

**Topographische Untersuchung der Expression
antimikrobieller Peptide in der Mundschleimhaut**

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

vorgelegt von
Bärbel Aleida Hertha Kamphuis (geb. Verbeck)
aus Münster

2006

Anfertigung mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

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

Tag der mündlichen Prüfung: 16.10.2006

Aus der Poliklinik für Parodontologie,
Zahnerhaltung und Präventive Zahnheilkunde
des Zentrums für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde
Universitätsklinikum Bonn
Direktor: Prof. Dr. Dr. S. Jepsen, M.S.

Diese Dissertation ist auf dem Hochschulschriftserver der ULB Bonn
http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss_online
elektronisch publiziert.

Inhaltsverzeichnis

	Seite	
1.	Einleitung	5
1.1	Defensine	5
1.1.1	Humanes β -Defensin-1	7
1.1.2	Humanes β -Defensin-2	8
1.1.3	Humanes β -Defensin-3	8
1.2	Weitere antimikrobielle Peptide	8
1.2.1	Lysozym	8
1.2.2	Calprotectin	9
1.3	Untersuchtes Gewebe in der Mundhöhle	9
1.4	Fragestellung der Arbeit	10
2.	Material und Methoden	12
2.1	Überblick	12
2.2	Polymerasekettenreaktion (PCR)	12
2.2.1	Reagenzien und Materialien	12
2.2.2	Gewinnung der Proben	12
2.2.3	Gewinnung des Standards	13
2.2.4	RNA-Extraktion aus den Proben	13
2.2.5	Reverse Transkription–Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)	14
2.2.5.1	Reverse Transkription	14
2.2.5.2	Polymerasekettenreaktion (PCR)	16
2.2.5.3	PCR für β -Aktin	16
2.2.6	Quantitative Bestimmung der Expression von hBD-1,-2 und -3	18
2.2.6.1	Quantitative Bestimmung der Expression von hBD-1	21
2.2.6.2	Quantitative Bestimmung der Expression von hBD-2 und 3	21
2.2.6.3	Auswertung der quantitativen PCR	22
2.2.7	Gelelektrophorese	23
2.3	Histologie	23
2.3.1	Hämatoxylin-Eosin-Färbung (H.E.-Färbung)	23
2.4	Immunhistologie	24
2.4.1.	Anfertigung der Schnittpräparate	24
2.4.2.	Immunhistochemische Methoden	24
2.4.2.1.	Antikörper	25
2.4.2.1.1	Immunhistochemische Darstellung von Lysozym	26
2.4.2.1.2	Immunhistochemische Darstellung von Calprotectin	26
2.4.2.1.3	Immunhistochemische Darstellung von hBD-1, -2, und -3	27
2.4.3.	Geräte, Reagenzien, Verdünnung	27
2.5	Statistische Auswertung	30

3.	Ergebnisse	31
3.1	Genexpression in den Gewebeproben	31
3.1.1	Quantitative Expression humaner β -Defensine	31
3.1.1.1	Humanes β -Defensin-1	31
3.1.1.2	Humanes β -Defensin-2	32
3.1.1.3	Humanes β -Defensin-3	32
3.1.1.4	Graphische Darstellung der Real-Time-PCR	33
3.1.2	Qualitativer Nachweis von β -Aktin	34
3.1.3	Gelelektrophorese	35
3.2	Immunhistochemie und Histologie	36
3.3	Statistische Auswertung (Graphiken)	43
3.4	Ergebnisübersicht	47
3.4.1	Gegenüberstellung der Ergebnisse der Immunhistologie und PCR	47
4.	Diskussion	48
5.	Zusammenfassung	57
6.	Literaturverzeichnis	58
7.	Glossar	68
8.	Danksagung	71
9.	Lebenslauf	72

1. Einleitung

1.1 Defensine

Defensine sind jüngst entdeckte antimikrobielle Peptide. Sie sind genetisch kodierte antimikrobielle Substanzen, die von Epithelzellen produziert werden können (Schröder, 1999). β -Defensine bilden neben der humoralen Abwehr und der physikalischen Barriere des Epithels eine weitere Möglichkeit des Körpers gegenüber Pilzen, Bakterien und Viren zu wirken (Boman, 1995). Zunächst wurden diese Peptide bei Pflanzen entdeckt. Neben der chemischen Barriere durch Peptide gibt es weitere antimikrobielle Substanzen, die erst nach Kontakt der pflanzlichen Epidermis mit Bakterien oder Pilzen gebildet werden. Beispielsweise kommt es zur Freisetzung gasförmiger Komponenten (z.B. Salicylsäuremethylester), die an Rezeptorstrukturen von Pflanzen binden. Sie induzieren dort in noch gesunden Epithelien die Produktion verschiedener antimikrobieller Peptide und Protease-Inhibitoren (Schröder, 1999).

Später wurde bei Insekten neben ihrem primitiven zellulären Immunsystem die Induktion pilz- oder bakterienselektiver antimikrobieller Peptide über spezielle Signalwege entdeckt. Darauf folgten Entdeckungen bei Fröschen und Rinderepithelien (z.B. LAP - Linguales Antimikrobielles Peptid) (Schröder, 1999).

Es wurden bisher über 100 verschiedene antimikrobielle Peptide entdeckt und benannt (Nicolas und Mor, 1995; Yang et al., 1999). Eine Klasse neu entdeckter antimikrobieller Peptide stellen die humanen Defensine dar.

Diese Peptide bestehen aus 18 bis 42 Aminosäuren mit einem großen Anteil an basischen Aminosäuren (Lysin, Arginin). Ein beschriebener Wirkort ist die Zytoplasmamembran der Mikroorganismen. Sie besitzen somit eine mikrobiozide Wirkung (Yang et al., 2002; Hoover et al., 2000). Humane Defensine wurden in drei Unterklassen, nämlich alpha-, beta- und theta-Defensine gegliedert. Das wichtigste Merkmal der verschiedenen Unterklassen ist die jeweils variable Verknüpfung der intramolekularen Disulfidbrücken. Die humanen alpha-Defensine werden auch als humane neutrophile Peptide bezeichnet und werden in den Epithelien des Intestinaltraktes, des Urogenitaltraktes, aber auch in den Mundhöhlenepithelien gebildet (Dunsche et al., 2001). Theta-Defensine stellen eine ringförmige Variante zweier humaner alpha-Defensinmoleküle dar, die über alternative Spleißvorgänge generiert werden (Tang et al., 1999; Leonova et al., 2001). β -Defensine werden in den Epithelzellen synthetisiert (Respiratorisches System, Gastro-intestinales System, Urogenitales System, Dermis). Ihr Wirkungsspektrum ist

unterschiedlich selektiv für die auf den Epithelien physiologisch befindliche Mikroflora (Schröder, 1999).

Wie der Mechanismus zur Abtötung oder Inaktivierung einer Zielzelle durch die Defensine im Speziellen funktioniert, ist noch nicht genau geklärt (Yang et al., 2002).

Nach bisheriger Annahme permeieren Defensine die zytoplasmatische Membran der Zielzelle (z.B. eine Bakterienzelle), indem sie durch Aggregation eine Formation von spannungsregulierten Ionenkanälen induzieren (Lehrer et al., 1993). Für diesen Mechanismus ist ein Membranpotential an der Zielzelle erforderlich, so dass Zellen mit metabolischer Aktivität getötet werden können (Lehrer et al., 1988). Nach Kagan und Mitarbeiter (1990) muss eine Polarität der Zielzellmembran Voraussetzung sein. Ihrer Meinung nach kann über die Aggregation durch zwei bis vier Defensinmoleküle ein spannungsgesteuerter Kanal ausgeformt werden, der zur Osmose und dem daraus resultierenden Tod der Zielzelle führt (Kagan et al., 1990). Die Membran der Mikroorganismen weist im Gegensatz zu denen der Säugetiere (wie dem Menschen), einen geringeren Anteil an Cholesterin und einen hohen Anteil an negativ geladenen Phospholipiden auf (Yang et al., 2002).

Eine weitere Theorie zur Wirkungsweise antimikrobieller Peptide wurde durch Hoover und Mitarbeiter vorgestellt. Dabei kommt es zu einer oberflächlichen Auflagerung („Carpet like“) einzelner Defensinmonomere auf die Membran von Mikroorganismen, wobei Defensin-Antigen-Komplexe ausgebildet und für das Immunsystem präsentiert werden (Hoover et al., 2000).

1999 stellten Yang und Mitarbeiter eine Verbindung zum adaptiven Immunsystem durch die Defensine fest. Sie zeigten, dass chemotaktische Eigenschaften der β -Defensine dendritische Zellen und T-Zellen beeinflussen (Yang et al., 1999). Noch unausgereifte dendritische Zellen können durch den Defensin-Antigen-Komplex angeregt werden, sich weiter zu entwickeln. Das mikrobielle Agens wird daraufhin von der dendritischen Zelle aufgenommen (Yang et al., 2002; Hoover et al., 2000). Diese chemotaktische Verbindung kann offenbar sowohl zu humanem β -Defensin-1 (Yang et al., 1999), als auch zu humanem β -Defensin-2 bestehen (Yang et al., 2002).

Für das humane β -Defensin-3 wurde eine chemotaktische Verbindung zu Monozyten des Blutkreislaufs und zu Makrophagen nachgewiesen (Garcia et al., 2001). Körper eigene, proinflammatorische Botenstoffe, wie zum Beispiel Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) vermag die Synthese der induzierbaren β -Defensine anzuregen (Harder et al., 2000; Vankeerberghen et al., 2005).

Defensine der Säugetiere und β -Defensine allgemein gehören der Familie der kationischen, Arginin-reichen, Disulfidbrücken enthaltenden Peptide mit 29 - 42 Aminosäureresten an, die sich in den Granula der zirkulierenden neutrophilen Granulozyten und Makrophagen befinden (Fang et al., 2003; Oren et al., 2003). Sie zeigen eine hohe Wirksamkeit gegenüber grampositiven und gramnegativen Bakterien, Mykobakterien, Spirochäten, Pilzen und einiger Viren mit Membranhülle (Nicolas und Mor, 1995).

Ein Defensin-Peptid ist ein starres, dreisträngiges, antiparalleles β -Faltblatt Molekül mit drei intramolekularen Disulfidbrücken. Ein Defensin-Molekül enthält ein carboxyterminales Ende eines Präpropeptids mit einer aminoterminalen Signalsequenz und einer aus 40-45 AS bestehenden anionischen Partialsequenz (Barcher et al., 1988; Michaelson et al., 1992). Die β -Defensine 1-3 wurden durch Genkartierung auf Chromosom 8 lokalisiert (Schütte et al., 2002).

1.1.1 Humanes β -Defensin-1

HBD-1 (humanes Beta-Defensin-1) wurde im Filtrat des Urins gefunden und den Epithelien des Urogenitaltraktes zugeordnet. Entdeckt wurde als dieses ein β -Defensin in Epithelien von Rindern (Bensch et al., 1995). Es handelt sich bei dem humanen β -Defensin-1 um ein basisches Peptid mit einem Molekulargewicht von 3,9 kDa, das aus 36 Aminosäuren aufgebaut ist (Schröder, 1999). Intramolekular bestehen drei Disulfidbrücken, wodurch die entsprechende Peptidkonformation bestimmt wird (Bensch et al., 1995; Diamond et al., 1996).

HBD-1 besitzt eine besonders hohe Wirksamkeit gegenüber *E. coli* und eine breite Wirksamkeit gegenüber andere verschiedenartigen Bakterien und Pilzen (Tanida et al., 2003). Das Wirkungsspektrum erstreckt sich unterschiedlich selektiv auf die auf den Epithelien physiologisch vorhandene Mikroflora (Schröder, 1999; Dale und Krisanaprakornkit, 2001; Jurevic et al., 2003).

Die Synthese von hBD-1 wird durch inflammatorische Stimuli wie Bakterien, Hefen oder Zytokine nicht angeregt. Es wird als konstitutiv exprimiertes antimikrobielles Peptid humaner Epithelien angesehen (Schröder, 1999).

1.1.2 Humanes β -Defensin-2

HBD-2 wurde erstmals 1997 in der menschlichen Haut isoliert und bestimmt (Harder et al., 1997). Es handelt sich hierbei um ein basisches Peptid mit einem Molekulargewicht von 4 kDa und 41 Aminosäureresten mit einer großen Anzahl von Arginin und Lysin (Harder et al., 1997). Durch eine Inkubation kultivierter Epithelzellen mit Bakterien, deren Stoffwechselprodukten oder mit Zytokinen konnte eine vermehrte Synthese von hBD-2 im Vergleich zur unstimulierten Kultur gezeigt werden (Schröder, 1999).

Es unterscheidet sich von anderen humanen antimikrobiellen Peptiden durch seine hohe Wirksamkeit gegenüber gram-negativen Erregern wie *Escherichia coli*, *Fusobacterium nucleatum*, *Pseudomonas aeruginosa* und Hefe (Dale und Krisanaprakornkit, 2001; Sawasaki et al., 2002; Meyer et al., 2004). Eine Wirksamkeit gegenüber grampositiven Erregern, wie dem Bakterium *Staphylococcus aureus*, zeigte sich lediglich in der Hemmung des Wachstums (Schröder, 1999; Harder et al., 1997; Dunsche et al., 2002).

1.1.3 Humanes β -Defensin-3

HBD-3 wurde 2000 von Harder und Mitarbeitern entdeckt. Es besitzt ein Molekulargewicht von 5,12 kDa (Harder et al., 2000). Es konnte in Keratinozyten und in den Epithelzellen der Mundhöhle nachgewiesen werden (Dunsche et al., 2002). Dieses Defensin besitzt eine antimikrobielle Wirkung gegenüber sowohl gram-negativen Bakterien, wie *Pseudomonas aeruginosa* und *Escherichia coli*, gram-positiven Erregern, wie *Staphylococcus aureus* und *Streptococcus pyogenes*, als auch gegenüber Pilzen, wie *Candida albicans* (Harder et al., 2001). In Bereichen von Leukoplakie wurde eine verstärkte Produktion von hBD-3 im Stratum granulosum gefunden (Nishimura et al., 2003). In gesunder Mundschleimhaut fand sich im Vergleich zu erkranktem Gewebe eine erhöhte Expression (Bissel et al., 2004).

1.2 Weitere antimikrobielle Peptide

1.2.1 Lysozym

Lysozym (1-4- β -N-Acetylmuramidase) ist ein körpereigenes Abwehrenzymb, das in der Lage ist die Bakterienwände, bestehend aus Muraminsäure, zu spalten. Dadurch wirkt das Enzym bakterizid und arbeitet zusammen mit anderen körpereigenen mikrobiellen Peptiden, wie α - und

β -Defensinen, als Abwehrstoff in einer Vielzahl von Epithelien. Vor allem im Darm und in der Haut, in myelo/monozytären, neutrophilen und Paneth-Zellen (Intestinaltrakt) (Rubio, 2003) und auch in Speicheldrüsen (Miyzaki et al., 1998; Kmiliauskis et al., 2005) wurde es entdeckt. Es gilt als hervorragendes Markermolekül von Gewebsmakrophagen bzw. Histiozyten. 2005 konnte das antimikrobielle Peptid Lysozym der humanen Milch zugeordnet und dessen vermehrter Sekretion eine Linderung mikrobieller Entzündungszeichen bei Hauterkrankungen von Säuglingen nachgewiesen werden (Phadke et al., 2005).

1.2.2 Calprotectin

Calprotectin ist ein Kalzium-bindendes Protein, das von neutrophilen Granulozyten und Monozyten bei einer entzündlichen Erkrankung vermehrt gebildet wird. Die Höhe des Calprotectin-Wertes korreliert mit der Entzündungsaktivität. Calprotectin eignet sich demnach zum Nachweis früher Inflammationen in Gewebeschnitten und Ausstrichen sowie zur Klassifizierung von Tumoren.

Die Epithelzellen des oralen Plattenepithels geben konstitutionell Calprotectin in das Cytoplasma und auch an die Zelloberfläche ab. Calprotectin erschwert die Anheftung von Bakterien an der Zelloberfläche, wodurch eine unterstützende Wirkung des antimikrobiellen Effekts erreicht wird (Nisapakultorn et al., 2001).

1.3 Untersuchtes Gewebe in der Mundhöhle

In der vorliegenden Arbeit wurde das Gewebe an der Zungenspitze und im dorsalen Bereich des Zungenkörpers sowie das Gewebe der Wange im Bereich der Mundöffnung und in der Nähe des Rachenraumes untersucht.

Die Zunge, im lateinischen Lingua oder Glossa, ist ein von Schleimhaut überzogener Muskelkörper, der in eine frei bewegliche Zungenspitze, die so genannte Apex linguae, den Zungenkörper, Corpus linguae und den vom Sulcus terminalis bis zur Epiglottis reichenden Zungenrund, Radix linguae unterteilt wird.

Die Schleimhaut des Zungenrückens ist durch die Zungenpapillen, die des Zungengrundes durch die Zungenbälge gekennzeichnet.

Die dorsale Zungenschleimhaut wird durch den V-förmigen Sulcus terminalis in einen großen anterioren und einen kleinen posterioren Abschnitt geteilt. Die Schleimhaut des Zungenrückens besteht aus Epithel und einer derben gefäß- und nervenreichen Lamina propria. Letztere setzt sich aus einer oberflächlichen und einer tiefen Schicht zusammen. Die oberflächliche Schicht, der Papillarkörper, ist zu Bindegewebswällen aufgeworfen, die verschiedene, von mehrschichtigem Plattenepithel überzogene, Papillen tragen. Die Papillen sind sowohl Vermittler von Tastempfindungen und besitzen Geschmacksknospen und Drüsenausgänge (Junqueira und Carneiro, 1996). Man unterscheidet vier verschiedene Arten von Papillen: Papillae filiformes, Papillae fungiformes, Papillae foliatae und Papillae vallatae (Schroeder, 1992; Schiebler et al., 1997). Durch die Verhornung des Epithels im Bereich der Papillenspitzen bildet sich ein weißlicher Zungenbelag, der durch Speichel und Speisereste noch vergrößert wird. Die zahlreichen Vertiefungen zwischen den Papillen begünstigen zusätzlich die Ansiedelung von Pilzen (z.B. *Candida albicans*).

Die Lippen- und Wangenschleimhaut kleidet das Vestibulum oris anterior und lateral zwischen oberer und unterer Umschlagfalte aus. Sie geht einerseits in die Alveolarschleimhaut und andererseits in das Lippenrot über. Sie besitzt eine glatte Oberfläche, ist blassrot gefärbt und einheitlich strukturiert.

Das Epithel der Lippen- und Wangenschleimhaut ist etwa doppelt so dick (ca. 600 µm) wie das der Gingiva und ähnelt strukturell demjenigen der Mundschleimhaut. Es besteht aus drei Schichten, dem Stratum basale, dem Stratum spinosum und Stratum superficiale. Es wird bis zu Dreivierteln seines Durchmessers von Bindegewebspapillen durchzogen, zwischen denen breite, epitheliale Leisten bestehen (Schroeder, 1992; Junqueira und Carneiro, 1996).

