Sensibilisierung z. B. durch Piercings stattfindet (Gölz et al., 2015). Es wird hierbei davon ausgegangen, dass die frühzeitige orale Antigenaufnahme eine systemische Immuntoleranz induziert. In Tierversuchen wurden bereits ähnliche Ergebnisse beobachtet. Hier führte die orale Gabe von Nickel in Meerschweinchen zur Induktion einer oralen Immuntoleranz, die abhängig von der Dauer, Frequenz und Dosis der spezifischen Antigenexposition sowie von Thymus Lymphozyten (T-Zellen) war (Van Hoogstraten et al., 1991).

Aktuelle klinische Studien unterstützen diesen Ansatz (Di Gioacchino et al., 2014; Schivano et al., 2006; Tamaro et al., 2009).

2.3 Nickel-induzierte Hypersensibilität

2.3.1 Prävalenz und klinische Symptome

Die Nickel-induzierte Hypersensibilität, als häufigste allergische Kontaktdermatitis (ACD) der westlichen Zivilisation, wird verursacht durch eine adaptive Immunreaktion gegen meist niedermolekulare Substanzen, die als Haptene bezeichnet werden. Per Definition verursacht erst eine Bindung des Haptens mit körpereigenen Proteinen einen vollständigen Antigenkomplex und damit eine mögliche allergische Reaktion. In Abhängigkeit von demographischen und geographischen Gegebenheiten liegt die Inzidenz der Nickel-induzierten Hypersensibilität zwischen 3-39 % (Ahlström et al., 2017; Cheng et al., 2008; Dotterud und Falk, 1994; Dotterud und Smith-Siversten, 2007; Edman und Möller, 1982; Fors et al., 2008; Kerosuo et al., 1996; Mattila et al., 2001; White et al., 2007). Dabei zeigen Frauen im Vergleich zu Männern eine 2-10-fach so häufige Prävalenz (Ahlström et al.; 2017; Moritz et al., 1999).

Wie in epidemiologischen Studien gezeigt wurde, findet die Sensibilisierung gegenüber Nickel in der Regel als Folge eines langfristigen Kontakts der Haut, z. B. nach einem Haut-Piercing statt (Brandão et al., 2010; Dotterud und Smith-Siversten, 2007). Da besonders in der Kieferorthopädie, wie bereits beschrieben, der Anteil nickelhaltiger Materialien sehr hoch ist, ist zu hinterfragen, inwieweit dieser Haut- oder Schleimhautkontakt die Prävalenz beeinflusst. Allgemein wird die Häufigkeit von Nickelreaktionen bei zahnärztlichen Patienten auf etwa 1:100 geschätzt. Zudem existieren Berichte darüber, dass es z. B. nach dem Einsetzen kieferorthopädischer Apparaturen gelegentlich zur Entstehung von Ausschlägen, Schwellungen und schmerzhaften erythematischen Läsionen der Mund- und Lippen Schleimhaut kam (Ehrnrooth und Kerosuo, 2009; Kolokitha und Chatzistavrou, 2009; Noble et al., 2008; Schuster et al., 2004). Genauere Untersuchungen ergaben jedoch, dass Hautreaktionen in den meisten Fällen Metallteilen extraoraler Apparaturen zugeschrieben werden konnten, und dass solche Reaktionen 6-fach häufiger als intraorale Reaktionen auftraten (Jacobsen und Hensten-Pettersen, 1989; Kappert und Fitjer, 2002).

Allergische Reaktion im Mundraum im Rahmen einer orthodontischen Behandlung werden nur sehr selten beobachtet (Schuster et al., 2004; Volkmann 2007). Es deuten verschiedenste Arbeiten darauf hin, dass der Einsatz nickelhaltiger Apparaturen während der kieferorthopädischen Behandlung sogar eine Hyposensibilisierung begünstigen könnte. Von besonderem Interesse sind hierbei Studien, die zeigen konnten, dass Jugendliche, die vor dem Tragen von Ohrpiercings nickelhaltige kieferorthopädische Apparaturen getragen hatten, später eine teilweise signifikant niedrigere Inzidenz der Nickelallergie aufwiesen als solche, die keine Zahnspangen oder Zahnspangen erst nach dem Ohrpiercing trugen (Fors et al., 2012; Jensen et al., 2002; Kerosuo et al., 1996). Kieferorthopädische Behandlungen scheinen also eine protektive Rolle gegenüber der Entwicklung einer Nickel-induzierten Hypersensibilität einzunehmen, besonders wenn diese einem (Ohr-)Piercing vorausgehen (Gölz et al., 2015). Die zugrundeliegenden Mechanismen sind jedoch noch weitestgehend unklar.

2.3.2 Pathomechanismus

Die Kontakthypersensibilität (CHS) gegenüber Nickel ist typischerweise eine Hypersensibilitätsreaktion vom verzögerten Typ (Typ IV), welche aufgrund ihrer molekularbiologischen Mechanismen in zwei Phasen eingeteilt werden kann: die Sensibilisierungs- und die Auslösungs- bzw. Effektorphase. Für eine Sensibilisierung sind der längere Kontakt, die Fläche und die Integrität der berührten Haut entscheidend. Die Hapten-Konzentration am Ort des Kontaktes und die Anwesenheit eines Irritantes sind einflussnehmende Faktoren bei der Sensibilisierung (Fisher, 1977; Menné, 1994; Saito et al., 2015).

Während der Sensibilisierungsphase durchdringen die hochreaktiven kleinen Haptene, bedingt durch ihren lipophilen Charakter, die Haut. Dort können sie dann mit einer großen Anzahl von körpereigenen extrazellulären und zellmembran-assoziierten Proteinen reagieren und bilden Protein-Hapten-Komplexe, welche zu Hapten-Peptid-Komplexen prozessiert werden können (Aiba et al., 1997; Divkovic et al., 2005). Nach der Bindung dieser Komplexe an MHC-Moleküle werden sie von T-Zellen als körperfremde Antigene erkannt. Während der Sensibilisierungsphase nehmen die dendritischen Zellen (DZs) der Haut, insbesondere Langerhans Zellen (LZs) und dermale DZs, diese Antigene auf und prozessieren sie (Aiba et al., 1997; Arrighi et al., 2001; Grabbe und Schwarz, 1998; Kalish

et al., 1994; Vollmer et al., 1999). Daraufhin wandern die DZs in die regionalen Lymphknoten, wo sie für die Aktivierung der T-Zellen verantwortlich sind (Priming) und die Differenzierung Hapten-spezifischer „skin-homing“ effektorischer T-Zellen (Teff-Zellen wie Th1- und Th17-Zellen) bzw. T-Gedächtniszellen induzieren. Bei erneutem Hautkontakt mit der betreffenden Substanz (Auslösungs- bzw Effektorphase) erkennen die auf das Antigen „geprimten“ Teff-Zellen dieses und setzen daraufhin Zytokine frei, welche wiederum zur Freisetzung von Zytokinen und Chemokinen durch Keratinozyten führen und zur Wanderung von Monozyten zur Läsion sowie deren Reifung zu aktivierten Gewebemakrophagen. Folglich induziert dies die typische allergisch-inflammatorische Reaktion der Kontaktdermatitis, wobei u.a. Teff-Zellen Hapten-bindende Keratinozyten abtöten und eine lokale Entzündungsreaktion initiieren (Kehren et al., 1999; Traidl et al., 2000). An der Initiierung und Amplifikation der Immunreaktion sind neben den ortsständigen Zellen, wie Keratinozyten, auch Mastzellen, DZs, T-Zellen, Endothelzellen und weitere Zellen der angeborenen Abwehr wie natürliche Killerzellen beteiligt (Albanesi et al., 2005; Biedermann et al., 2000; O`Leary et al., 2006).

In neueren Studien von Pennino et al. und He et al. wird davon ausgegangen, dass die Th17-Zellen als Subpopulation der T-Lymphozyten eine zentrale Rolle während der Auslösungsphase der ACD einnehmen (He et al., 2006; Pennino et al., 2010). Dabei ist zu erwähnen, dass die Th17-Zellen auch mit Autoimmunerkrankungen, wie der atopischen Dermatitis und Psoriasis in Verbindung gebracht werden (Eyerich et al., 2009; Ma et al., 2008; Zheng et al., 2007). Die Regulation und Kontrolle der Differenzierung der T-Lymphozyten zu reifen Th17-Zellen scheinen die DZs zu übernehmen. In der Studie von Pennino et al. wurde außerdem gezeigt, dass es zu einer Potenzierung der allergischen Reaktion durch das durch die Th17-Zellen sezernierte Interleukin (IL)-17 kommt, welches wiederum die T-Zell-vermittelte Abtötung der Keratinozyten induziert (Pennino et al., 2010). Die Ergebnisse muriner Studien bekräftigen diese Daten, wonach die Neutralisation von IL-17 die Auslösungsphase der CHS hemmte (Nakae et al., 2002). Yamazaki et al. wiesen nach, dass CCR6 positive Th17 Zellen durch die CCL20 Expression, die Migration von Th17 und regulatorischen T-Zellen (Treg) in vitro fördern. Ein Fehlen von CCR6 in Th17 reduzierte die Th17 und die Treg Rekrutierung in inflammatorisches Gewebe (Yamazaki et al., 2008). Weitere Studien zeigten auf, dass CCL20 durch verschiedene proinflammatorische Stimuli induziert werden kann und auch

beeinflussende Effekte auf inflammatorische Erkrankungen wie Psoriasis hat. CCL20 ein Signalprotein, welches primär von Keratinozyten und Fibroblasten gebildet wird und CCR6-positive immature DZs und T-Zellen anlockt, kann z. B. durch die proinflammatorischen Zytokine IL-1 und Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) oder Hypoxie induziert werden (Blengio et al., 2013; Homey et al., 2000; Le Borgne et al., 2006; Paradis et al., 2008; Spiekstra et al., 2005; Varona et al., 2005). Inflammatorische und hypoxische Prozesse sowie lokale Gewebszellen wie Keratinozyten und Fibroblasten unterstützen somit die Rekrutierung von DZs und T-Zellen, was wiederum zu einer Triggerung der allergischen Reaktion führen könnte. Genetische Studien bestätigen diese Ergebnisse, wonach Mutationen in T-Zell-Rezeptoren oder in Proteinen, die in den Verhornungsprozess der Haut involviert sind (Filaggrin-Gen), zu einer Prädisposition der Nickel-induzierten ACD führen (Thyssen et al., 2010; Yin et al., 2012).

Interessanterweise deuten Studien daraufhin, dass ein stetiger Nickelkontakt über die Mundschleimhaut im Rahmen einer kieferorthopädischen Behandlung selten eine Nickel-induzierte ACD zur Folge hat (Fors et al., 2012; Jensen et al., 2002; Kerosuo et al., 1996). Hier wird davon ausgegangen, dass protolerogene Eigenschaften von oralen DZs die Induktion von Treg-Zellen und damit die Entstehung einer Toleranz begünstigen (Allam et al., 2003a; Allam et al., 2003b; Allam et al., 2004; Allam et al., 2006; Allam et al., 2008a; Allam et al., 2008b; Novak et al., 2010). Unklar ist jedoch, welche Rolle lokale Gewebszellen bei der Entstehung einer Allergie oder einer Toleranz spielen.

2.3.3 Allergie versus Toleranz

Die Mundschleimhaut, besiedelt von mehr als 500 verschiedenen kommensalen und pathogenen Mikroorganismen und ihr stetiger Kontakt mit Antigenen aus der Nahrung, scheint durch ein fein abgestimmtes immunologisches Netzwerk tolerogener Mechanismen kontrolliert zu werden (Lü und Jacobson, 2007; Novak et al., 2008; Paster et al., 2001). Als Bestandteil des Gastrointestinaltraktes gehört sie mit der Lamina propria mucosae, dem Stroma der exokrinen Drüsen und dem Schleimhautepithel zu den immunologischen Effektorregionen (Brandtzaeg und Pabst, 2004). Dem gegenüber stehen die immunologischen Induktionsregionen des Mukosa-assoziierten lymphoiden Gewebes (MALT), welches Ähnlichkeiten mit Lymphknotengewebe durch seine T-Zell-Regionen, B-Zell-Follikel, verschiedene Populationen an Antigen-präsentierenden-Zellen

(APZ) und DZs aufzeigt. Da die Mundschleimhaut jedoch frei von MALT-Strukturen ist, ist davon auszugehen, dass immunologische Mechanismen zur Toleranzinduktion und -regulation in den Effektorregionen ablaufen, wobei die DZs bedeutend zum tolerogenen Potential der Mundschleimhaut beitragen (Allam et al., 2003a; Allam et al., 2003b; Allam et al., 2004; Allam et al., 2006; Allam et al., 2008a; Allam et al., 2008b).

DZs, die sich in allen Körperorganen, im Blut und im Knochenmark befinden, spielen bei der innate und der adaptiven Immunantwort eine zentrale Rolle. Sie sind verantwortlich für die Antigen-Prozessierung und -Präsentation gegenüber T-Zellen. DZs können abhängig von ihrem Reifegrad durch fehlende kostimulatorische Signale einerseits oder durch koinhibitorische Signale andererseits eine T-Zellenergie vermitteln oder durch koinhibitorische Signale eine T-Zelldeletion durch Apoptose induzieren (Chehade und Mayer, 2005; Sun et al., 2007). Sie tragen außerdem zur Induktion von regulatorischen T-Zellen bei.

Die menschliche Haut weist zwei verschiedene Arten von DZs auf, die durch verschiedene Zelloberflächenmarker unterschieden werden können. Zum einen die LZs, mit typischer Birbeck Granula und geringen CD11b Expressionen und zum anderen die dermalen DZs, ohne Birbeck Granula aber mit hohen CD11b Expressionen. Als Reaktion auf lokale Stimuli, wie z. B. Toxine sowie bakterielle und virale Produkte, wandern diese zur Induktion des Primings und der Differenzierung von naiven T-Zellen in die lokalen Lymphknoten. Laut Studien an knock-in-Mäusen scheinen jedoch dermale DZs eine größere Rolle bei der Hautreaktion auf Haptene zu spielen, bedingt durch ihre Migrationsgeschwindigkeit (Bennett et al., 2005; Kaplan et al., 2005; Kissenpfennig et al., 2005). Dies demonstrierte Streilein bereits 1989 mit der Exzision der kompletten Hapten-beladenen Haut und der daraus resultierenden Unterbindung einer CHS. Nach der isolierten Entfernung der LZs war dies nicht möglich (z.B. durch Corticosteroide) (Streilein, 1989). Nach Grabbe et al. waren die LZs auch nicht unbedingt notwendig für die Hapten-spezifische Aktivierung der T-Zellen in der Effektorphase der CHS (Grabbe et al., 1995). Ob diese murinen Erkenntnisse allerdings auf den Menschen übertragbar sind, ist derzeit noch nicht geklärt.

Allam et al. zeigten jedoch auf, dass orale DZs ausschließlich zur Linie der LZs gehören und einen immaturren/semi-maturren Phänotyp besitzen. Sie werden durch das orale Mikromilieu entscheidend beeinflusst und besitzen tolerogene Eigenschaften, welche

somit zur Aufrechterhaltung der lokalen Immunostase beitragen. Dermale DZs besitzen hingegen proallergene Eigenschaften (Allam et al., 2003a; Allam et al., 2003b; Allam et al., 2004; Allam et al., 2006; Allam et al., 2008a; Allam et al., 2008b; Novak et al., 2010). Obwohl orale DZs zur Gruppe der LZs gehören, konnten entscheidende Unterschiede zu klassischen LZs der Epidermis dargestellt werden, die für die Toleranzinduktion wichtig sind (Lutz und Schuler, 2002; Weiner et al., 2011). Deutlich wird dies auch durch den Nachweis des Lipopolysaccharid (LPS)-Rezeptor/CD14 auf oralen DZs, welcher zusammen mit dem Toll-like Rezeptor (TLR)4 und MD2 einen innaten Immunrezeptorenkomplex abbildet. Typischerweise führt dessen Aktivierung zu einer proinflammatorischen proallergenen Reaktion mit der Expression von IL-1, TNF- α und IL-18, gefolgt von der Aktivierung von Teff-Zellen, die ihrerseits lokale inflammatorische aber auch apoptotische Prozesse der Keratinozyten induzieren (Gibbs et al., 2018; He et al., 2006; Pearce et al., 2005). Aktuelle Studien zeigen, dass der TLR4 Rezeptor eine zentrale Rolle bei der Nickel-induzierten CHS spielt (Rachmawati et al., 2013; Schmidt et al., 2010). Bakterielle Bestandteile aus der Standortflora der Mundschleimhaut scheinen jedoch den Phänotyp und die Funktion von oralen DZs maßgeblich zu beeinflussen und eine Hochregulation von anti-inflammatorischen Mediatoren wie IL-10 und dem transformierenden Wachstumsfaktor (Transforming growth factor (TGF- β)) nach der Aktivierung des TLR4 zu begünstigen (Allam et al., 2003a; Allam et al., 2003b; Allam et al., 2004; Allam et al., 2006; Allam et al., 2008a; Allam et al., 2008b). Allam et al. zeigten außerdem, dass eine Aktivierung des TLR4 auf oralen DZs wiederum zur Induktion von Treg-Zellen führt und somit an der physiologischen Toleranzinduktion in vivo maßgeblich beteiligt ist. Dabei sezernieren Treg-Zellen hauptsächlich IL-10 anstatt Interferon-gamma (IFN- γ) und IL-4 und blockieren so die Immunantwort auf Haptene durch Hemmung der Antigen-präsentierenden Funktion und der Sekretion von IL-12 durch die DZs (Roncarolo, 2006).

Bei Nichtallergikern sind Treg-Zellen für die Hemmung der inflammatorischen Immunantwort verantwortlich (Luckey et al., 2012). In Bezug zur Nickel-induzierten CHS wurden IL-10 produzierende Nickel-spezifische Treg-Zellen vermehrt im peripheren Blut von Nicht-Allergikern nachgewiesen, was wiederum auf die zentrale Rolle der Zellen zur Aufrechterhaltung der Immuntoleranz gegenüber Nickel hindeutet (Cavani et al., 2000).

Unter der Berücksichtigung muriner Studien konnte im Tiermodell durch die Applikation eines Hautallergens nicht nur eine Immunisierung („Allergie“), sondern auch eine Toleranz induziert werden. Die lokale Ultraviolett-Bestrahlung (UVB) des Ortes der Hapten-Applikation führte z. B. zu einer spezifischen Immuntoleranz, welche eine spätere Sensibilisierung des Patienten verhinderte (Schwarz, 2005). Durch die orale Gabe des Allergens vor dem Hautkontakt konnte im Tierexperiment außerdem eine Toleranz gegenüber Chemikalien erzielt werden (Dubois, 2005). Diese Antigen-spezifische UVB- oder oral-induzierte Toleranz kann adaptiv auf naive Empfänger übertragen werden, durch z. B. Milz- oder Lymphknotensuspensionen. Dies macht erneut die Rolle der T-Zellen auf den tolerogenen Mechanismus deutlich.

Die Auseinandersetzung mit permanent und ubiquitär vorkommenden Chemikalien gehört zu den wichtigsten Aufgaben des Immunsystems der Haut und wird durch verschiedene Mechanismen gewährleistet. Unreife oder semi-reife dendritische Zellen wandern beispielsweise aus der Haut in die sekundären Lymphorgane, wo sie vor allem für die Expansion von Treg-Zellen anstatt von Teff-Zellen verantwortlich sind (Steinmann et al., 2003). Im Hinblick auf die regulatorischen T-Zellen ist auch zu erwähnen, dass diese vor allem IL-10 sezernieren und so eine inflammatorische Immunantwort unterdrücken. In Studien von Ferguson et al. sowie Schwarz et al. führte die Gabe von IL-10 vor Haptenexposition zur Blockade der Effektorphase im Rahmen der CHS-Reaktion (Ferguson et al., 1994; Schwarz et al., 1994). Eine Subgruppe der Treg Zellen ist für die kontinuierliche Expression von CD25-Antigenen verantwortlich und spielt eine entscheidende Rolle bei der Kontrolle der Immunantwort auf Selbst-Antigene bzw. körpereigene Antigene (Sakaguchi et al., 2005). Diese im Thymus entstehende induzierte Form der Treg-Zellen sind außerdem an der Kontrolle der Immunreaktion auf Antigene aus der Umgebung wie z. B. Bakterien, Pilze, Protozoen, allergene Moleküle und Chemikalien beteiligt (Höglund, 2006). Nach Goreishi et al. waren in vitro Zell-Zell-Kontakte für die Unterdrückung der Immunreaktion durch CD4+CD25+ Treg-Zellen wesentlich. In vivo hingegen spielte IL-10 für die Entwicklung einer Toleranz gegenüber Haptenen eine größere Rolle (Ghoreishi et al., 2006). Beim Menschen können CD4+CD25+ Treg-Zellen des peripheren Blutes von gesunden Nichtallergikern die Aktivität von naiven- und Memory- Nickel-spezifischen T-Zellen regulieren. Wurde der gleiche Zelltyp von Nickel-Allergikern isoliert, zeigte sich keine oder eine reduzierte

Fähigkeit zur Regulation von CD4+ und CD8+ Nickel-spezifischen T-Zellen. Entsprechend fanden sich in Hautbiopsien aus negativen Prick-Tests von Nichtallergikern hohe Zahlen von CD4+CD25+ T-Zellen (Cavani, 2003). Wurden diese Zellen isoliert, so zeigten sie eine starke suppressive Funktion gegenüber Nickel-spezifischen Teff-Zellen. Die Entwicklung einer Kontaktallergie wird demnach durch die Integration von Signalen der angeborenen und der adaptiven Immunabwehr unter Einbeziehung ortsständiger Zellen wie Keratinozyten und Fibroblasten kontrolliert. Dabei werden nichtallergische Verhältnisse aktiv durch das Immunsystem der Haut und durch die Expression von T-Zellen mit vorwiegend regulatorischen Eigenschaften erhalten (Balmert et al., 2017). Im Gegensatz dazu führt jedoch die Expression von Teff-Zellen unter bestimmten Rahmenbedingungen zu einer hypersensitiven Reaktion (Allergie). Die Mechanismen zur Kontrolle der Balance zwischen regulatorischen und effektorischen T-Zellen sind im Detail noch nicht geklärt. Jedoch scheinen orale DZs im Gegensatz zu dermalen DZs tolerogenere Eigenschaften zu besitzen und die Aktivierung von Treg-Zellen zu begünstigen, welche eine orale Toleranz induzieren (Allam et al., 2008a; Novak et al., 2010). Der Charakter der DZs wird entscheidend durch ihr Mikromillieu beeinflusst. Daher liegt die Vermutung nahe, dass die gleichzeitige Stimulation der spezifischen DZs der Haut bzw. Schleimhaut durch Stimuli ortsständiger Zellen wahrscheinlich eine große Rolle bei der Entstehung einer Allergie bzw. Toleranz spielen. In anderen Bereichen, wie der inflammatorischen Regulation der rheumatoiden Arthritis durch Fibroblasten, konnte dies eindrücklich nachgewiesen werden (Juarez et al., 2012). Inwiefern gingivale Fibroblasten als ortsständige Zellen der innaten Immunabwehr die Immunantwort der nahe gelegenen DZs modulieren, und ob es Unterschiede im Vergleich zu dermalen Fibroblasten gibt, soll Gegenstand dieser Studie sein. Dabei liegt der Fokus auf Nickel-aktivierten Signalkaskaden, welche im Rahmen von allergischen bzw. tolerogenen Reaktionen von Bedeutung sind.

2.3.4 Nickel-induzierte Signaltransduktionswege

Toll-like Rezeptor (TLR)

Schmidt et al. konnten in humanen Endothelzellen der Nabelschnur zeigen, dass Nickel über einen spezifischen Toll-like Rezeptor (TLR) detektiert werden kann, welcher zur angeborenen Immunabwehr gehört, den "Pattern Recognition Receptors"

(Mustererkennungsrezeptoren). Ihre primäre Aufgabe besteht darin, Pathogene (pathogen-associated microbial patterns (PAMPs)) und Signale einer potentiellen Schädigung (damage associated molecular patterns (DAMPs)) zu erkennen. Derzeit werden 13 verschiedene TLRs unterschieden, die in intrazelluläre und zell-membrangebundene Rezeptoren unterteilt werden können (Yamamoto und Takeda, 2010). Der 1997 von Medzhitov et al. als erster humaner Toll-Rezeptor identifizierte TLR4 wird auch durch Nickelionen aktiviert (Medzhitov et al., 1997; Rachmawati et al., 2013; Raghaven et al., 2012). TLR4 ist der am besten untersuchte Rezeptor und bekannt für seine Bindung von LPS, einem Bestandteil der Zellmembran gramnegativer Bakterien (Poltorak et al., 1998). Die Bindungsdomänen für LPS und Nickel sind jedoch unterschiedlich. Darüber hinaus ist eine spezifische Histidinkombination für die Aktivierung des humanen TLR4 durch Nickel erforderlich, welche z. B. im murinen TLR4 nicht gegeben ist. Dies erklärt die Schwierigkeiten bei der Induktion einer allergischen Kontaktdermatitis im Tiermodell (Artik et al., 2004; Schmidt et al., 2010).

Zu Beginn der Aktivierung eines TLRs steht die charakteristische Dimerbildung (Yamamoto und Takeda, 2010). TLR4 ist ein zell-membrangebundener Rezeptor. Nach LPS- oder auch nach Nickel-Bindung wird das Signal über interagierende extra- und intrazelluläre Domänen ins Innere der Zelle vermittelt. In der Folge wird hier eine Signalkaskade ausgelöst, die letztlich zur Aktivierung des MAP-Kinase-Wegs (MAP, engl. mitogen-activated protein) einerseits und/oder zur Myeloid differentiation primary response gene (88) (MyD88) abhängigen bzw. -unabhängigen Induktion des Nuclear Factor-kappaB (NF- κ B) Signalwegs andererseits führt. Ersterer Signalweg moduliert die Differenzierung und das Wachstum von Zellen und reguliert deren programmierten Zelltod (Apoptose) (Yap et al., 2011). Bedeutender für die spezifische Immunantwort des Rezeptors ist jedoch der NF- κ B Signalweg.

NF- κ B-Pathway

NF- κ B ist der wohl am besten erforschte Transkriptionsfaktor, der in vielen Spezies und Zellen konserviert ist (Hayden und Ghosh, 2008). Sein Signaltransduktionsweg ist an der Proliferation, Differenzierung, Apoptose, der lymphoiden Organogenese und Stressantwort beteiligt sowie mit verschiedensten anderen Signalwegen eng verknüpft (Hayden und Ghosh, 2008; Oeckinghaus et al., 2011). Die Induktion von NF- κ B erfolgt

durch den Ikk-Komplex (IκB-Kinase), der den Inhibitor von NF-κB (IκB) phosphoryliert. In der Folge kann letzterer durch das Proteasom abgebaut werden und NF-κB kann in den Nucleus translozieren, wo er verschiedenste Zielgene aktiviert (Abbildung 2). Hierzu gehören proinflammatorische Zytokine, Zytokin- und Immunrezeptoren, Chemokine, Proteine der Antigenpräsentierung, Zelladhäsionsmoleküle und viele mehr (Baeuerle und Henkel, 1994; Perkins, 2006; Baltimore, 2011). Die Regulation der NF-κB-Antwort ist gewebe- und zellspezifisch. Im Rahmen dieser Studie soll der Frage auf den Grund gegangen werden, ob durch Nickel unterschiedliche Zielgene in dermalen und gingivalen Fibroblasten aufgrund einer TLR4-Aktivierung induziert werden.

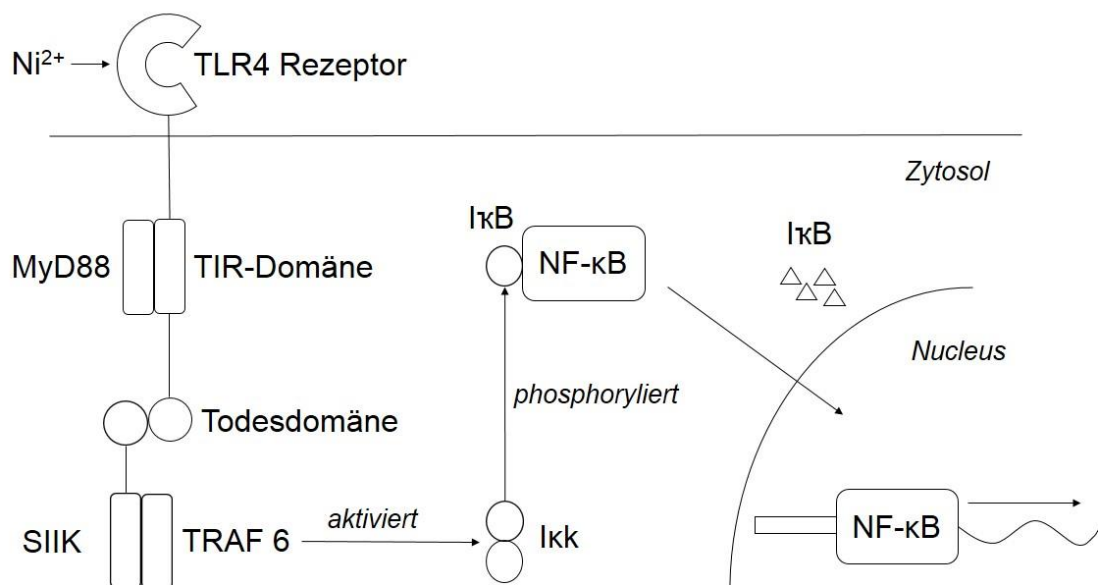


Abb. 2: TLR4 Aktivierung durch Nickel

Die extrazelluläre Aktivierung des TLR4 Rezeptors durch Nickel (Ni^{2+}) führt zur Aktivierung von MyD88 und zum Auslösen der Kinase-Aktivierungskaskade, was wiederum die Dimerisierung von Ikk begünstigt. Nach der Phosphorylierung und Dissoziation des inhibitorisch an NF-κB gebundenen Proteins IκB durch Ikk erfolgt die Translokation von NF-κB in den Nucleus und Aktivierung bestimmter Gene, welche die proinflammatorische Immunantwort begünstigen.

