

Einfluss von IL-4 auf die Genexpression antimikrobieller Peptide und
proinflammatorischer Mediatoren in gingivalen Zellen

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

Edina Juliane Canbulat geb. Glaser
aus Stuttgart

2011

Angefertigt mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Priv.-Doz. Dr. H. Dommisch
2. Gutachter: Prof. Dr. W. Götz

Tag der Mündlichen Prüfung: 11.10.2011

Aus der Poliklinik für Parodontologie, Zahnerhaltung und Präventive Zahnheilkunde
des Zentrums für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde des Universitätsklinikums Bonn
Prof. Dr. Dr. S. Jepsen, MS

Inhaltsverzeichnis

Einfluss von IL-4 auf die Genexpression antimikrobieller Peptide und proinflammatorischer Mediatoren in gingivalen Zellen.....	1
Inhaltsverzeichnis.....	3
Abkürzungsverzeichnis.....	5
1 Einleitung.....	9
1.1 Gingiva.....	10
1.2 Zytokine.....	14
1.3 Interleukin-4 (IL-4).....	16
1.4 Defensine.....	20
1.4.1 β -Defensine.....	21
1.5 Mediatorfunktionen humaner β -Defensine.....	23
1.6 Mediatoren der Immunantwort.....	25
1.6.1 CC-Chemokin-Ligand-20 (CCL20).....	25
1.6.2 Interleukin-1 β (IL-1 β).....	26
1.6.3 Interleukin-8 (IL-8).....	27
1.7 Ziel der Arbeit und Fragestellungen.....	28
2 Material und Methoden.....	29
2.1 Versuchsaufbau.....	29
2.2 Material und Reagenzien.....	29
2.3 Probengewinnung oraler Gewebe.....	29
2.4 Kultur primärer Zellen.....	30
2.5 Molekularbiologische Experimente zur qualitativen Genexpressionsanalyse.....	31
2.5.1 Qualitative Genexpressionsdarstellung.....	31
2.5.2 Standard-Polymerasekettenreaktion.....	31
2.6 Stimulation von GECs und HGFs mit IL-4.....	32
2.7 Quantitative Genexpressionsdarstellung.....	33

2.7.1	Real-Time-Polymerasekettenreaktion	33
2.8	Auswertung der quantitativen PCR	34
2.9	Statistische Auswertung der quantitativen Genexpressionsanalyse	36
3	Ergebnisse	37
3.1	Qualitative Genexpressionsanalyse	37
3.2	Optimierung der Real-Time-PCR	38
3.3	Quantitative Genexpressionsanalyse	39
3.3.1	Genexpression von hBD-1 nach Stimulation mit IL-4 bei GECs	40
3.3.2	Genexpression von hBD-2 nach Stimulation mit IL-4 bei GECs	41
3.3.3	Genexpression von CCL20 nach Stimulation mit IL-4 bei GECs	42
3.3.4	Genexpression von IL-1 β nach Stimulation mit IL-4 bei GECs	43
3.3.5	Genexpression von IL-8 nach Stimulation mit IL-4 bei GECs	44
3.3.6	Genexpression von hBD-1 nach Stimulation mit IL-4 bei HGFs	45
3.3.7	Genexpression von hBD-2 nach Stimulation mit IL-4 bei HGFs	46
3.3.8	Genexpression von CCL20 nach Stimulation mit IL-4 bei HGFs	47
3.3.9	Genexpression von IL-1 β nach Stimulation mit IL-4 bei HGFs	48
3.3.10	Genexpression von IL-8 nach Stimulation mit IL-4 bei HGFs.....	49
4	Diskussion.....	50
5	Zusammenfassung	58
6	Abbildungsverzeichnis.....	59
7	Tabellenverzeichnis.....	60
8	Formelverzeichnis	62
9	Anhang	63
9.1	Ergebnisse der Genexpression von hBD-1, hBD-2, CCL20, IL-1 β und IL-8 bei Gingivaepithel (GECs)- und Gingivafibroblastenzellen (HGFs).....	63
9.2	Ergebnisse für die Mittelwertgleichheit bei GECs und HGFs für hBD-1, hBD-2, CCL20, IL1- β und IL-8.....	66
10	Literaturverzeichnis.....	68
11	Danksagung	87