1.4 Fragestellung und Ziele der Arbeit

Erkrankungen der Mundschleimhaut zeigen zuweilen ein unterschiedliches topographisches Verteilungsmuster. Beispielsweise sind bei der oralen *Candidose* häufiger die Mundwinkel betroffen. Sie kann auftreten nach Antibiotikabegabe und bei Immundefekten (z.B. HIV-Infektion). Die *Glossitis rhombica mediana* ist zumeist im hinteren Drittel der Zunge vorzufinden und die Cheilitis zeigt sich beispielsweise als persistierende erosive Veränderung der Unterlippe. Daraus ergibt sich die Fragestellung, ob parallel zu diesen topographischen Unterschieden ebenfalls eine unterschiedliche quantitative Verteilung der humanen β -Defensine, Calprotectin

und Lysozym im Epithel der Mundschleimhaut vorzufinden ist. Harder und Schröder untersuchten in einer Studie Patienten mit der Erkrankung Psoriasis und stellten bereits die Frage nach einem topographischen Zusammenhang zwischen antimikrobiellen Peptiden, wie hBD-2, -3 und Lysozym, und deren Wirkung gegenüber Infektionen (Harder und Schröder, 2005).

Bisherige Studien konnten die mRNA-Expression antimikrobieller Peptide in der Mundschleimhaut nachweisen (Dunsche et al., 2002; Bissel et al., 2004; Dommisch et al., 2005).

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, einen möglichen Unterschied in der Expression der antimikrobiellen Peptide in Bezug auf die anteriore bzw. posteriore Lokalisation der Biopsate aus der Mundschleimhaut zu ermitteln.

Fragestellung dieser Studie:

1. Kann eine mRNA-Expression von hBD-1,-2,-3, Lysozym und Calprotectin in allen untersuchten topographischen Bereichen der Wange und der Zunge nachgewiesen werden?
2. Können die antimikrobiellen Peptide hBD-1, -2, -3, Calprotectin und Lysozym in allen untersuchten Mundschleimhautbereichen immunhistologisch dargestellt werden?
3. Zeigen sich topographische Unterschiede in der Proteinexpression der einzelnen untersuchten antimikrobiellen Peptide?
4. Besteht eine Korrelation zwischen der mRNA-Expression und der Protein-Expression der humanen β -Defensine-1, -2, -3?

2. Material und Methoden

2.1 Überblick

Im Rahmen chirurgischer Eingriffe in der Klinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel wurden Gewebeproben aus der Innenwange und Zunge entnommen. Nach Extraktion der RNA (2.2.4) und reverser Transkription (2.2.5.1) wurde die Real-Time-Polymerase-Ketten-Reaktion (2.2.6) durchgeführt. Teile derselben Proben wurden immunhistochemisch untersucht (2.4).

2.2 Polymerasekettenreaktion (PCR)

2.2.1 Reagenzien und Materialien

Die zur Aufbewahrung und Bearbeitung der gesammelten Proben benötigten Reaktionsgefäße und Pipettenspitzen kamen von der Fa. Sarstedt (Nümbrecht). Das in den Versuchsreihen benutzte Aqua dest. wurde von der Fa. Braun Melsungen AG (Melsungen) bezogen.

Für die RT-PCR wurde das Avian Myeloblastosis Virus (AMV) RT-Kit von der Fa. Promega GmbH (Mannheim) zur reversen Transkription die Eurogentec Goldstar Taq-Polymerase (5 U/ μ l), Primer und $MgCl_2$ von der Fa. Eurogentec (Seraing, Belgien) verwendet. Die Oligonukleotide wurden von der Fa. Roche (Mannheim) bezogen. Die Agarose wurde von der Fa. Biorad (Hercules, Californien) und die Elektrophoresekammer von der Fa. Cosmo Bio Co. Ltd. (Tokyo) verwendet.

2.2.2 Gewinnung der Proben

Die gesammelten Proben stammen aus der Klinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel. Die Patienten wurden vor den chirurgischen Eingriffen über die Entnahme des Gewebes ausführlich aufgeklärt. Es wurde aus dem Bereich der Zunge-ventral, Zunge-dorsal, Innenwange-ventral und Innenwange-dorsal gewonnen. Es wurden lediglich klinisch gesunde Proben im Durchmesser von 6 mm durch Stanzbiopsie aus dem Bereich des jeweiligen Operationsgebietes entnommen (Ethikkommission AZ.: 309/00).

Nach der Entnahme der Proben wurden diese noch im Operationssaal steril auf das Epithelgewebe reduziert und in drei Teilen als Probe A (Kontrolle) und Probe B (Untersuchung) in die ebenfalls sterilen Kryo-Röhrchen der Fa. Sarstedt (Nümbrecht) verteilt und bei -70°C eingefroren. Probe C (Histologie) wurde zu einem Teil in Formalin eingelegt und zu einem Teil ebenfalls bei -70°C eingefroren.

Es wurden jeweils 6 Proben aus der Wange ventral/dorsal und jeweils 7 Proben aus der Zunge ventral/dorsal (insgesamt: 26 Proben von 13 verschiedenen Patienten) in einer Gewebebank zusammengestellt, wobei jeweils von ein und demselben Patienten die Proben ventral und dorsal entnommen wurden.

2.2.3 Gewinnung des Standards

Der Standard stellt einen Kontrollwert zu den zu untersuchenden Proben dar. Es ist ein 2 cm x 2 cm großes Stück Schleimhaut aus der gesunden Innenwange eines von dieser Untersuchung unabhängigen Patienten. Von der Schleimhaut der Innenwange ist die mRNA-Expression humaner β -Defensine bereits bekannt (Dunsche et al., 2002). Die Probe wurde direkt nach der Entnahme in einem Falcon-Röhrchen der Fa. Becton-Dickensen (Heidelberg) eingefroren. Später wurde sie mittels flüssigen Stickstoffs bei -196°C und Mörser/Pistill homogenisiert und mit 10ml Trizol der Fa. Gibco (Karlsruhe) erneut in einem Falcon-Röhrchen eingefroren.

Dieser Standard wurde bei jedem der folgenden Versuchsabläufe als Kontrolle mitgeführt.

2.2.4 RNA-Extraktion aus den Proben

Die jeweiligen Teilproben B wurden mittels sterilem Mörser und Pistill unter Zugabe von flüssigem Stickstoff homogenisiert. Dem Gewebepulver wurde 1 ml TRIzol hinzu gegeben und ebenfalls zermahlen. Anschließend wurde das Homogenisat in ein Falconröhrchen überführt, in welchem es 10 Sekunden mit einem Ultraschallgerät von der Fa. B. Braun (Melsungen) bei 41 kHz behandelt werden konnte. Die so aufbereitete Teilprobe ist daraufhin in ein Eppendorf – Tube überführt worden.

Jedem Eppendorfgefäß wurden 0,2 ml Chloroform hinzu gegeben. Nach dem Schütteln für 10 Sekunden wurden diese für drei Minuten bei Zimmertemperatur stehengelassen. Alle nachfolgenden Zentrifugationsschritte wurden mit der Zentrifuge von der Fa. Sarstedt

(Nümbrecht) durchgeführt. Die nach Zentrifugation (12.000 x g, 4° C; 15 min) abgrenzbare wässrige Oberphase wurde vorsichtig in ein neues Eppendorf – Tube pipettiert, woraufhin die Proben mit jeweils 500 µl Isopropylalkohol gefällt wurden. Diesem wurde 1 µl Glykogen als Carrier für die RNA dazugegeben, bevor die Reagenzien vorsichtig gemischt wurden. Nach zehnminütiger Standzeit der Proben bei Raumtemperatur wurde erneut zentrifugiert (12000 x g, 4° C, 10 min). Der wässrige Überstand wurde abpipettiert. Dieses Sediment wurde mit 1 ml 70 % v/v Ethanol gewaschen. Es folgte die Zentrifugation (7500 x g, 4° C) für 5 Minuten. Der Überstand wurde abpipettiert und verworfen. Nach der Trockenzeit der RNA von 5 Minuten wurden 55 µl DEPC – Wasser (Diethylpyrocarbonat mit Aqua dest. 1:1000 verdünnt) hinzu gegeben.

Die Quantifizierung der RNA erfolgte durch photometrische Bestimmung der optischen Dichte bei 260 nm (OD260), 280 nm (OD280) und 320 nm (OD320), wobei eine OD260 von 1 einer RNA-Konzentration von 40 µg/ml entsprach (Sambrook et al., 1989).

Alle Proben, sowohl die des Standards als auch die aus der Gewebebank, wurden je nach Materialmenge auf eine Endkonzentration von 0,1 µg RNA pro µl Aqua dest. eingestellt.

2.2.5 Reverse Transkription – Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)

Die RT-PCR wurde zuerst von Veres und Mitarbeitern (1987) beschrieben. Sie kombiniert das Umschreiben der mRNA als Expressionsprodukt in stabile DNA mit der anschließenden Amplifizierung des gesuchten Genprodukts mittels PCR (Veres et al., 1987). Dabei wird im ersten Schritt an die isolierte Poly(A)⁺-RNA ein Oligo-(dT)₂₀-Primer hybridisiert. Dieses Oligonukleotid dient als Starthilfe zur Synthese des komplementären DNA-Stranges (cDNA) durch das Enzym „Reverse Transkriptase“. Der so gewonnene cDNA-Strang wird als Matrize für die PCR genutzt.

2.2.5.1 Reverse Transkription

Bei der reversen Transkription wird cDNA synthetisiert. Für diese Synthese wird ein Enzym, die Reverse Transkriptase, benutzt. Dieses Enzym benötigt für die in 5'-3'-Richtung verlaufende cDNA-Synthese ein kurzes Oligonukleotid, einen so genannten Primer, als Startermolekül. Der

Primer muss ein freies 3'OH-Ende besitzen und komplementär zur RNA sein. Die meisten eukaryontischen mRNAs sind an ihrem 3'-Ende polyadenyliert (Poly-A⁺-RNA). Als Primer wurden komplementär Oligonukleotide aus Thyminbasen, so genannte Oligo-(dT)₂₀-Primer verwendet. Diese bestehen üblicherweise aus 15 - 20 Nukleotiden, hybridisieren mit den Poly-A⁺-Enden der mRNAs und ermöglichen der Reversen Transkriptase, dadurch die komplementäre cDNA zu synthetisieren.

Es wurden zwei Zusatzgemische für alle Ansätze der reversen Transkription zusammen vorbereitet. Das Zusatzgemisch I enthielt eine mit Aqua dest. verdünnte Primermixtur bestehend aus einem Oligo-(dT)₂₀-Mix (0,5 mg/ml), während das Zusatzgemisch II einen RT-Puffer, ein Desoxynukleosidtriphosphatgemisch (dNTP-Mix), rRnasin und das RT-Enzym enthielt.

Die Menge der genannten Zusätze für eine Probe ist in der folgenden Tabelle 1 dargestellt:

Tabelle 1: Zusammenstellung der Komponenten für die Durchführung der reversen Transkription

Zusatz	Volumen
MgCl ₂ [25 mM]	4,0 µl
10 x Puffer [100 mM Tris-HCl (pH 8,8, 25 °C), 500 mM KCl, 1% Triton X [®] -100]	2,0 µl
10 mM dNTP-Mix [Desoxyribonukleotid-Mix]	2,0 µl
R Rnasin (10 U/µl) [rekombinanter Ribonukleaseinhibitor]	0,5 µl
AMV RT (200 U/µl) [0,1 M K-PO ₄ (pH 7,2), 0,2 % Triton X [®] -100, 2 mM Dithiothreitol, 50 % Glycerol]	1,5 µl

1 µl Zusatzgemisch I wurde zu 9 µl der RNA mit der Konzentration von 0,1 µg/µl hinzugegeben und für 5 Minuten bei 70° C im Thermoblock von der Fa. Biometra (Göttingen) inkubiert. Die Proben sind, nachdem sie zuvor auf Eis abgekühlt wurden, mit dem 10 µl Zusatzgemisch II je RT-Ansatz versetzt worden. Es folgten 50 min. Inkubation unter Schütteln bei 42° C im Wasserbad. Anschließend wurden die Proben auf Eis abgekühlt und bei -70° C eingefroren.

Die Qualität der Gesamt-RNA wurde photometrisch bei 260 nm und 280 nm bestimmt. Die Konzentration mit einer OD, entsprechend 40 µg RNA, wurde bei 260 nm bestimmt (Sambrook et al., 1989). Der Quotient von OD_{260nm}/OD_{280nm} gibt dabei die Reinheit der RNA-Extraktion an. Dabei wird für reine RNA-Isolate ein Quotient zwischen 1,8 und 2,0 angegeben. Liegt eine Verunreinigung vor, liegt der Quotient unter 1,8. In diesem Fall wäre eine akkurate Quantifizierung der isolierten Gesamt-RNA nicht möglich (Sambrook et al., 1989). Aus diesem Grunde wurde in dieser Arbeit ausschließlich RNA zur molekularbiologischen Aufbereitung verwendet, die einen OD_{260nm}/OD_{280nm} – Quotienten zwischen 1,8 und 2,0 aufwies.

2.2.5.2 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction = PCR) ist ein hochempfindliches Verfahren für die Amplifizierung von Genabschnitten. Die Methode setzt voraus, dass die Sequenzen an den Rändern der Zielregion bekannt sind, ermöglicht dann jedoch, den Bereich zwischen zwei definierten Stellen zu amplifizieren. Der DNA-Doppelstrang wird denaturiert. An die so hergestellten Einzelstränge lagern sich zwei kurze Primermoleküle (jeweils etwa 20 bp) an, die zu Bereichen an den Seiten der Zielregion des jeweils gegenüberliegenden Stranges komplementär sind. Die DNA-Polymerase synthetisiert Einzelstränge, die vom 3'-OH-Ende jedes Primers ausgehen. Der gesamte Zyklus lässt sich durch Denaturierung der DNA und einen neuen Reaktionsstart wiederholen. Die Kopienzahl der Zielsequenz steigt exponentiell an (Lewin, 2002).

2.2.5.3 PCR für β -Aktin

Zur qualitativen Kontrolle der Reversen Transkription erfolgte zunächst die Polymerasekettenreaktion mit β -Aktin-Primern für alle Proben. Dabei wird davon ausgegangen, dass sich die mRNA von β -Aktin in jeder Zelle befindet, da diese für ein Protein kodiert ist, das als Teil des Cytoskelettes ubiquitär vorhanden ist (Bustin et al., 2000). Deshalb wird das Gen für β -Aktin, wie auch für andere vergleichbare Gene, als Housekeeping-Gen bezeichnet.

Wird auf dem Elektrophoresegel eine Bande sichtbar, die der Größe von 550 Basenpaaren entspricht, kann davon ausgegangen werden, dass die Reverse Transkription erfolgreich durchgeführt wurde.

Es wurde ein Reaktionsgemisch vorbereitet, in welchem PCR-Puffer, MgCl₂, dNTP-Mix, die Primer, Taq-Polymerase und Aqua dest. zusammen pipettiert wurden. Für jeden Ansatz wurden 24 µl des Zusatzgemisches und 1 µl cDNA [1:5 mit Aqua dest. verdünnt] in ein Amplifikationsgefäß (dünnwandig) von der Fa. Sarstedt (Nümbrecht) pipettiert. Die eingesetzten Primer für β-Aktin hatten folgende Sequenz:

β-Aktin (550 Basenpaare):

Sense: 5' CTC CTT AAT GTC ACG CAG GAT TTC 3'

Antisense: 5' GTG GGG CGC CCC AGG CAC CA 3' .

Die genaue Zusammensetzung des Reaktionsgemisches ist in der folgenden Tabelle 2 dargestellt:

Tabelle 2: Zusätze für die Durchführung einer Polymerasekettenreaktion

Zusatz	Volumen
Primer 1 + 2 (Sense und Antisense) [200 pmol/µl je Primer]	2,0 µl
10 x Puffer [750 mM Tris-HCl (pH 8,8, 25 °C), 200 mM (NH ₄) ₂ SO ₄ , 0,1 % Tween 20]	2,5 µl
MgCl ₂ [12,5 mM]	2,0 µl
dNTP-Mix [Desoxyribonukleotid-Mix; 10 mM/dNTP]	1,0 µl
Taq-Polymerase (Eurogenetec) [5 U/µl]	0,2 µl
Aqua dest.	16,3 µl
Template-DNA	1,0 µl

Bei jeder Versuchsreihe wurde eine Negativprobe mit Aqua dest. angefertigt, die zur Überprüfung von Artefakten Verwendung fand. Dabei wurde den 24 µl des Zusatzgemisches 1 µl Aqua dest. anstelle der cDNA hinzugefügt.

Anschließend wurde die PCR-Reaktion im Thermocycler von der Fa. Perkin Elmer Cetus (Weiterstadt) gestartet und in dem folgenden Programm die gewünschten Produkte vervielfältigt:

95°C	10 min		
95°C	30 sec	}	35 Zyklen
60°C	30 sec		
72°C	30 sec		
72°C	10 min		

2.2.6. Quantitative Bestimmung der Expression von hBD-1,-2, und 3

Bei der Bestimmung der Expression wurde untersucht, ob Unterschiede zwischen den vorderen Bereichen der Wange und Zunge zu den hinteren Bereichen der Wange und Zunge in Bezug auf die Quantität von hBD 1-3 mRNA bestehen.

Die Real-Time-RT-PCR-Analyse wurde mit dem Fluoreszenz-Cycler (LightCycler®) der Fa. Roche (Mannheim) durchgeführt. Auf diese Weise konnte eine kontinuierliche Fluoreszenzmessung des PCR-Produktes, Zyklus für Zyklus, aufgezeichnet werden.

Zusätzlich zu den Primern wird ein Farbstoff hinzugegeben, das so genannte SYBR-Green I. Dieser Farbstoff bindet in der kleinen Furche der DNA. Nach der Denaturierung der DNA wird diese einzelsträngig, was die Bindung von SYBR-Green unmöglich macht (Roche Molecular Biochemicals).

In der Elongationsphase, in der es zu einer Verlängerung der Primer entlang der DNA-Matrize kommt, wurde mehr und mehr von dem Farbstoff an der DNA gebunden. Am Ende der Elongationsphase stellte sich somit wieder eine doppelsträngige DNA und gleichzeitig ein Maximum an gebundenem SYBR-Green-Farbstoff dar. Genau an diesem Punkt eines Zyklus in der Polymerasekettenreaktion, durchgeführt im LightCycler®, fand die Messung statt. Dieser Vorgang wurde in jedem Zyklus wiederholt, so dass Zyklus für Zyklus auf dem Monitor das gemessene Fluoreszenzsignal abgelesen werden konnte. Dadurch bestand eine genaue Kontrolle über den Ablauf der PCR.

Es wird eine Schwelle festgelegt, bei der ein klar signifikantes Signal gegenüber dem Hintergrundrauschen detektierbar ist. Jede Probe, die diese Schwelle überschreitet, wird quantifiziert.

Es ergeben sich somit für jede untersuchte Probe zwei unterschiedliche Parameter. Der erste Parameter ist die oben beschriebene Schwelle, also das Erreichen einer 5%igen PCR-Produktkonzentration (Gibson et al., 1996). Weiterhin ist der Zeitpunkt [als Crossing-Point = threshold cycle (C_t) bezeichnet], an dem diese Schwelle erreicht wird, als zweiter Parameter entscheidend. Dieser Zeitpunkt wird anhand der Zyklenzahl festgelegt. Je später, d.h. mit zunehmender Zyklenzahl, die Probe diese Schwelle erreicht, desto geringer war der Ausgang der Konzentration des Produktes (Higuchi et al., 1993).

Für eine abschließende Kontrolle über das erfolgreiche Ablaufen der PCR entschied eine Negativkontrolle. Bei dieser Kontrolle wurde anstatt der cDNA Wasser zum Probenmix gegeben. Es sollte hier keinerlei PCR-Produkt entstehen.

