

DER EINFLUSS VON EICOSANOIDEN UND STEROIDHORMONEN AUF DIE
GENEXPRESSION VON HBD-1, -2 UND IL-8 IN GINGIVAEPITHELZELLEN

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

vorgelegt von:
Sedique Bahram
aus Köln

2010

Angefertigt mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

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

Tag der Mündlichen Prüfung: 08.04.2010

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

Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	5
Abkürzungsverzeichnis	8
1. Einleitung	11
1.1 Einführung	11
1.2 Entzündung	11
1.3 Eicosanoide	14
1.3.1 Biosynthese	14
1.3.2 Signaltransduktion	15
1.3.3 Biologische Aktivität	16
1.4 Steroidhormone	16
1.4.1 Biosynthese	17
1.4.2 Signaltransduktion	18
1.4.3 Biologische Aktivität	19
1.5 Untersuchte Mediatoren der Immunantwort	19
1.5.1 Defensine	19
1.5.2 Zytokine	21
1.6 Untersuchtes Gingivaepithel	21
1.7 Fragestellungen und Ziele der Arbeit	23

2. Material und Methoden	24
2.1 Versuchsaufbau	24
2.2 Material und Reagenzien	24
2.3 Probengewinnung oraler Gewebe	24
2.4 Kulturen primärer Zellen	25
2.5 Stimulation von Gingivaepithelzellen mit Eicosanoiden sowie Steroidhormonen	25
2.6 Verfahren zur qualitativen Genexpressionsanalyse	26
2.6.1 RNA-Extraktion	26
2.6.2 cDNA-Synthese	26
2.6.3 Standard-Polymerasekettenreaktion	27
2.6.4 Gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte	28
2.7 Real-Time-PCR zur quantitativen Genexpressionsdarstellung	29
2.8 Auswertung der Real-Time-PCR	31
3. Ergebnisse	33
3.1 Optimierung der Real-Time-PCR	33
3.2 Genexpressionsanalyse der stimulierten Gingivaepithelzellen	34
3.2.1 Expression von hBD-1 nach Stimulation mit Prostaglandin-B ₂ , -D ₂ , Cortisol oder Corticosteron	34

3.2.2	Expression von hBD-2 nach Stimulation mit Prostaglandin-B ₂ , -D ₂ , Cortisol oder Corticosteron	37
3.2.3	Expression von IL-8 nach Stimulation mit Prostaglandin-B ₂ , -D ₂ , Cortisol oder Corticosteron	41
4.	Diskussion	44
5.	Zusammenfassung	50
6.	Literaturverzeichnis	51
7.	Danksagung	60
8.	Lebenslauf	61

Abkürzungsverzeichnis

α	=	alpha
Å	=	Ångström
Aqua dest.	=	destilliertes Wasser
β	=	beta
bp	=	Basenpaar
° C	=	Grad Celsius
cAMP	=	Zyklisches Adenosinmonophosphat (cyclic adenosine monophosphate)
cDNA	=	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CD3+	=	cluster of differentiation 3
CD8+	=	cluster of differentiation 8
CO ₂	=	Kohlendioxid
COX-2	=	Cyclooxygenase-2
cPLA ₂	=	zytosolische Phospholipase A ₂
CRP	=	C-reaktives Protein
C _t	=	Schwellenzyklus (threshold cycle)
DNA	=	Desoxyribonukleinsäure (desoxyribonucleid acid)
dNTP	=	Desoxynukleosidtriphosphat
dT	=	Desoxythymin
EDTA	=	Ethylendiamintetraacetat (ethylen-diamintetraacetate)
et al.	=	und Mitarbeiter (et alii)
Fa.	=	Firma
FCS	=	Fötales Kälberserum
h	=	Stunde
hBD-1	=	humanes beta-Defensin-1
hBD-2	=	humanes beta-Defensin-2
hBD-3	=	humanes beta-Defensin-3
HSP90	=	Hitzeschockprotein 90
IFN- β	=	Interferon-beta

IFN- γ	=	Interferon-gamma
IF- κ B	=	Inhibitor Faktor Kappa B
IL	=	Interleukin
IP ₃	=	Inositoltriphosphat
kDa	=	Kilodalton
kg	=	Kilogramm
KGM	=	keratinocyte growth medium
Log.	=	Logarithmus
LO	=	Lipoxygenase
LPS	=	Lipopolysaccharid
LT	=	Leukotrien
MgCl ₂	=	Magnesiumchlorid
min	=	Minute
ml	=	Milliliter
mm	=	Millimeter
mM	=	Millimolar
mRNA	=	Messenger-Ribonukleinsäure (messenger ribonucleid acid)
NGF	=	nerve growth factor
NF- κ B	=	Nukleärer Faktor Kappa B
nM	=	Nanomolar
PBS	=	phosphate buffered saline
PCR	=	Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction)
PDGF	=	platelet-derived growth factor
PG	=	Prostaglandin
PLA ₂	=	Phospholipase A ₂
PLC	=	Phospholipase C
PKA	=	Proteinkinase A
pH	=	negativer dekadischer Log. der Wasserstoffionenkonzentration
μ M	=	mikromolar
RNA	=	Ribonukleinsäure (ribonucleid acid)
rpm	=	Umdrehungen pro Minute (revolutions per minute)
RT-PCR	=	Reverse Transkriptase Polymerasekettenreaktion

sec	=	Sekunde/n
Θ	=	theta
t	=	Zeit
TBE	=	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TNF- α	=	Tumornekrosefaktor-alpha
μg	=	Mikrogramm
μl	=	Mikroliter
μM	=	Mikromolar

1. Einleitung

1.1 Einführung

Die Mundhöhle liefert ein optimales feucht-warmes Milieu für die Kolonisation von potentiell pathogenen grampositiven und gramnegativen Bakterien und Pilzen (Müller, 2006). Trotz der enormen Vielfalt an Mikroorganismen sind Infektionen und Erkrankungen der Mundschleimhaut selten, da die epithelialen Oberflächen der Mundhöhlen effiziente Barrierefunktionen bieten. Die sogenannte physikalische Barriere wird durch den festen interzellulären Verbund innerhalb des Epithels bereitgestellt. Neben diesen effektiven physikalischen Eigenschaften zeigt das Mundhöhlenepithel die Möglichkeit, eine chemische Barriere zu bilden. Antimikrobielle Peptide sind Teil dieser sogenannten chemischen Barriere können direkt gegenüber Mikroorganismen der Mundhöhle wirken. Epithelial synthetisierte antimikrobielle Peptide wie humane beta-Defensine tragen effektiv zur Aufrechterhaltung einer gesunden oralen Homöostase bei (Chung et al. 2007).

1.2 Entzündung

Die Entzündung ist die charakteristische Antwort der beteiligten Gewebe auf einen Reiz, mit dem Ziel diesen zu beseitigen oder zu inaktivieren und die reizbedingte Gewebeschädigung zu reparieren (Morgenroth et al., 1996). Zunächst verursacht jede Gewebeläsion eine initiale Ischämie. Die lokale Blutleere bewirkt Metabolite, die dann zur reaktiven Hyperämie (Rubor/Calor) führen. Vasodilatoren wie Prostaglandine und Leukotriene spielen hierbei die entscheidende Rolle (Klinke und Silbernagl, 1996). Eingetretene Bakterien verursachen eine Degranulation von Mastzellen. Das freigesetzte Histamin und die bereits vorhandenen Prostaglandine erhöhen die Permeabilität der Gefäßwände (Klinke und Silbernagl, 1996). Als Folge kommt es zur vermehrten Extravasation von Plasmaeiweißen ins Gewebe (Tumor). Zusätzlich erfolgt die Diapedese von Leukozyten, die durch chemotaktische Stoffe zum Ort der Reaktion gelockt werden. Die ödematöse Veränderung führt durch die entstehende Gewebes-

pannung zu Schmerzwahrnehmung (Dolor), deren Sensibilitätsschwelle zusätzlich durch Bradykinin indirekt herabgesetzt ist (Klinke und Silbernagl, 1996). Daraus resultiert dann eine eingeschränkte bisweilen aussetzende Funktionalität des betroffenen Gewebes (Functio laesa). Alle diese Veränderungen werden als Kardinalsymptome der Entzündung, Rubor, Calor, Tumor, Dolor und Functio laesa zusammengefasst (Morgenroth et al., 1996). Diese sind nicht immer direkt erkennbar oder auch nur teilweise nachweisbar. Das Vorliegen eines Entzündungszeichens kann bei der Diagnosefindung entzündlicher Veränderungen eine wichtige Rolle spielen. Je nach Intensität und Art reagiert der Gesamtorganismus auch mit unspezifischen Zeichen, wie Fieber, Leukozytenzahlanstieg, C-reaktives-Protein-Anstieg. Die Entzündungsreaktion wird von den proinflammatorischen Mediatoren Histamin, Prostaglandinen und Leukotrienen initiiert und aufrechterhalten.

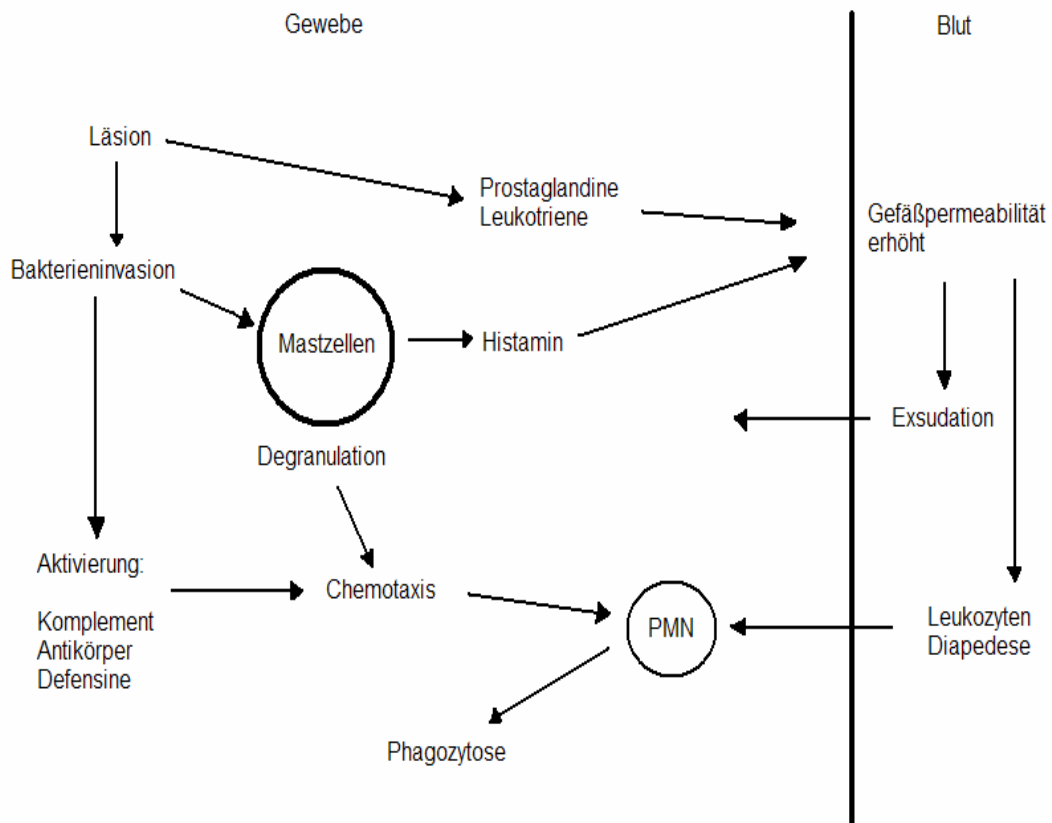


Abbildung 1: Schematischer Ablauf der Entzündungsreaktion (abgeändert nach Whaley, 1996)

Ein weiteres wichtiges Element ist die Antwort des Immunsystems. Die Immunzellen garantieren sowohl die Ausschaltung der Mikroorganismen als auch die Entfernung und Beseitigung körperfremden Gewebes (Abdolvahab-Emminger, 2002). Grundsätzlich wird eine angeborene und adaptive Immunabwehr unterschieden (Klinke und Silbernagl, 1996).

Die angeborene Immunabwehr umfasst sowohl die zelluläre Abwehr durch Phagozytose als auch die humorale Abwehr über das Komplementsystem, Zytokine, Akut-Phase-Proteine und die Synthese antimikrobieller Peptide (Defensine) (Abdolvahab-Emminger, 2002; Ganz, 2003).

Die adaptive Immunabwehr zeichnet sich durch Anpassungsfähigkeit gegenüber neuen oder veränderten Krankheitserregern aus. Im Rahmen dieser Anpassung sind die Zellen

der adaptiven Immunabwehr in der Lage, spezifische Antigene der Mikroorganismen zu erkennen und gezielt zelluläre Abwehrmechanismen zu initiieren sowie molekulare Antikörper zu synthetisieren (Horn et al., 2003). Die verschiedenen Bestandteile des Immunsystems bedingen sich gegenseitig. Erst durch ein gut koordiniertes Zusammenspiel der angeborenen und adaptiven Immunabwehr wird die komplexe Immunreaktion des Organismus' ermöglicht (Borghans et al., 1999).

1.3 Eicosanoide

Prostaglandine, Thromboxane und Leukotriene werden unter dem Begriff der Eicosanoide zusammengefasst (Löffler und Petrides, 1998). Nach Sekretion entwickeln diese parakrine oder autokrine Signalwirkung und zeigen überwiegend lokalen Effekt. Eicosanoide können von jeder Zelle produziert werden (Kreutzig, 1994).

1.3.1 Biosynthese

Eicosanoide sind Derivate mehrfach gesättigter ω -Fettsäuren, deren Gerüst aus 20 C-Atomen aufgebaut ist [gr.: εἴκοσι (*eikosi*) = zwanzig]. Als Vorstufe ist vor allem die Arachidonsäure zu nennen (Horn et al., 2003).

Da sich die Arachidonsäure als Bestandteil von Phospholipiden innerhalb der Plasmamembran befindet, beginnt die Eicosanoid-Biosynthese an der Zellmembran. Das Enzym Phospholipase-A₂ (PLA₂) setzt die Arachidonsäure aus der Membran frei. Die Fettsäure ist nun Substrat zweier Enzyme, der Cyclooxygenase (COX) und der Lipoxygenase (LO) (Horn et al., 2003).