TLR4 Toll like Rezeptor 4, **Ni^{2+}** Nickelionen, **MyD88** Myeloid differentiation primary response gene 88, **TIR-Domäne** Toll/IL-1R-Domäne, **SIKK** Serin/Threonin-Kinase, **TRAF 6** TNF receptor associated factor 6, **Ikk** Inhibitor of kappa B Kinase, **IκB** Inhibitor of kappa B, **NF-κB** Nukleärer Faktor (NF)-κB

Hypoxie-induzierte Faktor (HIF)-1 α Pathway

Ein weiterer wichtiger Transkriptionsfaktor im Zusammenhang mit Nickel ist der Hypoxie-induzierte Faktor (HIF-1 α). HIF besteht aus einer grundlegend exprimierten β -Untereinheit und eine Sauerstoff-regulierten α -Untereinheit. HIF-1 α und HIF-1 β Proteine enthalten beide Helix-loop-Helix Struktur motive, welche an die DNA binden können und zu einer Dimerbildung der Untereinheiten führen (Wang et al., 1995; Yang et al., 2005; Chapman-Smith et al., 2004). In der α -Untereinheit befindet sich eine Sauerstoff-abhängige Abbauregion (ODD), die durch Prolyl-Hydroxylase-2 (PHD-2) hydroxyliert wird und dadurch den proteosomalen Abbau unter Normoxie induziert (Huang et al., 1998). Die HIF-1 α Untereinheit beinhaltet außerdem zwei Transaktivierungsdomänen (TAD), die die HIF-1 Zielgene regulieren. Die zwei Transkriptionscoaktivatoren, das CREB bindende Protein (CBP) und p300, interagieren mit dem Carboxy-Terminus der Transaktivierungsdomäne (C-TAD) und sind beide essentiell für die HIF-1 Transkription und somit Ziele der HIF-1 Expressionsregulation. Die Hemmung der HIF-1 α C-TAD durch die Prolyl-Hydroxylase (PHD-2) inhibiert die HIF-1 Genexpression und verhindert die HIF Transkription und Translation (Lando et al., 2002). HIF-1 β beinhaltet nur eine dieser Domänen, welche jedoch nicht notwendig für die Funktion des HIF-1 Komplexes ist (Wang et al., 1995; Huang et al., 1998; Déry et al., 2005). Das HIF-1 α Gen wird mit Unterstützung von SP1, p300 und HIF-1 β im Zellkern transkribiert. Wenn es dann ins Zytoplasma transloziert, wird das HIF-1 α Protein von PHD-2 und Von-Hippel-Lindau (VHL) Ubiquitin-Ligase markiert und unter Normoxie proteosomal degradiert (Huang et al., 1998; Mole et al., 2001). Zusätzlich bewirkt das Faktor inhibierende HIF-1 (FIH) Protein eine Hydroxylierung und verhindert damit eine p300 und CBP Anlagerung. Die Expression und Stabilisierung des HIF-1-Komplexes wird durch Feedback-Hemmung, mithilfe der PHD-2 HIF-1-Aktivierung, reguliert (Déry et al., 2005). Hypoxie hingegen führt zur Inhibition von VHL und FIH, zur HIF-1 α Aktivierung, zur Stabilisierung der HIF-1 α Untereinheit, nukleären Akkumulation, Dimerisierung mit HIF-1 β und der Expression HIF spezifischer Zielgene (Abb. 3). Die zelluläre hypoxische Reaktion wird hauptsächlich durch den Proteinkomplex HIF-1 bestimmt. Studien über zweiwertige Metallionen wie in Nickelchlorid konnten zeigen, dass Nickelionen zu einer Inhibition von PDH und der Asparaginyll Hydrolase FIH führen. Dadurch wird der Abbau des Transkriptionsfaktors HIF-1 α gehemmt, worauf dieser in den Nucleus transloziert und zur Genexpression

spezifischer Mediatoren führt, welche z. B. im Rahmen der Angiogenese, des Zellmetabolismus, der Inflammation und der Immunabwehr von Bedeutung sind (Bracken et al., 2003; Maxwell und Salnikow, 2004). Viemann et al. konnten demonstrieren, dass primäre Endothelzellen mit einer Hochregulation des NF- κ B und HIF-1 α reagieren, wenn sie mit Nickel stimuliert werden (Viemann et al., 2007). Des Weiteren führte ein HIF-Knockout in Immunzellen zu einer Reduktion ihrer Vitalität, zu Verminderung ihrer Migration und zu Wundheilungsstörungen (Cramer et al., 2003; Frede et al., 2009).

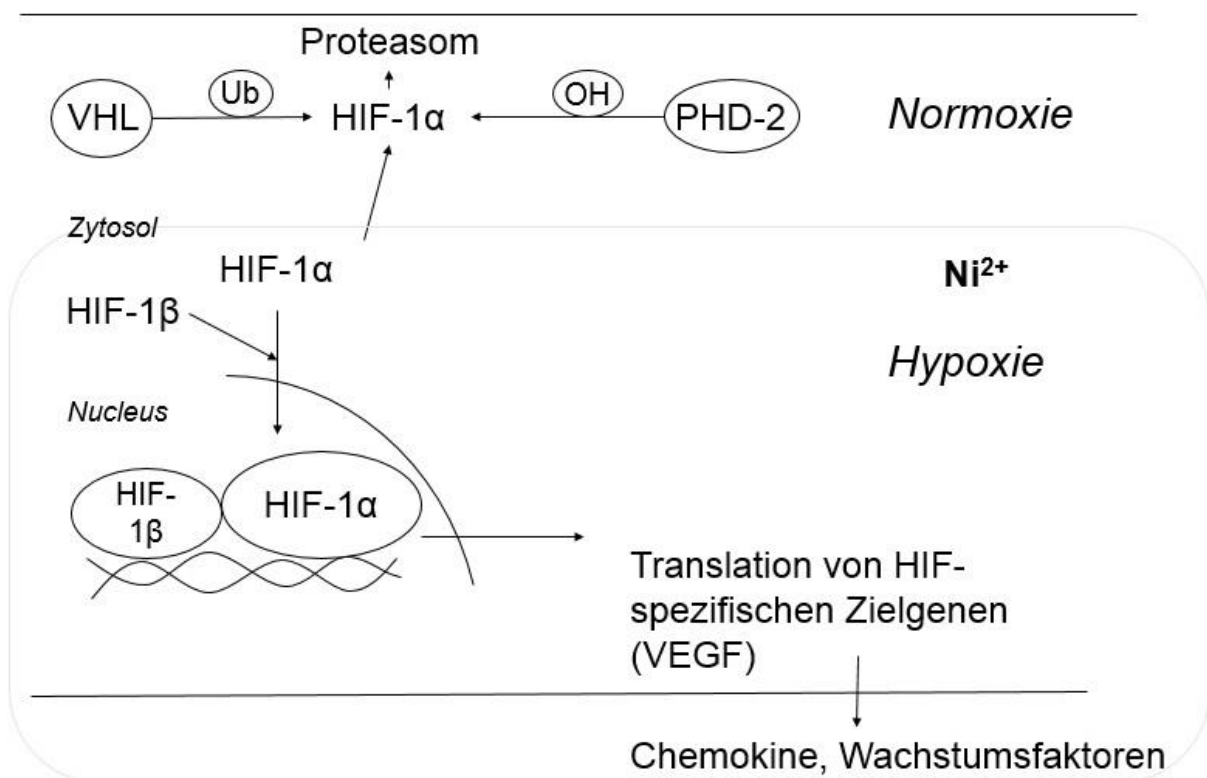


Abb. 3: HIF-1 Signalweg:

Unter Normoxie wird HIF-1 α hydroxyliert und ubiquitiniert, woraufhin es proteasomal abgebaut wird. Unter Hypoxie hingegen kommt es zur nukleären Akkumulation von HIF-1 α und Dimerisierung mit HIF-1 β und der Expression HIF-spezifischer Zielgene, verantwortlich für die Angiogenese, den Zellmetabolismus und die Immunzellmigration.

VHL Von-Hippel-Lindau, **Ub** Ubiquitinierung, **OH** Hydroxylierung, **HIF-1 α** Hypoxie-induzierbare Faktor-1 α , **PHD-2** Prolyl-Hydroxylase-Domain 2, **HIF-1 β** Hypoxie-induzierbare Faktor-1 β , **VEGF** Vascular Endothelial Growth Factor

Inwiefern das HIF- und das NF- κ B-System für die Mechanismen der oralen Toleranzinduktion von Bedeutung sind, und ob gingivale und dermale Zellen

unterschiedliche Modulationseigenschaften in Bezug auf Immunzellen aufweisen oder aber auch ein protolerogenes vs. proallergenes Umfeld schaffen, ist unklar und soll Gegenstand dieser Untersuchung sein.

3 Ziele und Problemstellung

Die Nickel-induzierte Hypersensibilität ist die häufigste Kontaktallergie und dennoch werden in der Mundhöhle nur sehr selten allergische Reaktionen beim Kontakt mit nickelhaltigen Materialien beobachtet. Die zugrundeliegenden molekularen Pathomechanismen der Kontaktallergie und einer möglichen oralen Toleranzinduktion sind jedoch noch weitgehend unklar. Daher bestehen nach wie vor Unsicherheiten auf Seiten der Behandler und teilweise Befürchtungen auf Seiten der Patienten angesichts der Risiken und Begleiterscheinungen, mit denen bei der Verwendung zahnärztlicher nickelhaltiger Materialien oder kieferorthopädischer Apparaturen zu rechnen sein könnte. In dieser Studie sollen Signaltransduktionswege genauer charakterisiert und eventuelle immunologische Unterschiede zwischen humanen gingivalen und dermalen Zellen aufgezeigt werden. Dabei wird davon ausgegangen, dass epitheliale Zellen der Mundhöhle als Bestandteil der innate Immunabwehr fungieren und damit direkt oder indirekt am immunologischen Geschehen beteiligt sind. Basierend auf der Hypothese, dass Zellen des Mundraumes mit einer veränderten Immunreaktion auf unterschiedliche Allergene reagieren, sollen gingivale sowie dermale Fibroblasten mit Nickelionen stimuliert werden. Die Effekte sollen unter besonderer Berücksichtigung der Signaltransduktionswege zweier Transkriptionsfaktoren: NF- κ B und HIF-1 α , welche für die Aktivierung der spezifischen Abwehr durch Attraktion und Aktivierung von Antigen-präsentierenden Zellen und T-Zellen von großer Bedeutung sind, miteinander verglichen werden. Des Weiteren sollen die Auswirkungen unter besonderer Berücksichtigung immunologischer, hypoxischer, proinflammatorischer und antiinflammatorischer Aspekte auf Gen- und Proteinebene analysiert werden.

Dabei wird die Hypothese verfolgt, dass gingivale Zellen eine andere immunologische Reaktion aufweisen und induzieren als dermale Zellen. Demnach induzieren gingivale Fibroblasten durch die Freisetzung spezifischer Chemokine und Zytokine ein antiinflammatorisches protolerogenes Mikromilieu, welches die tolerogenen Eigenschaften der DZs und damit eine orale Toleranzinduktion begünstigen. Im Gegensatz dazu fördern dermale Fibroblasten durch ein proinflammatorischen Mikromilieu die Entstehung einer Nickel-induzierten Hypersensibilität.

4 Material – Methoden

4.1 Verwendete Materialien / Materialienliste

Zellkultur

Material	Hersteller
PBS pH 7,4 (1x)	Gibco by Life Technologies, Darmstadt, D
1 % Antibiotikum – Antimykotikum (AB/AM)	Gibco by Life Technologies, Darmstadt, D
Collagenase Typ II	PAA, Laboratories, Cölbe, D
75 cm ² Zellkulturflaschen	CELLSTAR® Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, D
DMEM (1x) GlutaMAX™-I Medium	Gibco by Life Technologies, Darmstadt, D
Fetal Bovine Serum (FBS)	Biochrom AG, Berlin, D
Primäre humane dermale Fibroblasten	PromoCell, Heidelberg, D
Fibroblast Groth Medium 2	PromoCell, Heidelberg, D
Kryomedium Cryo-SFM	PromoCell, Heidelberg, D
Kryoröhrchen	BRAND GMBH + CO KG, Wertheim, D
Trypsin (1x)	PAA Laboratories/GE Healthcare Life Science, Frankfurt, D
TC-Platte 6-Well Standard F	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, D
Dimethyl Sulfoxide (DMSO)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, D
Zellschaber	Thermo Scientific, by Life Technologies, Darmstadt, D
Advanced RPMI 1640 Supplemented 1X GlutaMAX™	Gibco by Life Technologies, Darmstadt, D
100 U/ml Penicillin	Life Technologies/Thermo Fisher Scientific Inc., Darmstadt, D
100 µg/ml Streptomycin	PAA Laboratories/GE Healthcare Life Science, Frankfurt, D

PCR

Material	Hersteller
TRIzol Reagent®	Ambion® by Life Technologies, Darmstadt, D
Chloroform	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, D
Isopropanol	AppliChem GmbH, Darmstadt, D
Ethanol	AppliChem GmbH, Darmstadt, D
Distilled Water DNase/RNase free	Gibco by Life Technologies, Darmstadt, D

High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (LotNo. 1403156)	Applied Biosystems, Darmstadt, D
Agarose Typ I	Sigma Aldrich, Taufkirchen, D
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe, D
50 mM MgCl ₂ (Lot.No. 1074189)	Invitrogen™ by Life Technologies, Darmstadt, D
Taq DNA Polymerase Recombinant 500 U (5 U/μl) (Lot.No. 1367776)	Invitrogen™ by Life Technologies, Darmstadt, D
2,5 mM dNTP Mix (Lot.No 1426827)	Invitrogen™ by Life Technologies, Darmstadt, D
Nuclease-free-H ₂ O	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, D
10X PCR Rxn Buffer (Lot.No. 1088533)	Invitrogen™ by Life Technologies, Darmstadt, D
Primer	Hersteller
Integrin α10 forward	Invitrogen™ by Life Technologies, Darmstadt, D
Integrin α10 reverse	Invitrogen™ by Life Technologies, Darmstadt, D
Collagen IVα1 forward	Invitrogen™ by Life Technologies, Darmstadt, D
Collagen IVα1 reverse	Invitrogen™ by Life Technologies, Darmstadt, D
Collagen Xα1 forward	Invitrogen™ by Life Technologies, Darmstadt, D
Collagen Xα1 reverse	Invitrogen™ by Life Technologies, Darmstadt, D
Osteopontin forward	Invitrogen™ by Life Technologies, Darmstadt, D
Osteopontin reverse	Invitrogen™ by Life Technologies, Darmstadt, D
Periostin forward	Invitrogen™ by Life Technologies, Darmstadt, D
Periostin reverse	Invitrogen™ by Life Technologies, Darmstadt, D
Superoxiddismutase 3 forward	Invitrogen™ by Life Technologies, Darmstadt, D
Superoxiddismutase 3 reverse	Invitrogen™ by Life Technologies, Darmstadt, D
CXC12 forward	Invitrogen™ by Life Technologies, Darmstadt, D
CXC12 reverse	Invitrogen™ by Life Technologies, Darmstadt, D
Toll-like Receptor 4 forward	Invitrogen™ by Life Technologies, Darmstadt, D
Toll-like Receptor 4 reverse	Invitrogen™ by Life Technologies, Darmstadt, D
Fibronectin forward	Invitrogen™ by Life Technologies, Darmstadt, D
Fibronectin reverse	Invitrogen™ by Life Technologies, Darmstadt, D

Stimulanzen

Material	Hersteller
Nickel(II)chlorid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, D

Assays

Assay	Hersteller
Limulus Amebocyte Lysate (LAL) QCL-1000™	Lonza, Köln, D
Colorimetic Cell Viability Kit III (XTT)	PromoKine, Heidelberg, D
Pierce™ BCA Protein Assay Kit	Thermo Scientific™ Pierce™ by Life Technologies, Darmstadt, D

Diamond Plasmacytoid Dendritic Cell Isolation Kit II human	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, D
Culture Coat® 96 Well High BME Cell Invasion Assay	R&D Systems™, Wiesbaden-Nordenstadt, D
NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents	Thermo Scientific, by Life Technologies, Darmstadt, D
Human IL-1β ELISA Set II	BD Biosciences OptEIA, Heidelberg, D
Human VEGF ELISA Set	R&D Systems™, Wiesbaden-Nordenstadt, D
Human CCL20 / MIP-3α	R&D Systems™, Wiesbaden-Nordenstadt, D
Human IL-10 ELISA Set	BD Biosciences OptEIA, Heidelberg, D

Geräte

Gerät	Hersteller
Microplate Reader, ASYSHitech Expert 96	ASYSHitech by Biochrom, Bremen, D
NANODROP 2000	Thermo Scientific, Braunschweig, D
Sicherheitswerkbank Herasafe-Heraeus Instruments	Heraeus by Kendro Laboratory Products GmbH, Langenselbold, D
Thermocycler T-Gradient	Biometra GmbH, Göttingen, D
Zentrifuge: Centrifuge 5414R	Eppendorf, Hamburg, D
Inkubator	Memmert, Schwabach, D
Pipettierhilfe Accu Jet® Pro	Brand, Wertheim, D
Apparatur zum Gießen der Agarosegele, inklusive Einsteckkämmen, sowie zur Agarose-Gelelektrophorese, Mini Sub-Cell GM	Bio-Rad, München, D
Bio RAD Power Pac 3000	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, D
Gelelektrophoresekammer	Bio-Rad, München, D
Bio Doc-It™ Imaging System	VWR International GmbH, Darmstadt, D
Neubauerkammer (Tiefe 0,1 mm, 0,0025 mm ²)	Brand, Wertheim, D
Via 7	Applied Biosystems, Darmstadt, D
Matrix Electronic Multichannel Pipette	Thermo Scientific, Braunschweig, D
ELISA Microplate-Washer	ASYSHitech by Biochrom, Bremen, D
Brutschrank	Heraeus Thermo Electron Corporation, Braunschweig, D
Schüttler	Biometra® WT12, Göttingen, D
Audiographiekassette, Ortho Medium Curix screens	Agfa HealthCare GmbH, Bonn, D
Wasserbad (Zellkultur)	GFL-Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel, D
QuadroMACS Separator (Magnet)	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, D

Fluoreszenzreader	Tecan Group Ltd., Männedorf, CH
Mini-PROTEAN® 3 Cell	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, D
Mini Trans-Blot® Cell	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, D
Analysewaage Sartorius 3716	Sartorius, Göttingen, D
Analysewaage Sartorius CP 225D-0CE	Sartorius, Göttingen, D
Autoklav Modell Varioklav 25T	H+P Labortechnik, Oberschleissheim, D
Eismaschine, Scotsman AF 10	Scotsman by HIBU Eismaschinen GmbH & Co, Sprochhoevel, D
elektronische Pipettierhilfe Easypet	Eppendorf, Hamburg, D
Gefrierschrank -20 °C	Liebherr, Ochsenhausen, D
Gefrierschrank -80 °C, Hettich Freezer	Andreas Hettich GmbH & Co.KG, Tuttlingen
Kamera des Zeiss Mikroskops Axiolmager A1 (AxioCam MRc)	Carl Zeiss, Jena, D
Kühlschrank +4 °C, Profi Line	Liebherr, Ochsenhausen, D
Lichtmikroskop (für Zellkultur-Flaschen/-Schalen), Eclipse TS 100	Nikon GmbH, Düsseldorf, D
Magnetrührer MR3001	Heidolph Instruments, Schwabach, D
Mikrowelle zum Erhitzen der Agarose	Siemens, München, D
Multikanalpipette	Eppendorf, Hamburg, D
pH-Meter	WTW Wissenschaftliche Werkstätten, Weilheim, D
Schüttler für Western Blot-Membran, PMR-30	Grant-bio, Hillsborough, NJ, USA
Zentrifuge für 1,5/2 ml Reaktionsgefäße, Centrifuge 5415 D	Eppendorf, Hamburg, D
Zentrifuge für 50 ml Reaktionsgefäße, Centrifuge 5810 R	Eppendorf, Hamburg, D

Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller
96-Well Mikrotiterplatte	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, D
Safe-Lock Tubes 2,0 ml	Eppendorf, Hamburg, D
Safe-Lock Tubes 1,5 ml	Axygen® by Fisher Scientific GmbH, Schwerte, D
Safe-Lock Tubes 0,5 ml	Axygen® by Fisher Scientific GmbH, Schwerte, D
Safe-Lock Tubes 0,2 ml	Axygen® by Fisher Scientific GmbH, Schwerte, D
384-Well PCR-Platte	BRAND GmbH & Co KG, Wertheim, D
30 µl Impact 384 Tips Non-Sterile	Thermo Scientific by Life Technologies, Darmstadt, D

PBS Tabletten	Gibco by Life Technologies, Darmstadt, D
Tween [®] 20 for molecular biology	AppliChem GmbH, Darmstadt, D
Sodium Hydrogen Carbonat	AppliChem GmbH, Darmstadt, D
NaHCO ₃	AppliChem GmbH, Darmstadt, D
Na ₂ CO ₃	AppliChem GmbH, Darmstadt, D
BRAND [®] Parafilm [®] M sealing film	BRAND GmbH & Co KG, Wertheim, D
2 N Schwefelsäure	Carl Roth GmbH & CO. KG, Karlsruhe, D
TMB Substrate reagent set (ELISA)	BD Biosciences OptEIA, Heidelberg, D
Ficoll-Lösung/Ficoll-Paque PREMIUM	GE Healthcare Life Sciences, Solingen, D
NaCl-Lösung	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, D
LeucoSep [™] Centrifuge Tubes	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, D
MACS-Puffer	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, D
LD Column	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, D
Falcon 50 ml - Röhrchen	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, D
Falcon 15 ml - Röhrchen	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, D
100 µl Tips Certified RNase/DNase & Pyrogen Safe	MAXYMum Recovery [™] by VWR International GmbH, Darmstadt, D
1000 µl Tips Certified RNase/DNase & Pyrogen Safe	MAXYMum Recovery [™] by VWR International GmbH, Darmstadt, D
10 µl Tips Certified RNase/DNase & Pyrogen Safe	MAXYMum Recovery [™] by VWR International GmbH, Darmstadt, D
200 µl Tips Certified RNase/DNase & Pyrogen Safe	MAXYMum Recovery [™] by VWR International GmbH, Darmstadt, D
300 µl Spitzen für Multikanalpipette	Eppendorf, Hamburg, D
serologische Pipettenspitzen (2, 5, 10, 25 ml)	Cellstar, Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, D

RT-PCR

Material	Hersteller
Distilled Water DNase/RNase Free	Gibco by Life Technologies, Darmstadt, D
TaqMan [®] Gene Expression MasterMix	Applied Biosystems, Darmstadt, D
TaqMAN-Sonden	
RPS18: Hs 02387368-g1	Applied Biosystems, Darmstadt, D
IL-1β: Hs 00174097-m1	Applied Biosystems, Darmstadt, D
VEGFA: Hs 0090055-m1	Applied Biosystems, Darmstadt, D
CCL20: Hs 01011368-m1	Applied Biosystems, Darmstadt, D
IL-10: Hs 00174086-m1	Applied Biosystems, Darmstadt, D
IL-8: Hs 00174103-m1	Applied Biosystems, Darmstadt, D
HIF-1α: Hs 00153153-m1	Applied Biosystems, Darmstadt, D
TGF1: Hs 00545014-m1	Applied Biosystems, Darmstadt, D
IL-17A: Hs 00174383-m1	Applied Biosystems, Darmstadt, D

Western Blot

Material	Hersteller
PageRuler Prestained Protein Ladder	Thermo Scientific, Braunschweig, D
30 % Acrylamide Bis Solution 37.5:1	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, D
Tris ultrapure	AppliChem GmbH, Darmstadt, D
Methanol	AppliChem GmbH, Darmstadt, D
SDS Molecular biology grade	AppliChem GmbH, Darmstadt, D
Ammonium-Persulfate	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, D
TEMED	AppliChem GmbH, Darmstadt, D
Sodium Chloride pure Ph. Ew., USP	AppliChem GmbH, Darmstadt, D
Western Lightning® Ultra Extreme Sensitivity Chemiluminescence Substrate	PerkinElmer LAS (Germany) GmbH, Rodgau, D
Western Lightning® Plus-ECL Enhanced Chemiluminescence Substrate	PerkinElmer LAS (Germany) GmbH, Rodgau, D
Tris-Base	AppliChem GmbH, Darmstadt, D
1,5 M Tris	AppliChem GmbH, Darmstadt, D
SDS	AppliChem GmbH, Darmstadt, D
Ammoniumpersulfat	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, D
0,5 M Tris	AppliChem GmbH, Darmstadt, D
Nitrocellulosemembran, Trans-Blot® Transfer Medium	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, D
Whatman Chromatographie-Papier	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, D
Ponceau S	AppliChem GmbH, Darmstadt, D
Trichloressigsäure	AppliChem GmbH, Darmstadt, D
Nonfat dried milk powder (Milchpulver)	AppliChem GmbH, Darmstadt, D
Röntgenfilm	
HCl	Merck KGaA, Darmstadt, D
Glycin	AppliChem GmbH, Darmstadt, D
Bromphenolblau	AppliChem GmbH, Darmstadt, D
Glycerin	AppliChem GmbH, Darmstadt, D
β-Mercaptoethanol	AppliChem GmbH, Darmstadt, D
Antikörper	Hersteller
Host: Goat Anti-Mouse IgG, Label: Horseradish Peroxidase	Thermo Scientific™ Pierce™ by Life Technologies, Darmstadt, D
HIF-1α (Mouse monoclonal NB100 – 105)	Novus by Bio-Techne R&D Systems GmbH, Wiesbaden Nordenstadt, D
NF-κB p65 ((C-20) sc – 372 Rabbit Polyclonal IgG	Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg, D
Host: Goat Anti-Rabbit IgG, Label: Horseradish Peroxidase	New England Biolabs, Frankfurt am Main, D
Host: Goat Anti-Rabbit IgG, Label: Horseradish Peroxidase	Thermo Scientific™ Pierce™ by Life Technologies, Darmstadt, D
Lamin A Rabbit Polyclonal IgG	Abcam, Cambridge, UK

Software

Softwareprogramm	Hersteller
GraphPad Prism™ Version 5	GraphPad Software, San Diego, CA, USA
ImageJ	National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA

Puffer und Lösungen

Puffer	Inhaltsstoff	Menge
Reagent Diluent/ Assay Diluent/ Blocking Buffer	Für VEGF-, CCL20-ELISA: PBS und 1 % Bovines Serumalbumin	200-300 µl
	Für IL-1β- und IL-10-ELISA: PBS und 10% FBS	
TBS 10-fach	Tris-Base	24 g
	NaCl	87,5 g
	Auffüllen auf 1 l mit HCL auf einen pH Wert von 7,4 einstellen	
TBST 1-fach	TBS 10 fach	100 ml
	Bidest. Wasser	900 ml
	Tween	1 ml
TBS 1-fach	TBS 10 fach	100 ml
	Bidest. Wasser	900 ml
Laufpuffer 5-fach	Tris - base	15 g
	Glycin	72 g
	SDS	5 g
	Mit Bidest. Wasser auf 1 l aufgefüllt	
Laufpuffer 1-fach	Laufpuffer 5 fach	200 ml
	Bidest. Wasser	800 ml
Transferpuffer 10- fach	Tris - Base	7,5 g
	Glycin	
	Mit Bidest. Wasser auf 500 ml auffüllen	
Transferpuffer 1- fach	10 fach Transferpuffer	100 ml
	Bidest. Wasser	700 ml
	Methanol	200 ml
Blocklösung	TBST 1 fach	100 ml
	Magermilchpulver	5 g

Laemmli Puffer 5-fach	0,5 mol/l Tris Base pH 6,8	6,24 ml
	SDS	1 g
	Glycerin (87 %)	5 ml
	Bromphenolblau	50 mg
	900 µl portionsweise eingefroren und 100 µl Mercaptoethanol zugesetzt	
Strippingpuffer	1 M Tris - HCL	6,25 ml
	10 % SDS	20 ml
	2 - Mercaptoethanol	0,7 ml
	Mit Bidest. Wasser auf 100 ml auffüllen	
TAE-Puffer	Tris-Base 2 M (MW 121,14)	121,14 g
	EDTA Na-Salz 0,05 M (MW 372,2)	9,31 g
	28,6 ml Essigsäure (MW 60,05)	28,6 ml
	auf ein Endvolumen von 500 ml mit A. dest. Auffüllen (pH 8,5)	

4.2 Zellgewinnung

Die vorliegende Studie wurde im Vorfeld von der Ethikkommission der Universität Bonn genehmigt (Lfd. Nr. Ethikkommission Bonn: 318/11). Nach schriftlicher Einverständniserklärung seitens der Patienten bzw. ihrer Erziehungsberechtigten wurden gingivale Gewebeproben im Rahmen von Weisheitszahnextraktionen in der Poliklinik für Oralchirurgie der Universitätszahnklinik Bonn gesammelt und zur Gewinnung von humanen gingivalen Fibroblasten verwendet. Anamnestische Ausschlusskriterien waren das Vorliegen akuter oder chronischer inflammatorischer Erkrankungen sowie eine dauerhafte Medikation.

Die Patientengruppe bestand aus 3 männlichen und 5 weiblichen Patienten in einem Alter von 13 bis 38 Jahren.

Primäre humane dermale Fibroblasten wurden kommerziell von der Firma PromoCell (Heidelberg, D) erworben.

Nach der Entnahme wurden die gingivalen Gewebeproben mit steriler phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) (Gibco by Life Technologies, Darmstadt, D), versetzt mit 1 % Antibiotikum-Antimykotikum (AB-AM) (Gibco), in steriler Umgebung unter der Sicherheitswerkbank (Herasafe-Heraeus Instruments, Hanau, D) gewaschen. Danach wurden sie in Eppendorf-Reaktionsgefäße mit 200-300 µl Collagenase Typ II (PAA, Laboratories, Cölbe, D) und 1 % AB-AM überführt und für 2,5-3 h bei 37 °C und 5 % CO₂ im Inkubator (Memmert, Schwabach, D) inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Gewebeproben mit PBS gewaschen, das Gingivaepithel wurde vom Bindegewebe mit Hilfe von 2 sterilen Pinzetten getrennt und in eine sterile 75 cm² Zellkulturflasche (CELLSTAR® Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, D), gefüllt mit 20 ml Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (1x) GlutaMAX™-I Medium (Gibco), 10 % Fetal Bovine Serum (FBS) (Biochrom AG, Berlin, D) und 1 % AB-AM, zur Kultivierung überführt.

4.3 Kultur und Kryokonservierung der gingivalen und dermalen Fibroblasten

Die Kultivierung der primären gingivalen und dermalen Zellen (Abb. 4) erfolgte in sterilen 75 cm² Zellkulturflaschen in steriler Umgebung in Inkubatoren bei einer Temperatur von 37 °C und einer CO₂-Konzentration von 5 %.