Die Software kalkuliert aus dem Wert des Crossing-Points und dem der Zyklenzahl die relative Transkriptionsproduktmenge (relative transcript level) mit dem Abschluss der PCR für jede untersuchte Probe, einschließlich des Standards, automatisch. Die daraus ermittelte Standardkurve entspricht einer Linearregression, umgekehrt zur logarithmischen Funktion der Fluoreszenzaufzeichnung aus der PCR (Roche Molecular Biochemicals) (s. Ergebnisse: Abb.1-3). Die Steigung dieser Standardkurve steht mit dem entsprechenden Wert für die Effizienz der PCR. Der Wert wird mit einem negativen Vorzeichen angegeben und dient der Vergleichbarkeit der einzelnen Polymerasekettenreaktionen untereinander (Roche Molecular Biochemicals).

Ein Signal ergibt sich bei jedem Abdiffundieren der einzelnen Fluoreszenzfarbstoffe. Bei einer Wellenlänge von 485 nm erfolgt nach jedem Zyklus eine Messung der Fluoreszenzänderung in der Reaktionskapillare (Roche Molecular Biochemicals; Wittwer et al., 1997). Die verschiedenen Proben wurden anhand eines Standards quantifiziert. Dieser Standard wurde, wie oben bereits erwähnt, aus dem Epithel der nicht entzündeten Innenwange gewonnen. Die Total-RNA dieses Epithels wurde mit Hilfe von TRIzol von der Fa. Gibco (Karlsruhe) isoliert. 1µg dieser so gewonnenen RNA wurde mit den oben angeführten Reagenzien (AMV RT-Kit) revers transkribiert. Die cDNA, äquivalent zu 20 ng Poly-(A)⁺-RNA, wurde der Reaktion in einer Verdünnung von 1:5 zugegeben.

Die von jeder Probe gewonnenen cDNA wurde in die Reaktion, zusammen mit 4 mM MgCl₂, 0,5 µM pro Primer und der Polymerase (LightCycler[®]-DNA Master SYBR Green I) von der Fa. Roche (Mannheim) gegeben. Die genauen Angaben für Menge an zugegebenen Reagenzien sind in der Tabelle 3 dargestellt.

Tabelle 3: Zusätze für die Durchführung der Real-Time-PCR mit dem LightCycler®

Zusatz	Volumen
Aqua dest.	11,6 µl
MgCl ₂ [4 mM]	2,4 µl
Primer 1 + 2 (Sense und Antisense) [0,5 µM pro Primer]	2,0 µl
LightCycler®-DNA Master SYBR Green I-Mix	2,0 µl
Template-DNA	1,0 µl

Die angegebenen Reagenzien wurden in Glaskapillaren der Fa. Roche (Mannheim) zusammenpipettiert, so dass sich pro Kapillare ein Gesamtvolumen von 18 µl ergab. Die für jede Probe spezielle Glaskapillare wurde in den Thermocycler (LightCycler®) gegeben.

Das PCR-Produkt, das in jedem einzelnen Zyklus entstanden ist, wurde über die Messung der Fluoreszenz von SYBR Green I bei einer Temperatur von 87° C am Ende eines jeden Zyklus aufgezeichnet.

Nach dem Abschluss der 45 Zyklen folgte, von dem Programm automatisch eingeleitet, die Aufzeichnung der Schmelzkurven für alle PCR-Produkte (Roche Molecular Biochemicals). Dabei wurden die Proben auf 65° C für 15 Sekunden abgekühlt und anschließend in sehr engen Schritten (0,2° C/sec) bis auf 95° C erhitzt. Dieser Schritt diente zur qualitativen Analyse der PCR. Nur bei erfolgreicher Amplifizierung gewinnt man Schmelzkurven hoher Temperatur.

Im Folgenden konnten sowohl die Schmelzkurven als auch die Kurven der PCR mit Hilfe der LightCycler® Software ausgewertet werden. Es wird von der LightCycler® Software der Punkt festgelegt, an dem die Hintergrundaktivität der initialen Zyklen in die tatsächliche Amplifikationskurve der einzelnen Proben übergeht. Dieser Punkt, auch Crossing-Point genannt, zeigt diese Schwelle des Übergangs an (Higuchi et al., 1993). Dabei wird genauestens dokumentiert, bei welchem Zyklus diese Schwelle überschritten wird.

Laut Herstellerangaben und Literatur verhält sich die Zyklusnummer umgekehrt proportional zum Logarithmus der initialen Produktkonzentration (Roche Molecular Biochemicals; Higuchi et al., 1993).

Zur Optimierung der PCR für die quantitative Bestimmung der Expression wurde eine abgewandelte Verfahrensweise, die sogenannte Hot-Start PCR, angewandt (Bustin, 2002). Dabei

handelt es sich um eine Modifikation, bei der die initiale Denaturierungsphase ausgedehnt wird. Es wird zur Reaktion, statt der LightCycler®-DNA SYBR Green - Polymerase, die LightCycler®-FastStart DNA Master SYBR Green I – Polymerase hinzugegeben. Die Begriffe Hot-Start und Fast-Start werden synonym verwendet. Die Hot-Start-Polymerase unterscheidet sich von der Taq-Polymerase dadurch, dass ein spezifischer Antikörper die Aktivität des Enzyms bei niedriger Temperatur inhibiert. Erst, wenn der Antikörper durch Temperaturerhöhung beim Start der PCR denaturiert wird, ist die Hot-Start-Polymerase enzymatisch aktiv und beginnt die Amplifizierung. Dadurch wird eine unerwünschte Kettenverlängerung durch unspezifisches Priming bei niedriger Temperatur verhindert (Newton und Graham, 1994; Bustin, 2002).

2.2.6.1 Quantitative Bestimmung der Expression von hBD-1

Für die quantitative Bestimmung von hBD-1 wurde der folgende Ablauf, nach Programmierung, gestartet:

95° C 10 min		
95° C 10 sec	}	45 Zyklen
55° C 5 sec		
72° C 15 sec		

Die Primersequenz für das humane β -Defensin-1 in der Real-Time-PCR lautet:

Humanes β -Defensin-1 (184 Basenpaare):

Sense: 5' TTG TCT GAG ATG GCC TCA GGT GGT AAC 3'

Antisense: 5' ATA CTT CAA AAG CAA TTT TCC TTT AT 3'

2.2.6.2 Quantitative Bestimmung der Expression von hBD-2 und hBD-3

Der programmierte Ablauf der PCR-Reaktion stellte sich folgendermaßen dar:

95° C 10 min		
95° C 10 sec	}	45 Zyklen
60° C 5 sec		
72° C 10 sec		

Für das humane β -Defensin-2 und humane β -Defensin-3 in der Real-Time-PCR wurden die Primer mit folgenden Sequenzen eingesetzt:

Humanes β -Defensin-2 (255 Basenpaare):

Sense: 5' ATC AGC CAT GAG GGT CTT GT 3'.

Antisense: 5' GAG ACC ACA GGT GCC AAT TT 3'

Humanes β -Defensin-3 (206 Basenpaare):

Sense: 5' AGC CTA GCA GCT ATG AGG ATC 3'

Antisense: 5' CTT CGG CAG CAT TTT CGG CCA 3'.

2.2.6.3 Auswertung der quantitativen PCR

Die zu untersuchenden Proben wurden mit Hilfe des Standards und eines zweiten „House-Keeping-Genes“ (β -Aktin) ausgewertet. Seine mRNA ist in allen Zellen in fast gleichen Mengen vorhanden (Bustin, 2002; Bustin, 2000; Vandesompele et al., 2002). Die Verwendung des β -Aktin-Gens zur Auswertung der quantitativen PCR ist eine gebräuchliche und anerkannte Methode (Bustin, 2002; Vandesompele et al., 2002). Die cDNA des Standards wurde in einer Verdünnungsreihe von 1:5, 1:10, 1:50, 1:100 und 1:500 angesetzt. Diese Verdünnungsreihe wurde bei allen Versuchen beibehalten, um eine Reproduzierbarkeit der einzelnen Polymerasekettenreaktionen zu gewährleisten. Der Konzentrationsabfall der Verdünnungsreihe ist für die Auswertung der quantitativen PCR entscheidend. Durch die Werte der Standardproben konnte über den Light-Cycler eine Standardkurve ermittelt werden. Dies ergab zunächst die relative Expression der quantitativen PCR. In diese relative Expression, die sich aus einem Rechenschema ergibt, werden sowohl die Ergebnisse des Standards als auch des House-Keeping-Genes mit einbezogen (Bustin, 2002; Vandesompele et al., 2002; Applied Biosystems, 2001). Die Ergebnisse lassen sich zunächst durch den C_T -Wert (Crossing-Point) bestimmen.

Die durch die RT-PCR-Software ermittelten C_T -Werte von β -Aktin und des gesuchten Genes (hBD-1, -2 und -3) wurde durch Division (β -Aktin / hBD) gegeneinander normalisiert .

2.2.7 Gelelektrophorese

15 µl des PCR-Produktes, gemischt mit 3 µl Auftragspuffer (0,125 g Bromphenolblau, 28,7 g Glycerin, 100 ml Aqua dest.), wurden in einem 1,7%igen Agarosegel (50 ml 0,5 x Tris-Borsäure-EDTA-Puffer (TBE) und 3 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml) aufgetragen. Die Auftrennung der PCR-Produkte lief über eine Zeit von 50 Minuten bei einer Spannung von 100 Volt in 500 ml 0,5 x TBE-Puffer (Sambrook et al., 1989).

Die aufgetragenen PCR-Produkte von β -Aktin und hBD-1-3 fluoreszierten durch das zugesetzte Ethidiumbromid und wurden mit Hilfe einer Videokamera in einem Computer dokumentiert. Es wurde dafür eine Geldokumentationsanlage, Video BioDoc II, von der Fa. Biometra (Göttingen) verwendet

2.3 Histologie

Die C-Probe aus dem Operationssaal wurde zu einem Teil für die Kryoschnitte direkt bei -70°C eingefroren und zum anderen Teil für die Paraffinschnitte in Formalin eingelegt. Formalin besteht aus einer wässrigen 37%igen Formaldehyd-Lösung. Um jedoch später eine immunhistologische Untersuchung durchführen zu können, musste der eine Teil der Probe für die Herstellung der Kryoschnitte eingefroren werden. Durch die Immunhistologie kann ein Nachweis über antigene Substanzen in Gewebe und Zellen erfolgen (Böcker et al., 2001).

2.3.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung (H.E.-Färbung)

Die bei -20°C gelagerten Schnitte wurden kurz mit Aqua dest. abgespült und anschließend mit Hämalaun nach Mayer der Fa. Merck (Darmstadt) für fünf Minuten gefärbt. Nach dem Färben erfolgte das Abspülen mit Aqua dest. und eine Wässerung unter fließendem Leitungswasser für 15 Minuten. Im Folgenden wurden die Schnitte für 12 Minuten in Skandom γ -Eosin (1%iges Eosin) der Fa. Life Sciences International GmbH (Frankfurt/Main) inkubiert. Nach einer kurzen Differenzierung in 80%igem Alkohol erfolgte eine Fixierung der histologischen Schnitte über eine kleine aufsteigende Alkoholreihe. Hierbei wurde speziell für die Kryoschnitte zweimal in 96%igem Alkohol und zweimal in 100%igem Alkohol für jeweils 2 Minuten fixiert.

Alle Schnitte wurden abschließend mit einem Objektdeckel von der Fa. Menzel (Braunschweig) abgedeckt. Die Klebung erfolgte hierbei mit Eukit (Butylacetat) der Fa. O. Kindler (Freiburg).

Durch die sogenannte HE-Färbung lassen sich alle basophilen Zell- und Gewebestrukturen wie Zellkerne, Bakterien, Kalk, basophiles Zytoplasma und Knorpelgrundsubstanz blau färben, während azidophile Bestandteile wie Zytoplasma, Kollagen und Erythrozyten rot angefärbt werden.

Die Beurteilung und Photographie der Histologien wurde mit dem Mikroskop Axioskop 2 der Fa. Zeiss (Jena) und der Kamera Practica-ColorScan ebenfalls der Fa. Zeiss durchgeführt. Die Bildbearbeitung erfolgte durch das Programm Photoshop® (Adobe Photoshop/ Adobe Systems Incorporated, Version 2000).

2.4 Immunhistologie

2.4.1 Anfertigung der Schnittpräparate

Die Gewebeproben wurden routinemäßig fixiert und in Paraffin eingebettet. Daraus wurden mit Hilfe eines Schlittenmikrotoms der Fa. Jung (Heidelberg) 3-5 µm dicke Schnitte angefertigt und auf aminopropylethoxysilanbeschichtete Objektträger der Fa. Histobond (Marienfeld) aufgetragen. Die Schnitte wurden im Brutschrank über 24 Stunden bei 37 ° C getrocknet.

2.4.2 Immunhistochemische Methode

Für die Immunhistologie wurde die indirekte ABC-Methode (Avidin-Biotin-Complex) verwendet. Sie macht sich die Affinität von Avidin und Biotin zunutze (Noll und Schaub-Kuhnen, 2000).

Zur Anwendung kam 1 ml Reagenz A (Streptavidin aus *Strept. avidinii*) in 0,01 mol/l Phosphatpuffer, 0,15 mol/l NaCl und 15 mmol/l NaN₃ bei einem pH-Wert von 7,2.

1 ml Reagenz B (biotinylierte Merrettichperoxidase) enthielt 0,01 mol/l Phosphatpuffer, 0,15mol/l NaCl und 15 mmol/l NaN₃ bei ebenfalls einem pH-Wert von 7,2.

Es wurde eine sorgfältige Einstellung des Verhältnisses zwischen Streptavidin und dem biotinylierten Enzym durchgeführt. Hierdurch wurde sichergestellt, dass eine optimale Anzahl Biotinbindungsorte frei und funktional aktiv blieben, um verlässliche Markierungen zu erbringen. Die Biotinylierung der Peroxidase (Reagenz B, Meerrettichperoxidase) erfolgte mit aktiviertem Biotin, das einen Aminohexansäure-Spacerarm besitzt.

Die Spezifität dieses Komplexes liegt darin, dass sie verschiedene Biotinderivate und biotinylierte Proteine oder Nukleinsäuren bindet (Noll und Schaub-Kuhnen, 2000; Boenisch et al., 2003).

Nach Entparaffinierung der Schnitte durch Xylol, einer absteigenden Alkoholreihe und abschließender Spülung mit Aqua dest. (Tabelle 7), wurden die Präparate mit TBS 10 min. gespült und die endogene Peroxidase blockiert (70 ml Methanol und 700 µl 30%-iger H₂O₂-Lösung). Nach einer weiteren Spülung (10 min; TBS) erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörper (1h; 1:50 in 1%-iger TBS/BSA-Lösung) bei Raumtemperatur (25° C). Daraufhin wurde der Sekundärantikörper (hBD-1: anti-rabbit; hBD-2: anti-rabbit jeweils 1:50 in 1%-iger TBS/BSA-Lösung) nach einer Spülung mit TBS auf die Präparate aufgetragen. Der Sekundärantikörper wurde nach der Inkubationszeit von 30 min. erneut mit TBS angewaschen. Die Präparate wurden mit DAB (8 min.; 1:10) abgefärbt und mit TBS gespült (10 min.). Die Gegenfärbung erfolgte mit saurem Hämalaun (1 s) und die Bläuung unter fließendem Wasser (4 min.) Anschließend wurden die Präparate nach einer aufsteigenden Alkoholreihe (2x2 min. abs. Alkohol; 2x2 min. Xylol) mit DePex Fa. Boehringer Ingelheim (Heidelberg) eingedeckt (Tabelle 8).

2.4.2.1 Antikörper

Es wurden paraffingängige Antikörper der Fa. BioLogo (Kronshagen) für die Enzyme Lysozym, Calprotectin und für das beta-Defensin-1 verwendet. Für das beta-Defensin-2 und -3 wurden Antikörper der Fa. Alpha Diagnostic International/Cell Concept GmbH (Umkirch, Deutschland) verwendet.

Tabelle 4: Antikörperübersicht

Antikörper	Art	Spezies	Kontrolle	Firma
Anti-hBD-1	polyklonal	Kaninchen	Nieren- o.Blasenepithel	Biologo (Kronshagen)
Anti-hBD-2	polyklonal	Kaninchen	Urogenitaltrakt, Lunge, Trachea	Alpha-Diagnostics (CellConcepts, Umkirch)
Anti-hBD-3	monoklonal	Maus	Urogenitaltrakt, Lunge, Trachea	Alpha-Diagnostics (CellConcepts, Umkirch)
Calprotectin (27E10)	monoklonal	Maus	Knochenmark, Milz, Leber	Biologo (Kronshagen)
Lysozym (Muramidase)	polyklonal	Kaninchen	Leber, Haut, Darmepithel	Biologo (Kronshagen)

2.4.2.1.1 Immunhistochemische Darstellung von Lysozym

Der polyklonale, paraffingängige Lysozym-Antikörper (Muramidase) wurde in der Menge 1 mg/ml eines Kaninchen Immunglobulins, absorbiert gegen menschliches Plasma und Urin, mit einem pH-Wert von 7,3 verdünnt mit Na-Azid 0,09 %. Er ist verwendbar für sowohl Kryostatmaterial als auch für Paraffinschnitte und Immunoblotting (Mörsky, 1988; Pileri et al., 2002).

2.4.2.1.2 Immunhistochemische Darstellung von Calprotectin

27E10 ist ein monoklonaler, paraffingänger Antikörper gegen Calprotectin, der ein Epitop auf dem MRP8/14-Komplex nachweist.

Er wurde verwendet in Form von 100 µg gereinigtem monoklonalem Antikörper entstammend dem Maus Immunglobulin-G-1 lyophilisiert aus PBS mit einem pH-Wert von 7,2 in 1% BSA und 0,01% Thiomersal mit einer Rekonstitution mit 0,5 ml Aqua dest. zu einer Stammlösung von 200 µg/ml (Schmid et al., 1995; Luger et al., 1995).

2.4.2.1.3 Immunhistochemische Darstellung von hBD-1,-2 und 3

Der polyklonale, lyophilisierte Antikörper hBD-1 wurde verwendet in Form von 100 μ l Kaninchenserum enthaltend 0,05 % NaN_3 .

HBD-2 und -3 wurden als 0,1 %iges Kaninchenserum in der Menge 100 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ lyophilisiert verwendet (Bensch et al., 1995; Harder et al., 1997; Ganz, 1999; Diamond et al., 2000).

2.4.3 Geräte, Verdünnung, Reagenzien

Fixierung der Schnitte

Tabelle 5: Fixierung

Lösung

10%	Neutral gepufferte Formalin-Lösung (NBF)
100 ml	Formalin (ca. 37%ige w/v wässrige Formaldehyd-Lsg.)
4g	Natriumdihydrogenphosphat, Monohydrat ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$)
6,5g	di-Natriumhydrogenphosphat, wasserfrei (Na_2HPO_4)
ad 1l	Destilliertes Wasser
pH	6,8-7,2

Herstellung der Paraffinschnitte

Tabelle 6: Herstellung der Paraffinschnitte

Konz.	Lösung	Temp.	Zeit
70%	Ethanol	40° C	1h
80%	Ethanol	40° C	1h
95%	Ethanol	40° C	1h
95%	Ethanol	40° C	1h
100%	Ethanol	40° C	75 min.