Die COX kommt in mindestens zwei Isoformen vor. Die konstitutiv exprimierte COX-1 lässt sich vornehmlich im gesunden Organismus nachweisen. Dagegen wird die induzierbare COX-2 besonders in geschädigten oder entzündeten Geweben synthetisiert (Horn et al., 2003). Zytokine wie IL-1 oder TNF- α steigern die Syntheserate der COX-2. Beide Oxygenasen wandeln das Säuresubstrat zu Prostaglandin-G₂ um. Dieses stellt die Ausgangssubstanz für alle weiteren Prostaglandine dar. Ein weiterer

Weg bietet die LO, wobei Leukotrien-A₄ produziert wird, welches die Vorstufe für alle weiteren Leukotriene repräsentiert (Horn et al., 2003).

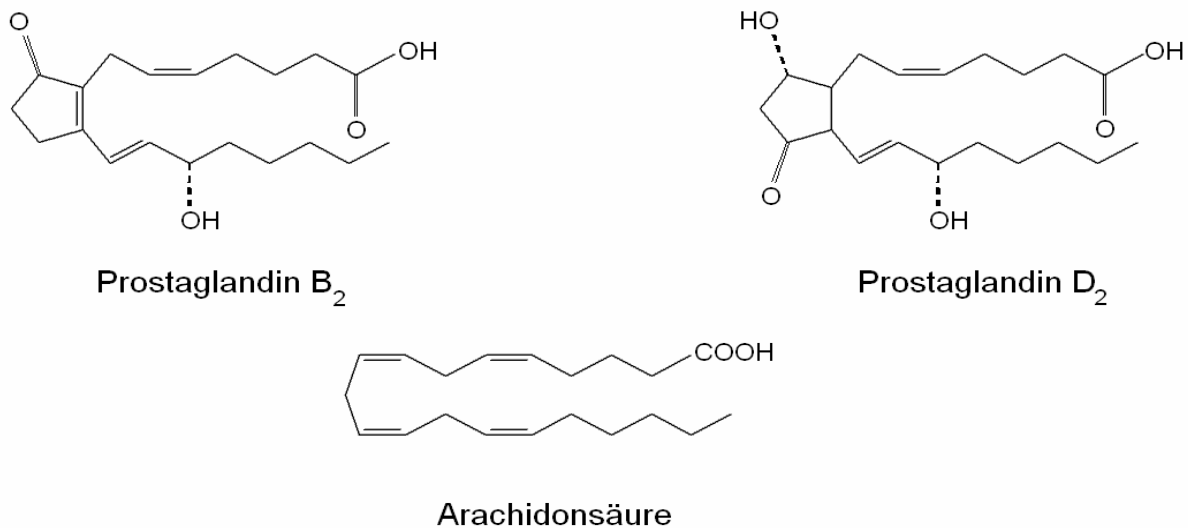


Abbildung 2: Arachidonsäure und entsprechende Derivate

1.3.2 Signaltransduktion

Prostaglandine besetzen spezifische Rezeptoren. Diese sind membrangebunden und verfügen über ein intrazellulär lokalisiertes G-Protein. Somit wird das Signal nach dem second messenger-Prinzip übertragen und verstärkt (Horn et al., 2003). Es kommt zum intrazellulären Anstieg von cAMP bzw. IP₃, das die Proteinkinase-A bzw. -C aktiviert. Diese Kinasen aktivieren bzw. inhibieren dann Zielenzyme, die Transkriptionsfaktoren aktivieren oder inhibieren können.

Die Signaltransduktion der Leukotriene läuft nach demselben Prinzip ab. Als second-messenger fungiert IP₃, welches die intrazelluläre Calciumkonzentration moduliert. Des Weiteren wird die Phospholipase-C (PLC) aktiviert. Die daraus resultierenden

Folgewirkungen für die entsprechende Zelle sind noch nicht abschließend geklärt (Horn et al., 2003).

1.3.3 Biologische Aktivität

Eicosanoide besitzen als Mediatoren vielfältige lokale Wirkungen. Thromboxane bewirken nach Degranulation aus thrombozytären Vesikeln die Thrombozytenaggregation. Diese ist von initialer Bedeutung für die primäre Hämostase. LTB_4 induziert eine Chemotaxis von Leukozyten, während LTD_4 eine Bronchokonstriktion bewirkt. Es wirkt 1000fach stärker als Histamin und spielt daher bei der Entstehung des Asthma bronchiale eine Rolle (Horn et al., 2003).

Prostaglandine besitzen starken Einfluss auf die Entzündungsreaktion. Diese werden hauptsächlich in Mastzellen gespeichert. Im Falle der Degranulation wirken Prostaglandine rasch gefäßerweiternd und erhöhen die Permeabilität des Endothels. Die somit entstandene sog. reaktive Hyperämie stellt den initialen Abschnitt der Entzündungsreaktion dar. Durch die Produktionssteigerung von Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF- α) oder COX-2 halten Prostaglandine das inflammatorische Geschehen aufrecht (Horn et al., 2003). Bei massiver Infektion wird im Hypothalamus die Produktion von Prostaglandinen stimuliert. PGE_2 erhöht den Sollwert der Körpertemperatur, sodass Fieber entsteht (Klinke und Silbernagl, 1996). Die Erwärmung des Gesamtorganismus' ist Teil der unspezifischen Entzündungsreaktion.

1.4 Steroidhormone

Steroidhormone sind Steroide, die als Hormone wirken. Die Steroidhormone der Säugetiere können in drei Gruppen eingeteilt werden: Glucocorticoide, Mineralcorticoide und Steroidhormone (Androgene, Östrogene und Gestagene) (Linnemann und Kühl, 1995).

Das Glucocorticoid Cortisol repräsentiert das potenteste körpereigene entzündungsmodulierende Hormon und nimmt in den weiteren Ausführungen die zentrale Rolle ein.

Durch den lipophilen Charakter kann Cortisol direkt in die Zelle gelangen und benötigt keinen second messenger zur Signalübertragung (Linnemann und Köhl, 1995).

1.4.1 Biosynthese

Cortisol ist ein Abkömmling des Cholesterols, das vornehmlich in der Leber gebildet wird (Horn et al., 2003). Somit basiert es auf dem Sterangerüst und wird daher als Steroid-Derivat bezeichnet (Linnemann und Köhl, 1995). Dieses Grundgerüst besteht aus einem Ringsystem, das aus drei Cyclohexanen und einem Cyclopentan aufgebaut ist.

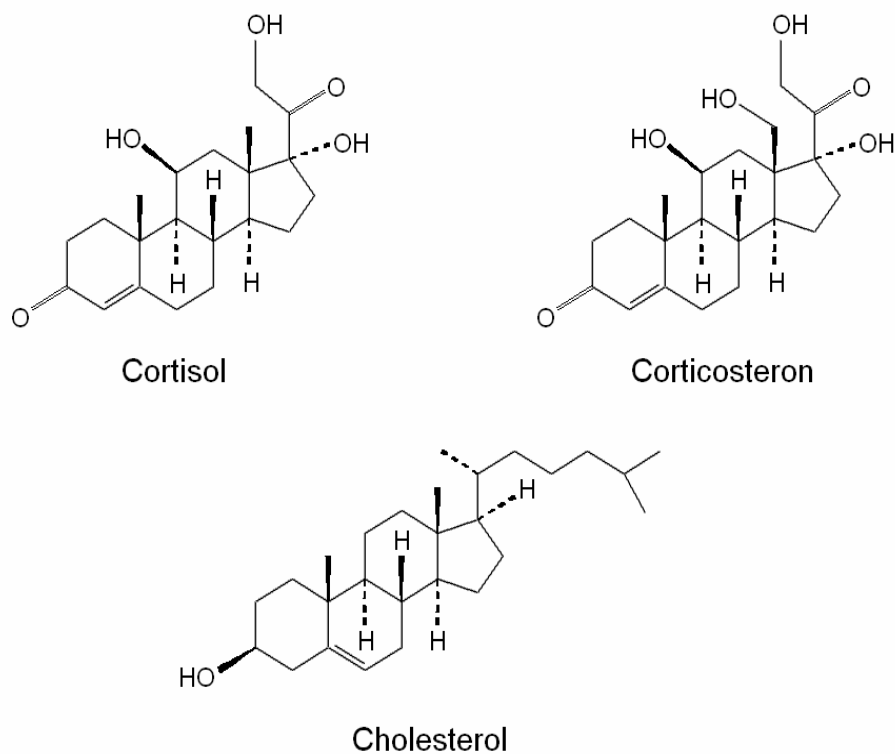


Abbildung 3: Cholesterol und entsprechende Derivate

Modifikationen am Cholesterol sind vor allem an der Seitenkette (C-17) und durch Oxidation möglich. Die Abspaltung der Seitenkette führt zur letzten gemeinsamen Vorstufe aller Steroidhormone, dem Pregnenolon (Kreutzig, 1994).

Danach übernehmen Hydroxylasen oder Dehydrogenasen die endgültige Modifikation. Die Zellen, in denen die Cortisol-Biosynthese stattfindet, besitzen in der Regel alle Enzyme, die zur Synthese benötigt werden (Horn et al., 2003). Bildungsort ist die Nebennierenrinde. Analog werden die Sexualhormone überwiegend in den Ovarien bzw. Hoden produziert.

Die Ausschüttung des Cortisols wird über Regulationshormone des Hypothalamus kontrolliert. Der Transport zur Zielzelle erfolgt durch das Blut. Durch den lipophilen Charakter sind spezielle Transportproteine nötig. Das Protein Transcortin besitzt eine hohe Affinität zu Cortisol und transportiert dieses über den Blutweg im Organismus (Linnemann und Kühl, 1995). Auch Albumin kann bei starker Produktion als Vehikel dienen (Horn et al., 2003).

1.4.2 Signaltransduktion

Der lipophile Charakter des Cortisolmolekül ermöglicht ein Durchdringen der Zellmembran (Horn et al., 2003). Es existieren somit keine membranständigen Rezeptoren. Stattdessen befindet sich im Zytoplasma ein löslicher Hormonrezeptor. Dieser liegt als Komplex mit dem Hitze-Schock-Protein-90 (HSP90) vor. Durch die Bindung des Hormons erfolgt eine Konformationsänderung, durch die das HSP90 aus dem Komplex entlassen wird. Eine dadurch freigewordene nukleäre Lokalisierungssequenz (NLS) ermöglicht den Eintritt in den Zellkern (Horn et al., 2003). Dort bindet der Komplex an regulatorische Gensequenzen und hemmt oder steigert die Transkription von Zielgenen. Damit wird die Enzymausstattung einer Zelle entsprechend den Anforderungen langfristig verändert (Horn et al., 2003).

1.4.3 Biologische Aktivität

Der Effekt von Cortisol ist komplex. Wirkungsbereiche sind der Stoffwechsel, das Immunsystem, der Kreislauf und der Elektrolythaushalt. Von besonderer klinischer Bedeutung ist der immunologische Effekt. Es wirkt immunsuppressiv und antiinflammatorisch und wird in diesem Sinne therapeutisch verabreicht. Die zentrale Rolle spielt der nukleäre-Faktor- κ B (NF- κ B) (Horn et al., 2003). In Lymphozyten liegt er in inaktiver Form vor. Das Inhibitorprotein- κ B (I- κ B) ist dafür verantwortlich. Folgt nun ein Entzündungsreiz, vermittelt durch Zytokine (z.B. IL-2), löst sich I- κ B und NF- κ B tritt in den Nukleus ein. Dort wird die Expression proinflammatorischer Gene gestartet. Die Produktion von IL-1, IL-6 und TNF- α wird induziert. Daraufhin wird die Proliferation und Differenzierung von Immunzellen erhöht und die Antikörpersynthese gesteigert (Horn et al., 2003). Aber Cortisol inhibiert NF- κ B und steigert zusätzlich die Expression von I- κ B. Eine Unterdrückung des gesamten lymphatischen Systems ist die Folge (Horn et al., 2003). Durch die Induktion des Proteins Lipocortin reguliert das Glucocorticoid proinflammatorische Effekte herunter. Lipocortin hemmt die PLA₂, die essentiell für die Eicosanoid-Synthese ist. Die erwähnte Hemmung von NF- κ B unterstützt diesen Effekt, da der nun fehlende Kernfaktor die Genexpression von COX-2 und LO nicht mehr fördern kann. Weitere mögliche Auswirkungen des Cortisols sind kaum verstanden und Ziel weiterer Forschungen (Horn et al., 2003).

1.5 Untersuchte Mediatoren der Immunantwort

1.5.1 Defensine

Die Gruppe der Defensine sind niedermolekulare Peptide, die der Abwehr von Mikroorganismen dienen. Die antimikrobielle Aktivität basiert auf der Eigenschaft, Aggregate innerhalb der Bakterienmembran zu bilden, wobei Poren- bzw. spannungsabhängige Kanäle ausgebildet werden können. Diese membranperforierende Wirkung führt zum osmotischen Zelltod des Bakteriums (Ganz, 2003; Hill et al., 1991; Schröder und Harder, 1999c). Ein anderer Wirkungsmechanismus besteht

darin, dass Defensine an die Bakterienmembran binden und eine teppich-ähnliche Formation („carpet-model“) ausbilden. Proinflammatorische Zytokine oder die Anwesenheit von Mikroorganismen steigern die Synthese der Defensine. Folglich spielen Defensine während der Anfangsphase der Immunreaktion eine wichtige Rolle.

Zur Familie der Defensine gehören die beiden Subfamilien der alpha- und beta-Defensine, welche sich durch die entsprechenden intramolekularen Verknüpfungen (Disulfidbrücken) unterscheiden (Ganz und Weiss, 1997). α -Defensine werden vor allem in neutrophilen Granulozyten synthetisiert (Ganz, 2003). Die humanen-beta-Defensine gehören dem angeborenen Immunsystem an (Ganz, 2003). Diese werden in den Epithelien der Haut bzw. Schleimhaut, der Trachea und des Intestinums, sowie in den Tonsillen, der Zunge, den Speicheldrüsen, in Keratinozyten oraler Gewebe (Dale und Krisanaprakornkit, 2001) und in Pulpazellen exprimiert (Dommisch et al., 2005). Derzeit sind vier humane beta-Defensine isoliert worden hBD-1, -2 sowie die später entdeckten hBD-3 und -4 (Harder et al., 2001 und 1997; Krisanaprakornkit et al., 2000; Lehrer und Ganz, 1999; Nicolas und Mor, 1995; Schröder, 1999b).

