

Expressionsanalysen von beta-Defensinen und Interleukin-1
beta in der gesunden und pathologisch veränderten
Speicheldrüse

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

vorgelegt von
Sven Scharf

aus
Parchim

2008

Angefertigt mit der Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. Dr. S. Jepsen, M.S.
2. Gutachter: PD Dr. S. Lossdörfer

Tag der Mündlichen Prüfung: 19.Dezember 2007

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

1. Einleitung	10
1.1 Einführung	10
1.2 Defensine	10
1.2.1 Humane beta-Defensine	11
1.2.1.1 Humanes beta-Defensin-1	11
1.2.1.2 Humanes beta-Defensin-2	12
1.2.1.3 Humanes beta-Defensin-3	13
1.2.1.4 Antimikrobieller Mechanismus der Defensine	14
1.3 Antimikrobielle Proteine im Speichel und in der Speicheldrüse	15
1.4 Interleukin-1 beta im Speichel und in der Speicheldrüse	17
1.5 Untersuchtetes Gewebe	17
1.5.1 Gesunde Speicheldrüse	17
1.5.2 Ätiologie und Folgen von Entzündungen in der Speicheldrüse	19
1.5.3 Radiotherapeutische Irritationen der Speicheldrüse	19
1.5.4 Tumoren der Speicheldrüse	20
1.6 Fragestellungen und Ziele der Arbeit	21
2. Material und Methoden	23
2.1 Übersicht	23
2.2 Reagenzien und Materialien	23
2.3 Probengewinnung	23
2.4 Fixierung, Einbettung und Schnitthanfertigung	24
2.5 Färbemethoden	25
2.5.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung	25
2.5.2 Methode der immunhistochemischen Nachweisreaktion	27
2.5.3 Immunhistochemischer Nachweis humaner beta-Defensine (hBD-1,-2,-3) und Interleukin-1 beta (IL-1 beta)	28
2.6 Auswertung der Proben	31

2.6.1	Fotografische Dokumentation	31
2.6.2	Auswertung und semiquantitative Beschreibung der Expression von hBD-1, -2, -3 und IL-1 beta	31
2.6.3	Fotografische Bildparameter	32
2.6.4	Semiquantitative Bildanalyse	33
2.7	Statistische Auswertung der Messdaten	36

3. Ergebnisse **37**

3.1	Überblick	37
3.2	Histomorphologische Auswertung	37
3.2.1	Morphologischer Vergleich gesunder und bestrahlter Glandula submandibularis	37
3.2.2	Morphologischer Vergleich gesunder und entzündlich veränderter Glandula submandibularis	39
3.2.2.1	Vergleich gesunder Speicheldrüse und Sialolithiasis	39
3.2.2.2	Vergleich gesunder Speicheldrüse und chronische Sialadenitis	41
3.2.3	Morphologische Beschreibung von Speicheldrüsentumoren	41
3.2.3.1	Morphologische Beschreibung des Pleomorphen Adenoms	42
3.2.3.2	Morphologische Beschreibung des Adenoidzystischen Karzinoms	42
3.3	Expression humaner beta-Defensine	43
3.3.1	Expression des humanen beta-Defensin-1	43
3.3.1.1	Expression des humanen beta-Defensin-1 in gesunder Speicheldrüse	43
3.3.1.2	Expression des humanen beta-Defensin-1 in bestrahlter Speicheldrüse	44
3.3.1.3	Expression des humanen beta-Defensin-1 in entzündlich veränderter Speicheldrüse	45

3.3.1.4	Expression des humanen beta-Defensin-1 in Speicheldrüsentumoren	46
3.3.1.4.1	Expression des humanen beta-Defensin-1 im Pleomorphen Adenom	46
3.3.1.4.2	Expression des humanen beta-Defensin-1 im Adenoidzystischen Karzinom	47
3.3.1.5	Vergleich der Expression des humanen beta-Defensin-1 in gesunder, bestrahlter, entzündlich und tumorös veränderter Speicheldrüse	48
3.3.2	Expression des humanen beta-Defensin-2	49
3.3.2.1	Expression des humanen beta-Defensin-2 in gesunder Speicheldrüse	50
3.3.2.2	Expression des humanen beta-Defensin-2 in bestrahlter Speicheldrüse	50
3.3.2.3	Expression des humanen beta-Defensin-2 in entzündlich veränderter Speicheldrüse	52
3.3.2.4	Expression des humanen beta-Defensin-2 in Speicheldrüsentumoren	53
3.3.2.4.1	Expression des humanen beta-Defensin-2 im Pleomorphen Adenom	53
3.3.2.4.2	Expression des humanen beta-Defensin-2 im Adenoidzystischen Karzinom	54
3.3.2.5	Vergleich der Expression des humanen beta-Defensin-2 in gesunder, bestrahlter, entzündlich und tumorös veränderter Speicheldrüse	55
3.3.3	Expression des humanen beta-Defensin-3	56
3.3.3.1	Expression des humanen beta-Defensin-3 in gesunder Speicheldrüse	56
3.3.3.2	Expression des humanen beta-Defensin-3 in bestrahlter Speicheldrüse	57
3.3.3.3	Expression des humanen beta-Defensin-3 in entzündlich veränderter Speicheldrüse	58

3.3.3.4	Expression des humanen beta-Defensin-3 in Speicheldrüsentumoren	59
3.3.3.4.1	Expression des humanen beta-Defensin-3 im Pleomorphen Adenom	59
3.3.3.4.2	Expression des humanen beta-Defensin-3 im Adenoidzystischen Karzinom	60
3.3.3.5	Vergleich der Expression des humanen beta-Defensin-3 in gesunder, bestrahlter, entzündlich und tumorös veränderter Speicheldrüse	61
3.4	Expression von Interleukin-1 beta	63
3.4.1	Expression von Interleukin-1 beta in gesunder Speicheldrüse	63
3.4.2	Expression von Interleukin-1 beta in entzündeter Speicheldrüse	63
3.4.3	Expression von Interleukin-1 beta in bestrahlter Speicheldrüse	64
3.4.4	Vergleich der Expression von Interleukin-1 beta in gesunder, bestrahlter und entzündlich veränderter Speicheldrüse	64
4.	Diskussion	66
5.	Zusammenfassung	79
6.	Anhang	80
6.1	Darstellung der Einzelmesswerte des mittleren Grauwertes	80
6.1.1	Gesunde Speicheldrüse I	80
6.1.2	Gesunde Speicheldrüse II	81
6.1.3	Bestrahlte Speicheldrüse I	82
6.1.4	Bestrahlte Speicheldrüse II	84
6.2	Daten aus der deskriptiven Statistik	85

7. Literaturverzeichnis	86
8. Danksagung	102

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	=	Abbildung
abs.	=	absolut
α	=	alpha
AK	=	Antikörper
Aqua dest.	=	Aqua destilata
β	=	beta
C	=	Cytosin
° C	=	(Grad) Celsius
<i>E. coli</i>	=	<i>Escherichia coli</i>
et al.	=	und Mitarbeiter (et alii)
Fa.	=	Firma
g	=	Gramm
hBD-1	=	humanes beta-Defensin-1
hBD-2	=	humanes beta-Defensin-2
hBD-3	=	humanes beta-Defensin-3
IL-1 beta	=	Interleukin-1 beta
HE	=	Hämatoxylin-Eosin
K	=	Kelvin
M	=	Molar
mM	=	Millimolar
min	=	Minute
ml	=	Milliliter

n	=	„number“, Fallzahl
ng	=	Nanogramm
nm	=	Nanometer
p	=	Signifikanzbereich
pH	=	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
rel.	=	relativ
s	=	„second“, Sekunde
θ	=	theta
UV	=	Ultraviolett
vol. %	=	Volumenprozent
μg	=	Mikrogramm
μl	=	Mikroliter
μm	=	Mikrometer
μM	=	Mikromolar

1. Einleitung

1.1 Einführung

Die Oberflächen der Mundhöhle sind von einer Vielzahl verschiedenster Mikroorganismen besiedelt. Neben grampositiven und gramnegativen Bakterien gehören auch Pilze zur normalen Flora der Mundhöhle. Trotz dieser enormen Vielfalt an Mikroorganismen sind Infektionen und Erkrankungen der Mundschleimhaut selten. Dieses Phänomen kann dadurch erklärt werden, dass die Mundhöhle über ein effizientes Abwehrsystem verfügt. Auf der einen Seite bietet der epitheliale Verbund der Mundschleimhautzellen eine rigide physikalische Barriere, die dem Eindringen von Mikroorganismen suffizient entgegenwirkt. Auf der anderen Seite wird in der Mundhöhle eine so genannte chemische Barriere synthetisiert, die direkt antimikrobiell wirksam ist und das Wachstum von Mikroorganismen auf der Oberfläche der Mundschleimhaut kontrolliert. Diese chemische Barriere wird durch das Vorhandensein antimikrobieller Peptide mitbestimmt (Nicolas et al., 1995). Antimikrobielle Peptide werden zum angeborenen Immunsystem gezählt und weisen sich durch eine potente Wirkungsweise gegenüber Mikroorganismen aus (Ganz, 2003). Diese Peptide werden von Epithelzellen der Mundschleimhaut synthetisiert und sekretiert (Dale et al., 2001). Weiterhin konnten antimikrobielle Peptide in der Speichelflüssigkeit nachgewiesen werden (Cuida et al., 1995; Fox et al., 1987; Mathews et al., 1999). Die Kombination antimikrobieller Peptide der Epithelzellen und des Speichels bildet diese chemische Barriere aus.

1.2 Defensine

Defensine sind antimikrobielle Peptide, die als Teil des angeborenen Immunsystems entscheidend zur Aufrechterhaltung der Gesundheit beitragen (Lehrer, 2004). Diese zeigen eine effektive Wirkungsweise gegenüber Bakterien, einigen Viren und Pilzen (Ganz, 1999; Kumar et al., 2004; Nicolas und Mor, 1995; Rao, 1995; Schröder, 1999a). Defensine sind als Teil des angeborenen Immunsystems in den letzten Jahren in den Mittelpunkt des Forschungsinteresses gerückt. Diese neu beschriebenen Peptide konnten neben der antimikrobiellen Wirkungsweise auch mit Vorgängen der Wundheilung, Chemotaxis sowie Zellmigration aber auch mit dem programmierten Zelltod in Verbindung gebracht werden (Lehrer, 2004). Die Gruppe humaner Defensine

wird in drei Klassen unterteilt. Dazu gehören alpha-, beta- und theta-Defensine. Die Einteilung der ersten beiden Klassen in alpha- und beta-Defensine ist abhängig vom jeweiligen Zysteingehalt der Aminosäuresequenz und der entsprechenden intramolekularen Verknüpfung über Disulfidbrücken (Ganz, 1999). Die dritte Klasse der theta-Defensine entspricht einer Variante zweier alpha-Defensine, wobei durch alternative Spleißvorgänge schließlich ein zyklisches Peptid synthetisiert wird (Tang et al., 1999). Allen Defensinklassen konnte bislang ein ausgeprägtes antimikrobielles Spektrum gegen grampositive und gramnegative Bakterien, Mykobakterien, Spirochäten, Pilze und auch einige membranumgebene Viren nachgewiesen werden (Brogden, 2005; Harder et al., 2000; Harder et al., 2001; Lehrer et al., 1988; Lehrer et al., 1989; Lehrer et al., 1993; Sahl et al., 2005; Tang et al., 1999). Als Expressionsorte humaner Defensine wurden bislang die Epithelzellen der Haut und Schleimhaut, sowie Leukozyten und Odontoblasten der Zahnpulpa beschrieben (Dale und Krisanaprakornkit, 2001; Dommisch et al., 2005a; Fang et al., 2003; Ganz, 2003; Ganz und Lehrer, 1997; Oren et al., 2003; Schröder, 1999a).

1.2.1 Humane beta-Defensine

1.2.1.1 Humanes beta-Defensin-1

Das humane beta-Defensin-1 (hBD-1) konnte erstmals von Bensch und Mitarbeitern 1995 gezeigt werden. Dieses wurde aus dem Plasma von Patienten mit einer fortgeschrittenen Nierenerkrankung isoliert und den Epithelzellen des Urogenitaltraktes zugeordnet (Bensch et al., 1995). Das humane beta-Defensin-1 ist ein aus 36 Aminosäuren aufgebautes, basisches Peptid mit einem Molekulargewicht von 3,9 kDa (Schröder et al., 1999b). Es konnte gezeigt werden, dass das humane beta-Defensin-1 konstitutiv in epithelialen Geweben exprimiert wird (Harder et al., 1997; Krisanaprakornkit et al., 1998). Darüber hinaus wurde die mRNA Expression in Makrophagen, Monozyten und dendritischen Zellen beschrieben. Hier zeigte sich zudem, dass die Expression von hBD-1 durch Interferon-1 gamma in Monozyten stimuliert werden kann, während Makrophagen ebenfalls ein konstitutives Expressionsprofil für hBD-1 aufzeigten. Darüber hinaus konnten in dendritischen Zellen Unterschiede im Expressionsprofil von hBD-1 dokumentiert werden. Unausgereifte dendritische Zellen wiesen hierbei eine geringere mRNA Expression für hBD-1 im

Vergleich zu ausgereiften dendritischen Zellen auf (Duits et al., 2002). Neueste Studien berichten, dass hBD-1 zwar einerseits stimulierbar ist, andererseits aber die Genexpression im Rahmen von Entzündungsvorgängen herunterreguliert werden kann (Dommisch et al., 2007b; Islam et al., 2001).

1.2.1.2 Humanes beta-Defensin-2

Das humane beta-Defensin-2 (hBD-2) wurde 1997 von Harder und Mitarbeitern aus der menschlichen Haut von Psoriasispatienten isoliert (Harder et al., 1997). Im Vergleich zur konstitutiven Expression von hBD-1 zeigte sich für hBD-2 eine induzierbare Genexpression in den Epithelzellen der Haut und Mundschleimhaut (Harder et al., 1997; Krisanaprakornkit et al., 2000; Liu et al., 2002). Der Kontakt von Epithelzellen mit grampositiven oder gramnegativen Bakterien, Pilzen und proinflammatorischen Zytokinen wie Interleukin-1 oder Tumornekrosefaktor- α führt innerhalb weniger Stunden zu einer vermehrten Bildung von mRNA Transkriptionsprodukten (Dale et al., 2005; Lehrer, 2004; Liu et al., 2003; Sørensen et al., 2005). In gesunden Geweben zeigte sich hingegen nur eine sehr geringe basale Expression von hBD-2. Neben einer unterschiedlichen Regulierung in der Genexpression wurden verschiedene Wirksamkeiten der beta-Defensine beobachtet (Schröder et al., 2006). Eine verstärkte antimikrobielle Wirkung von hBD-2 konnte zum einen gegenüber gramnegativen Bakterien wie zum Beispiel *Pseudomonas aeruginosa* oder *Escherichia coli*, zum anderen gegenüber kariogenen Mikroorganismen wie *Streptococcus mutans* oder *Streptococcus sobrinus* nachgewiesen werden (Nishimura et al., 2004; Shiba et al., 2003). Darüber hinaus ließen In-vitro-Versuche mit synthetisch hergestelltem hBD-2 einen erhöhten antimikrobiellen Effekt gegenüber parodontalpathogenen Mikroorganismen wie *Actinobacillus actinomycetemcomitans* oder *Porphyromonas gingivalis* erkennen (Mineshiba et al., 2003). Eine verminderte Wirksamkeit zeigte sich gegenüber grampositiven Bakterien wie zum Beispiel *Staphylococcus aureus* (Harder et al., 1997). In der Haut des Menschen wurde das humane beta-Defensin-2 überwiegend in den suprabasalen, oberflächlichen Zellschichten des mehrschichtigen, verhornten Plattenepithels identifiziert. Dabei zeigten immunhistochemische Untersuchungen für hBD-2 ein ungleichmäßiges, fokales Expressionsmuster in vereinzelt Arealen des Stratum corneum der Epidermis (Ali et al., 2001). In-vitro-Versuche mit Kulturen von

Keratinocyten der Mundschleimhaut ließen einen Zusammenhang zwischen der Expression des humanen beta-Defensin-1 und -2 und dem Differenzierungsgrad von Keratinocyten erkennen. Weiterhin zeigte sich die mRNA im epithelialen Gewebe überwiegend im Stratum spinosum, wohingegen sich die Peptide hauptsächlich in den apikalen, höher differenzierten Zellschichten des Stratum granulosum bzw. corneum detektieren ließen (Dale und Krisanaprakornkit, 2001).

1.2.1.3 Humanes beta-Defensin-3

Im Rahmen von biochemischen Analysen der Haut von Psoriasispatienten konnte 2001 ein weiteres humanes beta-Defensin (hBD-3) isoliert werden, das sich im Gegensatz zu hBD-1 und -2 durch eine verstärkte antimikrobielle Wirksamkeit gegenüber grampositiven Bakterien auszeichnet (Harder et al., 2001). Dieses Defensin zeigt allgemein ein breiteres Wirkspektrum gegenüber grampositiven bzw. gramnegativen Bakterien und Pilzen, einschließlich Methicillin resistenten Bakterienstämmen von *Staphylococcus aureus* (MRSA) und Vancomycin resistente Stämme von *Enterococcus faecium* (Harder et al., 2001; Maisetta et al., 2005). Die mRNA Expression von hBD-3 konnte in den Epithelzellen der Haut und Mundschleimhaut, der Zunge, den Tonsillen, im Thymus sowie in respiratorischen Epithelien lokalisiert werden (Harder et al., 2001; Nishimura et al., 2003). Für das Expressionsprofil von hBD-3 konnten Gemeinsamkeiten, aber auch Unterschiede zum humanen beta-Defensin-2 festgestellt werden. Für beide Defensine konnte die Stimulation der Genexpression als Antwort auf den Kontakt mit Mikroorganismen oder in Anwesenheit von Zytokinen wie Interleukin-1 beta, Interferon-1 gamma oder Tumornekrosefaktor-alpha dokumentiert werden (Garcia et al., 2001; Harder et al., 2001; Midorikawa et al., 2003). Die Genexpression von hBD-3 ist neben den genannten inflammatorischen Reizen zusätzlich von hormonellen Einflüssen abhängig. Hier konnten stimulierende Effekte auf die mRNA Expression als Antwort auf Wachstumsfaktoren wie Epithelial growth factor-1 (EGF-1), Insulin-like growth factor-1 sowie Transforming growth factor alpha (TGF- α) gezeigt werden (Schröder und Harder, 2006; Sørensen et al., 2005).

1.2.1.4 Antimikrobieller Mechanismus der Defensine

Den humanen beta-Defensinen ist ein geringes Molekulargewicht, eine positive Nettoladung, eine kurze Aminosäuresequenz (36-45 AS) sowie eine hohe Membranaktivität gemeinsam (Schröder, 1999b). Die funktionellen Eigenschaften dieser Peptide werden unter anderem durch die spezielle Anordnung von sechs Zysteinen innerhalb der Aminosäuresequenz bestimmt. Diese schwefelhaltigen Aminosäuren besitzen eine endständige Thiolgruppe (-SH) in ihrer Seitenkette, die mit einer Thiolgruppe eines weiteren Zysteins eine kovalente Disulfidbindung eingehen kann. Durch die Ausbildung von drei Disulfidbrücken entsteht die spezifische dreidimensionale Tertiärstruktur der humanen beta-Defensine. Diese Konformation wird von drei antiparallel angeordneten β -Faltblättern und einer angrenzenden α -Helix-Struktur stabilisiert (Hoover et al., 2001; Schibli et al., 2002). Mit der Quartärstruktur humaner beta-Defensine wird die antimikrobielle Wirkungsweise in der Literatur erklärt. Aus kristallografischen Analysen von hBD-2 ging hervor, dass Defensinmoleküle die Fähigkeit besitzen, sich zu oligomeren Strukturen zusammenlagern (Hoover et al., 2000). Dabei entstehen ringförmige, oktamere Formationen, die mit Hilfe der β -Faltblattstrukturen und α -Helices untereinander stabilisiert werden (Hoover et al., 2000). Es stellt sich die Frage, wie Defensinmoleküle Mikroorganismen von körpereigenen Zellen unterscheiden können. Im Gegensatz zu den Zellen des Menschen besitzen die Membranen von Mikroorganismen einen geringeren Anteil an Cholesterin und gleichzeitig einen hohen Anteil an negativ geladenen Phospholipiden (Yang et al., 2002). Beim Porenmodell nach Hill gehen die positiv geladenen, kationischen Aminosäurereste der Peptidkette eine elektrostatische Wechselwirkung mit den negativ geladenen Phospholipiden der Bakterienmembran ein. Anschließend treten hydrophobe (van-der-Waals) Kräfte zwischen Kohlenwasserstoffketten der bakteriellen Phospholipide und apolaren Aminosäureresten der Defensine in Wechselwirkung. Dieser Mechanismus kann schließlich zur Einlagerung der Defensinoligomere in die Plasmamembran führen (Hill et al., 1991). Auf Grund der ringförmigen Anordnung der Oligomere kommt es in einem zweiten Schritt zur Ausbildung eines wassergefüllten Kanals innerhalb der bakteriellen Membran. Der Verlust der Membranintegrität führt anschließend zum osmotischen Zelltod des Bakteriums (Brogden, 2005; Ganz, 2003; Garcia et al., 2001; Schneider et al., 2005). Eine weitere Modellvorstellung beschreibt

die Anheftung und Abdeckung von Defensinen auf der Oberfläche der Zellmembran in der Art eines Teppichs („carpet-like“). Durch diese Form der Ausbreitung werden die negativen Ladungen der Phospholipide in der Zellmembran neutralisiert, was ebenfalls zu einer Beeinflussung des Membranpotentials führen kann (Fujii et al., 1993; Hoover et al., 2000).

Neben diesen direkten antimikrobiellen Effekten stellen Defensine auch eine Verbindung zum adaptiven Immunsystem dar (Oppenheim et al., 2003). Hier zeigten Untersuchungen chemotaktische Beziehungen zwischen hBD-2 und unreifen dendritischen Zellen, T-Gedächtniszellen und CD8⁺-T-Lymphozyten (Yang et al., 1999). Darüber hinaus konnten auch für das humane beta-Defensin-3 stimulierende Effekte auf Monozyten nachgewiesen werden (Garcia et al., 2001). Zusätzlich wurden Monozyten, Makrophagen und dendritischen Zellen als Expressionsort der humanen beta-Defensine-1 und -2 identifiziert (Duits et al., 2002). Untersuchungen mit Mastzellen konnten dokumentieren, dass das humane beta-Defensin-2 die Freisetzung von Histamin fördert und die Produktion von Prostaglandin D₂ stimuliert (Niyonsaba et al., 2001). Diese Zusammenhänge machen deutlich, dass humane beta-Defensine neben einer Stimulierung der Zytokinproduktion und einer Rekrutierung immunkompetenter Zellen auch zu einer erhöhten Akkumulation der Defensine selbst beitragen (Schröder und Harder, 2006).

1.3 Antimikrobielle Proteine im Speichel und in der Speicheldrüse

Der Speichel des Menschen enthält eine Vielzahl antimikrobiell wirkender Proteine, die funktionell in unterschiedlicher Art und Weise zur Gesunderhaltung oraler Gewebe beitragen. Hier können hochmolekulare Substanzen wie Glykoproteine (Muzine, Immunglobuline, Lactoferrin) oder Enzyme, aber auch niedermolekulare, kationische Peptide unterschieden werden. Die Muzine gehören der Gruppe der Glykoproteine an und werden in den serösen und mukösen Azinuszellen der Speicheldrüse gebildet (Amerongen et al., 1995; Veerman et al., 2003). Glykoproteine verleihen dem Speichel einen zähflüssigen, viskoelastischen Charakter, sorgen für die Gleitfähigkeit der Nahrung und sind an der Pellikelbildung auf der Oberfläche des Zahnschmelzes beteiligt (Nieuw Amerongen et al., 1987; Seifert, 1996; van der Reijden et al., 1993). Als eine Art visköse Schutzschicht können diese das Eindringen antigener Noxen an der Oberfläche

des Gangsystems oder der Mundschleimhaut verhindern. Plasmazellen im interstitiellen Bindegewebe der Speicheldrüsen produzieren das Immunglobulin A, welches durch eine Agglutination von Mikroorganismen eine weitere Kolonisation bzw. deren Anheftung an die Mundschleimhaut verhindert (Van Nieuw Amerongen et al., 2004). Das überwiegend in den Schaltstückepithelien gebildete Enzym Muramidase (Lysozym) übt eine bakterizide Wirkung auf Mikroorganismen aus, indem es Polysaccharide innerhalb der Zellmembran hydrolysiert (Van Nieuw Amerongen et al., 2004). Das Glykoprotein Lactoferrin zeigt eine bakteriostatische Wirkung, indem es Eisenionen (Fe^{3+}) zu Chelat-Komplexen bindet und so zu einer Hemmung des Bakterienwachstums beiträgt (Groenink et al., 1999). Darüber hinaus kann in der Speichelflüssigkeit eine weitere Gruppe niedermolekularer, kationischer Peptide hervorgehoben werden, die auf Grund struktureller Gemeinsamkeiten in ähnlicher Art und Weise mit den Zellmembranen von Mikroorganismen interagieren (Den Hertog et al., 2004; Gennaro et al., 2000). Hierzu gehören die Histatine, das humane Cathelicidin (LL-37) und die Defensine.

Die Expression humaner beta-Defensine wurde in den epithelialen Geweben der Mundschleimhaut in den letzten Jahren studiert. Ungeklärt ist bislang das genaue Expressionsmuster humaner beta-Defensine in den Geweben der Speicheldrüse und im Speichel. Die humanen beta-Defensin-1 und -2 wurden erstmals 1999 von Mathews und Mitarbeitern mit einer Konzentration von 150 ng/ml in der Speichelflüssigkeit des Menschen identifiziert (Mathews et al., 1999). Mit Hilfe immunhistochemischer Methoden gelang die Lokalisation von hBD-1 in den Epithelzellen der Ausführungsgänge der kleinen Speicheldrüse (Mukozelen). Dabei wurde eine apikale Polarisierung der Peptidexpression innerhalb der Gangepithelzellen beschrieben (Sahasrabudhe et al., 2000). Das humane beta-Defensin-1 wurde ausschließlich in den Gangepithelzellen gefunden und konnte weder in serösen noch in mukösen Azinuszellen gezeigt werden. Darüber hinaus wurde die mRNA Expression von hBD-1, -2 und -3 in großen und kleinen Mundspeicheldrüsen nachgewiesen (Bonass et al., 1999; Dunsche et al., 2002; Harder et al., 1997; Mathews et al., 1999; Zhao et al., 1996). Die Proteinexpression der humanen beta-Defensin-2 und -3 konnte bisher noch nicht in Strukturen der gesunden Speicheldrüse gezeigt werden. Die Expression des humanen beta-Defensin-2 wurde immunhistochemisch bislang nur in keratinisierten Epithelinseln der tumorös veränderten Speicheldrüse nachgewiesen (Abiko, 2000).

1.4 Interleukin-1 beta im Speichel und in der Speicheldrüse

Interleukin-1 beta (IL-1 beta) ist ein proinflammatorisches Zytokin, welches zahlreiche Funktionen sowohl in der angeborenen als auch in der adaptiven Immunabwehr übernimmt (Janeway, 2002). Dieses Polypeptid besitzt ein geringes Molekulargewicht (15 kDa) und wird von Monozyten, polymorphkernigen Granulozyten, Gefäßendothelzellen, Epithelzellen, Keratinozyten, Fibroblasten, T- und B-Lymphozyten, Osteoklasten und Osteozyten produziert (Dinarello, 1996). Es stimuliert die Bildung weiterer Zytokine (IL-1, IL-6, IL-8, IL-12, TNF- α), aktiviert die Gewebemigration von neutrophilen Granulozyten und induziert die Proliferation von T- und B-Lymphozyten mit anschließender Immunglobulinbildung (Dinarello, 2005; Sell, 2001). Neben der Rolle als vielseitiger Mediator des Immunsystems stimuliert Interleukin-1 beta die Biosynthese von Cyclooxygenase und Prostaglandin E₂, was zu generellen Symptomen wie Fieber führen kann (Schmidt, 2000). Mit Hilfe immunhistochemischer Untersuchungen konnte die Expression von Interleukin-1 beta in den Gangepithel- und Azinuszellen der Speicheldrüse nachgewiesen werden. Dabei zeigte sich eine verstärkte Immunreaktion in den Gangepithelien der chronischen Sialadenitis und in autoimmunologisch verändertem Speicheldrüsengewebe (Sjögren Syndrom) (Cauli et al., 1995). Zusätzlich konnten experimentelle Untersuchungen in einem Mausmodell zeigen, dass Lipopolysaccharide gramnegativer Bakterien die Genexpression von Interleukin-1 beta in der Glandula submandibularis stimuliert (Yao et al., 2005).