Der Alkohol wurde mittels Xylol aus dem Gewebe entfernt. Darauf folgte die Infiltration des Gewebes mit flüssigem Paraffin bei 57° C. Es wurden Schnitte mit einem Durchmesser von 3-5 µm angefertigt und auf Objektträger aufgezogen. Eine Trocknung folgte für 24 h bei 37° C.

Entparaffinieren der Schnitte

Tabelle 7: Entparaffinieren

Lösung	Zeit
Xylol	10 min.
Isopropanol 100%	2 min.
Isopropanol 96%	2 min.
Isopropanol 80%	2 min.
Isopropanol 60%	2 min.
gespült mit H ₂ O	2 min.

Färbung

Bei der ABC-Methode reagiert der Avidin-Biotin-Enzymkomplex mit dem biotinylierten Sekundärantikörper. Das Gemisch sollte 30 min. (Komplexbildung) vor Gebrauch hergestellt werden.

Gegenfärbung mit Hämalan

Als Gegenfärbung bezüglich des Farbkontrastes und der Löslichkeit eignet sich Hämalan. Sie erfolgte mit Mayers saurem Hämalan (1s) und die Bläuung unter fließendem Wasser (4 min.).

Tabelle 8: Arbeitsschritte der immunhistochemischen Methodik

Arbeitsschritt	Zeit
Spülen mit TBS	10 min.
Blockierung der endogenen Peroxidase (70 ml Methanol und 70µl 30 %-iger H ₂ O ₂ -Lösung)	10 min
Spülen mit TBS	10 min.
Inkubation mit Primärantikörper (1:50 in 1%-iger TBA/BSA-Lösung; 25° C)	1 h.
Spülen mit TBS	10 min.
Inkubation mit Sekundärantikörper (DAKO „Envision“: hBD-1: anti-rabbit; hBD-2: anti-rabbit jeweils 1:50 in 1%-iger TBS/BSA-Lösung; 25° C)	30 min.
Spülen mit TBS	10 min.
Färbung mit DAB (1:10)	8 min.
Spülen mit TBS	10 min.
Gegenfärbung mit Hämalaun	1 s.
Bläuen unter fließendem Wasser	4 min.
Aufsteigende Alkoholreihe <ul style="list-style-type: none"> • 2 x abs. Alkohol • 2 x Xylol 	jeweils 2 min.
Eindecken	

Reagenzien:Xylol, Ethanol, Methanol und H₂O₂

Sek. AK, AB-Complex, DAB

Hämalaun, BSA, Tris-Puffer

Humanserum

*Fa. Merck (Darmstadt, Deutschland)**Fa. DAKO (Glostrup, Dänemark)**Fa. Sigma (Steinheim, Deutschland)**Universitätsklinikum**Schleswig-Holstein, Campus Kiel*

2.5 Statistische Auswertung der Ergebnisse aus der quantitativen Bestimmung der Expression für das humane β -Defensin-1, -2 und -3

Die statistische Auswertung wurde mit dem Programm SPSS (Student Version 12), lizenziert für die Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität zu Bonn, durchgeführt. Es wurde zunächst eine rein deskriptive Statistik durchgeführt, wobei der Mittelwert, Minimum, Maximum und die Standardabweichung angegeben worden sind. In einem zweiten Arbeitsschritt wurde mit dem nichtparametrischen Mann-Whitney-Test (Test für zwei unabhängige Stichproben) die Expression der humanen β -Defensine-1 – 3 zwischen den einzelnen Gewebeprobearten verglichen, da aufgrund der geringen Fallzahl die Annahme einer Normalverteilung in den Beobachtungen nicht zu überprüfen war. Der dritte Test bezog sich auf zwei verbundene Stichproben (Wilcoxon-Vorzeichen-Test) und bewertete das Verhältnis der Expression der humanen β -Defensine-1 – 3 mit den Proben Wange ventral, dorsal und der Zunge ventral, dorsal untereinander. In allen Tests wurde ein Signifikanzniveau von $\alpha = 0,05$ angenommen. Die abgeleiteten Ergebnisse sind explorativ zu sehen und sollten als Auffälligkeiten gewertet werden.

3. Ergebnisse

Es wurden sieben Proben jeweils von der Zunge ventral/dorsal und sechs von der Innenwange ventral/dorsal aus gesundem Gewebe verschiedener Patienten mit RT-PCR und Immunhistologie untersucht. Diese ergaben insgesamt 26 Proben von 13 Patienten.

3.1 Genexpression in den Gewebeproben

3.1.1 Quantitative Expression humaner β -Defensine

In allen 26 Proben wurde die RNA-Expression der humanen β -Defensine 1-3 quantitativ untersucht. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der Expression der humanen β -Defensine 1-3 in Bezug auf ihre unterschiedliche Lokalisation ventral und dorsal.

Für die einzelnen Proben sind die Werte der relativen Expression in den Tabellen 9-11 dargestellt.

3.1.1.1 Humanes β -Defensin-1

Tabelle 9: Quantitative Expression (normalisierte C_t -Werte) des humanen β -Defensins-1 in unterschiedlicher Lokalisation der Innenwange und Zunge.

	Wange-ventral	Wange-dorsal	Zunge-ventral	Zunge-dorsal
Probe	n = 6	n = 6	n = 7	n = 7
1	1,030	1,014	1,210	1,125
2	1	1,070	1,175	1,096
3	1,172	1,136	1,209	1,056
4	1,087	1,072	1,287	1,250
5	1,126	1,103	1,370	0,965
6	n.d.	1,100	n.d.	1,207
7			1,102	1,431

n.d. = nicht detektiert; n = Anzahl der untersuchten Proben

3.1.1.2 Humanes β -Defensin-2

Tabelle 10: Quantitative Expression (normalisierte C_t -Werte) des humanen β -Defensins-2 in unterschiedlicher Lokalisation der Innenwange und Zunge

	Wange-ventral	Wange-dorsal	Zunge-ventral	Zunge-dorsal
Probe	n = 6	n = 6	n = 7	n = 7
1	0,922	1,091	1,199	1,059
2	n.d.	n.d.	1,111	1,055
3	n.d.	n.d.	1,460	1,180
4	0,922	0,862	1,021	1,366
5	1	0,960	0,994	1,145
6	1,247	1,113	1,267	0,964
7			1,273	1,255

n.d. = nicht detektiert; n = Anzahl der untersuchten Proben

3.1.1.3 Humanes β -Defensin-3

Tabelle 11: Quantitative Expression (normalisierte C_t -Werte) des humanen β -Defensins-3 in unterschiedlicher Lokalisation der Innenwange und Zunge

	Wange-ventral	Wange-dorsal	Zunge-ventral	Zunge-dorsal
Probe	n = 6	n = 6	n = 7	n = 7
1	0,904	1,145	1,285	1,062
2	n.d.	n.d.	1,210	1,345
3	n.d.	n.d.	1,273	1,407
4	0,985	n.d.	n.d.	1,517
5	0,979	1,187	1,112	1,390
6	1,123	0,959	1,178	1,151
7			1,273	1,255

n.d. = nicht detektiert; n = Anzahl der untersuchten Proben

3.1.1.4 Graphische Darstellung der Ergebnisse der Real-Time-PCR

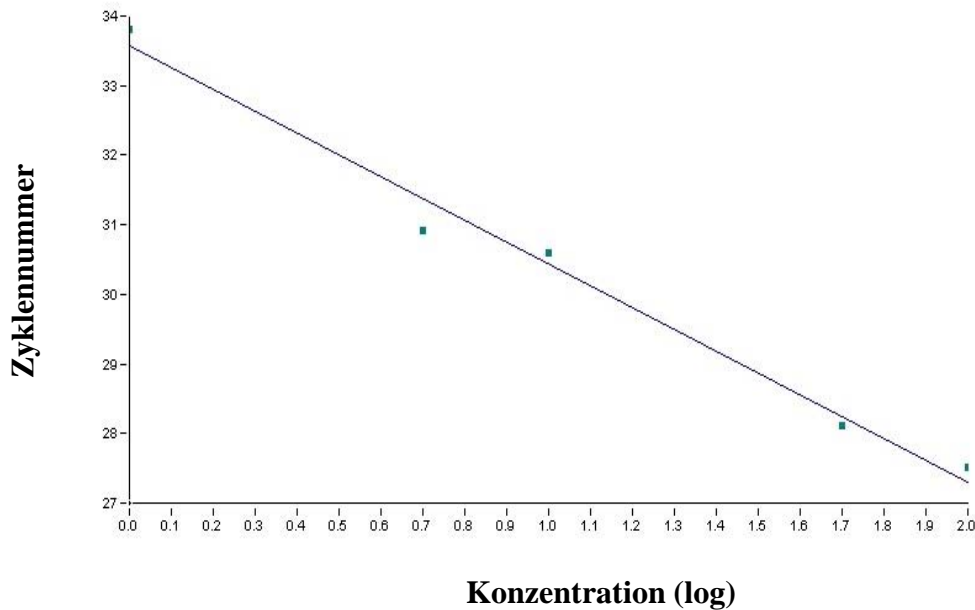


Abb. 1: hBD-1: Standardkurve (beispielhaft)

Standardkurve für die Proben des Standards in der Real-Time-PCR des humanes β -Defensin-1. Die Steigung dieser Standardkurve ist der Wert für die Effizienz der durchgeführten quantitativen Polymerasekettenreaktion.

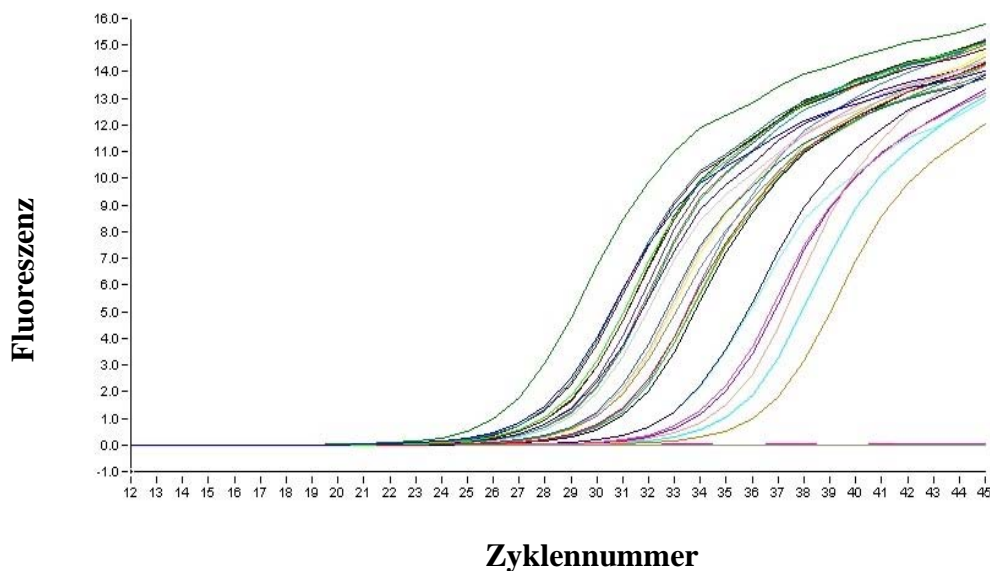


Abb. 2: hBD-1: Analysenkurve (beispielhaft)

Gesamtdarstellung der Kurven nach Fluoreszenzmessung durch den LightCycler[®] der Fa. Roche (Mannheim) für das humane β -Defensin-1. Es konnte ein exponentieller Anstieg der einzelnen Proben aufgezeichnet werden. Die Zahl des jeweiligen Zyklus verhält sich umgekehrt proportional zur Konzentration der gemessenen cDNA.

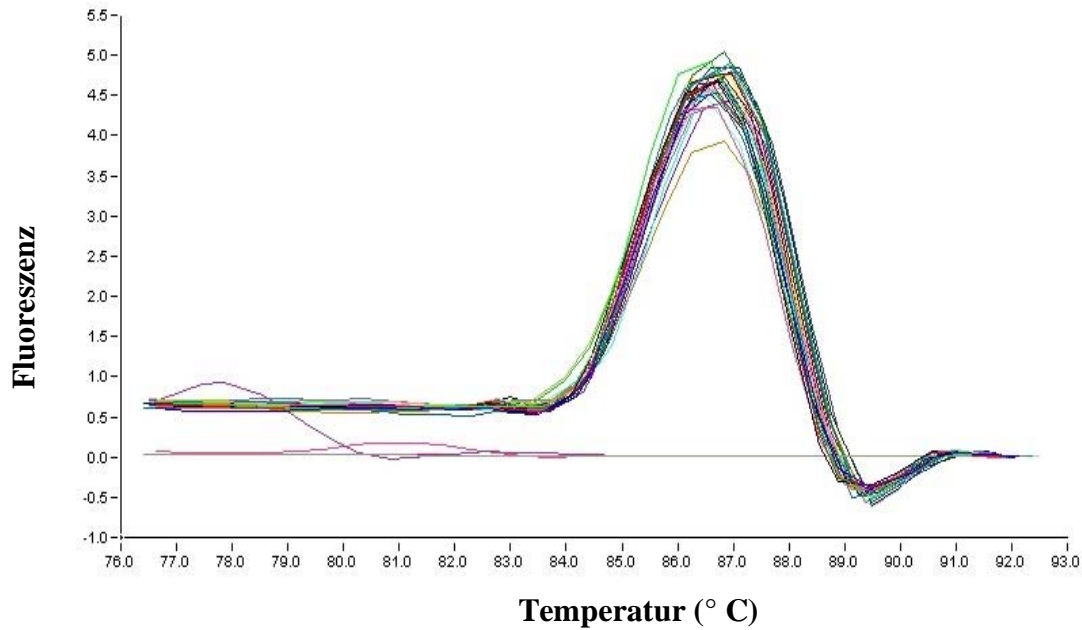


Abb. 3: hBD-1: Schmelzhöhepunkt (beispielhaft)

Darstellung der Schmelzkurve für das humane β -Defensin-1. Zwei Proben zeigen eine Abweichung von den restlichen Proben.

3.1.2 Qualitativer Nachweis von β -Aktin

Eine der Untersuchungsreihen bezog sich auf den qualitativen Nachweis von β -Aktin, um eine Kontrolle zu erhalten, ob die RNA-Extraktion und die anschließende reverse Transkription erfolgreich waren.

Es konnte in allen Proben das Vorhandensein von β -Aktin dargestellt werden.

3.1.3 Gelelektrophorese

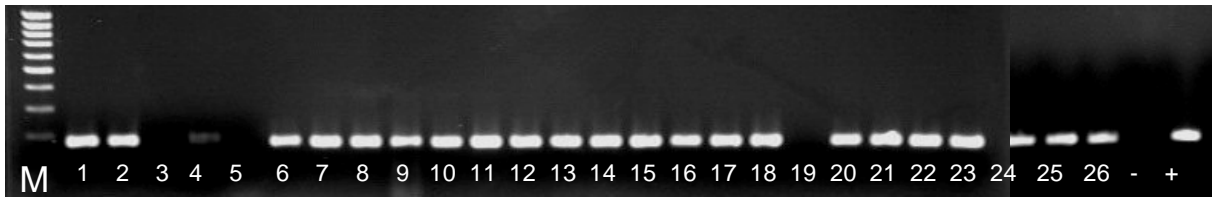


Abb. 4: Gelelektrophorese (beispielhaft)

In der Abbildung 4 ist beispielhaft das Bild einer Gelelektrophorese aus der qualitativen Bestimmung der Expression des humanen β -Defensin-2 dargestellt. Hier handelt es sich um die Darstellung der Produkte aus dem LightCycler.

Die Bahnen 1 –26 zeigen alle einzelnen Proben, die nach der Entnahme aus gesundem oralem Gewebe untersucht wurden. Die Bahnen 1, 3, 5, 7, 9 und 11 zeigen jeweils die Expression der Wange ventral, die Bahnen 2, 4, 6, 8, 10 und 12 der Wange dorsal. Die Bahnen 13, 15, 17, 19, 21, 23 und 25 entsprechen der Zunge ventral und die Bahnen 14, 16, 18, 20, 22, 24 und 26 entsprechen der Expression der Zunge dorsal. Die Bahn (-) zeigt die Negativkontrolle und Bahn (+) die Positivkontrolle. Die unteren Banden der jeweiligen Elektrophoreseläufe sind die PCR-Primer. Die Bezeichnung „M“ steht für den Marker (100 bp-Marker, Fa. Gibco, Karlsruhe).

3.2 Immunhistochemie und Histologie

Humanes β -Defensin-1:

Die Darstellung der Immunreaktion von hBD-1 fiel sowohl in der Wange ventral als auch in der Zunge ventral relativ schwach aus. Abbildungen 5a und 5b zeigen beispielhaft einen immunhistologischen Schnitt in zwei verschiedenen Vergrößerungen der Wange dorsal. Sowohl im Bereich der Wange dorsal als auch im Bereich der Zunge dorsal stellte sich eine mittelstarke Immunfärbung dar.

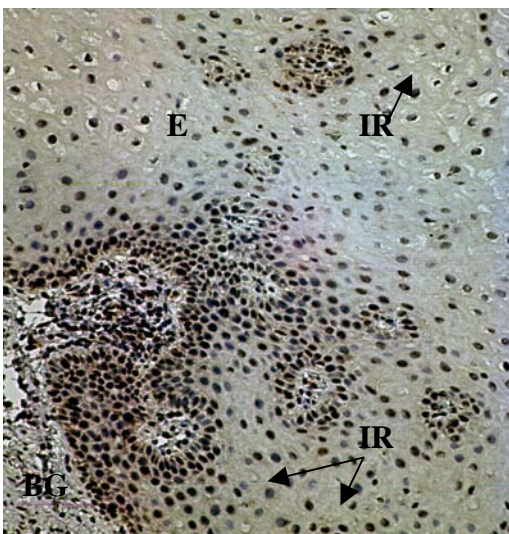


Abb. 5a hBD-1: Wange dorsal (beispielhaft)
Immunreaktion (IR-Braunfärbung),
Bindegewebe (BG), Epithel (E),
Vergrößerung (Objektiv + Okular): 8-fach

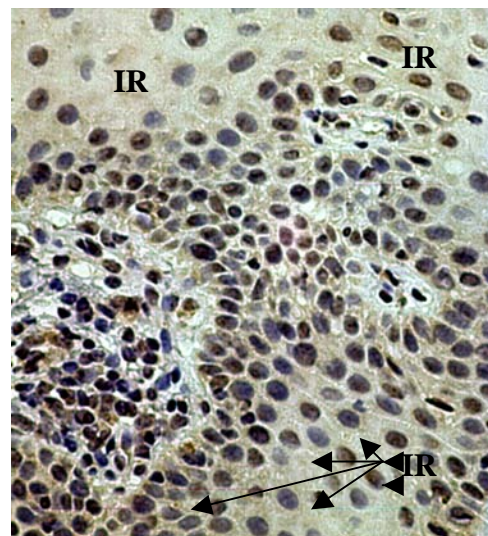


Abb.5b hBD-1: Wange dorsal (beispielhaft)
Immunreaktion (IR-Braunfärbung)
Vergrößerung (Objektiv + Okular): 35-fach

Humanes β -Defensin-2:

HBD-2 zeigte in allen immunhistologischen Präparaten eine starke Immunreaktion. Beispielhaft ist in den Abbildungen 6a und 6b die Wange ventral in zwei verschiedenen Vergrößerungen dargestellt.