Das humane beta-Defensin-1 (hBD-1) wurde erstmals aus dem Plasma von Patienten mit fortgeschrittenen, entzündlichen Nierenerkrankungen isoliert (Bensch et al., 1995). Weitere Syntheseorte sind die Epithelien der Haut (Schröder, 1999b), der Mundschleimhaut (Dunsche et al., 2002), des Gastrointestinaltraktes (Islam et al., 2001), des Respirationstraktes (Harder et al., 1997) und die Odontoblasten der Pulpa (Dommisch et al., 2005). HBD-1 wird hauptsächlich konstitutiv exprimiert und besitzt antimikrobielle Eigenschaften gegenüber grampositiven und gramnegativen Bakterien und Pilzen (*Candida albicans*) (Krisanaprakornkit et al., 1998; Mathews et al., 1999; Sahasrabudhe et al., 2000).

Das humane beta-Defensin-2 (hBD-2) wurde erstmalig in der Epidermis von Psoriasis-Patienten entdeckt (Schröder und Harder, 1999c). HBD-2 wird ebenfalls von den Epithelzellen von Haut, Mundschleimhaut, Gastrointestinaltrakt und Respirationstrakt auf bakteriellen Stimulus hin exprimiert. Auch die Odontoblastenzellen zeigen Expression von hBD-2 (Dommisch et al., 2005). Kürzlich konnte gezeigt werden, dass das Bakterium *Porphyromonas gingivalis* über den Proteinase-Rezeptor-2 die Genexpression von hBD-2 in gingivalen Epithelzellen steigert (Dommisch et al., 2007).

Es wirkt bakterizid auf gramnegative und bakteriostatisch auf grampositive Bakterien (Harder et al., 1997, Schröder, 1999a).

Defensine besitzen im Zuge des angeborenen Immunsystems zytokin-ähnliche und chemotaktische Funktionen (Lehrer, 2004; Yang et al., 2002). In Studien konnte eine Stimulierung der Zytokinsynthese (IL-6, IL-10, IL-18) seitens der Epithelzellen gezeigt werden (Niyonsaba et al., 2007). Zusätzlich konnten positive Einflüsse auf Migration und Proliferation der Epithelzellen gezeigt werden. Eine unterstützende Funktion während der Wundheilungsphase der Epithelien wird angenommen (Niyonsaba et al., 2007).

1.5.2 Zytokine

Zytokine (Interleukine, Interferone, Tumornekrosefaktoren) sind Proteine, die Wachstum und Differenzierung von Zellen regulieren und an vielen immunologischen Prozessen beteiligt sind. Diese wirken immunmodulierend (pro- oder anti-inflammatorisch) und dienen der Kommunikation der Abwehrzellen untereinander (Ibelgaufts, 2002).

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

1.6 Untersuchtes Gingivaepithel

Orale Epithelien stellen die Grenzfläche zwischen der Umwelt und dem Organismus dar und stehen in direktem Kontakt mit einer Vielzahl von Mikroorganismen und deren Stoffwechselprodukten. Die Gingiva ist der epitheliale Bestandteil des Parodontiums und

besteht aus mehrschichtigem oralem Plattenepithel, das nur wenig Keratinisierung aufweist (Müller, 2006). Unter gesunden Bedingungen treten dort trotzdem keine Infektionen auf. Es ist eine neuere Erkenntnis, dass orale Epithelien nicht nur eine physikalische Barriere darstellen, aufgrund ihrer zahlreichen Zell-Zell Interaktionen in Form von „Tight Junctions“, Desmosomen und Zonulae adhaerentes, sondern dass diese vielmehr in der Lage sind, aktiv auf die bakterielle Besiedelung zu reagieren. Diese Reaktion erfolgt durch das angeborene Immunsystem, welches für die Abwehr bakterieller, aber auch viraler Angriffe und Pilzinfektionen zuständig ist (Chung et al., 2007; Dale, 2002; Dale und Krisanaprakornkit, 2001; Schröder, 1999b). Durch den Epithelansatz (Saumepithel) zum Zahnschmelz bzw. Wurzelzement bewirkt die Gingiva einen bakteriendichten Verschluss der Körperoberfläche (Müller, 2006). Der Haftmechanismus des Saumepithels wird durch eine interne Basallamina aus Glykoproteinen bzw. Kollagen und Hemidesmosomen vermittelt (Müller, 2006). Das Saumepithel besitzt eine extrem hohe Erneuerungsrate. Sie ist bis zu 100-fach höher als beim oralen Gingivaepithel (Müller, 2006). So existiert im Sulkus-Bereich stets eine hohe Konzentration an Antikörpern und Leukozyten zur peripheren Infektionsabwehr (Müller, 2006). Der Raum zwischen Zahn und Gingiva wird als Sulcus gingivae bezeichnet und ist in der Regel 2 mm tief. Der Gingivalsaum verläuft girlandenförmig über die einzelnen Zähne und befindet sich 0,5 - 2 mm über der Schmelz-Zement-Grenze. Topographisch wird in freie, befestigte und interdentaler Gingiva unterschieden. Der Sulkus-Bereich, vor allem interdental, stellt eine natürliche Prädilektionsstelle für die Plaque dar (Hellwig et al., 2003). Die Plaque besteht vornehmlich aus Nahrungsresten und Bakterien sowie deren Stoffwechselprodukten (Müller, 2006). Durch fehlende oder unzureichende Beseitigung der Plaque entwickelt diese innerhalb von 24 Stunden einen pathogenen Charakter. Dieser Reiz evoziert die Antwort der Gingiva (Müller, 2006). Der entsprechende Entzündungszustand ist als Gingivitis bekannt und geht vor allem mit einer erhöhten Blutungsneigung, Schwellung und vermehrter Exsudation einher.

1.7 Fragestellungen und Ziele der Arbeit

In vorausgegangenen Studien konnte gezeigt werden, dass Mediatoren wie Eicosanoide und Steroidhormone auf entzündliche sowie immunologische Reaktionen in Zellen und Geweben Einfluss nehmen (Horn et al., 2003; Klinke und Silbernagl, 1996). Die Effekte von Eicosanoiden und Steroidhormonen auf die frühe Immunantwort von Gingivaepithelzellen wurden bislang kaum untersucht.

Daher war es Ziel dieser Arbeit, den Einfluss von Prostaglandin-B₂ (PGB₂), -D₂ (PGD₂), Cortisol und Corticosteron auf die frühe Immunantwort in Gingivaepithelzellen darzustellen.

Folgende spezifische Fragestellungen sollten im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden:

1. Beeinflussen Eicosanoide bzw. Steroidhormone die Genexpression humaner beta-Defensine in gingivalen Epithelzellen?
2. Welche Rolle spielen Eicosanoide und Steroidhormone in der frühen Regulation der Genexpression des pro-inflammatorischen Mediators Interleukin-8?
3. Zeigen sich Unterschiede zwischen der Regulation der mRNA humaner beta-Defensine und Interleukin-8 bezogen auf die Wirkdauer der Eicosanoide bzw. Steroidhormone?
4. Inwieweit können Unterschiede zwischen der Stimulation mit Eicosanoiden und Steroidhormone in Bezug auf die mRNA-Expression humaner beta-Defensine und Interleukin-8 in Gingivaepithelzellen dargestellt werden?

Zusammenfassend war das Ziel dieser Arbeit, die Rolle von Eicosanoiden und Steroidhormonen bei der frühen Regulation der Expression immunologisch relevanter Gene in gingivalen Epithelzellen zu untersuchen.

2. Material und Methoden

2.1 Versuchsaufbau

Im Rahmen routinemäßig durchgeführter oralchirurgischer Maßnahmen wurden Biopsien gesunder Gingiva gewonnen (2.3). Mit Hilfe dieser Gewebe wurden primäre Zellkulturen von Gingivaepithelzellen angelegt (2.4). Diese Zellen wurden mit Eicosanoiden und Steroidhormonen im Rahmen von Mehrfachversuchen stimuliert (2.5). Dabei wurde Zellen drei unterschiedlicher Donoren (n=3) untersucht. Anschließend erfolgte die quantitative Auswertung der Genexpression von hBD-1, -2 und IL-8 mit Hilfe der Real-Time-PCR (2.7).

2.2 Material und Reagenzien

Die zur Aufbewahrung und Bearbeitung der gesammelten Proben benötigten Eppendorf-Tubes und Pipettenspitzen waren von der Fa. Sarstedt (Nümbrecht). Das in den Versuchsreihen verwendete Aqua dest. war von der Fa. Braun Melsungen AG (Melsungen). Die Kulturschalen und Zellschaber wurden von der Fa. Labomedic GmbH (Bonn) bezogen. Das Keratinozyten-Wachstumsmedium (keratinocyte growth medium, KGM) wurde von der Fa. PromoCell GmbH (Heidelberg), die Antibiotika Penicillin, Amphotericin und Streptomycin wurden von der Fa. PAA Laboratories GmbH (Cölbe), Trypsininhibitor von der Fa. Roche Diagnostics GmbH (Mannheim), Trypsin-EDTA-Lösung von der Fa. Sigma-Aldrich GmbH (Taufkirchen) und CO₂ von der Fa. Linde (Höllriegelskreuth) bestellt.

2.3 Probengewinnung oraler Gewebe

In die Untersuchungen wurden ausschließlich gesunde Patientinnen und Patienten eingeschlossen, die sich aufgrund oralchirurgischer Indikationen in der Behandlung der

Poliklinik für Chirurgische Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde (Direktor: Universitäts-Prof. Dr. G. Wahl) im Universitätsklinikum Bonn befanden.

Die Gewebeproben wurden im Rahmen routinemäßig durchgeführter oralchirurgischer Weisheitszahnextraktionen gewonnen und unmittelbar post operationem für die Zellkultur vorbereitet. Alle Patienten wurden darüber aufgeklärt, dass mit ihrem Einverständnis zur Probenentnahme keine zusätzlichen Materialentnahmen verbunden wären. Diese Studie wurde von der Ethikkommission der Universität Bonn geprüft und genehmigt (Antrag Ethikkommission AZ.: 142/05).

2.4 Kulturen primärer Zellen

Die Kultur der Gingivaepithelzellen wurde anhand etablierter Methoden durchgeführt (Dommisch et al., 2008; Krisanaprakornkit et al., 1998). Dazu wurden Gingivabiopsien in KGM kultiviert. Die primären Zellen wurden mittels RT-PCR bezüglich einer hBD-Genexpression charakterisiert. Alle Stimulationsexperimente sind mit einer Zelllinie, bei der sich Transkripte von humanen beta-Defensinen detektieren ließen, durchgeführt worden. Die Zellen wurden bis zu einer Konfluenz von ca. 80-90% in KGM (mit Penicillin, Amphotericin und Streptomycin) bei 37° C und 5% CO₂ in einem Inkubator der Fa. Thermo (Dreieich) kultiviert. Das Medium wurde in einem Drei-Tagesrhythmus gewechselt

2.5 Stimulation von Gingivaepithelzellen mit Eicosanoiden und Steroidhormonen

Die Gruppe der Eicosanoide setzte sich aus Prostaglandin-B₂ und -D₂ zusammen. Aus der Klasse der Steroidhormone wurden Cortisol und Corticosteron verwendet. Alle verwendeten Stimulanzien wurden zuvor in Ethanol gelöst. Die Substanzen stammten von der Fa. Sigma-Aldrich GmbH (Taufkirchen).

Für die Stimationsversuche wurden Zellen der 2. Passage in Kulturschalen (Durchmesser: 35 mm) mit 2 ml Kulturmedium (KGM) bis zu einer Konfluenz von 80-90% angezogen. Sechzehn Stunden vor Versuchsbeginn wurde ein Wechsel zu

antibiotikafreiem Medium vorgenommen. Die Stimulation wurde mit 0,3 μM Prostaglandin- B_2 , - D_2 (Ceasar et al., 2003), 3 μM Cortisol, Corticosteron (Chaban und Micevych, 2005; Chrighuer et al., 2005; Li et al., 2001) durchgeführt.

Die stimulierten gingivalen Epithelzellen wurden über 30, 120 und 240 Minuten inkubiert. Diese kurzen Zeitspannen wurden gewählt, um eine initiale biologisch-relevante Antwort bzgl. der Expression der immunologischen Gene zu untersuchen. Nach Abschluss der Stimulation über den entsprechenden Zeitraum wurde das Medium mitsamt dem jeweiligen Stimulanzium aus der Zellkulturschale aspiriert. Anschließend erfolgte die Zelllysis, RNA-Extraktion und cDNA-Synthese.

2.6 Verfahren zur qualitativen Genexpressionsanalyse

2.6.1 RNA-Extraktion

Für die qualitative Genexpressionsanalyse von Gingivaepithelzellen wurde die Gesamt-RNA mit dem RNeasy Protect Mini Kit von der Fa. Qiagen (Hilden) extrahiert. Die Extraktion wurde nach Herstellerprotokoll für humane Zellkulturen durchgeführt. Die Gewebeprobe wurde mit dem entsprechenden Äquivalent Lysis-Puffer RLT (10 μl 2-Mercaptoethanol; 990 μl RLT) homogenisiert und mit 1 Volumen 70%igem Ethanol versetzt. Anschließend wurden die gelösten Proben auf eine RNeasy-Säule pipettiert und zentrifugiert (10.000 rpm; 15 Sekunden). Nach einer Zugabe von 700 μl RW1-Puffer fand ein weiterer Zentrifugationsschritt statt (10.000 rpm; 15 Sekunden). Daraufhin wurden die Säulen zweimal mit 500 μl RPE-Puffer gewaschen (10.000 rpm; 2 Minuten). Zuletzt wurde die auf den Säulen gebundene RNA zweimal mit je 50 μl RNase-freiem Aqua dest. eluiert (10.000 rpm; 1 Minute). Das resultierende Volumen von 100 μl Gesamt-RNA wurde bei -80°C gelagert.