1.5 Untersuchtes Gewebe

In der vorliegenden Arbeit wurden Gewebeproben der gesunden, entzündeten und bestrahlten Glandula submandibularis sowie Biopsien des pleomorphen Adenoms bzw. des adenoidzystischen Karzinoms der Speicheldrüse auf die Expression der humanen beta-Defensine-1, -2 und -3 sowie Interleukin 1-beta näher untersucht.

1.5.1 Gesunde Speicheldrüse

Die Glandula submandibularis stellt neben der Glandula parotis und der Glandula sublingualis eine der drei großen, paarig angelegten Mundspeicheldrüsen des Menschen dar. Zusammen mit den kleinen akzessorischen Speicheldrüsen auf der Zunge, der Wangenschleimhaut und am Gaumen übernehmen diese die Aufgabe der

Speichelproduktion. Die Speicheldrüse wird von einer kollagenfaserreichen Bindegewebskapsel umgeben, von der Bindegewebssepten ins Organinnere ziehen. Das Parenchym setzt sich aus serösen und mukösen Azinuszellen (Drüsenendstücke) und einem System intra-, inter- und extralobulärer Gänge zusammen (Junqueira, 1996). Den mukösen Azinuszellen sitzen zum Teil seröse Endkappen korbartig auf. Im Bindegewebe verlaufen neben zahlreichen Blut- und Lymphgefäßen auch Nerven, welche ein dichtes Netzwerk um die Drüsenendstücke und Ausführungsgänge bilden. Die serösen Azinuszellen sind durch basal gelegene, große Zellkerne gekennzeichnet und sezernieren einen Speichel mit einem hohen Wasser- und Proteinanteil. Die mukösen Azinuszellen zeichnen sich durch basal gelegene, flache Zellkerne aus und bilden einen viskösen und muzinhaltigen Speichel. Die Schaltstücke bilden das terminale Gangsystem und lassen sich durch einreihige, kubische Epithelzellen charakterisieren. Die Auskleidung der Streifenstücke besteht aus Zylinderepithelzellen, die zum Ganglumen einen Bürstensaum und basal, parallel ausgerichtete Zytoplasmastreifungen aufweisen (Seifert, 1996). Den interlobulären Gangabschnitten kommen vorwiegend Transportfunktionen zu. Je nach Gangkaliber erfolgt die Begrenzung durch ein mehrreihiges oder mehrschichtiges Zylinder- bzw. Plattenepithel. Die Glandula submandibularis ist eine gemischte, seromuköse Drüse, welche der sezernierten Speichelflüssigkeit die Eigenschaften der Sekrete von serösen und mukösen Azinuszellen verleiht.

Die Hauptfunktionen des Speichels beziehen sich auf den Transport und Verdau der Nahrung, die Vermittlung der Geschmacksempfindung sowie den Schutz oraler Gewebe vor infektiösen Agentien (Seifert, 1996). Als Ausgangsprodukt für die Speichelbildung wird ein plasmaisotoner Primärspeichel von den Azinuszellen ausgeschieden. Durch eine Rückresorption von Natrium-, Chlorid-, und Bikarbonat-Ionen in den Streifenstücken entsteht ein hypotoner Speichel in der Mundhöhle (Aps et al., 2005). Das tägliche Gesamtvolumen des Speichels beträgt zwischen 500-1500 ml, wobei sich dieses Volumen aus der Spontansekretion und der stimulierten Sekretion zusammensetzt. Die Sekretionsrate unterliegt einem zirkadianen Rhythmus und ist durch Geschmacks- und Geruchswahrnehmungen während der Nahrungsaufnahme stimulierbar. Das lymphoide, interstitielle Bindegewebe übernimmt neben der Integration

des Gefäß- und Nervenapparates auch Aufgaben des sekretorischen Immunsystems der Speicheldrüsen (Seifert, 1996).

1.5.2 Ätiologie und Folgen von Entzündungen in der Speicheldrüse

Als ätiologische Faktoren einer entzündlichen Erkrankung der Speicheldrüsen (Sialadenitis) können Traumen, Bakterien, Viren, Gangobstruktionen, Sekretionsstörungen, radiogene Noxen aber auch immunologische Prozesse angesehen werden (Seifert, 1995). Die akuten Formen einer Sialadenitis werden überwiegend durch bakterielle oder virale Noxen ausgelöst, wohingegen bei chronisch-rezidivierenden Entzündungen Sekretionsstörungen oder immunpathologische Reaktionen eher im Vordergrund stehen können. Faktoren wie herabgesetzte Speichelsekretion, veränderte Elektrolytzusammensetzung bzw. Sekretstauung im Gangsystem begünstigen die Entstehung einer obstruktiven Sialadenitis. Pathohistologisch können visköse Sekreteindickungen aber auch kleine Speichelsteine (Mikrolithen) in den Ganglumina beobachtet werden (Williams, 1999). Weitere morphologische Merkmale stellen unregelmäßig dilatierte Speichelgänge, Metaplasien des Gangepithels, periduktale lymphozytäre Infiltration, interstitielle Fibrose und eine Atrophie der Drüsenzazini dar. Die Dauer der Obstruktion steht in einem engen Zusammenhang mit dem Schweregrad der morphologischen Veränderung (Seifert, 1996). Als weitere Ursache einer Speicheldrüsenentzündung können tumoröse Veränderungen sowie Speicheldrüsenzysten genannt werden.

1.5.3 Radiotherapeutische Irritationen der Speicheldrüse

Die therapeutische Anwendung ionisierender Strahlen im Kopf-Hals-Bereich kann im direkten Strahlenumfeld zu klinisch erfassbaren Nebenwirkungen führen. Eine Folge der Bestrahlung ist die so genannte Strahlen-Sialadenitis, welche mit Symptomen wie Mundtrockenheit (Xerostomie), Schluckbeschwerden, Entzündungen der Mundschleimhaut (Mukositis), Geschmacksverlust oder einem vermehrten Auftreten von Candidainfektionen einhergehen kann (Andrews et al., 2001; Guchelaar et al., 1997; Jham et al., 2006). Schon innerhalb der ersten Tage können Symptome als Reaktion auf die Strahleneinwirkung auftreten. Diese umfassen neben den bereits genannten Symptomen auch schmerzhafte Drüsenschwellungen und eine unterschiedlich stark

ausgeprägte Reduktion der Speichelflussrate. Die im Laufe einer Strahlenbehandlung möglicherweise auftretenden morphologischen Veränderungen von Strukturen des Drüsengewebes können in folgende Stadien eingeteilt werden (Dreyer et al., 1989). Das Stadium I ist durch eine Schwellung und Vakuolisierung der serösen Azinuszellen, eine mäßige Atrophie der Drüsenazini sowie eine geringe lymphozytäre Infiltration des periduktalen Gewebes gekennzeichnet. Im Stadium II lassen sich deutliche Parenchymreduktionen durch atrophisierte Drüsenazini, Gangektasien mit vereinzelt dukulären Proliferationen und eine verstärkte periduktale lymphozytäre Infiltration erkennen. Das Stadium III wird durch eine hochgradige Parenchymreduktion, ausgedehnte periduktale lymphozytäre Infiltrate, ausgeprägte Gangektasien mit Becherzell- und Plattenepithelmetaplasien sowie vermehrte intraluminale Sekretanreicherungen bestimmt. Durch eine Zunahme des interstitiellen Bindegewebes resultiert das Bild einer Speicheldrüsenzirrhose. Darüber hinaus konnten für die Schalt- und Streifenstückepithelien eine verstärkte Expression der antimikrobiellen Proteine Lysozym und Lactoferrin dokumentiert werden (Dreyer et al., 1989).

1.5.4 Tumoren der Speicheldrüse

Das pleomorphe Adenom der Glandula parotis stellt den häufigsten benignen Speicheldrüsentumor des Menschen dar (Inzidenz: 2,5-3 Fälle auf 100.000 Einwohner). Pathohistologisch ist es durch einen vielgestaltigen Aufbau gekennzeichnet, wobei zwischen epithelialen bzw. myoepithelialen Zellstrukturen und unscharf begrenzten Stromaarealen mit mukoider, myxoider oder chondroider Differenzierung unterschieden werden kann. Die epithelialen bzw. myoepithelialen Zellkomplexe können gangartige, solide oder zystische Formationen und eine netzartige Auflockerung im Stroma aufzeigen. Die Myoepithelzellen können polygonal oder spindelförmig modifizierte Strukturen aufweisen. Zu geringeren Anteilen lassen sich inselartige Ausbildungen von Plattenepithelmetaplasien erkennen. Ätiologisch liegen der Entstehung humaner Speicheldrüsentumore unterschiedliche Faktoren wie exogene chemische Noxen, virale Komponenten, Strahlenexposition, Hormoneinwirkungen oder genetische Dispositionen zugrunde (Seifert, 1996).

Das adenoidzystische Karzinom stellt nach dem Mukoepidermoidkarzinom die zweithäufigste Entität innerhalb der Gruppe der malignen Speicheldrüsentumoren dar

(Inzidenz: 3,9-7,7 Fälle auf 100.000 Einwohner) (Löning und Jäkel, 2004). In der Mundhöhle ist es bevorzugt am Gaumen lokalisiert, wohingegen es in den kleinen und großen Speicheldrüsen des Menschen gleich häufig vorkommt (Löning und Jäkel, 2004). Es zeichnet sich durch ein infiltratives Wachstum aus, das durch eine perineurale oder perivaskuläre Ausbreitung gekennzeichnet ist. Pathohistologisch lassen sich glandulär-cribriforme, tubuläre und solid-basaloide Formen modifizierter Gängepithelien und myoepithelialer Zellen unterscheiden, die sowohl einzeln als auch gemischt auftreten können (Seifert, 1996).

1.6 Fragestellungen und Ziele der Arbeit

In einer Vielzahl von Untersuchungen konnte die Rolle humaner beta-Defensine in der Abwehr unseres Körpers gegenüber bakteriellen, viralen und fungiformen Noxen gezeigt werden (Lehrer, 2004). Dabei wurden unter anderem die Epithelzellen der Mundschleimhaut und Gingiva, aber auch Odontoblasten der Zahnpulpa als Syntheseort dieser Peptide identifiziert (Dale und Fredericks, 2005; Dommisch et al., 2005b; Krisanaprakornkit et al., 2000). Das unterschiedliche Expressionsprofil der einzelnen Defensine, die verschiedenen Wirksamkeiten gegen pathogene Mikroorganismen in der Mundhöhle und die Fähigkeit, immunkompetente Zellen zu rekrutieren, demonstrieren die funktionelle Vielseitigkeit der humanen beta-Defensine.

Ziel der Arbeit war es, immunhistochemische Methoden zur Darstellung der humanen beta-Defensine (hBD-1, -2, -3) und Interleukin-1 beta in Speicheldrüsen zu etablieren. Hierfür wurden Proben der gesunden, entzündeten und bestrahlten Speicheldrüse sowie von Tumoren der Speicheldrüse analysiert. Weiterhin war es von Interesse, eine Methode zur quantitativen Auswertung immunhistochemisch gefärbter Schnitte zu erarbeiten.

Im Zuge der vorliegenden Arbeit sollten folgende Fragestellungen untersucht werden:

Sind die humanen beta-Defensine-1, -2, und -3 in den Epithelzellen der gesunden, entzündeten und bestrahlten Glandula submandibularis exprimiert?

Bestehen Unterschiede in der Expression humaner beta-Defensine innerhalb einzelner Abschnitte des Ausführungsgangsystems in der gesunden, entzündeten bzw. bestrahlten Glandula submandibularis?

Zeigen sich Unterschiede in der Expression von hBD-1, -2, und -3 in Bezug auf die intrazelluläre Lokalisation?

Zeigen neben den Gangepithelien auch andere histologische Strukturen eine Expression für hBD-1, hBD-2 und hBD-3?

Können im Vergleich zur gesunden Glandula submandibularis quantitative Unterschiede in der Expression von hBD-1, -2, -3 in bestrahltem Drüsengewebe beobachtet werden?

Kann die Expression der humanen beta-Defensine-1, -2 und -3 in benignen bzw. malignen Speicheldrüsentumoren nachgewiesen werden?

2. Material und Methoden

2.1 Übersicht

Es wurden Proben der gesunden, entzündeten und bestrahlten Glandula submandibularis sowie der tumorös veränderten Speicheldrüse immunhistochemisch auf die Expression der humanen beta-Defensine-1, -2 und -3 bzw. Interleukin-1 beta hin untersucht.

2.2 Reagenzien und Materialien

Die verwendeten Probenröhrchen und Pipettenspitzen wurden von der Fa. Sarstedt (Nümbrecht) bezogen. Die Chemikalien (Ethanol, Eosinlösung, Formalinlösung, Hämatoxylin, Methanol, Natriumchlorid, Natriumhydroxid, Salzsäure, Xylol, Zitronensäuremonohydrat) für die immunhistochemische Technik wurden von der Fa. Merck (Darmstadt) bestellt. Weiterhin wurde 3,3-Diaminobenzidin (DAB) von der Firma Perbio Science (Bonn), bovines Serumalbumin von der Fa. Roth (Karlsruhe), Tris von der Fa. ICN Biomedicals (Ohio, USA), Xylolersatz von der Fa. Vogel (Giessen) und Wasserstoffperoxid von der Fa. KMF Laborchemie (Sankt Augustin) im Rahmen der histochemischen Untersuchungen verwendet.

2.3 Probengewinnung

Die Speicheldrüsenproben (n = 13) und die Proben der entzündlich veränderten humanen Haut (n = 3) wurden im Rahmen von Tumoroperationen im Sinne der Neck Dissection in der Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie (Direktor: Prof. Dr. Dr. R. Reich) gewonnen. Alle Patienten wurden nach den Richtlinien der Ethikkommission der Universität Bonn (AZ: 142/05) aufgeklärt und gaben ihr schriftliches Einverständnis. Hierbei wurden Proben der gesunden (n = 4) und der entzündeten (n = 2) Glandula submandibularis gewonnen. Weiterhin wurden Proben der Glandula submandibularis von Patienten untersucht (n = 3), die aufgrund einer Tumorerkrankung im Kopf-Hals-Bereich mit einer Strahlendosis von 36 Gy radiotherapeutisch vorbehandelt wurden (nach den Richtlinien des deutsch-österreichisch-schweizerischen Arbeitskreises zur Tumorforschung (DÖSAG)). Die Proben der gesunden Speicheldrüse wurden ebenfalls im Rahmen von Tumoroperationen, ohne vorherige Strahlentherapie

der Patienten, gewonnen. Darüber hinaus wurden Proben aus dem adenoidzystischen Karzinom der kleinen Speicheldrüse der Wange (n = 1) bzw. der Glandula submandibularis (n = 1) und des pleomorphen Adenoms der Glandula parotis (n = 2) gewonnen. Die klinische Diagnose wurde durch die histologische Untersuchung des Probenmaterials durch einen Pathologen gesichert. Die Proben für die Positivkontrolle aus der humanen Haut konnten aus geometrischen Gründen im Zuge von plastischen Operationen nach Tumortherapie gewonnen werden.

2.4 Fixierung, Einbettung und Schnittanfertigung

Die Präparate wurden unmittelbar nach ihrer Gewinnung in 4%-iger Formalinlösung der Fa. Merck (Darmstadt) für mindestens 36 Stunden bei Raumtemperatur fixiert.

Alle Proben wurden anschließend mit Hilfe des Einbettautomaten V.I.P. 2000/3000 der Fa. Vogel (Giessen) in drei Schritten vorbereitet. Der erste Schritt beinhaltete die Wässerung der Proben über einen Zeitraum von zwei Stunden. Im Anschluss daran wurden die Speicheldrüsenproben in einem zweiten Arbeitsschritt unter Verwendung einer aufsteigenden Alkoholreihe (70%, 80%, 96%, 100%, siehe Tabelle 1) dehydriert. Der dritte und letzte Arbeitsschritt beinhaltete die Lagerung der Gewebeproben in flüssigem Paraffin für 4 Stunden. Das Einbetten der Proben erfolgte in Kunststoffküvetten von der Fa. DAKO (Hamburg) in einem standardisierten Verfahren mittels der Paraffinausgießstation „Tissue Tek“ der Fa. Vogel.

Tabelle 1

Übersicht über die Schritte im Einbettautomat

Reagenz	Zeit
70% Ethanol, 40°C	1 h
70% Ethanol, 40°C	1 h
80% Ethanol, 40°C	1 h
96% Ethanol, 40°C	1 h
96% Ethanol, 40°C	1 h
100% Ethanol, 40°C	75 min
100% Ethanol, 40°C	75 min
100% Ethanol, 40°C	75 min
Xylol, 40°C	1 h
Xylol, 40°C	75 min
Paraffin, 60°C	1 h
Paraffin, 60°C	1 h
Paraffin, 60°C	1 h
Paraffin, 60°C	1 h

Nach dem Aushärten der Paraffinblöcke wurden diese in die entsprechende Vorrichtung am Rotationsmikrotom HM 355 S von der Fa. Microm International (Walldorf) eingespannt. Histologische Schnitte wurden mit einer Schichtdicke von 2 µm unter Anwendung der Serienschnitttechnik angefertigt und auf Objektträger von der Fa. Menzel-Gläser (Braunschweig) aufgetragen. Die Objektträger wurden anschließend auf einer Wärmeplatte der Fa. IKA (Staufen) für 30 Minuten bei 30°C gelagert. Die vollständige Trocknung der Präparate erfolgte in einem Inkubator der Fa. Memmert (Schwabach) für 12 Stunden bei 37°C.

2.5 Färbemethoden

2.5.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Zur Übersicht und Kontrolle des zu untersuchenden Gewebeareals wurde jeder zehnte Schnitt einer Serie mit Hämatoxylin-Eosin (HE) angefärbt.

Mit der so genannten HE-Färbung lassen sich alle basophilen Zell- und Gewebestrukturen wie Zellkerne, Bakterien, Calciumcarbonat, basophiles Zytoplasma und Knorpelgrundsubstanz blau färben, während azidophile Bestandteile wie Zytoplasma, Kollagen und Erythrozyten rot angefärbt werden (Junqueira, 1996) (siehe Tabelle 2).

Tabelle 2

Übersicht der Einfärbung spezieller Zellbestandteile mit der HE-Färbemethode

Zellstruktur	Färbung
Kerne	Blau
Zytoplasma	Blassrot
Retikulumfasern und Basalmembran	Blassrot oder ungefärbt
Kollagenfasern	Rot
Elastische Fasernetze und elastische Membranen	Blassrosa

Für beide histologische Schnitttechniken, HE und die immunhistochemischen Färbungen, wurden die Schnittpräparate unter Verwendung von Xylol entparaffiniert und mittels einer absteigenden Alkoholreihe (100%, 96%, 80%, 70%) hydriert (siehe Tabelle 3).

Tabelle 3

Arbeitsschritte und Reagenzien zur Entparaffinierung und Hydrierung

Reagenz	Zeit
Xylol	10 min
Xylol	10 min
100% Ethanol	5 min
100% Ethanol	5 min
96% Ethanol	5 min
70% Ethanol	5 min
Aqua dest.	5 min

Der chronologische Arbeitsablauf für die anschließende Hämatoxylin- und Eosinfärbung ist in Tabelle 4 dargestellt.

Tabelle 4

Einzelschritte der HE-Färbung

Reagenz	Zeit
Hämalaun	30 Sek.
Aqua dest.	1 min
Spülen unter fließendem H ₂ O	5 min
Eosin	2 min
Aqua dest.	2 sec
70% Ethanol	2 min
96% Ethanol	2 min
100% Ethanol	2 min
100% Ethanol	2 min
Xylolersatz	2 min
Xylolersatz	2 min
Eindecken mit DePex	Ohne Zeitangabe

2.5.2 Methode der immunhistochemischen Nachweisreaktion

Die immunhistologische Technik macht es möglich, Peptide/Proteine, Polysaccharide und andere Strukturen, gegen die primäre Antikörper gebildet werden können, hochspezifisch in histologischen Schnitten nachzuweisen. Dieses Verfahren erlaubt sowohl die Darstellung und Lokalisation eines Peptides/Proteins in der Zelle bzw. im untersuchten Gewebe als auch die Analyse von Expressionsmustern (www.pathologie-online.de/meth/immunhisto.php).

Die in dieser Arbeit angewandte immunhistochemische Technik erfolgte in Anlehnung an die Arbeit von Lossdörfer und Mitarbeitern (Lossdörfer et al., 2002). Dabei handelte es sich um die indirekte Streptavidin-Biotin-Methode (ABC-Methode). Das Prinzip dieser Methode ist, dass ein spezifischer Primärantikörper an das zu untersuchende Antigen

bindet. Ein zweiter Sekundärantikörper, der an den ersten Primärantikörper bindet, ist kovalent mit Biotin markiert. Streptavidin besitzt eine starke Affinität zu Biotin, so dass es zum Verbund von Streptavidin-Biotin-Komplexen und biotinylierten Sekundärantikörper kommt. Vor diesem Hintergrund wurde nach einem Primärantikörper, ein biotinylierter zweiter Antikörper und präformierte Streptavidin-Biotin-Enzymkomplexe für die Färbung der Präparate eingesetzt. Die abschließende Reaktion erfolgte unter Anwendung des Enzyms Merrettichperoxidase, welche direkt an den beschriebenen Komplex gekoppelt ist. Dieses Enzym wandelt das farblose Chromogen 3,3-Diaminobenzidin (DAB) in ein braunes Enzymprodukt um. Als Ergebnis wurde ein Immunpräzipitat sichtbar, welches die Beschreibung von Lokalisation und Verteilung des untersuchten Antigens erlaubte.

Histologische Serienschritte der humanen Haut wurden als Positivkontrolle für die Expression der humanen beta-Defensine unter Anwendung des oben beschriebenen Protokolls immunhistochemisch angefärbt. Als Negativkontrolle für die Immunreaktion wurden ebenfalls Schnitte der Glandula submandibularis herangezogen. Dabei wurden parallel zum beschriebenen Ablauf der übrigen Präparate die Schnitte ohne Verwendung des Primärantikörpers mit 1% TBS/BSA inkubiert.

2.5.3 Immunhistochemischer Nachweis humaner beta-Defensine (hBD-1,-2,-3) und Interleukin-1 beta (IL-1beta)

In Vorversuchen wurden zunächst alle Antikörper getestet und die verwendete Konzentration so bestimmt, dass sich eine distinkte und deutliche Immunreaktion, möglichst frei von unspezifischer Hintergrundfärbung, ergab.

Im Anschluss an die Entparaffinierung und Hydrierung der Präparate (siehe Tabelle 3) erfolgte ein Waschschrift für 10 Minuten in TBS. Um ausschließlich Reaktionen der verwendeten Merrettichperoxidase zu erhalten, wurde die endogene Gewebeperoxidase blockiert (10 min; 70 ml Methanol und 700 µl 30%-ige H₂O₂-Lösung). Nach einem weiteren Waschschrift (10 min; TBS) erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörper in einer feuchten Kammer (verdünnt in 1%-iger TBS/BSA-Lösung, siehe Tabelle 5). Anschließend wurde erneut mit TBS (10 min) gewaschen und der Sekundärantikörper der Fa. DAKO (Hamburg) auf die Präparate aufgetragen (siehe Tabelle 6). Die

histologischen Schnitte wurden nach einer Inkubationszeit von 30 min wiederum für 10 min mit TBS gewaschen.

Die Präparate wurden im Anschluss an die oben genannten Schritte mit DAB (8 min; 1:10) gefärbt und mit TBS gespült (10 min). Die Gegenfärbung erfolgte mit Mayers saurem Hämalaun (1 s) und die Bläuung anschließend unter fließendem Wasser (4 min). Abschließend wurden die Präparate mit Hilfe einer aufsteigenden Alkoholreihe (2 x 2 min abs. Alkohol; 2 x 2 min Xylolersatz) dehydriert und mit DePex von der Fa. Serra (Heidelberg) sowie Deckgläsern der Fa. Engelbrecht (Edermunde) eingedeckt. Die einzelnen Schritte der immunhistologischen Methodik sind in Tabelle 6 zusammengefasst.

Tabelle 5

Übersicht und Anwendung der verwendeten Primärantikörper

Antikörper	Isotyp	Hersteller	Inkubationsprotokoll
hBD-1	polyklonal Kaninchen	Fa. Biologo (Kiel)	1:30, 1h, 25°C
hBD-2	polyklonal Ziege	Fa. Cell Concepts (Umkirch)	1:10, 20h, 4°C
hBD-3	polyklonal Kaninchen	Fa. Gentaur (Belgium)	1:100, 1h, 25°C
IL-1 beta	polyklonal Kaninchen	Fa. Perbio Science (Bonn)	1:100, 20h, 4°C

Tabelle 6

Arbeitsschritte der immunhistochemischen Methodik

Arbeitsschritt	Zeit
Entparaffinierung	siehe Tabelle 3
Spülen mit TBS	10 min
Blockierung der endogenen Gewebeperoxidase (70 ml Methanol mit 70 µl 30%-iger H ₂ O ₂ -Lösung und 20% Tween 20)	10 min
Spülen mit TBS	10 min
Inkubation mit dem Primärantikörper	siehe Tabelle 5
Spülen mit TBS	10 min
Inkubation mit dem Sekundärantikörper (DAKO „Envision“: hBD-1 AK gegen Kaninchen; hBD-2 AK gegen Ziege; hBD-3 AK gegen Kaninchen; IL-1β AK gegen Kaninchen; 1:50 in 1%-iger TBS/BSA-Lösung, 25 °C)	30 min
Spülen mit TBS	10 min
Färbung mit DAB (1:10; von Pierce)	8 min
Spülen mit TBS	10 min
Gegenfärbung mit Mayers saurem 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	ohne Zeitangabe

2.6 Auswertung der Proben

2.6.1 Fotografische Dokumentation

Die fotografische Dokumentation und anschließende Auswertung der histologischen Präparate wurde mit dem Mikroskop Axio Imager A1 und der Kamera AxioCam MRc der Fa. Zeiss (Jena) durchgeführt. Die computertechnische Analyse der histologischen Fotografien wurde mit dem Programm AxioVision Rel. 4.5[®] von der Fa. Zeiss vorgenommen.

Die histologischen Schnitte wurden für jeden Antikörper unter standardisierten Bedingungen in einem Fortlauf fotografiert. Unterschiede in der Intensität der Immunreaktion zwischen den Gruppen konnten mittels dieses Verfahrens genauer beurteilt werden. Auf diese Art und Weise wurden technische bzw. anwendungsbedingte Variationen minimiert. Um gleichmäßig belichtete Aufnahmen ohne Helligkeitsunterschiede zu erhalten, wurde darauf Wert gelegt, dass eine Schattenbildung innerhalb der Aufnahme ausgeschlossen werden konnte (Grube, 2004). Diese randständige Schattenbildung tritt nach jedem Objektivwechsel auf und wurde daher vor jeder Aufnahmeserie manuell nachkorrigiert. Für eine realitätsgetreue Farbdarstellung der Präparate im Bild wurden die Farbkanäle aufeinander abgestimmt (Weißabgleich). Die optimale Belichtungszeit wurde ermittelt und für die nachfolgenden Aufnahmen bei einer konstanten Farbtemperatur von 3200 K beibehalten. Die Belichtungszeit betrug für hBD-1 5 ms, hBD-2 5 ms, hBD-3 5 ms, IL-1beta 4 ms. Nach jeder Aufnahmeserie wurde anhand der Informationsdatei zu jedem Bild kontrolliert, ob alle Aufnahmen bei konstanter Belichtungszeit angefertigt wurden.

Für jedes Präparat wurden 10 Messaufnahmen der Epithelzellen von Schalt- und Streifenstücken in einer 10 x 40 Vergrößerung angefertigt und für die Analyse mit dem Messprogramm AutMess[®] (Automatisches Messen) der Fa. Zeiss separat gespeichert.

2.6.2 Auswertung und semiquantitative Beschreibung der Expression von hBD-1, -2, -3 und IL-1 beta

Interzelluläre Unterschiede in der Intensität der Immunreaktion resultieren aus unterschiedlichen Mengen an gebundenem Primärantikörper und korrelieren so mit dem vorhandenen Proteingehalt der Zelle. Für eine semiquantitative Beschreibung der

Expression von hBD-1, -2, -3 und IL-1 beta wurde gesunde und bestrahlte Speicheldrüse mit Hilfe des Computerprogramms AutMess® der Fa. Zeiss analysiert und zusätzlich statistisch ausgewertet.