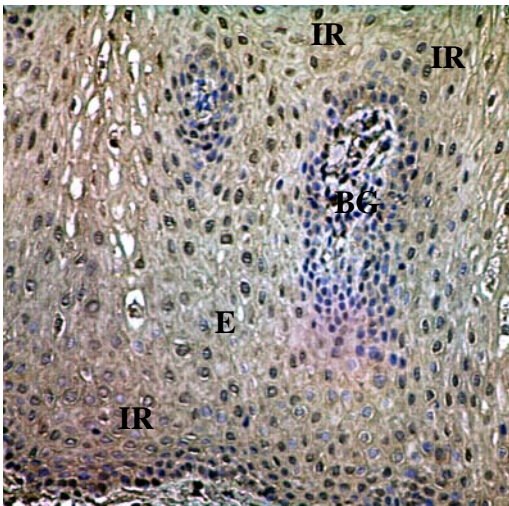


Abb. 6a hBD-2: Wange ventral (beispielhaft)
Immunreaktion (IR-Braunfärbung),
Bindegewebspapille (BG), Epithel (E)
Vergrößerung (Objektiv + Okular): 8-fach

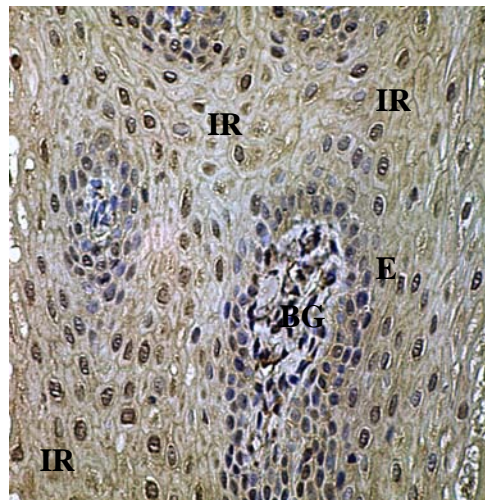


Abb. 6b hBD-2: Wange ventral (beispielhaft)
Immunreaktion (IR-Braunfärbung),
Bindegewebspapille (BG), Epithelzellen (E),
Vergrößerung (Objektiv + Okular): 30-fach

Humanes β -Defensin-3:

Die Darstellung der immunhistochemischen Färbung von hBD-3 fiel ebenfalls insgesamt stark aus. Lediglich die Wange dorsal zeigte eine mittlere Immunreaktion. Abbildungen 7a und 7b zeigen beispielhaft ein Präparat aus der Zunge dorsal in 8-facher und 30-facher Vergrößerung. Die Immunreaktion lässt sich anhand der deutlichen Braunfärbung gut vom umgebenden Gewebe abgrenzen.

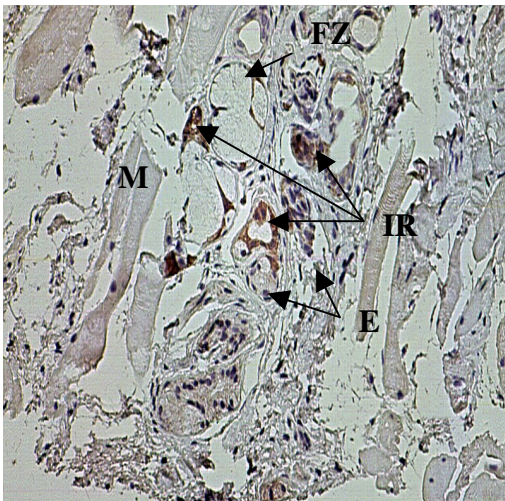


Abb. 7a hBD-3: Zunge dorsal (beispielhaft)
Immunreaktion (IR), Epithelzellen (E),
Fettzelle(FZ), Muskelgewebe(M)
Vergrößerung (Objektiv + Okular): 8-fach

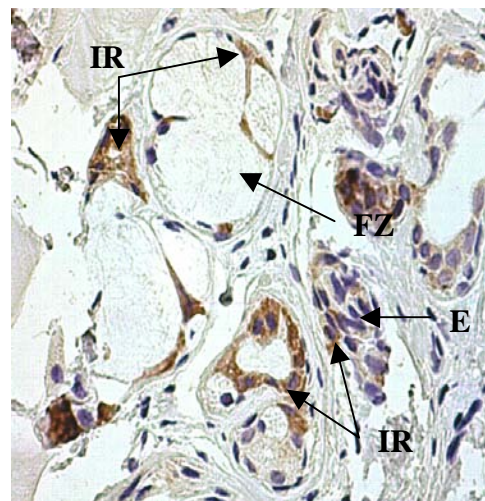


Abb.7b hBD-3: Zunge dorsal (beispielhaft)
Immunreaktion (IR), Epithelzellen (E),
Fettzelle(FZ)
Vergrößerung (Objektiv + Okular): 35-fach

Lysozym:

Die immunhistochemische Darstellung von Lysozym zeigte in den Präparaten der Zunge ventral und dorsal eine starke Immunreaktion. In den Präparaten der Wange, sowohl dorsal als auch ventral, stellte sich eine mittelstarke Färbung dar. Abbildungen 8a und 8b zeigen beispielhaft eine Darstellung der Zunge ventral in zwei verschiedenen Vergrößerungen.

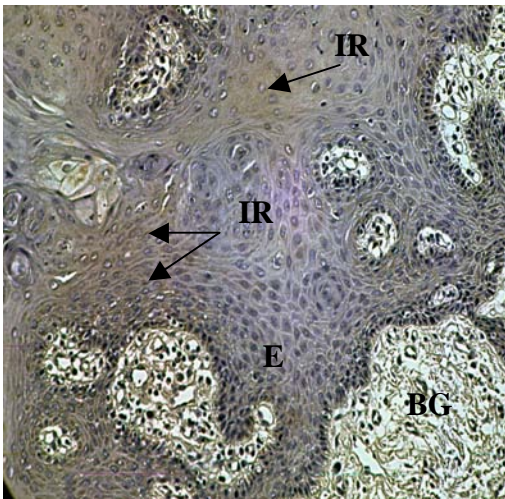


Abb. 8a Lysozym: Zunge ventral (beispielhaft)
Immunreaktion (IR-Braunfärbung),
Bindegewebe (BG), Epithel (E)
Vergrößerung (Objektiv + Okular): 8-fach

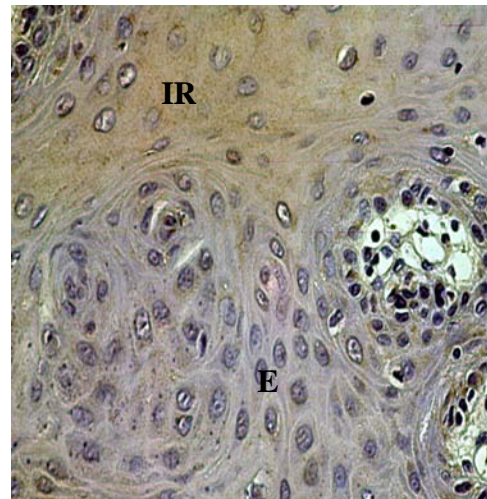


Abb.8b Lysozym: Zunge ventral (beispielhaft)
Immunreaktion (IR-Braunfärbung),
Epithelzellen (E)
Vergrößerung (Objektiv + Okular): 35-fach

Calprotectin:

Die immunhistochemische Darstellung von Calprotectin zeigte lediglich im Bereich der Wange dorsal eine starke Immunreaktion. Alle anderen untersuchten Bereiche zeigten eine schwache Färbung. Abbildungen 9a und 9b zeigen beispielhaft eine Darstellung der Wange dorsal in zwei verschiedenen Vergrößerungen.

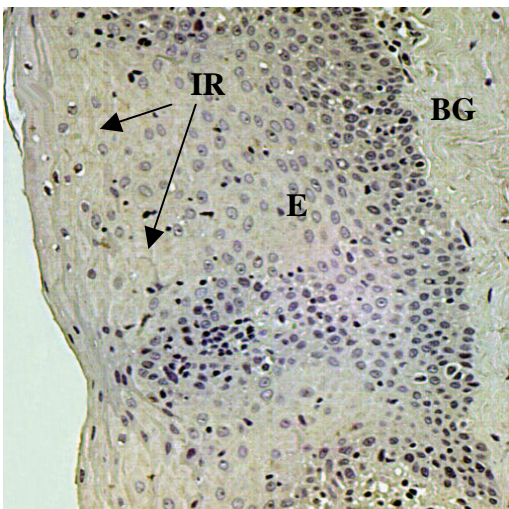


Abb. 9a Calprotectin: Wange dorsal (beispielhaft)
Immunreaktion (IR-Braunfärbung), Epithel (E),
Bindegewebe (BG)
Vergrößerung (Objektiv + Okular): 8-fach

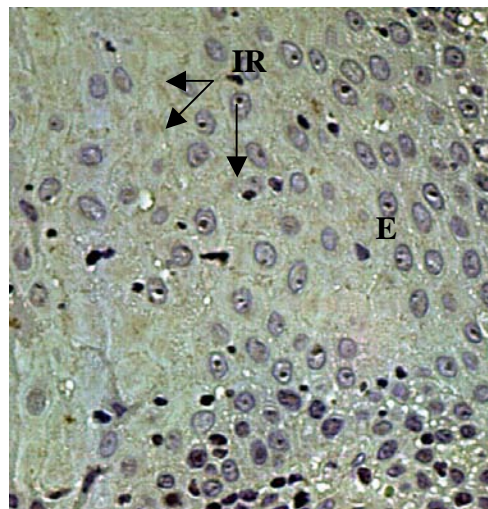


Abb.9b Calprotectin: Wange dorsal (beispielhaft)
Immunreaktion (IR-Braunfärbung), Epithel (E)
Vergrößerung (Objektiv + Okular): 35-fach

Hämatoxylin-Eosin:

Die beispielhaft dargestellte der Hämatoxylin-Eosin-Färbung der Zunge ventral dient der Entzündungskontrolle und zeigt die typische Schichtung mit Epithel und Drüsengewebe und Bindegewebspapillen.

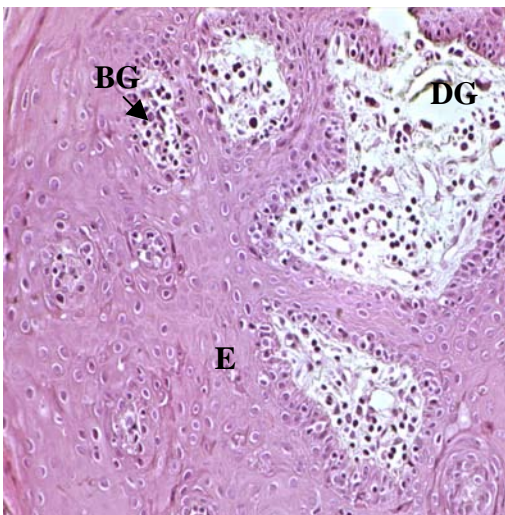


Abb. 10a HE: Zunge ventral (beispielhaft)
Epithelzellen (E), Drüsengewebe (DG)
Bindegewebspapille (BG),
Vergrößerung (Objektiv + Okular): 8-fach

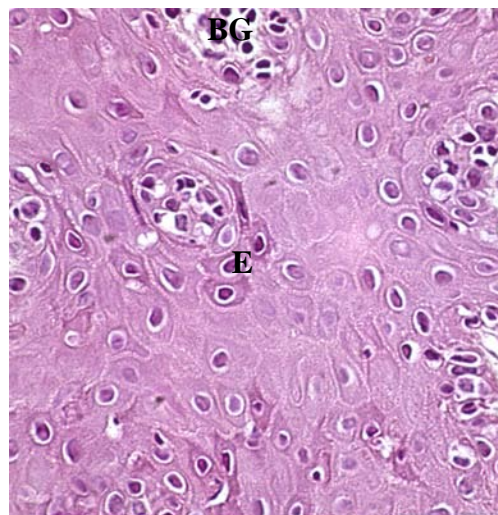


Abb. 10b HE: Zunge ventral (beispielhaft)
Bindegewebspapille (BG), Epithelzellen (E),
Vergrößerung (Objektiv + Okular): 35-fach

Tabelle 12: Immunhistologische Gesamtdarstellung aller untersuchten Präparate im Vergleich

	Wange ventral	Wange dorsal	Zunge ventral	Zunge dorsal
hBD-1	(+)	+	(+)	+
hBD-2	++	++	++	++
hBD-3	++	(+)	++	++
Lysozym	+	+	++	++
Calprotectin	(+)	++	(+)	(+)

++ starke Immunreaktion; + mittlere Immunreaktion; (+) schwache Immunreaktion;
 - keine Immunreaktion

Bei Betrachtung der histologischen Schnitte zeigte hBD-1 insgesamt eine schwache Immunreaktion. Die immunhistologische Färbung von Calprotectin fällt, bis auf den Bereich der Wange dorsal, relativ schwach aus. hBD-2 zeigt in allen Präparaten die stärkste immunhistologische Färbung. HBD-3 ist lediglich in der Wange dorsal schwächer hervorgetreten. Lysozym zeigt eine auffallend stärkere Expression in der Zunge gegenüber der Wange. Insgesamt konnte jedoch in jedem untersuchten Präparat eine Immunreaktion nachgewiesen werden.

3.3 Statistische Auswertung (graphische Darstellung der relativen Expression)

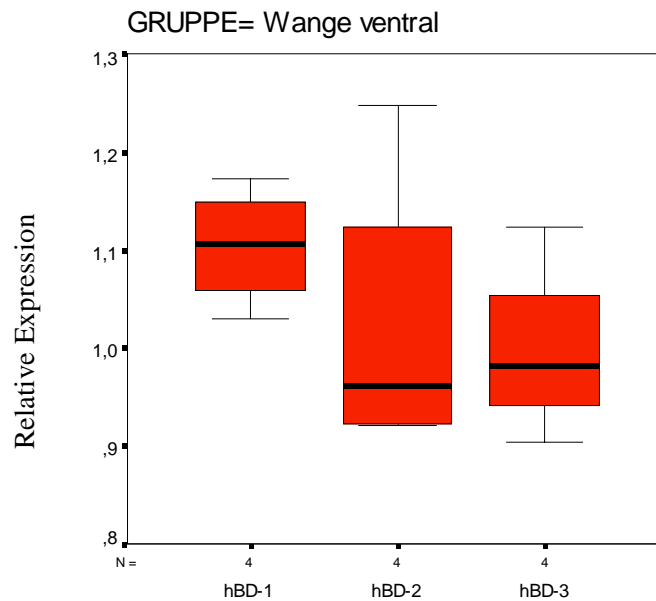


Abb. 11: Relative Expression der mRNA der humanen β -Defensine-1, -2 und -3 in der **Wange ventral**

Boxplotdarstellung (Median, 25tes und 75tes Perzentil, die Länge der Antennen (Whisker) stellen das 1,5-fache des Interquartilabstands dar) der relativen mRNA Expression der humanen β -Defensine -1, -2 und -3.

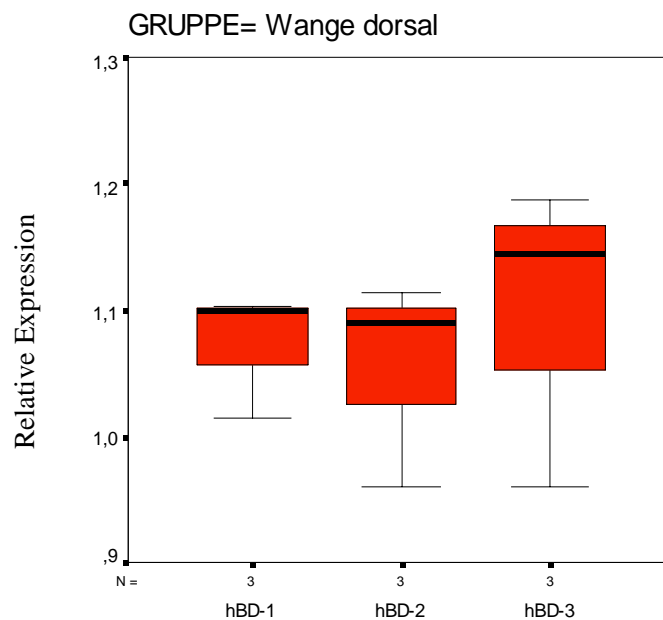


Abb. 12: Relative Expression der mRNA der humanen β -Defensine-1, -2, -3 in der **Wange dorsal**

Boxplotdarstellung (Median, 25tes und 75tes Perzentil, die Länge der Antennen (Whisker) stellen das 1,5-fache des Interquartilabstands dar) der relativen mRNA Expression der humanen β -Defensine -1, -2 und -3.

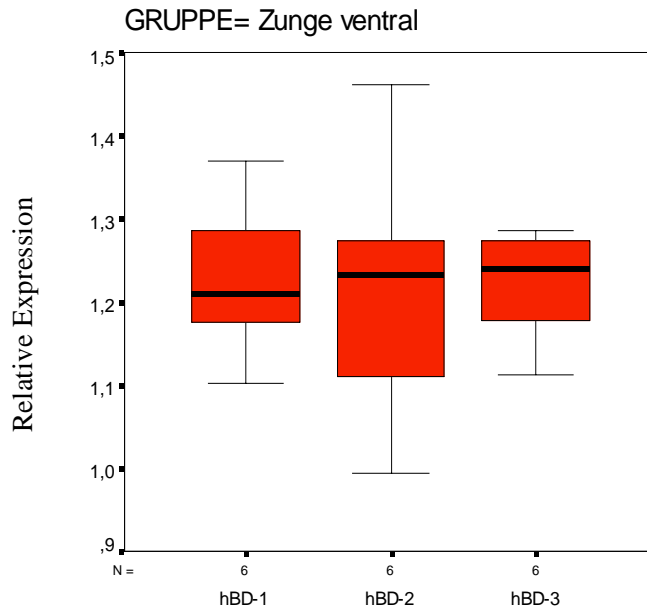


Abb. 13: Relative Expression der mRNA der humanen β -Defensine-1, -2, -3 in der **Zunge ventral**

Boxplotdarstellung (Median, 25tes und 75tes Perzentil, die Länge der Antennen (Whisker) stellen das 1,5-fache des Interquartilabstands dar) der relativen mRNA Expression der humanen β -Defensine -1, -2 und -3.

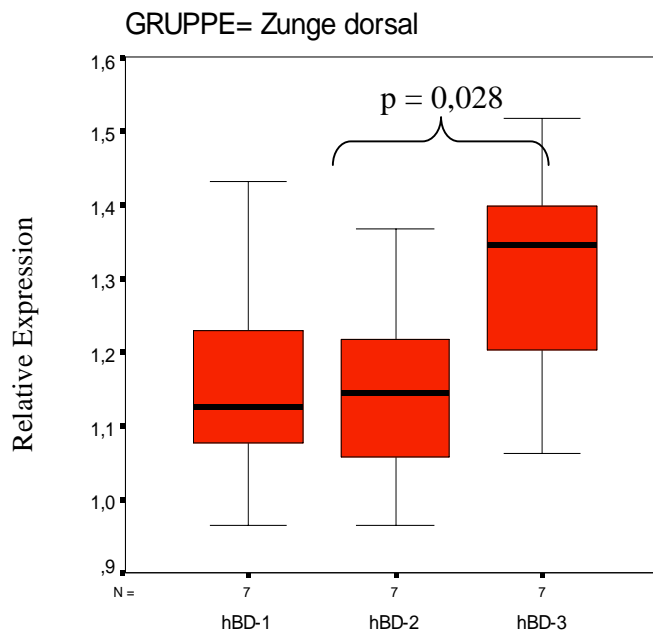


Abb. 14: Relative Expression der mRNA der humanen β -Defensine-1, -2, -3 in der **Zunge dorsal**

Boxplotdarstellung (Median, 25tes und 75tes Perzentil, die Länge der Antennen (Whisker) stellen das 1,5-fache des Interquartilabstands dar) der relativen mRNA Expression der humanen β -Defensine -1, -2 und -3.