Abkürzungsverzeichnis

α	alpha
Å	Angström
AMPs	Antimikrobielle Peptide
ANUG	Akute nekrotisierende ulzerative Gingivitis
AP	Adulte Parodontitis
Aqua dest.	Destilliertes Wasser
β	beta
bcr-abl-Tyrosinkinase	Fusion der Gene "BCR" und "ABL" mit der Folge einer Aktivierung des Enzyms Tyrosinkinase
bp	Basenpaare
°C	Grad Celsius
CCL20	Chemokin-Ligand-20
CCR-6	Chemokinrezeptor-6
CD4+	Proteinkomplex aus T-Lymphozyten und Antigen CD4
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure (copy deoxyribonucleic acid)
CMMoL	Chronisch myelomonozytäre Leukämie
CO ₂	Kohlendioxid
Cox-1	Cyclooxygenase-1
Cox-2	Cyclooxygenase-2
C _t	Schwellenzyklus (threshold cycle)
CXC	Chemokinfamilie
DC	Dendritische Zellen
DNA	Desoxyribonukleinsäure (deoxyribonucleic acid)
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
dT	Desoxythymine
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>

et al.	und Mitarbeiter (et alii)
Fa.	Firma
FCS	Fötale Kälberserum
GAP-DH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GEC	Gingivaepithelzellen
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
h	Stunde
hBD-1	Humanes β -Defensin-1
hBD-2	Humanes β -Defensin-2
hBD-3	Humanes β -Defensin-3
HGF	Humane Gingivafibroblasten
IFN- γ	Interferon- γ
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IL-2-R	Interleukin-2-Rezeptor
IL-4-R	Interleukin-4-Rezeptor
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
KRK	Kolorektales Karzinom
LAK	Lymphokinaktivierte Killerzellen
LARK	Leber- und aktivierungsgesteuertes Chemokin (liver and activation-regulated chemokine)
LJP	Lokalisierte juvenile Parodontitis
MALT	Mukosa-assoziiertes lymphatisches Gewebe
mg	Milligramm
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (Major Histocompatibility Complex)
min.	Minute

MIP	Makrophageninflammatorisches Protein (Macrophage Inflammatory Protein)
MIP-3 α	Makrophagen inflammatorisches Peptid-3alpha
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
MMP-3	Matrix Metalloproteinase-3
mRNA	Messenger-Ribonukleinsäure (messenger ribonucleic acid)
MTA	Medizinisch technische Assistentin
ng	Nanogramm
NF-E2	Nucleärer Factor E2 (nuclear factor-erythroid 2)
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
O ₂	Sauerstoff
PBS	Phosphat gepuffertes Salz (phosphate buffered saline)
PCR	Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction)
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
PP	Präpubertäre Parodontitis
PTGS-1	Prostaglandin Endoperoxid Synthase 1
PTGS-2	Prostaglandin Endoperoxid Synthase 2
RNA	Ribonukleinsäure (ribonucleic acid)
rpm	Umdrehungen pro Minute (revolutions per minute)
RPP, AgP	schnell verlaufende progressive oder aggressive Parodontitis
RT-PCR	Reverse Transkriptase Polymerasekettenreaktion
s	Sekunde/n
t	Zeit
Th	T-Helferzelle
TNF- α	Tumornekrosefaktor-alpha

µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
U	enzymatische Einheit/-en (unit/-s)
%	Prozent

1 Einleitung

Die Epithelien der Mundhöhle stellen die Grenze zwischen Umwelt und Organismus dar und stehen ständig in direktem Kontakt mit einer Vielzahl von Mikroorganismen und deren Stoffwechselprodukte. Sie verfügen über unterschiedliche Mechanismen der Immunabwehr, um das Eindringen der Mikroorganismen zu verhindern, ohne dass klinische Anzeichen einer Entzündung auftreten (Lehrer, 2004; Yin et al., 2011, Feghali et al., 2011). Die oralen Epithelien stellen nicht nur eine physikalische Barriere dar aufgrund ihrer zahlreichen Zell–Zell Interaktionen in Form von „Tight Junctions“, Desmosomen und Zonula adherens. Vielmehr sind die Epithelien in der Lage, durch Bildung antimikrobieller Peptide, die direkt osmotische Wirkung auf Mikroorganismen und zytokinähnliche Funktionen innerhalb des Epithelverbundes zu übernehmen, eine chemische Barriere zu bilden und damit aktiv auf die bakterielle Besiedelung zu reagieren (Schröder, 1999a; Ara et al., 2009; Wada et al., 2009; Roman et al., 2011).

Das menschliche Immunsystem besteht zum einen aus zellulären, zum anderen aus humoralen Abwehrmechanismen. Es lässt sich in die unspezifische oder angeborene Immunabwehr („innate immunity“) und die spezifische oder erworbene Immunabwehr („adaptive immunity“) unterteilen und bietet dem Organismus Schutz vor Infektionen durch verschiedene Mikroorganismen (Janeway et al., 2002; Medzhitov, 2007; Souza et al., 2010).

Für die Abwehr bakterieller, aber auch viraler Angriffe und Pilzinfektionen ist das angeborene Immunsystem zuständig (Dale&Krisanaprakornkit, 2001; Dale, 2000; Schröder, 1999b; Yoon, 2010). Es wird repräsentiert durch Granulozyten, Monozyten, Makrophagen, natürliche Killer-Zellen, Mastzellen sowie Epithel- oder auch Endothelzellen. Diese Zellen können auf molekularer Ebene potentielle Infektionen erkennen, da sie in der Lage sind, bakterielle Bestandteile (Peptidoglykanen oder Lipopolysacchariden) an membranständige Rezeptoren wie z.B. Toll-Like-Rezeptoren zu binden (Hornef et al., 2002; Medzhitov, 2007; Takeda et al., 2003, Mitchell et al., 2011). Die angeborenen Mechanismen bilden somit die erste Barriere gegen den Eintritt von Mikroorganismen an Grenzflächen wie Haut und Schleimhäuten.