2.6.3 Fotografische Bildparameter

Als Grundlage für die Quantifizierung wurde in jedem Messfoto der mittlere Grauwert der Farbreaktion in Schalt- und Streifenstücken des Ausführungsgangsystems ermittelt. Alle Aufnahmen entstanden mit der Axio Cam MRc Farbkamera und wurden im RGB-Farbmodus aufgenommen. RGB bezeichnet die Grundfarben Rot, Grün und Blau und stellt das so genannte additive Farbmodell dar. Jede Farbe lässt sich durch einen Rot-, Grün-, und Blauanteil beschreiben, in der jeder Farbanteil zwischen 0 und 100% variieren kann. Sind alle drei Grundfarben zu einem Farbanteil von 100% vorhanden, ergibt sich die Farbe Weiß. Ein Farbanteil von 0% aller drei Grundfarben spiegelt die Farbe Schwarz wider. Dieses Modell der Farbdarstellung wird von Computermonitoren und Kameras verwendet. Die kleinste Darstellungseinheit von Farbinformationen stellt am Monitor ein Bildschirmpixel dar. Dieser Bildpunkt besteht aus drei Farbpunkten der Grundfarben Rot, Grün und Blau. Jede Farbe eines Pixels setzt sich aus der Farbinformation des Rot-, Grün-, und Blaukanals dieses Pixels zusammen. Der Wertebereich, den jeder Kanal einnehmen kann, wird als Farbtiefe bezeichnet. Somit gibt die Farbtiefe die Feinheit der Abstufungen an, mit der beispielsweise die Farbe Rot im Rotkanal wiedergegeben werden kann. Alle Werte eines Farbkanals werden elektronisch kodiert. Die Anzahl der Farbtöne und damit der Farbtiefe lässt sich in der exponentiellen Funktion 2^n ausdrücken und wird in Bit angegeben. Eine Aufnahme mit einer Farbtiefe von 1 Bit enthält genau zwei Farbtöne (2^1). Eine Aufnahme von 2 Bit Farbtiefe besitzt 4 (2^2) unterschiedliche Farbtöne und eine Aufnahme von 16 Bit 65536 (2^{16}) mögliche Farbabstufungen für jeden Farbkanal. In diesem additiven Farbmodell, bei dem sich alle Farbkanäle eines Pixels bei voller Intensität zur Farbe Weiß addieren, besitzen hellere Bildpunkte mehr Farbinformation als Dunklere. Somit gibt der Zahlenwert 0 den Farbton Schwarz und jeder größere Zahlenwert einen entsprechend helleren Farbton an (Zeiss, 2005).

Alle Messaufnahmen wurden im RGB-Modus mit einer Farbtiefe von 48 Bit aufgenommen. Das Messprogramm wandelt eine markierte Region innerhalb eines 48

Bit RGB-Farbbildes gemäß der Formel $(R+G+B) / 3$ in ein 16 Bit Graustufenbild um. Die Grauwerte aller Bildpunkte einer markierten Region werden analysiert und der Mittelwert aller Grauwerte als Zahlenwert ausgegeben. Die mittleren Grauwerte können einen Zahlenwert von 0 bis 65535 annehmen.

2.6.4 Semiquantitative Bildanalyse

Die Intensität der Immunreaktion der Epithelzellen von Schalt- und Streifenstücken wurde mit Hilfe des mittleren Grauwertes miteinander verglichen. Vorversuche haben gezeigt, dass die dunkelsten Bildpunkte (Minimalwerte) von den Zellkernen hervorgerufen wurden, die aufgrund der basophilen Kerngegenfärbung in der Epithelzelle entstanden (siehe Abbildung 1). Die hellsten Bildpunkte (Maximalwerte) hingegen wurden von den Lumina innerhalb der Schalt- und Streifenstücke hervorgerufen (siehe Abbildung 2). Um ausschließlich den mittleren Grauwert der zytoplasmatischen Immunreaktion bestimmen und miteinander vergleichen zu können, wurden sowohl die Zellkerne der Epithelzellen als auch die Lumina der Schalt- und Streifenstücke selektiv markiert und von der anschließenden Messung ausgeschlossen (siehe Abbildung 1-3).

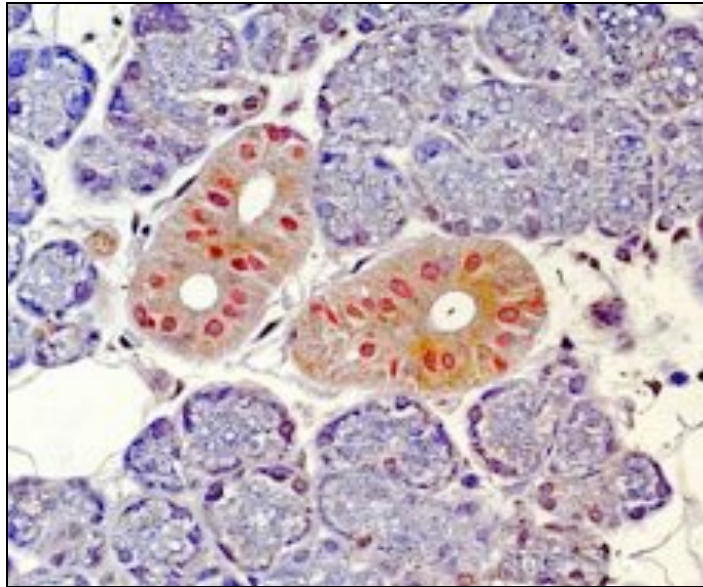


Abbildung 1

Immunhistochemische Darstellung des humanen beta-Defensin-1 in der gesunden Speicheldrüse. Zur semiquantitativen Auswertung wurden die einzelnen Zellkerne in den Epithelzellen der Streifenstücke markiert. Durch diese selektive Erfassung konnten diese Bereiche von der anschließenden Messung ausgeschlossen werden. (Vergrößerung 40fach)

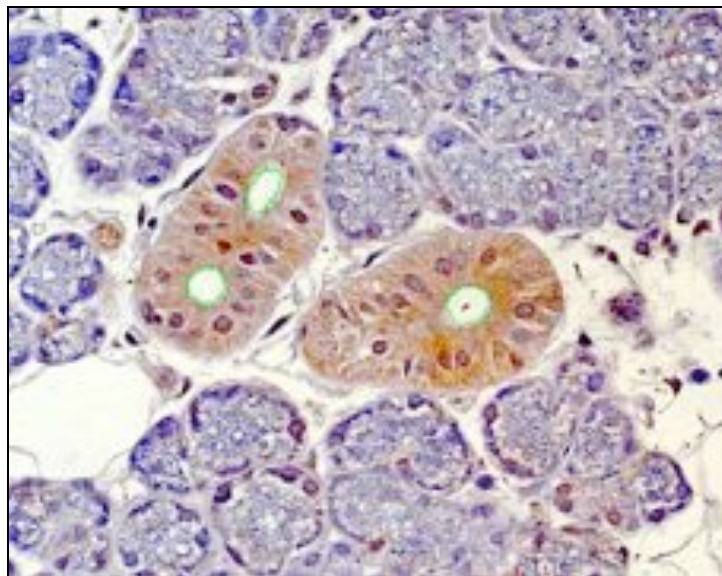


Abbildung 2

Zusätzlich zu den Zellkernen wurden auch die Lumina der Streifenstücke selektiv markiert und ebenfalls nicht in die anschließende Messung mit einbezogen. (Vergrößerung 40fach)

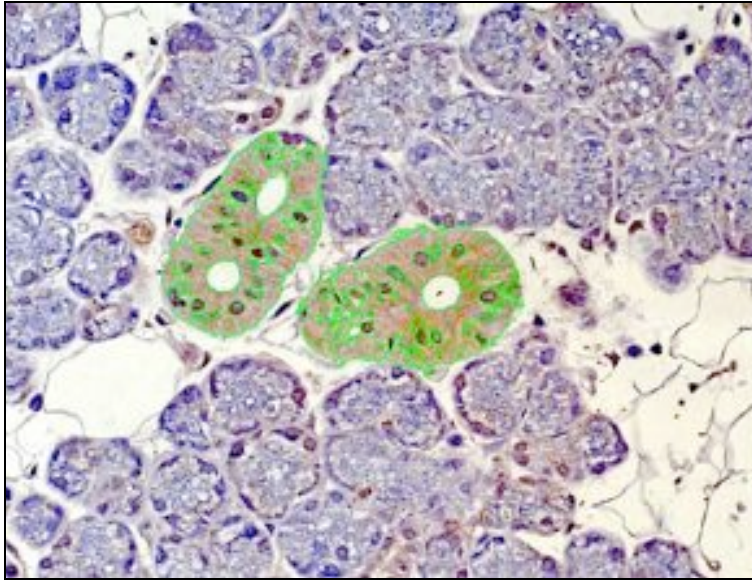


Abbildung 3

Endgültige Einstellung vor der Messung des Grauwertes der Immunreaktion. Die hellsten Punkte (Maximalwerte) waren im Lumen der Schalt- und Streifenstücke zu finden, wohingegen die dunkelsten Punkte (Minimalwerte) von den Zellkernen hervorgerufen wurden. Durch Ausschluss dieser Areale von der Messung konnte schließlich nur der mittlere Grauwert der zytoplasmatischen Immunreaktion ermittelt werden. (Vergrößerung 40fach)

Alle Messungen wurden fünffach durchgeführt, um Ungleichmäßigkeiten in der Markierung des Messareals bzw. in der Selektierung auszugleichen. Anschließend wurde aus den Einzelmesswerten der Mittelwert bestimmt. Um die Intensität der Immunreaktion mit Hilfe der mittleren Grauwerte in einem Diagramm anschaulich darzustellen, wurden diese mit folgender Formel umgerechnet (Lohrke et al., 2002).

$$\text{relativer Graumittelwert} = \frac{1}{\text{Graumittelwert (Einzelwert)}} * 10000$$

Somit ergaben sich für jede Speicheldrüse aus den untersuchten Gruppen 10 Einzelwerte für den relativen mittleren Grauwert, die dann untereinander verglichen werden konnten.

2.7 Statistische Auswertung der Messdaten

Die statistische Auswertung wurde mit dem Computerprogramm SPSS (Version 14) durchgeführt. Es wurde eine rein deskriptive Statistik durchgeführt, wobei der Medianwert, Minimum, Maximum und die Standardabweichung angegeben worden sind. Unter Verwendung des nicht-parametrischen Wilcoxon-Vorzeichen-Tests wurde der mittlere Grauwert für die Immunreaktion der Antikörper gegen hBD-1, -2, -3 und Interleukin-1 beta ausgewertet.

Hierbei wurden Proben der gesunden (Gruppe 1) und Proben der bestrahlten Speicheldrüse (Gruppe 2) miteinander verglichen. In jede Gruppe wurden jeweils Schnitte von 2 Donoren aufgenommen. Pro Donor wurde, wie unter 2.6.4 beschreiben, der mittlere Grauwert für die Immunreaktion von insgesamt 10 Streifenstücken analysiert. Die Signifikanzschwelle wurde bei $p \leq 0.05$ festgelegt.

Die grafische Darstellung der ermittelten Daten erfolgte über Boxplotdiagramme. Ein Boxplotdiagramm beinhaltet einen Kasten, der nach oben durch das 75%- und nach unten durch das 25%-Perzentil begrenzt wird. Durch eine im Kasten dargestellte Linie, die sich zwischen den beiden Perzentilen befindet, wird der ermittelte Medianwert angezeigt. Zusätzlich zeigt ein Boxplotdiagramm den jeweils größten und kleinsten Wert aus der deskriptiven Statistik an (siehe Anhang 6).

3. Ergebnisse

3.1 Überblick

In der vorliegenden Studie wurden insgesamt 13 Speicheldrüsenproben mit den Methoden der Immunhistochemie untersucht. Es wurden Biopsien gesunder Speicheldrüsen (n = 4), strahlentherapeutisch irritierter Speicheldrüsen (n = 3), entzündlich veränderter Speicheldrüsen (n = 2), sowie Speicheldrüsentumore (n = 4) in Hinblick auf die Expression humaner beta-Defensine (hBD-1, -2, -3) und Interleukin-1 beta ausgewertet.

3.2 Histomorphologische Auswertung

3.2.1 Morphologischer Vergleich gesunder und bestrahlter Glandula submandibularis

Die Präparate der gesunden Speicheldrüse zeigten eine Gliederung des Parenchymgewebes in Drüsenläppchen. In den Präparaten konnten die einzelnen Anteile des Ausführungsgangsystems wie Schaltstücke mit isoprismatischem, einschichtigem Epithel, Streifenstücke mit hochprismatischem, einschichtigem Epithel, intraglobuläre und extraglobuläre Ausführungsgänge mit mehrreihigem Epithel identifiziert werden. Die Zellkerne der Epithelzellen der Schalt- und Streifenstücke waren gleichmäßig im mittleren bis apikalen Drittel der Epithelzellen angeordnet. Neben Zellen des Ausführungsgangsystems konnten seröse und muköse Azinuszellen in den Schnitten dokumentiert werden. Es lag eine unterschiedliche Verteilung seröser und muköser Azinuszellen in den einzelnen Präparaten der unterschiedlichen Donoren vor. Im Unterschied zu den Epithelzellen des Ausführungsgangsystems konnten in den serösen und mukösen Azini randständige Zellkerne lokalisiert werden. Am basalen Zellpol vereinzelter Azinuszellen ließen sich myoepitheliale Zellen identifizieren (siehe Abbildung 4).

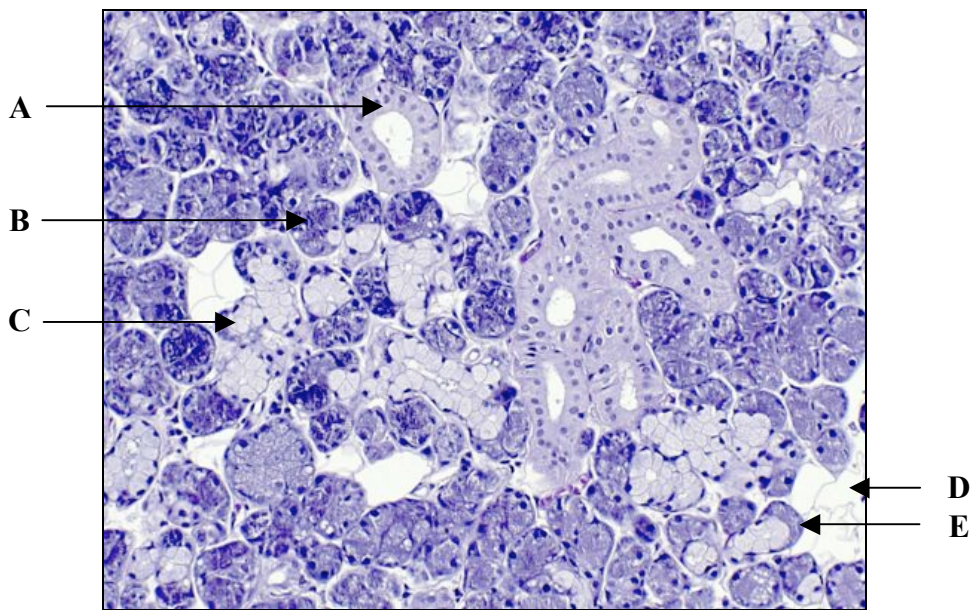


Abbildung 4

HE-Färbung der gesunden Glandula submandibularis. Das Drüsenparenchym bestand aus Epithelzellen des Ausführungsgangsystems (A), serösen (B) und mukösen (C) Azinuszellen sowie vereinzelt Fettzellen (D). Einigen mukösen Zellen saßen seröse halbmondförmige Azinuszellen korbartig auf (E). (Vergrößerung 40fach)

Die strahlentherapeutisch irritierten Gewebeproben zeigten großflächige Strukturauflösungen innerhalb des Drüsenparenchymgewebes. Die Degeneration betraf besonders die serösen Azinuszellen. Hier wurde anstelle der Azini fibröses Bindegewebe in ausgedehnten Arealen beobachtet. Anteile der Basalmembran, die an degenerierte Azinuszellreste angrenzten, ließen unterschiedlich ausgeprägte Strukturverluste erkennen. Muköse Drüsenanteile und Epithelzellen der Ausführungsgänge waren ebenfalls von der Degeneration betroffen. In stark zerstörten Regionen konnten vermehrt vielkernige Zellen identifiziert werden. Die Lumina der Ausführungsgänge waren verkleinert und enthielten neben Zelltrümmern und Epithelresten auch Reste von sezerniertem Primärspeichel (siehe Abbildung 5). Vereinzelt Epithelzellen der Sammelrohre zeigten ungeordnete, proliferierte Strukturen mit einzelnen pyknotischen und abgeschilferten Zellen, die in das jeweilige Lumen reichten. Angrenzend an Blutgefäße zeigten sich deutliche, entzündliche Infiltrate im

interstitiellen Bindegewebe, die durch Lymphozyten, Makrophagen und Plasmazellen repräsentiert wurden.

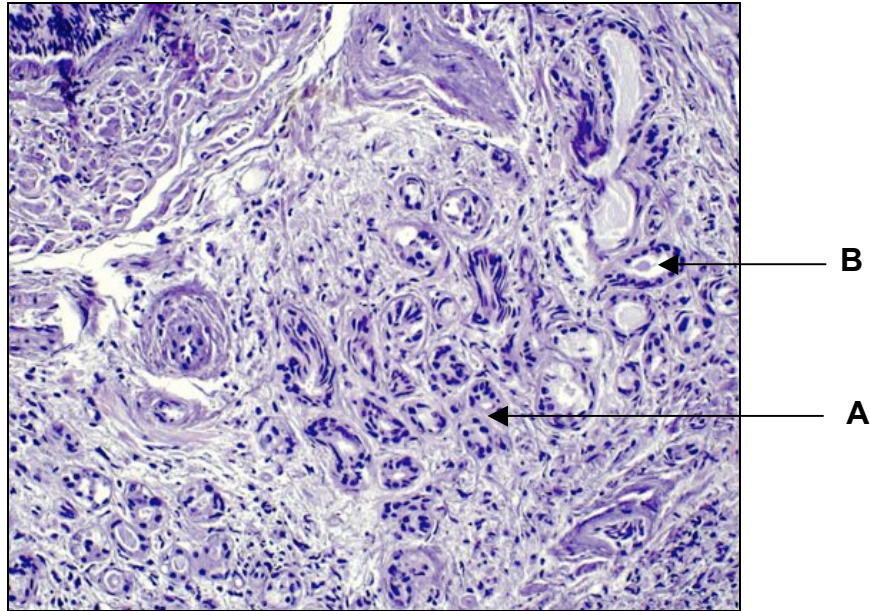


Abbildung 5

HE-Färbung der bestrahlten Glandula submandibularis. Das Drüsenparenchym zeigte einen Verlust an serösen und mukösen Azinuszellen (A). Sekretreste konnten in den Lumina der deformierten Ausführungsgänge lokalisiert werden (B). (Vergrößerung 40fach)

3.2.2 Morphologischer Vergleich gesunder und entzündlich veränderter Glandula submandibularis

Es wurde jeweils eine Gewebeprobe der chronischen Sialadenitis und der Sialolithiasis untersucht.

3.2.2.1 Vergleich gesunder Speicheldrüse und Sialolithiasis

Die Probe der entzündlich veränderten Speicheldrüse (Sialolithiasis) zeigte stark dilatierte und ungleichmäßig begrenzte Ausführungsgänge (Gangektasien). In einigen Arealen der Gangepithelzellen konnten ein verringertes Kern-Zytoplasma-Verhältnis sowie Bereiche vermehrter Zellproliferation festgestellt werden. Weiterhin wiesen einige Areale der Epithelzellen luminale Ausstülpungen auf, in denen vermehrte

Desquamationen beobachtet werden konnten (siehe Abbildung 6). Im interstitiellen Bindegewebe und in unmittelbarer Nähe von Blutgefäßen wurden Makrophagen, Plasmazellen oder Lymphozyten als Komponenten der zellulären Immunabwehr identifiziert (siehe Abbildung 7).

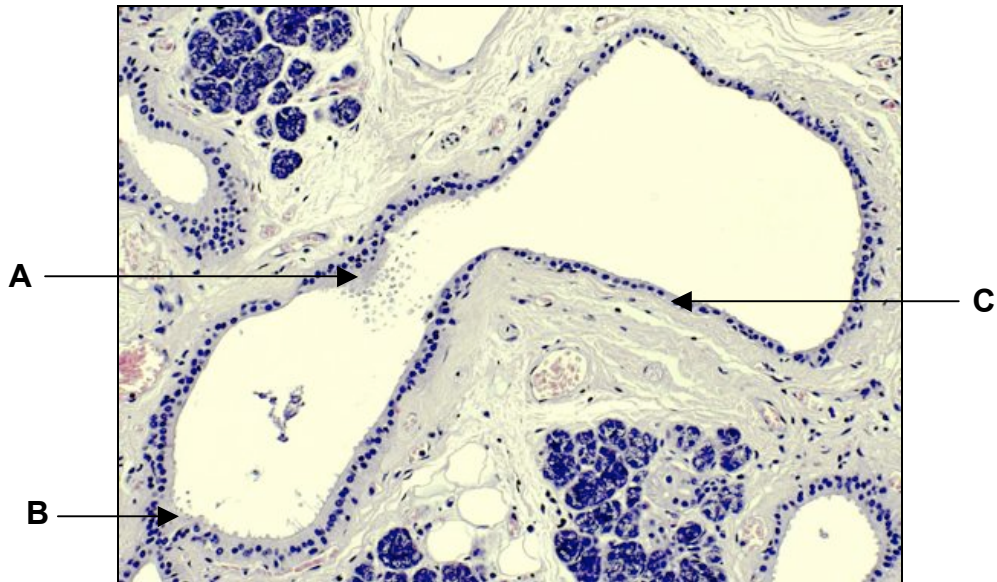


Abbildung 6

HE-Färbung eines dilatierten Ausführungsgangs (Gangektasie) der entzündlich veränderten Glandula submandibularis (Sialolithiasis). Epithelzellen mit unterschiedlichem Kern-Zytoplasma-Verhältnis (B, C) und Areale mit vermehrter Desquamation (A) konnten lokalisiert werden. (Vergrößerung 20fach)

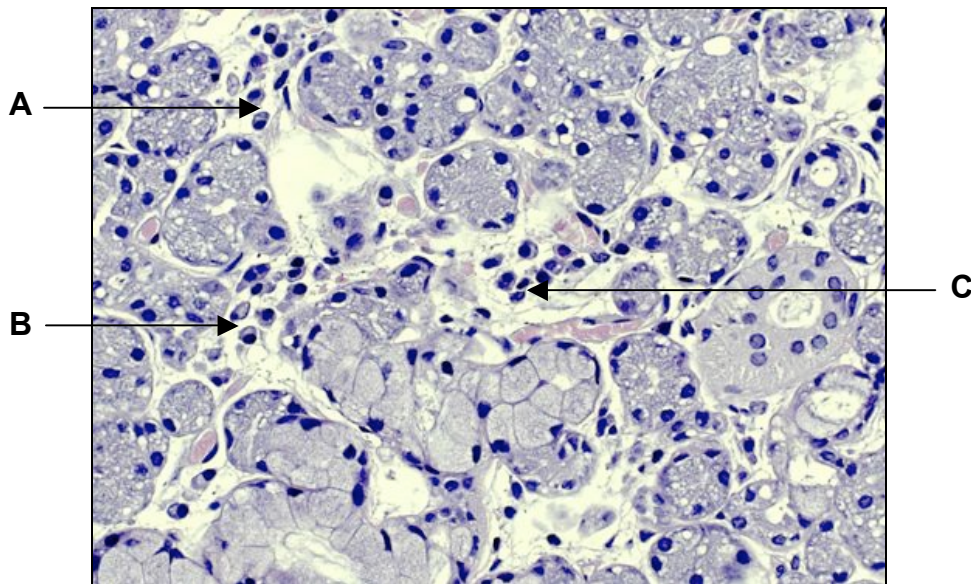


Abbildung 7

HE-Färbung der entzündeten Glandula submandibularis. Lokalisation von Entzündungszellen der humoralen Immunabwehr im interstitiellen Bindegewebe des Drüsenparenchyms. Plasmazellen mit randständigem Zellkern (A, B) und Lymphozyten (C) wurden in den entzündlichen Infiltraten identifiziert. (Vergrößerung 40fach)

3.2.2.2 Vergleich gesunder Speicheldrüse und chronische Sialadenitis

Die untersuchte Gewebeprobe zeigte geringe Anzeichen einer Entzündung im histologischen Bild. Es konnten nur wenige Entzündungszellen im interstitiellen Bindegewebe identifiziert werden. Zusammenhängende entzündliche Infiltrate wurden nicht aufgefunden. Des Weiteren wiesen die Epithelzellen des Ausführungsgangsystems wenig morphologische Veränderungen auf.

3.2.3 Morphologische Beschreibung von Speicheldrüsentumoren

Zur morphologischen Untersuchung humaner beta-Defensine in Tumoren der Speicheldrüse wurde das pleomorphe Adenom der Glandula parotis und das adenoidzystische Karzinom der kleinen Speicheldrüse der Wange bzw. der Glandula submandibularis immunhistochemisch ausgewertet.

3.2.3.1 Morphologische Beschreibung des Pleomorphen Adenoms

Das pleomorphe Adenom der Glandula parotis zeigte überwiegend epitheliale Zellkomplexe, die sich durch eine unscharfe Begrenzung zu den umgebenden Stromaarealen charakterisieren ließen. Zum Teil konnten zystische, gangartige Strukturen mit zentralen Keratinisierungen lokalisiert werden (siehe Abbildung 8).

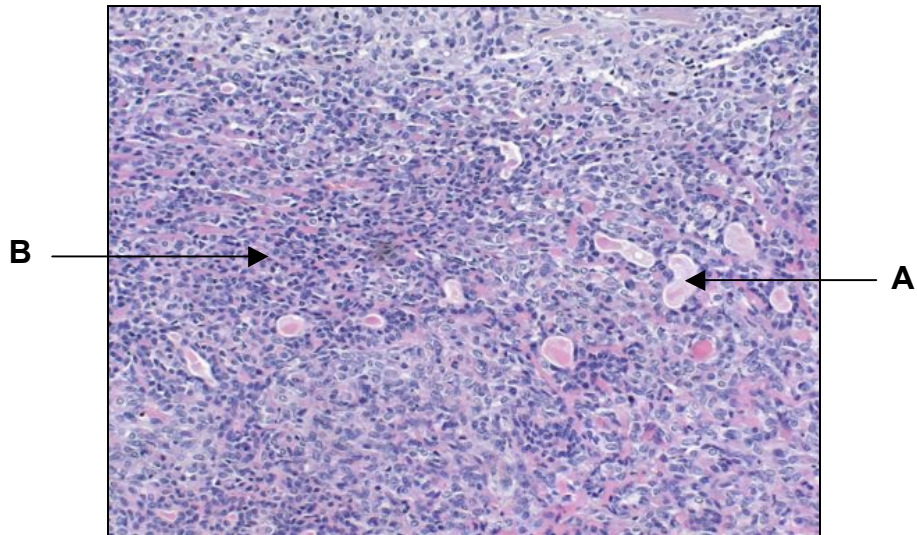


Abbildung 8

HE-Färbung des pleomorphen Adenoms der Glandula parotis. Überwiegend epitheliale Zellkomplexe (B) wurden identifiziert. In vereinzelt zystischen Formationen dieser Zellkomplexe konnten eingeschlossene, zentrale Keratinisierungen beobachtet werden (A). (Vergrößerung 20fach)

3.2.3.2 Morphologische Beschreibung des Adenoidzystischen Karzinoms

Das adenoidzystische Karzinom der kleinen Speicheldrüse der Wange war vorwiegend aus soliden Zellnestern aufgebaut, die durch vereinzelte kleine glandulär-cribriforme Zellnester durchsetzt waren. Die zystischen Hohlräume bestanden aus eosinophilem, hyalinem Zellmaterial. Die kleinzelligen Tumorzellen enthielten wenig Zytoplasma und wurden durch einen kompakten Zellkern charakterisiert (siehe Abbildung 9).