2.6.2 cDNA-Synthese

Zur cDNA-Erststrangsynthese wurden aus jeder Probe jeweils 8 μl Gesamt-RNA mit 1 μl dNTP-Mix (10 mM dATP, dGTP, dTTP, dCTP) und 1 μl Oligo(dT)-Primer (0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)

vermischt und 5 Minuten bei 65° C denaturiert. Nach Abkühlung auf Raumtemperatur wurden 2 µl 10fach RT-Puffer, 4 µl MgCl₂ (25 mM), 2 µl DTT (Dithiothreitol) (100 mM), 1 µl RNaseOUT (40 U/µl), 1 µl SuperScript™ II Reverse-Transkriptase (50 U/µl) hinzugeführt und für 50 Minuten bei 42° C inkubiert. Anschließend wurde das Gemisch für 15 Minuten bei 72° C denaturiert. Darauf folgte der RNase-Verdau durch die Zugabe von 1 µl RNase H (2 U/µl) für 20 Minuten bei 37° C. Alle verwendeten Reagenzien wurden von der Fa. Invitrogen GmbH (Karlsruhe) bezogen.

2.6.3 Standard-Polymerasekettenreaktion

Für die qualitative Amplifizierung der Gene hBD-1, -2 und IL-8 wurden jeweils 1 µl der entsprechenden cDNA mit 5 µl dNTP (1 mM dATP, dGTP, dTTP, dCTP), 5 µl 10fach Puffer, je 1 µl Primer (100 pmol/µl), 1,5 µl MgCl₂ (50 mM), 0,2 µl Taq DNA Pol (5 U/µl) und 35,3 µl Aqua dest. vermischt. Die Reagenzien wurden von der Fa. Invitrogen GmbH (Karlsruhe) bestellt und die Standard-PCR in dem Thermocycler MyCycler™ der Fa Bio-Rad Laboratories (München) durchgeführt. Zu Beginn der PCR wurde eine Denaturierungsphase von 5 Minuten bei 95° C angesetzt. Innerhalb eines PCR-Zyklus fand zunächst eine Denaturierung der cDNA-Moleküle statt (95 °C; 15 Sekunden). Darauf folgte die Hybridisierung der Primer an die cDNA-Fragmente bei optimaler Annealingtemperatur (je nach Gen 56-64° C; 30 Sekunden). Im Anschluss erfolgte die Elongationsphase (72° C, 60 Sekunden). Insgesamt umfasste die PCR 40 dieser Zyklen.

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

Tabelle 1: Darstellung der PCR-Primersequenzen für beta-Aktin, die humanen beta-Defensine-1 und -2 (hBD-1, -2) sowie das Interleukin-8 (IL-8) mit der Anzahl der Basenpaare für die jeweiligen PCR-Produkte und den primerspezifischen Annealing-temperaturen. (▶: Vorwärts-Primer; ◀: Rückwärts-Primer; **bp**: Basenpaare; ° **C**: Temperaturoptimum)

Gen	PCR-Primersequenzen	bp	° C
beta-Aktin	▶ 5'-CATGGATGATGATATCGCCGCG-3' ◀ 5'-ACATGATCTGGGTCATCTTCTGC-3'	370	69
hBD-1	▶ 5'-CATGAGAACTTCCTACCTTCTGC-3' ◀ 5'-TCACTTGCAGCACTTGGCCTT-3'	216	69
hBD-2	▶ 5'-CATGAGGGTCTTGTATCTCCTCT-3' ◀ 5'-CCTCCTCATGGCTTTTTGCAGC-3'	213	68
IL-8	▶ 5'-ATGACTTCCAAGCTGGCCGTGG-3' ◀ 5'-TGAATTCTCAGCCCTCTTCAAAAAC-3'	297	68

2.6.4 Gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte

Die Agarose-Gelelektrophorese erfolgte nach Sambrook et al. (1989). 15 µl des PCR-Produktes, gemischt mit 3 µl Auftragspuffer (0,125 g Bromphenolblau, 28,7 g Glycerin, 100 ml Aqua dest.), wurden in einem 2%igen Agarosegel [NuSieve GTG® Agarose: 50 ml 0,5 x Tris-Borsäure-EDTA-Puffer (TBE), 3 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml)] aufgetragen. Die Auftrennung der PCR-Produkte lief über eine Zeit von 30 Minuten bei einer Spannung von 100 Volt in 500 ml 0,5 x TBE-Puffer. Die beta-Aktin-Bande wurde durch das zugesetzte Ethidiumbromid unter UV-Licht sichtbar gemacht und mit einer Videokamera in einem Computer dokumentiert [Gel-Doc-System von der Fa. Bio-Rad (München)].

Die qualitative Untersuchung des beta-Aktins fungierte als interner Standard für alle Poly-

merasekettenreaktionen innerhalb der Versuchsreihe. beta-Aktin ist als Bestandteil des Zytoskeletts ein häufiges Protein in Eukaryonten und besitzt eine konstitutive, nicht-alternierende Expression. Die Untersuchung der Genexpression von beta-Aktin bietet die Möglichkeit den Erfolg der PCR unmittelbar zu überprüfen. Sollte dieser Standard nicht detektiert werden können, muss davon ausgegangen werden, dass ein vorangegangener Versuchsanteil (mRNA-Extraktion, cDNA-Synthese) nicht optimal verlaufen sind. Im Weiteren konnte durch Bezugnahme aller ermittelten Werte zu beta-Aktin ein Vergleich zwischen den einzelnen Genen, also eine Relativierung ermöglicht werden.

2.7 Real-Time-PCR zur quantitativen Genexpressionsdarstellung

Für die quantitative Amplifizierung der Gene hBD-1, -2 und IL-8 wurden Real-Time-PCR-Analysen mit dem iCycler[®] der Fa. Bio-Rad (München) durchgeführt. Die Detektion der PCR-Produkte erfolgte mit dem im Reagenzmix enthaltenen, interkalierenden Fluoreszenzfarbstoff SYBRGreen I[®]. Dieser Farbstoff bindet in der doppelsträngigen DNA und fluoresziert bei einer Wellenlänge von 490 nm. Auf diese Weise konnte eine kontinuierliche Fluoreszenzmessung des PCR-Produktes, Zyklus für Zyklus, aufgezeichnet werden. Nach einer Denaturierung der DNA liegt diese einzelsträngig vor, wodurch eine Interkalation des Fluoreszenzfarbstoffs nicht möglich ist. Während der Annealing-Phase hybridisieren die Primer an ihrer Zielsequenz der DNA-Matrize und generieren in der Elongationsphase einen Doppelstrang, in den sich der Farbstoff mehr und mehr einlagern kann. Am Ende der Elongationsphase stellt sich somit ein Maximum an gebundenem SYBR-Green[®]-Farbstoff dar. Während dieser Phase eines Zyklus in der Polymerasekettenreaktion wird die Messung mit Hilfe der iCycler[®] Kamera durchgeführt. Dieser Ablauf wiederholt sich in jedem Zyklus, so dass auf einem angeschlossenen Computermonitor das gemessene Fluoreszenzsignal zu einem beliebigen Zeitpunkt abgelesen werden kann. Schließlich wird die Polymerasekettenreaktion als exponentielle Funktion graphisch dargestellt. Die iCycler[®]-Software errechnet eine sogenannte Schwellenlinie (Baseline), welche den Übergang des Graphen in die exponentielle Phase der Polymerasekettenreaktion markiert. Dieser Übergang beschreibt das Erreichen einer PCR-Produktkonzentration, die höher ist als die

Hintergrundfluoreszenz im Reagenzgefäß (Gibson et al., 1996). Wird die exponentielle Phase erreicht, ergibt dieses den so genannten Schwellenwert [„threshold cycle“ (C_t -Wert)]. Dieser C_t -Wert wird anhand der Zyklenzahl festgelegt. Je später, d.h. mit zunehmender Zyklenzahl, die Probe diese Schwelle erreichte, desto geringer fällt die Konzentration der cDNA aus (Higuchi et al., 1993). Zur quantitativen Amplifizierung wurde jeweils 1 μ l der entsprechenden cDNA zu einem Mix aus 0,125 μ l Primer (je 100 pmol/ μ l), 12,5 μ l iQTMSYBR[®] Green Supermix [MgCl₂ (6 mM)], dNTP (0,4 mM dATP, dGTP, dTTP, dCTP), Taq DNA Pol (50 U/ml), SYBR Green (20 nM), pH 8,4) und 11,375 μ l Aqua dest. (RNase-frei) gegeben. Die Reagenzien wurden von der Fa. Bio-Rad (München) bezogen. Um unterschiedliche Konzentrationen durch ungenaues Pipetieren zu vermeiden, wurde ein Gesamtgemisch („Mastermix“) aus dem iQTMSYBR[®] Green Supermix, Aqua dest. und Primern hergestellt.

Zu Beginn der PCR wurde eine Denaturierungsphase von 3 Minuten bei 95°C angesetzt. Innerhalb eines Real-Time-PCR-Zyklus fand zunächst eine Denaturierung der cDNA-Moleküle statt (95 °C; 15 Sekunden). Darauf folgte die Hybridisierung der Primer an die cDNA-Fragmente bei optimaler Annealingtemperatur (je nach Gen 56-64° C; 30 Sekunden). Im Anschluss erfolgte die Elongationsphase (72° C, 30 Sekunden). Insgesamt umfasste die Real-Time-PCR 40 dieser Zyklen. Die bei der Real-Time-PCR verwendeten Primer waren identisch mit den Primern aus der Standard-PCR (siehe Tab. 1). Jedes Experiment setzte sich aus einer PCR-Negativkontrolle, sowie der jeweiligen cDNA-Proben und einer Verdünnungsreihe der PCR-Positivkontrolle zusammen. Bei der PCR-Negativkontrolle wurde anstatt cDNA Aqua dest. zum Probenmix gegeben. Es sollte hier keinerlei PCR-Produkt entstehen bzw. gemessen werden.

Um die durch unterschiedliche Primer generierten Werte bzw. zwei getrennte Real-Time-Polymerasekettenreaktionen mit einander vergleichen zu können, mussten die Primereffizienzen bestimmt werden. Diese wurden mit Hilfe von Verdünnungsreihen der klonierten cDNA (Standard) über eine Standardkurve ermittelt. Diese Standardkurve entspricht einer Linearregression, umgekehrt zur logarithmischen Funktion der Fluoreszenzaufzeichnung aus der PCR. Die Steigung dieser Standardkurve führte schließlich zu einem Wert für die Primereffizienz (3.1).

2.8 Auswertung der Real-Time-PCR

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

Alle Ergebnisse wurden zunächst durch den oben beschriebenen Schwellenwert (Ct-Wert) dargestellt. Die Methode nach Pfaffl ermittelt die Änderung der Genexpression im Vergleich zum Housekeeping-Gen und zur unstimulierten Kontrolle. Der Wert wird hier als x-fache Änderung der entsprechenden Genexpression angegeben (Pfaffl, 2001). Im ersten Schritt wurde die Primereffizienz der Referenz- und der Zielprimer errechnet. In einem zweiten Rechenschritt wurden die jeweiligen ΔCt -Werte der einzelnen Proben erarbeitet. Es wurde eine Differenz gebildet, bei welcher der ΔCt -Wert aus dem Ct-Wert des House-Keeping-Gens und dem des Zielgens der unstimulierten Kontrolle ermittelt wurde. Dieses entsprach der Referenz.

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

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

(Pfaffl, 2001)

Die statistische Analyse wurde mit der Statistik- und Analysesoftware SPSS 17.0 (SPSS Software GmbH, München) durchgeführt. Ausgewertet wurden die ermittelten x-fachen Expressionsänderungen für die Gene hBD-1, -2 und IL-8 nach 30, 120 und 240 Minuten. Es wurde eine deskriptive Statistik erstellt, bei der Mittelwert, Minimum, Maximum und

Standardabweichung ermittelt wurden. Die grafische Darstellung erfolgte über Balkendiagramme, aus denen man Mittelwert (Balken) und Standardabweichung (Fehlerbalken) ablesen kann.

Anschließend wurde der T-Test für unabhängige Stichproben durchgeführt, um statistisch signifikante Unterschiede zu ermitteln. Die Signifikanzschwelle wurde bei 5% ($p \leq 0.05$) festgelegt.

3. Ergebnisse

Gingivabiopsien von 3 unterschiedlichen Donoren (n=3) wurden im Rahmen zahnärztlich-oralchirurgischer Behandlungen gewonnen. Aus diesen wurden primäre Zellkulturen von Gingivaepithelzellen herangezüchtet. Die Kulturen wurden jeweils mit Eicosanoiden (Prostaglandin-B₂, Prostaglandin-D₂) bzw. Steroidhormonen (Cortisol, Corticosteron) für 30, 120 und 240 Minuten stimuliert. Anschließend erfolgte die quantitative Genexpressionsanalyse für beta-Aktin, hBD-1, -2 und IL-8 mit Hilfe der Real-Time-PCR.

3.1 Optimierung der Real-Time-PCR

Die Bedingungen der Real-Time-PCR wurden optimiert, indem für jedes einzelne Gen mit den entsprechenden klonierten PCR-Produkten, die optimalen Temperaturen der dazugehörigen Primer bestimmt wurden. Die Effizienzen zur Berechnung der relativen Genexpressionen nach Pfaffl (2001) wurden mit Hilfe von Verdünnungsreihen ermittelt. Diese sind in Tabelle 2 dargestellt. Unter optimalen Bedingungen generiert die PCR mit cDNA Proben eine einzelne DNA-Bande, die mit der aus der PCR-Positivkontrolle korreliert, wobei gleichzeitig keine Bande mit Wasser als PCR-Negativkontrolle erkennbar ist.

Tabelle 2: Darstellung der Primereffizienzen für das beta-Aktin, die humanen beta-Defensine-1 und -2 (hBD-1, -2) sowie das Interleukin-8 (IL-8) nach individueller experimenteller Ermittlung der Standardkurven und Berechnung nach Pfaffl (2001).