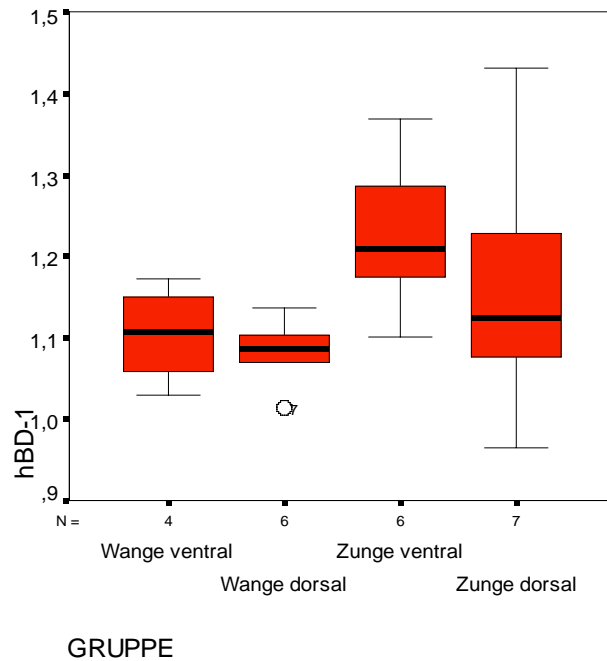


Abb.15: Vergleich der relativen Expression der mRNA des humanen β -Defensin-1 mit den Proben untereinander. In der Zunge ventral zeigte sich eine leicht höhere Expression.

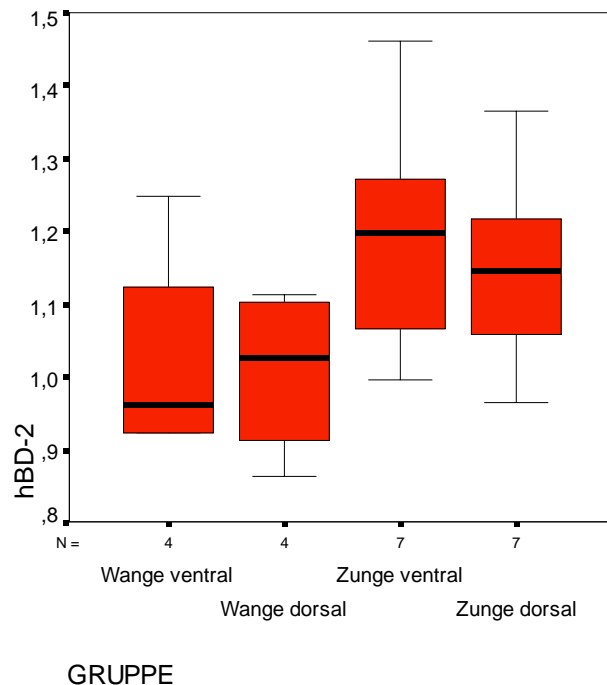


Abb. 16: Vergleich der relativen Expression der mRNA des humanen β -Defensin-2 mit den Proben untereinander. Tendenziell konnte eine höhere relative m-RNA-Expression des humanen beta-Defensin-2 in den untersuchten Abschnitten der Zunge im Vergleich zu den untersuchten Abschnitten der Innenwange dokumentiert werden.

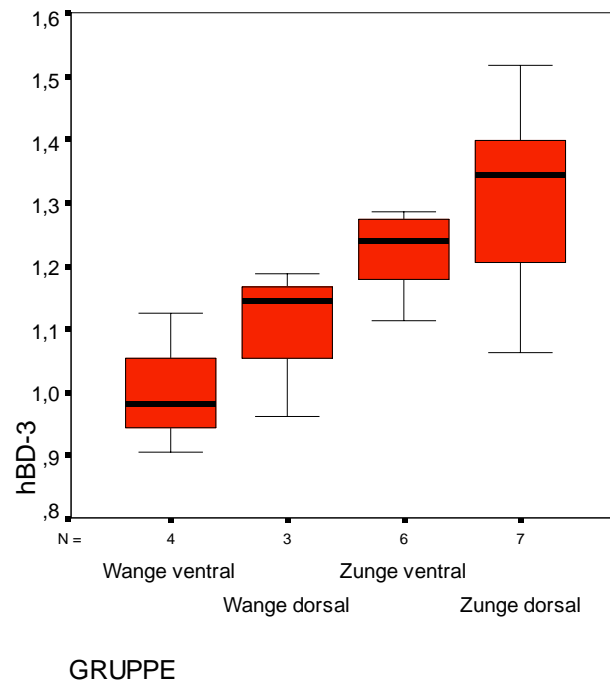


Abb. 17: Vergleich der relativen Expression der mRNA des humanen β -Defensin-3 mit den Proben untereinander. Es kann eine leicht höhere Expression der Zunge ventral und dorsal aufgezeigt werden.

3.4 Ergebnisübersicht

3.4.1 Gegenüberstellung der Ergebnisse der Immunhistologie und PCR

Tabelle 13: Gegenüberstellung der Ergebnisse der immunhistologischen Untersuchung und der gemittelten PCR-(RT)-normalisierten-Werte von **hBD-1**

	Immunreaktion in den hist. Präparaten	Quantitative Expression mit RT-PCR
Wange ventral	(+)	1,104
Wange dorsal	+	1,083
Zunge ventral	(+)	1,225
Zunge dorsal	+	1,161

++ = starke Immunreaktion; + = mittlere Immunreaktion; (+) = schwache Immunreaktion;
- = keine Immunreaktion

Tabelle 14: Gegenüberstellung der Ergebnisse der Immunhistologischen Untersuchung und der gemittelten PCR-(RT)-normalisierten-Werte von **hBD-2**

	Immunreaktion in den hist. Präparaten	Quantitative Expression mit RT-PCR
Wange ventral	++	1,023
Wange dorsal	++	1,006
Zunge ventral	++	1,189
Zunge dorsal	++	1,146

++ = starke Immunreaktion; + = mittlere Immunreaktion; (+) = schwache Immunreaktion;
- = keine Immunreaktion

Tabelle 15: Gegenüberstellung der Ergebnisse der Immunhistologischen Untersuchung und der gemittelten PCR-(RT)-normalisierten-Werte von **hBD-3**

	Immunreaktion in den hist. Präparaten	Quantitative Expression mit RT-PCR
Wange ventral	++	0,998
Wange dorsal	(+)	1,097
Zunge ventral	++	1,222
Zunge dorsal	++	1,304

++ = starke Immunreaktion; + = mittlere Immunreaktion; (+) = schwache Immunreaktion;
- = keine Immunreaktion

4. Diskussion

In dieser Arbeit wurden Gewebeproben aus der Mundschleimhaut im Bereich der Zunge und der Wange untersucht. Es handelt sich dabei um Proben von gesunden Geweben des Zungenrandes ventral und dorsal und der Innenwange ventral und dorsal. Die Entnahme wurde im Rahmen routinemäßig durchgeführter Eingriffe in der Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel nach vorherigem Einverständnis der Patienten vorgenommen.

Die Proben für die Untersuchung der Expression mit Hilfe von PCR wurden in drei Teile aufgeteilt und in Anlehnung an die Arbeiten Harder et al. und Dale et al. die Extraktion der gesamten RNA aus den Proben vorgenommen (Harder et al., 2000; Harder et al., 2001; Dale et al., 2001). Des Weiteren wurde ein Teil dieser Proben für die immunhistologische Untersuchung verwendet.

Besondere Aufmerksamkeit wurde auf die Expression der neu entdeckten antimikrobiellen Peptide hBD-1, -2, und -3 gerichtet. Hier interessierte im Speziellen der Vergleich zwischen mRNA- und Proteinexpression.

Der erste Teil, die quantitative Auswertung, wurde mit dem LightCycler[®] (Real-Time-PCR) durchgeführt (O'Neal et al., 1999; Bustin, 2000; Harder et al., 2001; Bustin, 2002; Krisanaprakornkit et al., 2002; Lehmann et al., 2002; Vandesompele et al., 2002). Es konnten mit dem LightCycler[®] sehr kleine Mengen von cDNA-Fragmenten amplifiziert werden (Bustin, 2000; Bustin, 2002). Dadurch bestand die Möglichkeit, bei den Proben, bei denen mit dem klassischen Verfahren der RT-PCR kein Produkt amplifiziert werden konnte, nochmals den genauen Inhalt an cDNA der humanen β -Defensine zu bestimmen.

Bei Betrachtung der Methodik muss eine fehlerhafte RNA-Isolation oder ein Mangel an mRNA in Betracht gezogen werden. Die fehlerhafte RNA Extraktion kann man anhand der erfolgreich verlaufenden β -Aktin-PCR jedoch ausschließen. Hingegen kann die unterschiedliche Verteilung von mRNA dadurch zustande kommen, dass orales Gewebe zwar makroskopisch gesund erscheint, jedoch mikroskopisch eine Entzündungsreaktion vorherrscht, die wiederum eine Stimulation der Defensin-Expression und deren unterschiedliche Verteilung innerhalb einer Mundhöhle verursacht (O'Neal et al., 1999, Harder et al., 2001; Ong et al., 2002; Liu et al. 2003). Um dies zu kontrollieren wurden die Proben bei der mikroskopischen Untersuchung mit

Hämatoxylin-Eosin angefärbt. Von einem Kontakt des Epithels mit Bakterien, Viren oder Pilzen muss bei einer Untersuchung in vivo jedoch ausgegangen werden. Die Expression der mRNA von hBD-2 unterliegt dem Mechanismus der Stimulation (O'Neal et al., 1999; Harder et al., 2000; Krisanaprakornkit et al., 2000; Duits et al., 2002). Wurden die Zellen in einem Gewebe weder durch Bakterien noch durch deren Stoffwechselprodukte stimuliert, führte dies zu keiner Genaktivierung von hBD-2 oder -3 (O'Neal et al., 1999; Duits et al., 2002). Andere Untersuchungen zeigten, dass bei Stimulation gingivaler Zellen die Produktion und die damit verbundene Expression von hBD-2 und -3 rasch ansteigen kann (O'Neal et al., 1999; Harder et al., 2000; Duits et al., 2002; Krisanaprakornkit et al., 2002; Lehmann et al., 2002; Ong et al., 2002; Liu et al., 2003). In einer neueren Untersuchung wurde in klinisch und histologisch gesunden oralen Epithelien die mRNA-Expression humaner beta-Defensine beobachtet. In Untersuchungen der Expression von hBD-2 zeigte sich beispielsweise, dass auch in der klinisch und histologisch gesunden Gingiva ebenfalls die entsprechende Menge mRNA gefunden werden konnte (Dale, 2002; Dommisch et al., 2005). Womöglich reicht der Kontakt der Epithelien mit Mikroorganismen aus, um mRNA von hBD-2 zu exprimieren, ohne eine Entzündungsreaktion im Gewebe auszulösen. Im Gegensatz zu hBD-1 gehören hBD-2 und -3 zu den nicht konstitutiv exprimierten humanen β -Defensinen (Harder et al., 2001), wobei von hBD-1 bekannt ist, dass durch Stimulation nur eine geringfügig höhere Expression möglich ist (Lehmann et al., 2002).

Die einzelnen Proben dieser Arbeit entstammten jeweils von unterschiedlichen Individuen. In anderen Untersuchungen wurde bereits festgestellt, dass Unterschiede im Muster der Expression der mRNA der humanen β -Defensine von Individuum zu Individuum bestehen können (Dale, 2002; Jurevic et al., 2003). Man kann daher sagen, dass Differenzen in der Expression humaner β -Defensine unterschiedlicher Herkunft durchaus auftreten. Zusätzlich zu den interindividuellen Schwankungen der mRNA-Expression stellte die geringe Fallzahl eine weitere Einschränkung der statistischen Auswertung der Real-Time-PCR-Ergebnisse dar. Standardmäßig wurde für die Real-Time-PCR die Gelelektrophorese durchgeführt, um eine qualitative Kontrolle der Real-Time-PCR-Produkte durchzuführen. Die Produktgröße konnte jeweils an einem 100 Basenpaar-Längenstandard abgelesen werden. Bei der Fluoreszenzmessung des LightCyclers[®] wurden alle Produkte und Inhalte des Reagenzglases aufgezeichnet, an denen der Farbstoff SYBRGreen[®] (Roche Molecular Biochemicals) bindet. Dabei können allerdings auch entstandene Primerdimere ein SYBR-Green[®]-Fluoreszenzsignal abgeben, wenn das PCR-Produkt entweder fehlt oder nur in einem geringen Maße vorhanden ist (Bustin, 2002). Um möglichst alle PCR-

Produkte detektieren zu können, wurde die Gelelektrophorese daher an die Polymerasekettenreaktion angeschlossen. Im Gegensatz zur Standard-PCR, die lediglich die Endpunkte bestimmt, bietet die Real-Time-PCR die Möglichkeit, die enzymatische Reaktion kontinuierlich zu verfolgen. Das Ergebnis der quantitativen PCR wird als relative Expression angegeben, die sich wiederum aus einer Berechnung (s. 2.2.6) ergeben (Bustin, 2002; Vandesompele et al., 2002; Applied Biosystems, 2001; Liu und Saint, 2002; Gumbs et al., 2002; Ong et al., 2002). Eine weitere mögliche Fehlerquelle könnte der Farbstoff SYBRGreen[®] darstellen, da die Möglichkeit der Bindung an unspezifische PCR-Produkte neben dem gesuchten Produkt bestehen kann. Diese Problematik konnte jedoch bei der Auswertung ausgeschlossen werden, da im Anschluß an jede PCR eine Gelelektrophorese durchgeführt wurde (s. Ergebnisse, Abb.4).

Es wurde in dieser Studie Biopsien der gesunden Innenwange und der gesunden Zunge untersucht. Dabei wurde unterschieden, aus welcher Lokalisation die jeweiligen Biopsate stammten. Es ergaben sich hier für die jeweiligen Gewebe zwei Gruppen. Auf Höhe der ersten Molaren erfolgte eine Teilung der anatomischen Strukturen in einen ventralen und einen dorsalen Abschnitt. Die entsprechenden Gruppen wurden jeweils mit Hilfe der quantitativen Real-Time-PCR und immunhistochemischer Färbemethoden ausgewertet.

Im Rahmen der quantitativen Bestimmung der mRNA-Expression wurden die Gene für β -Aktin, hBD-1, hBD-2 und hBD-3 berücksichtigt.

Zunächst wurde die Genexpression von β -Aktin ermittelt. Bei β -Aktin handelt es sich um ein Protein, das als Bestandteil des Zytoskeletts in nahezu jeder Zelle gleich expremiert wird (Bustin, 2002). Daher stellte die Ermittlung der mRNA-Expression von β -Aktin einerseits eine gute Kontrolle für die zuvor durchgeführte reverse Transkription und andererseits eine Möglichkeit zur Normalisierung der Real-Time-PCR-Ergebnisse dar. β -Aktin wird aufgrund dieser Eigenschaften auch als Housekeeping-Gen bezeichnet (Bustin, 2002). Die Normalisierung über die Genexpression von β -Aktin ermöglicht es, für alle weiteren Gene eine annähernde cDNA-Menge zu ermitteln und diese untereinander damit zu relativieren. Die Ermittlung der sog. relativen Expression (Normalisierung) erfolgte über eine Berechnung, die unter 2.2.6 beschrieben wurde. In der vorliegenden Studie konnte in allen untersuchten Biopsien die mRNA-Expression von β -Aktin nachgewiesen werden.

Humane β -Defensine sind neu entdeckte antimikrobielle Peptide, während Calprotectin und Lysozym seit längerem bekannt sind (Imoto, 2003). Daher wurde in der weiteren molekularbiologischen Auswertung die mRNA-Expression der humanen beta-Defensine-1,-2, und -3 näher untersucht. Die mRNA-Expression von hBD-1, -2 und -3 konnte in beiden Gruppen sowohl in den Innenwangenbiopsien, als auch in den Zungenbiopsien nachgewiesen werden (vgl. Tabelle 9-11). Diese Ergebnisse decken sich mit denen aus der Literatur bereits bekannten Daten (Dale, 2002; Dunsche et al., 2001, 2002). Bislang unbekannt ist die topographische Verteilung humaner β -Defensine in der Mundhöhle. Die vorliegende Untersuchung zeigte ein differentielles mRNA-Expressionsmuster der untersuchten antimikrobiellen Peptide, sowohl in dem Gewebe der Innenwange als auch in dem der Zunge.

In den Biopsien aus den ventralen Bereichen der Innenwange zeigte sich eine tendenziell höhere Genexpression von hBD-1 im Vergleich zu hBD-3. Vergleichbar waren die mRNA-Expressionsprofile von hBD-1 und hBD-2 in dieser Gruppe. Ein Vergleich der Genexpression von hBD-1, -2 und -3 zeigte in der Gruppe der dorsalen Innenwangenbiopsien keine signifikanten Unterschiede.

Die Gewebeproben aus den ventralen Bereichen der Zunge ließen keine signifikanten Unterschiede in der mRNA-Expression der drei untersuchten beta-Defensine erkennen. In den Proben aus der dorsalen Zunge konnte eine signifikant höhere Expression der mRNA von hBD-3 im Vergleich zu hBD-2 dokumentiert werden. Der Vergleich der Genexpression von hBD-1 und hBD-3 zeigte zwar keine statistische Auffälligkeit, jedoch in Gegenüberstellung beider Medianwerte könnte ebenfalls eine tendenziell höhere RNA-Expression von hBD-3 geschlussfolgert werden.

Die Ergebnisse zeigten Unterschiede in der Lokalisation der Genexpression humaner β -Defensine sowohl innerhalb eines Gewebes als auch in den verschiedenen Geweben untereinander. So zeigte sich eine höhere mRNA-Expression von hBD-1 in der ventralen Innenwange und von hBD-3 in der dorsalen Zunge. Insgesamt jedoch konnte eine tendenziell höhere Genexpression der untersuchten humanen beta-Defensine in den Biopsien aus der Zunge im Vergleich zu denen aus der Innenwange ermittelt werden (vgl. Tabelle 9-11). Dass antimikrobielle Peptide differentielle Konzentrationen in unterschiedlichen Lokalisationen aufzeigen können, konnte jüngstens für ein weiteres neu entdecktes antimikrobielles Peptid, das Psoriasin gezeigt werden. Hier wurden die unterschiedlichen Lokalisationszentren für Psoriasin

in der gesamten Haut ermittelt (Harder und Schröder, 2005). In Addition dazu zeigten die Ergebnisse der Real-Time-PCR, dass insgesamt in dem Gewebe der Zunge eine höhere mRNA-Expression der untersuchten humanen β -Defensine im Vergleich zu den Geweben der Innenwange vorlag.

Das humane β -Defensin-2 zeigte in keiner der untersuchten Gruppen Auffälligkeiten in Hinblick ein Mehr- bzw. Mindereexpression. Die Genregulation von hBD-2 unterliegt offenbar der Induktion durch pathogene Bakterien bzw. deren Stoffwechselprodukten wie bereits in Zellkulturexperimenten ermittelt wurde (Krisanaprakornkrit et al., 2002).