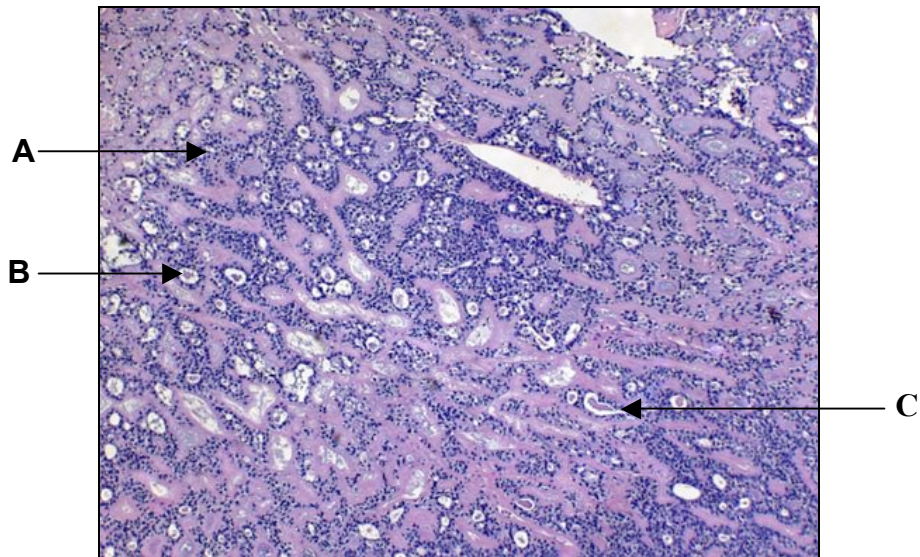


Abbildung 9

HE-Färbung des adenoidzystischen Karzinoms der kleinen Speicheldrüse der Wange. In dem vorliegenden Präparat herrschte überwiegend der solide Subtyp vor (A). Einzelne Zellnester wurden durch glandulär-cribriforme Zellformationen durchsetzt (B), die im Inneren hyalines, eosinophiles Material enthielten (C). (Vergrößerung 20fach)

3.3 Expression humaner beta-Defensine

3.3.1 Expression des humanen beta-Defensin-1

Die Expression des humanen beta-Defensin-1 konnte in gesunder, bestrahlter sowie entzündlich und tumorös veränderter Speicheldrüse dargestellt werden.

3.3.1.1 Expression des humanen beta-Defensin-1 in gesunder Speicheldrüse

Als Expressionsort des humanen beta-Defensin-1 konnten ausschließlich die Epithelzellen des Ausführungsgangsystems identifiziert werden. Seröse und muköse Azinuszellen zeigten keine Immunreaktion. Als Grenze der Proteinexpression wurde der Übergang der Azinuszellen in die isoprismatischen Epithelzellen der Schaltstücke beobachtet. Die Immunreaktion zeigte eine starke Intensität und verteilte sich gleichmäßig innerhalb der Epithelzelle. Vereinzelt Proteincluster hoben sich von der Grundfärbung ab (siehe Abbildung 10). Weiterhin ließ sich das humane beta-Defensin-1 in Endothelzellen der Blutgefäße und in Makrophagen darstellen.

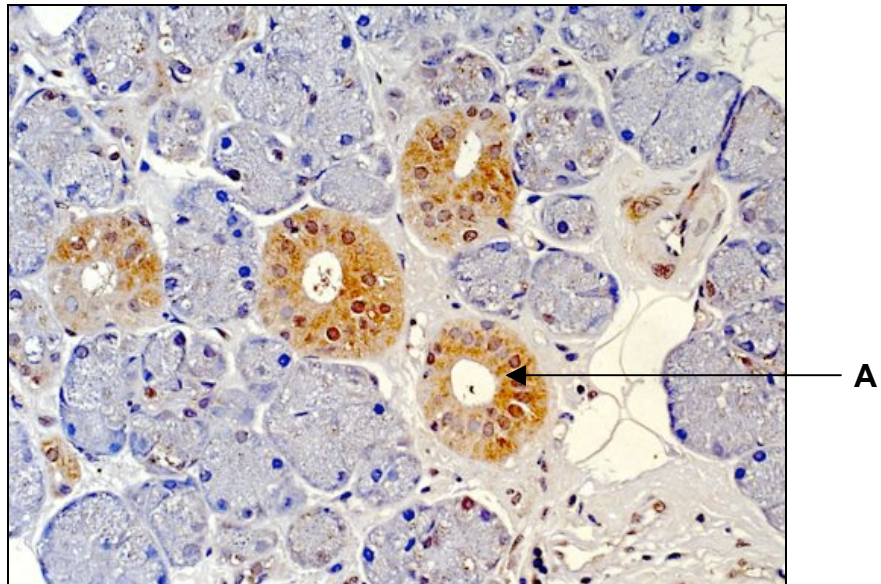


Abbildung 10

Immunohistochemische Darstellung des humanen beta-Defensin-1 in den Epithelzellen der Streifenstücke der gesunden Glandula submandibularis (A). (Vergrößerung 40fach)

3.3.1.2 Expression des humanen beta-Defensin-1 in bestrahlter Speicheldrüse

In den Schalt- und Streifenstücken der bestrahlten Glandula submandibularis ließen sich morphologische Veränderungen erkennen. Die degenerierten Epithelreste der Schalt- und Streifenstücke zeigten eine schwache Immunreaktion für das humane beta-Defensin-1. Im Lumen der Ausführungsgänge konnte ebenfalls eine positive Immunreaktion gezeigt werden (siehe Abbildung 11).

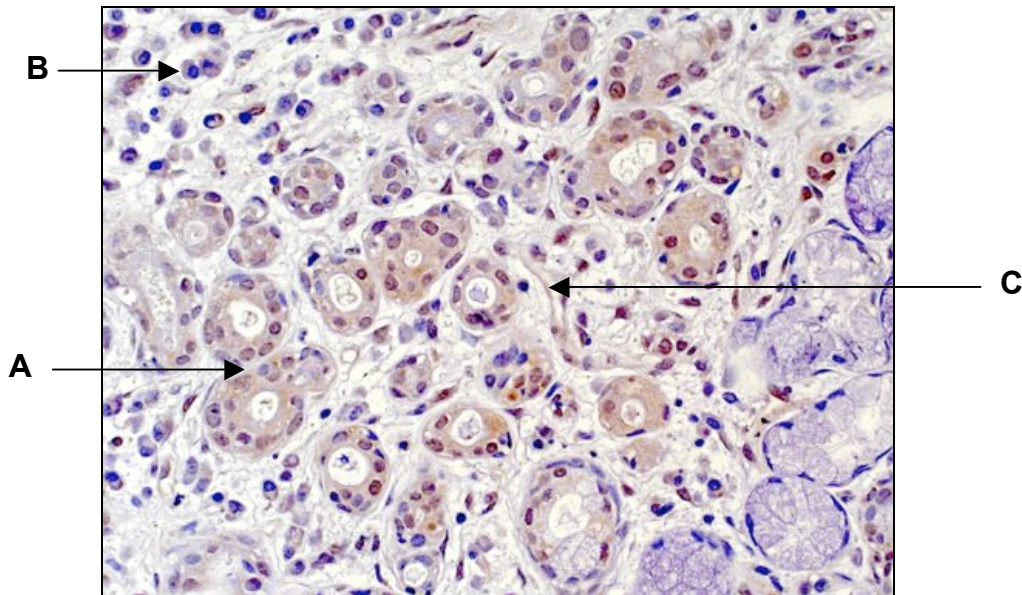


Abbildung 11

Darstellung der immunhistochemischen Färbung humaner beta-Defensine-1 in bestrahlter Glandula submandibularis. Neben degenerierten Epithelzellen (A) konnten Entzündungszellen (B) im interstitiellen Bindegewebe identifiziert werden. Einige Epithelzellen zerfielen, so dass nur noch die Basalmembran erhalten blieb (C). (Vergrößerung 40fach)

3.3.1.3 Expression des humanen beta-Defensin-1 in entzündlich veränderter Speicheldrüse

Die Immunreaktion in der entzündlich veränderten Glandula submandibularis zeigte eine mittlere Intensität. Die zytoplasmatische Immunreaktion wies eine apikale Polarität innerhalb der Streifenstückepithelzellen auf. Das heisst, es konnte eine verstärkte luminale Immunreaktion beobachtet werden. Dieses Reaktionsmuster spiegelte sich in allen Abschnitten des Ausführungsgangsystems wider (siehe Abbildung 12).

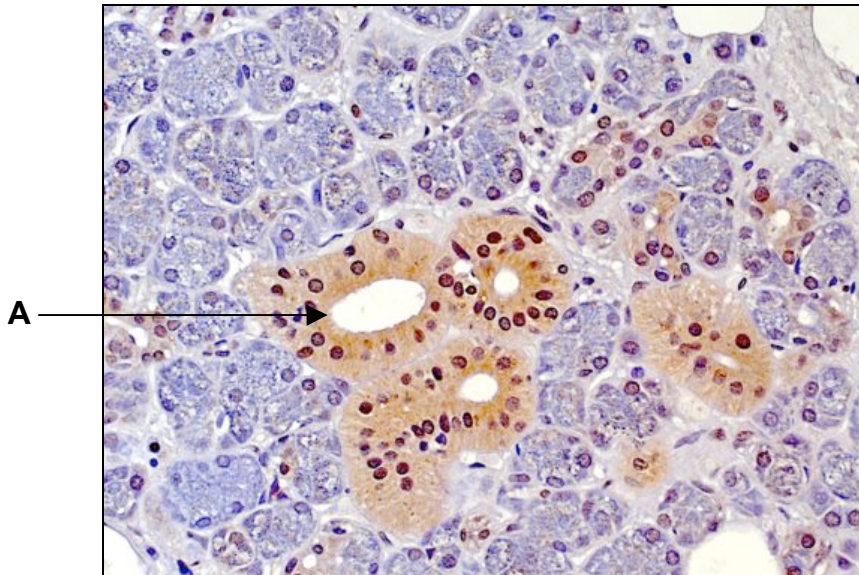


Abbildung 12

Darstellung der Expression des humanen beta-Defensin-1 in der entzündeten Glandula submandibularis. Es konnte eine polare Immunreaktion dargestellt werden (A). (Vergrößerung 40fach)

3.3.1.4 Expression des humanen beta-Defensin-1 in Speicheldrüsentumoren

3.3.1.4.1 Expression des humanen beta-Defensin-1 im Pleomorphen Adenom

Das humane beta-Defensin-1 konnte im pleomorphen Adenom der Glandula parotis dargestellt werden. Dabei wurden unterschiedlich starke, fokale Immunreaktionen innerhalb der epithelialen Tumorzellen lokalisiert (siehe Abbildung 13).

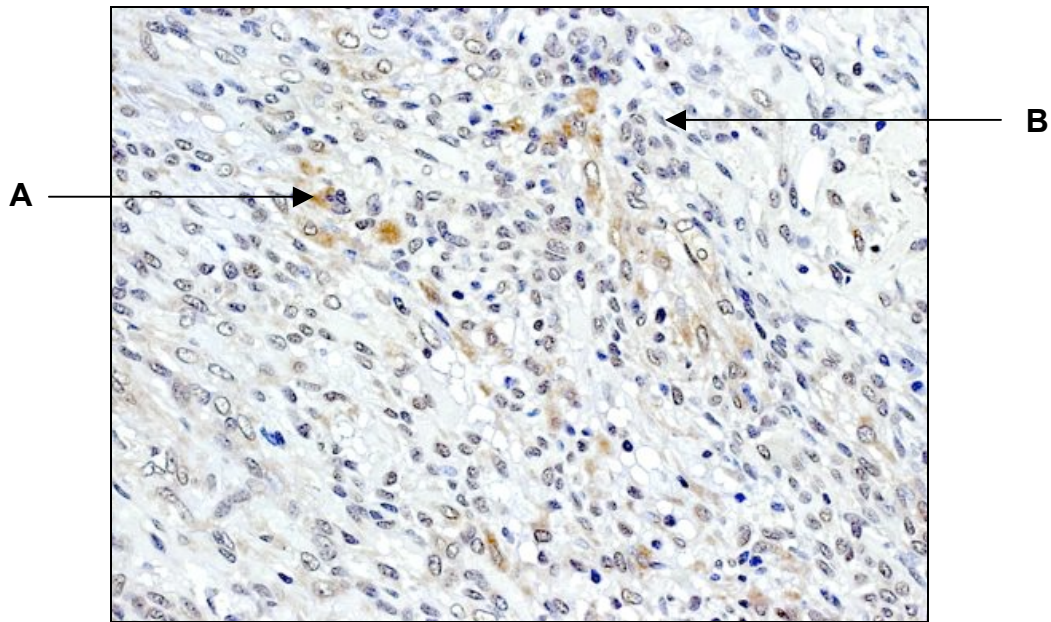


Abbildung 13

Immunohistochemische Darstellung des humanen beta-Defensin-1 im pleomorphen Adenom der Glandula parotis. Die epithelialen Tumorzellen zeigten eine unterschiedliche, fokale Immunfärbung innerhalb einer schwarmartigen Anordnung im bindegewebigen Stroma (A). Für vereinzelte spindelförmige Zellen (B) konnte keine Immunreaktion nachgewiesen werden. (Vergrößerung 40fach)

3.3.1.4.2 Expression des humanen beta-Defensin-1 im Adenoidzystischen Karzinom

Das humane beta-Defensin-1 konnte in den epithelialen Tumorzellen des adenoidzystischen Karzinoms identifiziert werden. Dabei ließ sich eine fokale Verteilung der Immunreaktion zeigen (siehe Abbildung 14).

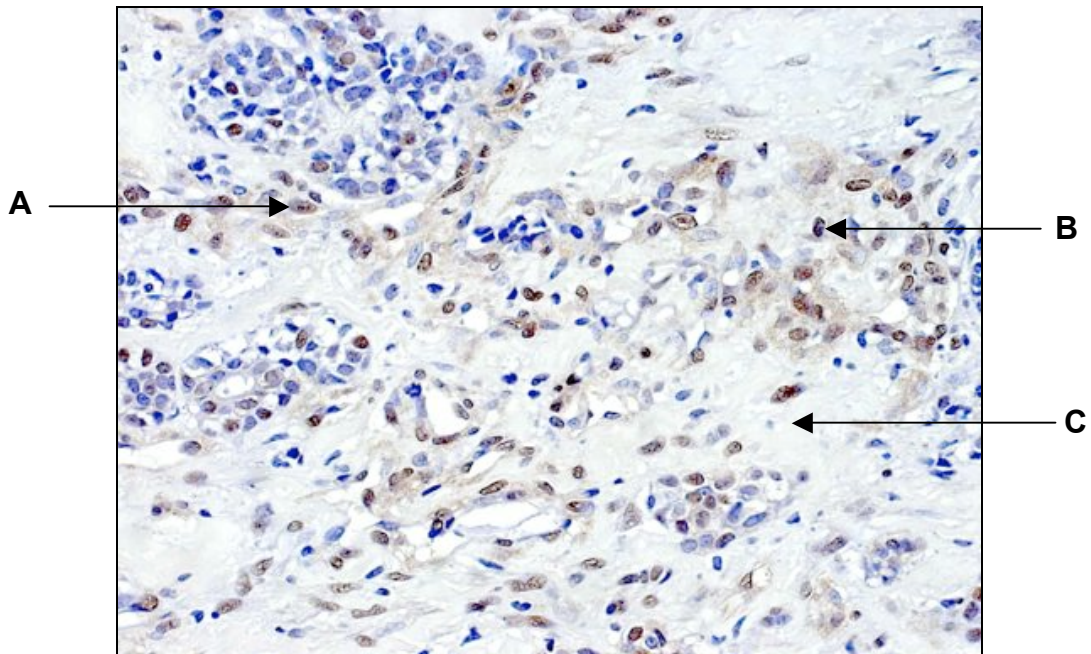


Abbildung 14

Immunhistochemische Darstellung des humanen beta-Defensin-1 im adenoidzystischen Karzinom der kleinen Speicheldrüse der Wange. Es konnten fokale unterschiedliche Immunreaktionen der epithelialen Tumorzellen dargestellt werden (A). Zusätzlich ließen vereinzelte Zellkerne eine positive Immunreaktion für hBD-1 erkennen (B). Für Komponenten der interzellulären Matrix wurden keine positiven Immunreaktionen festgestellt (C). (Vergrößerung 40fach)

3.3.1.5 Vergleich der Expression des humanen beta-Defensin-1 in gesunder, bestrahlter, entzündlich und tumorös veränderter Speicheldrüse

Die Expression des humanen beta-Defensin-1 konnte in gesunder, bestrahlter und entzündlich veränderter Speicheldrüse sowie in Tumoren der Speicheldrüse dargestellt werden. Die Immunfärbung wurde ausschließlich in den Epithelzellen lokalisiert. Die Azinuszellen zeigten keine Immunreaktion. Darüber hinaus konnten in Makrophagen und Gefäßendothelzellen eine Expression von hBD-1 gezeigt werden. Die Auswertung der relativen mittleren Grauwerte für die Immunreaktion von hBD-1 zeigte, dass signifikante Unterschiede innerhalb der Gruppe der bestrahlten Speicheldrüsen ($p = 0.005$) messbar waren. Der Vergleich der Gruppen untereinander demonstrierte eine stärkere Immunreaktion in den Streifenstücken der gesunden Speicheldrüse als in der

bestrahlten Speicheldrüse. Die dargestellten Unterschiede waren jeweils von den verschiedenen Donoren abhängig (siehe Abbildung 15). In der entzündlich veränderten Speicheldrüse zeigte sich zudem eine polare Verteilung von hBD-1 innerhalb des Zytoplasmas der Epithelzelle. Apikal der Zellkerne ließ sich somit eine verstärkte Immunreaktion darstellen.

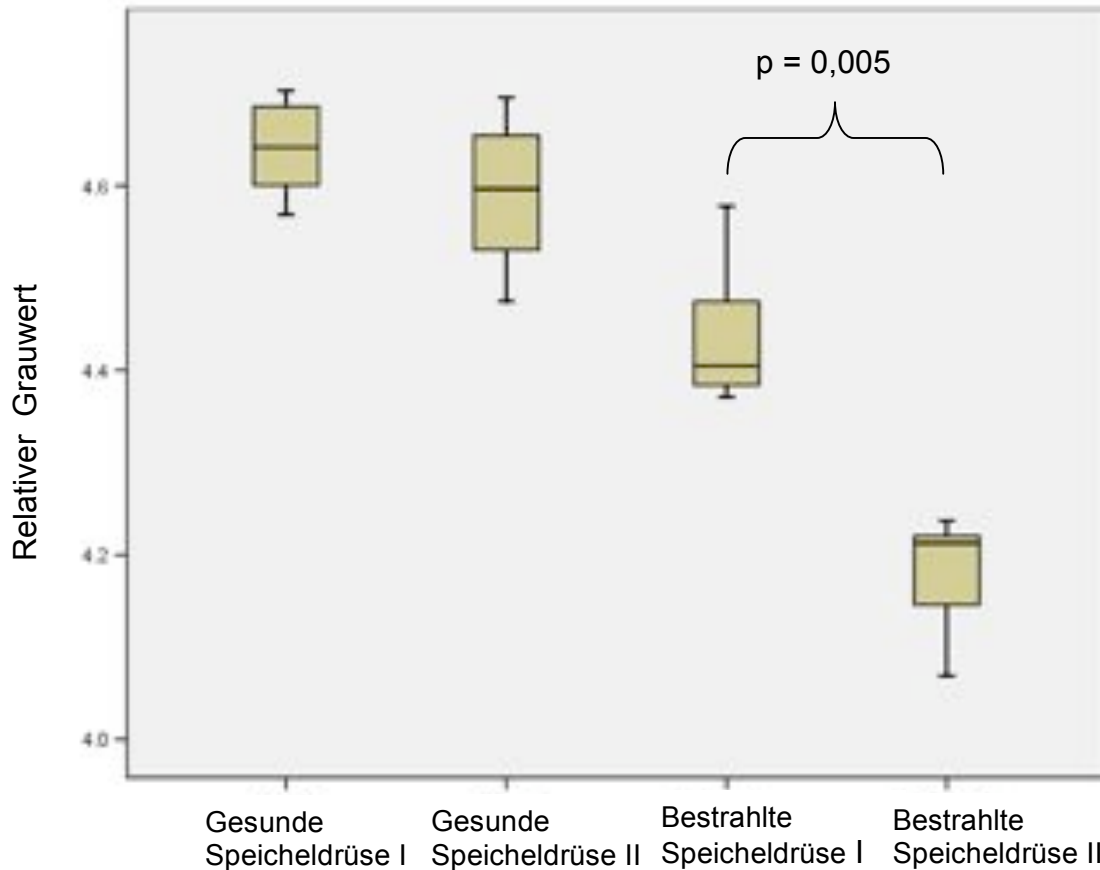


Abbildung 15

Vergleich der Expression des humanen beta-Defensin-1 in gesunder und bestrahlter Glandula submandibularis. In der gesunden Speicheldrüse zeigte sich eine größere Proteinexpression als in der bestrahlten.

3.3.2 Expression des humanen beta-Defensin-2

Die Expression des humanen beta-Defensin-2 konnte in gesunder, bestrahlter sowie entzündlich und tumorös veränderter Speicheldrüse dargestellt werden.

3.3.2.1 Expression des humanen beta-Defensin-2 in gesunder Speicheldrüse

Die Schalt- und Streifenstücke der gesunden Speicheldrüse zeigten eine kaum erkennbare Immunreaktion für das humane beta-Defensin-2 (siehe Abbildung 16).

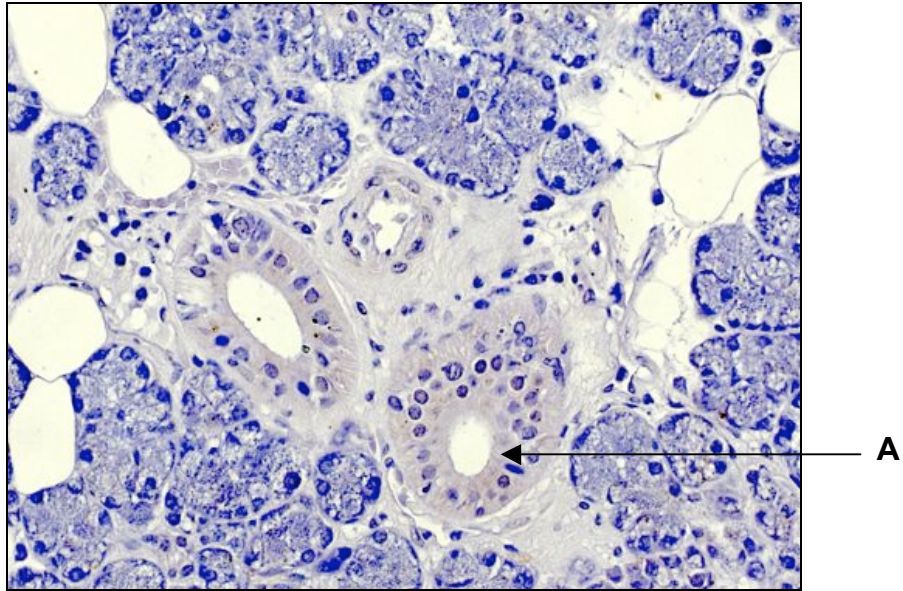


Abbildung 16

Immunhistochemische Darstellung des humanen beta-Defensin-2 in der gesunden Glandula submandibularis. Die Epithelzellen ließen eine sehr geringe Expression erkennen (A). (Vergrößerung 40fach)

3.3.2.2 Expression des humanen beta-Defensin-2 in bestrahlter Speicheldrüse

Die Epithelzellen der Ausführungsgänge der bestrahlten Speicheldrüse zeigten eine schwache Immunreaktion. Eine polare Verteilung zum Lumen hin war erkennbar. Darüber hinaus konnte das Protein in sekretorischen, perinukleären Vesikeln dargestellt werden (siehe Abbildung 17). Zusätzlich ließen sich perivaskuläre entzündliche Infiltrate in der Nähe von intra- bzw. interlobulären Ausführungsgängen lokalisieren (siehe Abbildung 18).

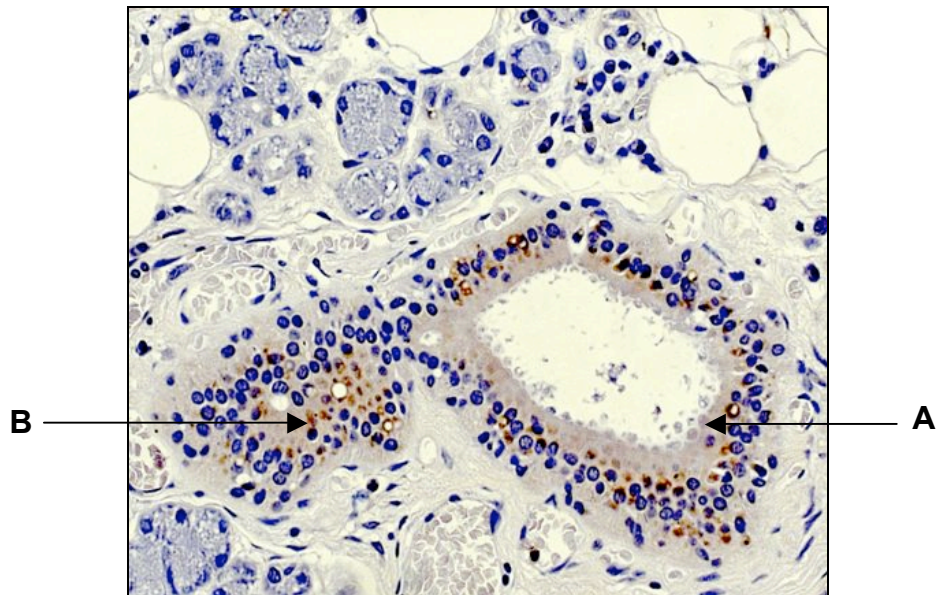


Abbildung 17

Darstellung der immunhistochemischen Reaktion des humanen beta-Defensin-2 in bestrahlter Glandula submandibularis. Neben einer schwachen apikalen Reaktion (A) konnten starke Färbungen in perinukleären Vesikeln (B) gezeigt werden. (Vergrößerung 40fach)

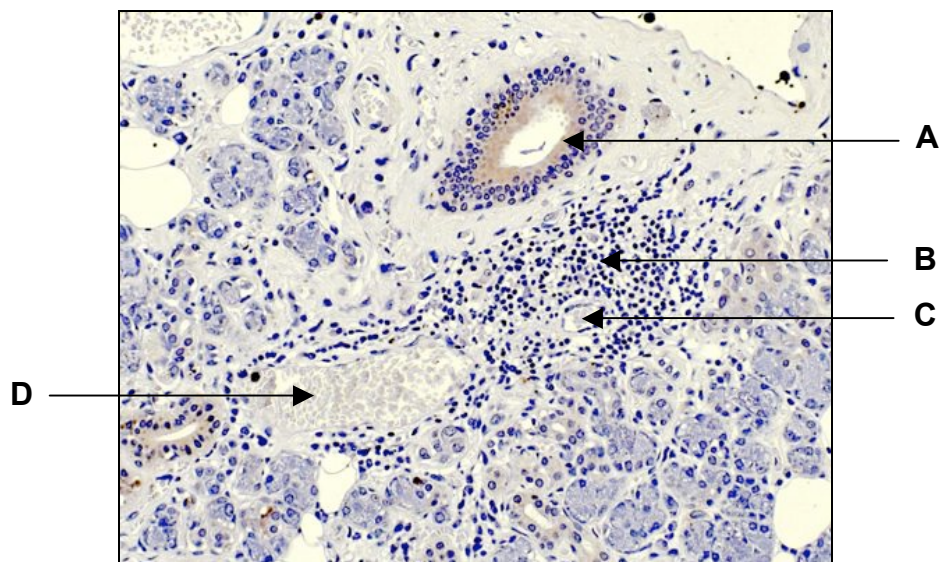


Abbildung 18

Darstellung des humanen beta-Defensin-2 eines intralobulären Ausführungsgangs der bestrahlten Glandula submandibularis (A). In unmittelbarer Nähe der Blutgefäße (C, D) konnte ein perivaskuläres, entzündliches Infiltrat (B) lokalisiert werden. (Vergrößerung 20fach)

3.3.2.3 Expression des humanen beta-Defensin-2 in entzündlich veränderter Speicheldrüse

In der entzündlich veränderten Speicheldrüse (Sialolithiasis) ließ sich eine deutlich luminale Immunreaktion erkennen. Die Immunfärbung zeigte eine polare Verteilung innerhalb der Epithelzelle und war apikal der Zellkerne lokalisiert. (siehe Abbildung 19). Zusätzlich ließ der Vergleich der Intensität der Immunreaktion in den einzelnen Abschnitten des Gangsystems eine verstärkte Immunreaktion in proximaleren Gangabschnitten erkennen (siehe Abbildung 20).