Durch Toll-Like-Rezeptoren könnte vermutlich die Expression von Defensinen, proinflammatorischen Zytokinen (TNF- α , IL-1, -6, -12, und -18), sowie von Chemokinen (IL-8) und Eikosanoiden vermittelt werden (Chang et al., 2007; Hornef et al., 2002; Akira et al., 2001; Mitchell et al., 2011; Khoo et al., 2011). Antimikrobielle Peptide töten nicht nur direkt Mikroorganismen ab, sondern haben auch chemotaktische Eigenschaften, indem diese dendritische Zellen, Makrophagen und T-Lymphozyten aktivieren und somit eine wertvolle Verbindung zum erworbenen Immunsystem

schaffen können (Dale, 2003; Chung et al., 2007, Yang et al., 2000). Die erworbene Immunabwehr wird durch T- und B-Lymphozyten verkörpert, die über Antigen-Antikörperreaktionen vermittelt werden (Takeda et al., 2003; Kumar et al., 2011).

1.1 Gingiva

Charakteristisch für eine klinisch gesunde Gingiva, auch marginales Parodont genannt, sind bestimmte Merkmale der Form, Farbe und Konsistenz. Die Girlandenform äußert sich in der Ausbildung mehr oder weniger ausgeprägter Interdentalpapillen, die Farbe ist meist blasrosa, die Oberfläche gestipelt. Eine gingivale Furche bildet die Trennlinie zwischen der marginalen und der befestigten Gingiva. Als Sulcus gingivae wird die Einsenkung um den Zahn bezeichnet. Die symptomlose Gingiva enthält praktisch immer ein Infiltrat aus neutrophilen Granulozyten und Lymphozyten (Lindhe, 2005; Wada et al., 2009).

Histologisch finden sich drei unterschiedliche Epithelien: das keratinisierte orale Gingivaepithel, das lateral den Sulkus begrenzende keratinisierte orale Sulkusepithel und das nichtkeratinisierte Saumepithel. Das nichtkeratinisierende Saumepithel umgibt den Zahnhals ringförmig und geht auf der Höhe des Sulkusbodens in das orale Sulkusepithel über (Nanci, 1996; Hatakeyama et al., 2006). Es ist ein mehrschichtiges Plattenepithel, dessen Zellen über Desmosomen miteinander verbunden sind (Presland et al., 2002; Lindhe, 2005; Gasparoni et al., 2005). Der zwischen Saumepithel und Zahnoberfläche bestehende Haftmechanismus wird auch als Epithelansatz bezeichnet. Es wird ein biologisches Prinzip beschrieben, bei dem Epithelzellen, die mit einem nicht-epithelialen Substrat in Kontakt treten, eine Basallamina ausbilden und sich über Hemidesmosomen an diese anheften. Aus Zahnoberfläche, Basallamina, Hemidesmosomen und Zellmembran bildet sich ein Komplex, der für die Haftung der Saumepithelzellen an der Zahnoberfläche sorgt. Der Epithelansatz garantiert die Kontinuität der epithelialen Auskleidung der Mundhöhle, das Saumepithel als Ganzes sorgt für die Erhaltung und die Abwehrleistung des gingivalen Gewebes am Zahnhals (Lindhe, 2005; Presland et al., 2002).

Neben dem Epithel besteht die Gingiva aus derb fibrösem Bindegewebe, der Lamina propria, welches von mehrschichtigem, meist verhorntem Plattenepithel überzogen wird (Kühnel, 2002). Das Bindegewebe setzt sich hauptsächlich aus Bindegewebsfasern, Proteoglycanen, Blutgefäßen und Fibroblasten zusammen (Junqueira et al., 2005).

Die größte Zellpopulation wird von den Fibroblasten gestellt, die als ortsständige Zellen eine wichtige Rolle bei der Bildung von geformter Interzellulärsubstanz (Bindegewebe) und ungeformter Interzellulärsubstanz (Gundsubstanz) bilden. Zu den Produkten gehört hauptsächlich das Kollagen, das zusammen mit den ebenfalls gebildeten Proteoglycanen für die

das Kollagen, das zusammen mit den ebenfalls gebildeten Proteoglycanen für die Festigkeit der extrazellulären Matrix sorgt (Benninghoff, 2008). Im Bindegewebe klinisch gesunder Gingiva kommen neben Makrophagen und Mastzellen auch Infiltrate von neutrophilen Granulozyten, Lymphozyten und Plasmazellen vor, die für die Reinigung des Gewebes und die immunologische Kontrolle zuständig sind (Into et al., 2010).