Untersuchungen an Gewebebiopsien der gesunden und erkrankten befestigten Gingiva konnte eine höhere Genexpression von hBD-2 in dem Stadium der Gingivitis im Vergleich zu hBD-1 und -3 zeigen. In der gesunden befestigten Gingiva war die mRNA-Expression der humanen β -Defensine-1, -2 und -3 vergleichbar (Dommisch et al., 2005)

Im zweiten Teil dieser Studie wurden die 26 Proben histologisch und immunhistologisch untersucht. Die Immunhistologie stellt eine weitere Methode dar, eine Immunreaktion im Gewebe aufzuzeigen. Als Nachweismethode wurde die Avidin-Biotin-Komplex-Methode verwendet (Noll und Schaub-Kuhnen, 2000). Der Vorteil dieser Methode ist, dass der immunologische Nachweis ca. 4-8-fach stärker ist, als bei der PAP (Peroxidase-Anti-Peroxidase)- und APAAP (Alkalische Phosphatase-Anti-Alkalische Phosphatase) -Methode. Nachteil ist jedoch zum einen, dass darauf geachtet werden muss, falls endogenes Biotin im Gewebe ist, dieses zu blockieren, da es sonst unspezifische Bindungen herbeiführen kann und Hintergrundreaktionen verursacht, zum anderen, dass keine Signalverstärkung durch Wiederholung wie bei PAP- oder APAAP-Methoden möglich ist (Noll und Schaub-Kuhnen, 2000).

Ein Teil der histologischen Proben wurde direkt nach der Entnahme eingefroren, um eine Autolyse des Gewebes zu vermeiden. Der Vorteil ist, dass die enzymatische Demaskierung entfällt, da es durch die Fixierung zu keiner Vernetzung und somit zu keiner Demaskierung der Antigenstruktur kommt. Nachteil ist die schlechtere Morphologie der Schnitte gegenüber den Paraffinschnitten wie Chromolyse oder Schädigung der Zellmembran. Zudem kommt, dass die Handhabung schwieriger ist und damit die Wahrscheinlichkeit, Präparate zu zerstören, steigt. Immunhistochemie mit vielen Waschschrritten kann zudem das Gewebe schädigen (Noll und Schaub-Kuhnen, 2000).

Der zweite Teil der Proben für die histologische Untersuchung wurde formalinbasierend fixiert und in Paraffin eingebettet. Vorteil dieses Fixatives ist die gute Durchdringungsfähigkeit und, dass es vom Gewebe gut vertragen wird, so dass die morphologischen Details besser bewahrt bleiben. Es kann jedoch auch während der Fixierung und der nachfolgenden Paraffineinbettung zu Schrumpfungen oder Verzerrungen des Gewebes kommen. In dieser Studie wurde für hBD-3 ein monoklonaler Antikörper am Paraffinschnitt (formalinfixiertes, paraffineingebettetes Präparat) eingesetzt, was dazu geführt haben kann, dass die immunhistologische Färbung im Vergleich zu hBD-1 und -2 etwas schwächer ausfiel. Bei dieser Kombination kann die Paraffineinbettung oder das Aufziehen und Trocknen der Paraffinschnitte das hitzelabile Antigen teilweise zerstören (Boenisch et al., 2003). Der Vorteil eines monoklonalen Antikörpers ist, dass er nur einen Epitop eines Antigens erkennt und daher sehr spezifisch reagiert und daher Kreuzreaktionen oder störende Hintergrundfärbungen äußerst selten auftreten (Noll und Schaub-Kuhnen, 2000).

Das Ergebnis der Immunhistologie zeigt eine leicht stärkere Immunreaktion von hBD-1 in den Schnitten der dorsalen Wange bzw. dorsalen Zunge im Vergleich zu den entsprechenden Schnitten aus den ventralen Arealen. Für das humane β -Defensin-2 und -3 (mit Ausnahme der Schnitte aus der dorsalen Wange) konnte in allen untersuchten Schnitten eine vergleichbar intensive Immunreaktion dokumentiert werden.

Die Färbung zeigte sich sowohl in den zytoplasmatischen Zellgrenzen, verteilt im Zytoplasma als auch nukleär im Bereich der Zellkerne des Epithels. In den immunhistologischen Präparaten der Wange dorsal und Zunge ventral mit hBD-2 wurde besonders der Bereich der Basallamina stark angefärbt.

Lysozym zeigte in der Wange, im Vergleich zur Zunge eine etwas schwächere Reaktion. Calprotectin konnte insgesamt, bis auf die Wange dorsal, nur sehr schwach dargestellt werden.

Die immunhistochemische Untersuchung ist eine zusätzliche Möglichkeit der Darstellung antimikrobieller Peptide. Es konnte nicht nur die mRNA-Expression, sondern auch die Proteinexpression für alle untersuchten antimikrobiellen Peptide in den einzelnen Gewebegruppen nachgewiesen werden. Der immunhistochemische Nachweis wurde bereits in einigen vorherigen Studien genutzt (Sawasaki et al., 2002; Dale et al., 2001).

Ein direkter Vergleich der Ergebnisse der Expression mittels Real-Time-PCR mit den Ergebnissen der immunhistologischen Untersuchung kann nicht aufgestellt werden, da bei der RT-PCR die mRNA nachgewiesen wird und bei der histologischen Untersuchung das Peptid.

Betrachtet man speziell die *Candida*-assoziierten Mundschleimhauterkrankungen, fällt die spezifische topographische Verteilung dieser Erkrankungen auf. Bei *Candidainfektionen* in der Mundschleimhaut lassen sich verschiedene klinische Formen unterscheiden, wie akute pseudomembranöse *Candidainfektion*, die sich durch scharf abgegrenzte, weißliche Pseudomembranen, die nach Abstreifung auf einem rötlichen Grund liegen, darstellt und die akute atrophische *Candidainfektion*, die sich in der Mundschleimhaut als atrophisch und rötlich entzündet zeigt. Diese *Candidainfektion* manifestiert sich zumeist auf der Zunge und ist häufig bei einer Antibiotikatherapie zu beobachten. Es stellt sich nun die Frage, ob die Antibiotikatherapie eventuell Einfluss auf die Produktion der körpereigenen antimikrobiellen Peptide nimmt. In einer weiteren Studie könnte die quantitative Expression von hBD-1 bis -3 bei einer *Candidainfektion* auf der Zunge untersucht werden, um dies zu vergleichen. Des Weiteren gibt es die chronische hyperplastische *Candidainfektion*, die durch eine persistierende, derbe unregelmäßig begrenzte weiße Plaque im vorderen Bereich der Wangenschleimhaut charakterisiert ist.

Es konnte in dieser Studie dargelegt werden, dass sowohl Calprotectin und Lysozym, als auch hBD-1 bis -3 weniger im Bereich der Wange exprimiert wurden. Bei der chronischen atrophischen *Candidainfektion*, die zumeist bei Zahnprothesenträgern, unterhalb der Kunststoff-Prothesensätteln auftritt, sind die hellen- oder dunkelroten Verfärbungen und atrophischen Areale auf die Kontaktstellen begrenzt. Hier stellt sich die Frage, ob die Produktion der Peptide durch Prothesendruck oder Mangel an Speichel beeinflusst werden kann. Dale zeigte 2002, dass das Epithel eine besondere Rolle für die parodontale Gesundheit spielt und die Barrierefunktion, die Produktion antimikrobieller Peptide und die Expression von Chemokinen und Zytokinen die Grundpfeiler der epithelialen Abwehrmechanismen darstellt (Dale, 2002). Die Cheilitis angularis (Perleche) ist nicht immer durch eine *Candidainfektion* bedingt. Es ist jedoch ihre häufigste Ursache. Sie zeigt sich durch krustig belegte Rhagaden und entzündlichem Randsaum im Mundwinkel. Bei Erwachsenen ist das Auftreten einer *Candidainfektion* ein ernstzunehmender Hinweis auf einen zellulären Immundefekt (Jung und Moll, 2003; Sherman et al., 2002; Jurevic et al., 2003). Wie in der Einleitung beschrieben, stehen sowohl hBD-1 als auch hBD-2 in Verbindung mit dem sekundären Immunsystem. Es stellt sich die Frage, ob ein Immundefekt die

Produktion dieser Defensine in dem Maße beeinflussen kann, dass es schneller zu einer Candidainfektion kommt.

Als letztes ist die Glossitis rhombica mediana zu nennen, die sich durch eine im hinteren Drittel der Zunge rhombische gerötete Zone mit Verlust der Papillen darstellt (Sterry und Merk, 1992). Im dorsalen Bereich der Zunge ergab diese Studie eine geringe Expression von hBD-1 und hBD-2 im Vergleich zur Zunge ventral. hBD-3 hingegen zeigte eine höhere Expression im dorsalen Bereich der Zunge.

Die meisten humanpathogenen Hefepilze gehören der Gattung der *Candida* an. Von besonderer pathologischer Bedeutung ist *C. albicans*. Der Pilz kommt physiologisch in geringer Anzahl im Magen-Darm-Trakt und auch in der Vagina vor. Die Haut sowie der Bronchialtrakt sind unter Normalbedingungen frei von *Candida*. Jedoch auch *C. stellatoidea*, *tropicalis* und *parapsilosis* können pathologische Veränderungen auslösen (Sterry und Merk., 1992).

Durch zahlreiche Faktoren, die durch Veränderungen im Wirt ausgelöst werden, kann sich das Wachstumsverhalten von *Candida*arten ändern und Krankheitserscheinungen auslösen (Sterry und Merk, 1992).

Die Glossitis rhombica mediana kann als lokalisierte Form der erythematösen *Candidiasis* aufgefasst werden und galt früher als entwicklungsbedingte Anomalie. Sie ist ein rhombischer oder ovaler, 1,5 - 4 cm langer und 0,5 – 1 cm breiter rötlicher oder weißlicher Herd in der Mitte des hinteren Zungenrückens. Die Oberfläche ist eingesunken oder erhaben, verrukös und tumorartig. Histologisch handelt es sich hierbei um ein Hämolympfangiom mit Entzündungsreaktion. Sie ist das Ergebnis einer lokalisierten chronischen *Candidainfektion*. Lokale Faktoren wie Tabakgenuss und das Tragen von Prothesen können die lokalisierte Proliferation von *C. albicans* begünstigen (Reichart et al., 2002). Wird durch Tabakgenuss oder Alkoholabusus die Produktion der antimikrobiellen Peptide beeinflusst?

In weiteren Studien konnte bereits eine verminderte Expression von β -Defensinen bei tumorös entarteten Epithelien aufgezeigt werden (Donald et al., 2003; Sørensen et al., 2003)

Die Cheilitis ist eine Mundschleimhautentzündung, die man unterteilen kann in die Cheilitis abrasiva praecancerosa, die sich durch eine hartnäckige persistierende erosive Veränderung an der Unterlippe, bei meist älteren Männern, charakterisiert; die Cheilitis actinica, die eine entzündliche Anschwellung der Unterlippe mit Bläschen, Erosionen, Krusten und Schuppen bedeutet; die Cheilitis exfoliatae, die sich durch eine hochrote, schuppige, krustöse und geschwollene Lippe auszeichnet; die Cheilitis glandularis apostematosa, entstehend aus der

Cheilitis glandularis simplex nach Sekundärinfektion, als chronisch verlaufende Abszedierung und Ulzeration mit Schwellung der Lippen, die Cheilitis glandularis simplex, als stecknadelkopfgroße, pupurrote, papulös angeschwollene Schleim- und Speicheldrüsen, die Cheilitis granulomatosa mit anfänglicher vorübergehender, aber später bleibender Schwellung der Lippen, besonders der Oberlippen, die Cheilitis plasmacellularis, welche sich durch eine Plasmazelleninfiltration mit lividrotem, lackartigem Glanz an einer Lippe auszeichnet und die Cheilitis vulgaris, die sich durch aufgesprungene Lippen darstellt.

In den meisten Fällen und vor allem bei Zahnprothesenträgern ist die Cheilitis angularis *candida*-assoziiert (Warnakulasuriya et al., 1991).

Es konnte in dieser experimentellen Studie gezeigt werden, dass die humanen β -Defensine 1-3 als auch Calprotectin und Lysozym im Bereich der ventralen Mundschleimhaut und Zunge als auch im dorsalen Bereich der Mundschleimhaut und Zunge vertreten sind. Mit Hilfe der Real-Time-PCR konnte ein quantitativer Unterschied im Vergleich der Zungenschleimhaut zur Wangenschleimhaut dargestellt werden. Die Untersuchung von Lysozym und Calprotectin in den Proben mittels Immunhistologie, ergab ebenfalls eine stärkere Reaktion von Lysozym im Bereich der Zunge. Calprotectin reagierte dagegen nur sehr schwach.

Aufgrund der geringen Fallzahl kann lediglich eine Tendenz festgestellt werden und es lassen sich keine direkten Rückschlüsse auf die topographische Verteilung ziehen, da es keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Proben gab.

Es ergeben sich aus dieser Studie wieder viele neue Fragen, die in zukünftigen Studien vielleicht geklärt werden können. Im Ausblick auf zukünftige Untersuchungen wird es eine stetige Weiterentwicklung der Methoden zur genauen Bestimmung der antimikrobiellen Peptide in Epithelien geben.

5. Zusammenfassung

Humane β -Defensine sind neu entdeckte antimikrobielle Peptide, die in den Epithelien exprimiert werden. An der menschlichen Mundschleimhaut treten verschiedene Erkrankungen in Erscheinung. Speziell *Candida*-assoziierte Erkrankungen haben eine unterschiedliche lokale Verteilung in der Mundhöhle. Ziel dieser Untersuchung war es zu klären, ob ein Unterschied in der topographischen Expression antimikrobieller Peptide zu finden ist, was auf einen Zusammenhang mit dem lokalisierten Auftreten von Mundschleimhauterkrankungen hinweisen könnte.

In dem ersten Teil der Studie wurden 26 Proben (2 x 6 Innenwange ventral/dorsal, 2 x 7 Zunge ventral/dorsal) mittels Real-Time-PCR auf die quantitative mRNA Expression von hBD-1, -2 und -3 untersucht. Die Proben entstammten klinisch gesundem Mundschleimhautgewebe von 13 verschiedenen Patienten. In einem zweiten Untersuchungsteil wurde in denselben Proben hBD-1, -2 und -3, Calprotectin und Lysozym immunhistologisch mittels der Avidin-Biotin-Complex-Methode nachgewiesen.

Es konnte in allen Proben und immunhistologischen Präparaten eine Immunreaktion unterschiedlicher Intensität festgestellt werden. Beide Methoden zeigten, dass hBD-2 und -3 in der Zunge im Vergleich zur Wange etwas stärker exprimiert wurde, allerdings war durch die statistische Analyse der RT-PCR-Ergebnisse kein signifikanter Unterschied nachzuweisen. In Hinblick auf die *Candida*-Infektionen, wie z.B. die Cheilitis angularis, die vor allem im Bereich des Mundwinkels vorzufinden ist, wurde beobachtet, dass in Proben aus der ventralen Wange mit beiden Untersuchungsmethoden die geringste Expression aller untersuchten antimikrobiellen Peptide zu finden war.

Zusammenfassend konnte die vorliegende Studie keine signifikanten Unterschiede in der topographischen Verteilung der Expression humaner β -Defensine (hBD-1, -2, -3), Calprotectin und Lysozym an der Zunge und der Innenwange aufzeigen.

6. Literaturverzeichnis

APPLIED BIOSYSTEMS 2001. User Bulletin # 2. Roche Molecular Systems

BARCHER RL, GLUCK GJ, PEASE LR. Acidic precursor revealed in human eosinophil granules major basic protein cDNA. *Exp Med* 1988; 168: 1493-1498

BENSCH KW, RAIDA M, MÄGERT H-J, SCHULZ-KNAPPE P, FORSSMANN W-G. hBD-1: A novel beta-defensin from human plasma. *FEBS Lett* 1995; 368: 331-335

BISSEL J, JOLY S, JOHNSON GK, ORGAN CC, DAWSON D, McCRAY PB Jr, GUTHMILLER JM. Expression of beta-defensins in gingival health and in periodontal disease. *J Oral Pathol Med* 2004; 33: 278-285

BÖCKER W, DENK H, HEITZ PU. *Pathologie*. München: Urban und Fischer Verlag 2001; 17-18

BOENISCH TH, FARMILO AJ, STEAD RH. *Immunochemische Färbemethoden, Färbemethoden-Detektionssysteme*. 3. Auflage. Dako Cytomation GmbH. 2003

BOMAN, HG. Peptide antibiotics and their role in innate immunity. *Ann Rev Immunol* 1995; 13: 61-92

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

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

DALE BA. Periodontal epithelium: a newly recognized role in health and disease. *Periodontology* 2002; 30: 70-78

DALE BA, KIMBALL JR, KRISANAPARKORNKIT S, ROBERTS F, ROBINOVITCH M, O'NEAL R, VALORE EV, GANZ T, ANDERSON GM, WEINBERG A. Localized antimicrobial peptide expression in human gingiva. *J Periodont Res* 2001; 36: 285-294

DALE BA, KRISANAPRAKORNKIT S. Defensin antimicrobial peptides in the oral cavity (Review article) *J Oral Pathol Med* 2001; 30: 321-327

DIAMOND G, RUSSEL JP, BEVINS CL. Inducible expression of an antibiotic peptide genes in lipopolysaccharide-challenged tracheal epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 5156-5160

DIAMOND G, KAISER V, RHODES J, RUSSEL JP, BEVINS CL. Transcriptional regulation of beta-defensin gene expression in tracheal cells. *Infect Immun* 2000; 68: 113-119

DONALD CD, SUN CQ, LIM SD, MACOSKA J, COHAN C, AMIN MB, YOUNG AN, GANZ TA, MARSHALL FF, PETROS JA. Cancer-specific loss of β -defensin-1 in renal and prostatic carcinomas. *Lab Invest* 2003; 83: 501-505

DOMMISCH H, WINTER J, AÇIL Y, DUNSCHE A, TIEMANN M, JEPSEN S. Human beta-defensin (hBD-1, -2) expression in dental pulp. *Oral Microbiol Immunol* 2005; 20: 163-166

DOMMISCH H, AÇIL Y, DUNSCHE A, WINTER J, JEPSEN S. Differential gene expression of human beta-defensins (hBD-1, -2, -3) in inflammatory gingival diseases. *Oral Microbiol Immunol* 2005; 20: 186-190.

DUITS LA, RADEMAKER M, RAVENSBERGEN B, VAN STERKENBURG MAJA, VAN STRIJEN E, HIEMSTRA PS, NIBBERING PH. Inhibition of hBD-3, but not hBD-1 and hBD-2, mRNA expression by corticosteroids. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 280: 522-525

DUITS LA, RAVENSBERGEN B, RADEMAKER M, HIEMSTRA PS, NIBBERING PH. Expression of β -defensin 1 and 2 mRNA by human monocytes, macrophages and dendritic cells. *Immunology* 2002; 106: 517-525

DUNSCHE A., AÇIL Y, SIEBERT R, HARDER J, SCHRÖDER JM, JEPSEN S. Expression profile of human defensins and antimicrobial proteins in oral tissues. *J Oral Pathol Med* 2001; 30: 154-158

DUNSCHE A., AÇIL Y, DOMMISCH H, SIEBERT R, SCHRÖDER JM, JEPSEN S. The novel human beta-defensin-3 is widely expressed in oral tissues. *Eur J Oral Sci* 2002; 109: 121-124

FANG XM, SHU Q, CHEN QX, BOOK M, SAHL HG, HOEFT A, STUBER F. Differential expression of alpha- and beta-defensins in human peripheral blood. *Eur J Clin Invest* 2003; 33: 82-87

GANZ T. Defensins and host defense. *Science* 1999; 286: 420-421.