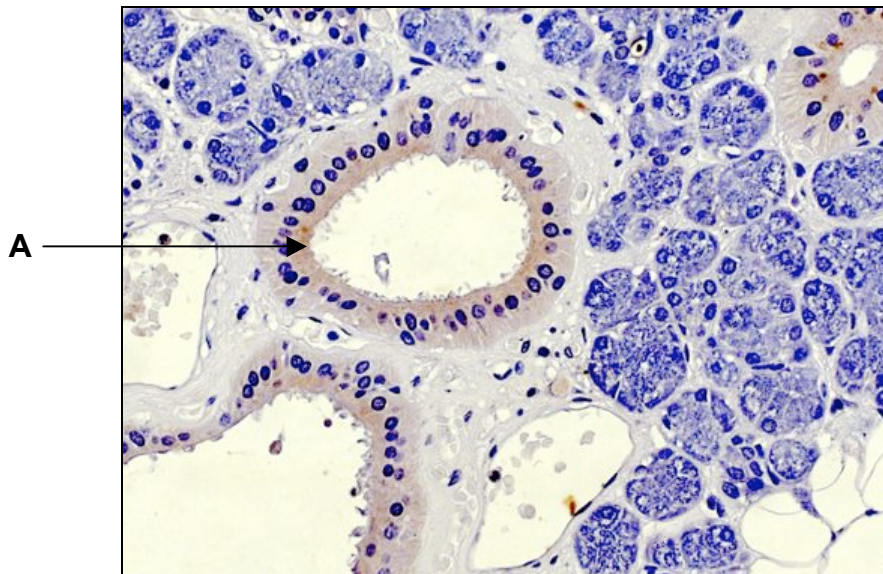


Abbildung 19

Immunhistochemische Darstellung des humanen beta-Defensin-2 in entzündlich veränderter Glandula submandibularis. Eine luminale Immunreaktion konnte gezeigt werden (A). (Vergrößerung 40fach)

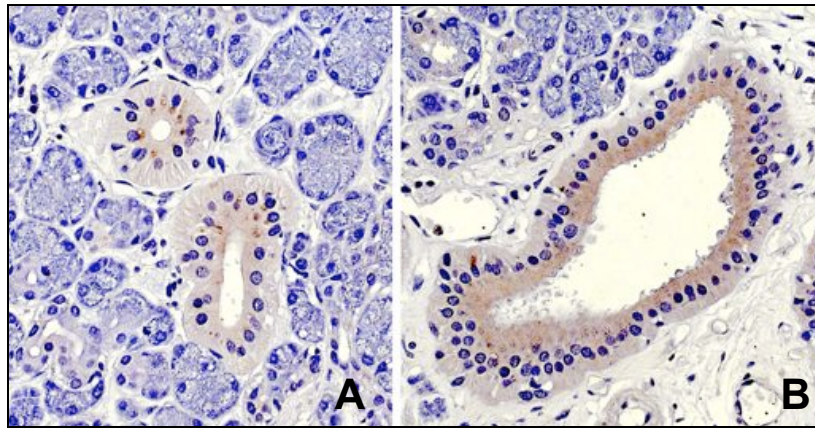


Abbildung 20

Unterschiedliche Intensität der Immunreaktion innerhalb einzelner Abschnitte des Ausführungsgangsystems der entzündeten Glandula submandibularis. Im Vergleich zu den Streifenstücken (A) konnte eine verstärkte Proteinexpression für hBD-2 in den Abschnitten der intra- bzw. interlobulären Ausführungsgänge (B) gezeigt werden. (Vergrößerung 40fach)

3.3.2.4 Expression des humanen beta-Defensin-2 in Speicheldrüsentumoren

3.3.2.4.1 Expression des humanen beta-Defensin-2 im Pleomorphen Adenom

Das humane beta-Defensin-2 konnte im pleomorphen Adenom der Glandula parotis dargestellt werden. Dabei konnten fokale unterschiedliche Immunfärbungen innerhalb der epithelialen Tumorzellen lokalisiert werden (siehe Abbildung 21).

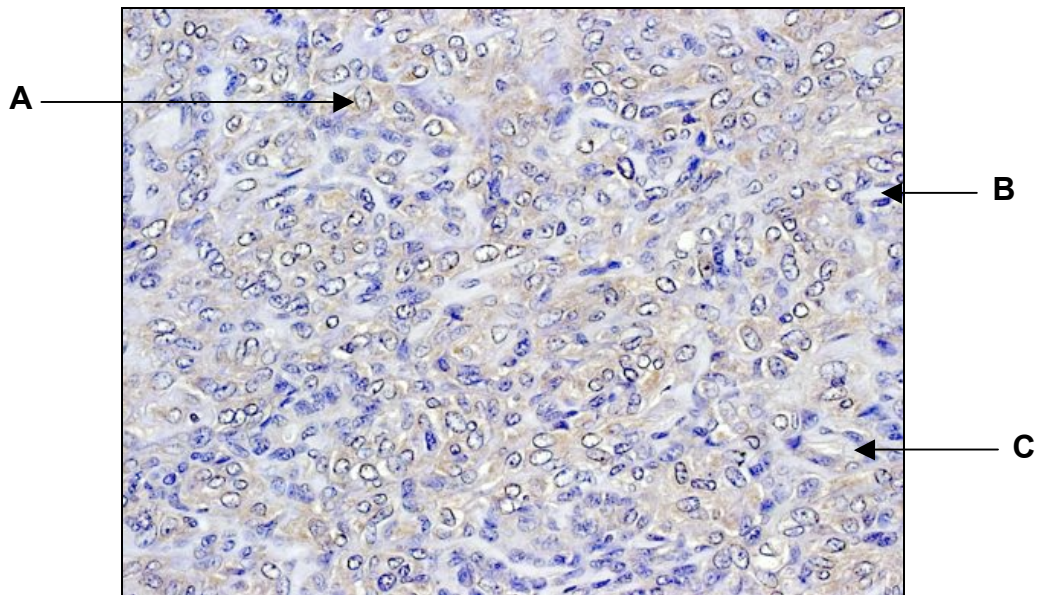


Abbildung 21

Immunreaktion des humanen beta-Defensin-2 im pleomorphen Adenom der Glandula parotis. Fokal unterschiedliche Intensitäten der Immunreaktion wurden im Zytoplasma der Tumorzellen (A) dargestellt. Vereinzelt konnten rudimentäre Pseudoduktuli identifiziert werden (B, C). (Vergrößerung 40fach)

3.3.2.4.2 Expression des humanen beta-Defensin-2 im Adenoidzystischen Karzinom

Das humane beta-Defensin-2 konnte in den epithelialen Tumorzellen des adenoidzystischen Karzinoms der kleinen Speicheldrüse der Wange dargestellt werden. Dabei ließen sich Areale mit einer sehr schwachen und deutlich stärkeren Immunreaktion erkennen (siehe Abbildung 22).

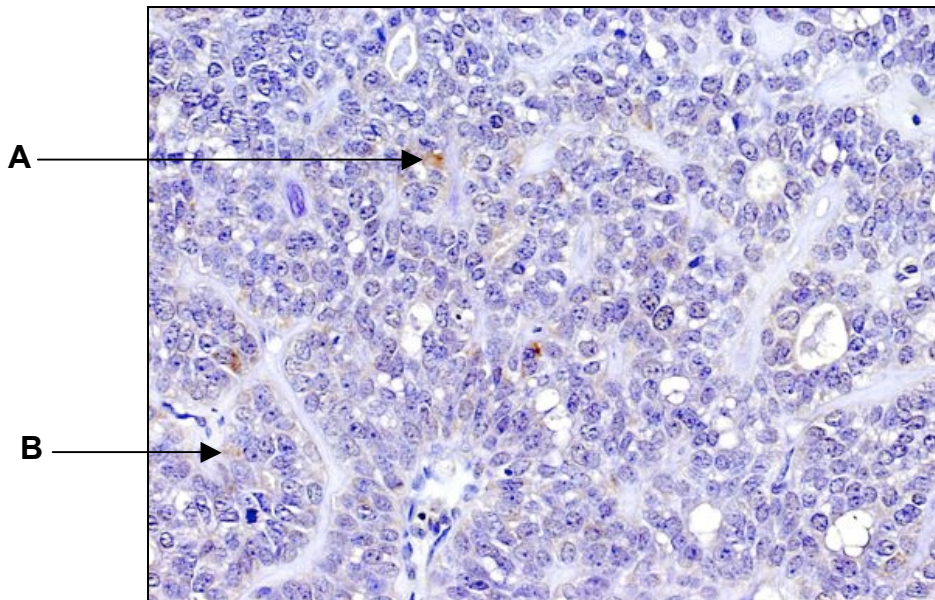


Abbildung 22

Immunhistochemische Darstellung des humanen beta-Defensin-2 im adenoidzystischen Karzinom der kleinen Speicheldrüse der Wange. Es konnte eine schwache Immunreaktion (B) in den Tumorzellen festgestellt werden. Wenig vereinzelte Areale ließen eine stärkere Intensität erkennen (A). (Vergrößerung 40fach)

3.3.2.5 Vergleich der Expression des humanen beta-Defensin-2 in gesunder, bestrahlter, entzündlich und tumorös veränderter Speicheldrüse

Die Expression des humanen beta-Defensin-2 konnte in gesunder, bestrahlter und entzündeter Speicheldrüse sowie in Tumoren der Speicheldrüsen identifiziert werden. Das Prinzip einer luminalen Proteinexpression von hBD-2 wurde in den Epithelzellen des Ausführungsgangsystems der entzündeten und bestrahlten Speicheldrüse beobachtet. Die Auswertung der relativen mittleren Grauwerte für die Immunreaktion von hBD-2 zeigte, dass signifikante Unterschiede innerhalb der Gruppe der gesunden ($p = 0,028$) sowie der bestrahlten Speicheldrüse ($p = 0,017$) messbar waren. Der Vergleich der Gruppen untereinander demonstrierte eine stärkere Immunreaktion in den Streifenstücken der bestrahlten Speicheldrüse als in der gesunden Speicheldrüse. Die dargestellten Unterschiede waren jeweils von den verschiedenen Donoren abhängig (siehe Abbildung 23).

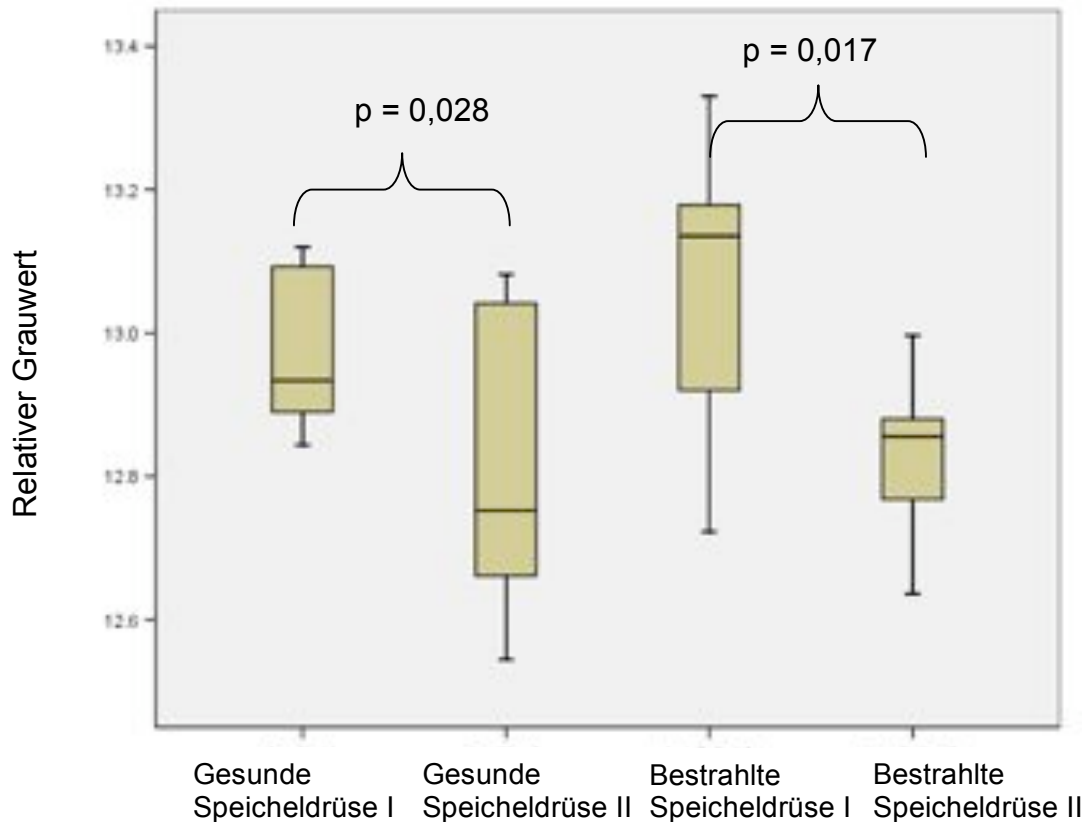


Abbildung 23

Vergleich der Expression des humanen beta-Defensin-2 in der gesunden und bestrahlten Glandula submandibularis. Es konnte eine verstärkte Immunreaktion in der bestrahlten Speicheldrüse gezeigt werden.

3.3.3 Expression des humanen beta-Defensin-3

Die Expression des humanen beta-Defensin-3 konnte in gesunder, radiotherapeutisch und entzündlich veränderter Speicheldrüse sowie in Tumoren der Speicheldrüse dargestellt werden.

3.3.3.1 Expression des humanen beta-Defensin-3 in gesunder Speicheldrüse

In drei der vier gesunden Speicheldrüsenbiopsien konnte das humane beta-Defensin-3 immunhistochemisch identifiziert werden. Es ließ sich eine schwache und gleichmäßige Immunreaktion in allen Abschnitten des Ausführungsgangsystems zeigen. Weiterhin

wurde eine verstärkte Immunfärbung in den Zellkernen aufgefunden (siehe Abbildung 24).

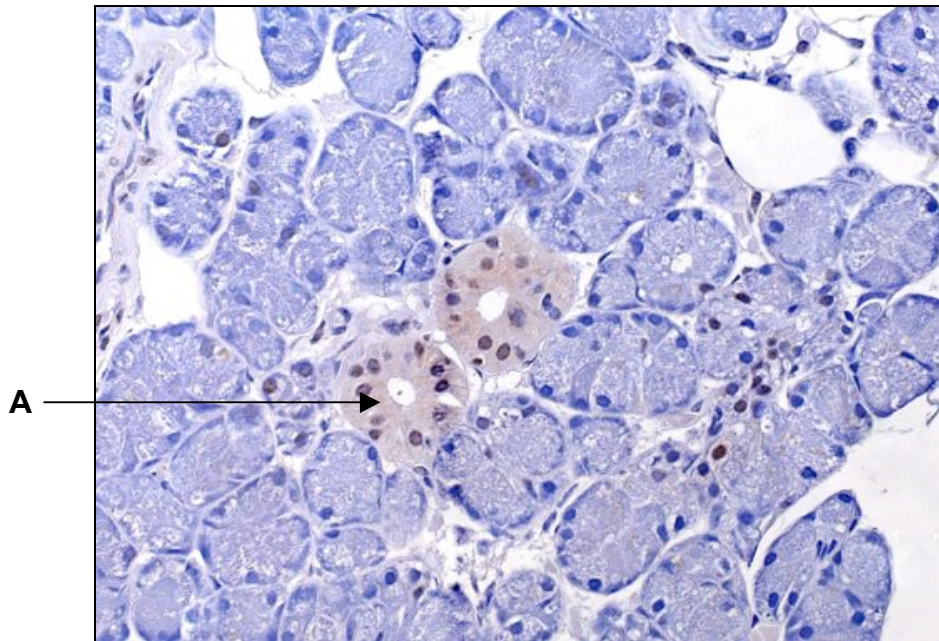


Abbildung 24

Immunhistochemische Darstellung des humanen beta-Defensin-3 in den Streifenstücken der gesunden Glandula submandibularis. Eine sehr schwache Immunreaktion wurde lokalisiert (A). (Vergrößerung 40fach)

3.3.3.2 Expression des humanen beta-Defensin-3 in bestrahlter Speicheldrüse

Die Schalt- und Streifenstücke der bestrahlten Speicheldrüse zeigten eine mäßig starke Immunreaktion in den Epithelzellen. Es lag eine gleichmäßige Immunreaktion in den Epithelzellen vor. Weiterhin ließen sich stark angefärbte perinukleäre Vesikel identifizieren (siehe Abbildung 25).

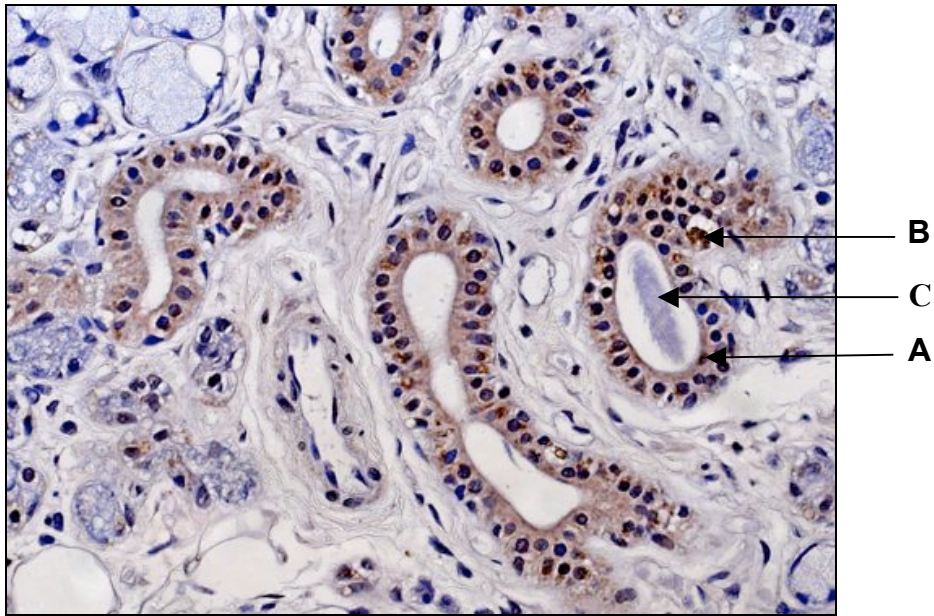


Abbildung 25

Darstellung der immunhistochemischen Färbung des humanen beta-Defensin-3 in bestrahlter Glandula submandibularis. Neben einer verstärkten luminalen Immunreaktion (A) konnten stärker gefärbte perinukleäre Vesikel (B) und Sekretreste im Lumen der Ausführungsgänge (C) dargestellt werden. (Vergrößerung 40fach)

3.3.3.3 Expression des humanen beta-Defensin-3 in entzündlich veränderter Speicheldrüse

In der entzündlich veränderten Speicheldrüse konnte eine schwache Immunreaktion dargestellt werden. Apikal der Zellkerne zeichnete sich eine verstärkte luminal Expression ab. Vereinzelt kleine perinukleäre Vesikel mit verstärkter Immunfärbung ließen sich dokumentieren (siehe Abbildung 26).

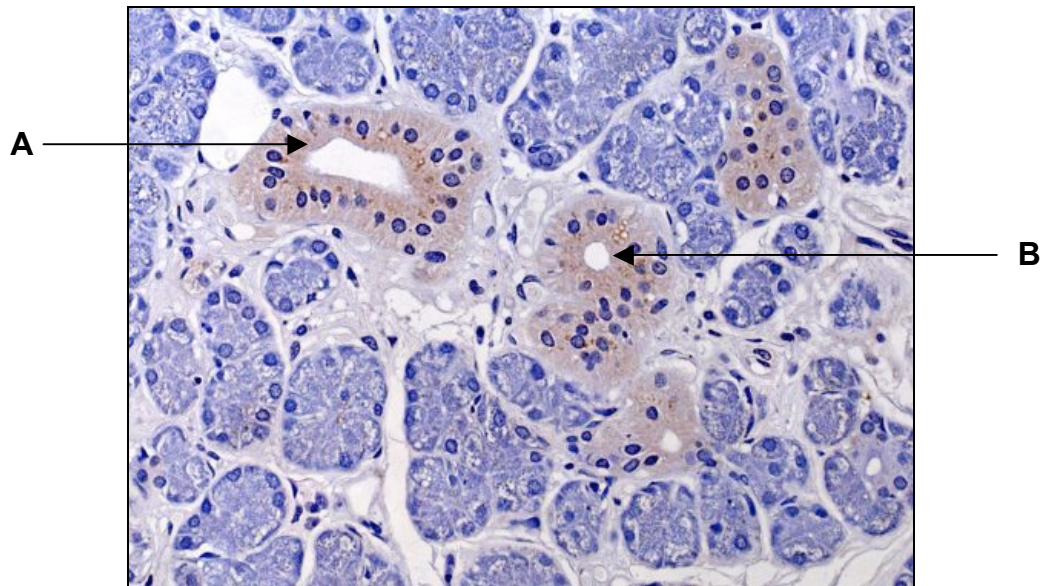


Abbildung 26

Immunohistochemische Darstellung der Expression des humanen beta-Defensin-3 in entzündlich veränderter Glandula submandibularis. Eine verstärkte luminale Expression konnte gezeigt werden (A, B). (Vergrößerung 40fach)

3.3.3.4 Expression des humanen beta-Defensin-3 in Speicheldrüsentumoren

3.3.3.4.1 Expression des humanen beta-Defensin-3 im Pleomorphen Adenom

Das humane beta-Defensin-3 konnte im pleomorphen Adenom der Glandula parotis dargestellt werden. Dabei ließ sich eine fokale Verteilung unterschiedlich intensiver Immunreaktionen im Zytoplasma der epithelialen Tumorzellen zeigen (siehe Abbildung 27).

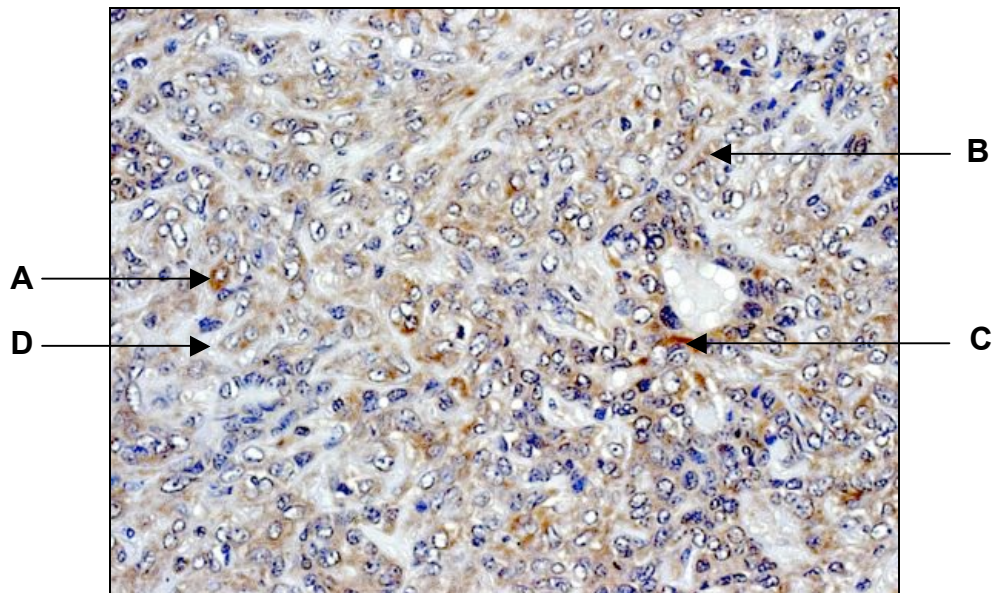


Abbildung 27

Darstellung der Immunreaktion des humanen beta-Defensin-3 im pleomorphen Adenom der Glandula parotis. Es konnte eine starke Immunreaktion unterschiedlicher Intensität dokumentiert werden (A, B). Für eine Vielzahl der gangartigen Formationen wurde eine starke Immunreaktion beobachtet (C). Bindegewebige Stromaareale ließen keine Immunreaktion erkennen (D). (Vergrößerung 40fach)

3.3.3.4.2 Expression des humanen beta-Defensin-3 im Adenoidzystischen Karzinom

Das humane beta-Defensin-3 konnte im adenoidzystischen Karzinom der kleinen Speicheldrüse der Wange immunhistochemisch dargestellt werden. Dabei ließen sich unterschiedlich starke Immunreaktionen im Zytoplasma der Tumorzellen erkennen (siehe Abbildung 28).

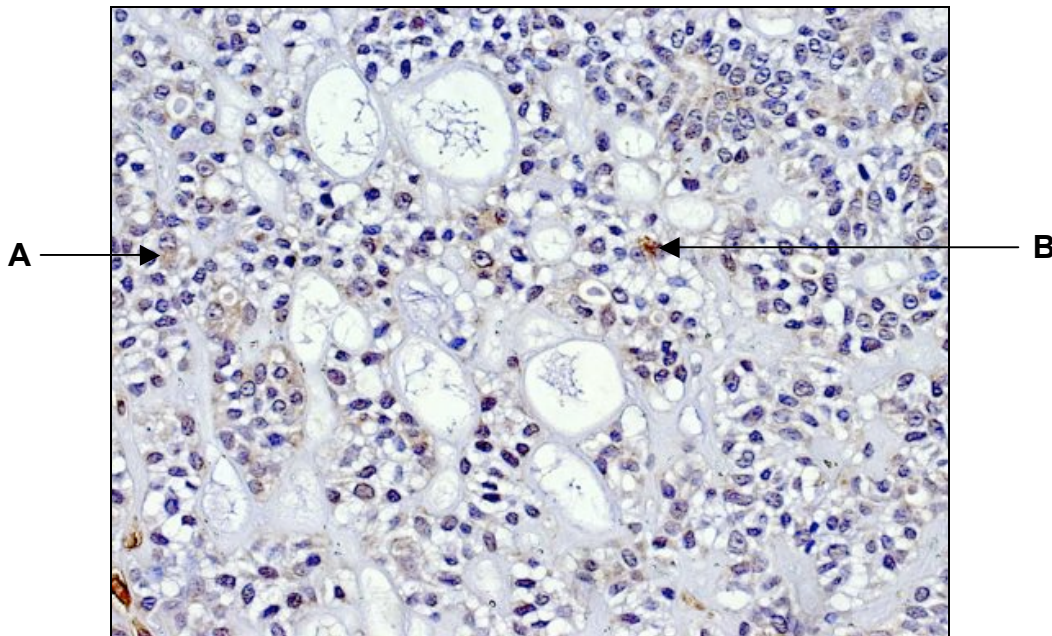


Abbildung 28

Immunhistochemische Darstellung des humanen beta-Defensin-3 im adenoidzystischen Karzinom der kleinen Speicheldrüse der Wange. Das Zytoplasma der epithelialen Tumorzellen zeigte eine starke Immunfärbung unterschiedlicher Intensität (A, B). (Vergrößerung 40fach)

3.3.3.5 Vergleich der Expression des humanen beta-Defensin-3 in gesunder, bestrahlter, entzündlich und tumorös veränderter Speicheldrüse

Aus der Gruppe der gesunden Speicheldrüse ließ eine Biopsie keine deutliche Immunreaktion für hBD-3 erkennen. Die restlichen Proben zeigten eine sehr geringe Immunfärbung. Die Auswertung der relativen mittleren Grauwerte für die Immunreaktion von hBD-3 zeigte, dass signifikante Unterschiede innerhalb der Gruppe der gesunden ($p = 0,002$) sowie der bestrahlten Speicheldrüse ($p = 0,021$) messbar waren. Der Vergleich der Gruppen untereinander demonstrierte eine stärkere Immunreaktion in den Streifenstücken der bestrahlten als in der gesunden Speicheldrüse. Die dargestellten Unterschiede waren jeweils von den verschiedenen Donoren abhängig (siehe Abbildung 29). Zusätzlich konnte eine luminale Proteinverteilung von hBD-3 in der bestrahlten Speicheldrüse gezeigt werden.