Gen	Effizienz
beta-Aktin	1,83
hBD-1	2,07
hBD-2	2,05
IL-8	2,01

3.2 Quantitative Genexpressionsanalyse der stimulierten Gingivaepithelzellen

3.2.1 Expression von hBD-1 nach Stimulation mit Prostaglandin-B₂, -D₂, Cortisol und Corticosteron

Die Expression von hBD-1 konnte in stimulierten Gingivaepithelzellen (Prostaglandin-B₂, -D₂, Cortisol und Corticosteron) sowie in der unstimulierten Kontrolle bzw. Ethanol-Kontrolle dargestellt werden.

Prostaglandin-B₂ sowie Prostaglandin-D₂ hatten keinen signifikanten Effekt auf die mRNA-Expression von hBD-1 (Abb. 5 und 6). Nach Cortisol-Stimulation zeigte sich für den Zeitraum zwischen 30 und 120 Minuten eine signifikante Erniedrigung der Genexpression (Abb. 7). Dagegen lieferte Corticosteron (Abb. 8) innerhalb des gesamten Zeitverlaufes eine eindeutig signifikante Erhöhung der hBD-1 mRNA-Expression.

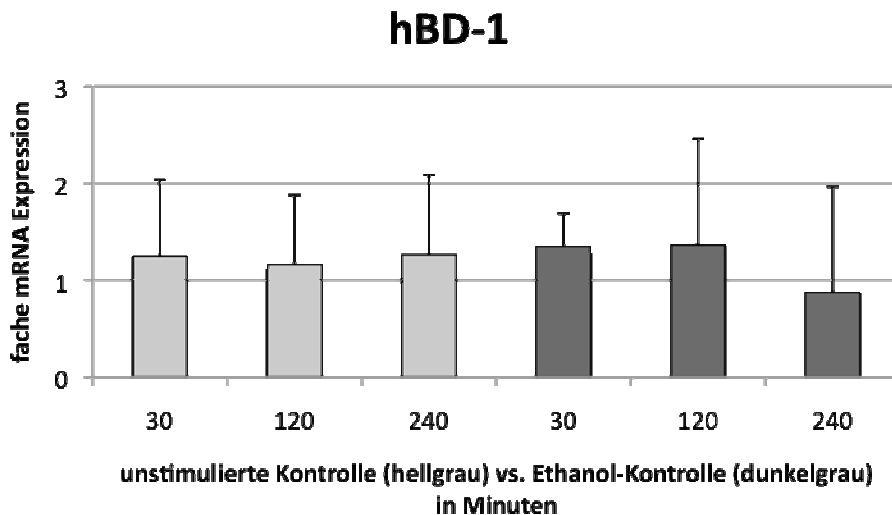


Abbildung 4: Genexpression des humanen beta-Defensin-1 (hBD-1) der unstimulierten Kontrolle bzw. Ethanol-Kontrolle in Gingivaepithelzellen. Innerhalb der durchgeführten Kontrollen zeigten sich keine Unterschiede in der hBD-1 mRNA-Expression über die Zeit.

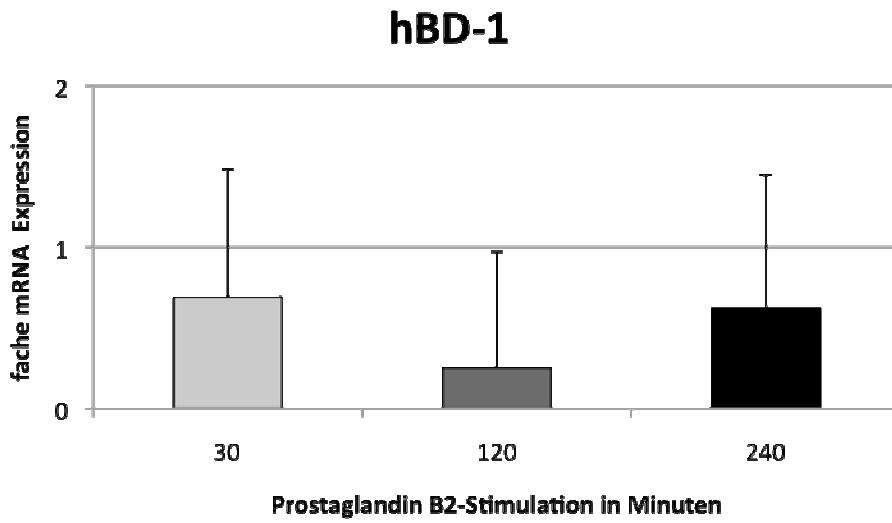


Abbildung 5: Genexpression des humanen beta-Defensin-1 (hBD-1) in Gingiva-epithelzellen nach Stimulation mit Prostaglandin-B₂. Die hBD-1 mRNA-Expression blieb gegenüber der unstimulierten Kontrolle und über die Zeit unverändert.

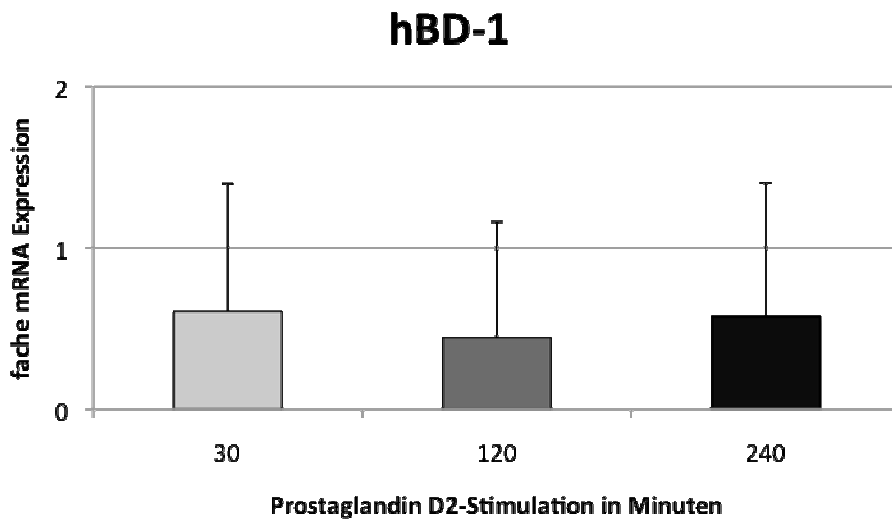


Abbildung 6: Genexpression des humanen beta-Defensin-1 (hBD-1) in Gingiva-epithelzellen nach Stimulation mit Prostaglandin-D₂. Die hBD-1 mRNA-Expression blieb gegenüber der unstimulierten Kontrolle und über die Zeit unverändert.

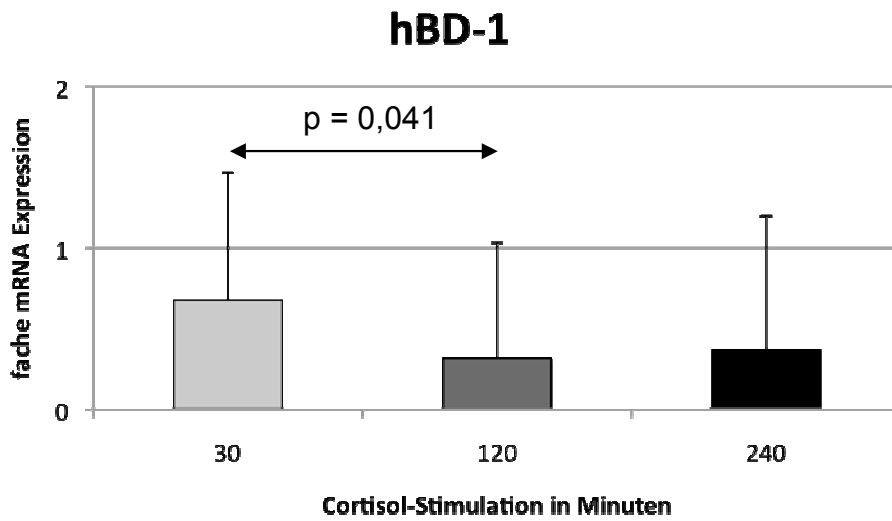


Abbildung 7: Genexpression des humanen beta-Defensin-1 (hBD-1) in Gingivaepithelzellen nach Stimulation mit Cortisol. Nach 120 min zeigte sich eine signifikante Erniedrigung der mRNA-Expression ($p = 0,041$).

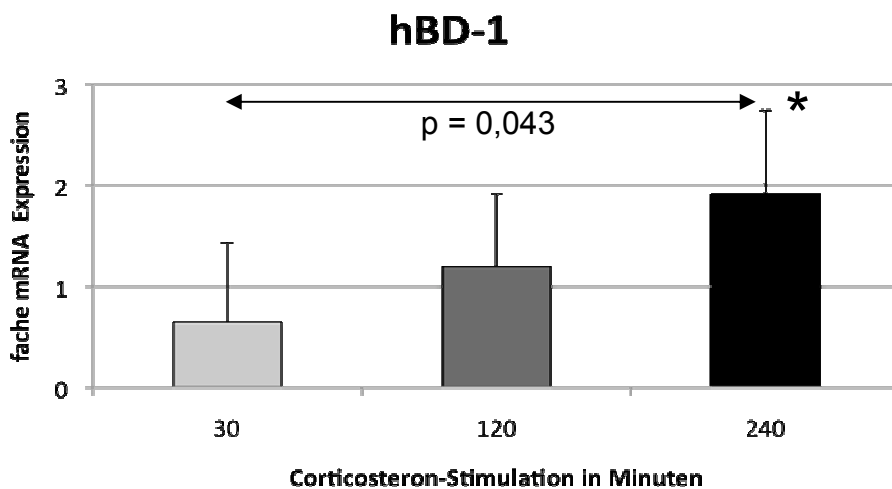


Abbildung 8: Genexpression des humanen beta-Defensin-1 (hBD-1) in Gingivaepithelzellen nach Stimulation mit Corticosteron. Nach 240 min zeigte sich eine signifikante Erhöhung der mRNA-Expression ($p = 0,043$). Zusätzlich stellte sich eine signifikante Erhöhung ($p = 0,017$) gegenüber der unstimulierten Kontrolle (s. Abb. 4) dar.

3.2.2 Expression von hBD-2 nach Stimulation mit Prostaglandin-B₂, -D₂, Cortisol und Corticosteron

Die Expression von hBD-2 konnte in stimulierten Gingivaepithelzellen (Prostaglandin-B₂, -D₂, Cortisol und Corticosteron) sowie in der unstimulierten Kontrolle bzw. Ethanol-Kontrolle dargestellt werden.

Bei der Ethanol-Kontrolle zeigte sich zwischen 120 und 240 Minuten eine signifikante Erniedrigung der hBD-2 mRNA-Expression (Abb. 9). Prostaglandin-B₂ sowie Prostaglandin-D₂ hatten keinen signifikanten Effekt auf die mRNA-Expression von hBD-2 (Abb. 11 und 10). Cortisol lieferte nach 30 Minuten eine deutliche Steigerung und danach einen kontinuierlichen Abfall der Expression von hBD-2 (Abb. 12). Corticosteron wies zu allen Zeitpunkten eine Erniedrigung gegenüber den unstimulierten Kontrollen auf (Abb. 13).

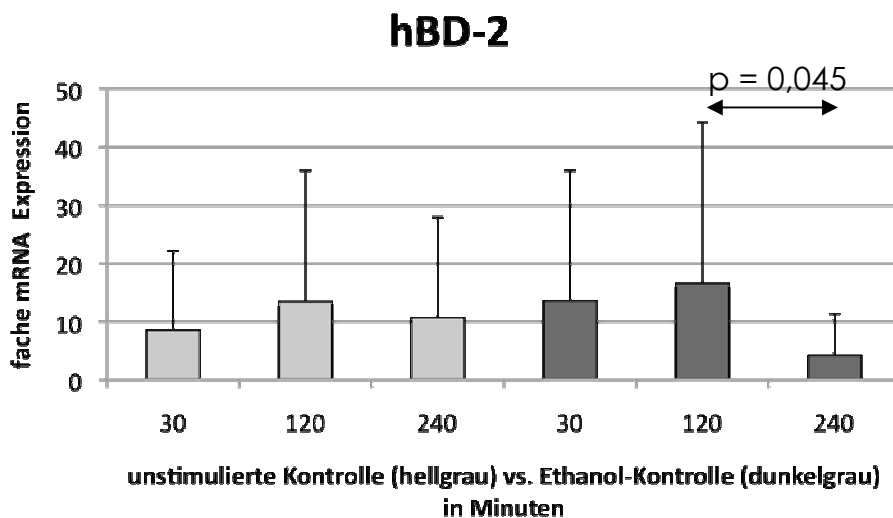


Abbildung 9: Genexpression des humanen beta-Defensin-2 (hBD-2) in Gingivaepithelzellen der unstimulierten Kontrolle bzw. Ethanol-Kontrolle. Innerhalb der durchgeführten Ethanol-Kontrolle zeigte sich zwischen 120 und 240 min ein Abfall der mRNA-Expression ($p = 0,045$).

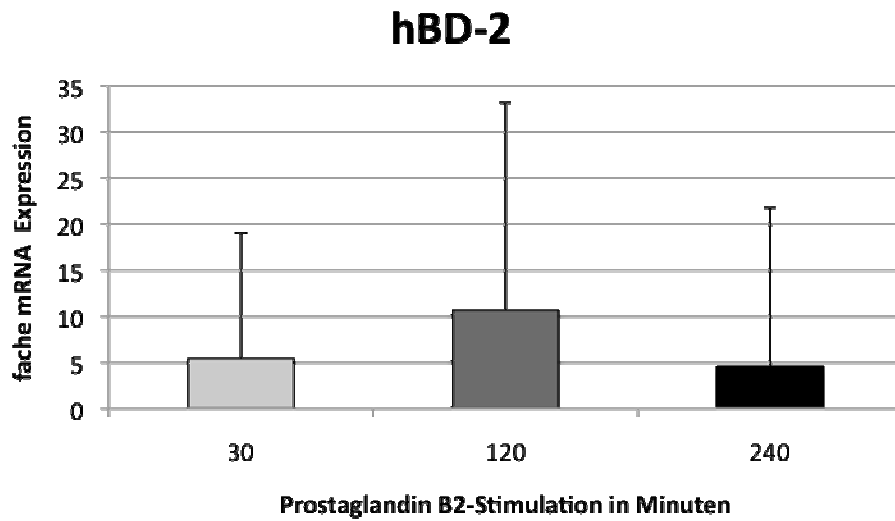


Abbildung 10: Genexpression des humanen beta-Defensin-2 (hBD-2) in Gingiva-epithelzellen nach Stimulation mit Prostaglandin-B₂. Innerhalb der 240 min zeigten sich keine signifikanten Änderungen.