GARCIA JR, JAUMANN F, SCHULZ S, KRAUSE A, RODRIGUEZ-JIMENEZ J, FORSSMANN U, ADERMANN K, KLUVER E, VOGELMEIER C, BECKER D, HEDRICH R, FORSSMANN WG, BALS R. Identification of a novel, multifunctional beta-defensin (human beta-defensin-3) with specific antimicrobial activity: its interaction with plasma membranes of *Xenopus* oocytes and the induction of macrophage chemoattraction. *Cell Tissue Res* 2001; 306: 257-264

GIBSON UE, HEID CA, WILLIAMS PM. A novel method for real time quantitative PCR. *Genome Research* 1996; 995-1001

GUMBS AA, BASSI C, MOORE PS, FALCONI M, FRIGERIO I, BARON A, PIEMONTI L, MODLIN I, SCARPA A. Overexpression of the Sm-like proto-oncogene in primary and metastatic pancreatic endocrine tumors. *J Pancreas* 2002; 3: 109-115.

HARDER J, BARTELS J, CHRISTOPHERS E, SCHRÖDER JM. A peptide antibiotic from human skin. *Nature* 1997; 387: 861

HARDER J, MEYER - HOFFERT U, TERAN LM, BARTELS J, SCHWICHTENBERG L, MAUNE S, SCHRÖDER JM. Mucoid pseudomonas aeruginosa, TNF- α and IL-1 β , but not IL-6 induce human β -defensin-3 in respiratory epithelia. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2000; 22: 714-721

HARDER J, BARTELS J, CHRISTOPHERS E, SCHRÖDER JM. Isolation and characterisation of human beta-defensin-3, a novel human inducible peptide antibiotic. *J Biol Chem* 2001; 276: 5707-5713

HARDER J, SCHRÖDER JM. Psoriatic scales: a promising source for the isolation of human skin-derived antimicrobial proteins. *J Leukoc Biol* 2005; 77: 476-86.

HIGUCHI R, FOCHLER C, DOLLINGER G, WATSON R. Kinetik PCR Analysis: Real -time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology* 1993; 11: 1026-1030

HOOVER DM, RAJASHANKAR KR, BLUMENTHAL R, PURI A, OPPENHEIM JJ, CHERTOV O, LUBKOWSKI J. The structure of human beta-defensin-2 shows evidence of higher order. *J Biol Chem* 2000; 275: 32911-32918

IMOTO T. Enjoying research on lysozymes for 42 years. *Yakugaku Zasshi* 2003; 123: 377-386

JUNG EG, MOLL I. *Dermatologie*. Stuttgart: Thieme-Verlag 2003; 106-107

JUNQUEIRA LC, CARNEIRO J, SCHIEBLER TH. *Zytologie, Histologie und Anatomie des Menschen*. Berlin-Heidelberg-New York: Springer-Verlag 1996; 466-470

JUREVIC RJ, BAI M, CHADWICK RB, WHITE TC, DALE BA. Single-nucleotide polymorphisms (SNPs) in human β -defensin 1: high-throughput SNP assays and association with candida carriage in type I diabetes and non diabetic controls. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 90-96

KAGAN BL, SELSTEDT ME, GANZ T, LEHRER RI. Antimicrobial defensin peptide from voltage-dependent ion-permeable channels in planar lipid bilayer membrans. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 210-214

KMILIAUSKIS MA, PALMEIRA P, ARSLANIAN C, PONTES GN, COSTA- CARVALHO BT, JACOB CM, CARNEIRO-SAMPAIO MM. Salivary lysozyme levels in patients with primary immunodeficiencies. *Allergol Immunopathol* 2005; 33: 65-68

KRISANAPRAKORNKIT S, KIMBALL JR, WEINBERG A, DARVEAU RP, BAINBRIDGE BW, DALE BA. Inducible expression of human β -defensin 2 by fusobacterium nucleatum in oral epithelial cells: multiple signaling pathways and role of commensal bacteria in innate immunity and epithelial barrier. *Infect and Immun* 2000; 68: 2907-2915

KRISANAPRAKORNKIT S, KIMBALL JR, DALE BA. Regulation of human β -defensin-2 in gingival epithelial cells: The involvement of mitogen-activated protein kinase pathways, but not the NF- κ B transkription factor family. *J Immunol* 2002; 168: 316-324

LEHMANN J, RETZ M, HARDER J, KRAMS M, KELLNER U, HARTMANN J, HOHGRÄWE K, RAFFENBERG U, GERBER M, LOCH T, WEICHERT-JAKOBSEN K, STÖCKLE M. Expression of human beta-defensins 1 and 2 in kidneys with chronic bacterial infection. *BMC Infectious Dis* 2002; 2: 20

LEHRER RI, BARTON A, DAKER KA, HARWIG SSI, GANZ T, SELSTED ME. Interaction of human defensin with E. coli: Mechanism of bactericidal activity. *Clin Invest* 1988; 81: 1829-1835

LEHRER RI, GANZ T, SZKLAREK D, SELSTED ME. Modulation of the in vitro candidacidal activity of human neutrophil defensins by target cell metabolism and divalent cations. *Clin Invest* 1988; 81: 1829-35

LEHRER RI, LICHTENSTEIN AI, GANZ T. Defensins: Antimicrobial and cytotoxic peptides of mammalian cells. *Annu Rev Immunol* 1993; 11: 105-128

LEONOVA L, KOKRYAKOV VN, ALESHINA G, HONG T, NGUYEN T, ZHAO C, WARING AJ, LEHRER RI. Circular minidefensins and posttranslational generation of molecular diversity. *J Leukoc Biol.* 2001; 70: 461-464

LEWIN B. Molekularbiologie der Gene. Heidelberg-München: Spektrum-Akademischer-Verlag 2002; 509-511

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

LIU W, SAINT DA. Validation of quantitative method for real-time PCR kinetics. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 294: 347-353

LUGERING N, STOLL R, KUCHARZIK T, SCHMID KW, ROHLMANN G, BURMEISTER G, SORG C, DOMSCKE W. Immunohistochemical distribution and serum levels of the Ca(2+)-binding proteins MRP8, MRP14 and their heterodimeric form MRP8/14 in Crohn`s disease. *Digestion* 1995; 5: 406-414

MEYER JE, HARDER J, GOROGH T, WEISE JB, SCHUBERT S, JANSSEN D, MAUNE S. Human beta-defensin-2 in oral cancer with opportunistic Candida infection. *Anticancer Res* 2004; 24: 1025-1030

MICHAELSON D, RAYNER J, COUTO M, GANZ T. Cationic defensins arise from charge-neutralized propeptides: a mechanism for avoiding leukocyte autotoxicity? *J Leukoc Biol* 1992; 51: 634-639

MIYZAKI T, FUJIKI T, INOUE Y, TAKANO K. Immunoelectron microscopic identification of lysozyme-expressing cells in human labial salivary glands. *Arch Histol Cytol* 1998; 61: 199-214

MÖRSKY P. Detection of lysozyme and alpha-2-macroglobulin-lysozyme complexes by immunoblotting. *Clin Chim Acta* 1988; 178: 327-336

NEWTON CR, GRAHAM A. 1994 PCR. Spektrum Akademischer Verlag

NICOLAS P, MOR A. Peptides as weapons against microorganism in the chemical defense system of vertebrates. *Annu Rev Microbiol* 1995; 94: 277-304

NISAPAKULTORN K, ROSS K F, HERZBERG M C. Calprotectin expression inhibits binding to mucosal epithelial cells. *Infect Immun* 2001; 69: 3692-3696

NISHIMURA M, ABIKO Y, KUSANO K, YAMAZAKI M, SAITOH M, MIZOGUCHI I, JINBU Y, NOGUCHI T, KAKU T. *Med Electron Microsc* 2003; 36: 94-97

NOLL S, SCHAUB-KUHNEN S. *Praxis der Immunhistochemie*. München-Jena: Urban und Fischer Verlag 2000; 17-18

O`NEIL DA, PORTER EM, ELEWAUT D, ANDERSON GM, ECKMANN L, GANZ T, KAGNOFF MF. Expression and regulation of the human beta-defensins hBD-1 and hBD-2 in intestinal epithelium. *J Immunol* 1999; 163: 6718-6724

ONG PY, OHTAKE T, BRANDT C, STRICKLAND I, BOGUNIEWICZ M, GANZ T, GALLO RL, LEUNG DYM. Endogenous antimicrobial peptides and infections in atopic dermatitis. *N Engl J Med* 2002; 347: 1151-1160

OREN A, GANZ T, LIU L, MEERLOO T. In human epidermis, β -defensin 2 is packaged in lamellar bodies. *Exp Mol Pathol* 2003; 74: 180-182

PHADKE SH M, DESLOUCHES B, HILEMAN S E, MONTELARO R C , WIESENFELD H C, MIETZNER T A. Antimicrobial peptides in mucosal secretions: the importance of local secretions in mitigating infection. *J Nutr* 2005; 135: 1289-1293

PILERI SA, GROGAN TM, HARRIS NL, BANKS P. Tumors of histiocytes and accessory dendritic cells: an immunohistochemical approach to classification from the international lymphoma study group based on 61 cases. *Histopathology* 2002; 41: 1-29.

REICHART PA, HAUSAMEN J-E, BECKER J, NEUKAM F W, SCHLIEPKAKE H, SCHMELZEISEN R. *Zahn-, Mund- und Kieferkrankheiten*. Band II. Quintessenz Verlags-GmbH 2002; 162-167

RUBIO CA. Colorectal adenomas produce lysozyme. *Rev Anticancer Res* 2003; 23: 5165-5171

SAMBROOK J, FRITSCH EF, MANIATIS T. *Molecular Cloning – A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y. 1989

SAWASAKI K, MIZUKAWA N, YAMAAI T, FUKUNAGA J, SUGAHARA T. Immunohistochemical study on expression of alpha-defensin and beta-defensin-2 in human buccal epithelia with candidiasis. *Oral Dis* 2002; 8: 37-41

SCHIEBLER TH, SCHMIDT W, ZILLES K. *Zytologie, Histologie, Entwicklungsgeschichte, makroskopische und mikroskopische Anatomie des Menschen*. Berlin-Heidelberg-New York: Springer-Verlag 1997; 39-50

SCHMID KW, LUGERING N, STOLL R, BRINKBAUMER P, WINDE G, DOMSCHKE W, BOCKER W, SORG C. Immunohistochemical demonstration of the calcium-binding proteins MRP8 and MRP14 and their heterodimer (27E10 antigen) in Crohn`s disease. *Hum Path* 1995; 26: 334-337.

SCHRÖDER JM. Antimikrobielle Peptide – Antibiotika der Zukunft? *MMP* 1999; 9: 270-276

SCHRÖDER JM, HARDER J. Human beta-defensin-2. *Int J Biochem Cell Biol* 1999; 163: 6718-6724

SCHROEDER HE. *Orale Strukturbiologie*. Stuttgart-New York: Thieme-Verlag 1992; 363-382

SCHUTTE BC, MITROS JP, BARTLETT JA; JESSE DW; JIA HP; WELSH MJ; CASAVANT THL, MCCRAY PB, Discovery of five conserved β -defensin gene clusters using a computational search strategy. *PNAS* 2002; 99: 2129-2133

SHERMAN RG, PRUSINSKI L, RAVENEL MC, JORALMON RA. Oral candidosis. *Quintessence Int* 2002; 33: 521-532

SØRENSEN OE, COWLAND JB, THEILGAARD-MÖNCH K, LIU L, GANZ T, BORREGAARD N. Wound healing and expression of antimicrobial peptides/polypeptides in human keratinocytes; a consequence of common growth factors. *J Immunol* 2003; 170: 5583-5589

STERRY W, MERK H. Checkliste der Dermatologie und Venerologie. Stuttgart-New York: Thieme-Verlag 1992; 79-80

TANIDA T, OKAMOTO T, OKAMOTO A, WANG H, HAMADA T, UETA E, OSAKI T. Decreased excretion of antimicrobial proteins and peptides in saliva of patients with oral candidiasis. *J Oral Pathol Med* 2003; 32: 586-594

TANG YQ, YUAN J, OSAPAY G, OSAPAY K, TRAN D, MILLER CJ, OUELLETTE AJ, SELSTED ME. A cyclic antimicrobial peptide produced in primate leukocytes by the ligation of two truncated alpha-defensins. *Science* 1999; 286: 498-502

VANDESOMPELE J, DE PRETER K, PATTYN F, POPPE B, VAN ROY N, DE PAEPE A, SPELEMAN F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by genomic averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology* 2002; 3: research 0034.1-0034-11

VANKEERBERGHEN A, NUYTTEN H, DIERICKX K, QUIRYNEN M, CASSIMAN JJ, CUPPENS H. Differential induction of human beta-defensin expression by periodontal commensals and pathogens in periodontal pocket epithelial cells. *J Periodont* 2005; 76: 1293-1303

VERES G, GIBES RA, SCHRER SE, CASKEY CT. The molecular basis of sparse for mouse mutation. *Science* 1987; 237: 415-417

WARNAKULASURIYA KA, SAMARANAYAKE LP, PEIRIS JS. Angular cheilitis in a group of adults: a clinical and microbiologic study. *J Oral Pathol Med* 1991; 20: 172-175

WITTWER CT, RIRIE KM, ANDREW RV, DAVID DA, GUNDRY RA, BALIS UJ. The Light-Cycler: a microvolume multisample fluorimeter with rapid temperature control. *Biotechnics* 1997; 22: 176-181

YANG D, CHERTOV O, BYKOVSKAIA SN, CHEN Q, BUFFO MJ, SHOGAN J, ANDERSON M, SCHRÖDER JM, WANG JM, HOWARD OM, OPPENHEIM JJ. Beta-defensins: linking innate and adaptive immunity through dendritic and T cell CCR6. *Science* 1999; 286: 525-528

YANG D, BIRAGYN A, KWAK LW, OPPENHEIM JJ. Mammalian defensins in immunity: more than just microbicidal. *Trends Immunol* 2002; 23: 291-296

7. Glossar

Abb.	=	Abbildung
AMV	=	Avian Myoblastosis Virus
APAAP	=	Alkalische Phosphatase-Anti-Alkalische Phosphatase
Aqua dest.	=	Aqua destillata
AS	=	Aminosäuren
<i>C. albicans</i>	=	<i>Candida albicans</i>
<i>C. stellatoidea</i>	=	<i>Candida stellatoidea</i>
<i>C. tropicalis</i>	=	<i>Candida tropicalis</i>
<i>C. parapsilosis</i>	=	<i>Candida parapsilosis</i>
cDNA	=	copy DNA (kopierte Desoxyribonukleinsäure)
cm ²	=	Quadratcentimeter
Ct	=	Threshold Cycle (Schwellenzyklus)
DEPC	=	Diethylpyrocarbonat
dNTP	=	Desoxynukleotidtriphosphat
dT	=	Desoxythyminbasen
DNA	=	Desoxyribonukleinsäure
<i>E. coli</i>	=	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	=	Ethylendiamintetraessigsäure
<i>F. nucleatum</i>	=	<i>Fusobacterium nucleatum</i>
g	=	Einheit der Erdbeschleunigung
GOI	=	Gene of interest (gesuchtes Gen)
hBD-1	=	humanes β -Defensin-1

hBD-2	=	humanes β -Defensin-2
hBD-3	=	humanes β -Defensin-3
HCl	=	Salzsäure
HKG	=	Housekeeping Gen (Haushaltsgen)
KCl	=	Kaliumchlorid
kDa	=	Kilodalton
K ₂ PO ₄	=	Kaliumphosphat
Konz.	=	Konzentration
Log	=	Logarithmus
M	=	Molarität
mM	=	Millimolar
mm	=	Millimeter
MgCl ₂	=	Magnesiumchlorid
min	=	Minute
ml	=	Milliliter
mRNA	=	messenger Ribonukleinsäure
n	=	Anzahl der untersuchten Proben
n.d.	=	nicht detektiert
nm	=	Nanometer
ng	=	Nanogramm
OD	=	Optische Dichte
PAP	=	Peroxidase-Anti-Peroxidase
<i>P. aeruginosa</i>	=	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PCR	=	Polymerasekettenreaktion

pH	=	Wert für die Konzentration an Wasserstoffionen
Pmol	=	Picomolar
Poly-A+	=	Polyadenylatschwanz der mRNA
R Rnasin	=	rekombinanter Ribonukleaseinhibitor
RNA	=	Ribonukleinsäure
RT	=	Reverse Transkription
RT-PCR	=	Reverse-Transkription – Polymerasekettenreaktion
<i>Staph. aureus</i>	=	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>Strep. pyogenes</i>	=	<i>Streptococcus pyogenes</i>
Taq	=	Thermus aquaticus
TBE	=	Tris – Borsäure – EDTA
TNF- α	=	Tumornekrosefaktor- α
UV	=	Ultraviolett
V	=	Volt
z.B.	=	zum Beispiel
μ g	=	Mikrogramm
μ l	=	Mikroliter
μ M	=	Mikromolar

8. Danksagung

Herrn Prof. Dr. Dr. S. Jepsen, M.S., Direktor der Poliklinik für Parodontologie, Zahnerhaltung und Präventive Zahnheilkunde im Universitätsklinikum Bonn, Herrn PD. Dr. Dr. (H) A. Dunsche, Direktor der Klinik für Mund- Kiefer- und Gesichtschirurgie am Städtischen Krankenhaus in Karlsruhe und Herrn Prof. Dr. Y. Açil, Leiter der wissenschaftlichen Laboratorien in der Klinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel, danke ich für die Bereitstellung des Themas und der finanziellen Mittel zur Durchführung aller Experimente.

Herrn Prof. Dr. Dr. F. Härle, Direktor der Klinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie, Universität Kiel, gilt mein Dank für die Möglichkeit die Experimente in den wissenschaftlichen Laboratorien seiner Klinik durchführen zu dürfen.

Herrn Dr. K. Tiemann und Herrn M. Weiß, Institut für Pathologie im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel, danke ich für die Hilfe bei den immunhistologischen Präparaten.

Herrn Dr. H. Dommisch und Dr. J. Winter, Poliklinik für Parodontologie, Zahnerhaltung und Präventive Zahnheilkunde (Direktor Prof. Dr. Dr. S. Jepsen) möchte ich herzlich für die Hilfe und Korrektur meiner Arbeit danken.

Herrn Prof. Dr. W. Götz und MTA I. Bay, Kieferorthopädische Abteilung der Zahnklinik Bonn danke ich für die freundlichen und kompetenten Ratschläge im Bereich der Immunhistologie.

Frau G. Otto (MTA) und Frau M. Herrmann (MTA) Universitätsklinikum Kiel, danke ich für ihre theoretische und praktische Unterstützung bei der Durchführung der Experimente.

Meinen Eltern, Dr. Dr. C. Verbeck und Dr. B. Verbeck, möchte ich für ihre großzügige Unterstützung in der Zeit meiner Ausbildung und meines Studiums danken.

Meinem Mann, B. Kamphuis, danke ich für seine große Geduld.