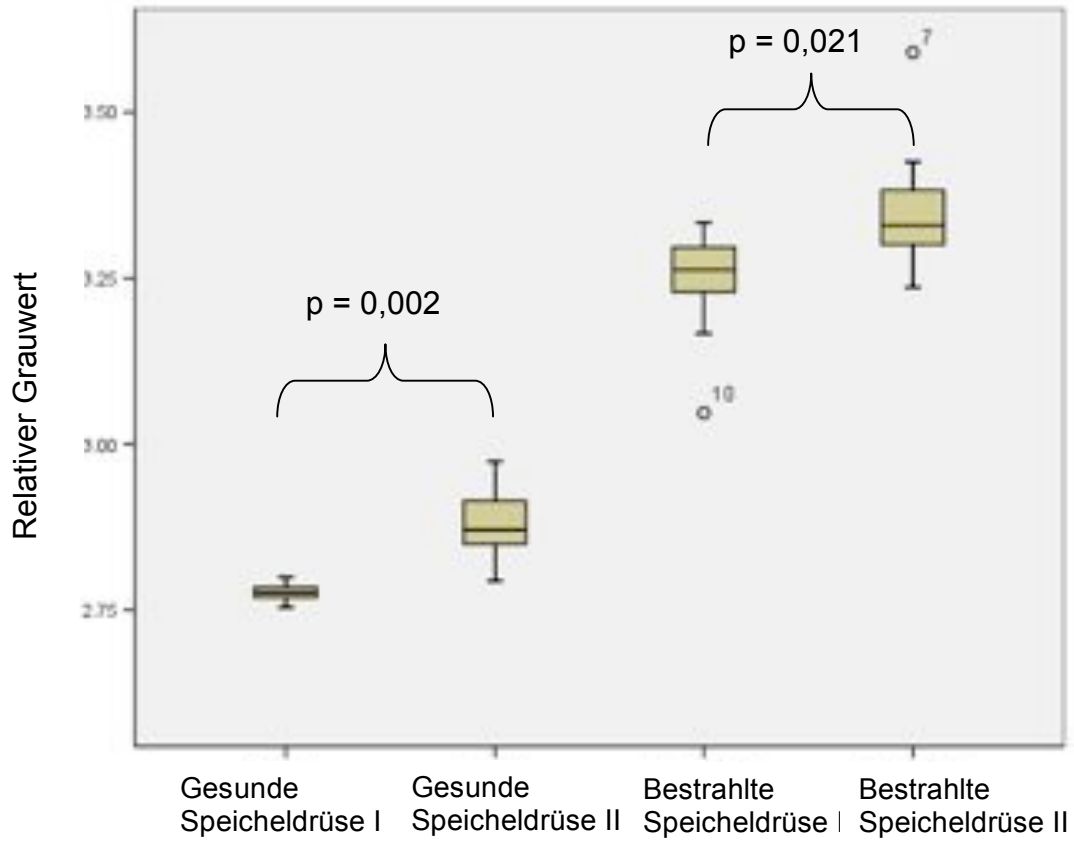


Abbildung 29

Vergleich der Expression des humanen beta-Defensin-3 in der gesunden und bestrahlten Glandula submandibularis. Für die bestrahlte Speicheldrüse zeigte sich eine höhere Expression im Vergleich zur Gesunden.

3.4 Expression von Interleukin-1 beta

Die Expression von Interleukin-1 beta wurde in gesunder, bestrahlter und entzündeter Speicheldrüse dargestellt.

3.4.1 Expression von Interleukin-1 beta in gesunder Speicheldrüse

In allen 4 gesunden Speicheldrüsen konnte eine deutliche Immunreaktion festgestellt werden (siehe Abbildung 30).

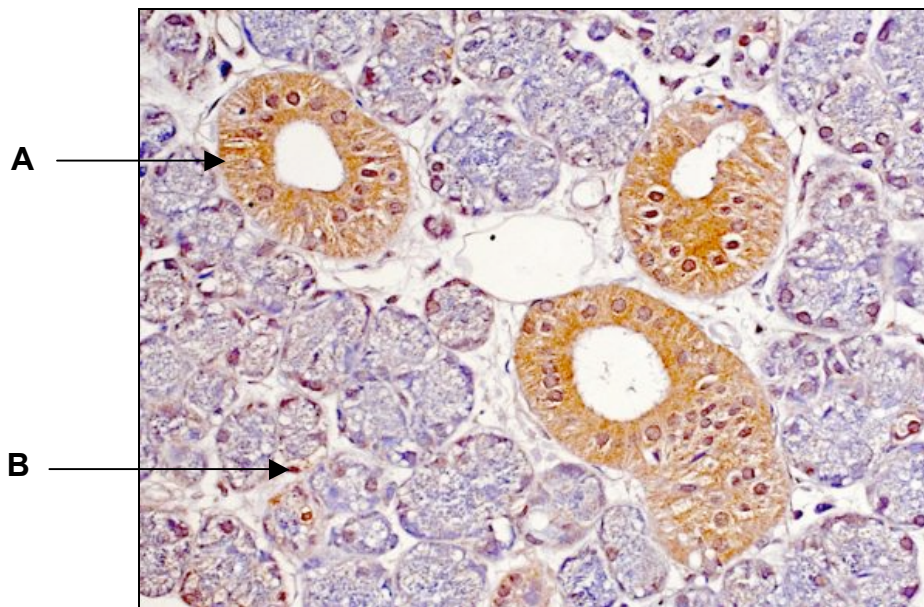


Abbildung 30

Immunhistochemische Darstellung von Interleukin-1 beta in gesunder Glandula submandibularis. Die Schalt- und Streifenstücke zeigten eine moderate, gleichmäßige Immunreaktion (A). Zusätzlich wurde eine Immunreaktion in den Azinuszellen identifiziert (B). (Vergrößerung 40fach)

3.4.2 Expression von Interleukin-1 beta in entzündeter Speicheldrüse

Die Immunreaktion der entzündlich veränderten Speicheldrüse zeigte eine starke Färbung. Eine verstärkte Reaktion apikal der Zellkerne zum Lumen hin zeichnete sich ab (siehe Abbildung 31).

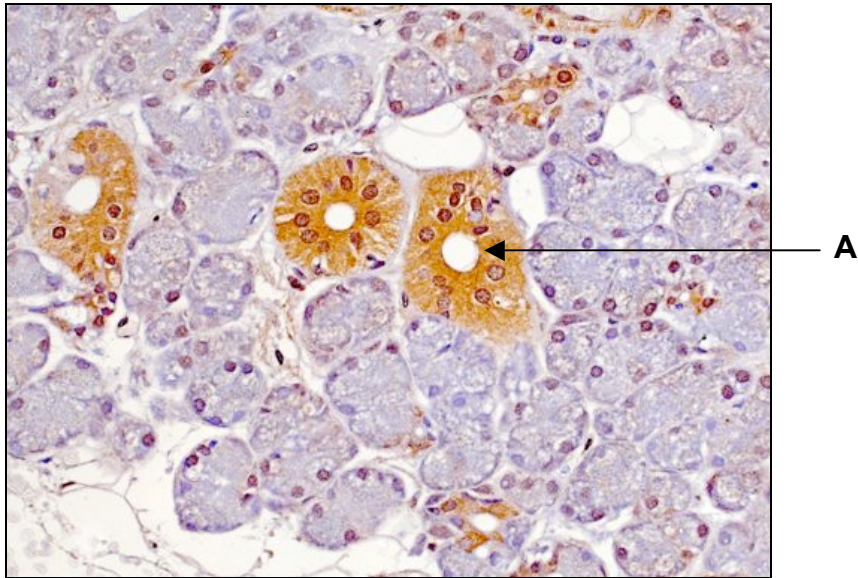


Abbildung 31

Immunhistochemische Darstellung von Interleukin-1 beta in entzündeter Glandula submandibularis. Neben einer gleichmäßig starken Immunreaktion zeichnete sich eine verstärkte Expression apikal der Zellkerne ab (A). (Vergrößerung 40fach)

3.4.3 Expression von Interleukin-1 beta in bestrahlter Speicheldrüse

Die Schalt- und Streifenstücke der bestrahlten Speicheldrüse zeigten eine starke Immunfärbung in den degenerierten Epithelzellen. Diese konnte gleichmäßig in der Zelle lokalisiert werden.

3.4.4 Vergleich der Expression von Interleukin-1 beta in gesunder, bestrahlter und entzündlich veränderter Speicheldrüse

Die Auswertung der relativen mittleren Grauwerte für die Immunreaktion von Interleukin-1 beta zeigte, dass signifikante Unterschiede innerhalb der Gruppe der gesunden ($p = 0,002$) und bestrahlten Speicheldrüse ($p = 0,021$) messbar waren. Der Vergleich der Gruppen untereinander demonstrierte eine stärkere Immunreaktion in den Streifenstücken der bestrahlten als in der gesunden Speicheldrüse. Die dargestellten Unterschiede waren jeweils von den verschiedenen Donoren abhängig (siehe Abbildung 32).

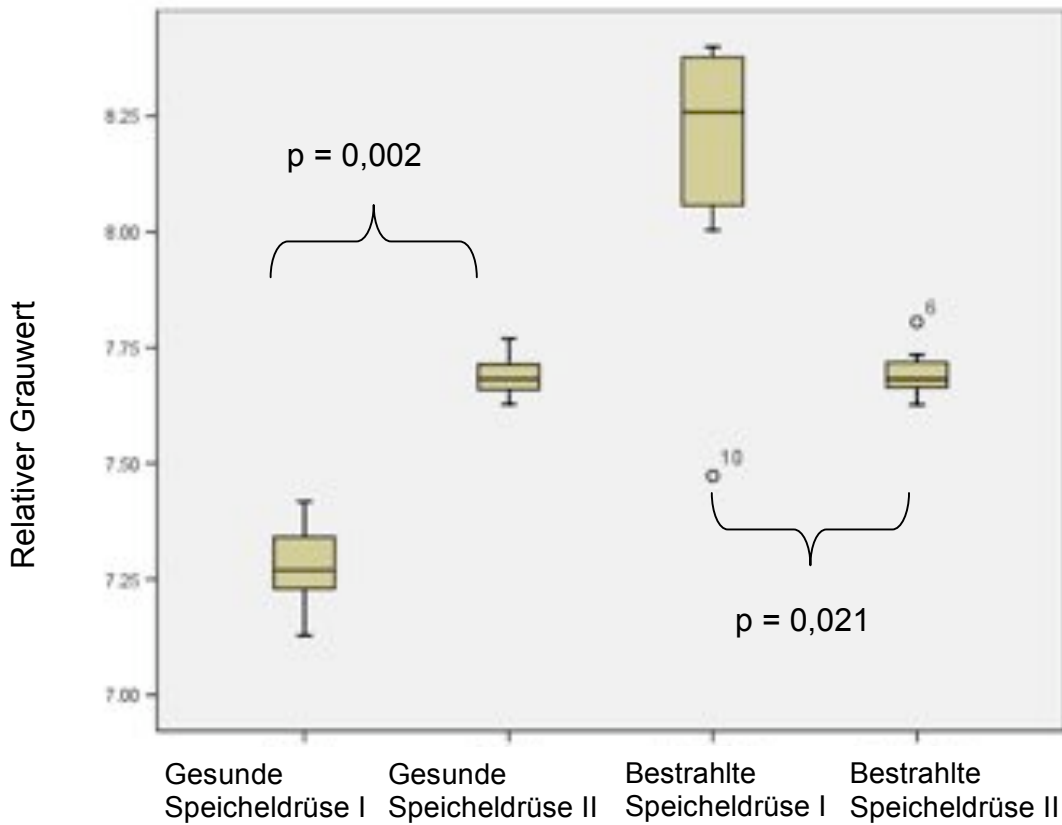


Abbildung 32

Darstellung der Expression von Interleukin-1 beta in der gesunden und bestrahlten Glandula submandibularis. Eine verstärkte Immunreaktion von Interleukin-1 beta konnte in der bestrahlten Speicheldrüse gezeigt werden.

4. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden Untersuchungen mit Gewebeproben der gesunden, entzündlichen und radiotherapeutisch veränderten Glandula submandibularis sowie tumorös veränderter Speicheldrüse durchgeführt. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, immunhistochemische Methoden zur Darstellung der humanen beta-Defensine-1, -2, -3 und Interleukin-1 beta zu etablieren. Die Anfertigung der immunhistochemischen Präparate erfolgte in Anlehnung an die Arbeiten von Götz und Mitarbeitern (Götz et al., 2006; Götz et al., 2003; Lossdörfer et al., 2002).

Die Methode der Immunhistochemie stellt eine wichtige unterstützende Maßnahme in der morphologischen Analyse von Gewebepreparaten dar. Mit Hilfe der Spezifität von Antikörpern kann sowohl das Vorhandensein als auch die Verteilung von Antigenen (z.B. Proteinen) histologisch im Durchlichtmikroskop sichtbar gemacht werden. In Vorversuchen wurde mittels einer Verdünnungsreihe die optimale Konzentration von jedem Primärantikörper (hBD-1, -2, -3, IL-1 beta) für die anschließende Immunfärbung ermittelt. Eine optimale Konzentration des Primärantikörpers wird als diejenige angesehen, bei der verschiedene interzelluläre Färbintensitäten erkennbar werden und eine unspezifische Hintergrundanfärbung ausgeschlossen werden kann (Grube, 2004). Aus diesem Grund ist die Verwendung von höheren Antikörperverdünnungen zur Bestimmung der optimalen Antikörperkonzentration zu bevorzugen (Grube, 2004). Unspezifische Antikörperreaktionen beeinflussen den Kontrast bzw. die Interpretierbarkeit der spezifischen Immunreaktionen maßgeblich. Als Ursache können zu hohe Konzentrationen des Primärantikörpers, ausgedehnte Inkubationszeiten, Antigendiffusionen in die Umgebung oder ungenügend entparaffinierte Gewebeschnitte in Betracht kommen (Denk, 1999; Dinges, 2002). Um verlässliche Interpretationen der Ergebnisse zu erzielen, wurden bei jedem Versuchsdurchgang Positiv- und Negativkontrollen mitgeführt. Eine Positivkontrolle (Kontrollschnitt) stellt einen Gewebeschnitt dar, in dem eine positive Immunreaktion mit dem Zielantigen dargestellt werden konnte. Idealerweise sollte eine Positivkontrolle eine Immunreaktivität mit stark reagierenden und schwach reagierenden antigenen Strukturen aufweisen. Im Zweifelsfall sollten schwach reagierende Antigene stark reagierenden vorgezogen

werden, um eine spezifische Interpretierbarkeit der Immunreaktion zu ermöglichen (Dinges, 2002).

Die Expression humaner beta-Defensine hBD-1, -2, und -3 konnte in der Epidermis des Menschen nachgewiesen werden (Dorschner et al., 2003; Huh et al., 2002; Oren et al., 2003; Poindexter, 2005; Poindexter et al., 2006). Während für das humane beta-Defensin-1 eine perinukleäre Verteilung innerhalb der Keratinozytenschichten der Epidermis der gesunden Haut gezeigt werden konnte, wurde für das humane beta-Defensin-2 das Stratum germinativum und spinosum als Hauptexpressionsort beschrieben. Das humane beta-Defensin-3 wurde überwiegend in dendritischen Zellen des Stratum spinosum identifiziert (Oren et al., 2003; Poindexter, 2005). In entzündlichen Veränderungen der Haut konnte zum einen eine verstärkte Genexpression von hBD-2 und -3 in den Keratinozyten gezeigt werden. Zum anderen ließen sich stimulierende Effekte der Defensine auf die Interleukin- und Chemokinbildung in der Dermis beobachten (Niyonsaba et al., 2007). Aus diesem Grund dienten Gewebeschnitte der entzündeten, humanen Dermis als Positivkontrolle. Neben einer deutlichen Immunreaktion in den Keratinozyten konnten Infiltrate von Entzündungszellen im subkutanen Bindegewebe identifiziert werden. Die Negativkontrolle diente der Abschätzung der spezifischen Immunreaktion und einer unspezifischen Hintergrundreaktion (Spezifitätskontrolle). In der praktischen Durchführung wurde der Primärantikörper durch eine nicht reagierende Substanz (PBS) ersetzt. Auf diese Art und Weise konnten falsch positive Reaktionen ausgeschlossen werden.

Die qualitative Analyse immunhistochemischer Färbungen beruht auf der Beschreibung der anatomischen Verteilung der Immunreaktion innerhalb der Zelle oder eines Gewebes, auf der Einschätzung und dem Vergleich unterschiedlicher Färbeintensitäten, bzw. auf der Definition von Schwellenwerten einzelner Färbeintensitäten (Seidal et al., 2001). Diese Grenzwerte bestimmen eine Schwellenfärbung, die eine positive Immunreaktion von einer Negativen abgrenzt. Mit Hilfe dieser Definition kann anschließend eine eindeutige Zuordnung zwischen einer positiven und negativen Immunreaktion vorgenommen werden, welche die Grundlage für weiterführende Auswertungen darstellt. Neben diesen qualitativen Auswertungsmöglichkeiten können quantitative Bestimmungen des Antigengehaltes vorgenommen werden. Quantitative

Analysen von Antigenmengen führen zu Ergebnissen mit semiquantitativem Charakter (Grube, 2004). Aufgrund fehlender Standards in der praktischen Durchführung der histochemischen Technik nehmen unterschiedliche Faktoren Einfluss auf die Interpretierbarkeit von Immunreaktionen (Seidal et al., 2001). Zu diesen Faktoren zählen Unterschiede in der Gewebefixierung, in der Einbettmethode, Einzelheiten im Färbeprotokoll oder eine individuelle Deutung der angefertigten Immunfärbung. Semiquantitative Auswertungen können zum einen durch einen relativen Vergleich von Färbeintensitäten untereinander und zum anderen durch eine Auszählung positiver Reaktionen innerhalb eines definierten Gewebeareals erfolgen (Seidal et al., 2001).

Der Speichel des Menschen enthält eine Vielzahl unterschiedlicher antimikrobiell wirkender Peptide, die durch ein synergistisches Zusammenwirken einen entscheidenden Beitrag zur Gesunderhaltung oraler Gewebe leisten. Darunter sind niedermolekulare, kationische Peptide in den Mittelpunkt des Interesses gerückt, die sich zum einen durch eine direkte antimikrobielle Wirkungsweise, zum anderen durch ihre Funktion als Effektormoleküle bzw. Bindeglied zwischen der angeborenen und erworbenen Immunabwehr auszeichnen (Devine, 2003). Hierzu zählen Histatine, das humane Cathelicidin (LL-37) und Defensine (Abiko et al., 2003; Murakami et al., 2002; Van Nieuw Amerongen et al., 2004).

Die erste Untersuchung bezog sich auf die Expression des humanen beta-Defensin-1 in der Glandula submandibularis bzw. tumorösen Veränderungen der kleinen Speicheldrüse der Wange, der Glandula parotis sowie der Glandula submandibularis. Die Expression konnte in allen Proben festgestellt werden und beschränkte sich ausschließlich auf die Epithelzellen der Schalt- und Streifenstücke bzw. der intra- und interlobulären Ausführungsgänge. Der Vergleich der gesunden Glandula submandibularis mit den Proben der bestrahlten Speicheldrüse ließ eine verstärkte Immunreaktion in der gesunden Speicheldrüse erkennen. Für das humane beta-Defensin-1 wurde eine konstitutive mRNA-Expression in der Speicheldrüse bzw. in den Epithelzellen oraler Gewebe beschrieben (Bensch et al., 1995; Dommisch et al., 2005a; Harder et al., 1997; Krisanaprakornkit et al., 1998; Mathews et al., 1999). Im Gegensatz zu gesunden Geweben konnte eine verminderte Genexpression von hBD-1 bei entzündlichen Prozessen gezeigt werden (Islam et al., 2001; Wehkamp et al., 2003).

Weitere Studien konnten belegen, dass neben pathogenen Mikroorganismen auch strahlentherapeutische Anwendungen als Ursache für entzündliche Vorgänge in der Speicheldrüse angesehen werden können (Guchelaar et al., 1997; Stephens et al., 1991; Takeda et al., 2003). Somit kann eine geringere Expression von hBD-1 in der bestrahlten Speicheldrüse mit den Ergebnissen aus der Literatur bestätigt werden. Vereinzelt Schalt- und Streifenstücke bzw. Gangepithelzellen der Probe der entzündlich veränderten Speicheldrüse (Sialolithiasis) zeigten eine verstärkte Proteinexpression von hBD-1 im Vergleich zu den gesunden Proben. Die Immunreaktion ließ eine luminale und somit polare Proteinverteilung innerhalb der Epithelzelle erkennen. Anhand dieses Erscheinungsbildes könnte die Bedeutung und Funktion humaner beta-Defensine in der Speicheldrüse veranschaulicht werden. Zum einen kann die Hypothese unterstützt werden, dass durch die Sekretion dieser Peptide dem Speichel eine weitere antimikrobielle Wirkkomponente hinzugefügt wird. Zum anderen bietet das Ausführungssystem einen Ausbreitungsraum für aufsteigende infektiöse Vorgänge der Mundhöhle, so dass diese Peptide auch in der Speicheldrüse durch die Formation einer lokalen, chemischen Barriere der Invasion von pathogenen Mikroorganismen entgegentreten können. Diese Funktion humaner beta-Defensine wird durch die Tatsache unterstützt, dass die Grenze der Proteinexpression am Übergang der Epithelzellen der Schaltstücke in die Azinuszellen festgestellt werden konnte. Die Beteiligung von bakteriellen Mikroorganismen an der Entstehung und Unterhaltung von entzündlichen Vorgängen der Sialolithiasis wurde in der Literatur beschrieben (Madani et al., 2006; Marchal et al., 2003; Marchal et al., 2001; Teymoortash et al., 2002). Diese Ergebnisse wurden von Sahasrabudhe und Mitarbeiter ebenfalls beschrieben (Sahasrabudhe et al., 2000).

Für das humane beta-Defensin-1 konnte eine Assoziation mit Muzinen in der Speichelflüssigkeit festgestellt werden (Sahasrabudhe et al., 2000). Muzine stellen hochmolekulare, anionische Makromoleküle dar und können mit niedermolekularen, kationischen Peptiden wie zum Beispiel hBD-1 elektrostatische Wechselwirkungen eingehen. Dies hat zur Folge, dass diese Peptide vor einem proteolytischen Abbau (Proteasen) geschützt werden und die Adhärenz auf unterschiedlichen Oberflächen wie zum Beispiel der Mundschleimhaut unterstützt wird. Durch die zusätzliche Eigenschaft der Muzine, sich mit Bakterien zu Aggregaten zusammenzulagern, können diese

kationischen Peptide mit einer größeren Effektivität ihrer antimikrobiellen Wirkung nachkommen (Sahasrabudhe et al., 2000).

In dem Präparat des adenoidzystischen Karzinoms der kleinen Speicheldrüse der Wange konnte in vereinzelt Zellkernen eine Immunreaktion für den Antikörper gegen hBD-1 festgestellt werden. Studien haben gezeigt, dass humane beta-Defensine zytokin-ähnliche Mediatorwirkungen auf Epithelzellen und Odontoblasten-ähnliche Zellen besitzen können (Dommisch et al., 2007a; Niyonsaba et al., 2007). Diese Untersuchungen demonstrierten eine Erhöhung der Gen- und Proteinexpression proinflammatorischer Mediatoren (IL-6, IL-8) als Reaktion auf die Stimulation mit rekombinant hergestellten humanen beta-Defensinen (Dommisch et al., 2007a; Niyonsaba et al., 2007). Des Weiteren konnte in Makrophagen und Gefäßendothelzellen eine positive Immunreaktion für hBD-1 lokalisiert werden. Eine mRNA Expression der humanen beta-Defensin-1 und -2 in Makrophagen konnte in der Vergangenheit dokumentiert werden (Duits et al., 2002). Neben dieser lokalen Wirkungsweise konnten allerdings auch chemotaktische Eigenschaften dieser Peptide zu den Zellen der erworbenen Immunabwehr festgestellt werden (Yang et al., 1999; Oppenheim et al., 2003). Durch diese Zusammenhänge wird deutlich, dass humane beta-Defensine neben der Fähigkeit der Rekrutierung von Zellen der erworbenen Immunabwehr zum Entzündungsort auch zu einer vermehrten Ansammlung der Defensine selbst beitragen.

In dieser Arbeit konnte erstmals die Expression des humanen beta-Defensin-2 in der Glandula submandibularis bzw. tumorös veränderter Speicheldrüse immunhistochemisch identifiziert werden. Dabei zeigten die Proben der bestrahlten und entzündlich veränderten Speicheldrüse eine stärkere Immunreaktion als die gesunden Proben. Die therapeutische Anwendung ionisierender Strahlen führt zu entzündlichen Veränderungen des Speicheldrüsenparenchyms (Dreyer et al., 1989). Für das humane beta-Defensin-2 konnte eine induzierbare Genexpression in entzündlichen Geweben gezeigt werden (Jang et al., 2004; Krisanaprakornkit et al., 2000; Shin et al., 2004; Harder et al., 1997; Hao et al., 2001; Harder et al., 2000; Lehrer, 2004; Liu et al., 2002). Der Vergleich der Immunreaktion der Schalt- und Streifenstücke mit den intra- und interlobulären Ausführungsgängen in der entzündeten Speicheldrüse ließ eine verstärkte luminale Reaktion von hBD-2 in den Ausführungsgängen erkennen. Diese Beobachtung

lässt die Vermutung zu, dass retrograde bzw. aufsteigende Infektionen aus der Mundhöhle zu einer Erhöhung der hBD-2 Expression in proximaleren Gangabschnitten führen. Diese Tatsache gewinnt vor allem dann an Bedeutung, wenn man berücksichtigt, dass die Ausbreitung von aufsteigenden Infektionen bis hin zu den Azinuszellen und darüber hinaus stattfinden kann. In der Probe der Sialolithiasis konnte entsprechend der Immunreaktion für hBD-1 ebenfalls eine luminale Proteinverteilung für hBD-2 dargestellt werden. Eine größere Auswahl an Proben sollte allerdings ausgewertet werden, um die interindividuelle Streuung zu minimieren.

Ebenso wie hBD-2 konnte auch das humane beta-Defensin-3 erstmals immunhistochemisch in der gesunden, entzündeten, bestrahlten Glandula submandibularis bzw. tumorös veränderter Speicheldrüse dargestellt werden. Im Vergleich zur gesunden Speicheldrüse wurde eine höhere Expression von hBD-3 in der bestrahlten Speicheldrüse festgestellt. Für dieses Protein wurde ebenfalls eine induzierbare Genexpression in der Literatur beschrieben (Harder et al., 1997; Kawauchi et al., 2006; Harder et al., 2001). Im Unterschied zu hBD-2, konnte für hBD-3 ein größeres Wirkspektrum gegenüber grampositiven und gramnegativen Bakterien ermittelt werden (Harder et al., 2001). Durch die Einwirkung ionisierender Strahlen konnten morphologische Veränderungen in der bestrahlten Speicheldrüse beobachtet werden. Strahlentherapeutische Maßnahmen sind mit akuten bzw. langfristigen Veränderungen und Nebeneffekten auf das Drüsenparenchym verbunden (Seifert, 1996). Als akute Nebenwirkung treten innerhalb weniger Tage eine verminderte Speichelflussrate mit den Folgen der Mundtrockenheit (Xerostomie), entzündliche Veränderungen der Mundschleimhaut (Mukositis), Geschmacksverlust sowie eine erhöhte Inzidenz von Candidainfektionen auf (Andrews und Griffiths, 2001; Guchelaar et al., 1997; Jham und da Silva Freire, 2006; Redding et al., 2004).