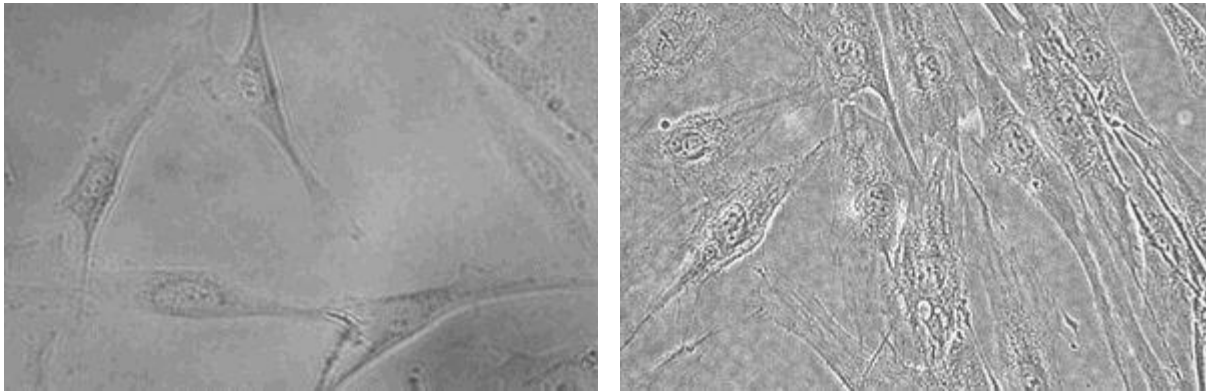


Abb. 4: Humane gingivale Fibroblasten (links) und humane dermale Fibroblasten (rechts), Vergrößerung 200-fach

Die Wahl der Medien und des FBS erfolgte nach deren Testung mit einem spezifischen Endotoxintest (Limulus Assay[®] der Firma Lonza, Köln, D) sowie mittels Zellvitalitätstests (XTT, PromoKine, Heidelberg, D) (siehe Kap. 4.5). Die Medien und das FBS mit der höchsten Zellvitalität bei fehlender Endotoxinbelastung wurden für die jeweiligen Zelltypen ausgewählt. Somit wurden für die humanen dermalen Fibroblasten das Fibroblast Growth Medium 2 von PromoCell und für die humanen gingivalen Fibroblasten das DMEM (1x) GlutaMAX[™]-I Medium von Gibco als Nährmedien verwendet. Beide Basismedien wurden mit 10 % FBS (Biochrom AG) und 1 % AB-AM (Gibco) versetzt.

Alle 2 Tage wurde ein Mediumwechsel mit 20 ml Nährmedium durchgeführt. Das Zellwachstum wurde täglich kontrolliert. Bei Erreichen einer 90 %igen Konfluenz wurden die Zellen passagiert. Dafür wurden sie zuerst mit 7 ml sterilem PBS unter der Sicherheitswerkbank gewaschen und danach mit 2 ml Trypsin (1x) (GE Healthcare PAA, Chalfont St Giles, GB) pro konfluenter Zellkulturflasche gelöst. Unter Zugabe von 8 ml Zellnährmedium wurden sie durch Auf- und Abpipettieren mit Hilfe einer serologischen Pipette und einer Pipettierhilfe (Accu Jet[®] Pro von Brand, Wertheim, D) in ein 50 ml Falcon überführt. Um die Trypsinreste zu entfernen, wurden die Zellen bei 800 rpm für 5 min zentrifugiert (Eppendorf, Hamburg, D). Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen, das Zellpellet wurde in 20 ml Zellnährmedium resuspendiert und jeweils 5 ml Zellsuspension in eine neue Zellkulturflasche überführt. Die Zellkulturflaschen wurden mit Zellnährmedium auf 20 ml aufgefüllt. Die Zellen wurden in Passage 3 bzw. 4 kryokonserviert.

Zur Kryokonservierung der gingivalen und dermalen Fibroblasten wurden die Zellen in den Zellkulturflaschen mit 7 ml PBS gewaschen, mit 2 ml Trypsin gelöst, mit 8 ml Medium resuspendiert und bei 800 rpm 5 min zentrifugiert. Nach der Abnahme des Überstandes wurden die Zellpellets in ihrem zellspezifischen Zellnährmedium resuspendiert. Es wurden 800 µl Kryomedium Cryo-SFM (PromoCell, Heidelberg, D) mit 20 % Dimethylsulfoxid (DMSO) in jedes Kryoröhrchen (Brand) vorgelegt. Nach dem Zählen der Zellen mit Hilfe einer Neubauerkammer wurden 1×10^6 Zellen pro ml in Nährmedium gelöst. Nun wurden 800 µl Zellsuspension in jedes Kryoröhrchen gegeben. Die Kryoröhrchen wurden bei $-80\text{ }^\circ\text{C}$ eingefroren und nach 1-2 Tagen in einen Stickstofftank überführt. Zur Vorbereitung der Stimulationsexperimente wurden nach Bedarf Kryoröhrchen aufgetaut. Dafür wurde das im Wasserbad aufgetaute Kryoröhrchen in 5 ml spezifisches Zellnährmedium gegeben und bei 800 rpm für 5 min zentrifugiert, um das im Einfriermedium enthaltene DMSO zu entfernen. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen, das Zellpellet wurde in 5 ml Zellnährmedium resuspendiert und in eine sterile Zellkulturflasche überführt. Diese wurde mit Zellnährmedium auf 20 ml aufgefüllt.

4.4 Charakterisierung der primären Zellen

Zur Charakterisierung der humanen dermalen und humanen gingivalen Zelllinien und Phänotypisierung wurden Polymerase-Kettenreaktionen (PCR) mit folgenden Primern durchgeführt:

Primer	Sequenz	Molekulare Masse
Integrin $\alpha 10$ forward	AGA AAA CAC AGC CCA GAC C	5769,8 µg/µmol
Integrin $\alpha 10$ reverse	TGA ACC AGC CTC AAT AGT CC	6047,0 µg/µmol
Collagen IV $\alpha 1$ forward	GCA CAG CCA GAC CAT TCA GA	6081,0 µg/µmol
Collagen IV $\alpha 1$ reverse	CTA TGG TGG CGA GCC AAA AG	6192,0 µg/µmol
Collagen X $\alpha 1$ forward	AAT GCC GAG TCA AAT GGC CT	6127,0 µg/µmol
Collagen X $\alpha 1$ reverse	TCA GGG GGA AGG TTT GTT GG	6285,0 µg/µmol
Osteopontin forward	CAC TCC AGT TGT CCC CAC AG	5999,0 µg/µmol
Osteopontin reverse	AAC GGG GAT GGC CTT GTA TG	6214,0 µg/µmol

Periostin forward	CAG CAG ACA CAC CTG TTG GA	6112,0 µg/µmol
Periostin reverse	TTG TTA GTG TGG GTC CTT CAG T	6779,4 µg/µmol
Superoxiddismutase 3 forward	CTC TGA GGT CTC ACC TTC GC	6021,0 µg/µmol
Superoxiddismutase 3 reverse	AGT CTC AGG GCT TAT GGG GT	6205,0 µg/µmol
CXC12 forward	TGA GCT ACA GAT GCC CAT GC	6103,0 µg/µmol
CXC12 reverse	TAG CTT CGG GTC AAT GCA CA	6118,0 µg/µmol
Toll-like Receptor 4 forward	GAA GGG GTG CCT CCA TTT CA	6134,0 µg/µmol
Toll-like Receptor 4 reverse	GGG TCT TCT CCA CCT TCT GC	6012,0 µg/µmol
Fibronectin forward	TCT GAC AGG CCT CAC CAG AG	6088,0 µg/µmol
Fibronectin reverse	GTG TAG GGG TCA AAG CAC GA	6232,0 µg/µmol

4.4.1 RNA Isolation und cDNA Synthese

Die RNA-Isolation erfolgte nach der Guanidinium Thiocyanate/Phenol/Chloroform Extraktionsmethode (Chomczynski und Sacchi, 1987).

Zur Charakterisierung der primären Zellen wurde für die RNA-Isolation jeweils der Inhalt eines Kryos einer Zelllinie in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und bei 800 rpm für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und das Zellpellet wurde mit 1000 µl TRIzol Reagent® (von Ambion® by Life Technologies, Darmstadt, D) gelöst und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Das dabei enthaltene Guanidiniumthiocyanat diente der Zellyse sowie RNase-Inaktivierung und Phenol der Lösung der RNA. Nach der Inkubation der Proben wurden den Eppendorf-Reaktionsgefäßen 200 µl Chloroform hinzugegeben, sie wurden für 15 s geschüttelt; 3 min inkubiert und 15 min bei 4 °C und 12000 g (Eppendorf) zur Phasentrennung zentrifugiert. Nach der Auftrennung in 3 Phasen (obere wässrige Phase RNA, Interphase DNA, Chloroformphase Proteine) erfolgte die Präzipitation der RNA durch das Mischen von 500 µl der oberen wässrigen Phase mit 500 µl Isopropanol, Vortexen und Zentrifugieren für 10 min bei 4 °C und 10000 g. Nach 2 maligem Waschen mit 75-prozentigem Ethanol und Zentrifugieren für 5 min bei 4 °C und 10000 g sowie 30

minütigem Trocknen erfolgte das Resuspendieren der RNA in RNase-freiem Wasser (Destilled Water DNase/RNase free, Gibco) auf Eis. Die RNA Konzentrationsbestimmung erfolgte spektrophotometrisch mit dem NANODROP 2000 (von Thermo Scientific, Braunschweig, D).

Für die cDNA-Synthese wurden 800 ng RNA je Probe auf Eis mit RNase-freiem Wasser auf 24,2 µl verdünnt und mit 5,8 µl Mastermix umgeschrieben.

Die Amplifizierung von komplementärer DNA erfolgte unter Verwendung von Molony Murine Leukemia Virus Reverse Transkriptase nach dem abgebildeten Protokoll:

Mastermix Komponente	µl pro Reaktion für 1 Probe
10 x Reverse Transkriptase Puffer	2
25 x dNTP's	0,8
10 x Random Primer	2
Multi Scribe Reverse Transkriptase (50 U/µl)	1
Gesamtvolumen	5,8

Die Synthese erfolgte im Thermocycler für 10 min bei 25 °C, 2 h bei 37 °C, 5 s bei 85 °C. Die cDNA-Proben wurden bei 4 °C gelagert.

4.4.2 PCR

Die Grundvorgänge der PCR ähneln der natürlichen Replikation. Bei der natürlichen Replikation wird ein neuer DNA-Strang an einer einzelsträngigen Nucleinsäurematrize mit Hilfe von Startermolekülen und einer DNA-Polymerase synthetisiert, eine Template-DNA. Die PCR nutzt synthetische DNA-Oligonucleotide (Primer) als Start- und Stoppmoleküle, die an die einzelsträngige Template-DNA binden und von deren 3'-Ende eine hitzestabile DNA-Polymerase den neuen DNA-Strang synthetisiert. Durch die initiale Denaturierung wird die DNA aufgeschmolzen und es entstehen einzelsträngige DNA-Templates. Die Amplifikation erfolgt mit Hilfe der Taq-Polymerase und beginnt nach der spezifischen Primer-Hybridisierung durch Basenpaarung. Eigentliches Prinzip der PCR ist die

zyklische Wiederholung der Reaktionsschritte und dadurch die exponentielle Amplifikation der Matrize.

Dafür wurden zuerst die Mastermixe nach dem folgenden Protokoll für jeden Primer auf Eis angesetzt:

Mastermix für 1 Probe	Menge in μl
10-fach Puffer	2,5
MgCl ₂	0,75
dNTP's	2,5
Primer 1 forward	1,25
Primer 2 reverse	1,25
Taq-Polymerase	0,25
RNase freies Wasser	14,5
Summe	23

Diese wurden in 200 μl RNase freie Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt. Daraufhin wurden 2 μl Probe in die Reaktionsgefäße pipettiert. Nach sorgfältigem Mischen und kurzer Zentrifugation wurden die Proben in den Thermocycler überführt und nach folgendem PCR-Thermocycler-Programm amplifiziert.

1. Initiale Denaturierung bei 96 °C für 5 min
2. Denaturierung bei 96 °C für 30 s
3. Primer-Hybridisierung bei 60 °C für 45 s
4. Polymerisation bei 72 °C für 30 s
5. Wiederholung der Schritte 2-4, 39-mal
6. Abschließende Polymerisation bei 72 °C für 10 min

Nach Beendigung des Thermocycler-Programms wurden die Proben bei 4 °C gelagert oder direkt gelelektrophoretisch analysiert.

4.4.3 Agarose-Gelelektrophorese

Für die Agarose-Gelelektrophorese wurden aus 150 ml TAE-Puffer, 3000 mg Agarose und 15 µl Ethidiumbromid vor Ort 2 %ige Gele nach Erhitzung in einer Gel-Gießvorrichtung mit Einsteckkämmen für die Geltaschen möglichst luftblasenfrei gegossen. Nach der 30-minütigen Polymerisation wurde das Agarosegel in die Elektrophoresekammer überführt. Die Elektrophoresestation wurde soweit mit TAE-Puffer aufgefüllt, dass die Geltaschen nicht überflutet wurden und das Gel mit 25 µl 100 bp DNA-Leiter und jeweils 25 µl Probe trocken beladen werden konnte. Die Elektrophorese wurde für 2 min bei einer Spannung von 100 V mit dem Bio RAD Power Pac 3000 gestartet. Daraufhin wurde das Agarosegel in der Gelelektrophoresekammer mit TAE-Puffer geflutet und lief für weitere 30 min bei einer Spannung von 100 V. Das Ergebnis der Gelelektrophorese wurde unter UV-Licht mit dem Bio Doc-It™ Imaging System betrachtet und visualisiert.

4.5 **Limulus Assay und Zytotoxizitätstest**

4.5.1 Limulus Assay

Um eine Endotoxinbelastung des Mediums sowie des Fetalen Bovine Serums oder eine LPS-Belastung der Metallionenstocklösungen und eine Beeinflussung der Stimulationsversuche auszuschließen, wurden Limulus LAL Assays (Lonza, Köln, D) durchgeführt.

Das Limulus LAL Assay ist ein quantitativer Test zur bakteriellen Endotoxinbestimmung. Die Verwendung von Limulus-Amöbocyten-Lysat beruht auf der Beobachtung, dass eine Infektion des *Limulus polyphemus* (Pfeilschwanzkrebse) mit den Endotoxinen (LPS) gramnegativer Bakterien zu einer intravaskulären Koagulation, der im Blut vorkommenden Amöbocyten führt (Bang, 1956; Laemmli, 1970; Young et al., 1972). Der verwendete Limulus LAL Test (Limulus Amebocyte Lysate (LAL) QCL 1000™ von Lonza) nutzt die initiale LAL Reaktion, um ein Enzym zu aktivieren, welches daraufhin aus einem synthetischen Substrat p-Nitroaniline abgibt und in Abhängigkeit von der vorhandenen Endotoxinkonzentration eine gelbe Farbreaktion provoziert. Die Farbreaktion kann dann photometrisch mittels eines Microplate Readers detektiert werden.

Dafür wurden zuerst 4 Endotoxinstandards der Konzentrationen von 1,0 EU/ml, 0,5 EU/ml, 0,25 EU/ml und 0,1 EU/ml durch Verdünnung mit LAL Reagenz Wasser hergestellt. Die Proben und Standards wurden nach dem folgenden Protokoll auf eine 96-Well Platte gegeben und inkubiert:

	Probe	Negativkontrolle
Probe und Standard bei einer Temperatur von 20-25 °C	50 µl	
LAL Reagenz Wasser		50 µl
LAL	50 µl	50 µl
Inkubation bei einer Temperatur von 37 °C	10 min	10 min
Substratlösung bei einer Temperatur von 37 °C	100 µl	100 µl
Inkubation bei einer Temperatur von 37 °C	6 min	6 min
Stopplösung (25 %ige Essigsäure)	100 µl	100 µl

Nach dem Stoppen dieser Reaktion erfolgten die photometrische Messung bei einer Wellenlänge von 405-410 nm und die Bestimmung der Endotoxinkonzentrationen in Abhängigkeit von den Extinktionswerten der Endotoxinstandards mit Hilfe eines Microplate Readers, Asys Hitech Expert 96 (Biochrom, Bremen, D). Die Korrelation zwischen der Extinktion und der Endotoxinkonzentration erstreckt sich im linearen Bereich von 0.1-1.0 EU/ml.

Die Untersuchung des Mediums zusammen mit 3 verschiedenen FBS ergab bei allen Seren eine Endotoxinbelastung von ca. 0,1 EU/ml, was 0,01-0,02 ng Endotoxin pro ml entspricht und zu vernachlässigen ist. Bei der Betrachtung der Seren allein gab es unterschiedliche Endotoxinexpressionen, dabei war im FBS1 mit 0,177 EU/ml und somit 0,0177-0,0354 ng Endotoxin pro ml die geringste Endotoxinkonzentration messbar und im FBS3 die höchste mit 0,244 EU/ml, also 0,0244-0,0488 ng Endotoxin pro ml. Aufgrund dessen wurde für die Kultur der humanen gingivalen und dermalen Fibroblasten und die durchzuführenden weiteren Versuche nur das FBS1 verwendet.

Bei der Untersuchung der Metallionenstocklösung war ebenfalls keine Endotoxinbelastung feststellbar.

4.5.2 XTT-Zytotoxizitätstest

Der XTT-Zytotoxizitätstest wurde verwendet, um die Überlebensrate und Proliferation der gingivalen und dermalen Zellen bei bestimmten Nickelkonzentrationen zu testen. Dabei wurde besonders der LD₅₀-Wert (Lethale Dosis 50 Wert) betrachtet, welcher die Toxizität der Konzentration einer Substanz angibt, die die Überlebensrate der Zellen auf 50 % senkt.

Der XTT Zellviabilitätstest (PromoKine, Heidelberg, D) ist ein colorimetrisches Versuchssystem, welches die Reduktion von schwach rot gefärbtem Tetrazoliumsalz in dunkelrotes Formazan durch die Mitochondrien lebender Zellen spektrophotometrisch misst. Der XTT-Test weist also indirekt die Glykolyserate lebender Zellen nach. Dabei ist die Menge der entstandenen Farbe direkt proportional zur Anzahl lebender Zellen.

Zur Versuchsdurchführung wurden 3 gingivale Zelllinien gepoolt. Diese wuchsen bis zum Erreichen 90 %iger Konfluenz in sterilen Zellkulturflaschen heran. Dann wurden sie mit 7 ml sterilem PBS unter der Sicherheitswerkbank gewaschen und danach mit 2 ml Trypsin (1x) pro konfluenter Zellkulturflasche gelöst. Unter Zugabe von 8 ml Zellnährmedium wurden sie durch Auf- und Abpipettieren mit Hilfe einer serologischen Pipette und einer Pipettierhilfe in einen 50 ml Falcon überführt. Um die Trypsinreste zu entfernen, wurden die Zellen bei 800 rpm für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen, das Zellpellet wurde in 2 ml Zellnährmedium resuspendiert und die Zellzahl wurde mit Hilfe einer Neubauerkammer bestimmt. Dafür wurden 10 µl Zellsuspension in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und mit 10 µl Trypanblau gemischt. Zum Zählen wurden 10 µl in die Neubauerkammer gegeben und unter Berücksichtigung der Verdünnung (1:2) wurde die Zellzahl bestimmt.

$$\text{Zellzahl} = \frac{\text{Summe der gezählten Zellen}}{4} * 10000 * 2 (\text{Verdünnung}) = x \text{ Zellen pro ml}$$

Für den Zytotoxizitätstest wurden die Zellen auf eine 96-Well Mikrotiterplatte zu 5000 Zellen pro Well in 100 µl zellspezifischem Nährmedium ausgesät, dabei wurden 8 Wells als Kontrolle ohne Zellen benutzt, und einen Tag im Inkubator bei einer Temperatur von 37 °C und einer CO₂-Konzentration von 5 % inkubiert. Nach 24 Stunden wurde ein Mediumwechsel der Wells vorgenommen und die Stimulation erfolgte mit 1 µmol/l –

100000 $\mu\text{mol/l}$ Nickelchlorid (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, D) in 10er Potenzen. Zudem dienten 8 Wells als Negativ- (DMSO-Wells), 8 Wells als Positivkontrolle (Wells mit Zellen ohne Konzentration) und weitere 8 Wells wurden nur mit Medium gefüllt. Nach der Stimulation erfolgte die weitere Inkubation unter normoxischen Bedingungen (20,9 % O_2) für 24 h. Danach wurden 25 μl XTT Reaktionslösung (bestehend aus 5 ml XTT und 25 μl Activation Solution für 2 Platten) in jedes Well gegeben. Die spektrophotometrischen Messungen mit Hilfe eines Microplate Readers (Asys Hitech Expert 96) bei einer Wellenlänge von 450 nm und einer Wellenlängenkorrektur von 690 nm erfolgten nach 2 h, 4 h, 6 h und 24 h. Die Zellviabilität und der LD_{50} -Wert wurden in Abhängigkeit von den Extinktionswerten bestimmt.

Es wurden 2-fach Bestimmungen in 3 unabhängigen Versuchen pro angegebene Nickelkonzentration vorgenommen. Zur graphischen Darstellung wurde der Mittelwert der nur mit Medium gefüllten Wells von den Absorptionswerten der verschiedenen Stimulationen abgezogen. Diese Werte wurden wiederum auf die Kontrolle normiert, welche auf 100 % gesetzt wurde. Der nun erhaltene prozentuale Anteil lebender Zellen (Mittelwerte und Standardabweichungen) wurde in GraphPad Prism eingepflegt und mit Hilfe einer nicht-linearen Regressionsfunktion dargestellt.

4.6 Stimulationsexperimente

Die Stimulation der gingivalen und dermalen Fibroblasten erfolgte mit Nickelchlorid. Nach der Charakterisierung wurden 3 gingivale Zelllinien mit ähnlichen Charakterisierungsmerkmalen für die Stimationsversuche ausgewählt und gepoolt. Dafür wurden die in Zellkulturflaschen kultivierten Fibroblasten auf 6-Well Platten in steriler Umgebung unter der Sicherheitswerkbank (Herasafe-Heraeus Instruments) ausgesät. Dies geschah nach dem Waschen mit sterilem PBS, anschließender Trypsinierung und dem Zählen der Zellen mit Hilfe einer Neubauerkammer, wie bereits zuvor beschrieben. Es wurde mit 120000 Zellen und 2 ml zellspezifischem Nährmedium pro Well gearbeitet. Die Konzentrationen der angesetzten Stocklösungen betragen 1000 $\mu\text{mol/l}$, 10000 $\mu\text{mol/l}$ und 100000 $\mu\text{mol/l}$. Die Endkonzentrationen betragen 1 $\mu\text{mol/l}$, 10 $\mu\text{mol/l}$, 100 $\mu\text{mol/l}$ und 1000 $\mu\text{mol/l}$, bezogen auf ein mit 1 ml Zellnährmedium gefülltes Well (Abb. 5).

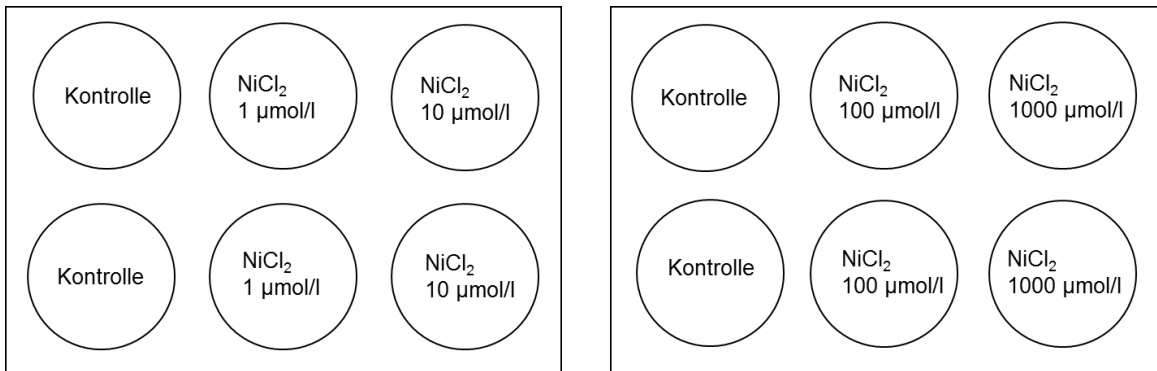


Abb. 5: Belegungsplan der Stimulationsexperimente

Es wurden verschiedene Konzentrationen verwendet um die Ergebnisse der Zytotoxizitätstests auf mRNA-Ebene zu bestätigen. Außerdem wurde die Stimulation nach 2 h, 4 h, 6 h und 24 h miteinander verglichen. Die Inkubation erfolgte bei einer Temperatur von 37 °C, einer CO₂-Konzentration von 5 % und einer Sauerstoffkonzentration von 20 %.

Die Stimulation wurde als Doppelbestimmung (n = 2) für die Zeitpunkte: 2 h, 4 h, 6 h, 24 h pro Zelllinie durchgeführt. Nach den ersten Stimulationsversuchen und Ergebnissen auf mRNA-Ebene wurde die Stimulation, aufgrund der aussagekräftigsten Unterschiede zwischen dermalen und gingivalen Fibroblasten mit 100 µmol/l Nickelchlorid und der Tatsache, dass toxische Effekte (siehe Kapitel 4.5) bei dieser Nickelionenkonzentration ausgeschlossen werden konnten, im Hauptexperiment auf diese Konzentration begrenzt.

4.7 Genexpressionsanalyse

4.7.1 RNA-Isolation und cDNA Synthese

Die RNA-Isolation aus den Stimulationsversuchen erfolgte mit 1000 µl TRIzol Reagent® (Ambion® by Life Technologies) pro Well, wie unter Punkt 4.4.1 bereits angegeben. Danach wurde die in TRIzol gelöste Zellsuspension in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Wenn eine Weiterverarbeitung nicht möglich war, wurden die Proben bei -80 °C eingefroren und das Protokoll zu einem späteren Zeitpunkt fortgesetzt. Die cDNA-Synthese erfolgte, wie bereits zuvor beschrieben.

4.7.2 Quantitative Real-Time-PCR

Zum Nachweis von inflammatorischen und antiinflammatorischen Zytokinen (IL-1 β , IL-10, IL-8), von HIF-Signalmolekülen (HIF-1 α , Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)), von Molekülen der Immunmodulation (IL-17, TGF- β) und von Chemokinen (CCL20) wurden quantitative Real-Time Polymerase-Kettenreaktionen (RT-PCR) durchgeführt.

Die Quantitative RT-PCR dient dem Nachweis einer spezifischen mRNA, welche die von einer Zelle exprimierten Proteine kodiert. Sie beschreibt die Verwendung der Reversen Transkription in Verbindung mit einer Polymerase Kettenreaktion. Dabei erfolgt die relative Quantifizierung durch eine Normierung auf ein nicht reguliertes Housekeeping Gen (18S). Die Vorteile liegen dabei in der Reduzierung der Varianz der Expressionsergebnisse (Pfaffl, 2004).

Die PCR erfolgte im Viia 7 von Applied Biosystems unter Verwendung von Fluorophor-gekoppelten TaqMan-Sonden. Dabei binden während der Annealingphase neben den sequenzspezifischen Primern auch die sequenzspezifischen fluoreszenzmarkierten Sonden. Durch die TaqMan-Sonden findet zuerst keine Fluoreszenzemissionen statt, da der sondengebundene Quencher diese unterdrückt. Bei der Zweitstrangsynthese wird die Fluoreszenzsonde nun durch die 5'-3'-Exonukleaseaktivität der Taq Polymerase hydrolytisch gespalten. Eine Trennung von Quencher und Reporter erfolgt, woraufhin eine Anregung des Reporters zu einer Fluoreszenzemission einer bestimmten Wellenlänge führt. Je mehr DNA synthetisiert wird, desto mehr Reportermoleküle werden freigesetzt und desto mehr Fluoreszenzemissionen finden statt. Es besteht eine Proportionalität zwischen der Menge der neu gebildeten DNA-Stränge und der Menge an Ausgangs-DNA. Dies wurde in 40 Zyklen wiederholt und die Fluoreszenz mit dem Real-Time PCR System Viia 7 von Applied Biosystems gemessen.

Als Richtmaß für die Quantifizierung dienen die Crossing Points (CT), die der Anzahl der PCR Zyklen entsprechen, die benötigt werden, um ein konstant definiertes Fluoreszenzniveau zu erhalten. Bei potenziell 100 %iger Effizienz verdoppelt sich nach jedem PCR Zyklus die Produktmenge der DNA und dadurch auch das Fluoreszenzsignal. Zur Berechnung des Expressionsunterschiedes wurde zuerst der CT Wert des Referenzgens vom CT Wert des Zielgens abgezogen:

$$\Delta CT = CT \text{ Zielgen} - CT \text{ Referenzgen}$$

Danach erfolgte die Subtraktion des ΔCT Wertes der Negativkontrolle vom ΔCT Wert der stimulierten Probe:

$$\Delta\Delta CT = \Delta CT \text{ Stimulation} - \Delta CT \text{ Kontrolle}$$

und die Auswertung mit Microsoft Excel sowie die Übertragung in GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

Versuchsdurchführung

Für die Versuchsdurchführung wurde zuerst ein Mastermix mit der entsprechenden TaqMan Sonde, RNase-freiem Wasser (Distilled Water DNase/RNase free) und TaqMan® Gene Expression MasterMix (Applied Biosystems) auf Eis nach dem folgenden Protokoll (Tabelle 5) angesetzt:

Mastermix Quantitative RT-PCR	Für eine Probe (Dreifachbestimmung)
TaqMan® Gene Expression MasterMix	16,83 μ l
TaqMan Sonde	1,68 μ l
DEPC Wasser	8,49 μ l
Summe	27 μ l

Danach wurden 27 μ l Mastermix und 6,65 μ l cDNA der Probe auf Eis in ein 0,2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß gegeben. Dies wurde für alle Proben der Stimulationsexperimente durchgeführt. Nach dem Vortexen und Zentrifugieren erfolgte die Überführung von jeweils 10 μ l für eine Dreifachbestimmung auf eine 384-Well PCR Platte mit einer Matrix Electronic Multichannel Pipette (Thermo Scientific).

Die PCR-Zyklen gliederten sich wie folgt:

1. Initiale Denaturierung bei 50 °C für 2 min
2. Hot Start Denaturierung bei 96 °C für 10 min
3. Denaturierung bei 95 °C für 15 s

4. Primer-Hybridisierung und Polymerisation bei 60 °C für 1 min

5. Wiederholung der Schritte 3-4, 39 Mal

Die Fluoreszenzmessung erfolgte durch das Real-Time PCR System Viiia 7 von Applied Biosystems.