Der Faserapparat des gingivalen Bindegewebes weist eine komplizierte Architektur auf und ist als Fortsetzung des desmodontalen Fasergerüsts zu betrachten. Die Kollagenfaserbündel des Bindegewebes bilden den Supraalveolären Faserapparat und befestigen das gingivale Gewebe an Wurzelzement und Alveolarknochen, stabilisieren die Position der Zähne, unterlagern das Saumepithel und verleihen der Gingiva ihre Reißfestigkeit (Junqueira et al., 2005). An der Grenzfläche zwischen Gingiva und Zahnoberfläche gibt es somit zwei verschiedene Haftmechanismen. Das Saumepithel ist mit der Zahnoberfläche durch eine epitheliale Haftung verbunden. Im Bereich des Bindegewebes inserieren Faserbündel in das Wurzelzement. Im Idealfall grenzen diese beiden verschiedenen Haftmechanismen an der Schmelz-Zement-Grenze aneinander. Das gingivale Gewebe besitzt eine hohe Regenerationsfähigkeit, aufgrund hoher Umsatzraten seiner epithelialen und bindegewebigen Bestandteile. Ein Großteil der immunologischen Abwehrleistung findet im Saumepithel statt (Junqueira et al., 2005; Into et al., 2010).

Akut entzündliche Vorgänge der Gingiva gehen mit Rötungen, Schwellungen, und evtl. Ulzerationen der Gingiva einher. Weitere Charakteristika entzündeter Gingiva sind eine erhöhte Fließrate der Sulcusflüssigkeit, eine erhöhte Temperatur im Sulcus, Blutung nach Sulkussondierung und eine erhöhte Sondierungstiefe ohne Attachmentverlust, d.h. Pseudotaschen (Löe et al., 1965; Page&Schroeder, 1976). Nicht selten lässt sich bei vielen Patienten Zahnfleischbluten diagnostizieren. Die Formen einer Gingivitis lassen sich in nicht plaqueinduzierte Formen, auch unspezifische Traumen wie Verbrennungen, Verätzungen oder mechanische Infiltrate, und in plaqueinduzierte Formen unterteilen (Armitage, 1999; Deutsche Gesellschaft für Parodontologie, 2002).

Wird die ursächliche Plaque beseitigt, so ist die Gingivitis voll reversibel. Lokale Faktoren, wie überstehende Restaurationsränder oder Zahnengstand können eine Plaque begünstigen. Bei einer Gingivitis liegt in der reifen Plaque neben der vorherrschenden Flora grampositiver, fakultativ-anaerober Kokken und Stäbchen eine im Vergleich zum gesunden Parodont erhöhte Zahl gramnegativer Kokken und Stäbchen vor (Lovegrove, 2004; Lindhe, 2005).

Plaqueinduzierte Gingivitis kann an Parodontien mit und ohne Attachmentverlust auftreten, der jedoch nicht progredient ist (Lindhe, 2005). Klinisch finden sich dentale Plaqueablagerungen im

Übergangsbereich Gingiva zu Zahn, diese initiieren marginale Entzündungsreaktionen (Lovegrove, 2004; Lang et al., 2009).

Die Gingivitiden können bei einem reduzierten Immunstatus, der Präsenz von Risikofaktoren, inflammatorischen Mediatoren und einem Überhandnehmen der parodontogenen Bakterien auf die tieferen Strukturen des Zahnhalteapparats übergreifen und eine Auflösung desmodontaler Fasern sowie des Knochens nach sich ziehen (Rateitschak et al., 2004).

Es ergibt sich folglich eine Taschenbildung im ursprünglichen Bereich des Zahnhalteapparats. Einsetzender Knochenabbau bedingt im fortgeschrittenen Stadium eine Zahnlockerung und nachfolgenden Zahnverlust (Schroeder, 1996). Anhand des Alters zur Zeit des Krankheitsbeginns, des Schweregrades und der endogenen bzw. exogenen Implizität teilt die heutige Medizin die Parodontitis in verschiedene Formen ein (Lautenbach, 1992; Lang, 2003). Ätiologisch liegen jeder differenzierten Erscheinungsform - analog zur Karies - die vier essentiellen Faktoren zu Grunde, die ausschließlich in Ergänzung das Krankheitsbild ergeben: „Wirt“, „Mikroorganismen“, „Substrat“ und „Zeit“ (König, 2000). Loe gelang es mit seinen Mitarbeitern bereits 1965 den essentiellen Zusammenhang zwischen entzündlichen parodontalen Erkrankungen und bakteriellen Einflüssen herzustellen (Löe, 1965). Quantitativ unterschiedlich verteilte Bakterienspezies bei parodontal Erkrankten ließen verschiedene Formen mit eigener Ätiologie und Wirtsabwehr vermuten (Haffajee, 1988).