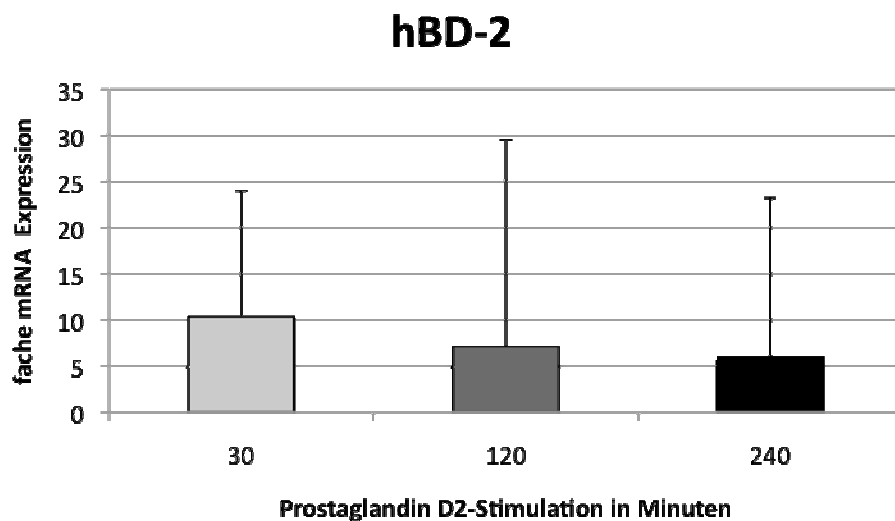


Abbildung 11: Genexpression des humanen beta-Defensin-2 (hBD-2) in Gingiva-epithelzellen nach Stimulation mit Prostaglandin-D₂. Innerhalb der 240 min zeigten sich keine signifikanten Änderungen.

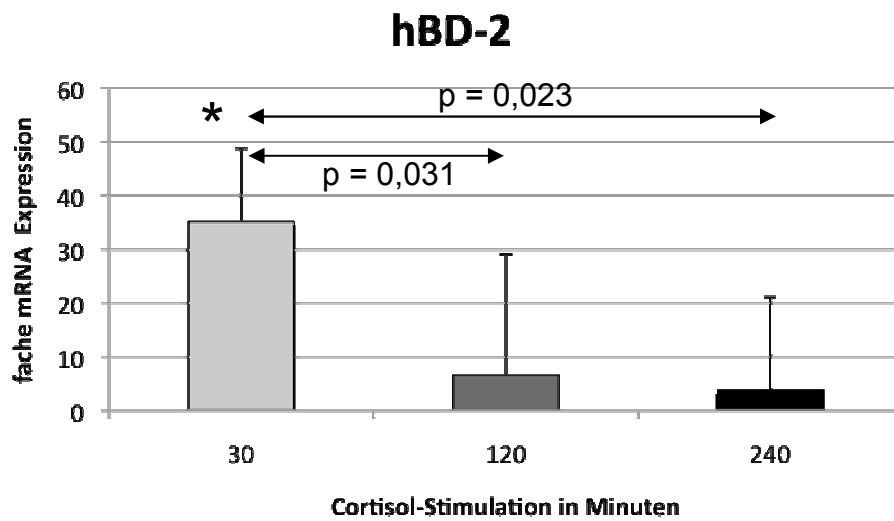


Abbildung 12: Genexpression des humanen beta-Defensin-2 (hBD-2) in Gingiva-epithelzellen nach Stimulation mit Cortisol. Bei 30 min (*) zeigte sich eine signifikante Steigerung der hBD-2 mRNA-Expression ($p = 0,04$) gegenüber der unstimulierten Kontrolle (s. Abb. 9). Innerhalb des Zeitverlaufs von 30 bis 240 min folgte ein signifikanter Abfall ($p = 0,023$ bzw. $p = 0,031$) der mRNA-Expression.

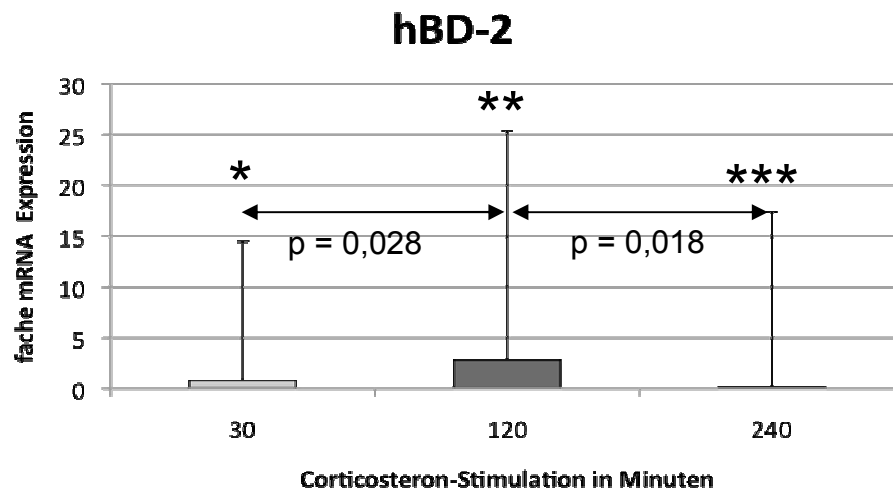


Abbildung 13: Genexpression des humanen beta-Defensin-2 (hBD-2) in Gingiva-epithelzellen nach Stimulation mit Corticosteron. Zu allen Zeitpunkten erfuhr hBD-2 eine signifikante Erniedrigung der mRNA-Expression ($p = 0,02$ (*) bzw. $p = 0,035$ (**) bzw. $p = 0,017$ (***)) gegenüber den jeweiligen unstimulierten Kontrollen (s. Abb. 9). Eine erhöhte mRNA-Expression von hBD-2 zeigte sich nach 120 min im Vergleich zur Expression nach 30 min ($p = 0,028$) bzw. 240 min Stimulation ($p = 0,018$).

3.2.3 Expression von IL-8 nach Stimulation mit Prostaglandin-B₂, -D₂, Cortisol und Corticosteron

Die Genexpression von IL-8 konnte in stimulierten Gingivaepithelzellen (Prostaglandin-B₂, -D₂, Cortisol und Corticosteron) sowie in der unstimulierten Kontrolle bzw. Ethanol-Kontrolle dargestellt werden.

Bei der Ethanol-Kontrolle zeigte sich zwischen 120 und 240 Minuten eine signifikante Erniedrigung der IL-8 mRNA-Expression (Abb. 14). Prostaglandin-B₂ lieferte nach 30 Minuten eine deutliche Erhöhung gegenüber der unstimulierten Kontrolle und zeigte dann einen signifikanten Abfall für die Expression von IL-8 (Abb. 15). Cortisol steigerte die mRNA-Expression für IL-8 zwischen 120 und 240 Minuten deutlich. Prostaglandin-D₂ und Corticosteron wiesen dagegen keine signifikanten Änderungen auf (Abb. 16 und 18).

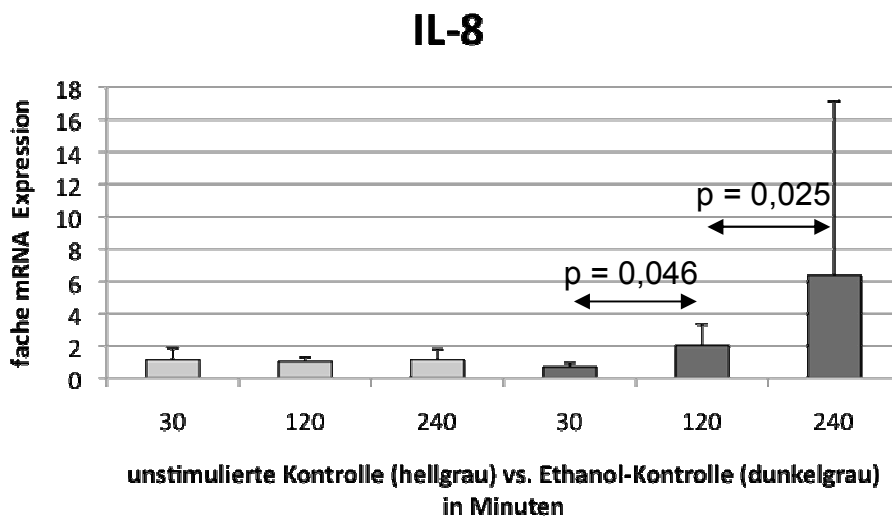


Abbildung 14: Genexpression von Interleukin-8 (IL-8) in Gingivaepithelzellen der unstimulierten Kontrolle bzw. Ethanol-Kontrolle. Innerhalb des Zeitverlaufs zeigte sich für die Ethanol-Kontrolle eine signifikante Steigerung der mRNA-Expression ($p = 0,046$ bzw. $p = 0,025$).

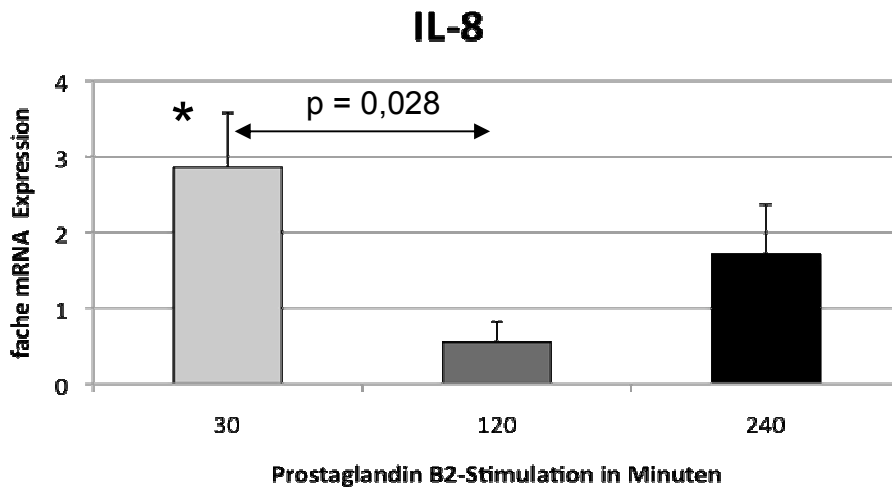


Abbildung 15: Genexpression von Interleukin-8 (IL-8) in Gingivaepithelzellen nach Stimulation mit Prostaglandin-B₂. Nach 30 min (*) wies die mRNA-Expression eine Steigerung ($p = 0,034$) gegenüber der unstimulierten Kontrolle auf (s. Abb. 14). Zwischen 30 und 120 min zeigte sich eine signifikante Erniedrigung der mRNA-Expression ($p = 0,028$).

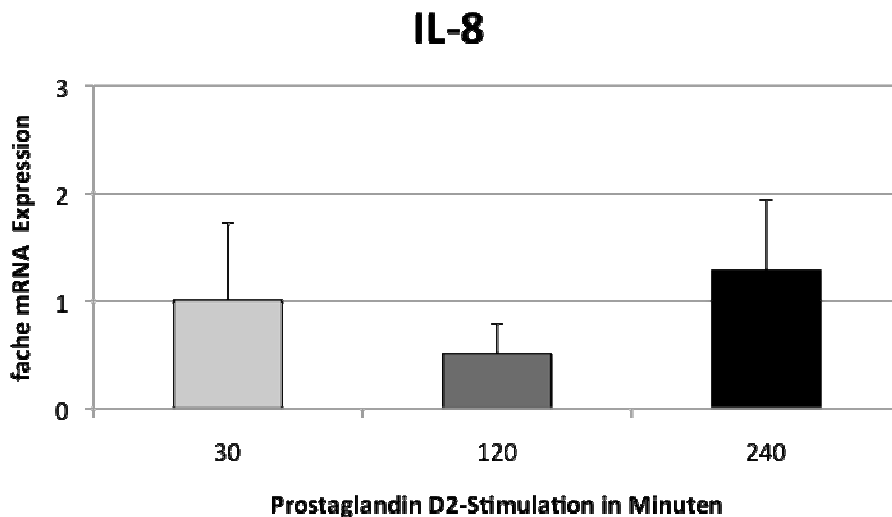


Abbildung 16: Genexpression von Interleukin-8 (IL-8) in Gingivaepithelzellen nach Stimulation mit Prostaglandin-D₂. Innerhalb der 240 min zeigten sich keine signifikanten Änderungen der mRNA-Expression.

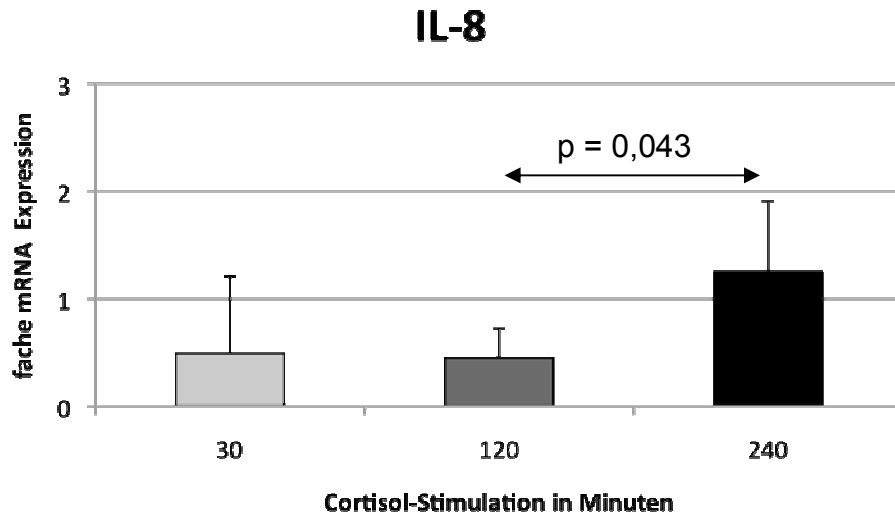


Abbildung 17: Genexpression von Interleukin-8 (IL-8) in Gingivaepithelzellen nach Stimulation mit Cortisol. Zwischen 120 und 240 min zeigte sich eine signifikante Steigerung der mRNA-Expression ($p = 0,043$).