Folgende TaqMAN-Sonden wurden benutzt:

Housekeeping Gen	RPS18: Hs 02387368-g1
NF-κB Zielgene	IL-1β: Hs 00174097-m1
	IL-8: Hs 00174103-m1
	IL-10: Hs 00174086-m1
HIF Zielgene	HIF-1α: Hs 00153153-m1
	VEGFA: Hs 0090055-m1
Immunmodulation	IL-17A: Hs 00174383-m1
	TGF1: Hs 00545014-m1
Chemokin	CCL20: Hs 01011368-m1

4.8 Proteinanalyse

4.8.1 Enzyme-linked Immunosorbent Assays (ELISA)

Zur Ergänzung der über die PCR-Analyse gesammelten Daten und um zu evaluieren, ob die gesteigerte Genexpression auch eine gesteigerte Proteinfreisetzung mit sich zieht, wurden Enzyme-linked Immunosorbent Assays (ELISA) durchgeführt. Dafür wurden Sandwich-ELISA's mit jeweils 2 spezifisch bindenden Antikörpern für folgende Proteine benutzt:

IL-1β (Human IL-1β ELISA Set II von BD Biosciences OptEIA, Heidelberg, D)

VEGF (Human VEGF von R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt, D)

CCL20 (Human CCL20 / MIP-3α von R&D Systems)

IL-10 (Human IL-10 ELISA Set von BD Biosciences OptEIA)

Der ELISA ist ein antikörperbasierter Immunassay mit enzymatischer Farbreaktion.

Aufgrund der Ergebnisse der Genexpressionsanalyse wurden nur die Mediumüberstände der Negativkontrollen und Konzentration von 100 µmol/ml Nickelchlorid der Stimulationsexperimente berücksichtigt. Diese wurden nach der Stimulation und vor der RNA-Isolation abgenommen, in neue Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt und bei -80 °C gelagert.

Die Standards, eine Negativkontrolle und die Proben wurden entsprechend des Belegungsplanes für eine Doppelbestimmung auf eine 96-Well Mikrotiterplatte aufgebracht (100 µl pro Well).

Belegungsplan jeweils für gingivale und dermale Fibroblasten (im Versuch als Doppelbestimmung):

Standard	HDF 4h Kontrolle 1	HDF 6h NiCl ₂ 100µl1	HGF 4h Kontrolle 1	HGF 6h NiCl ₂ 100µl1
Standard 2	HDF 4h Kontrolle 2	HDF 6h NiCl ₂ 100µl 2	HGF 4h Kontrolle 2	HGF 6h NiCl ₂ 100µl 2
Standard 3	HDF 6h Kontrolle 1	HDF 24h NiCl ₂ 100µl 1	HGF 6h Kontrolle 1	HGF 24h NiCl ₂ 100µl 1
Standard 4	HDF 6h Kontrolle 2	HDF 24h NiCl ₂ 100µl 2	HGF 6h Kontrolle 2	HGF 24h NiCl ₂ 100µl 2
Standard 5	HDF 24h Kontrolle 1		HGF 24h Kontrolle 1	
Standard 6	HDF 24h Kontrolle 2		HGF 24h Kontrolle 2	
Standard 7	HDF 4h NiCl ₂ 100µl 1		HGF 4h NiCl ₂ 100µl 1	
Negativkontrolle	HDF 4h NiCl ₂ 100µl 2		HGF 4h NiCl ₂ 100µl 2	

Zuerst wurde der Primärantikörper (Capture Antibody) entsprechend der angegebenen Herstellerkonzentration gelöst und eine 96-Well Mikrotiterplatte mit 100 µl pro Well beschichtet. Hierzu sollte die Gebrauchslösung des Primärantikörpers eine Konzentration von 1 µg/ml für den VEGF-ELISA und 2 µg/ml für den CCL20-ELISA, gelöst in einer phosphatgepufferten Salzlösung (PBS), aufweisen. Der Primärantikörper des IL-1β- und IL-10-ELISA's wurde in einer Konzentration von 1:250 in Coating Buffer (0.1 M Natrium Carbonat, 7.13 g NaHCO₃, 1.59 g Na₂CO₃ in 1 l bidestilliertem Wasser, mit einem pH-

Wert von 9,5) gelöst. Die beschichteten IL-1 β und IL-10 Mikrotiterplatten wurden bei 4°C über Nacht inkubiert und mit Klebestreifen abgedeckt, VEGF und CCL20 bei Raumtemperatur. Am nächsten Morgen wurden die mit Capture-Antibody-Lösung beschichteten Mikrotiterplatten ausgeklopft und mit einem ELISA Microplate-Washer (ASYSHitech by Biochrom, Bremen, D) mit jeweils 400 μ l Waschpuffer (phosphatgepufferten Salzlösung und 0,05 % Tween) pro Well 5-mal gewaschen. Um freie Proteinbindungsstellen der Mikrotiterplatten zu blockieren, wurden die Platten für eine Stunde mit 300 μ l Reagent Diluent (PBS und 1 % Bovines Serumalbumin für VEGF- und CCL20-ELISA) oder 200 μ l Assay Diluent (PBS und 10 % FBS für IL-1 β - und IL-10-ELISA) bei Raumtemperatur blockiert. Währenddessen wurden die Standards vorbereitet. Zur Erstellung der Standards wurden die Standardreihen entsprechend der Herstellerangaben angesetzt und jeweils 1:2 verdünnt.

Standardreihe IL-1 β :

250 pg/ml \rightarrow 125 pg/ml \rightarrow 62,5 pg/ml \rightarrow 31,3 pg/ml \rightarrow 15,6 pg/ml \rightarrow 7,8 pg/ml \rightarrow 3,9 pg/ml

Standardreihe VEGF:

2000 pg/ml \rightarrow 1000 pg/ml \rightarrow 500 pg/ml \rightarrow 250 pg/ml \rightarrow 125 pg/ml \rightarrow 62,5 pg/ml \rightarrow 31,3 pg/ml

Standardreihe CCL20:

1000 pg/ml \rightarrow 500 pg/ml \rightarrow 250 pg/ml \rightarrow 125 pg/ml \rightarrow 62,5 pg/ml \rightarrow 31,3 pg/ml \rightarrow 15,6 pg/ml

Standardreihe IL-10:

500 pg/ml \rightarrow 250 pg/ml \rightarrow 125 pg/ml \rightarrow 62,5 pg/ml \rightarrow 31,3 pg/ml \rightarrow 15,6 pg/ml \rightarrow 7,8 pg/ml

Nach dem Blockieren erfolgte ein weiterer Waschvorgang, wie zuvor beschrieben. Die Standards, eine Negativkontrolle und die Proben wurden entsprechend des Belegungsplanes für eine Doppelbestimmung auf eine 96-Well Mikrotiterplatte aufgebracht (100 μ l pro Well).

Nach einer Inkubationszeit von 2 h erfolgten ein erneuter Waschvorgang und die Vorbereitung des Zweitantikörpers (Detection Antibody). Die Gebrauchslösung des Zweitantikörpers sollte eine Konzentration von 0,1 μ g/ml für den VEGF-ELISA und 0,025

$\mu\text{g/ml}$ für den CCL20-ELISA, gelöst in Reagent Diluent, aufweisen. Der Sekundärantikörper des IL-1 β -ELISA wurde in einer Konzentration von 2 $\mu\text{g/ml}$ in Assay Diluent gelöst. Zum IL-10-ELISA wurde der Sekundärantikörper in einer Konzentration von 1:1000 in Assay Diluent und die Streptavidin-Horseradish Peroxidase in einer Konzentration von 1:250 gegeben. Es wurden 100 μl pro Well auf die 96-Well Mikrotiterplatte gegeben und 1 h (IL-1 β , IL-10) bzw. 2 h (VEGF, CCL20) inkubiert. Auf eine erneute Waschung folgte zur Signalverstärkung die Inkubation mit Streptavidin-gekoppelter Meerrettichperoxidase in einer Konzentration von 1:250 gelöst in Assay Diluent für 30 min (IL-1 β) oder einer Konzentration von 1:200 gelöst in Reagent Diluent für 20 min (VEGF, CCL20) im Dunkeln. Nach erneuter Waschung wurden 100 μl Substratlösung, bestehend aus einem Farbreagent A (H_2O_2) und Farbreagent B (Tetramethylbenzidine), auf die 96-Well Mikrotiterplatten gegeben und für 20-30 min, abhängig vom Farbumschlag der Standards, im Dunkeln inkubiert. Zum Abstoppen des Farbumschlages wurden 50 μl 2 N Schwefelsäure in jedes Well gegeben. Die Extinktionsmessung erfolgte bei 450 nm mit einer Wellenlängenkorrektur bei 540 nm und die Antigenkonzentrationen in Abhängigkeit von den Extinktionswerten der Antigenstandards wurden bestimmt.

4.8.2 Western Blot

Beruhend auf der Ausgangshypothese, dass gingivale Epithelzellen eine andere Immunreaktion auf Nickelionen als dermale Epithelzellen aufweisen, sollten deren Effekte unter besonderer Berücksichtigung der Signaltransduktionswege der Transkriptionsfaktoren NF- κB und HIF-1 α mit Hilfe des Western Blot-Systems verglichen werden. Untersucht wurden nukleäre Proteine humaner dermaler und gingivaler Fibroblasten nach 4 h unter Zugabe von 100 $\mu\text{mol/l}$ Nickelchlorid. Unstimulierte Fibroblasten dienten als Kontrolle. Dimethyloxaloylglycine (DMOG), ein Inhibitor der Prolyl-Hydroxylase (PHD) und der Asparaginyln-Hydroxylase Factor inhibiting HIF (FIH), welche eine Hochregulation von HIF-1 α verursachen, wurden als Positivkontrolle für die HIF-1 α Detektion verwendet. LPS des gramnegativen Bakteriums *Escherichia coli* (*E. coli*), ein TLR4 Agonist, der zu einer nukleären Akkumulation von NF- κB führt, diente wiederum als Positivkontrolle für die NF- κB Detektion.

4.8.2.1 Proteinextraktion

Die Proteinextraktion erfolgte mit dem NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents Kit (Thermo Scientific, Braunschweig, D). Dies ermöglichte die schrittweise Trennung von Zytoplasma- und Kernfraktion. Laut Herstelleranweisung sollen adhärenente Zellen mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) gewaschen, anschließend mit Trypsin-EDTA gelöst, zu einem Zellpellet bei 500 g für 5 min zentrifugiert, wieder mit PBS gewaschen und bei 500 g für 2-3 min zentrifugiert werden, sodass der Überstand abgenommen werden kann. Da die nachzuweisenden Proteine HIF-1 α und NF- κ B eine sehr kurze Halbwertszeit haben, wurde auf diese Schritte verzichtet. Stattdessen wurde sofort das Zellmedium abgesaugt und 200 μ l Cytoplasmic Extraction Reagent I und 20 μ l Proteaseinhibitor auf Eis in die 6-Well-Platte gegeben. Danach wurden die Zellen mit einem Zellschaber gelöst und in Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt. Nach 15 s Vortexen wurden die Reaktionsgefäße 10 min auf Eis inkubiert. Daraufhin wurden 11 μ l Cytoplasmic Extraction Reagent II hinzugegeben, 5 s gevortext und 1 min auf Eis inkubiert. Nach erneutem Vortexen für 5 s wurden die Eppendorf-Reaktionsgefäße für 5 min bei 16000 g zentrifugiert. Die Zugabe der ersten 2 Reagenzien führte zur Diskontinuität der Zellmembranen und zum Freisetzen der zytoplasmatischen Zellbestandteile. Dieser Überstand wurde in neue Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt und bei -80 °C weggefroren. Durch Zugabe von 100 μ l Nuclear Extraction Reagent und 10 μ l Proteaseinhibitor, 15 s Vortexen alle 10 min für insgesamt 40 min und Zentrifugieren bei 16000 g für 10 min wurde auch die nukleäre Zellfraktion gewonnen, in Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt und bei -80 °C weggefroren.

4.8.2.2 Bicinchoninsäure-Test (BCA-Test)

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration der gewonnenen Proben wurde das BCA Protein Assay Kit von Thermo Scientific Pierce verwendet, beruhend auf der Tatsache, dass Proteine mit 2 oder mehr Peptidbindungen in alkalischer Lösung mit zweiwertigen Kupferionen einen blauen Farbkomplex bilden (Biuret Reaktion), wobei die zweiwertigen Kupferionen zu einwertigen Kupferionen reduziert werden. Die einwertigen Kupferionen bilden daraufhin mit Bicinchoninsäure (BCA) einen violetten Farbkomplex. Nach der photometrischen Messung bei einer Wellenlänge von 562 nm kann so die

Proteinkonzentration in Abhängigkeit von den Extinktionswerten einer Standardkurve bestimmt werden. Bei diesem Assay liegt die untere Nachweisgrenze bei 5 µg/ml.

Zuerst wurden aus Rinderserumalbumin 7 Protein-Standards mit Konzentrationen von 2000 mg/ml, 1000 mg/ml, 500 mg/ml, 250 mg/ml, 125 mg/ml, 62,5 mg/ml und 31,25 mg/ml durch Verdünnung mit bidestilliertem Wasser hergestellt. Die Proben und Standards wurden nach dem folgenden Protokoll für eine Doppelbestimmung jeweils für die Nucleusfraktion und die Zytosolfraktion auf eine 96-Well Platte gegeben.

Dafür wurden 10 µl Standard und 10 µl Probe 1:10 verdünnt auf eine 96-Well Platte gegeben und 200 µl Working Reagent, d.h. eine 1:50 Lösung aus Reagent A und Reagent B, in jedes Well pipettiert. Nach 30 minütiger Inkubation bei 37 °C im Brutschrank erfolgten die photometrische Messung bei einer Wellenlänge von 540 nm und die Bestimmung der Proteinkonzentration in Abhängigkeit von den Extinktionswerten der Standards. Für den Proteinnachweis im Westernblotverfahren wurden 20 µg Protein pro zu untersuchender Probe eingesetzt.

4.8.2.3 Proteinanalyse Western Blot

Zur Vorbereitung des Western Blots wurden die Proben in der davor durch den BCA errechneten Konzentration mit 5-fach Laemmli Puffer verdünnt und 5 min im Thermomixer aufgeköcht, um eventuelle Proteasen zu inaktivieren, Disulfidbrückenbindungen (durch β-Mercaptoethanol), Proteinsekundärstrukturen und -tertiärstrukturen aufzulösen. Die denaturierenden Polyacrylamidgele wurden entsprechend der Größe der nachzuweisenden Proteine selbst gegossen. Für eine Proteingröße von 120kD (HIF-1α) und 65 kD (NF-κB) wurden Gele mit einer Polyacrylamidkonzentration von 10 % im Trenngel angefertigt, die benötigten Puffer wurden immer frisch angesetzt (Apparaturen und Platten von Bio-Rad).

Trenngel 10 %ig	Bidest. Wasser	4,9 ml
	30 % Acrylamid Bis Solution	2,5 ml
	1,5 M Tris	2,5 ml
	10 % SDS	100 µl
	10 % Ammoniumpersulfat	100 µl
	Tetramethylethylenediamine (TEMED)	10 µl

Sammelgel 5 %ig	Bidest. Wasser	3,13 µl
	30 % Acrylamid Bis Solution	0,625 µl
	0,5 M Tris	1,25 µl
	10 % SDS	50 µl
	10 % Ammoniumpersulfat	50 µl
	TEMED	10 µl

SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Für die Elektrophorese wurden die Gele in die Elektrophoreseeinheit eingebaut, innere und äußere Kammern mit 1-fach Laufpuffer gefüllt und die Gele mit der Proteinleiter (PageRuler Prestained Protein Ladder von Thermo Scientific) und den mit Laemmli versetzten Proben nass beladen (Laemmli, 1970). Die Elektrophorese und damit das größenabhängige Wandern der negativ geladenen Proteine durch das denaturierende Polyacrylamidgel erfolgte bei 120 V für 60 min (BioRad Power Pac 3000), unter Beobachtung der Proteinleiter, welche als Referenz zur Proteinauftrennung betrachtet wurde.

Blotten

Der elektrophoretische Proteintransfer auf eine adsorbierende Nitrocellulosemembran erfolgte mit Hilfe des Tank-Blot-Systems. Dafür wurden die Gele vorsichtig aus den Gelkammern gelöst und in Transferpuffer gelegt. Daraufhin wurden sie in ein "Sandwichsystem", auf einem in Transferpuffer eingeweichtem Schwämmchen mit Whatman Chromatographie-Papier gebettet und mit einer in Transferpuffer eingeweichten Nitrocellulosemembran bedeckt. Darüber wurde wiederum ein in Transferpuffer geweichtes Whatman Chromatographie-Papier gelegt und das System wurde mit einem weiteren Schwämmchen geschlossen, auf Luftblasen überprüft und in die Blotkammer überführt. Diese wurde mit Transferpuffer geflutet, mit einer Kühleinheit versehen und auf einen Magnetrührer gestellt. Der elektrophoretische Proteintransfer erfolgte bei 120 V für 70 min von der Kathode zur Anode (siehe Abb. 6).

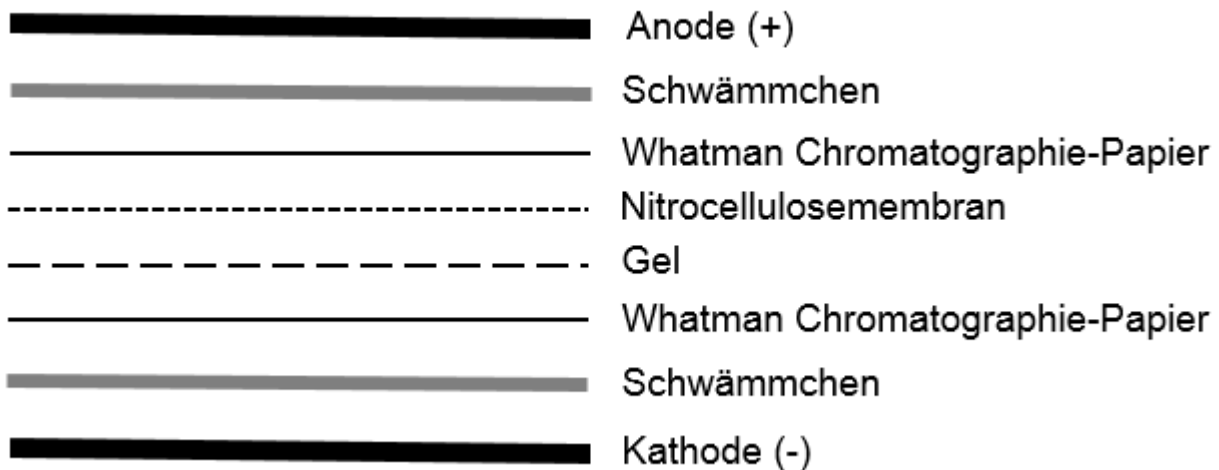


Abb. 6: „Sandwichsystem“ Western Blot

Detektion

Nach dem Beenden des Blottens wurde die Membran kurz mit Tris-buffered saline mit Tween20 (TBST) gewaschen und mit Ponceau S, in Trichloressigsäure verdünnt, reversibel gefärbt. Dabei wurden alle Proteine auf der Nitrocellulosemembran gefärbt und durch ein Foto visualisiert. Danach wurde die Nitrocellulosemembran nochmals mit TBST gewaschen und durch Zugabe von 20 ml 5 %-iger Blocklösung wurden die unspezifischen Proteinbindungsstellen für 1 h bei Raumtemperatur unter Schütteln (Schüttler Biometra® WT12, Göttingen, D) blockiert. Daraufhin wurde der Primärantikörper HIF-1 α (Mouse monoclonal NB100-105 von Novusbiochemicals by Bio-Techne, Wiesbaden Nordenstadt, D) in einer 1:1000 Verdünnung (10 μ l) in 10 ml Blocklösung (TBS-T 1-fach und 5 % Magermilchpulver) gelöst und über Nacht unter Schütteln bei 4 °C auf die Nitrocellulosemembran gegeben. Nach dem Waschen der Membran: 1-mal für 10 min und 3-mal für 5 min mit TBST am Folgetag, wurde der Sekundärantikörper (Host: Goat Anti-Mouse IgG, Label: Horseradish Peroxidase von Pierce™ Thermo Fischer Scientific, Bonn, D) in Blocklösung 1:10000 verdünnt und für 1 h bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubiert. Nach erneuter Waschung (3-mal 5 min mit TBST und 3-mal 5 min mit TBS, um die Tween-Reste zu entfernen) wurde die Membran abgetropft und 1 ml Western Lightning® Ultra Extreme Sensitivity Chemiluminescence Substrate (Perkin Elmer, Inc., Hamburg, D) in einer Audiographiekassette zwischen 2 Folien auf der Membran verteilt.

Die am Sekundärantikörper gebundene Horseradish-Peroxidase löste dabei die Oxidation des im Western Ligtning® enthaltenen Luminol aus. Das Luminol gibt ein Elektron ab und geht vom angeregten Zustand in den Grundzustand über, dabei entsteht Licht. In der Dunkelkammer erfolgte die Visualisierung des entstandenen Lichts mit Hilfe eines Röntgenfilms (Agfa, Mortsel, B) und Entwickler- sowie Fixiererflüssigkeit. Die vom SDS-Gel auf die Nitrocellulosemembran übertragene Proteinleiter wurde auf dem Röntgenfilm markiert. Da HIF-1 α eine Molekulare Masse von 120 kDa besitzt, waren die HIF-1 α Proteinbanden zwischen den Referenzbanden 100 kDa und 130 kDa zu erwarten.

Um Wechselwirkungen zwischen dem HIF-1 α (Mouse NB100-105 von Novusbiochemicals) und NF- κ B p65 ((C-20) sc-372 Rabbit Polyclonal IgG von Santa Cruz Biotechnology) Antikörper zu vermeiden, wurden die bereits gebundenen Antikörper nach der Visualisierung mit 5 ml Strippingpuffer bei 50 °C unter Schütteln entfernt. Danach wurde unter Schütteln durch mehrmaliges Waschen mit TBST der restliche Strippingpuffer entfernt und die unspezifischen Proteinbindungen der Membran wurden mit Blocklösung erneut für 1 h bei Raumtemperatur unter Schütteln blockiert. Die Inkubation mit dem Primärantikörper NF- κ B p50 (Nuclear Factor-kappaB von Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg, D) in einer 1:1000 Verdünnung (10 μ l) in 10 ml Blocklösung gelöst und über Nacht erfolgte unter Schütteln bei 4 °C. Am nächsten Tag wurde die Membran 1-mal für 10 min und 3-mal für 5 min mit TBST gewaschen. Der Sekundärantikörper (Host: Goat Anti-, Antigen: Rabbit IgG, Label: Horseradish Peroxidase von Pierce™) wurde in Blocklösung 1:10000 verdünnt und für 1 h bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubiert. Daraufhin wurde die Membran erneut 3-mal 5 min mit TBST und 3-mal 5 min mit TBS, um die Tween-Reste zu entfernen, gewaschen. Die Visualisierung erfolgte, wie zuvor beschrieben. Da NF- κ B p50 eine molekulare Masse von 50 kDa besitzt, waren die Proteinbanden über der 55 kDa Referenzbande zu erwarten.

Zur Ladekontrolle der nukleären Akkumulation von HIF-1 α und NF- κ B wurde Lamin A verwendet. Dafür wurde nach erneutem Waschen und Strippen der Nitrocellulosemembran der Primärantikörper Lamin A (Rabbit Polyclonal IgG von Abcam, Cambridge, UK) in einer 1:1000 Verdünnung (10 μ l) in 10 ml Blocklösung gelöst und über Nacht unter Schütteln bei 4 °C inkubiert. Danach wurde wie zuvor beschrieben gewaschen und der Sekundärantikörper (Host: Goat Anti-, Antigen: Rabbit IgG, Label: Horseradish Peroxidase von New England Biolabs, Frankfurt am Main) 1:10000 verdünnt

in Blocklösung für 1 h bei Raumtemperatur unter Schütteln auf die Membran gegeben. Nach wiederholtem Waschen erfolgte die Visualisierung, wie bereits beschreiben. Lamin A besitzt eine molekulare Masse von 74-76 kDa und war deshalb ca. auf Höhe der 75 kDa Referenzbande zu erwarten.

Die densitometrische Analyse erfolgte mit dem frei verfügbaren Bildbearbeitungsprogramm ImageJ 1.43 (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA; <http://rsb.info.nih.gov/ij>).

4.9 Isolation und Migration dendritischer Zellen

Da Studien zeigen konnten, dass die oralen dendritischen Zellen im Gegensatz zu den dermalen dendritischen Zellen tolerogene Eigenschaften besitzen, welche entscheidend durch das Mikromillieu beeinflusst werden, sollten die Effekte der gingivalen Zellen auf die Aktivierung und Migration dendritischer Zellen mit Hilfe eines Migrationassays evaluiert werden.

4.9.1 Isolation plasmazytoider dendritischer Zellen

Zur Isolation plasmazytoider dendritischer Zellen (pDZs) wurde das Diamond Plasmacytoid Dendritic Cell Isolation Kit II von Miltenyi Biotec GmbH (Bergisch Gladbach, D) verwendet. Die Reinheit der pDZs wurde mittels Durchflusszytometrie auf >90 % Zellen bestimmt. Zuvor wurden mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (PBMCs) mit Hilfe von Ficoll-Plaue Dichtegradienten aus Buffy Coats gereinigt. Hierzu wurden Buffy Coats durch 200 µm-Filter von Transfusionssystemen für Erythrozytenkonzentrate in Falcons überführt und mit 0,9 %iger NaCl-Lösung 1:1 verdünnt, jeweils zu 25-30 ml in Ficollröhrchen LeucoSep™ Centrifuge Tubes (Greiner Bio One) (diese wurden zuvor mit 15 ml Ficolllösung-Ficoll-Paque PREMIUM (GE Healthcare Life Sciences, Solingen, D) 30 s bei 1000 g zentrifugiert) gegeben und bei 800 g bei 20 °C für 20 min zentrifugiert. Daraufhin wurden die PBMC-Ringe abgenommen und in 2 Falcons überführt und gepoolt (Abb.7).

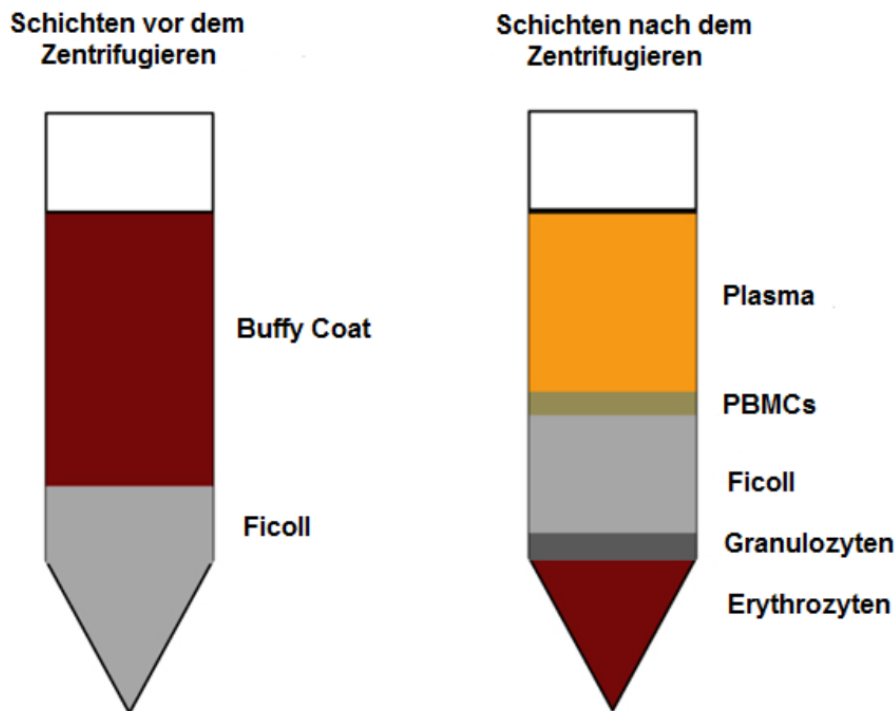


Abb. 7: Isolation von mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (PBMCs) mit Hilfe von Ficoll-Plaques Dichtegradienten

Anschließend wurden die Falcons auf Eis mit 0,9 %iger NaCL-Lösung auf 50 ml aufgefüllt und bei 400 g, 4 °C für 7 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und die Zellpellets wurden in 40 ml Medium von Gibco® Advanced RPMI 1640 supplementiert mit 10 % hitzeinaktiviertem FBS, 1X GlutaMAX™ (Life Technologies/Thermo Fisher Scientific Inc.) und 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin (PAA Laboratories/GE Healthcare Life Science) gepoolt und gezählt. Durch magnetisch-aktivierte Zellsortierung (MACS) mit Hilfe von CD14-Mikrokügelchen (Miltenyi Biotec GmbH) erfolgte die Isolierung von pDZs aus PBMCs. Dafür wurden 10×10^8 PBMCs auf je 2 Falcons verteilt, bei 4 °C und 300 g für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und jedes Zellpellet wurde in 2 ml MACS-Puffer resuspendiert, es wurden 400 µl Non-PDC Biotin Antibody Cocktail II zugegeben und für 15 min im Kühlschrank inkubiert. Danach wurden die Falcons zum Waschen auf 50 ml mit MACS-Puffer aufgefüllt und bei 4 °C und 300 g für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut abgenommen und die Zellpellets wurden in 2 ml MACS-Puffer resuspendiert, es wurden 400 µl Non-PDC Micro Beads Cocktail II

zugegeben und für 20 min im Kühlschrank inkubiert. Daraufhin wurde erneut, wie bereits beschrieben, gewaschen und der Überstand abgenommen. Jedes Zellpellet wurde in 2,5 ml MACS-Puffer resuspendiert (500 µl pro 1×10^8 Zellen). Um die gewünschten nicht mit Micro Beads beladenen pDZs zu isolieren, wurden LD Columns verwendet, welche ferromagnetische Kügelchen enthalten und somit die Isolierung von Micro Bead beladenen Zellen mittels eines magnetischen Feldes ermöglichen. Nach dem Äquilibrieren der LD Column am Magneten mit 2 ml MACS-Puffer wurden 1,25 ml Zellsuspension auf die LD Columns gegeben und der Durchfluss in einem neuen Falcon auf Eis aufgefangen. Nach dem Spülen der Säulen mit 2 x 1 ml MACS-Puffer wurden die Säulen verworfen. Der Durchfluss wurde bei 4 °C und 300 g für 10 min zentrifugiert, der Überstand wurde abgenommen und die Zellpellets wurden in 1 ml Zellnährmedium resuspendiert, gepoolt und gezählt.