Als Grund für die kurzfristig auftretende Verminderung der Speichelsekretion wird eine Zerstörung der Zellmembran der Azinuszellen angesehen. Die Einwirkung ionisierender Strahlen auf Wassermoleküle begünstigt die Entstehung von freien Radikalen (Konings et al., 2005). Durch weitere Radikalbildungen wird eine Kettenreaktion ausgelöst, die letztendlich zu einer Zerstörung der Zellmembran der Azinuszellen führt. Durch diese Prozesse werden zelluläre Signaltransduktionskaskaden unterbrochen und die Sekretion des Primärspeichels gestört (Konings et al., 2005). Als langfristige,

persistierende Dauerschäden werden histomorphologische Veränderungen und Degenerationen des Drüsenparenchyms beobachtet, die von der Strahlendosis, der Fraktionierung und der Lage der Speicheldrüse im Strahlenfeld abhängen (Seifert, 1996; Vissink et al., 2003). In der bestrahlten Speicheldrüse konnten stark degenerierte Azinuszellen und ausgeprägte Gangproliferationen identifiziert werden, die durch dysplastische Epithelzellen mit atypisch vergrößerten Zellkernen gekennzeichnet waren. Sullivan und Mitarbeiter konnten in histologischen Untersuchungen von Biopsien der chemoradiotherapeutisch behandelten Glandula submandibularis ähnliche morphologische Veränderungen dokumentieren (Sullivan et al., 2005). Als weitere Beobachtung kann hervorgehoben werden, dass die Epithelzellen des Gangsystems im Vergleich zu den Azinuszellen eine größere Resistenz gegenüber ionisierender Strahlen aufwiesen. Untersuchungen des Zytokeratinskeletts von Gangepithelzellen der Glandula submandibularis ließen eine verstärkte Immunreaktion in bestrahlten Biopsien erkennen (Sullivan et al., 2005). Zytokeratin stellt ein Intermediärfilament dar, das zum einen dem Struktur- und Formerhalt der Zelle dient, zum anderen aber auch intrazelluläre, vesikuläre Transportfunktionen übernimmt (Bartel-Friedrich et al., 2000). Die verstärkte Expression dieser Filamente trägt zu einer erhöhten Strahlenresistenz der Gangepithelien gegenüber den Azinuszellen bei. Darüber hinaus führen ionisierende Strahlen zu irreversiblen Schädigungen der DNA von Progenitor- und Stammzellen, so dass die Regeneration der sezernierenden Drüsenepithelien unterbleibt (Nagler, 2002). Zusätzlich kann die Degeneration der Blutgefäße, des Nervengewebes und eine zunehmende Fibrosierung des interstitiellen Bindegewebes zu unterschiedlich ausgeprägten Funktionsverlusten des Drüsenparenchyms führen.

Des Weiteren konnten in der radiotherapeutisch veränderten Speicheldrüse periduktale, lymphozytäre Infiltrate als Zeichen einer akuten oder chronischen Entzündung lokalisiert werden. Teymoortash und Mitarbeiter haben die Lymphozyteninfiltrate der entzündlich veränderten Speicheldrüse näher untersucht. Sie konnten ein vermehrtes Auftreten von CD4-T-Lymphozyten, B-Lymphozyten und Plasmazellen zeigen (Teymoortash et al., 2004). In einer weiteren Studie mit Biopsien der bestrahlten Glandula submandibularis konnte zusätzlich eine verstärkte Infiltration von zytotoxischen T-Lymphozyten nachgewiesen werden (Teymoortash et al., 2005). Lau und Mitarbeiter konnten einen Zusammenhang zwischen antimikrobiellen Peptiden (Cathelicidin LL-37) und der

Apoptose in Epithelzellen zeigen (Lau et al., 2006). Darüber hinaus wurden zytotoxische Einflüsse von hBD-3 in der Literatur beschrieben (Ganz, 2003; Lehrer, 2004; Sakamoto et al., 2005). Diese Zusammenhänge lassen eine verstärkte Immunreaktion von hBD-3 in der entzündlich und radiotherapeutisch veränderten Speicheldrüse vermuten, da eine Beteiligung von hBD-3 an der Abwehr von Mikroorganismen bzw. an Apoptosevorgängen angenommen werden kann.

Für das humane beta-Defensin-1 und -2 wurde eine verminderte Aktivität unter physiologischen Ionenkonzentrationen, wie sie im Blutserum oder Ultrafiltraten vorliegen, festgestellt (Schröder und Harder, 2006). Als Grund wird eine elektrostatische Wechselwirkung der positiven Ladungen der Defensine mit gelösten Ionen diskutiert (Pazgier et al., 2006). Somit können humane beta-Defensine eine verstärkte antimikrobielle Wirkung auf Epitheloberflächen der Haut und Mundschleimhaut sowie in der hypotonen Speichelflüssigkeit der Mundhöhle ausüben. Im Unterschied zu hBD-2 wurde für das humane beta-Defensin-3 eine uneingeschränkte antimikrobielle Wirksamkeit auch unter physiologischen Ionenkonzentrationen ermittelt (Lehrer, 2004). Zusammen mit einem allgemein größeren Wirkspektrum gegenüber grampositiven und gramnegativen Mikroorganismen kann es als wirksamstes der drei beta-Defensine angesehen werden und rechtfertigt so die verstärkte Immunreaktion von hBD-3 in entzündlich und radiotherapeutisch veränderter Speicheldrüse. Allerdings sollten weitere Proben ausgewertet werden, um die interindividuelle Streuung zu minimieren.

Eine Proteinexpression von Interleukin-1 beta konnte sowohl in den Gangepithelzellen als auch in den Azinuszellen der gesunden, entzündeten und radiotherapeutisch veränderten Speicheldrüse lokalisiert werden. Als proinflammatorisches Zytokin stellt es eine bedeutende Rolle als Mediatormolekül zwischen der angeborenen und erworbenen Immunabwehr dar. Die Expression von Interleukin-1 beta in der Speicheldrüse wurde in der Literatur beschrieben (Cauli et al., 1995). Im Vergleich zur gesunden Speicheldrüse ließ sich eine verstärkte Immunreaktion in der bestrahlten Speicheldrüse beobachten. Eine vermehrte Genexpression von Interleukin-1 beta konnte in der entzündeten bzw. radiotherapeutisch veränderten Speicheldrüse gezeigt werden (Takeda et al., 2003). Ähnlich wie für die humanen beta-Defensine konnte auch für Interleukin-1 beta eine polare, luminale Proteinverteilung innerhalb der Epithelzellen in entzündlich und

radiotherapeutisch veränderter Speicheldrüse gezeigt werden. Yao und Mitarbeiter konnten darüber hinaus in einem Mausmodell nachweisen, dass der Kontakt mit Lipopolysacchariden gramnegativer Bakterien zu einer erhöhten Expression und Sekretion von Interleukin-1 beta in den Speichel führt (Yao et al., 2005). Somit kann ein Zusammenhang zwischen einer erhöhten Genexpression von Interleukin-1 beta und den humanen beta-Defensinen-2 und -3 und einer verstärkten Immunreaktion dieser Peptide tendenziell hergestellt werden.

Für den semiquantitativen Vergleich der Expression der humanen beta-Defensine-1, -2, -3 und Interleukin-1 beta wurden aus den Gruppen der gesunden, entzündeten und bestrahlten Glandula submandibularis jeweils 2 Proben ausgewählt und mit Hilfe der Computersoftware AxioVision® weitergehend analysiert. In den Präparaten der benannten Gruppen wurden jeweils 10 Schalt- und Streifenstücke für die fotografische Auswertung bestimmt und unter standardisierten Bedingungen fotografiert. Szeszel und Mitarbeiter haben Richtlinien für die quantitative Bildanalyse entwickelt, um variable Parameter der Kamera- und Mikroskopeinstellungen zu minimieren und reproduzierbare Messergebnisse zu ermöglichen (Szeszel et al., 2005). Dabei sollten die Parameter wie Lichtintensität, Ausrichtung der Beleuchtungsquelle, die Belichtungszeit oder der künstliche Lichteinfall von außen während der Anfertigung von Messaufnahmen konstant gehalten und für zusätzliche Aufnahmen dokumentiert werden. Computerunterstützte Bildanalysen immunhistochemischer Färbungen bieten den Vorteil, dass unterschiedliche Farbwerte der Immunreaktionen genauer erfasst werden können. Mit der Voraussetzung, dass diese Messbilder unter gleichen Bedingungen aufgenommen werden, können so kleinere Intensitätsunterschiede in der Farbreaktion von einem Computerprogramm bestimmt und untereinander effektiver miteinander verglichen werden. In der Literatur wurden zahlreiche Anwendungen softwareunterstützter Bildanalysen zur semiquantitativen Auswertung immunhistochemischer Reaktionen beschrieben (Brey et al., 2003; Elie et al., 2003; Lehr et al., 1997; Lehr et al., 1999; Matkowskyj et al., 2000; Matkowskyj et al., 2003; Underwood et al., 2001). Vor der Anfertigung der Messbilder wurde eine Kalibrierung des Kamerasystems nach den genannten Richtlinien durchgeführt (Grube, 2004). Dies beinhaltete auch die Durchführung einer so genannten „Shading-Korrektur“. Durch dieses Vorgehen konnten Helligkeitsunterschiede innerhalb der Aufnahmen

ausgeglichen werden. Eine gleichmäßig ausgeleuchtete Messaufnahme ist für einen quantitativen bzw. semiquantitativen Bildvergleich von besonderer Bedeutung. Das Messprogramm AutMess (Automatisches Messen) der AxioVision® Software der Fa. Zeiss stellt ein auf dem Bildbearbeitungsprogramm Photoshop (Adobe®) basierendes Computerprogramm dar. Mit Hilfe ähnlicher Funktionen bzw. Bedienelementen kann eine selektive Erfassung immunhistochemisch gefärbter Bildareale vorgenommen werden. Jedem Pixel dieser ausgewählten Fläche unterliegt ein Grauwert bzw. eine Information im Rot-, Grün- oder Blaukanal, die in einem Zahlenwert von der Software gespeichert wird. Für diese selektive Markierung ist eine deutliche Immunreaktion von großem Vorteil, denn unspezifische Reaktionen mit einer undeutlichen Abgrenzung zum Hintergrund erschweren die Auswahl des markierten Bereichs und ergeben ungenaue und schlecht reproduzierbare Messungen. Die Zahlenwerte wurden dokumentiert und anschließend für statistische Auswertungen herangezogen. Die Vorteile dieser Auswertungsmöglichkeit immunhistochemischer Reaktionen können darin gesehen werden, dass zum einen auch geringfügige Intensitätsunterschiede miteinander verglichen werden können, zum anderen in der Möglichkeit, die Ergebnisse grafisch zu veranschaulichen. Ein zusätzlicher Vorteil besteht darin, dass der Grauwert leicht ermittelt werden kann, ohne die Messfotos in andere Fotobearbeitungsprogramme (z.B. Adobe Photoshop) übertragen zu müssen. Neben der Bestimmung von Intensitätsunterschieden kann auch das Verhältnis zwischen positiver und negativer Immunreaktionen in einem definierten Zählfenster ermittelt werden.

Bei diesen Auswertungen sollte allerdings nicht außer Acht gelassen werden, dass es sich um semiquantitative Bestimmungen bzw. Einschätzungen des Antigengehaltes handelt, die in den einzelnen Gruppen ausschließlich relativ miteinander verglichen werden können. Weiterhin zeigten sich deutliche intra- und interindividuellen Variationen für die einzelnen Immunreaktionen. Aufgrund fehlender Standardisierungsmaßnahmen und Kontrollschnitten mit bekanntem Antigengehalt können keine Vergleiche mit absoluten Antigenmengen untereinander vorgenommen werden. Daher sind die dargestellten Unterschiede für die Immunreaktionen humaner beta-Defensine und IL-1 beta als deskriptiv bzw. als Auffälligkeiten zu bewerten. Zahlreiche Einflüsse in der praktischen Durchführung der Immunfärbung wirken sich auf die endgültige Färbung aus. Grube und Mitarbeiter haben diese einflußnehmenden Faktoren näher untersucht

und analysiert (Grube, 2004). Dabei konnten die Schichtdicke des histologischen Präparates, die Verdünnung des Primärantikörpers und die Puffersubstanzen, indem der Antikörper gelöst wird, als entscheidende Faktoren bestimmt werden. Als zusätzlicher Faktor wurden Variationen in der praktischen Durchführung einzelner Färbdurchgänge ermittelt. Aus diesem Grund können Intensitätsunterschiede von immunhistochemischen Reaktionen am besten miteinander verglichen werden, wenn alle Präparate in einem Durchgang und mit einer Verdünnung des Primärantikörpers angefärbt werden. In Anlehnung an die Richtlinien von Grube und Mitarbeitern wurden daher alle Gewebeschnitte der Glandula submandibularis mit ein und demselben Verdünnungsansatz für den jeweiligen Primärantikörper inkubiert (Grube, 2004).

Zusammenfassend kann für die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit gesagt werden, dass Interpretationen der gemessenen mittleren Grauwerte aufgrund individueller Expressionsvarianzen der untersuchten Proteine erschwert wurden. Hier zeigten die jeweiligen Donoren einer Gruppe bereits statistisch signifikante Unterschiede. Aus diesem Grund können, trotz der präzisen Messeinstellungen, keine definitiven Rückschlüsse auf die Expressionsprofile der untersuchten Peptide/Proteine im Vergleich der Gruppen untereinander gezogen werden. Für quantitative Analysen müssten größere Fallzahlen in die Untersuchung einbezogen werden.

Der Speichel des Menschen stellt eine wichtige Grundlage für die Aufrechterhaltung eines Gleichgewichts zwischen einer permanenten mikrobiellen Besiedlung oraler Gewebe und unterschiedlichen Abwehrleistungen des Körpers dar. Er wird von den mukösen und serösen Azinuszellen der Speicheldrüsen gebildet und in Sekretionsvesikeln gespeichert (Aps und Martens, 2005). Die Sekretionsrate unterliegt sowohl einem zirkadianen Rhythmus als auch einer Regulation durch das autonome, vegetative Nervensystem. Die Beteiligung der jeweiligen großen Speicheldrüse an der Speichelproduktion entscheidet über die Eigenschaften und Zusammensetzung des Gesamtspeichels. Unter Ruhebedingungen wird die Hauptproduktion des Speichels von der Glandula submandibularis übernommen. Bei einer Stimulierung der Speichelsekretion wird die Produktion eines elektrolytreichen, serösen Speichels der Glandula parotis verstärkt, so dass die Speichelflüssigkeit eine niedrigvisköse Konsistenz annimmt. Während der Passage durch das Gangsystem erfolgt eine

Rückresorption von Natrium-, Chlorid- und Bikarbonationen aus dem Primärspeichel und eine hypotone Speichelflüssigkeit wird in die Mundhöhle abgegeben (Aps und Martens, 2005). Unter stimulierten Bedingungen fließt mehr Speichel durch die Ausführungsgänge und es bleibt weniger Zeit für eine Rückresorption von Natrium-, Chlorid- und Bikarbonationen. Durch diese Vorgänge resultiert eine höhere Bikarbonatkonzentration bzw. eine erhöhte Pufferkapazität im niedrig viskosen Speichel, der durch die Neutralisation von bakteriellen Stoffwechselprodukten der Demineralisation der Zähne entgegenwirkt (Aps und Martens, 2005). Zusätzlich können antimikrobielle Peptide und Proteine, wie Muzine, Lactoferrine, Histatine, Cathelicidine oder Defensine in der Mundhöhle verteilt und zu ihren Wirkorten transportiert werden. In klinischen Untersuchungen konnte ein Zusammenhang zwischen der Konzentration antimikrobiell wirkender Peptide in der Speichelflüssigkeit und der Kariesinzidenz beobachtet werden. So konnte gezeigt werden, dass Individuen mit einer erhöhten Konzentration an alpha-Defensinen im Speichel weniger an Karies erkrankten (Dale et al., 2006; Tao et al., 2005). Die verschiedenen antimikrobiellen Peptide des Speichels üben ihre antimikrobielle Wirkung zum Teil direkt durch eine Interaktion mit der Zellmembran der Mikroorganismen aus. Auf Grund gemeinsamer, kationischer Eigenschaften vieler antimikrobieller Peptide kommt es zu einer Beeinflussung des Membranpotentials bzw. einem Einbau von permeablen Ionenkanälen in die Phospholipidmembran von Mikroorganismen. Die konstitutive Expression des humanen beta-Defensin-1 ermöglicht eine Grundabwehr gegenüber pathogenen Mikroorganismen, ohne dass Entzündungszeichen in Erscheinung treten (Mathews et al., 1999). Im Falle von entzündlichen Vorgängen können durch eine Hochregulation der Genexpression der humanen beta-Defensine-2 und -3 weitere antimikrobielle Peptide mit unterschiedlichen bzw. ergänzenden Wirksamkeiten einer fortschreitenden infektiösen Invasion von Mikroorganismen entgegenzutreten. In der Endkonsequenz können durch stimulierende Effekte zum erworbenen Immunsystem zusätzlich zelluläre Abwehrmechanismen aktiviert werden (Oppenheim et al., 2003; Yang et al., 1999).

Humane beta-Defensine wurden bislang in den Epithelzellen der Mundschleimhaut, der Zunge bzw. den Leukozyten des Gingivalsulkus nachgewiesen (Dale und Krisanaprakornkit, 2001). Als weiterer Expressionsort des humanen beta-Defensin-1

konnten die Epithelzellen des Gangsystems der Speicheldrüse beschrieben werden. In der vorliegenden Arbeit konnte erstmals auch die Expression von hBD-2 und -3 in der gesunden, entzündeten und bestrahlten Glandula submandibularis gezeigt werden. Die Expression des humanen beta-Defensin-2 wurde bereits von Abiko et al. in keratinisierten Arealen des pleomorphen Adenoms der Speicheldrüse nachgewiesen (Abiko, 2000; Abiko et al., 2003). In den Proben des pleomorphen Adenoms und des adenoidzystischen Karzinoms konnte die Expression von hBD-2 in der vorliegenden Arbeit ebenfalls gezeigt werden. Darüber hinaus wurde hBD-3 als weiteres antimikrobielles Peptid in Tumoren der Speicheldrüse dargestellt.

Durch ein synergistisches Zusammenwirken der humanen beta-Defensine mit weiteren antimikrobiellen Proteinen wird die Gesunderhaltung oraler Gewebe unterstützt (Devine, 2003). Die große Bedeutung liegt in der Funktion als natürliche Antibiotika, welche die Membranintegrität der Mikroorganismen auflösen und so eine bakterizide Wirkung ausüben. Zukünftig könnten ähnlich biologisch aktive Moleküle bzw. synthetisch hergestellte antimikrobielle Peptide entwickelt werden, welche zur Behandlung oraler Infektionskrankheiten wie zum Beispiel der oralen Candidose eingesetzt werden können (Kavanagh et al., 2004; Ruissen et al., 2001). Weitere Studien an Speicheldrüsenbiopsien und Speichelproben sind jedoch erforderlich, die zu einem genaueren Verständnis über das Expressionsmuster und -verhalten sowie der Wirkungsweise antimikrobieller Peptide der Speicheldrüse führen. Die Anwendung synthetisch hergestellter antimikrobieller Peptide könnte in der Tumorthherapie im Kopf-Hals-Bereich neben dem bereits verwendeten 'künstlichen Speichel' (Glandosane, Xialine) in der Zukunft einen festen Platz einnehmen (Nieuw Amerongen et al., 2003; Rothstein et al., 2002).

5. Zusammenfassung

Humane beta-Defensine (hBDs) sind kationische, antimikrobiell wirkende Peptide der angeborenen Immunabwehr. Die Expression dieser Peptide konnte in den Epithelzellen unterschiedlicher Gewebe gezeigt werden. Dabei wurde für das humane beta-Defensin-1 (hBD-1) eine konstitutive Expression nachgewiesen, wohingegen für humanes beta-Defensin-2 (hBD-2) und humanes beta-Defensin-3 (hBD-3) eine induzierbare Genexpression auf entzündliche Reize hin gezeigt werden konnte. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, immunhistochemische Methoden zur Darstellung der Expression von hBD-1, -2 und -3 bzw. Interleukin-1 beta (IL-1 beta) in Proben der Speicheldrüse zu etablieren.

Es wurden Biopsien der gesunden, bestrahlten und entzündeten Glandula submandibularis sowie Tumoren der Speicheldrüse (Glandula parotis, Glandula submandibularis, kleine Speicheldrüse der Wange) untersucht. Für die Darstellung der Proteinexpression wurden histologische Schnitte angefertigt und anschließend mit spezifischen Antikörpern gegen hBD-1, -2, -3 und IL-1 beta immunhistochemisch angefärbt. Durch die Bestimmung des Grauwertes wurde die Intensität der immunhistochemischen Reaktion gemessen und semi-quantitativ ausgewertet.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigten die intrazelluläre Expression von hBD-1, -2, -3 und IL-1 beta in den epithelialen Zellen der Drüsenausführungsgänge der untersuchten Proben der Speicheldrüse. Für hBD-1 konnte eine verstärkte Immunreaktion in den Proben der gesunden im Vergleich zur bestrahlten Speicheldrüse dargestellt werden, während die Immunreaktion von hBD-2 und -3 in den Proben der entzündeten bzw. bestrahlten Speicheldrüse stärker war als in der gesunden Speicheldrüse. Sowohl für hBD-2 als auch für hBD-3 konnte eine polare, apikale Immunfärbung innerhalb der Epithelzellen des Ausführungsgangsystems der entzündeten und bestrahlten Speicheldrüse dargestellt werden. In den Proben der tumorös veränderten Speicheldrüse konnte die Expression von hBD-1, -2 und -3 innerhalb dysplastischer Epithelzellen gezeigt werden.

Die vorliegende Studie konnte erstmals die Proteinexpression der humanen beta-Defensine-2 und -3 in den Epithelzellen der gesunden, entzündeten, bestrahlten Speicheldrüse sowie in Tumoren der Speicheldrüse zeigen. Mit der Expression humaner beta-Defensine in den Gangepithelien könnten Speicheldrüsen eine wichtige Rolle in der angeborenen Immunabwehr übernehmen.

6. Anhang

6.1 Darstellung der Einzelmesswerte des mittleren Grauwertes

6.1.1 Gesunde Speicheldrüse I

humanes beta-Defensin-1

Schalt- oder Streifenstück	Anzahl Messungen				
	1	2	3	4	5
1	2120	2126	2125	2135	2125
2	2147	2154	2158	2165	2154
3	2153	2151	2163	2158	2148
4	2143	2121	2126	2132	2137
5	2143	2136	2148	2161	2167
6	2152	2153	2151	2157	2156
7	2176	2173	2181	2179	2178
8	2172	2175	2168	2177	2176
9	2190	2185	2182	2201	2187
10	2132	2132	2136	2133	2138

humanes beta-Defensin-2

Schalt- oder Streifenstück	Anzahl Messungen				
	1	2	3	4	5
1	773	773	775	772	770
2	775	774	778	772	770
3	775	770	775	778	773
4	780	769	777	781	772
5	782	771	779	782	775
6	773	785	780	776	779
7	760	764	764	760	763
8	760	764	764	760	763
9	767	771	767	762	765
10	770	75	763	761	766

humanes beta-Defensin-3

Schalt- oder Streifenstück	Anzahl Messungen				
	1	2	3	4	5
1	1371	1377	1361	1348	1351
2	1356	1362	1349	1337	1336
3	1407	1411	1387	1395	1414
4	1382	1389	1370	1361	1369
5	1361	1354	1352	1373	1371
6	1378	1371	1365	1387	1387
7	1371	1361	1345	1382	1382
8	1380	1390	1356	1384	1375
9	1379	1391	1390	1373	1383
10	1400	1392	1378	1373	1388

Interleukin-1 beta

Schalt- oder Streifenstück	Anzahl Messungen				
	1	2	3	4	5
1	1371	1377	1361	1348	1351
2	1356	1362	1349	1337	1336
3	1407	1411	1387	1395	1414
4	1382	1389	1370	1361	1369
5	1361	1354	1352	1373	1371
6	1378	1371	1365	1387	1387
7	1371	1361	1345	1382	138
8	1380	1390	1356	1384	1375
9	1379	1391	1390	1373	1383
10	1400	1392	1378	1373	1388

6.1.2 Gesunde Speicheldrüse II

humanes beta-Defensin-1

Schalt- oder Streifenstück	Anzahl Messungen				
	1	2	3	4	5
1	2135	2126	2124	2133	2129
2	2161	2149	2140	2154	2138
3	2175	2165	2161	2172	2163
4	2185	2194	2183	2176	2182
5	2157	2164	2154	2147	2152
6	2144	2140	2145	2148	2143
7	2218	2216	2222	2223	2224
8	2207	2205	2211	2210	2203
9	2231	2231	2240	2240	2232
10	2185	2196	2204	2186	2196

humanes beta-Defensin-2

Schalt- oder Streifenstück	Anzahl Messungen				
	1	2	3	4	5
1	794	792	802	796	802
2	795	790	798	794	803
3	774	795	783	788	788
4	773	799	780	787	783
5	776	760	746	767	773
6	791	784	772	783	790
7	795	790	777	790	797
8	784	782	766	772	782
9	767	774	758	765	770
10	767	770	754	764	770

humanes beta-Defensin-3

Schalt- oder Streifenstück	Anzahl Messungen				
	1	2	3	4	5
1	1278	1301	1292	1307	1304
2	1292	1312	1296	1306	1318
3	1275	1289	1280	1315	1276
4	1275	1311	1304	1301	1295
5	1302	1316	1296	1306	1307
6	1293	1311	1285	1307	1296
7	1307	1322	1300	1293	1310
8	1315	1309	1305	1310	1316
9	1293	1331	1288	1317	1299
10	1295	1280	1307	1299	1278

Interleukin-1 beta

Schalt- oder Streifenstück	Anzahl Messungen				
	1	2	3	4	5
1	1278	1301	1292	1307	1304
2	1292	1312	1296	1306	1318
3	1275	1289	1280	1315	1276
4	1275	1311	1304	1301	1295
5	1302	1316	1296	1306	1307
6	1293	1311	1285	1307	1296
7	1307	1322	1300	1293	1310
8	1315	1309	1305	1310	1316
9	1293	1331	1288	1317	1299
10	1295	1280	1307	1299	1278

6.1.3 Bestrahlte Speicheldrüse I

humanes beta-Defensin-1

Schalt- oder Streifenstück	Anzahl Messungen				
	1	2	3	4	5
1	2246	2240	2253	2262	2266
2	2176	2165	2180	2197	2203
3	2272	2261	2281	2289	2302
4	2278	2273	2275	2279	2309
5	2273	2270	2273	2268	2272
6	2294	2281	2289	2286	2290
7	2271	2281	2273	2284	2272
8	2264	2253	2270	2292	2265
9	2215	2206	2235	2221	2219
10	2271	2247	2258	2237	2272

humanes beta-Defensin-2

Schalt- oder Streifenstück	Anzahl Messungen				
	1	2	3	4	5
1	745	760	744	758	744
2	756	747	766	761	764
3	760	770	753	755	756
4	757	763	746	750	752
5	760	763	778	783	786
6	784	782	783	770	773
7	787	791	794	778	780
8	770	769	772	767	773
9	766	763	759	762	760
10	779	771	771	773	774

humanes beta-Defensin-3

Schalt- oder Streifenstück	Anzahl Messungen				
	1	2	3	4	5
1	1180	1184	1202	1194	1194
2	1186	1181	1204	1198	1200
3	1233	1231	1252	1243	1247
4	1172	1186	1213	1193	1189
5	1221	1229	1218	1181	1208
6	1231	1238	1227	1233	1220
7	1209	1203	1184	1192	1188
8	1233	1205	1196	1197	1221
9	1266	1245	1238	1255	124
10	1234	1255	1241	1246	1235

Interleukin-1 beta

Schalt- oder Streifenstück	Anzahl Messungen				
	1	2	3	4	5
1	1180	1184	1202	1194	1194
2	1186	1181	1204	1198	1200
3	1233	1231	1252	1243	1247
4	1172	1186	1213	1193	1189
5	1221	1229	1218	1181	1208
6	1231	1238	1227	1233	1220
7	1209	1203	1184	1192	1188
8	1233	1205	1196	1197	1221
9	1266	1245	1238	1255	124
10	1234	1255	1241	1246	1235

6.1.4 Bestrahlte Speicheldrüse II

humanes beta-Defensin-1

Schalt- oder Streifenstück	Anzahl Messungen				
	1	2	3	4	5
1	2375	2358	2383	2371	2364
2	2449	2440	2466	2432	2454
3	2461	2440	2457	2465	2465
4	2413	2409	2421	2406	2411
5	2359	2376	2345	2364	2356
6	2372	2382	2359	2369	2365
7	2377	2392	236	2371	2366
8	2362	2379	2354	2368	2351
9	2369	2393	2373	2389	2387
10	2373	2380	2354	2367	2392

humanes beta-Defensin-2

Schalt- oder Streifenstück	Anzahl Messungen				
	1	2	3	4	5
1	776	766	777	768	760
2	778	789	777	774	768
3	784	781	775	792	780
4	780	785	795	778	779
5	796	793	795	790	783
6	784	772	773	785	768
7	771	760	781	759	78
8	780	779	776	775	7735
9	778	777	781	785	795
10	778	777	780	773	785

humanes beta-Defensin-3

Schalt- oder Streifenstück	Anzahl Messungen				
	1	2	3	4	5
1	1301	1310	1292	1294	1303
2	1300	1309	1307	1288	1274
3	1293	1314	1286	1304	1305
4	1296	1298	1310	1292	1319
5	1304	1302	1302	1308	1308
6	1274	1264	1290	1281	1297
7	1306	1295	1322	1315	1312
8	1301	1291	1286	1288	1299
9	1306	1309	1313	1288	1302
10	1310	1314	1301	1315	1316

Interleukin-1 beta

Schalt- oder Streifenstück	Anzahl Messungen				
	1	2	3	4	5
1	1301	1310	1292	1294	1303
2	1300	1309	1307	1288	1274
3	1293	1314	1286	130	1305
4	1296	1298	1310	1292	1319
5	1304	1302	1302	1308	1308
6	1274	1264	1290	1281	1297
7	1306	1295	1322	1315	1312
8	1301	1291	1286	1288	1299
9	1306	1309	1313	1288	1302
10	1310	1314	1301	1315	1316

6.2 Daten aus der deskriptiven Statistik

Gesunde Speicheldrüse (Donor I), Streifenstücke (n = 10)	hBD-1	hBD-2	hBD-3	IL-1 beta
Median	4,64	12,93	2,78	7,23
Minimum	4,57	12,84	2,75	7,13
Maximum	4,70	13,12	2,80	7,42
Standardabweichung	0,04	0,19	0,01	0,08

Gesunde Speicheldrüse (Donor II), Streifenstücke (n = 10)	hBD-1	hBD-2	hBD-3	IL-1 beta
Median	4,59	12,75	2,87	7,68
Minimum	4,47	12,54	2,79	7,63
Maximum	4,69	13,08	2,97	7,77
Standardabweichung	0,07	0,20	0,05	0,04

Bestrahlte Speicheldrüse (Donor I), Streifenstücke (n = 10)	hBD-1	hBD-2	hBD-3	IL-1 beta
Median	4,40	13,14	3,26	8,25
Minimum	4,37	12,72	3,05	7,47
Maximum	4,58	13,33	3,33	8,39
Standardabweichung	0,07	0,19	0,08	0,28

Bestrahlte Speicheldrüse (Donor II), Streifenstücke (n = 10)	hBD-1	hBD-2	hBD-3	IL-1 beta
Median	4,21	12,86	3,33	7,68
Minimum	4,07	12,64	3,24	7,63
Maximum	4,24	13,00	3,59	7,80
Standardabweichung	0,06	0,11	0,09	0,05

7. Literaturverzeichnis

Abiko Y. Presence of human beta-defensin 2 peptide in keratinization in salivary gland tumor. *Oral Med Pathol* 2000; 5: 95-97.