Im Gegensatz zur Karies ist es jedoch bei der Parodontitis bis heute nicht möglich, einen speziellen Keim als bakteriellen Auslöser zu isolieren. Vielmehr rufen bei den unterschiedlichen Formen der Parodontitiden eine Reihe von gramnegativen Schlüsselbakterien in Kombination das Krankheitsbild hervor. Dazu gehören vor allem *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (A.a., früher: *Actinobacillus actinomycetemcomitans*), *Prevotella intermedia* (P.i.), *Porphyromonas gingivalis* (P.g.), *Tannerella forsythensis*, *Tannerella denticula* und Spirochäten (Dahle et al., 1993; Wolff, 1994; Lang, 2003; Rateitschak et al., 2004). Die 'American Academy of Periodontology' (= AAP) hat in Zusammenarbeit mit der 'European Federation of Periodontology' (= EFP) eine neue Einteilung der verschiedenen Parodontopathien herausgegeben (Armitage, 1999). So unterscheiden sich die dort aufgeführte Chronische Parodontitis (= CP, Typ II, chronisch langsam verlaufende PA beim Erwachsenen; ehemals 'Adult Periodontitis' (= AP)) von der Aggressiven Parodontitis (= AP, Typ III, schnell verlaufende PA; ehemals 'Early Onset Periodontitis' (= EOP) und 'Rapid Progressiv Periodontitis' (= RPP)) nicht nur auf Grund des klinischen Erscheinungsbildes, sondern auch signifikant durch die differierende subgingivale Flora (Moore & Moore, 1994; Lindhe, 1999; Lang, 1999; Armitage, 1999). Für die Lokale Aggressive Parodontitis (=

LAP) ist mittlerweile ein sogenanntes Schlüsselbakterium in Form von *A.a.* definiert worden (Zambo et al., 1983; van Winkelhoff et al., 1994).

Periimplantitis bezeichnet bakterielle Infektionen an Implantaten mit einer entzündlichen Infiltration des Weichgewebes und progressivem Knochenverlust (Esposito et al., 1999; Spiekermann, 1994; Heasman, 2010). Die Klassifikation nach Spiekermann orientiert sich am röntgenologischen Befund und unterscheidet - je nach dem Umfang des Knochenverlustes - vier Klassen (Spiekermann, 1994). Dabei werden horizontale, schüsselförmige, trichterförmige und spaltförmige Defektformen unterschieden (Behneke&Behneke, 2004 b).

Die Ätiologie der Periimplantitis wird heute als multifaktoriell angesehen. Dabei sind mikrobielle, biomechanische und kofaktorielle Einflussgrößen zu nennen (Strub et al., 1994; Ratka-Krüger et al., 2001; Deppe, 2003 a, Heitz-Mayfield, 2008, Renvert et al., 2008). Für die Ausbildung beziehungsweise den Verlauf periimplantärer Entzündungen werden in der Literatur weitere mögliche Kofaktoren genannt, wie biomechanische Überbelastung, die Implantatform und -oberfläche sowie immunologische Störungen, beziehungsweise Nikotinabusus (Spiekermann, 1994; Bain, 2003; Garg, 2010). Die Bedeutung einer keratinisierten Schleimhaut wird kontrovers diskutiert; in weiteren Untersuchungen konnte aber ein günstiger Einfluss bei der Prophylaxe periimplantärer Infektionen festgestellt werden (Deppe et al., 2004 b).

Die mikrobielle Flora, die sich an Implantaten mit unauffälliger Mukosa und nicht erhöhten klinischen Parametern befindet, entspricht weitgehend der Mikroorganismen um natürliche Zähne. Die Besiedelung mit überwiegend grampositiven fakultativ anaeroben Kokken und Stäbchen etabliert sich im Bereich des Implantats kurz nach der Implantatinsertion, auch gramnegative Spezies ist in geringer Zahl vorhanden (Keller et al., 1998; Mombelli&Mericske-Stern, 1990; Mombelli et al., 1987; Lekholm et al., 1986; Sordyl et al., 1995; Verardi et al., 2011). Bei zahnlosen Patienten finden sich eine höhere Anzahl von Kokken und weniger Stäbchen und Spirochäten um Implantate (Quirynen&Listgarten, 1990; Adell et al., 1990), was auf einen Einfluss der parodontalen Situation natürlicher Zähne auf das periimplantäre Weichgewebe hinweist. Studien zeigen, dass sich die Entstehung und die Mikroflora einer bakteriell bedingten Periimplantitis mit der einer Parodontitis vergleichen lassen (Eke et al., 1998; Lang et al., 1993; Ericson et al., 1992; Baron et al., 2001, Heitz-Mayfield, 2008; Verardi et al., 2011).

Es finden sich eine hohe Anzahl parodontal pathogener Keime, wie *A.a.*, *P.g.*, *P.i.*, *Bacteroides forsythus* und *Treponema denticola* (Hultin et al., 2002).

1.2 Zytokine

Die nötige Kommunikation zwischen Abwehrzellen und Körperzellen untereinander erfolgt zum einen über Zell-Zell-Interaktionen, zum anderen über Abwehr-Botenstoffe, sog. Zytokine und Hormone.