4.9.2 Migration-Assay

Als Migration-Assay wurde das CultureCoat® 96 Well High BME Cell Invasion Assay (R & D Systems™) verwendet. Zur Vorbereitung erfolgte die Inkubation der bei -20 °C gelagerten 96-Well-Assayplatte und des Inserts für 1 h bei Raumtemperatur. Anschließend wurden die Inserts mit 25 µl warmen serumfreien Medium bei 37 °C für 1 h im CO₂-Inkubator rehydriert. Die davor isolierten pDZs wurden daraufhin in Medium (Gibco® Advanced RPMI 1640, 10 % hitzeinaktiviertes FBS, 1X GlutaMAX™ (Life Technologies/Thermo Fisher Scientific Inc.)) und 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin (PAA Laboratories/GE Healthcare Life Science) gelöst und jeweils 50000 Zellen/25 µl in jedes Insert gegeben. Die 96-Well Assay-Bodenplatte wurde mit 150 µl Mediumüberständen der humanen dermalen oder gingivalen Zellen aus den Stimulationsexperimenten, die mit einer Nickelkonzentration von 100 µmol/l stimuliert worden waren, befüllt. Nach der Inkubation für 24 h im CO₂-Inkubator bei 37 °C und 5 % CO₂ wurde das Insert vorsichtig ausgeklopft und jedes Insertwell wurde mit 100 µl 37 °C warmen Waschpuffer gewaschen und wiederum ausgeklopft. Währenddessen wurde die 96-Well Assayplatte bei 800 rpm herunterzentrifugiert und der Überstand abgenommen. Die Inserts wurden wieder auf die Assayplatte gesetzt und 100 µl Cell Dissociation Solution/Calcein AM (1:1000) wurde in jedes Well der Assayplatte gegeben. Intrazelluläre Esterasen spalten Acetemethylester (AM) und generieren freies Calcein, welches hell

fluoresziert. Durch das Fluoreszenzsignal kann die Anzahl der migrierten Zellen quantifiziert werden. Zur Fluoreszenzmarkierung der Zellen wurde die Platte erneut für 60 min im CO₂-Inkubator bei 37 °C und 5 % CO₂ aufbewahrt. Die Fluoreszenzmessung erfolgte ohne Insert bei einer Exzitation von 485 nm und einer Emission von 520 nm.

Die Daten aus 2 unterschiedlichen Experimenten, durchgeführt in Duplikaten wurden mit GraphPad Prism 5 graphisch dargestellt. Zur graphischen Darstellung wurde der Mittelwert, der nur mit Medium und einer Nickelkonzentration von 100 µmol/l Ni²⁺ gefüllten Wells von den Fluoreszenzwerten der verschiedenen Stimulationen abgezogen. Diese Werte wurden wiederum auf die Kontrolle (Dendritische Zellen nur mit Medium) normiert.

4.10 Statistische Auswertung

Die erhobenen Daten wurden statistisch mit GraphPad Prism 5.0 Software (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) ausgewertet. Alle Experimente wurden in Triplikaten durchgeführt, bis auf die Migration dendritischer Zellen. Diese erfolgte in Duplikaten mit 2-maliger Wiederholung. Unterschiede in der mRNA-Expression zwischen den HDFs und den HGFs, sowie unterschiedliche Proteinkonzentrationen und Ergebnisse der dendritischen Zellmigration zwischen der Kontrollgruppe der HDFs und HGFs sowie der Nickelkontrollgruppen beider Zelltypen wurden mittels des ungepaarten *t*-Tests ausgewertet und mit GraphPad Prism 5.0 Software dargestellt. Die angegebenen Daten werden als Mittelwerte ±SEM dargestellt, *p*-Werte (*p*) unter 0,05 werden als statistisch signifikant gewertet.

5 Ergebnisse

Zur Qualitätssicherung wurden in Vorversuchen die verwendeten humanen gingivalen und dermalen Fibroblasten mit spezifischen Primern charakterisiert. Um außerdem eine Beeinflussung der Stimulationsversuche durch eine Endotoxinbelastung des Mediums oder eine LPS-Belastung der Metallionenstocklösungen auszuschließen, wurden Limulus LAL Assays durchgeführt. Diese ergaben keinen Hinweis auf eine Kontamination.

5.1 Ergebnisse des Zytotoxizitätstests

Da Nickel in hohen Konzentrationen zytotoxisch wirkt, wurde ein XTT-Zytotoxizitätstest durchgeführt, um die Überlebensrate und Proliferation der humanen gingivalen und humanen dermalen Fibroblasten bei bestimmten Nickelkonzentrationen zu testen und die mittlere letale Dosis (LD₅₀-Wert) zu bestimmen. Dieser statistisch aus der Dosis-Wirkungsbeziehung ermittelte Wert gibt an, bei welcher Konzentration eine 50 %ige Letalitätsrate der mit Nickel stimulierten Zellen zu erwarten ist. Dies wurde mit Hilfe einer nicht-linearen Regressionsfunktion durch die Gegenüberstellung der Zellüberlebensrate in % und verschiedener Nickelkonzentrationen in $\mu\text{mol/l}$ grafisch dargestellt. Wie in den folgenden Abbildungen 8 und 9 zu erkennen, gab es hierbei starke Unterschiede zwischen den dermalen und gingivalen Fibroblasten.

Die mittlere letale Dosis betrug 1039.57 $\mu\text{mol/l}$ für dermale Fibroblasten (Abb. 8), während sie für gingivale Fibroblasten etwa 3-fach höher war (3021.25 $\mu\text{mol/l}$; Abb.9). Demnach wurde 100 $\mu\text{mol/l}$ Ni²⁺ als finale Stimulationskonzentration verwendet, da hierbei toxische Effekte ausgeschlossen werden konnten und zudem die maximalen mRNA-Expressionen im Rahmen von Vorversuchen bei dieser Nickelkonzentration detektiert wurden.

Überlebensrate der dermalen Fibroblasten (XTT)

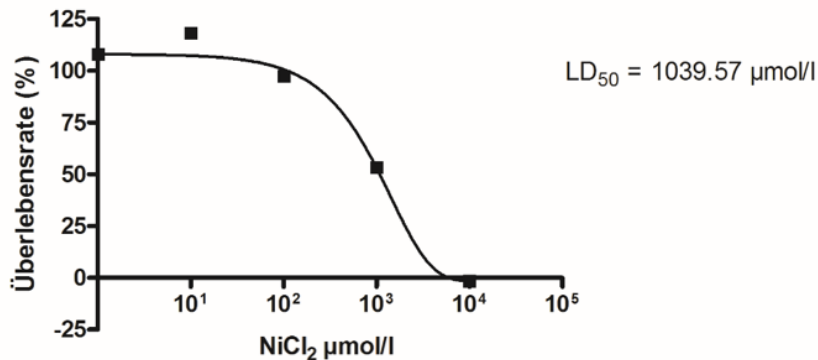


Abb. 8: LD₅₀-Bestimmung von humanen dermalen Fibroblasten unter Nickelstimulation

x-Achse: Nickelchloridkonzentrationen in µmol/l; y-Achse: Überlebensrate in %; Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen mit 2-fach Bestimmung; SEM; nicht-lineare Regression („log(agonist) vs. response, variable slope, 4 parameters“) mit $R^2 = 0,99$, die Nickelstimulation mit den unterschiedlichen Konzentrationen erfolgte für 24 h, die spektrophotometrischen Messungen erfolgten nach 2-, 4-, 6- und 24-stündiger XTT-Inkubation.

Überlebensrate der gingivalen Fibroblasten (XTT)

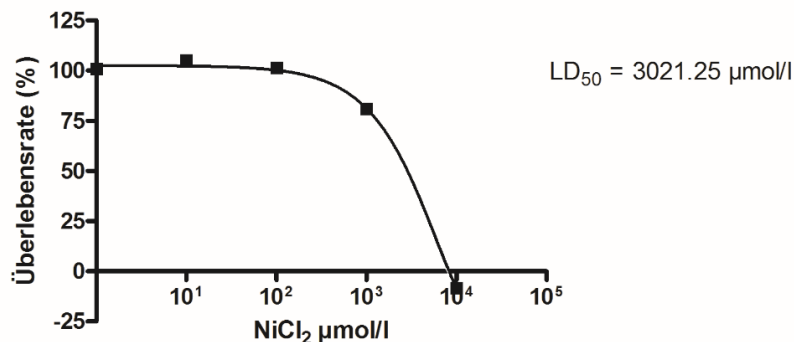


Abb. 9: LD₅₀-Bestimmung von humanen gingivale Fibroblasten unter Nickelstimulation

x-Achse: Nickelchloridkonzentrationen in µmol/l; y-Achse: Überlebensrate in %; Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen mit 2-fach Bestimmung; SEM; nicht-lineare Regression („log(agonist) vs. response, variable slope, 4 parameters“) mit $R^2 = 0,99$, die Nickelstimulation mit den unterschiedlichen Konzentrationen erfolgte für 24 h, die spektrophotometrischen Messungen erfolgten nach 2-, 4-, 6- und 24-stündiger XTT-Inkubation.

5.2 Immunantwort humaner gingivaler und dermaler Fibroblasten unter Nickelstimulation

5.2.1 Inflammatorische Immunantwort

Da Ni^{2+} an den Toll-like Rezeptor 4 binden kann, wurden diesbezüglich die NF- κ B-Akkumulation und nukleäre Translokation mit Hilfe des Western Blots sowie die Expression von IL-1 β auf mRNA- und Proteinebene näher betrachtet.

Untersucht wurden die Überstände humaner dermaler und gingivaler Fibroblasten nach 4 h unter Zugabe von 100 $\mu\text{mol/l}$ Nickelchlorid. Unstimulierte Fibroblasten dienten als Kontrolle. LPS des gramnegativen Bakteriums *E. coli*, ein TLR4-Agonist, welcher zu einer nukleären Akkumulation von NF- κ B führt, diente als Positivkontrolle für die NF- κ B-Detektion. Der Hydroxylinhibitor Dimethyloxaloylglycine (DMOG) wiederum stellte die Positivkontrolle der HIF-1 α -Detektion dar und ist für die Betrachtung der HIF-1 α -Expression von Relevanz (siehe 5.2.3) (Abb. 10).

Bei der Visualisierung der nukleären Proteinproben durch Chemilumineszenz sind für NF- κ B p50 spezifische Banden auf Höhe von 50 kDa der HGFs und HDFs nach 4-stündiger Nickelstimulation zu erkennen. Lamin A mit einer molekularen Masse von 74-76 kDa diente als Ladekontrolle (Abb. 10).

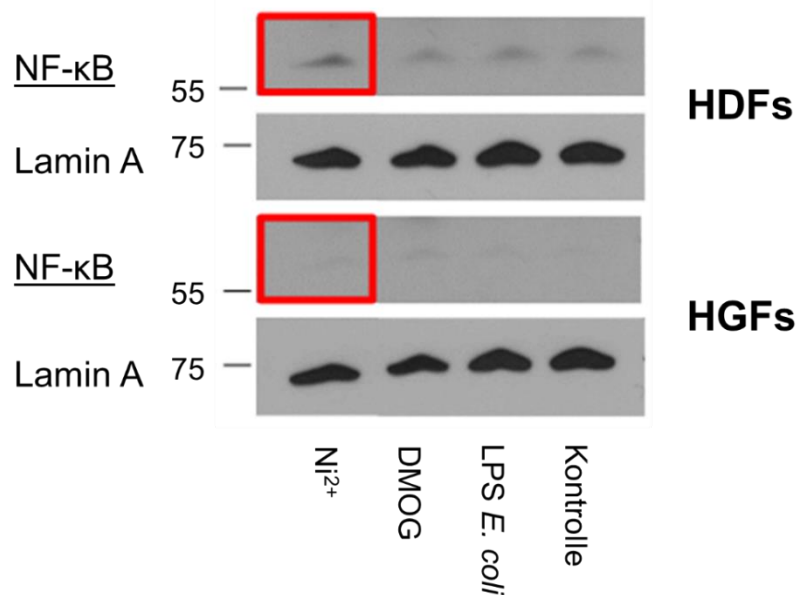


Abb. 10: NF- κ B Western Blot von humanen dermalen (HDFs) und humanen gingivalen Fibroblasten (HGFs) unter Stimulation mit 100 $\mu\text{mol/l}$ Ni^{2+} nach 4 h. LPS

des gramnegativen Bakteriums *Escherichia coli* (*E. coli*) und Hydroxylinhibitor Dimethylloxaloylglycine (DMOG) dienten als Positivkontrollen.

Links: Proteinleiter, die Zahlen beschreiben das Molekulargewicht in kDa. NF- κ B p50 mit einem Molekulargewicht von 50 kDa und Lamin A mit 74 kDa

Wie aus Abbildung 10 hervorgeht wurde die höchste NF- κ B-Expression bei den HDFs unter Nickelstimulation angezeigt. Außerdem war bei den HDFs eine NF- κ B-Grundexpression detektierbar. Sie lag jedoch unter der NF- κ B-Expression der Positivkontrolle. Bei den HGFs hingegen war grundsätzlich nur eine sehr geringe NF- κ B-Expression feststellbar, die nur minimal durch die Nickelstimulation und LPS erhöht wurde.

Demnach konnte eindeutig ein Konzentrationsunterschied an nukleärem NF- κ B p50 in HDFs im Vergleich zu HGFs nach 4-stündiger Ni²⁺-Stimulation detektiert werden. Die NF- κ B-Expression der HGFs unter Nickelstimulation lag zudem unter der NF- κ B-Grundexpression der HDFs.

Der Nachweis des NF- κ B Zielgenes IL-1 β erfolgte auf mRNA-Ebene mittels der quantitativen Real-Time PCR (Abb. 11).

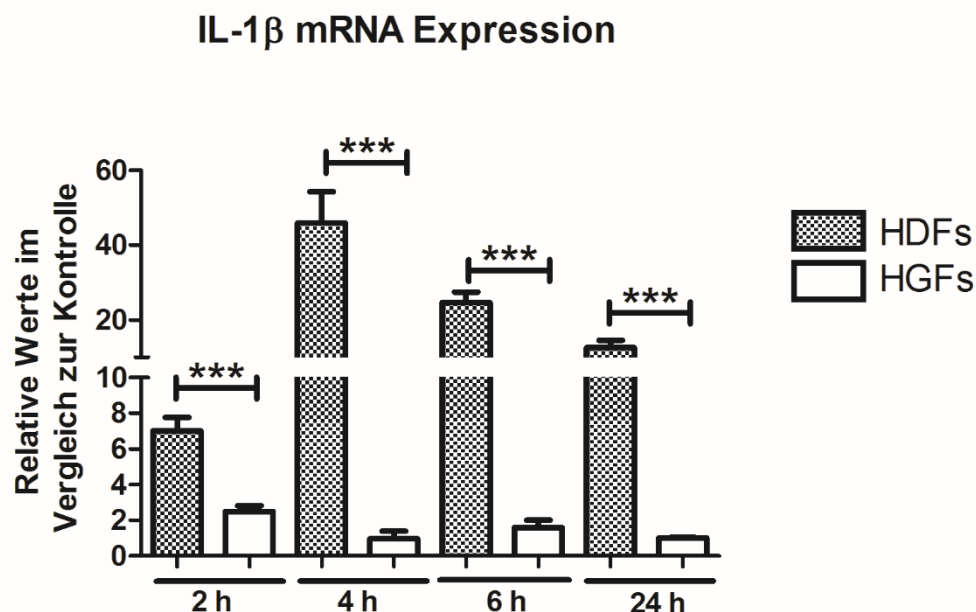


Abb. 11: IL-1 β mRNA Expression im Vergleich zur Kontrolle

x-Achse: Stimulation von humanen dermalen (HDFs) und gingivalen Fibroblasten (HGFs) mit 100 μ mol/l Ni²⁺ zu verschiedenen Zeitpunkten (2 h, 4 h, 6 h, 24 h), y-Achse: $\Delta\Delta$ CT-

Mittelwerte und graphische Darstellung mit GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA); \pm SEM von 3 unabhängigen Experimenten ausgeführt in Duplikaten, $N = 6$, *** $p < 0,001$, ungepaarter t -Test

Nach der Stimulation von HGFs und HDFs mit $100 \mu\text{mol/l Ni}^{2+}$ über einen Zeitraum von 2 h, 4 h, 6 h und 24 h ist statistisch eine Signifikanz in der IL-1 β -Expression von HDFs gegenüber HGFs zu erkennen. Die höchste IL-1 β -Expression war bei den HDFs nach 4 h zu verzeichnen (Abb. 11), welche nach 6 h und 24 h wieder abnahm. Die IL-1 β -Expression der HGFs hingegen war nach 2 h am höchsten. Die Expression lag jedoch nach 2, 4, 6 und 24 h fast durchgängig auf dem Kontrollniveau. Die IL-1 β -Expression der HDFs war 3- (nach 2 h) bis zu 25-fach höher (nach 4 h) im Vergleich zur Expression der HGFs.

Die Untersuchung der IL-8 (CXCL8) mRNA Expression unterstützte die Ergebnisse der IL-1 β mRNA Analyse (Daten nicht dargestellt).

Da mRNA verschiedenen posttranskriptionellen Veränderungen unterliegt, wurde die Proteinexpression aus den gesammelten Mediumüberständen der verschiedenen Zelltypen unter Nickelstimulation von $100 \mu\text{mol/l Ni}^{2+}$ analysiert (Abb. 12).

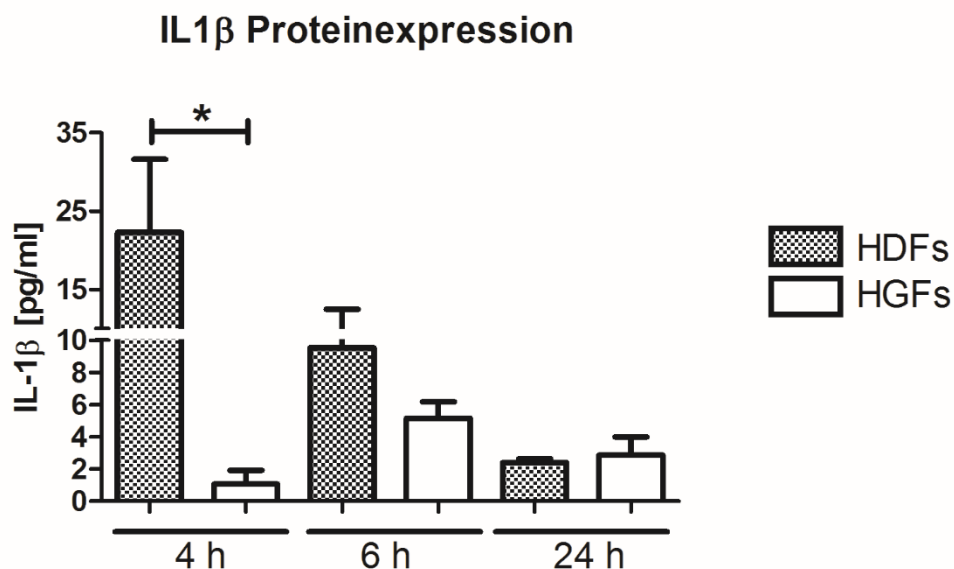


Abb. 12: IL-1 β Proteinexpression in Mediumüberständen im Vergleich zur Kontrolle
 x-Achse: Stimulation von humanen dermalen (HDFs) und gingivalen Fibroblasten (HGFs) mit $100 \mu\text{mol/l Ni}^{2+}$ zu verschiedenen Zeitpunkten (4 h, 6 h, 24 h), y-Achse: mittelwertige Proteinmenge in pg/ml und graphische Darstellung mit GraphPad Prism 5 (GraphPad

Software, San Diego, CA, USA); \pm SEM von 3 unabhängigen Experimenten ausgeführt in Duplikaten, N = 6, * $p < 0,05$, ungepaarter t -Test

Die Ni²⁺-Stimulation führte bereits nach 4 h bei den HDFs zu einer erhöhten IL-1 β -Freisetzung, welche zu späteren Zeitpunkten abfiel. In den HGFs wurde hingegen eine geringere IL-1 β -Freisetzung beobachtet mit einem Maximalwert nach 6 h. Der Vergleich der IL-1 β -Proteinsekretion zeigte deutliche Unterschiede zwischen HDFs und HGFs, insbesondere nach 4 h exprimierten HDFs signifikant höhere IL-1 β -Konzentrationen als HGFs.

5.2.2 Antiinflammatorische Immunantwort

Da IL-10 für seine antiinflammatorischen und immunsuppressiven Effekte, welche bei der oralen Toleranz eine zentrale Rolle spielen, bekannt ist, wurde die IL-10-Expression auf mRNA- (Abb. 13) und Proteinebene (Abb. 14) unter Nickelstimulation nach 2 h, 4 h, 6 h und 24 h untersucht.

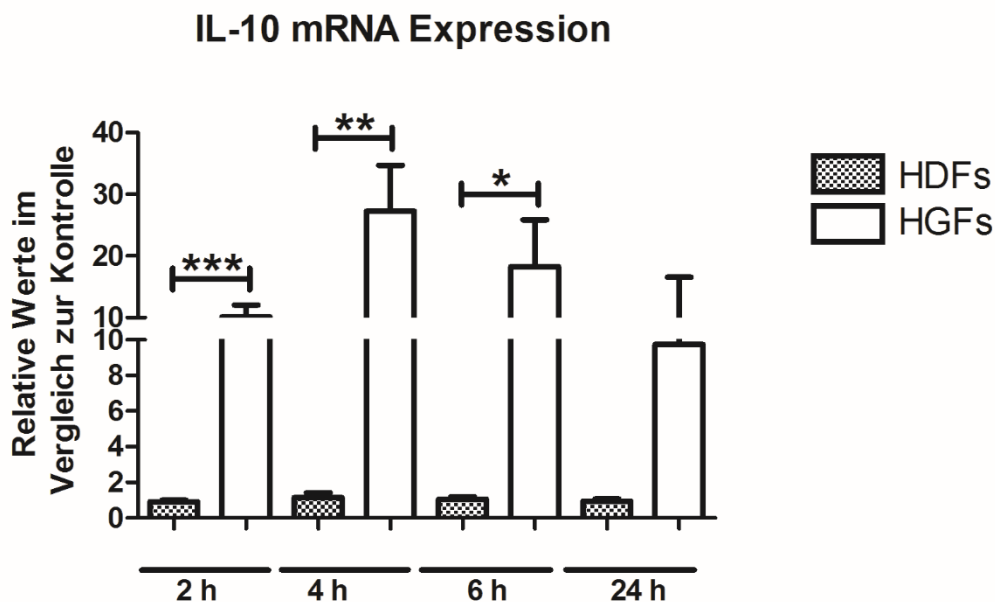


Abb. 13: IL-10 mRNA Expression im Vergleich zur Kontrolle

x-Achse: Stimulation von humanen dermalen (HDFs) und gingivalen Fibroblasten (HGFs) mit 100 $\mu\text{mol/l}$ Ni²⁺ zu verschiedenen Zeitpunkten (2 h, 4 h, 6 h, 24 h), y-Achse: $\Delta\Delta\text{CT}$ -Mittelwerte und graphische Darstellung mit GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA); \pm SEM von 3 unabhängigen Experimenten ausgeführt in Duplikaten, N = 6, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, ungepaarter t -Test

Auf mRNA-Ebene waren bei den HDFs nur sehr geringe Konzentrationen an IL-10 zu detektieren (Abb. 13). Demgegenüber zeigten die HGFs eine gesteigerte IL-10-Expression mit einem Maximum nach 4 h (28-fach). Der Vergleich beider Zelltypen machte deutlich, dass Ni²⁺ in HGFs höhere IL-10-mRNA-Expressionen induzierte als in HDFs, die nach 2 h, 4 h und 6 h signifikant unterschiedlich waren.

Auf Proteinebene wurden diese Beobachtungen, wie in Abbildung 14 zu erkennen, bestätigt. Die Mediumüberstände der HDFs wiesen reduzierte IL-10-Proteinkonzentrationen auf, welche sich annähernd auf dem Kontrollniveau befanden (4 h und 24 h), mit einem Maximum nach 6 h. In den Mediumüberständen der HGFs waren hingegen bis zu 30-fach höhere IL-10-Proteinkonzentrationen nach Ni²⁺-Stimulation detektierbar (nach 6 h und 24 h). Insgesamt waren in den HGFs im Vergleich zu den HDFs nach 4, 6 und 24 h signifikant höhere IL-10-Proteinkonzentrationen unter Ni²⁺-Stimulation nachweisbar.

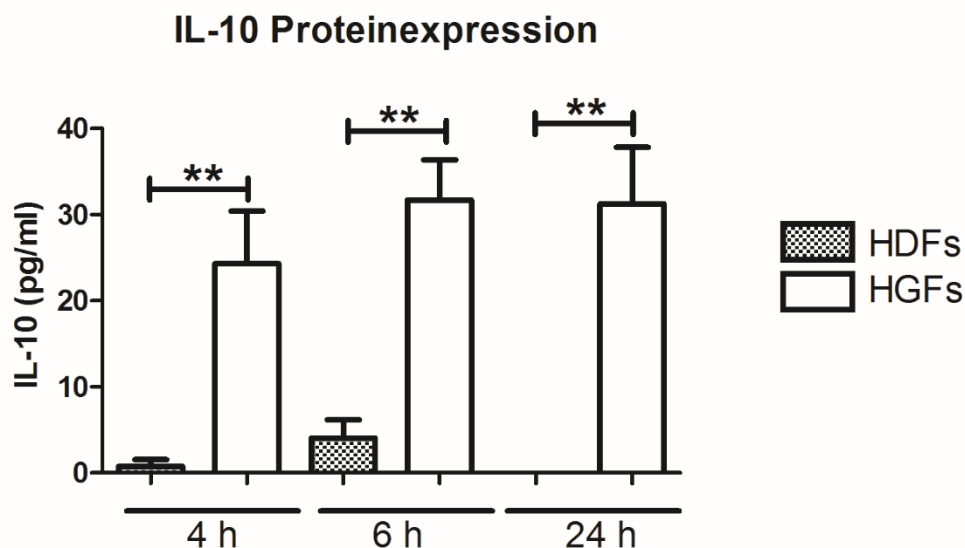


Abb. 14: IL-10 Proteinexpression in Mediumüberständen im Vergleich zur Kontrolle

x-Achse: Stimulation von humanen dermalen (HDFs) und gingivalen Fibroblasten (HGFs) mit 100 µmol/l Ni²⁺ zu verschiedenen Zeitpunkten (4 h, 6 h, 24 h), y-Achse: mittelwertige Proteinmenge in pg/ml und graphische Darstellung mit GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA); ± SEM von 3 unabhängigen Experimenten ausgeführt in Duplikaten, N = 6, ** $p < 0,01$, ungepaarter t -Test

Veränderungen der mRNA-Expression von TGF- β , einem Mediator, der ebenfalls eine Bedeutung bei der oralen Toleranz zukommt, waren hingegen weder bei den HDFs noch bei den HGFs unter Stimulation mit 100 $\mu\text{mol/l}$ Ni^{2+} zu verzeichnen (Daten nicht dargestellt).

5.2.3 Hypoxische Immunantwort

Da zweiwertige Kationen wie Ni^{2+} hypoxie-ähnliche Effekte induzieren, wurde die nukleäre Akkumulation von HIF-1 α sowie die Expression von HIF-1 α untersucht.

Dimethyloxaloylglycine (DMOG), Inhibitor der Prolyl-Hydroxylase (PHD) und der Asparaginy-Hydroxylase Factor inhibiting HIF (FIH), welcher eine Hochregulation von HIF-1 α verursacht, wurde als Positivkontrolle für die HIF-1 α Detektion verwendet.

Bei der Visualisierung der nukleären Proteinproben durch Chemilumineszenz sind, wie in Abbildung 15 dargestellt, die für HIF-1 α spezifische Proteinbanden auf Höhe von 120 kDa zu erkennen. Lamin A mit einer molekularen Masse von 74-76 kDa diente als Ladekontrolle (Abb. 15).

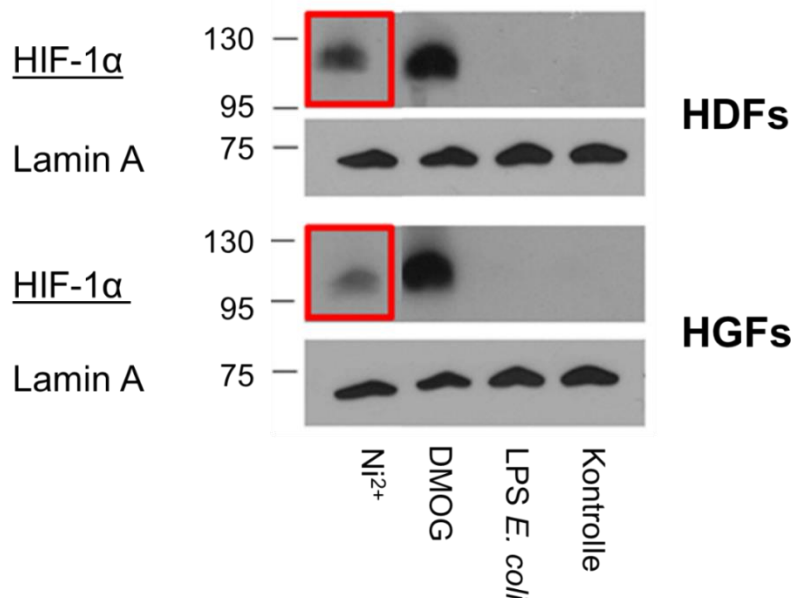


Abb. 15: HIF-1 α Western Blot nukleärer Proteinproben humaner dermaler (HDFs) und humaner gingivaler Fibroblasten (HGFs) unter Stimulation mit 100 $\mu\text{mol/l}$ Ni^{2+} nach 4 h. Der Hydroxylinhibitor Dimethyloxaloylglycine (DMOG) diente als Positivkontrolle.

Links: Proteinleiter, die Zahlen beschreiben das Molekulargewicht in kDa. HIF-1 α mit einem Molekulargewicht von 120 kDa und Lamin A mit 74 kDa

Dabei ist eine deutliche Proteinbande nach 4-stündiger Nickelstimulation bei den HDFs und HGFs zu erkennen. Eine Grundexpression war weder bei den HDFs noch bei den HGFs detektierbar und die Positivkontrollen zeigten keine Unterschiede zwischen HDFs und HGFs. Jedoch wurde bei den HDFs nach 4-stündiger Nickelstimulation eine höhere Expression im Vergleich zu den HGFs verzeichnet.

Auf mRNA-Ebene war weder in HDFs noch in HGFs eine Veränderung der HIF-1 α -Expression unter Stimulation mit 100 $\mu\text{mol/l}$ Ni²⁺ nachweisbar (Daten nicht dargestellt).

Eines der wichtigsten Zielgene von HIF-1 α ist der Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF). Dieser ist von besonderer Bedeutung für die Angiogenese und Gefäßpermeabilität. Daher wurde die VEGF-Expression sowohl auf mRNA- (Abb. 16) als auch auf Proteinebene (Abb. 17) untersucht.