Abiko Y, Nishimura M, Kaku T. Defensins in saliva and the salivary glands. *Med Electron Microsc* 2003; 36: 247-252.

Ali RS, Falconer A, Ikram M, Bissett CE, Cerio R, Quinn AG. Expression of the peptide antibiotics human beta defensin-1 and human beta defensin-2 in normal human skin. *J Invest Dermatol* 2001; 117: 106-111.

Amerongen AV, Bolscher JG, Veerman EC. Salivary mucins: protective functions in relation to their diversity. *Glycobiology* 1995; 5: 733-740.

Andrews N, Griffiths C. Dental complications of head and neck radiotherapy: Part 1. *Aust Dent J* 2001; 46: 88-94.

Aps JK, Martens LC. Review: The physiology of saliva and transfer of drugs into saliva. *Forensic Sci Int* 2005; 150: 119-131.

Bartel-Friedrich S, Friedrich RE, Lautenschlager C, Holzhausen HJ, Moll R. Dose-response relationships on the expression profile of cytokeratins and vimentin in rat submandibular glands following fractionated irradiation. *Anticancer Res* 2000; 20: 4917-4926.

Bensch KW, Raida M, Magert HJ, Schulz-Knappe P, Forssmann WG. hBD-1: a novel beta-defensin from human plasma. *FEBS Lett* 1995; 368: 331-335.

Bonass WA, High AS, Owen PJ, Devine DA. Expression of beta-defensin genes by human salivary glands. *Oral Microbiol Immunol* 1999; 14: 371-374.

Brey EM, Lalani Z, Johnston C, Wong M, McIntire LV, Duke PJ, Patrick CW, Jr. Automated selection of DAB-labeled tissue for immunohistochemical quantification. *J Histochem Cytochem* 2003; 51: 575-584.

Brogden KA. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nat Rev Microbiol* 2005; 3: 238-250.

Cauli A, Yanni G, Pitzalis C, Challacombe S, Panayi GS. Cytokine and adhesion molecule expression in the minor salivary glands of patients with Sjogren's syndrome and chronic sialoadenitis. *Ann Rheum Dis* 1995; 54: 209-215.

Cuida M, Brun JG, Tynning T, Jonsson R. Calprotectin levels in oral fluids: the importance of collection site. *Eur J Oral Sci* 1995; 103: 8-10.

Dale BA, Fredericks LP. Antimicrobial peptides in the oral environment: expression and function in health and disease. *Curr Issues Mol Biol* 2005; 7: 119-133.

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

Dale BA, Tao R, Kimball JR, Jurevic RJ. Oral antimicrobial peptides and biological control of caries. *BMC Oral Health* 2006; 6 Suppl 1: S13.

Den Hertog AL, Wong Fong Sang HW, Kraayenhof R, Bolscher JG, Van't Hof W, Veerman EC, Nieuw Amerongen AV. Interactions of histatin 5 and histatin 5-derived peptides with liposome membranes: surface effects, translocation and permeabilization. *Biochem J* 2004; 379: 665-672.

Denk H. *Spezielle Untersuchungsmethoden in der diagnostischen Pathologie*. Berlin-Heidelberg-New York: Remmele H Pathologie 1999.

Devine DA. Antimicrobial peptides in defence of the oral and respiratory tracts. *Mol Immunol* 2003; 40: 431-443.

Dinarello CA. Biologic basis for interleukin-1 in disease. *Blood* 1996; 87: 2095-2147.

Dinarello CA. Interleukin-1beta. *Crit Care Med* 2005; 33: 460-462.

Dinges HP, Denk H, Reiner A, Würtz FG. *Immunhistochemie; Qualitätsstandards in der Pathologie*, 2002.

Dommisch H, Acil 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* 2005a; 20: 186-190.

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

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

Dommisch H, Winter J, Açil Y, Hacker J, Mintcheva M, Eberhard J, Götz W, Jepsen S. Differential gene expression of interleukin-6, -8, cyclooxygenase-2, and human beta-defensins in dental pulp. *Advances Dent Res; in print; 2007b*

Dorschner RA, Lin KH, Murakami M, Gallo RL. Neonatal skin in mice and humans expresses increased levels of antimicrobial peptides: innate immunity during development of the adaptive response. *Pediatr Res* 2003; 53: 566-572.

Dreyer JO, Sakuma Y, Seifert G. Radiation-induced sialadenitis. Stage classification and immunohistology. *Pathologie* 1989; 10: 165-170.

Duits LA, Ravensbergen B, Rademaker M, Hiemstra PS, Nibbering PH. Expression of beta-defensin 1 and 2 mRNA by human monocytes, macrophages and dendritic cells. *Immunology* 2002; 106: 517-525.

Dunsche A, Acil 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; 110: 121-124.

Elie N, Plancoulaine B, Signolle JP, Herlin P. A simple way of quantifying immunostained cell nuclei on the whole histologic section. *Cytometry A* 2003; 56: 37-45.

Fang XM, Shu Q, Chen QX, Book M, Sahl HG, Hoefft A, Stuber F. Differential expression of alpha- and beta-defensins in human peripheral blood. *Eur J Clin Invest* 2003; 33: 82-87.

Fox PC, Heft MW, Herrera M, Bowers MR, Mandel ID, Baum BJ. Secretion of antimicrobial proteins from the parotid glands of different aged healthy persons. *J Gerontol* 1987; 42: 466-469.

Fujii G, Selsted ME, Eisenberg D. Defensins promote fusion and lysis of negatively charged membranes. *Protein Sci* 1993; 2: 1301-1312.

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

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

Ganz T, Lehrer RI. Antimicrobial peptides of leukocytes. *Curr Opin Hematol* 1997; 4: 53-58.

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.

Gennaro R, Zanetti M. Structural features and biological activities of the cathelicidin-derived antimicrobial peptides. *Biopolymers* 2000; 55: 31-49.

Götz W, Heinen M, Lossdörfer S, Jäger A. Immunohistochemical localization of components of the insulin-like growth factor system in human permanent teeth. *Arch Oral Biol* 2006; 51: 387-395.

Götz W, Lossdörfer S, Krüger U, Braumann B, Jäger A. Immunohistochemical localization of insulin-like growth factor-II and its binding protein-6 in human epithelial cells of Malassez. *Eur J Oral Sci* 2003; 111: 26-33.

Groenink J, Walgreen-Weterings E, van 't Hof W, Veerman EC, Nieuw Amerongen AV. Cationic amphipathic peptides, derived from bovine and human lactoferrins, with antimicrobial activity against oral pathogens. *FEMS Microbiol Lett* 1999; 179: 217-222.

Grube D. Constants and variables in immunohistochemistry. *Arch Histol Cytol* 2004; 67: 115-134.

Guchelaar HJ, Vermes A, Meerwaldt JH. Radiation-induced xerostomia: pathophysiology, clinical course and supportive treatment. *Support Care Cancer* 1997; 5: 281-288.

Hao HN, Zhao J, Lotoczky G, Grever WE, Lyman WD. Induction of human beta-defensin-2 expression in human astrocytes by lipopolysaccharide and cytokines. *J Neurochem* 2001; 77: 1027-1035.

Harder J, Bartels J, Christophers E, Schröder JM. Isolation and characterization of human beta -defensin-3, a novel human inducible peptide antibiotic. *J Biol Chem* 2001; 276: 5707-5713.

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, Schwichtenberg L, Bartels J, Maune S, Schröder JM. Mucoïd *Pseudomonas aeruginosa*, TNF-alpha, and IL-1beta, but not IL-6, induce human beta-defensin-2 in respiratory epithelia. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2000; 22: 714-721.

Hill CP, Yee J, Selsted ME, Eisenberg D. Crystal structure of defensin HNP-3, an amphiphilic dimer: mechanisms of membrane permeabilization. *Science* 1991; 251: 1481-1485.

Hoover DM, Chertov O, Lubkowski J. The structure of human beta-defensin-1: new insights into structural properties of beta-defensins. *J Biol Chem* 2001; 276: 39021-39026.

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 oligomerization. *J Biol Chem* 2000; 275: 32911-32918.

Huh WK, Oono T, Shirafuji Y, Akiyama H, Arata J, Sakaguchi M, Huh NH, Iwatsuki K. Dynamic alteration of human beta-defensin 2 localization from cytoplasm to intercellular space in psoriatic skin. *J Mol Med* 2002; 80: 678-684.

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

Janeway CA. Immunologie. Heidelberg Berlin: Spektrum Akademischer Verlag GmbH; 2002.

Jang BC, Lim KJ, Paik JH, Kwon YK, Shin SW, Kim SC, Jung TY, Kwon TK, Cho JW, Baek WK, Kim SP, Suh MH, Suh SI. Up-regulation of human beta-defensin 2 by interleukin-1beta in A549 cells: involvement of PI3K, PKC, p38 MAPK, JNK, and NF-kappaB. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 320: 1026-1033.

Jham BC, da Silva Freire AR. Oral complications of radiotherapy in the head and neck. *Rev Bras Otorrinolaringol (Engl Ed)* 2006; 72: 704-708.

Junqueira L. Histologie. Berlin Heidelberg New York: Springer Verlag; 1996.

Kavanagh K, Dowd S. Histatins: antimicrobial peptides with therapeutic potential. *J Pharm Pharmacol* 2004; 56: 285-289.

Kawauchi K, Yagihashi A, Tsuji N, Uehara N, Furuya D, Kobayashi D, Watanabe N. Human beta-defensin-3 induction in *H. pylori*-infected gastric mucosal tissues. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 5793-5797.

Konings AW, Coppes RP, Vissink A. On the mechanism of salivary gland radiosensitivity. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2005; 62: 1187-1194.

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

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

Kumar M, Liu ZR, Thapa L, Chang Q, Wang DY, Qin RY. Antiangiogenic effect of somatostatin receptor subtype 2 on pancreatic cancer cell line: Inhibition of vascular endothelial growth factor and matrix metalloproteinase-2 expression in vitro. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 393-399.

Lau YE, Bowdish DM, Cosseau C, Hancock RE, Davidson DJ. Apoptosis of airway epithelial cells: human serum sensitive induction by the cathelicidin LL-37. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2006; 34: 399-409.

Lehr HA, Mankoff DA, Corwin D, Santeusanio G, Gown AM. Application of photoshop-based image analysis to quantification of hormone receptor expression in breast cancer. *J Histochem Cytochem* 1997; 45: 1559-1565.

Lehr HA, van der Loos CM, Teeling P, Gown AM. Complete chromogen separation and analysis in double immunohistochemical stains using Photoshop-based image analysis. *J Histochem Cytochem* 1999; 47: 119-126.

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

Lehrer RI, Barton A, Daher KA, Harwig SS, Ganz T, Selsted ME. Interaction of human defensins with *Escherichia coli*. Mechanism of bactericidal activity. *J Clin Invest* 1989; 84: 553-561.

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. *J Clin Invest* 1988; 81: 1829-1835.

Lehrer RI, Lichtenstein AK, Ganz T. Defensins: antimicrobial and cytotoxic peptides of mammalian cells. *Annu Rev Immunol* 1993; 11:105-128.

Liu AY, Destoumieux D, Wong AV, Park CH, Valore EV, Liu L, Ganz T. Human beta-defensin-2 production in keratinocytes is regulated by interleukin-1, bacteria, and the state of differentiation. *J Invest Dermatol* 2002; 118: 275-281.

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

Lohrke S, Friauf E. Developmental distribution of the glutamate receptor subunits KA2, GluR6/7, and delta 1/2 in the rat medial nucleus of the trapezoid body. A quantitative image analysis. *Cell Tissue Res* 2002; 308 :19-33.

Löning T, Jäkel KT. Salivary gland tumors - tumor typing and grading. *Pathologe* 2004; 25: 38-45.

Lossdörfer S, Götz W, Jäger A. Immunohistochemical localization of receptor activator of nuclear factor kappaB (RANK) and its ligand (RANKL) in human deciduous teeth. *Calcif Tissue Int* 2002; 71: 45-52.

Madani G, Beale T. Inflammatory conditions of the salivary glands. *Semin Ultrasound CT MR* 2006; 27: 440-451.

Maisetta G, Batoni G, Esin S, Raco G, Bottai D, Favilli F, Florio W, Campa M. Susceptibility of *Streptococcus mutans* and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* to bactericidal activity of human beta-defensin 3 in biological fluids. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49: 1245-1248.

Marchal F, Dulguerov P. Sialolithiasis management: the state of the art. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2003; 129: 951-956.

Marchal F, Kurt AM, Dulguerov P, Lehmann W. Retrograde theory in sialolithiasis formation. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2001; 127: 66-68.

Mathews M, Jia HP, Guthmiller JM, Losh G, Graham S, Johnson GK, Tack BF, McCray PB, Jr. Production of beta-defensin antimicrobial peptides by the oral mucosa and salivary glands. *Infect Immun* 1999; 67: 2740-2745.

Matkowskyj KA, Cox R, Jensen RT, Benya RV. Quantitative immunohistochemistry by measuring cumulative signal strength accurately measures receptor number. *J Histochem Cytochem* 2003; 51: 205-214.

Matkowskyj KA, Schonfeld D, Benya RV. Quantitative immunohistochemistry by measuring cumulative signal strength using commercially available software photoshop and matlab. *J Histochem Cytochem* 2000; 48: 303-312.

Midorikawa K, Ouhara K, Komatsuzawa H, Kawai T, Yamada S, Fujiwara T, Yamazaki K, Sayama K, Taubman MA, Kurihara H, Hashimoto K, Sugai M. Staphylococcus aureus susceptibility to innate antimicrobial peptides, beta-defensins and CAP18, expressed by human keratinocytes. *Infect Immun* 2003; 71: 3730-3739.

Mineshiba F, Takashiba S, Mineshiba J, Matsuura K, Kokeguchi S, Murayama Y. Antibacterial activity of synthetic human B defensin-2 against periodontal bacteria. *J Int Acad Periodontol* 2003; 5: 35-40.

Murakami M, Ohtake T, Dorschner RA, Gallo RL. Cathelicidin antimicrobial peptides are expressed in salivary glands and saliva. *J Dent Res* 2002; 81: 845-850.

Nagler RM. The enigmatic mechanism of irradiation-induced damage to the major salivary glands. *Oral Dis* 2002; 8: 141-146.

Nicolas P, Mor A. Peptides as weapons against microorganisms in the chemical defense system of vertebrates. *Annu Rev Microbiol* 1995;: 277-304.

Nieuw Amerongen AV, Oderkerk CH, Driessen AA. Role of mucins from human whole saliva in the protection of tooth enamel against demineralization in vitro. *Caries Res* 1987; 21: 297-309.

Nieuw Amerongen AV, Veerman EC. Current therapies for xerostomia and salivary gland hypofunction associated with cancer therapies. *Support Care Cancer* 2003; 11: 226-231.

Nishimura E, Eto A, Kato M, Hashizume S, Imai S, Nisizawa T, Hanada N. Oral streptococci exhibit diverse susceptibility to human beta-defensin-2: antimicrobial effects of hBD-2 on oral streptococci. *Curr Microbiol* 2004; 48: 85-87.

Nishimura M, Abiko Y, Kusano K, Yamazaki M, Saitoh M, Mizoguchi I, Jinbu Y, Noguchi T, Kaku T. Localization of human beta-defensin 3 mRNA in normal oral epithelium, leukoplakia, and lichen planus: an in situ hybridization study. *Med Electron Microsc* 2003; 36: 94-97.

Niyonsaba F, Someya A, Hirata M, Ogawa H, Nagaoka I. Evaluation of the effects of peptide antibiotics human beta-defensins-1/-2 and LL-37 on histamine release and prostaglandin D(2) production from mast cells. *Eur J Immunol* 2001; 31: 1066-1075.

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

Oppenheim JJ, Biragyn A, Kwak LW, Yang D. Roles of antimicrobial peptides such as defensins in innate and adaptive immunity. *Ann Rheum Dis* 2003; 62 Suppl 2:17-21.

Oren A, Ganz T, Liu L, Meerloo T. In human epidermis, beta-defensin 2 is packaged in lamellar bodies. *Exp Mol Pathol* 2003; 74: 180-182.

Pazgier M, Hoover DM, Yang D, Lu W, Lubkowski J. Human beta-defensins. *Cell Mol Life Sci* 2006; 63: 1294-1313.

Poindexter BJ. Immunofluorescence deconvolution microscopy and image reconstruction of human defensins in normal and burned skin. *J Burns Wounds* 2005; 4:e7.

Poindexter BJ, Bhat S, Buja LM, Bick RJ, Milner SM. Localization of antimicrobial peptides in normal and burned skin. *Burns* 2006; 32: 402-407.

Rao AG. Antimicrobial peptides. *Mol Plant Microbe Interact* 1995; 8: 6-13.

Redding SW, Dahiya MC, Kirkpatrick WR, Coco BJ, Patterson TF, Fothergill AW, Rinaldi MG, Thomas CR, Jr. *Candida glabrata* is an emerging cause of oropharyngeal candidiasis in patients receiving radiation for head and neck cancer. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2004; 97: 47-52.

Rothstein DM, Helmerhorst EJ, Spacciapoli P, Oppenheim FG, Friden P. Histatin-derived peptides: potential agents to treat localised infections. *Expert Opin Emerg Drugs* 2002; 7: 47-59.

Ruissen AL, Groenink J, Helmerhorst EJ, Walgreen-Weterings E, Van't Hof W, Veerman EC, Nieuw Amerongen AV. Effects of histatin 5 and derived peptides on *Candida albicans*. *Biochem J* 2001; 356: 361-368.

Sahasrabudhe KS, Kimball JR, Morton TH, Weinberg A, Dale BA. Expression of the antimicrobial peptide, human beta-defensin 1, in duct cells of minor salivary glands and detection in saliva. *J Dent Res* 2000; 79: 1669-1674.

Sahl HG, Pag U, Bonness S, Wagner S, Antcheva N, Tossi A. Mammalian defensins: structures and mechanism of antibiotic activity. *J Leukoc Biol* 2005; 77: 466-475.

Sakamoto N, Mukae H, Fujii T, Ishii H, Yoshioka S, Kakugawa T, Sugiyama K, Mizuta Y, Kadota J, Nakazato M, Kohno S. Differential effects of alpha- and beta-defensin on cytokine production by cultured human bronchial epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2005; 288: 508-513.

Schibli DJ, Hunter HN, Aseyev V, Starner TD, Wiencek JM, McCray PB, Jr., Tack BF, Vogel HJ. The solution structures of the human beta-defensins lead to a better understanding of the potent bactericidal activity of HBD3 against *Staphylococcus aureus*. *J Biol Chem* 2002; 277: 8279-8289.

Schmidt. *Physiologie des Menschen*. Berlin Heidelberg New York: Springer Verlag, 2000.

Schneider JJ, Unholzer A, Schaller M, Schafer-Korting M, Korting HC. Human defensins. *J Mol Med* 2005; 83: 587-595.

Schröder JM. Epithelial antimicrobial peptides: innate local host response elements. *Cell Mol Life Sci* 1999a; 56: 32-46.

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

Schröder JM, Harder J. Antimicrobial skin peptides and proteins. *Cell Mol Life Sci* 2006; 63: 469-486.

Seidal T, Balaton AJ, Battifora H. Interpretation and quantification of immunostains. *Am J Surg Pathol* 2001; 25: 1204-1207.

Seifert G. Etiology and differential diagnosis of sialadenitis. *Laryngorhinootologie* 1995; 74: 274-281.

Seifert G. *Pathologie der Speicheldrüsen*. Berlin Heidelberg New York: Springer Verlag, 1996.

Sell S. *Immunology, Immunopathology and Immunity*. ASM Press, 2001.

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

Shin JS, Kim CW, Kwon YS, Kim JC. Human beta-defensin 2 is induced by interleukin-1 β in the corneal epithelial cells. *Exp Mol Med* 2004; 36: 204-210.

Sørensen OE, Thapa DR, Rosenthal A, Liu L, Roberts AA, Ganz T. Differential regulation of beta-defensin expression in human skin by microbial stimuli. *J Immunol* 2005; 174: 4870-4879.

Stephens LC, Schultheiss TE, Price RE, Ang KK, Peters LJ. Radiation apoptosis of serous acinar cells of salivary and lacrimal glands. *Cancer* 1991; 67: 1539-1543.

Sullivan CA, Haddad RI, Tishler RB, Mahadevan A, Krane JF. Chemoradiation-induced cell loss in human submandibular glands. *Laryngoscope* 2005; 115: 958-964.

Szeszel MK, Crisman CL, Crow L, McMullen S, Major JM, Natarajan L, Saquib A, Feramisco JR, Wasserman LM. Quantifying estrogen and progesterone receptor expression in breast cancer by digital imaging. *J Histochem Cytochem* 2005; 53: 753-762.

Takeda I, Kizu Y, Yoshitaka O, Saito I, Yamane GY. Possible role of nitric oxide in radiation-induced salivary gland dysfunction. *Radiat Res* 2003; 159: 465-470.

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.

Tao R, Jurevic RJ, Coulton KK, Tsutsui MT, Roberts MC, Kimball JR, Wells N, Berndt J, Dale BA. Salivary antimicrobial peptide expression and dental caries experience in children. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49: 3883-3888.

Teymoortash A, Simolka N, Schrader C, Tiemann M, Werner JA. Lymphocyte subsets in irradiation-induced sialadenitis of the submandibular gland. *Histopathology* 2005; 47: 493-500.

Teymoortash A, Tiemann M, Schrader C, Werner JA. Characterization of lymphoid infiltrates in chronic obstructive sialadenitis associated with sialolithiasis. *J Oral Pathol Med* 2004; 33: 300-304.

Teymoortash A, Wollstein AC, Lippert BM, Peldszus R, Werner JA. Bacteria and pathogenesis of human salivary calculus. *Acta Otolaryngol* 2002; 122: 210-214.

Underwood RA, Gibran NS, Muffley LA, Usui ML, Olerud JE. Color subtractive-computer-assisted image analysis for quantification of cutaneous nerves in a diabetic mouse model. *J Histochem Cytochem* 2001; 49: 1285-1291.

van der Reijden WA, Veerman EC, Amerongen AV. Shear rate dependent viscoelastic behavior of human glandular salivas. *Biorheology* 1993; 30: 141-152.

Van Nieuw Amerongen A, Bolscher JG, Veerman EC. Salivary proteins: protective and diagnostic value in cariology? *Caries Res* 2004; 38: 247-253.

Veerman EC, van den Keijbus PA, Nazmi K, Vos W, van der Wal JE, Bloemena E, Bolscher JG, Amerongen AV. Distinct localization of MUC5B glycoforms in the human salivary glands. *Glycobiology* 2003; 13: 363-366.

Vissink A, Jansma J, Spijkervet FK, Burlage FR, Coppes RP. Oral sequelae of head and neck radiotherapy. *Crit Rev Oral Biol Med* 2003; 14: 199-212.

Wehkamp J, Harder J, Weichenthal M, Mueller O, Herrlinger KR, Fellermann K, Schroeder JM, Stange EF. Inducible and constitutive beta-defensins are differentially expressed in Crohn's disease and ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis* 2003; 9: 215-223.

Williams MF. Sialolithiasis. *Otolaryngol Clin North Am* 1999; 32: 819-834.

Yang D, Biragyn A, Kwak LW, Oppenheim JJ. Mammalian defensins in immunity: more than just microbicidal. *Trends Immunol* 2002; 23: 291-296.

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.

Yao C, Li X, Murdiastuti K, Kosugi-Tanaka C, Akamatsu T, Kanamori N, Hosoi K. Lipopolysaccharide-induced elevation and secretion of interleukin-1beta in the submandibular gland of male mice. *Immunology* 2005; 116: 213-222.

Zeiss C, *Lichtmikroskopie, AxioVision® Software Manual, Göttingen 2003-2005*

Zhao C, Wang I, Lehrer RI. Widespread expression of beta-defensin hBD-1 in human secretory glands and epithelial cells. *FEBS Lett* 1996; 396: 319-322.

8. Danksagung

Herrn Prof. Dr. Dr. S. Jepsen M.S., Direktor der Poliklinik für Parodontologie, Zahnerhaltung und Präventive Zahnheilkunde des Zentrums für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, danke ich für die Bereitstellung des Themas, der finanziellen Mittel und der wissenschaftlichen Laboratorien seiner Klinik sowie für die Korrektur dieser Arbeit.

Herrn Dr. H. Dommisch, wissenschaftlicher Mitarbeiter der Poliklinik für Parodontologie, Zahnerhaltung und Präventive Zahnheilkunde des Zentrums für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn möchte ich für die Unterstützung bei der Durchführung, Auswertung und Korrektur der Arbeit sowie für die finanziellen Mittel über die Herbert-Reeck-Stiftung (Zweitrantragsteller Priv.-Doz. Dr. S. Lossdörfer) danken.

Herrn Prof. Dr. W. Götz, Leiter des oralbiologischen Labors der Poliklinik für Kieferorthopädie des Zentrums für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn (Direktor: Prof. Dr. A. Jäger), danke ich für die Bereitstellung der wissenschaftlichen Laboratorien seiner Abteilung und die Unterstützung bei der Anfertigung und Auswertung der histologischen Präparate bzw. der Korrektur der Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Dr. R. H. Reich (Direktor) und Herrn Dr. Dr. M. Wenghoefer aus der Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie des Zentrums für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn danke ich für die Bereitstellung der Speicheldrüsenbiopsien und die Korrektur der Arbeit.

Herrn Dr. J. Winter, Leiter des molekular- und zellbiologischen Labors der Poliklinik für Parodontologie, Zahnerhaltung und Präventive Zahnheilkunde des Zentrums für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn gilt mein Dank für seine Unterstützung bei der Durchführung und Auswertung der Experimente und die Korrektur der Arbeit.

Frau I. Bay (MTA) und Frau M. Schulte (MTA), möchte ich für die praktische und theoretische Unterstützung bei der Anfertigung der immunhistochemischen Präparate danken.

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