Zytokine sind (Glyko-)Proteine, die von vielen Zellen gebildet werden können (Horn et al., 2002). Stärke und Dauer der Immun- und Entzündungsreaktion werden durch diese Proteine gesteuert (Roitt, 1993). Ihre Wirkung entfalten diese vorwiegend in unmittelbarer Nähe der sezernierenden Zellen. Ihre Halbwertszeit ist sehr kurz und liegt im Minutenbereich. Zytokine können autokrin, parakrin und endokrin wirken, je nachdem in welcher Konzentration diese gebildet werden und ob diese die Blutbahn erreichen (Horn et al., 2002). Ein Großteil der Zytokine wird als Interleukine bezeichnet, die zum Teil im Dienst der unspezifischen Abwehr stehen, zum Teil Aufgaben im Rahmen der spezifischen Abwehr erfüllen. Zytokine wirken im Körper nicht alleine, sondern im Komplex mit mehreren anderen Zytokinen, die additiv, synergistisch oder antagonistisch wirken. Es lassen sich somit Zytokine unterscheiden, die eine proliferative Wirkung entfalten und solche, die eine hemmende Wirkung auf das Zellwachstum bewirken (Horn et al., 2002).

Allgemein kontrollieren Zytokine Wachstum, Differenzierung und das Überleben von Zellen.

Ebenso sind Zytokine an der Apoptose beteiligt (Schooltink et al., 2003). Als Wachstumsfaktoren beeinflussen Zytokine die Hämatopoese und Lymphopoese und regulieren die Entwicklung von Vorläuferzellen zu differenzierten Zelltypen. Außerdem wirken diese stimulierend auf die Zellproliferation (Doenecke et al., 2005; Löffler et al., 2007; Culig, 2010). Als Interleukine übernehmen Zytokine vielfältige Aufgaben in der Regulation der Immunabwehr, der Entzündungsreaktion, der Hämatopoese und der Apoptose (Schooltink et al., 2003; Hansbro et al., 2011).

Zytokine besitzen große Bedeutung für die Antwort der angeborenen und erworbenen Immunität auf eine Infektion (Romagnani, 2000; Janeway, 2002; Miller et al., 2011). Exogene Pathogene, die an Makrophagen andocken und diese somit aktivieren, sind für die Sekretion der Zytokine verantwortlich.

In der frühen Phase einer Infektion führt die Interaktion zwischen pathogenen Keimen und Zellen der angeborenen Immunabwehr (neutrophile Granulozyten, Makrophagen und NK-Zellen) zu einer Induktion der Zytokine TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8, IL-12, IL-18 und des Chemokins IL-8 (Doenecke et al., 2005; Schooltink et al., 2003; Theoharides et al., 2010).

Die Zytokine aktivieren Zellen der erworbenen Immunabwehr (Th1- und Th2-Zellen) und führen somit zur Ausbildung einer protektiven Immunantwort. Dieses Zusammenspiel ist maßgeblich an der Ausbildung einer genetisch bedingten Resistenz beteiligt (Wilkie&Mallard, 1999). Entscheidend für den physiologischen Ablauf der Entzündungsreaktion ist dabei ein Gleichgewicht zwischen fördernden und hemmenden Einflüssen.

Als proinflammatorische Zytokine werden Mediatoren bezeichnet, die die Entzündungsreaktion fördern, wie zum Beispiel IL-1, IL-6 und TNF- α . Als antiinflammatorische gelten diejenigen, die eine hemmende Wirkung auf die Aktivität proinflammatorischer Zytokine haben, wie IL-4, IL-10 und IL-3 (Koolmann et al., 2002).

1.3 Interleukin-4 (IL-4)

Interleukin-4 (IL-4) ist ein pleiotropes Molekül, welches eine Vielzahl physiologischer Effekte auf unterschiedliche Zielzellen während der Immunantwort ausüben kann (Paul, 1991; Brown et al., 1997). Dazu gehören immunmodulatorische Effekte (B- und T-Zellen), antiinflammatorische Effekte (Monozyten), proinflammatorische Effekte (Endothelialzellen) und profibrotische Effekte (Fibroblasten) (Paul&Seder, 1994). Das Protein gehört neben IL-2, IL-3, IL-5, IL-6, IL-7, IL-9, IL-21 und Erythropoetin zur Strukturfamilie der Hämatopeptide (Heldin, 1995; Parrish-Novak et al., 2000). Es ist ein monomeres, 129 Aminosäuren langes Protein mit einem theoretischen Molekulargewicht von 15 kDa und einem hohen isoelektrischen Punkt, der zwischen 9,6 und 10,5 liegen kann. Das Protein weist zwei potentielle N-Glykosilierungsstellen an den Positionen N38 und N105 auf, deren Glykosilierung für seine biologische Aktivität jedoch nicht notwendig ist (Jayaram et al., 1989). Im humanen System wurden IL-4 Varianten mit unterschiedlichen Molekulargewichten zwischen 15 und 19 kDa nachgewiesen (Paul, 1991), was auf eine heterogene Glykosilierung des Proteins hindeutet. Die Struktur von IL-4 wurde unabhängig voneinander sowohl mittels NMR Spektroskopie (Powers et al., 1992; Smith et al., 1992) als auch mittels Röntgenstrukturanalyse aufgeklärt. Das Molekül besteht aus vier α -Helices (α A, α B, α C und α D), die gebündelt angeordnet sind. IL-4 kann an zwei Typen von Rezeptoren binden. Diese Rezeptoren sind Heterodimere und setzen sich entweder aus der IL-4R α -Kette, die auch als CD124 bezeichnet wird, in Kombination mit der γ c-Kette (Russel et al., 1993; Kondo et al., 1993; Letzelter et al., 1998; Typ-1-Rezeptor) oder aus dem Heterodimer von IL-4R α mit IL-13 α 1 als akzessorischer Kette (Tony et al., 1994; Obiri et al., 1995 und 1997; Miloux et al., 1997; Typ-2-Rezeptor) zusammen.