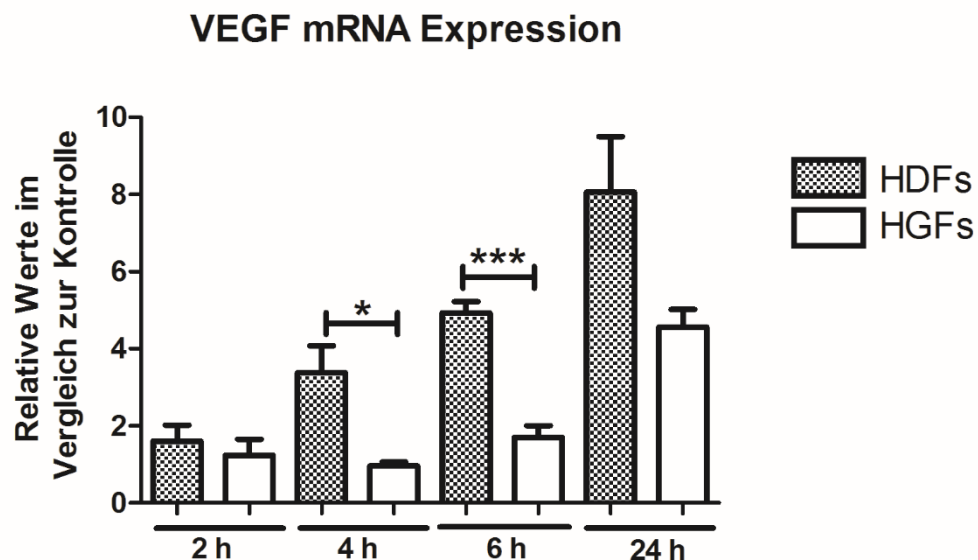


Abb. 16: VEGF mRNA Expression im Vergleich zur Kontrolle

x-Achse: Stimulation von humanen dermalen (HDFs) und gingivalen Fibroblasten (HGFs) mit 100 $\mu\text{mol/l}$ Ni²⁺ zu verschiedenen Zeitpunkten (2h, 4 h, 6 h, 24 h), y-Achse: $\Delta\Delta\text{CT}$ -Mittelwerte und graphische Darstellung mit GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA); \pm SEM von 3 unabhängigen Experimenten ausgeführt in Duplikaten, N = 6, * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$, ungepaarter t -Test

Bezugnehmend auf die erhöhte Aktivierung von HIF-1 α induzierte die Ni²⁺-Stimulation in HDFs als auch in HGFs einen stufenweisen Anstieg der VEGF-Konzentration nach 2 h, 4 h, 6 h und hatte ihr Maximum nach 24 h (Abb. 16). Beim Vergleich der Expressionen beider Zelltypen wurde der signifikant höhere VEGF-Anstieg nach 4 h und 6 h in den HDFs deutlich.

Die VEGF-Proteindaten (Abb. 17) validierten die dargestellten mRNA-Expressionen (Abb. 16).

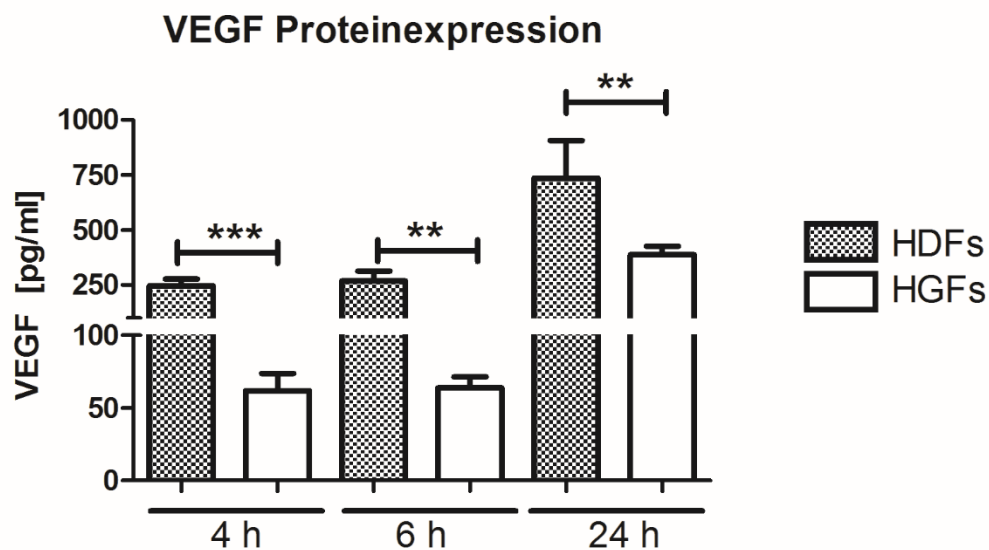


Abb. 17: VEGF Proteinexpression in Mediumüberständen im Vergleich zur Kontrolle

x-Achse: Stimulation von humanen dermalen (HDFs) und gingivalen Fibroblasten (HGFs) mit 100 $\mu\text{mol/l}$ Ni²⁺ zu verschiedenen Zeitpunkten (4 h, 6 h, 24 h), y-Achse: mittelwertige Proteinmenge in pg/ml und graphische Darstellung mit GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA); \pm SEM von 3 unabhängigen Experimenten ausgeführt in Duplikaten, N = 6, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, ungepaarter t -Test

Demnach induzierte die Stimulation mit 100 $\mu\text{mol/l}$ Ni²⁺ einen stufenweisen Anstieg der VEGF-Konzentration in den Mediumüberständen beider Zelltypen über den beobachteten Zeitraum mit einem Maximum nach 24 h (Abb. 17). Zudem konnte eine signifikant höhere Freisetzung an VEGF in den HDFs im Vergleich zu den HGFs nach 4 h, 6 h und nach 24 h nachgewiesen werden.

5.2.4 CCL20-Regulation

Da CCL20 dafür bekannt ist, durch proinflammatorische Zytokine hochreguliert zu werden und gleichzeitig in die Immunzellrekrutierung verwickelt zu sein, wurden die CCL20-Konzentrationen auf mRNA- und Proteinebene in HDFs und HGFs nach der Stimulation mit Ni^{2+} untersucht.

Die maximale CCL20 mRNA Expression zeigten die HDFs nach 2 h, diese sank nach 4 h leicht ab und stieg nach 6 h erneut an, mit einem deutlichen Abfall nach 24 h. In den HGFs war eine gleichbleibend geringe CCL20 mRNA Expression mit einem Maximum nach 4 h zu erkennen. Letztere zeichneten sich durch eine sehr geringe Konzentrationsänderung aus. Beim Vergleich beider Zelltypen wurde eine signifikant höhere CCL20 mRNA Konzentration in den HDFs nach 2 h, 4 h und 6 h der Stimulation mit $100 \mu\text{mol/l Ni}^{2+}$ nachgewiesen, die signifikant (bis zu 200-fach) höher war als in den HGFs (Abb. 18).

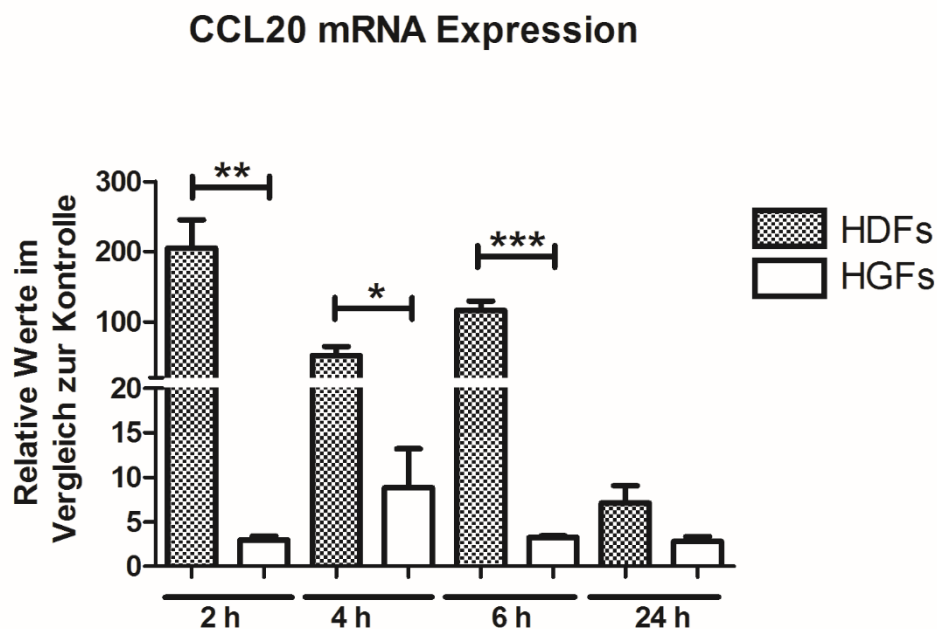


Abb. 18: CCL20 mRNA Expression im Vergleich zur Kontrolle

x-Achse: Stimulation von humanen dermalen (HDFs) und gingivalen Fibroblasten (HGFs) mit $100 \mu\text{mol/l Ni}^{2+}$ zu verschiedenen Zeitpunkten (2 h, 4 h, 6 h, 24 h), y-Achse: $\Delta\Delta\text{CT}$ -Mittelwerte und graphische Darstellung mit GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA); \pm SEM von 3 unabhängigen Experimenten ausgeführt in Duplikaten, $N = 6$, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, ungepaarter t -Test

Die Untersuchung der Mediumüberstände der HDFs und HGFs nach 4, 6 und 24 h unter Nickelstimulation, wie in Abbildung 19 dargestellt, bestätigten die mRNA-Ergebnisse. In den HGFs waren keine CCL20-Proteinkonzentrationen messbar. Dagegen konnte ein zunehmender Anstieg der CCL20-Konzentration (bis zu 35-fach) im Überstand der Ni²⁺-stimulierten HDFs nachgewiesen werden. Der Vergleich zwischen HDFs und HGFs zeigte signifikante Unterschiede zu allen gemessenen Zeitpunkten (4, 6 und 24 h).

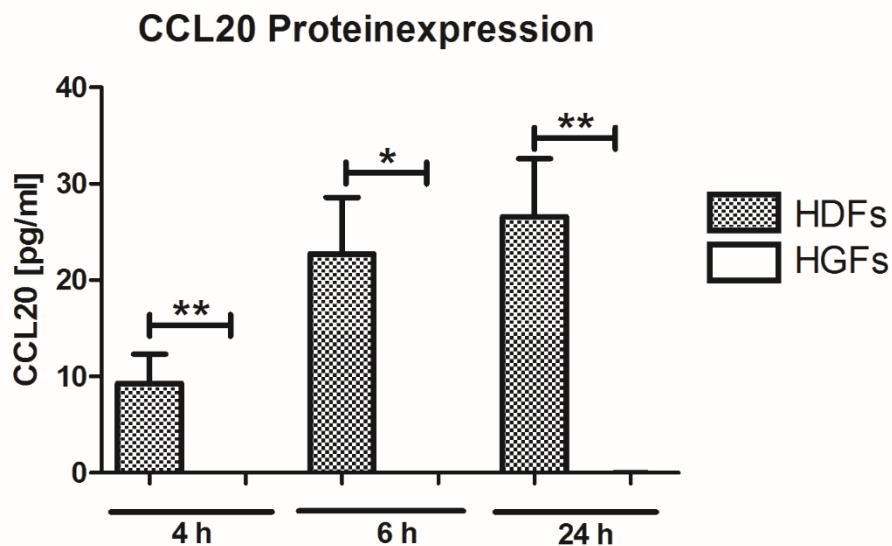


Abb. 19: CCL20 Proteinexpression in Mediumüberständen im Vergleich zur Kontrolle

x-Achse: Stimulation von humanen dermalen (HDFs) und gingivalen Fibroblasten (HGFs) mit 100 $\mu\text{mol/l}$ Ni²⁺ zu verschiedenen Zeitpunkten (4 h, 6 h, 24 h), y-Achse: mittelwertige Proteinmenge in pg/ml und graphische Darstellung mit GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA); \pm SEM von 3 unabhängigen Experimenten ausgeführt in Duplikaten, N = 6, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, ungepaarter t -Test

Darüber hinaus wurde die mRNA Expression von IL-17 untersucht, da davon ausgegangen wird, dass diese in Verbindung mit der CCL20-Expression steht (Harper et al., 2009). Auf mRNA-Ebene waren jedoch keine Expressionsveränderungen nachweisbar (Daten nicht dargestellt).

5.3 Induktion der plasmazytoiden dendritischen Zellmigration

Um das Ausmaß der immunologischen Reaktion zu untersuchen, wurde die humane plasmazytoide dendritische Zellmigration unter Verwendung der Mediumüberstände beider Zelltypen nach 6- und 24-stündigen Nickelstimulation mit 100 $\mu\text{mol/l}$ analysiert. Wie die dargestellten Expressionsprofile vermuten lassen, wurde die Migration der humanen plasmazytoiden dendritischen Zellen durch die Mediumüberstände der HDFs vermehrt induziert (Abb. 20). Dabei führten die 6 h Überstände zu einer mehr als doppelt so hohen Zellmigration als die Überstände nach 24-stündiger Inkubation. Im Gegensatz dazu konnte nach 6 h im Vergleich zur Kontrolle eine Hemmung der Migration bei der Verwendung der HGF Überstände detektiert werden. Nach 24 h kehrten die Werte auf das Kontrollniveau zurück. Der Vergleich beider Fibroblastentypen ergab einen signifikanten Anstieg der dendritischen Zellmigration nach 6 h Inkubation der HDF-Überstände im Vergleich zu den HGF-Überständen.

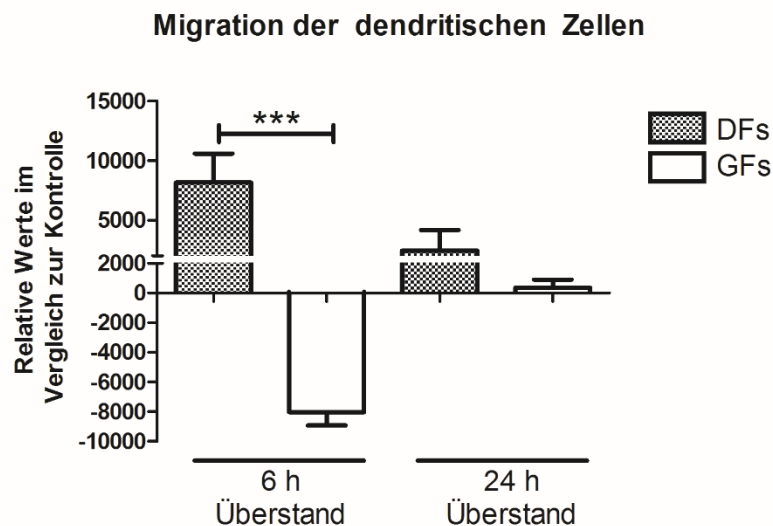


Abb. 20: Humane plasmazytoide dendritische Zellmigration (PDCs) mit Hilfe eines Migration Assays zur Analyse der Mediumüberstände im Vergleich zur Kontrolle
 x-Achse: Zellmigration durch die Mediumüberstände nach der Stimulation von humanen dermalen (HDFs) und gingivalen Fibroblasten (HGFs) mit 100 $\mu\text{mol/l}$ Ni^{2+} zu verschiedenen Zeitpunkten (6 h, 24 h), y-Achse: relative Werte im Vergleich zur Kontrolle und graphische Darstellung mit GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA); \pm SEM von 2 unabhängigen Experimenten ausgeführt in Duplikaten, $N = 4$, *** $p < 0,001$, ungepaarter t -Test

6 Diskussion

6.1 Unterschiedliche Reaktionen humaner gingivaler und dermaler Fibroblasten unter Nickelstimulation

Nickel ist die häufigste Ursache einer Kontaktdermatitis. Dennoch sind allergische Reaktionen während einer kieferorthopädischen Behandlung mit nickelhaltigen Apparaturen im Mundraum sehr selten. Vielmehr gibt es Hinweise dafür, dass eine kieferorthopädische Therapie eine Hypersensibilität gegen Nickel sogar verhindern könnte (Gölz et al., 2015). Hier wird von der Induktion einer oralen Hyposensibilisierung ausgegangen. Erste klinische Studien nutzen diesen Effekt der oralen Hyposensibilisierung bereits und therapieren Nickelallergiker mit der oralen Gabe von Nickel. Die zugrundeliegenden Mechanismen sind jedoch noch weitestgehend unbekannt (Di Gioacchino et al., 2014; Schivano et al., 2006; Tammaro et al., 2009). Verschiedene Arbeiten deuten nun darauf hin, dass orale DZs hierbei eine zentrale Rolle spielen könnten und dabei maßgeblich von ihrem Mikromilieu beeinflusst werden (Allam et al., 2008a; Novak et al., 2010). Inwiefern lokale Gewebsfibroblasten, als ortsständige Zellen ein Mikromilieu induzieren, welches die Eigenschaften der DZs beeinflusst, wurde bisher jedoch noch nicht evaluiert. Daher wurden in der vorliegenden Studie erstmals gingivale und dermale Fibroblasten mit Nickelionen stimuliert und unter besonderer Berücksichtigung pro- und antiinflammatorischer sowie hypoxischer Signaltransduktionswege, die für die Entstehung einer Allergie bzw. Toleranz relevant sind, näher untersucht.

6.1.1 Inflammatorische Immunantwort

Es gibt Hinweise darauf, dass ortsständige Zellen Immunreaktionen und entzündliche Prozesse maßgeblich beeinflussen können (Juarez et al., 2012). Bei der Betrachtung Nickel-induzierter Signaltransduktionswege zeigten zudem Schmidt et al. in vaskulären Endothelzellen, dass Nickelionen teilweise vom humanen innate Immunrezeptor TLR4 über eine spezifische Histidinkombination erkannt werden (Schmidt et al., 2010).

Die Aktivierung des TLR4 durch Nickel führt dabei in der Regel zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B in der Zelle. Typischerweise induziert somit die Aktivierung

des TLR4 u. a. über die Freisetzung von IL-1 β eine proinflammatorische Umgebung und begünstigt die Aktivierung und Rekrutierung zahlreicher Immunzellen (z. B. DZs und Teff Zellen) (Medzhitov und Janeway, 2000; Muzio et al., 2000; Miller et al., 2005).

Interessanterweise scheint die Immunantwort oraler DZs von dieser „typischen TLR4 Aktivierung“ abzuweichen, denn nach LPS-Stimulation zeigten orale DZs im Gegensatz zu dermalen DZs einen Anstieg von antiinflammatorischen Mediatoren wie IL-10 (Allam et al., 2008b; Allam et al., 2011b). Orale DZs könnten somit die Induktion von Treg Zellen und damit eine orale Hyposensibilisierung begünstigen, während die Eigenschaften der dermalen DZs durch die Freisetzung proinflammatorischer Mediatoren und Aktivierung von Teff-Zellen eine Hypersensibilisierung fördern könnten.

Inwiefern Gewebsfibroblasten der Haut bzw. oralen Schleimhaut im Rahmen einer Nickelexposition ein verändertes Mikromilieu begünstigen könnten, welches den Charakter der DZs hinsichtlich der Entstehung einer Allergie bzw. Toleranz fördert, war Gegenstand der vorliegenden Arbeit.

Daher wurde die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B sowie seines Zielgens IL-1 β nach der Nickelstimulation in gingivalen und dermalen Fibroblasten analysiert. Dabei wurden lediglich in den dermalen Zellen höhere Konzentrationen an nukleärem NF- κ B detektiert. Unterstützt wurde dies durch die gleichermaßen bis zu 25-fach höhere IL-1 β mRNA- und Proteinexpressionen in dermalen Fibroblasten. Im Gegensatz dazu zeigten die gingivalen Zellen eine nur geringfügige Induktion der NF- κ B-Aktivierung gefolgt von einer geringen IL-1 β Expression. Die Daten der IL-8 Expression in gingivalen und dermalen Zellen unterstützten diese Ergebnisse. Demnach führte die Nickelexposition bei dermalen Fibroblasten zur Entstehung eines verstärkt proinflammatorischen Mikromilieus und könnte somit die proallergenischen Eigenschaften der dermalen DZs und damit eine Nickel-induzierte Hypersensibilität begünstigen. Demgegenüber könnte die reduzierte inflammatorische Antwort der gingivalen Fibroblasten den antiinflammatorischen Charakter der DZs und damit eine orale Hyposensibilisierung fördern. Die Daten werden durch die unterschiedliche Expression des antiinflammatorischen Zytokins IL-10 validiert (siehe Kap. 6.1.2) und untermauern die eingangs dargelegte Hypothese.

6.1.2 Antiinflammatorische Immunantwort

Trotz der hohen bakteriellen Besiedelung sind akute Infektionen der oralen Mundschleimhaut selten. Dabei besiedeln bis zu 500 verschiedene kommensale und pathogene Bakterienarten die Mundhöhle, welche wie auch andere Komponenten, Lipopolysaccharide enthalten, die an den TLR4-Rezeptor binden können (Reife et al., 2006). Normalerweise führt eine TLR-Bindung zur Transkription von proinflammatorischen Zytokinen, wie IL-1, IL-6 und TNF- α (Miller et al., 2005). Als Bestandteil des adaptiven Immunsystems sind LZs in der Lage eine Immunantwort durch die Aktivierung von Antigen-spezifischen T-Zellen zu initiieren oder protektive Immunreaktionen einzuleiten (Novak et al., 2004). Allam et al. wiesen diesbezüglich nach, dass es durch die LPS-induzierte TLR4 Aktivierung in oralen LZs zu einer vermehrten Freisetzung von antiinflammatorischen Zytokinen wie IL-10, sowie zu einer reduzierten Stimulationsfähigkeit gegenüber T-Zellen kam. Die antiinflammatorische Immunantwort und hier insbesondere die Mediatoren IL-10 und TGF- β spielen eine zentrale Rolle bei der Induktion der Immuntoleranz (Akdis und Akdis, 2014; Allam et al., 2008b; Allam et al., 2011b). Hier führte die Gabe von Monophosphoryl lipid A (MPL), ebenfalls ein TLR4 Agonist, zu einer vermehrten IL-10 und TGF- β Expression in oralen LZs (Allam et al., 2008a; Allam et al., 2011a).

IL-10 unterdrückt nachweislich die Expression von inflammatorischen Zytokinen, wie TNF- α , IL-6 und IL-1 β in Makrophagen, durch die Inhibition der nukleären NF- κ B-Akkumulation (Hu et al., 2007; Williams et al., 2004).

Interessanterweise wurde nachgewiesen, dass Nickelallergiker weniger IL-10 produzierende Treg-Zellen besitzen als Nicht-Allergiker. Außerdem behinderte die IL-10-Gabe vor der Nickelstimulation die Effektorphase der CHS im Mausmodell (Cavani et al., 1998). In dieser Untersuchung reagierten die HGFs im Vergleich zu HDFs nach der TLR4 Aktivierung mit einer signifikant erhöhten IL-10-Freisetzung auf mRNA- und Protein-Ebene. Außerdem scheinen diese Veränderungen im Mikromillieu unabhängig von TGF- β zu sein, denn weder in HDFs noch in HGFs wurden veränderte TGF- β -Expressionen nachgewiesen.

Die Ergebnisse unterstützen die dargelegte Hypothese, wonach HGFs im Gegensatz zu HDFs ein protolerogenes und antiinflammatorisches Mikromillieu fördern, welches die Nickel-induzierte Hypersensibilität unterdrücken könnte.

6.1.3 Hypoxische Immunantwort

Neben der Aktivierung des TLR4 Signalweges und der nukleären Translokation von NF- κ B konnten verschiedene Studien zeigen, dass zweiwertige Metallionen wie Nickel die nukleäre HIF-1 α -Akkumulation induzieren und den proteosomalen Abbau des Transkriptionsfaktors HIF-1 α in humanen Endothelzellen hemmen (Viemann et al., 2007). HIF-1 ist ein heterodimerer Transkriptionsfaktor für eine Reihe von Zielgenen, welcher in homöostatische Prozesse eingebunden, die Vaskularisation und Permeabilität in hypoxischen Gebieten steigern kann. Zudem ist HIF-1 essentiell für immunologische Reaktionen, Regulator der Vaskularisation und des anaeroben Stoffwechsels. Dabei führt die HIF-Aktivierung zur Genexpression verschiedener Mediatoren, die für die Angiogenese, den Zellmetabolismus und die Immunzellmigration verantwortlich sind (Brant et al., 2009; Cramer et al., 2003; Huang et al., 1998; Lakhani et al., 2003; Wang et al., 1995). VEGF ist eines der meist untersuchtesten HIF-Zielgene, welches verantwortlich für die Vaskularisation und endotheliale Durchlässigkeit ist, die die Immunzellinvasion unterstützt. Unter Hypoxie bindet HIF-1 an die Regulatorregion des VEGF-Gens und induziert dessen Transkription und Expression (Déry et al., 2005; Hewitson und Schofield, 2004; Pagé et al., 2002; Vaupel, 2004). Die damit verbundene endotheliale Zellmigration führt zur Bildung neuer Blutgefäße und verbesserter Versorgung der betroffenen Gebiete mit sauerstoffreichem Blut (Richard et al., 2000).

HIF-1 führt außerdem zur Induktion von zahlreichen glykolytischen Enzymen und Glukosetransportern, wie Adolase A und Pyruvatkinase M, welche für die anaerobe Energiegewinnung verantwortlich sind (Vaupel et al., 2004). Zahlreiche Studien haben jedoch auch nachgewiesen, dass eine Überexpression von HIF-1 die Apoptose in Zellen induzieren kann. Dies könnte die eingangs dargelegte Apoptose der Keratinozyten im Rahmen der allergischen Reaktion begünstigen (Carmeliet et al., 1998; Krick et al., 2005). Dabei müssen die exakten Signalwege noch evaluiert werden. In myeloiden Zellen haben Cramer et al. nachgewiesen, dass HIF-1 für Stoffwechselprozesse notwendig ist. Dabei führte eine Überexpression von HIF zu einer ansteigenden lokalen Inflammation, während

ein Fehlen von HIF die Aggregations- und Migrationsfähigkeiten von myeloiden Zellen verringerte und bakterielle Potentiale unterstützte (Cramer et al., 2003). Kleine Moleküle, wie Nickelionen, führen in Zellen zu einer ansteigenden HIF-1 Aktivität. Vermutlich konkurrieren diese Ionen um die Eisenbindungsstellen der 2-Oxoglutarat (2-OG) Hydroxylase, der C-Terminus Domäne der PHD2, inhibieren diese und haben dadurch eine hypoxische Wirkung (Rotili et al., 2011; Wang et al., 1995).

In dieser Untersuchung wurde lediglich in HDFs eine nukleäre stufenweise HIF-1 α -Akkumulation nach der Nickelstimulation nachgewiesen. Dabei gab es einen korrelierenden Anstieg von VEGF in den HDFs. Zudem lagen die nukleären HIF-1 α -Konzentrationen in den HGFs annähernd auf dem Kontrollniveau und auch die VEGF-Konzentrationen waren deutlich geringer. Im Gegensatz zu humanen dermalen Fibroblasten führen humane gingivale Fibroblasten unter Nিকেlexposition also nicht zu einer gesteigerten Vaskularisation und endothelialen Durchlässigkeit und dadurch bedingten gesteigerten Immunzellinvasion. Durch das damit induzierte Mikromilieu könnte eine Hyperreaktion in der Haut bei Nickelkontakt bzw. eine Hyporeaktion in der Gingiva begünstigt werden.

6.1.4 CCL20 Regulation

CCL20 wird mit einer verstärkten Rekrutierung von immaturren DZs, Teff, CD4⁺ T-Gedächtniszellen oder B-Lymphozyten in Verbindung gebracht (Yamazaki et al., 2008). Da die CCL20 Sekretion durch proinflammatorische Zytokine wie IL-1 und TNF- α oder durch Hypoxie induziert werden kann und CCR6-positive immaturre DZs sowie T-Zellen anlockt, wird CCL20 als ein inflammatorisches und homöostatisches Zytokin betrachtet (Blengio et al., 2013; Le Borgne et al., 2006; Paradis et al., 2008; Spiekstra et al., 2005; Varona et al., 2005; Zhao et al., 2014).

Außerdem haben Studien gezeigt, dass CCL20 bei inflammatorischen Erkrankungen wie Psoriasis von Bedeutung ist. Dabei wiesen Homey et al. nach, dass besonders kultivierte primäre Keratinozyten, dermale Fibroblasten und dermale mikrovaskuläre Endothel- und dendritische Zellen durch Mediatoren wie TNF- α , IL-1 β , CD40, IFN- γ oder IL-17 den Mediator CCL20 ausschütten (Homey et al., 2000, Zhao et al., 2014). Die erhobenen Daten unterstützen diese Arbeiten und zeigen, dass CCL20 auch eine Rolle bei der Nickel-induzierten ACD spielt. Nach der Nickelstimulation wurden hauptsächlich in den

dermalen Fibroblasten erhöhte CCL20 Konzentrationen nachgewiesen, während in den gingivalen Fibroblasten kaum CCL20-Expressionen zu verzeichnen waren. Dabei ist noch unklar, wie die CCL20-Aktivität auf Transkriptionsebene reguliert und kontrolliert wird. Da die CCL20-Promotorregion über eine NF- κ B-Bindungsstelle verfügt, könnte die erhöhte CCL20-Expression in den HDFs mit der NF- κ B-Aktivierung in Verbindung stehen (Sugita et al., 2002; Zhao et al., 2014). Auch die erhöhte IL-1 β -Expression könnte den CCL20-Anstieg in den HDFs erklären, wie dies in der Literatur bereits beschrieben wurde (Homey et al., 2000). Da ein Zusammenhang zwischen der Anzahl IL-17 positiven Zellen und den klinischen Symptomen einer Nickel-induzierten ACD sowie der Induktion von CCL20 in Keratinozyten besteht, wurde in der vorliegenden Studie auch die Expression von IL-17 untersucht (Harper et al., 2009; Pennino et al., 2010). Ein Zusammenhang zwischen der IL-17 und der CCL20 Expression konnte in den verwendeten Zellen jedoch nicht aufgezeigt werden.