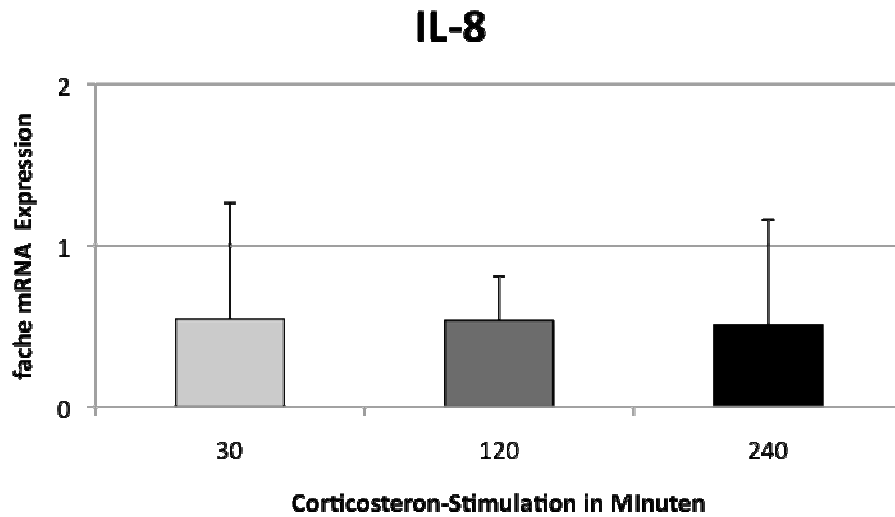


Abbildung 18: Genexpression von Interleukin-8 (IL-8) in Gingivaepithelzellen nach Stimulation mit Corticosteron. Innerhalb der 240 min zeigten sich keine signifikanten Änderungen der mRNA-Expression.

4. Diskussion

Die oralen Epithelien stellen die Grenzfläche zwischen der Umwelt und dem Organismus dar. Daher stehen diese in direktem Kontakt mit einer Vielzahl von Mikroorganismen und deren Stoffwechselprodukten. Unter gesunden Bedingungen, treten dort trotzdem selten Infektionen auf. Es ist eine neuere Erkenntnis, dass orale Epithelien nicht nur eine physikalische Barriere darstellen, sondern in der Lage sind, aktiv auf die bakterielle Besiedelung zu reagieren (Eberhard et al., 2009). Diese Reaktion erfolgt zum Teil durch die aktive Synthese antimikrobieller Peptide als Teil der angeborenen Immunabwehr, welche gegenüber Bakterien, aber auch Pilze und membranumgebene Viren wirken können (Dale, 2002; Dale und Krisanaprakornkit, 2001; Schröder, 1999b). Die angeborenen Mechanismen bilden somit die erste Barriere gegen den Eintritt von Mikroorganismen an Grenzflächen wie Haut und Schleimhäuten. Das menschliche Immunsystem setzt sich aus der angeborenen und der erworbenen, adaptativen Immunabwehr zusammen, die Pathogene bei erneuter Infektion erkennt und somit einen Selektionsvorteil bietet. Dabei regulieren und beeinflussen diese sich gegenseitig. Bis heute sind die komplexen Mechanismen der einzelnen Interaktionen zwischen beiden Systemen zum Teil noch unerforscht. Gegenstand verstärkter Forschung war bis jetzt vornehmlich das erworbene Immunsystem, welches durch enorme Spezifität beeindruckt. Dieses wird durch B- und T-Lymphozyten repräsentiert, die die Funktion über Antigen-Antikörper-Reaktionen vermitteln. Diese können Mikroorganismen wieder erkennen und diese durch freigesetzte Antikörper rasch neutralisieren.

Der zellulären angeborenen Abwehr gehören neutrophile Granulozyten, Monozyten und Makrophagen an. Diese sind zur Phagozytose fähig und können nach Aktivierung Leukotriene, Prostaglandine und Thromboxane freisetzen (Golenhofen, 2004). Zum humoralen angeborenen Immunsystem zählen das Komplementsystem und die antimikrobiellen Peptide, Defensine (Ganz, 2003). Mittels Sekretion von Chemokinen können Monozyten aus Blutgefäßen in das Gewebe übertreten und dort zu Makrophagen differenzieren. Diese Reaktion kann oft schon ausreichen um Infektionen zu verhindern. Ist dies nicht der Fall, sind diese dann in der Lage, Zytokine und vor allem Interleukine zu produzieren, welche wiederum stimulierend auf Lymphozyten

wirken. Dadurch erfolgt der Übergang vom angeborenem zum erworbenen Immunsystem (Golenhofen, 2004). Ein effizienterer Infektionsschutz ist damit gegeben. In der vorliegenden Arbeit wurden Untersuchungen an Kulturen von Zellen oraler Gewebe vorgenommen. Hierbei handelte es sich um Gingivaepithelzellen von drei unterschiedlichen Donoren (n=3).

Das Ziel dieser Arbeit war es, die Genexpression von hBD-1, -2 und IL-8 in Gingivaepithelzellen nach der Stimulation mit Eicosanoiden bzw. Steroidhormonen zu untersuchen. Im Rahmen dieser Stimualtionsexperimente sollten mögliche immunmodulierende Effekte der Stimulanzen auf die Geneexpression von hBD-1, -2 und IL-8 in Gingivaepithelzellen dargestellt werden.

Dafür wurden die herangezuchteten Kulturen mit den Eicosanoiden Prostaglandin-B₂ und Prostaglandin-D₂ bzw. mit den Steroidhormonen Cortisol und Corticosteron über den Zeitraum von 30, 120 und 240 Minuten stimuliert. Diese kurzen Zeitspannen wurden gewählt, um speziell die frühe Antwort bezüglich der Expression der oben genannten Gene zu untersuchen. Anschließend wurde eine quantitative Genexpressionsanalyse für hBD-1, -2, und IL-8 mit Hilfe der Real-Time-Polymeraseketten-reaktion (PCR) durchgeführt.

Bei der Real-Time-PCR handelt es sich um ein thermozyklisches Verfahren, womit bereits kleine Mengen von DNA-Fragmenten mit hoher Ausbeute (exponentiell) amplifiziert werden. Die zur Analyse der Genexpression verwendete Real-Time-PCR ist ein sehr sensitives Verfahren und erlaubt neben der üblichen Amplifizierung der cDNA zusätzlich eine Quantifizierung mit Hilfe von Fluoreszenzmessungen. Die Fluoreszenzaufzeichnung aus einer Probe erfolgt dann, wenn das Fluoreszenzsignal des amplifizierten Produktes mindestens 5% stärker ist als die Hintergrundfluoreszenz der Reaktion (Schwellenwertzyklus / „Crossing point“) (Bustin, 2002 und 2000). Für die quantitative Analyse der Genexpression wurde zunächst das mRNA-Level des sogenannten Housekeeping-Gens untersucht. Als Housekeeping-Gene werden Gene bezeichnet, die Zellen zumeist gleichmäßig, d.h. konstitutiv in Zellen exprimieren (Dheda et al., 2004; Thellin et al. 1999). beta-Aktin ist als Bestandteil des Zytoskeletts ein häufiges Protein in Eukaryonten und besitzt eine konstitutive, nicht-alternierende Expression. Die Darstellung der mRNA-Expression von beta-Aktin bietet daher die

Möglichkeit, zunächst den Erfolg der reversen Transkriptionspolymerasekettenreaktion zu überprüfen, und darüber hinaus die ermittelten C_t -Werte der Zielgene zu normalisieren. Die Genexpression von beta-Aktin konnte in allen Proben sowohl im Rahmen der qualitativen als auch der quantitativen Analyse nachgewiesen werden. Aufgrund dessen konnten die C_t -Werte der zu untersuchenden Gene hBD-1, -2, IL-8 sowie des Housekeeping-Gens beta-Aktin und der jeweiligen unstimulierten Kontrollen zusammen mit den entsprechenden Primereffizienzen mittels der Formel nach Pfaffl in Korrelation gebracht und die relativen Expressionen berechnet werden (Pfaffl, 2001). Die Ergebnisse wurden dokumentiert und anschließend für die statistische Auswertung herangezogen. Die Auswertung erfolgte mit der Statistik- und Analysesoftware SPSS 17.0 (SPSS Software GmbH, München).

Die Wirkung von Corticosteroiden auf humane-beta-Defensine in Epithelzellen war in der Vergangenheit Fokus von molekularbiologischen Untersuchungen. In Bronchialepithelzellen zeigte die Stimulation mit Dexamethason keine Wirkung auf die hBD-1 Produktion (Duits et al., 2001). Dieses Steroid wird synthetisch hergestellt und besitzt gegenüber den natürlichen Hormonen eine deutliche Steigerung der glucocorticoiden Wirkung (Thun und Schwartz-Porsche, 1992). Durch die Halogenierung am C-9-Atom (Fluoratom) kommt es nicht nur zur Erhöhung der Affinität zum Glucocorticoidrezeptor, sondern auch zur Verlangsamung der Metabolisierung, was eine dementsprechend längere Wirkdauer zur Folge hat (Hogger, 2003; Thun und Schwartz-Porsche, 1992). Die Wirkstärke von Cortisol wird bis zu 40-fach übertroffen, wobei die mineralocorticoide Wirkung zu vernachlässigen ist (Ungemach, 2002).). In Epithelzellen der Cornea hatte Dexamethason auf die Genexpression von hBD-1 keinen regulativen Einfluss (Terai et al., 2004). In der vorliegenden Studie konnten erstmals unterschiedliche Reaktionen der gingivalen Epithelzellen nach der Stimulation mit Steroidhormonen gezeigt werden. Während Prostaglandin- B_2 und - D_2 keine Änderung der Genexpression von hBD-1 zeigten, konnten für Cortisol und Corticosteron entgegengesetzte Ergebnisse beobachtet werden. Cortisol reduzierte die Expression von hBD-1 signifikant, während für Corticosteron eine deutliche Zunahme ermittelt werden konnte. Die Ergebnisse der vorliegenden Studie lassen vermuten, dass Corticosteroide die Genexpression der antimikrobiellen hBD-1 und hBD-2 auf

unterschiedliche Weise in Epithelzellen der Gingiva im Vergleich zu Zellen der Cornea und der Bronchien regulieren.

In Epithelzellen der Cornea konnte der modulierende Effekt von Dexamethason auf hBD-2 nachgewiesen werden (Terai et al., 2004). In Epithelzellen der Cornea erhöhte Dexamethason die Expression für hBD-2, während die für hBD-1 unverändert blieb. Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass im Zustand der glucocorticoiden Immunsuppression dennoch ein Infektionsschutz durch gesteigerte hBD-2 Produktion gegeben ist (Terai et al., 2004). In einer vorangegangenen Studie zeigte sich, dass in Epithelzellen bronchialer Herkunft das Glucocorticoid Dexamethason weder einen stimulierenden noch inhibierenden Effekt auf die Genexpression von hBD-2 hatte (Duits et al., 2001). Während Prostaglandin-B₂ und -D₂ keine Änderung der Genexpression von hBD-2 zeigten, konnten die Untersuchungen im Rahmen dieser Studie erstmals Wirkmechanismen zweier unterschiedlicher Corticosteroide auf Gingivaepithelzellen ermitteln. Cortisol erhöhte zwar kurzfristig (30 min) die Genexpression für hBD-2 in Gingivaepithelzellen signifikant. Da aber sowohl die unstimulierte Kontrolle als auch die Ethanol-Kontrolle einen insgesamt hohen Level an hBD-2 zeigten, ist der stimulative Effekt von Cortisol zu diesem Zeitpunkt auf die mRNA-Expression von hBD-2 zweifelhaft. Da sich nach 120 Minuten die hBD-2-Expression deutlich erniedrigte, ist vielmehr von einer hBD-2 Inhibierung nach Cortisol-Stimulation auszugehen. Die hier gezeigten Daten ab 120 Minuten bestätigen in der Literatur beschriebenen Untersuchungen an Zellen anderer Gewebe (Jang et al., 2007; Varoga et al., 2008). Da auch Corticosteron die Genexpression für hBD-2 signifikant erniedrigte, kann von einer glucocorticoiden Hemmung der hBD-2-Produktion in Gingivaepithelzellen ausgegangen werden. Zusammenfassend könnte die Tendenz abgeleitet werden, dass die jeweiligen Epithelien verschiedene Mechanismen hinsichtlich der Produktion humaner beta-Defensine besitzen. Da die Expression antimikrobieller Peptide durch die Präsenz von Mikroorganismen maßgeblich beeinflusst wird (Chung et al., 2007), könnten Unterschiede in der Zusammensetzung der mikrobiellen Flora in den jeweiligen Körperregionen als mögliche Erklärung für dieses Phänomen herangezogen werden.

Das Interleukin-8 (IL-8) ist wie die humanen beta-Defensine eine Komponente des angeborenen Immunsystems (Ganz, 2003; Struyf et al., 2003). Auf neutrophile Granulozyten wirkt das Zytokin IL-8 primär chemotaktisch und aktiviert deren Phagozytosebereitschaft (Ibelgauffs, 2002). Während Cortisol, Corticosteron und Prostaglandin-D₂ keine direkte Wirkung auf Genexpression von IL-8 zeigten, lieferte Prostaglandin-B₂ (PGB₂) als einziger proinflammatorischer Mediator ein signifikantes Ergebnis in Gingivaepithelzellen. Nach 120 Minuten reduzierte es die Genexpression für IL-8 deutlich. Das Eicosanoid ist bekannt, als Co-Stimulator bei der T-Lymphozyten Aktivierung zu fungieren (Cattan et al., 2000). T-Lymphozyten bilden die spezifische zelluläre Immunabwehr und sind für die zellvermittelte Zytotoxizität verantwortlich. T-Lymphozyten sind für die Kontrolle von virusbefallenen Körperzellen, für die Abwehr von Pilzen und Parasiten und für die Zerstörung von entarteten Körperzellen zuständig. Aktivierte T-Zellen können auch zu sogenannten T-Helferzellen differenzieren, die wiederum weitere Immunzellen anlocken. PGB₂ ist somit an einer Aktivierung und Etablierung des erworbenen Immunsystems am Ort des Geschehens beteiligt (Abbas et al., 1994). Durch die hier gezeigte Erniedrigung der IL-8 Expression könnte es zusätzlich die unspezifische Immunantwort hemmen und somit die eigene Wirkung verstärken. Die Ergebnisse zeigten darüber hinaus, dass Ethanol ebenfalls einen stimulativen Effekt auf den Genexpression von IL-8 nach 120 bzw. 240 Minuten ausübte. Dennoch war die Genexpression von IL-8 nach Stimulation mit Prostaglandin-B₂, Prostaglandin-D₂, Cortisol oder Corticosteron im Vergleich zur Kontrollstimulation mit Ethanol deutlich niedriger. Da alle Stimulanzen zunächst in Ethanol gelöst wurden, lässt sich daher auf indirekt auf eine inhibierende Wirkung sowohl von Prostaglandin-B₂ und Prostaglandin-D₂ als auch von Cortisol und Corticosteron auf die IL-8-Genexpression in Gingivaepithelzellen schließen.