Die Produktion von IL-4 kann von verschiedenen Typen von aktivierten T-Zellen (Paul und Seder, 1994; Yoshimoto und Paul, 1994; Ferrick et al., 1995; Chen und Paul, 1997), Basophilen und Mastzellen (Seder und Paul, 1994) sowie von Eosinophilen (Dubucqoi et al., 1994, Keegan, 2000a) erfolgen. Als antiinflammatorisches Zytokin hat IL-4 eine hemmende Wirkung auf die Entzündungsreaktion und steht im Dienste der spezifischen Abwehr (Horn et al., 2002). Die Wirkung von IL-4, die polyklonale Proliferation kostimulierter B-Zellen von Mäusen zu induzieren, wurde im Jahre 1982 entdeckt (Howard et al., 1982). Nach der Klonierung humaner IL-4 cDNA (Yokota et al., 1986) wurde ein weites Spektrum biologischer Effekte des Zytokins auf hämatopoetische und nicht-hämatopoetische Zellen nachgewiesen. Wachstumsfördernde Wirkungen auf T-Zellen (Mitchell et al., 1989), ebenso auf Endothelzellen (Toi et al., 1991) und Fibroblasten (Feghali et al., 1992) wurden aufgedeckt.

IL-4 ist an der Reifung von B-Zellen zu Immunglobulin-sezernierenden Plasmazellen durch die Induktion des Immunglobulinklassenwechsel von IgM zu IgG1 und IgE (Snapper et al., 1988; Coffman et al., 1993; Kuhn et al., 1991) oder IgA (Silbernagel et al., 2002) beteiligt. Auch für die Expression von Oberflächen-IgM (Shields et al., 1989), von MHC-Klasse II (Noelle et al., 1984; Rousset et al., 1988) und des niedrig-affinen IgE-Rezeptors CD23 (Conrad et al., 1988; Defrance et al., 1987) auf B-Zellen spielt IL-4 eine entscheidende Rolle. Bei der Aktivierung von B-Zellen zur Produktion von IgE Antikörpern ist IL-4 verantwortlich für die Entstehung von allergischen Reaktionen und dadurch für die Freisetzung diverser Mediatoren (Histamine, Prostaglandine, Leukotriene und Cytokine), die die typischen inflammatorischen Prozesse auslösen und die Aufrechterhaltung der allergischen Reaktion begünstigen (Janeway et al., 2002). Das Protein ist für die Differenzierung von T-Helfer-(Th)-0-Vorläuferzellen zu Th2-Zellen verantwortlich und ist so ausschlaggebend an der Entwicklung einer humoralen Immunantwort beteiligt (Maggi et al., 1992; Scott, 1991; Seder et al., 1992). Basierend auf der Zytokin-Synthese von CD4+T-Helfer-Zellen von Mäusen wurde gezeigt, dass sich zwei Zelltypen unterscheiden lassen: Th1-Zellen und Th2-Zellen. Th1-Zellen haben die Aufgabe IL-2 und IFN- γ zu sezernieren, Th2-Zellen sezernieren dagegen IL-4, IL-5, IL-10 (Mosmann et al., 1986).

Beim Menschen lassen sich ebenfalls T-Zell-Subpopulationen mit ähnlicher Polarität beobachten (Romagnani, 1994), die jedoch nicht immer voneinander zu unterscheiden sind (ursprünglich: die Grenzen zwischen Th1- und Th2-Zellen nicht immer leicht gezogen werden können). Inzwischen ist deutlich geworden, dass es viele Überlappungen zwischen den Subpopulationen gibt und Zytokin-Muster gesehen werden, die sich keinem bekannten Phänotyp eindeutig zuordnen lassen. Ob es sich bei der Menge an Populationen um transiente Antworten auf Immunstimuli handelt, um unterschiedliche Stadien der Zellentwicklung oder ob es sich um eine endliche Vielzahl definierter Phänotypen handelt, konnte bisher nicht in letzter Konsequenz geklärt werden.