6.2 Induktion der plasmazytoiden dendritischen Zellmigration

Dendritische Zellen sind als Antigen-präsentierende Zellen hauptsächlich für die T-Zell-Aktivierung und -Differenzierung während der Sensibilierungsphase der CHS verantwortlich und bestimmen damit, ob zukünftig eine Hyper- oder Hyposensibilität im Rahmen des Antigenkontaktes auftritt. Dabei sind die Eigenschaften der DZs abhängig von ihrem Reifegrad, ihrer Entstehung und immunmodulierenden Mediatoren sowie von ihrem lokalen Mikromilieu. Eine Aktivierung des TLR4 auf oralen DZs, der von Mikroorganismen stark besiedelten Mundschleimhaut, führte in Untersuchungen von Allam et al. zur Induktion von Treg-Zellen (Allam et al. 2008a). Interessanterweise scheinen bakterielle Bestandteile aus der Standortflora der Mundschleimhaut den Phänotyp und die Funktion von oralen DZs maßgeblich zu beeinflussen und eine Hochregulation von antiinflammatorischen Mediatoren wie IL-10 nach der Aktivierung des TLR4 zu begünstigen (Allam et al., 2003a; Allam et al., 2003b; Allam et al., 2004; Allam et al., 2006; Allam et al., 2008a). Die aktivierten Treg-Zellen sezernieren zusätzlich IL-10 und blockieren so die Immunantwort auf Haptene durch die Hemmung der Antigen-präsentierenden Funktion und die Sekretion von Interleukinen durch die DZs (Roncarolo

2006). Orale DZs sind somit entscheidend an der physiologischen Toleranzinduktion in vivo beteiligt.

Bei der Betrachtung der Unterschiede zwischen HDFs und HGFs zeigten sich in dieser Studie ähnliche Ergebnisse. HDFs hatten durch die verstärkte HIF-1 α und NF- κ B Aktivierung und damit verbundene hohe Expression an proinflammatorischen Mediatoren und Zytokinen (IL-1 β , IL-8, VEGF, CCL20) eher einen proallergenischen Charakter. Demgegenüber wiesen die HGFs ein protolerogenes Potenzial auf. Da Fibroblasten hauptsächlich zur Lamina propria gehören, in der DZs lokalisiert sind, könnten HGFs die protolerogenen Eigenschaften der DZs durch das veränderte Mikromilieu begünstigen. Im Gegensatz dazu könnten HDFs durch die Sekretion der proinflammatorischen Mediatoren DZs in Richtung proallergischer Charaktereigenschaften fördern.

Die hier dargelegten Untersuchungen der Migration humaner plasmazytoider dendritischer Zellen unterstützen diese Ergebnisse. Dabei wurde die Migration der DZs durch die Mediumüberstände der HDFs induziert. Während bei den HGFs sogar eine Hemmung der dendritischen Zellmigration feststellbar war. Die unterschiedliche Aktivierung der Migration könnte die Folge der unterschiedlichen Zytokin- und Chemokinfreisetzung sein. Der Nachweis kann jedoch nur durch entsprechende Inhibitionsversuche erfolgen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass HDFs durch die Freisetzung von IL-1 β als Entzündungsmediator, VEGF als Mediator für eine erhöhte Vaskularisierung und Gefäßpermeabilität sowie CCL20 als chemischer Lockstoff die Immunzellrekrutierung und -invasion in dermales Gewebe maßgeblich fördern können. Demgegenüber begünstigen HGFs durch die Sekretion von IL-10 und durch die reduzierte Freisetzung von IL-1 β , VEGF und CCL20 eine Hemmung der DZ-Invasion in gingivales Gewebe.

Damit unterstützen die Daten die eingangs dargelegte Hypothese, wonach gingivale Fibroblasten ein protolerogenes antiinflammatorisches Mikromilieu induzieren, welches den protolerogenen Charakter der DZs und damit die Entstehung einer oralen Toleranz fördern könnte.

6.3 Klinische Schlussfolgerung und Ausblick

Die Ergebnisse dieser Untersuchung unterstützen klinische Erfahrungswerte, wonach im Mundraum nur sehr selten durch Nickel verursachte allergische Reaktionen im Rahmen einer kieferorthopädischen Behandlung auftreten. Ihre Inzidenz wird auf unter 1 % geschätzt (Schuster et al., 2004, Volkman et al., 2007). Vielmehr zeigen verschiedene Studien, dass die juvenile Nickelexposition z. B. durch kieferorthopädische Apparaturen die Inzidenz einer Kontaktdermatitis senken kann. Die frühzeitige orale Antigenaufnahme scheint also langfristig zu einer systemischen Immuntoleranz führen zu können (Du Toit et al., 2015; Du Toit et al., 2018; Fors et al., 2008; Fors et al., 2012; Gölz et al., 2015). Du Toit und Kollegen konnten in einer randomisierten klinischen Studie zeigen, dass eine frühzeitige orale Exposition von Erdnüssen die Prävalenz der Erdnussallergie signifikant reduzierte (Du Toit et al., 2018). Da nur die frühzeitige orale Exposition eine Hyposensibilisierung induzieren konnte, wird hier auch von einem „Window of Opportunity“ gesprochen. Bestätigt werden die Untersuchungen durch die Tierstudien von Hoogstraten und Kollegen, wonach die Effektivität der oralen Hyposensibilisierung gegenüber Nickel mit dem Alter abnahm (Hoogstraten et al., 1991; Hoogstraten et al., 1992; Hoogstraten et al., 1993).

Zudem führte eine orale Nickelgabe zur Induktion einer Toleranz, die sowohl allergenspezifisch als auch dosisabhängig war und durch T-Zellen vermittelt wurde (Allam et al., 2014; Van Hoogstraten et al., 1992; Van Hoogstraten et al., 1993; Wu et al., 2007). Erste klinische Studien bestätigen die Tierstudien (Di Gioacchino et al., 2014; Schivano et al., 2006; Tammaro et al., 2009). Di Gioacchino et al. untersuchten in einem randomisierten doppelt-verblindeten Studiendesign Nickelallergiker, welchen oral Nickel verabreicht wurde, im Vergleich zu einer Placebogruppe. Dabei verursachte eine orale Nickelaufnahme von 1,5 µg Nickel/Woche eine signifikante Verbesserung der gastrointestinalen sowie dermalen Symptome und es konnte sogar eine teilweise Hyposensibilisierung nach oraler Nickelgabe bei Nickelallergikern erzielt werden (Di Gioacchino et al., 2014). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit konnten erstmals zeigen, dass unterschiedliche Eigenschaften lokaler Gewebsfibroblasten die Entstehung einer Hypo- oder Hypersensibilisierung mit beeinflussen könnten.

Grundsätzlich können allergische Reaktionen im Rahmen einer kieferorthopädischen Behandlung auch im Mundraum jedoch nie ganz ausgeschlossen werden. Zudem sollten extraorale Apparaturen, wie Gesichtsmasken (Headgear) mit Kontakt zur äußeren Haut, bei Nickelallergikern nicht eingesetzt werden, da kieferorthopädisch bedingte Hautreaktionen in den meisten Fällen den Metallteilen extraoraler Apparaturen zugeschrieben werden konnten (Jacobsen und Hensten-Pettersen, 1989; Kappert und Fitjer, 2002).

Unklar bleibt inwiefern zusätzliche Stimuli, wie die durch Kunststoffmonomere, die Ergebnisse beeinflussen könnten. Bando et al. hatten im Mausmodell zeigen können, dass vergleichsweise geringe Nickelkonzentrationen in Verbindung mit Kunststoffmonomeren ausreichend sind, um eine Sensibilisierung gegenüber Nickel auszulösen. Kunststoffmonomere könnten somit die Entstehung einer Nickel-induzierten allergischen Kontaktdermatitis begünstigen. Studien in Mausmodellen sind jedoch aufgrund der Unterschiede hinsichtlich des TLR4 Rezeptors nur unzureichend auf den Menschen übertragbar (Schmidt et al., 2010).

Des Weiteren ist zu beachten, dass in der Literatur Kreuzallergien zwischen Nickel und Kobalt (Cavielier und Fousserau, 1995; Khamaysi et al., 2006; Korossy et al., 1981), sowie Nickel und Palladium (Brehler, 2006; Tschernitschek et al., 2001; Wataha und Hanks, 1996) beschrieben werden. Dabei wird aufgezeigt, dass über 50 % aller Nickelallergiker auch Reaktionen auf Palladiumsalze und ein Drittel aller Nickelallergiker auch Sensibilisierungen gegenüber Kobaltchlorid aufweisen. Obwohl solche Reaktionen aufgrund der Korrosionsbeständigkeit von Kobalt-Chrom- oder Palladiumlegierungen sehr selten sind (Figgner, 1992; Garhammer et al., 2001; Schmalz und Garhammer, 2002), sollte bei der Auswahl der Dentallegierung anamnestisch darauf geachtet werden, da allergische Reaktionen nicht ausgeschlossen werden können (Tschernitschek et al., 1998).

Um forensischen Problemen vorzubeugen, sollte ein Zahnarzt deshalb bei Nickelallergikern die Indikation von kobalt-, chrom- oder palladiumhaltigen Legierungen sorgfältig abwägen, ihren potentiellen Einsatz im vornherein ausführlich mit dem Patienten besprechen und dokumentieren. Dabei wird eine interdisziplinäre Zusammenarbeit mit dermatologischen Fachabteilungen empfohlen, um gegebenenfalls weitere Epikutantestungen zu veranlassen oder alternative Materialien zu wählen. Zudem kann

der Behandler beim Einsatz kieferorthopädischer Apparaturen auf nickelfreie Produkte zurückgreifen, wie z. B. Titan- oder Keramikbrackets und im Einzelfall die Behandlungsplanung entsprechend anpassen.

Abschließend kann die vorliegende Arbeit als Pilotprojekt betrachtet werden, welche einzelne Signalwege im Rahmen der Nickel-induzierten Hypersensibilität näher beleuchtet, um erstmals relevante Unterschiede in der Immunantwort von lokalen Gewebsfibroblasten darzustellen. Zukünftige Untersuchungen sollten genomweite Transkriptomanalysen zur systematischen Aufarbeitung und Identifizierung weiterer relevanter Signaltransduktionswege und immunologischer Unterschiede beider Fibroblastentypen umfassen. Darüber hinaus sind klinische Studien erforderlich, um die möglichen protolerogenen Effekte einer kieferorthopädischen Therapie mit nickelhaltigen Apparaturen bei jungen Patienten besser zu verstehen.

7 Zusammenfassung

Die Nickelallergie ist mit einer Prävalenz von 4,5 bis 39 % die häufigste Kontaktallergie (Fors et al.; 2008; Kerosuo et al., 1996; Mattila et al., 2001). Dabei findet die Sensibilisierung hauptsächlich durch einen langfristigen Hautkontakt statt (Brandão et al., 2010; Dotterud und Smith-Sivertsen, 2007). Trotz der hohen Prävalenz werden allergische Reaktionen auf zahnmedizinische nickelhaltige Apparaturen im Mundraum nur sehr selten beobachtet (Schuster et al., 2004; Volkmann, 2007).

Basierend auf der Hypothese, dass Zellen des Mundraumes mit einer veränderten Immunreaktion auf unterschiedliche Allergene reagieren, wurden in dieser Untersuchung gingivale sowie dermale Fibroblasten mit unterschiedlichen Nickelionenkonzentrationen stimuliert. Dabei wurden gingivale Fibroblasten aus Gewebeproben einer Patientengruppe bestehend aus 3 männlichen und 5 weiblichen Patienten im Alter von 13-38 Jahren gewonnen, während dermale Fibroblasten kommerziell erworben wurden. Die Effekte wurden unter besonderer Berücksichtigung der Signaltransduktionswege, die im Rahmen einer Hyper- bzw. Hyposensibilisierung von großer Bedeutung sind, miteinander verglichen. Die untersuchten dermalen Fibroblasten wiesen nach Nickelionenstimulation durch eine verstärkte bis zu 25-fach höhere IL-1 β - und IL-8-Expression sowie eine erhöhte CCL20-Konzentrationen ein stark proinflammatorisches Potenzial auf. Während die gingivalen Fibroblasten nach der TLR4 Aktivierung antiinflammatorische Eigenschaften aufzeigten, die durch reduzierte IL-1 β -, IL-8- und CCL20-Expressionen sowie bis zu 30-fach erhöhte IL-10-Konzentrationen bedingt wurden. Eine gesteigerte Vaskularisation und eine damit verbundene gesteigerte Immunzellinvasion durch eine stufenweise nukleäre HIF-1 α -Akkumulation nach der Nickelionenstimulation mit einem korrelierenden Anstieg von VEGF konnte zudem lediglich in dermalen Fibroblasten nachgewiesen werden. Die Aktivierung der Migration der DZs wurde entsprechend durch die HDFs begünstigt und durch die HGFs inhibiert. Die vorliegende Arbeit gibt somit erste Hinweise darauf, dass Unterschiede in Bezug auf das lokale Mikromilieu in gingivalen und dermalen Fibroblasten proallergene oder protolerogene Immunzellreaktionen begünstigen könnten. Außerdem zeigen die Ergebnisse neue Aspekte der oral-induzierten Toleranz auf. Diese basieren auf aktuellen Erkenntnissen, die darauf hindeuten, dass die orale Nickelexposition vor einem

Hautpiercing eine Hypersensitivitätsreaktion gegenüber Nickel verhindern könnte. Dies ist wahrscheinlich nicht nur auf orale protolerogene DZs zurückzuführen, sondern vielmehr auch auf die Veränderungen im Mikromilieu, die durch gingivale Fibroblasten induziert werden und den Charakter der DZs beeinflussen könnten. Dabei bietet das Entschlüsseln der nach Nickelexposition relevanten Signalwege und Pathomechanismen in verschiedenen Zelltypen völlig neue Möglichkeiten für therapeutische Ansätze, um bestehende Probleme der allergischen Kontaktdermatitis durch die oral-induzierte Hyposensitivitätsreaktion zu behandeln.

Weitere Untersuchungen sind jedoch notwendig, um den Zusammenhang zwischen lokalen Gewebszellen, Immunzellen und den zugrundeliegenden Signalkaskaden, welche für die durch Nickel verursachten allergischen Reaktionen verantwortlich sind, darzulegen.

8 Anhang

8.1 Literaturverzeichnis

Ahlström MG, Thyssen JP, Menné T, Johansen JD. Prevalence of nickel allergy in Europe following the EU Nickel Directive - a review. *Contact Dermatitis* 2017; 77: 193-200

Aiba S, Terunuma A, Manome H, Tagami H. Dendritic cells differently respond to haptens and irritants by their production of cytokines and expression of co-stimulatory molecules. *Eur J Immunol* 1997; 27: 3031-3038

Akdis CA, Akdis M. Mechanisms of immune tolerance to allergens: role of IL-10 and Tregs. *J Clin Invest* 2014; 124: 4678-4680

Albanesi C, Scarponi C, Giustizieri ML, Girolomoni G. Keratinocytes in inflammatory skin diseases. *Curr Drug Targets. Inflamm Allergy* 2005; 4: 329-334

Allam JP, Duan Y, Winter J, Stojanovski G, Fronhoffs, Wenghoefer M, Bieber T, Peng WM, Novak N. Tolerogenic T cells, Th1/Th17 cytokines and TLR2/TLR4 expressing dendritic cells predominate the microenvironment within distinct oral mucosal sites. *Allergy* 2011a; 66: 532-539

Allam JP, Geiger E, Kraft S, Bieber T. Limited reliability of E-cadherin as a specific marker for in vitro-generated Langerhans cells. *Arch Dermatol Res* 2003b; 295: 263-268

Allam JP, Klein E, Bieber T, Novak N. Transforming growth factor-beta1 regulates the expression of the high-affinity receptor for IgE on CD34 stem cell-derived CD1a dendritic cells in vitro. *J Invest Dermatol* 2004; 123: 676-682

Allam JP, Niederhagen B, Bücheler M, Appel T, Betten H, Bieber T, Bergé S, Novak N. Comparative analysis of nasal and oral mucosa dendritic cells. *Allergy* 2006; 61: 166-172

Allam JP, Novak N, Fuchs C, Asen S, Bergé S, Appel T, Geiger E, Kochan JP, Bieber T. Characterization of dendritic cells from human oral mucosa: a new Langerhans' cell type with high constitutive FcεpsilonRI expression. *J Allergy Clin Immunol* 2003a; 112: 141-148

Allam JP, Novak N. Immunological mechanisms of sublingual immunotherapy. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2014; 14:564-569

Allam JP, Novak N. Local immunological mechanisms of sublingual immunotherapy. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2011b; 11: 571-578

Allam JP, Peng WM, Appel T, Wenghoefer M, Niederhagen B, Bieber T, Bergé S, Novak N. Toll-like receptor 4 ligation enforces tolerogenic properties of oral mucosal Langerhans cells. *J Allergy Clin Immunol* 2008a; 121: 368-374

Allam JP, Stojanovski G, Friedrichs N, Peng W, Bieber T, Wenzel J, Novak N. Distribution of Langerhans cells and mast cells within the human oral mucosa: new application sites of allergens in sublingual immunotherapy? *Allergy* 2008bk; 63: 720-727

Anke M, Müller R, Trupschuch A, Dorn W, Seifert M, Pilz K, Vormann J, Schäfer U. Intake of nickel in Germany: risk or normality. *J Trace and Microprobe Techniques* 2000; 18: 549-556

Arrighi JF, Rebsamen M, Rousset F, Kindler V, Hauser C. A critical role for p38 mitogenactivated protein kinase in the maturation of human blood-derived dendritic cells induced by lipopolysaccharide, TNF-alpha, and contact sensitizers. *J Immunol* 2001; 166: 3837-3845

Artik S, Gleichmann E, Ruzicka T. (Tolerance induction towards nickel. From animal model to humans). *Hautarzt* 2004; 55: 1052-1059

Baeuerle PA, Henkel T. Function and activation of NF-kappa B in the immune system. *Annu Rev Immunol* 1994; 12: 141-179

Balmert SC, Donahue C, Vu JR, Erdos G, Falo LD Jr, Little SR. In vivo induction of regulatory T cells promotes allergen tolerance and suppresses allergic contact dermatitis. *J Control Release* 2017; 261:223-233

Baltimore D. NF-kB is 25. *Nat Immunol* 2011; 12: 683-685

Bando K, Takahashi H, Kinbara M, Tanaka Y, Kuroishi T, Sasaki K, Takano-Yamamoto T, Sugawara S, Endo Y. Resin Monomers Act as Adjuvants in Ni-induced Allergic Dermatitis *in vivo*. J Dent Res 2014; 93: 1101-1107

Bang FB. A bacterial disease of *Limulus polyphemus*. Bull Johns Hopkins Hosp. 1956; 98: 325-351

Barrett RD, Bishara SE, Quinn JK. Biodegradation of orthodontic appliances. Part I. Biodegradation of nickel and chromium in vitro. Am J Orthod Dentofacial Orthop 1993; 103: 8-14

Behr K. Nickel-Titan-Instrumente. Endodontie Journal 2003; 2: 6-11

Bennett CL, van Rijn E, Jung S, Inaba K, Steinmann RM, Kapsenberg ML, Clausen BE. Inducible ablation of mouse Langerhans cells diminishes but fails to abrogate contact hypersensitivity. J Cell Biol. 2005; 169: 569-576

Biedermann T, Kneilling M, Mailhammer R, Maier K, Sander CA, Kollias G, Kunkel SL, Hültner L, Röcken M. Mast cells control neutrophil recruitment during T cell-mediated delayed-type hypersensitivity reactions through tumor necrosis factor and macrophage inflammatory protein 2. J Exp Med 2000; 192: 1441–1452

Blengio F, Raggi F, Pierobon D, Cappello P, Eva A, Giovarelli M, Varesio L, Bosco MC. The hypoxic environment reprograms the cytokine/chemokine expression profile of human mature dendritic cells. Immunobiology 2013; 218: 76-89

Bracken CP, Whitelaw ML, Peet DJ. The hypoxia-inducible factors: key transcriptional regulators of hypoxic responses. Cell Mol Life Sci 2003; 60: 1376-1393

Brandão MH, Gontijo B, Girundi MA, de Castro MC. Ear piercing as a risk factor for contact allergy to nickel. J Pediatr (Rio J) 2010; 86: 149-154

Brandão MH, Gontijo B. Contact allergy to metals (chromium, cobalt and nickel) in childhood. An Bras Dermatol 2012; 87(2): 269-276

Brandtzaeg P, Pabst R. Let's go mucosal: communication on slippery ground. *Trends Immunol* 2004; 25: 570-577

Brant KA, Fabisiak JP. Nickel alterations in TLR-2-dependent chemokine profiles in lung fibroblasts are mediated by COX-2. *Am J Respir Cell Molec Biol* 2008; 38: 591–599

Brant KA, Fabisiak JP. Nickel and the microbial toxin, MALP-2, stimulate proangiogenic mediators from human lung fibroblasts via a HIF-1alpha and COX-2-mediated pathway. *Toxicol Sci* 2009; 107: 227-237

Brant KA, Fabisiak JP. Role of hypoxia-inducible factor 1, α subunit and cAMP-response element binding protein 1 in synergistic release of interleukin 8 by prostaglandin E2 and nickel in lung fibroblasts. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2013; 49: 105-113

Brehler R. Verdachtsdiagnose Materialunverträglichkeit. *Zahnärztl Mitt* 2006; 96: 78-80

Bunselmeyer B, Bergmann KC. Nickelgehalt deutscher Lebensmittel. *Allergo J* 1998; 7: 419-424

Cameron KS, Buchner V, Tchounwou PB. Exploring the molecular mechanisms of nickel-induced genotoxicity and carcinogenicity: a literature review. *Rev Environ Health* 2011; 26: 81-92

Carmeliet P, Dor Y, Herbert JM, Fukumura D, Brusselmans K, Dewerchin M, Neeman M, Bono F, Abramovitch R, Maxwell P, Koch CJ, Ratcliffe P, Moons L, Jain RK, Collen D, Keshert E. Role of HIF-1alpha in hypoxia-mediated apoptosis, cell proliferation and tumor angiogenesis. *Nature* 1998; 394: 485-490

Caruso RV, O'Connor RJ, Stephens WE, Cummings KM, Fong GT. Toxic Metal Concentrations in Cigarettes Obtained from U.S. Smokers in 2009: Results from the International Tobacco Control (ITC) United States Survey Cohort. *Int J Environ Res Public Health* 2014; 11: 202-217

Cavani A, Mei D, Guerra E, Corinti S, Giani M, Pirrotta L, Puddu P, Girolomoni G. Patients with allergic contact dermatitis to nickel and nonallergic individuals display different nickel-specific T cell responses. Evidence for the presence of effector CD8+ and regulatory CD4+ T cells. *J Invest Dermatol* 1998; 111: 621-628

Cavani A, Nasorri F, Ottaviani C, Sebastiani S, De Pità O, Girolomoni G. Human CD25+ regulatory T cells maintain immune tolerance to nickel in healthy, nonallergic individuals. *J Immunol* 2003; 171: 5760-5768

Cavani A, Nasorri F, Prezzi C, Sebastiani S, Albanesi C, Girolomoni G. Human CD4+ T lymphocytes with remarkable regulatory functions on dendritic cells and nickel-specific Th1 immune responses. *J Invest Dermatol* 2000; 114: 295-302

Cavielier C, Fousserau J. Kontaktallergie gegen Metalle und deren Salze. Teil II: Nickel, Kobalt, Quecksilber und Palladium. *Dermatosen* 1995; 43: 152-162

Chapman-Smith A, Lutwyche JK, Whitelaw ML. Contribution of the Per/Arnt/Sim (PAS) domains to DNA binding by the basic helix-loop-helix PAS transcriptional regulators. *J Biol Chem* 2004; 279: 5353-5362

Chehade M, Mayer L. Oral tolerance and its relation to food hypersensitivities. *J Allergy Clin Immunol* 2005; 115: 3-12

Cheng TY, Tseng YH, Sun CC, Chu CY. Contact sensitization to metals in Taiwan. *Contact Dermatitis* 2008; 59: 353-360

Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987; 162: 156-159

Cramer T, Yamanishi Y, Clausen BE, Förster I, Pawlinski R, Mackman N, Haase VH, Jaenisch R, Corr M, Nizet V, Firestein GS, Gerber HP, Ferrara N, Johnson RS. HIF-1 α is essential for myeloid cell-mediated inflammation. *Cell* 2003; 112: 645-657

Déry MA, Michaud MD, Richard DE. Hypoxia-inducible factor 1: regulation by hypoxic and non-hypoxic activators. *Int J Biochem Cell Bio* 2005; 37: 535-540

DGZMK. Metalle im Mund. *DGZMK.de* 1999; 1/99: 11-12

Di Gioacchino M, Ricciardi L, De Pità O, Minelli M, Patella V, Voltolini S, Di Rienzo V, Braga M, Ballone E, Mangifesta R, Schiavino D. Nickel oral hyposensitization in patients with systemic nickel allergy syndrome. *Ann Med* 2014; 46: 31-37

Divkovic M, Pease CK, Gerberick GF, Basketter DA. Hapten-protein binding: from theory to practical application in the in vitro prediction of skin sensitization. *Contact Dermatitis* 2005; 53: 189–200

Dotterud LK, Falk ES. Metal allergy in north Norwegian schoolchildren and its relationship with ear piercing and atopy. *Contact Dermatitis* 1994; 31: 308-313

Dotterud LK, Smith-Sivertsen T. Allergic contact sensitization in the general adult population: a population-based study from Northern Norway. *Contact Dermatitis* 2007; 56: 10-15

Dubois B, Goubier A, Joubert G, Kaiserlian D. Oral tolerance and regulation of mucosal immunity. *Cell Mol Life Sci* 2005; 62: 1322–1332

Du Toit G, Roberts G, Sayre PH, Bahnson HT, Radulovic S, Santos AF, Brough HA, Phippard D, Basting M, Feeney M, Turcanu V, Sever ML, Gomez Lorenzo M, Plaut M, Lack G, LEAP Study Team. Randomized Trial of Peanut Consumption in Infants at Risk for Peanut Allergy. *N Engl J Med* 2015; 372: 803-813

Du Toit G, Sampson HA, Plaut M, Burks AW, Akdis CA, Lack G. Food allergy: Update on prevention and tolerance. *J Allergy Clin Immunol* 2018; 141: 30-40

Edman B, Möller H. Trends and forecasts for standard allergens in a 12-year patch test material. *Contact Dermatitis* 1982; 8: 95-104

Ehrnrooth M, Kerosuo H. Face and neck dermatitis from a stainless steel orthodontic appliance. *Angle Orthod* 2009; 79: 1194-1196

Eliades T, Bourauel C. Intraoral aging of orthodontic materials: the picture we miss and its clinical relevance. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2005; 127: 403-412

Eliades T, Trapalis CY, Eliades G, Katsavrias E. Salivary metal levels of orthodontic patients: a novel methodological and analytical approach. *Eur J Orthod* 2003; 25: 103-106

Eyerich K, Pennino D, Scarponi C, Foerster S, Nasorri F, Behrendt H, Ring J, Traidl-Hoffmann C, Albanesi C, Cavani A. IL-17 in atopic eczema: linking allergen-specific adaptive and microbial-triggered innate immune response. *J Allergy Clin Immunol* 2009; 123: 59-66

Ferguson TA, Dube P, Griffith TS. Regulation of contact hypersensitivity by interleukin 10. *J Exp Med* 1994; 179: 1597–1604

Figgenger L. Dentallegierungen und Allergie-Ein Fallbericht. *Dtsch Zahnärztl Z* 1992; 47: 33-35

Fishbein L. Perspectives of analysis of carcinogenic and mutagenic metals in biological samples. *Int J Environ Anal Chem* 1987; 28: 21-69

Fisher AA. Allergic dermatitis presumably due to metallic foreign bodies containing nickel or cobalt. *Cutis* 1977; 19: 285-286

Flyvholm MA, Nielsen GD, Andersen A. Nickel Content of Food and Estimation of Dietary Intake. *Z Lebens Unters Forsch* 1984; 179: 427-431

Fors R, Persson M, Bergström E, Stenlund H, Stymne B, Stenberg B. Nickel allergy-prevalence in a population of Swedish youths from patch test and questionnaire data. *Contact Dermatitis* 2008; 58: 80-87

Fors R, Persson M, Bergström E, Stenlund H, Stymne B, Stenberg B. Lifestyle and Nickel Allergy in a Swedish Adolescent Population: Effects of Piercing, Tattooing and Orthodontic Appliances. *Acta Derm Venereol* 2012; 92(6): 664-668

Fors R, Stenberg B, Stenlund H, Persson M. Nickel allergy in relation to piercing and orthodontic appliances-a population study. *Contact Dermatitis* 2012; 67: 342-350

Frede S, Stockmann C, Winning S, Freitag P, Fandrey J. Hypoxia-inducible factor (HIF) 1alpha accumulation and HIF target gene expression are impaired after induction of endotoxin tolerance. *J Immunol* 2009; 182: 6470-6476

Garhammer P, Schmalz G, Hiller KA, Reitinger T, Stolz W. Patients with local adverse effects from dental alloys: frequency, complaints, symptoms, allergy. *Clin Oral Investig* 2001; 5: 240-249

Gaukrodger DJ, Cook SW, Fell GS, Hunter JA. Nickel dermatitis. the reacticen to oral nickel challenge. *Br. J. Dermatol* 1986; 115: 33-38

Ghoreishi M, Dutz JP. Tolerance induction by transcutaneous immunization through ultraviolet-irradiated skin is transferable through CD4+CD25+ T regulatory cells and is dependent on host-derived IL-10. *J Immunol* 2006; 176: 2635-2644

Gibbs S, Kosten I, Veldhuizen R, Spiekstra S, Corsini E, Roggen E, Rustemeyer T, Feilzer AJ, Kleverlaan CJ. Assessment of metal sensitizer potency with the reconstructed human epidermis IL-18 assay. *Toxicology* 2018; 393: 62-72

Gölz L, Knickenberg AC, Keilig L, Reimann S, Papageorgiou SN, Jäger A, Bourauel C. Nickel ion concentrations in the saliva of patients treated with self-ligating fixed appliances: a prospective cohort study. *J Orofac Orthop* 2016; 77: 85-93

Gölz L, Papageorgiou SN, Jäger A. Nickel hypersensitivity and orthodontic treatment: a systematic review and meta-analysis. *Contact Dermatitis* 2015; 73: 1-14

Goodman JE, Prueitt RL, Thakali S, Oller AR. The nickel ion bioavailability model of the carcinogenic potential of nickel-containing substances in the lung. *Crit Rev Toxicol* 2011; 41: 142-174

Grabbe S, Schwarz T. Immunoregulatory mechanisms involved in elicitation of allergic contact hypersensitivity. *Immunol Today* 1998; 19: 37-44

Grabbe S, Steinbrink K, Steinert M, Luger TA, Schwarz T. Removal of the majority of epidermal Langerhans cells by topical or systemic steroid application enhances the effector phase of murine contact hypersensitivity. *J Immunol* 1995; 155: 4207-4217

Grandjean P. Human exposure to nickel. In: Sunderman FW, HRSG. Nickel in the human environment IARC Scientific Publications No. 53. Lyon: IARC, 1984: 469-485