In vorausgegangenen Studien konnte gezeigt werden, dass Mediatoren wie Eicosanoide und Steroidhormone auf entzündliche sowie immunologische Reaktionen in Zellen und Geweben Einfluss nehmen können (Horn et al., 2003; Klinke und Silbernagl, 1996). Die Effekte von Eicosanoiden und Steroidhormonen auf die frühe Immunantwort (hBD-1, -2 und IL-8) von Gingivaepithelzellen wurden bislang kaum untersucht. Im Rahmen dieser Studie wurde erstmals der Effekt von Eicosanoiden (Prostaglandin-B₂ und

Prostaglandin-D₂,) oder Steroidhormonen (Cortisol und Corticosteron) auf die Genexpression von hBD-1 und hBD-2 in Gingivaepithelzellen dargestellt. Die Analysen im Rahmen dieser Studie konnten gegensätzliche Regulationen der Genexpression von hBD-1 und hBD-2 nach Cortisol- bzw. Corticosteron-Stimulation zeigen. Darüber hinaus stellte sich eine deutliche Herunterregulation der Genexpression von IL-8 nach Prostaglandin-B₂-Stimulation heraus.

Zukünftige Studien könnten weitere Effekte von Eicosanoiden und Steroidhormonen auf die Expression antimikrobieller Peptide darstellen und möglicherweise zu neuen Erkenntnissen bezüglich der Therapie und im Speziellen der Prävention gingivaler Entzündungen führen.

5. Zusammenfassung

Die Gingivitis, eine bakteriell verursachte Entzündung, ist die häufigste Erkrankung der Mundhöhle. Eine Gingivitis entwickelt sich als Reaktion auf die dentale Plaque. Gingivaepithelzellen können im Rahmen einer Immunreaktion antimikrobielle Peptide und pro-inflammatorische Mediatoren synthetisieren. Die Expression dieser Mediatoren kann durch eine Vielzahl unterschiedlicher Faktoren, wie z.B. durch Steroide, beeinflusst werden. Ziel dieser Arbeit war es, die mRNA-Expression von humanen beta-Defensinen (hBD-1, -2) und Interleukin-8 (IL-8) in Gingivaepithelzellen nach Stimulation mit Eicosanoiden oder Steroidhormonen zu untersuchen.

Primäre Gingivaepithelzellen von drei unterschiedlichen Donoren (n=3) wurden bis zu einer Konfluenz von 80% kultiviert und jeweils mit einem Eicosanoid (Prostaglandin-B₂, -D₂) oder Steroidhormon (Cortisol, Corticosteron) über einen Zeitraum von 30, 120, 240 Minuten stimuliert. Anschließend erfolgte die RNA-Extraktion und Synthese der komplementären DNA. Die quantitative Auswertung der mRNA-Expression von hBD-1, -2, IL-8 und beta-Aktin (Housekeeping-Gen) erfolgte mit Hilfe der Real-Time-Polymerasekettenreaktion.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen einen regulativen Einfluss von Cortisol und Corticosteron auf die mRNA-Expression von hBDs in Gingivaepithelzellen. Während Cortisol die Genexpression von hBD-1 und hBD-2 erniedrigte, zeigte Corticosteron eine Stimulation der Genexpression von hBD-1 und eine Hemmung für hBD-2. Die Genexpression von IL-8 wurde in dem untersuchten Zeitraum durch Steroidhormone oder Eicosanoide in Gingivaepithelzellen herunterreguliert. Stimulative Effekte bzw. die Herunterregulation der mRNA von hBD-1 und -2 zeigten entsprechende zeitabhängige Muster.

Die vorliegende Arbeit konnte erstmals die gegensätzliche Regulation der hBD-1 und hBD-2 Genexpression in Gingivaepithelzellen nach Cortisol- bzw. Corticosteron-Stimulation zeigen. Vor diesem Hintergrund könnten in Zukunft neue Ansätze für die Prävention bzw. Therapie gingivaler Entzündungen entwickelt werden.

6. Literaturverzeichnis

Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. Cellular and Molecular Immunology 2. Aufl. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1994

Abdolvahab-Emminger H. Physikum Exakt. Stuttgart-New York: Thieme Verlag, 2002

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

Borghans JA, Noest AJ, De Boer RJ. How specific should immunological memory be?. J Immunol 1999; 163: 569-575

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

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

Cattan N, Mary D, Peleraux A, Mari B, Aussel C, Rossi B. Prostaglandin B(2) delivers a co-stimulatory signal leading to T cell activation. Eur Cytokine Netw. 2000; 11: 293-9

Ceaser EK, Ramachandran A, Levonen AL, Darley-Usmar VM. Vascular signaling by free radicals oxidized low density lipoprotein and 15-deoxy-delta12,14-PGJ2 increase mitochondrial complex I activity in endothelial cells. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2003; 285: 2298-2308

Chaban VV, Micevych PE. Estrogen receptor-alpha mediates estradiol attenuation of ATP-induced Ca²⁺ signaling in mouse dorsal root ganglion neurons. J Neurosci Res 2005; 81: 31-37

Chriguer RS, Elias LL, da Silva IM Jr, Vieira JG, Moreira AC, de Castro M. Glucocorticoid sensitivity in young healthy individuals: in vitro and in vivo studies. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90: 5978-5984

Chung WO, Dommisch H, Yin L, Dale BA. Expression of defensins in gingiva and their role in periodontal health and disease. *Curr Pharm Des.* 2007; 13(30): 3073-83.

Cotran R, Kumar V, Collins T. Robbins pathologic basis of disease. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1999

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

Dale BA. Periodontal epithelium: a newly recognized role in health and disease. *Periodontol 2000* 2002; 30: 70-78

Dheda K, Huggett JF, Bustin SA, Johnson MA, Rook G, Zumla A. Validation of housekeeping genes for normalizing RNA expression in real-time PCR. *Biotechniques.* 2004; 37: 112-119

Dommisch H, Winter J, 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* 2010; im Druck

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

Dommisch H, Whasun OC, Maryam GR, Williams D, Rangarajan M, Curtis MA, Dale BA. Protease-activated receptor 2 mediates human beta-defensin 2 and CC chemokine ligand 20 mRNA Expression in response to proteases secreted by *Porphyromonas gingivalis*. *Infect and Immun* 2007b; 75: 4326-4333

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

Duits LA, Rademaker M, Ravensbergen B, van Sterkenburg MA, van Strijen E, Hiemstra PS, Nibbering PH. Inhibition of hBD-3, but not hBD-1 and hBD-2, mRNA expression by corticosteroids. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 280(2): 522-5

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

Eberhard J, Pietschmann R, Falk W, Jepsen S, Dommisch H. The immune response of oral epithelial cells induced by single-species and complex naturally formed biofilms. *Oral Microbiol Immunol*. 2009; 24(4): 325-30

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

Ganz T, Weiss J. Antimicrobial peptides of phagocytes and epithelia. *Semin in Hematol* 1997; 34: 343-354

Gaudreault E, Gosselin J. Leukotriene B₄ induces release of antimicrobial peptides in lungs of virally infected mice. *J Immunol* 2008; 180: 6211-6221

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

Golenhofen K. *Basislehrbuch Physiologie*. München: Urban & Fischer, 2004

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 J-M. A peptide antibiotic from human skin. *Nature* 1997; 387: 861

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

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

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

Hogger P. What happens in the body with glucocorticoids? Pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Pharm. unserer Zeit* 2003; 4: 296-301

Horn F, Lindenmeier G, Moc I, Grillhösl, Berghold S, Schneider N, Münster B. *Biochemie des Menschen*. Stuttgart-New York: Thieme Verlag, 2003

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

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

Jang BC, Lim KJ, Suh MH, Park JG, Suh SI. Dexamethasone suppresses interleukin-1beta-induced human beta-defensin 2 mRNA expression: involvement of p38 MAPK, JNK, MKP-1, and NF-kappaB transcriptional factor in A549 cells. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2007; 51(1): 171-84

Jones SA. Directing transition from innate to acquired immunity: defining a role for IL-6. *J Immunol* 2005; 175: 3463-3468

Jones DA, Carlton DP, McIntyre TM, Zimmerman GA, Prescott SM. Molecular cloning of human prostaglandin endoperoxide synthase type II and demonstration of expression in response to cytokines. *J Biol Chem* 1993; 268: 9049-9054

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

Kanda N, Watanabe S. Histamine enhances the production of human beta-defensin-2 in human keratinocytes. *Am J Physiol Cell Physiol* 2007; 293: 1916-1923

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

Klinke R, Silbernagl S. *Lehrbuch der Physiologie*. Stuttgart-New York: Thieme Verlag, 1996

Kreutzig T. *Biochemie Kurzlehrbuch*. Freiburg: Jungjohann Verlagsgesellschaft, 1994

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 Immunol* 2000; 68: 2907-2915

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

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

Lehrer RI, Ganz T. Antimicrobial peptides in mammalian and insect host defence. *Curr Opin Immunol* 1999; 11: 23-27

Li LC, Hou Q, Guo Y, Cheng GF. Inhibitory effects of hydrocortisone on human polymorphonuclear leukocyte adhesion to human synovial cell. *Yao Xue Xue Bao* 2001; 36: 401-406

Linnemann M, Kühl M. *Biochemie für Mediziner*. Berlin-Ulm: Vieweg Verlag, 1995

Liu A, Claesson HE, Mahshid Y, Klein G, Klein E. Leukotriene B₄ activates T cells that inhibit B-cell proliferation in EBV-infected cord blood-derived mononuclear cell cultures. *Blood* 2008; 11: 2693-2703

Löffler G, Petrides PE. *Bio- und Pathobiochemie*. Berlin-Tokio: Springer Verlag, 1998

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

Morgenroth K, Bremerich A, Lange DE. *Pathologie der Mundhöhle*. Stuttgart-New York: Thieme Verlag, 1996

Müller HP. *Checkliste Parodontologie*. Stuttgart-New York: Thieme Verlag, 2006

Murata T, Ushikubi F, Matsuoka T, Hirata M, Yamasaki A, Sugimoto Y, Ichikawa A, Aze Y, Tanaka T, Yoshida N, Ueno A, Ohishi S, Narumiya S. Altered pain perception and inflammatory response in mice lacking prostacyclin receptor. *Nature* 1997; 388: 678-682

Nicolas P, Mor A. Peptides as weapons against microorganisms in the chemical defense system of vertebrates. *Annu Rev Microbiol* 1995; 49: 277-304

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

Ohnishi H, Miyahara N, Dakhama A, Takeda K, Mathis S. Corticosteroids enhance CD8+ T-cell-mediated airway hyperresponsiveness and allergic inflammation by upregulating leukotriene B₄ receptor 1. *J Allergy Clin Immunol* 2008; 121: 864-871

Ost M, Uhl E, Carlsson M, Gidlof A, Soderkvist P, Sirsjo A. Expression of mRNA for phospholipase A₂, cyclooxygenases, and lipoxygenases in cultured human umbilical vascular endothelial and smooth muscle cells and in biopsies from umbilical arteries and veins. *J Vasc Res* 1998; 35: 150-155

O'Sullivan MG, Chilton FH, Huggins EM, Jr., McCall CE. Lipopolysaccharide priming of alveolar macrophages for enhanced synthesis of prostanoids involves induction of a novel prostaglandin H synthase. *J Biol Chem* 1992; 267: 14547-14550

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

Roessner A. Pathologie für Zahnmediziner. München-Jena: Urban & Fischer, 2004

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

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular cloning: A laboratory manual. Spring Harbor-New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989

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

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

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

Struyf S, Proost P, Van Damme J. Regulation of the immune response by the interaction of chemokines and proteases. *Adv Immunol* 2003; 81: 1-44

Terai K, Sano Y, Kawasaki S, Endo K, Adachi W, Hiratsuka T, Ihiboshi H, Nakazato M, Kinoshita S. Effects of dexamethasone and cyclosporin A on human beta-defensin in corneal epithelial cells. *Exp Eye Res* 2004; 79: 175-180

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

Thun R, Schwartz-Porsche D. Nebennierenrinde. In: Döcke F, HRSG. *Veterinärmedizinische Endokrinologie*. Stuttgart: Gustav Fischer Verlag, 1992: 309-353

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

Ungemach FR. *Pharmaka zur Beeinflussung von Entzündungen. Pharmakotherapie bei Haus- und Nutztieren*. Berlin: Parey Verlag, 2002

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

Varoga D, Tohidnezhad M, Paulsen F, Wruck CJ, Brandenburg L, Mentlein R, Lippross S, Hassenpflug J, Besch L, Müller M, Jürgens C, Seekamp A, Schmitt L, Pufe T. The role of human beta-defensin-2 in bone. *J Anat* 2008; 213(6): 749-57

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

Whaley K. Innate and Acquired Immunity 1996: <http://www.tulane.edu/~dmsander/WWW/MBChB/1b.html>

Woszczek G, Chen LY, Nagineni S, Kern S, Barb J, Munson PJ, Logun C, Danner RL, Shelhamer JH. Leukotriene D₄ induces gene expression in human monocytes through cysteinyl leukotriene type I receptor. *J Allergy Clin Immunol* 2008; 121: 215-221

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