Harper EG, Guo C, Rizzo H, Lillis JV, Kurtz SE, Skorcheva I, Purdy D, Fitch E, Iordanov M, Blauvelt A. Th17 cytokines stimulate CCL20 expression in keratinocytes in vitro and in vivo: implications for psoriasis pathogenesis. *J Invest Dermatol* 2009; 129: 2175-2183

Hayden MS, Gosh S. Shared principles in NF- κ B signaling. *Cell* 2008; 132: 344-362

He D, Wu L, Kim HK, Li H, Elmetts CA, Xu H. CD8⁺ IL-17-producing T cells are important in effector functions for the elicitation of contact hypersensitivity responses. *J Immunol* 2006; 177: 6852–6858

Hewitson KS, Schofield CJ. The HIF pathway as a therapeutic target. *Drug Discov Today* 2004; 9: 704-711

Höglund P. Induced peripheral regulatory T cells: the family grows larger. *Eur J Immunol* 2006; 36: 264-266

Homey B, Dieu-Nosjean MC, Wiesenborn A, Massacrier C, Pin JJ, Oldham E, Catron D, Buchanan ME, Müller A, deWaal Malefyt R, Deng G, Orozco R, Ruzicka T, Lehmann P, Lebecque S, Caux C, Zlotnik A. Up-regulation of macrophage inflammatory protein-3 α /CCL20 and CC chemokine receptor 6 in psoriasis. *J Immunol* 2000; 164: 6621-6632

Horak E, Sundermann W. Fecal nickel excretion by healthy adults. *Clin Chem* 1973; 19: 429

Hu X, Chen J, Wang L, Ivashkiv LB. Crosstalk among Jak-STAT, Toll-like receptor, and ITAM-dependent pathways in macrophage activation. *J Leukoc Biol* 2007; 82: 237-243

Huang LE, Gu J, Schau M, Bunn HF. Regulation of hypoxia-inducible factor 1 α is mediated by an O₂-dependant degradation domain via the ubiquitin-proteasome pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 7987-7992

Jacobsen N, Hensten-Pettersen A. Occupational health problems and adverse patient reactions in orthodontics. *Eur J Orthod* 1989; 11: 254-264

Jensen CS, Lisby S, Baadsgaard O, Vølund A, Menné T. Decrease in nickel sensitization in a Danish schoolgirl population with ears pierced after implementation of a nickel-exposure regulation. *Br J Dermatol* 2002; 146: 636-642

Jia W, Beatty MW, Reinhardt RA, Petro TM, Cohen DM, Maze CR, Strom EA, Hoffmann M. Nickel release from orthodontic archwires and cellular immune response to various nickel concentrations. *J Biomed Mat Res* 1999; 48: 488-495

Juarez M, Filer A, Buckley CD. Fibroblasts as therapeutic targets in rheumatoid arthritis and cancer. *Swiss Med Wkly* 2012; 142: 13529

Kaaber K, Veien NK, Tjell JC. Low nickel diet in the treatment of patients with chronic nickel dermatitis. *Br J Dermatol* 1978; 98: 197-201

Kalish RS, Wood JA, LaPorte A. A Processing of urushiol (poison ivy) hapten by both endogenous and exogenous pathways for presentation to T cells in vitro. *J Clin Invest* 1994; 93: 2039-2047

Kaplan DH, Jenison MC, Saeland S, Shlomchik WD, Shlomchik MJ. Epidermal langerhans cell-deficient mice develop enhanced contact hypersensitivity. *Immunity* 2005; 23: 611-620

Kappert HF, Fitjer LC. Kieferorthopädische Werkstoffe- Biokompatibilität der kieferorthopädischen Materialien. In: Diedrich P, HRSG. *Praxis der Zahnheilkunde Bd 12. Kieferorthopädie 3 – Interdisziplinäre Aufgaben*. München – Jena: Urban & Fischer-Verlag; 2002, 4. Auflage: 255

Kehren J, Desvignes C, Krasteva M, Ducluzeau MT, Assossou O, Horand F, Hahne M, Kägi D, Kaiserlian D, Nicolas JF. Cytotoxicity is mandatory for CD8(+) T cell-mediated contact hypersensitivity. *J Exp Med* 1999; 189: 779–786

Kerosuo H, Kullaa A, Kerosuo E, Kanerva L, Hensten-Pettersen. Nickel allergy in adolescents in relation to orthodontic treatment and piercing of ears. *A Am J Orthod Dentofacial Orthop* 1996; 109: 148-154

Kerosuo H, Moe G, Kleven E. In vitro release of nickel and chromium from different types of simulated orthodontic appliances. *Angle Orthod* 1995; 65: 111-116

Khamaysi Z, Bergman R, Weltfriend S. Positive patch test reactions to allergens of the dental series and the relation to the clinical presentations. *Contact Dermatitis* 2006; 55: 216-218

Kissenpfennig A, Henri S, Dubois B, Laplace-Builhé C, Perrin P, Romani N, Tripp CH, Douillard P, Leserman L, Kaiserlian D, Saeland S, Davoust J, Malissen B. Dynamics and function of Langerhans cells *in vivo*: dermal dendritic cells colonize lymph node areas distinct from slower migrating Langerhans cells. *Immunity*. 2005; 22: 643-654

Kolokitha OE, Chatzistavrou E. Allergic reactions to nickel-containing orthodontic appliances: clinical signs and treatment alternatives. *World J Orthod* 2008; 9: 399-406

Korossy S, Nebenführer L, Vincze E. Häufigkeit und Relevanz der einzelnen chemischen Gruppen- und Kopplungsallergien. *Z Hautkr* 1981; 56: 137-144

Krick S, Eul BG, Hänze J, Savai R, Grimminger F, Seeger W, Rose F. Role of hypoxia-inducible factor-1alpha in hypoxia-induced apoptosis of primary alveolar epithelial type II cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2005; 32: 395-403

Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227: 680-685

Lakhani NJ, Sarkar MA, Venitz J, Figg WD. 2-Methoxyestradiol, a promising anticancer agent. *Pharmacotherapy* 2003; 23: 165-172

Lando D, Peet DJ, Whelan DA, Gorman JJ, Whitelaw ML. Asparagine hydroxylation of the HIF transactivation domain a hypoxic switch. *Science*. 2002; 295: 858-861

Le Borgne M, Etchart N, Goubier A, Lira SA, Sirard JC, van Rooijen N, Caux C, Ait-Yahia S, Vicari A, Kaiserlian D, Dubois B. Dendritic cell rapidly recruited into epithelial tissues via CCR6/ CCL20 are responsible for CD8⁺ T cell crosspriming *in vivo*. *Immunity* 2006; 24: 191-201

Lidén C, Skare L, Vahter M. Release of nickel from coins and deposition onto skin from coin handling-comparing Euro coins and SEK. *Contact Dermatitis* 2008; 59: 31-37

Lindigkeit J. Sind Dentallegierungen bald am Ende?. *ZT Aktuell* 2005; 4: 13-14

Luckey U, Schmidt T, Pfender N, Romer M, Lorenz N, Martin SF, Bopp T, Schmitt E, Nikolaev A, Yogeve N, Waismann A, Jakob T, Steinbrink K. Crosstalk of regulatory T cells and tolerogenic dendritic cells prevents contact allergy in subjects with low zone tolerance. *J Allergy Clin Immunol* 2012; 130: 781-797

Lü X, Lu H., Zhao L, Yang Y, Lu Z. Genome-wide pathways analysis of nickel ion-induced differential genes expression in fibroblasts. *Biomaterials* 2010; 31: 1965-1973

Lü FX, Jacobson RS. Oral mucosal immunity and HIV/SIV infection. *J Dent Res* 2007; 86: 216–226

Luft S, Keilig L, Jäger A, Bourauel C. In-vitro evaluation of the corrosion behavior of orthodontic brackets. *Orthod Craniofac Res* 2009; 12: 43-51

Luftqualität in Nordrhein-Westfalen: LUQS-Jahresbericht 1998; Landesumweltamt Nordrhein-Westfalen (LUA NRW), Essen 1999

Lutz MB, Schuler G. Immature, semi-mature and fully mature dendritic cells: which signals induce tolerance or immunity? *Trends Immunol* 2002; 23: 445-449

Ma HL, Liang S, Li J, Napierata L, Brown T, Benoit S, Senices M, Gill D, Dunussi-Joannopoulos K, Collins M, Nickerson-Nutter C, Fouser LA, Young DA. IL-22 is required for Th17 cell-mediated pathology in a mouse model of psoriasis-like skin inflammation. *J Clin Invest* 2008; 118: 597-607

Mattila L, Kilpeläinen M, Terho EO, Koskenvuo M, Helenius H, Kalimo K. Prevalence of nickel allergy among Finnish university students in 1995. *Contact Dermatitis* 2001; 44: 218-223

Maxwell P, Salnikow K. HIF-1: an oxygen and metal responsive transcription factor. *Cancer Biol Ther* 2004; 3: 29-35

Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA Jr. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 1997; 388: 394–397

Medzhitov R, Janeway CJr. The toll receptor family and microbial recognition. *Trends Microbiol* 2000; 8: 452-456

Menné T. Quantitative aspects of nickel dermatitis. Sensitization and eliciting threshold concentrations. *Sci Total Environ* 1994; 148: 275-281

Mikulewicz M, Chojnacka K. Release of metal ions from orthodontic appliances by in vitro studies: a systematic literature review. *Biol Trace Elem Res* 2011; 139: 241-256

Mikulewicz M, Chojnacka K. Trace metal release from orthodontic appliances by in vivo studies: a systematic literature review. *Biol Trace Elem Res* 2010; 137: 127-138

Miller SI, Ernst RK, Bader MW. LPS, TLR4 and infectious disease diversity. *Nat Rev Microbiol* 2005; 3: 36-46

Mole DR, Maxwell PH, Pugh CW, Ratcliffe PJ. Regulation of HIF by the von Hippel-Lindau tumour suppressor: implications for cellular oxygen sensing. *IUBMB Life* 2001; 52: 43-47

Moritz C G, Andersen K E. Allergy contact dermatitis in children and adolescents. *Contact Dermatitis* 1999; 41: 121–130

Muzio M, Polentarutti N, Bosisio D, Manoj Kumar PP, Mantovani A. Toll-like receptor family and signalling pathway. *Biochem Soc Trans* 2000; 28: 563-566

Nakae S, Komiyama Y, Nambu A, Sudo K, Iwase M, Homma I, Sekikawa K, Asano M, Iwakura Y. Antigen-specific T cell sensitization is impaired in IL-17-deficient mice, causing suppression of allergic cellular and humoral responses. *Immunity* 2002; 17: 375-387

Noble J, Ahing SI, Karaikos NE, Wiltshire WA. Nickel allergy and orthodontics, a review and report of two cases. *Br Dent J* 2008; 204: 297-300

Noël L, Leblanc JC, Guérin T. Determination of several elements in duplicate meals from catering establishments using closed vessel microwave digestion with inductively coupled plasma mass spectrometry detection: estimation of daily dietary intake. *Food Addit Contam* 2003; 20: 44-56

Novak N, Allam JP, Betten H, Haberstock J, Bieber T. The role of antigen presenting cells at distinct anatomic sites: they accelerate and they slow down allergies. *Allergy* 2004; 59: 5-14

Novak N, Gros E, Bieber T, Allam JP. Human skin and oral mucosal dendritic cells as 'good guys' and 'bad guys' in allergic immune responses. *Clin Exp Immunol* 2010; 161: 28-33

Novak N, Haberstock J, Bieber T, Allam JP. The immune privilege of the oral mucosa. *Trends Mol Med* 2008; 14: 191-198

O'Leary JG, Goodarzi M, Drayton DL, von Andrian UH. T cell- and B cell independent adaptive immunity mediated by natural killer cells. *Nat Immunol* 2006; 7: 507-516

Oeckinghaus A, Hayden MS, Ghosh S. Crosstalk in NF- κ B signaling pathways. *Nat Immunol* 2011; 12: 695-708

Ogami A, Morimoto Y, Myojo T, Oyabu T, Murakami M, Todoroki M, Nishi K, Kadoya C, Yamamoto M, Tanaka I. Pathological features of different sizes of nickel oxide following intratracheal instillation in rats. *Inhal Toxicol* 2009; 21: 812-818

Pagé EL, Robitaille GA, Pouyssegur J, Richard DE. Induction of hypoxia-inducible factor-1 α by transcriptional and translational mechanisms. *J Biol Chem* 2002; 277: 48403-48409

Paradis TJ, Cole SH, Nelson RT, Gladue RP. Essential role of CCR6 in directing activated T cells to the skin during contact hypersensitivity. *J Invest Dermatol* 2008; 128: 628-633

Park HY, Shearer TR. In vitro release of nickel and chromium from simulated orthodontic appliances. *Am J Orthod* 1983; 84: 156-159

Pasanen K, Pukkala E, Turunen AW, Patama T, Jussila I, Makkonen S, Salonen RO, Verkasalo PK. Mortality among population with exposure to industrial air pollution containing nickel and other toxic metals. *J Occup Environ Med* 2012; 54: 583-591

Paster BJ, Boches SK, Galvin JL, Ericson RE, Lau CN, Levanos VA, Sahasrabudhe A, Dewhirst FE. Bacterial diversity in human subgingival plaque. *J Bacteriol* 2001; 183: 3770-3783

Pearce AL, Finlay-Jones JJ, Hart PH. Reduction of nickel-induced contact hypersensitivity reactions by topical tea tree oil in humans. *Inflamm Res*. 2005; 54: 22-30

Pennino D, Eyerich K, Scarponi C, Carbone T, Eyerich S, Nasorri F, Garcovich S, Traidl-Hoffmann C, Albanesi C, Cavani A. IL-17 amplifies human contact hypersensitivity by licensing hapten nonspecific Th1 cells to kill autologous keratinocytes. *J Immunol* 2010; 184: 4880-4888

Perkins ND. Posttranslational modifications regulating the activity and function of the nuclear factor kappa B pathway. *Oncogene* 2006; 25: 6717-6730

Petoumenou E, Arndt M, Keilig L, Reimann S, Hoederath H, Eliades T, Jäger A, Bourauel C. Nickel concentration in the saliva of patients with nickeltitanium orthodontic appliances. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2009; 135: 59-65

Pfaffl MW. Real-time RT-PCR: Neue Ansätze zur exakten mRNA Quantifizierung. *BIOspektrum* 2004; 1: 92-95

Pfannhauser W. Essentielle Spurenelemente in der Nahrung. Berlin - Heidelberg: Springer-Verlag, 1988

Pietruska JR, Liu X, Smith A, McNeil K, Weston P, Zhitkovich A, Hurt R, Kane AB. Bioavailability, intracellular mobilization of nickel, and HIF-1 α activation in human lung epithelial cells exposed to metallic nickel and nickel oxide nanoparticles. *ToxSci* 2011; 124: 138-148

Poltorak A, He X, Smirnova I, Liu MY, van Huffel C, Du X, Birdwell D, Alejos E, Silva M, Galanos C, Freudenberg M, Ricciardi-Castagnoli P, Layton B, Beutler B. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science* 1998; 282: 2085–2088

Rachmawati D, Bontkes HJ, Verstege MI, Muris J, von Blomberg BM, Scheper RJ, van Hoogstraten IM. Transition metal sensing by Toll-like receptor-4: next to nickel, cobalt and palladium are potent human dendritic cell stimulators. *Contact Dermatitis* 2013; 68: 331-338

Raghavan B, Martin SF, Esser PR, Goebeler M, Schmidt M. Metal allergens nickel and cobalt facilitate TLR4 homodimerization independently of MD2. *EMBO Rep* 2012; 13: 1109-1115

Rahilly G, Price N. Current Products and Practice Nickel allergy and orthodontics. *Journal of Orthodontics* 2003; 30: 171-174

Reife RA, Coats SR, Al-Qutub M, Dixon DM, Braham PA, Billharz RJ, Howald WN, Darveau RP. Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide lipid A heterogeneity: differential activities of tetra- and penta-acylated lipid A structures on E-selectin expression and TLR4 recognition. *Cell Microbiol* 2006; 8: 857-868

Richard DE, Berra E, Pouyssegur J. Nonhypoxic pathway mediates the induction of hypoxia-inducible factor 1 α in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 2000; 275: 26765-26771

Rietschel RL, Fowler JF, Warshaw EM, Belsito D, DeLeo VA, Maibach HI, Marks JG, Mathias CG, Pratt M, Sasseville D, Storrs FJ, Taylor JS, Zug KA. Detection of nickel sensitivity has increased in North American patch-test patients. *Dermatitis* 2008; 19: 16-19

Roncarolo MG, Gregori S, Battaglia M, Bacchetta R, Fleischhauer K, Levings MK. Interleukin-10-secreting type 1 regulatory T cells in rodents and humans. *Immunol Rev* 2006; 212: 28-50

Rotili D, Altun M, Kawamura A, Wolf A, Fischer R, Leung IK, Mackeen MM, Tian YM, Ratcliffe PJ, Mai A, Kessler BM, Schofield CJ. A Photoreactive Small-Molecule Probe for 2-Oxoglutarate Oxygenases. *Chem Biol* 2011; 18: 642-654

Saito M, Arakaki R, Yamada A, Tsunematsu T, Kudo Y, Ishimaru N. Molecular Mechanisms of Nickel Allergy. *Int J Mol Sci* 2016; 17: 202

Sakaguchi S. Naturally arising Foxp3-expressing CD25⁺CD4⁺ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. *Nat Immunol* 2005; 6: 345-352

Salnikow K, Zhitkovich A. Genetic and epigenetic mechanisms in metal carcinogenesis and cocarcinogenesis: nickel, arsenic, and chromium. *Chem Res Toxicol* 2008; 21: 28-44

Schatt W, Worch H. *Werkstoffwissenschaften*. Weinheim: Wiley-VCH, 2003

Schiavino D, Nucera E, Alonzi C, Buonomo A, Pollastrini E, Roncallo C, De Pasquale T, Lombardo C, La Torre G, Sabato V, Pecora V, Patriarca G. A clinical trial of oral hyposensitization in systemic allergy to nickel. *Int J Immunopathol Pharmacol* 2006; 19: 593-600

Schmalz G, Garhammer P. Biological interactions of dental cast alloys with oral tissues. *Dent Mater* 2002; 18: 396-406

Schmidt M, Raghavan B, Müller V, Vogl T, Fejer G, Tchaptchet S, Keck S, Kalis C, Nielsen PJ, Galanos C, Roth J, Skerra A, Martin SF, Freudenberg MA, Goebeler M. Crucial role for human Toll-like receptor 4 in the development of contact allergy to nickel. *Nat Immunol* 2010; 11: 814-819

Schopf P. Metallische Werkstoffe. In: Schopf P, HRSG. Curriculum Kieferorthopädie Band II. Berlin: Quintessenz, 2000: 458-473

Schuster G, Reichle R, Bauer RR, Schopf PM. Allergies induced by orthodontic alloys: incidence and impact on treatment. Results of a survey in private orthodontic offices in the Federal State of Hesse, Germany. *J Orofac Orthop* 2004; 65: 48-59

Schwarz A, Grabbe S, Riemann H, Aragane Y, Simon M, Luger TA, Schwarz T. In vivo effects of interleukin-10 on contact hypersensitivity and delayed-type hypersensitivity reactions. *J Invest Dermatol* 1994; 103: 211–216

Schwarz A, Beissert S, Grosse-Heitmeyer K, Gunzer M, Bluestone JA, Grabbe S, Schwarz T. Evidence for functional relevance of CTLA-4 in ultraviolet-radiation-induced tolerance. *J Immunol* 2000; 165: 1824-1831

Schwarz T. Regulatory T cells induced by ultraviolet radiation. *Int Arch Allergy Immunol* 2005; 137: 187–193

Senkutvan RS, Jacob S, Charles A, Vadgaonkar V, Jatol-Tekade S, Gangurde P. Evaluation of nickel ion release from various orthodontic arch wires: An in vitro study. *J Int Soc Prevent Communit Dent* 2014; 4: 12-16

Simonsen AB, Deleuran M, Johansen JD, Sommerlund M. Contact allergy and allergic contact dermatitis in children-a review of current data. *Contact Dermatitis* 2011; 65: 254-265

Spalj S, Mlacovic Zrinski M, Tudor Spalj V, Ivankovic Buljand Z. In-vitro assessment of oxidative stress generated by orthodontic archwires. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2012; 141: 583-589

Spiekstra SW, Toebak MJ, Sampat-Sardjoepersad S, van Beek PJ, Boorsma DM, Stoof TJ, von Blomberg BM, Scheper RJ, Bruynzeel DP, Rustemeyer T, Gibbs S. Induction of cytokine (interleukin-1 α and tumor necrosis factor- α) and chemokine (CCL20, CCL27, and CXCL8) alarm signals after allergen and irritant exposure. *Exp Dermatol* 2005; 14:109-116

Steinman RM, Hawiger D, Nussenzweig MC. Tolerogenic dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 2003; 21: 685–711

Stimola A. *Understanding the elements of the periodic table*. New York: The Rosen Publishing Group, 2007

Steilein JW. Antigen-presenting cells in the induction of contact hypersensitivity in mice: evidence that Langerhans cells are sufficient but not required. *J Invest Dermatol* 1989; 93: 443-448

Striezel R. Vergleich der Metallionenaufnahme durch Nahrung und Korrosion von Dentallegierungen. *ZWR* 1998; 22: 615-637

Sugita S, Kohno T, Yamamoto K, Imaizumi Y, Nakajima H, Ishimaru T, Matsuyama T. Induction of macrophage-inflammatory protein-3 α gene expression by TNF-dependent NF- κ B activation. *J Immunol* 2002; 168: 5621-5628

Sun CM, Hall JA, Blank RB, Bouladoux N, Oukka M, Mora JR, Belkaid Y. Small intestine lamina propria dendritic cells promote de novo generation of Foxp3 T reg cells via retinoic acid. *J Exp Med* 2007; 204: 1775-1785

Tammaro A, De Marco G, Persechino S, Narcisi A, Camplone G. Allergy to nickel: first results on patients administered with an oral hyposensitization therapy. *Int J Immunopathol Pharmacol* 2009; 22: 837-840

Technical Committee ISO TC 106/SC2/WG 12. DIN/ISO-Norm 10271. Dental metallic materials - Corrosion test methods. Genève: Beuth-Verlag, 2001

Thyssen JP, Johansen JD, Linneberg A, Menné T, Nielsen NH, Meldgaard M, Szecsi PB, Stender S, Carlsen BC. The association between null mutations in the filaggrin gene and contact sensitization to nickel and other chemicals in the general population. *Br J Dermatol* 2010; 162: 1278-1285

Traidl C, Sebastiani S, Albanesi C, Merk HF, Puddu P, Girolomoni G, Cavani A. Disparate cytotoxic activity of nickelspecific CD8⁺ and CD4⁺ T cell subsets against keratinocytes. *J Immunol* 2000; 165:3058–3064

Tschernitschek H, Borchers L, Geurtsen W. Palladium – Geschichte eines ungeliebten Metalls. *Dtsch Zahnärztl Z* 2001; 56: 147-154

Tschernitschek H, Wolter S, Körner M. Allergien auf Zahnersatzmaterialien. *Dermatosen* 1998; 46: 244-248

Umweltbundesamt. Bekanntmachung des Umweltbundesamtes: Nickel. Stellungnahme der Kommission "Human-Biomonitoring" des Umweltbundesamtes. Bundesgesundhbl – Gesundheitsforsch – Gesundheitsschutz 44 2001; 12: 1243-1248

Umweltbundesamt. Jahresbericht 1999 aus dem Messnetz des Umweltbundesamtes. UBA-Texte 58/00. Berlin: Umweltbundesamt, 2000

Van Hoogstraten IM, Andersen KE, Von Blomberg BM, Boden D, Bruynzeel DP, Burrows D, Camarasa JG, Dooms-Goossens A, Kraal G, Lahti A, Menné T, Rycroft RJG, Shaw S, Todd D, Vreeburg KJJ, Wilkinson JD, Scheper RJ. Reduced frequency of nickel allergy upon oral nickel contact at an early age. *Clin Exp Immunol* 1991; 85: 441-445

Van Hoogstraten IM, Boden D, von Blomberg ME, Kraal G, Scheper RJ. Persistent immune tolerance to nickel and chromium by oral administration prior to cutaneous sensitization. *J Invest Dermatol* 1992; 99: 608-616

Van Hoogstraten IM, Boos C, Boden D, Von Blomberg ME, Scheper RJ, Kraal G. Oral induction of tolerance to nickel sensitization in mice. *J Invest Dermatol* 1993; 101: 26-31

Varona R, Cadenas V, Gómez L, Martínez AC, Márquez G. CCR6 regulates CD4+ T-cell-mediated acute graft-versus-host disease response. *Blood* 2005; 106: 18-26

Vaupel P. The Role of Hypoxia-Induced Factors in Tumor Progression. *Oncologist* 2004; 9: 10-17

Veien NK, Andersen MR. Nickel in Danish food. *Acta Derm Venerol* 1986; 66: 502-509

Veien NK, Hattel T, Laurberg G. Low nickel diet: an open prospective trial. *J Am Acad Dermatol* 1993; 29: 1002-1007

Viemann D, Schmidt M, Tenbrock K, Schmid S, Müller V, Klimmek K, Ludwig S, Roth J, Goebeler M. The contact allergen nickel triggers a unique inflammatory and proangiogenic gene expression pattern via activation of NF-kappaB and hypoxia-inducible factor-1alpha. *J Immunol* 2007; 178: 3198-3207

Volkman KK, Inda MJ, Reichl PG, Zacharisen MC. Adverse reactions to orthodontic appliances in nickel-allergic patients. *Allergy Asthma Proc* 2007; 28: 480-484

Vollmer J, Weltzien HU, Moulon C. TCR reactivity in human nickel allergy indicates contacts with complementarity-determining region 3 but excludes superantigen-like recognition. *J Immunol* 1999; 163: 2723-2731

Wang GL, Jiang BH, Rue EA, Semenza GL. Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 5510-5514

Wataha JC, Hanks CT: Biological effects of palladium and risk of using palladium in dental casting alloys. *J Oral Rehabil* 1996; 23: 309-320

Weiner HL, da Cunha AP, Quintana F, Wu H. Oral tolerance. *Immunol Rev* 2011; 241: 241-259

White JM, Goon AT, Jowsey IR, Basketter DA, Mak RK, Kimber I, McFadden JP. Oral tolerance to contact allergens: a common occurrence? A review. *Contact Dermatitis* 2007; 56: 247-254

Williams D F. On the nature of biomaterials. *Biomaterials* 2009; 30: 5897–5909

Williams LM, Ricchetti G, Sarma U, Smallie T, Foxwell BM. Interleukin-10 suppression of myeloid cell activation-a continuing puzzle. *Immunology* 2004; 113: 281-292

World Health Organisation - International Programme on Chemical Safety (WHO-ICPS). Nickel. *Environmental Health Criteria* 108. Geneva: WHO, 1991

Wu X, Roelofs-Haarhuis K, Zhang J, Nowak M, Layland L, Jermann E, Gleichmann E. Dose dependence of oral tolerance to nickel. *Int Immunol* 2007; 19: 965-975

Yamamoto M, Takeda K. Current views of toll-like receptor signaling pathways. *Gastroenterol Res Pract* 2010; 2010: 240-365

Yamazaki T, Yang XO, Chung Y, Fukunaga A, Nurieva R, Pappu B, Martin-Orozco N, Kang HS, Ma L, Panopoulos AD, Craig S, Watowich SS, Jetten AM, Tian Q, Dong C. CCR6 regulates the migration of inflammatory and regulatory T cells. *J Immunol* 2008; 181: 8391-8401

Yang J, Zhang L, Erbel PJ, Gardner KH, Ding K, Garcia JA, Bruick RK. Functions of the Per/ARNT/Sim domains of the hypoxia-inducible factor. *J Biol Chem* 2005; 280: 36047-36054

Yap JL, Worlikar S, MacKerell AD Jr, Shapiro P, Fletcher S. Small-molecule inhibitors of the ERK signaling pathway: Towards novel anticancer therapeutics. *ChemMedChem* 2011; 6: 38-48

Yin L, Crawford F, Marrack P, Kappler JW, Dai S. T-cell receptor (TCR) interaction with peptides that mimic nickel offers insight into nickel contact allergy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012; 109: 18517-18522

Young NS, Levin J, Prendergast RA. An invertebrate coagulation system activated by endotoxin: Evidence for enzymatic mediation. *J. Clin. Invest.* 1972; 51: 1790-1797

Zhang Q, Kusaka Y, Sato K, Nakakuki K, Kohyama N, Donaldson K. Differences in the extent of inflammation caused by intratracheal exposure to three ultrafine metals: role of free radicals. *J Toxicol Environ Health A* 1998; 53: 423-438

Zhao L, Xia J, Wang X, Xu F. Transcriptional regulation of CCL20 expression. *Microbes Infect* 2014; 16: 864-870

Zheng Y, Danilenko DM, Valdez P, Kasman I, Eastham-Anderson J, Wu J, Ouyang W. Interleukin-22, a TH17 cytokine, mediates IL-23-induced dermal inflammation and acanthosis. *Nature* 2007; 445: 648-651

9 Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt PD Dr. Lina Gölz und PD Dr. Stilla Frede für die Ermöglichung und die intensive wissenschaftliche Betreuung dieser Arbeit. Vielen Dank für die aufschlussreichen wöchentlichen Teammeetings und die vielen Ideen, die diese Arbeit immer wieder weiterbrachten. Danke für die außerordentliche Förderung und die Möglichkeit zur Teilnahme am Keystone Symposium in Dublin sowie die ständige Begeisterung für das wissenschaftliche Arbeiten. Vielen Dank für die vielen geselligen Laborabende und die freundschaftliche Zusammenarbeit.

Weiterhin bedanke ich mich bei der Anästhesiologie des Uniklinikums Bonn für die Möglichkeit der Bereitstellung eines Laborplatzes.

Ganz besonderer Dank geht dabei an Mario Fox, Moritz Blankart, Susanne Schulz, Frank Splettstoesser und das ganze Laborteam für die sehr engagierte fachliche Unterstützung. Danke, dass ihr immer ein offenes Ohr hattet und die rettenden Ideen auch in schwierigen Situationen. Vielen Dank für den angenehmen Einblick in die wissenschaftliche Tätigkeit und das tolle Jahr bei euch.

Meinem Freund Patrick danke ich für den mentalen Beistand, die aufbauenden, stets lustigen Worte, seine Geduld und die uneingeschränkte Unterstützung auch während meines Studiums.

Vielen Dank an meine Eltern und meine Brüder für die Unterstützung während meines Studiums und meiner Dissertation.

Danke auch an meine Freunde, durch die mir die Studienzeit in sehr positiver Erinnerung bleibt.