Trotzdem ist es möglich, den unterschiedlichen Immunreaktionen eine definierte Th1- oder Th2-Zellantwort mit streng korrelierender Zytokin-Produktion zu zuordnen. Somit bleibt die Th1-Th2-Dichotomie auch weiterhin als eine sinnvolle funktionelle Einteilung bestehen (Mosmann&Sad, 1996). Die Th1-Zellen stellen ihren Dienst vor allem in die zellvermittelnde Immunität, während die Aufgaben der Th2-Zellen hauptsächlich in der humoralen Immunantwort zu sehen sind. Th2-Zellen reagieren auf die von B-Zellen präsentierten Antigene, sind für die beschleunigte Sekretion von Antikörpern, vor allem von IgE, verantwortlich und unterstützen Proliferation und Funktion von Mastzellen und eosinophilen Granulozyten (Mosmann&Sad, 1996).

Durch die dargestellten biologischen Funktionen ist IL-4 in der Lage, eine Vielzahl der Th2-assoziierten Eigenschaften zu vermitteln. Für eine hohe Transkriptionsaktivität und Überexpres-

sion ist einer der bekannten Polymorphismen im Promotor des IL-4 Genes verantwortlich (Song et al., 1996).

Bisher sind für den IL-4-Rezeptor (IL-4R) zwei Polymorphismen bekannt. Ihr Auftreten korreliert mit erhöhter IgE-Produktion und atopischen Erkrankungen (Hershey et al., 1997; Mitsuyasu et al., 1998). In einigen Studien wird bestätigt, dass IL-4 zum einen einen direkten wachstumshemmenden Effekt auf leukämische Zellen haben kann (Akashi, 1993) und dass das Zytokin eine wichtige Rolle bei der immunologischen Abwehr maligner Zellen inne hat. Es wurde nachgewiesen, dass IL-4 die DNA-Synthese Ph1-positiver ALL-Blasten vom B-Zell Phänotyp supprimiert (Okabe et al., 1991) und dass das Zytokin weiterhin in der Lage ist, dosisabhängig das Wachstum von Ph1-positiven ALL-Zelllinien zu hemmen. Dadurch kommt es auch zu einer gekoppelten Hemmung der Tyrosinkinase-Aktivität.

Es wird also davon ausgegangen, dass es durch die Bindung von IL-4 an seinen spezifischen Rezeptor zu einem noch nicht bekannten Mechanismus und dadurch zur Hemmung der bcr-abl-Tyrosinkinase kommt. Durch Inhibition der „autokrinen“ Produktion von IL-6 oder GM-CSF übt IL-4 gleichzeitig auch eine hemmende Wirkung auf das Wachstum von Zellen der chronischen myelomonozytären Leukämie (CMML) aus (Akashi et al., 1991). Dieser Effekt ist jedoch nur in der chronischen Phase der Erkrankung wirksam, während in der akuten Phase ein direkter wachstumsstimulierender Einfluß von IL-4 überwiegt (Yanagisawa et al., 1995). Ein hemmender Einfluss von IL-4 ließ sich in den meisten Fällen auch bei akuten myeloischen Leukämien mit myelomonozytärer Differenzierung (M4/M5-AML) *in vitro* beobachten. Da unter Zugabe von IL-6 keine Änderung zu erkennen ist, kann der Effekt nicht durch eine alleinige Hemmung der autokrinen IL-6-Produktion durch IL-4 erklärt werden (Jansen et al., 1993). Durch Einwirken von IL-4 auf zytotoxische Zellen ist eine indirekte Wirkung auf Tumorzellen möglich. Werden unspezifisch wirkende zytotoxische Zellen aktiviert, so spielt IL-4 im Gegensatz zu IL-2 eine untergeordnete Rolle.

In einer weiteren Studie konnte gezeigt werden, dass T-Zell-Klone, die in Anwesenheit von IL-4 kultiviert wurden, eine höhere zytolytische Aktivität zeigten als Zellen, die nur in IL-2 kultiviert wurden (Grusby et al., 1990). Bei den Zellen, welche in IL-4, nicht aber in IL-2 gewachsen waren, wurde die Expression einer Lipase entdeckt, die an dem zytolytischen Prozess beteiligt zu sein scheint.

Weiter konnte gezeigt werden, dass IL-4 die Expression des Nukleären Faktors E2 (NF-E2) Transkriptionsfaktors in menschlichen Megakaryocyten und Megakaryoblasten herunterreguliert und damit ihre Reifung hemmt (Catani et al., 2001). IL-4 blockiert die IFN- γ sezernierenden TH1-

Zellen und verschiebt damit die Immunantwort in Richtung humorale Immunantwort (Romagnani, 2006).

In Verbindung mit IFN- γ wurde nachgewiesen, dass IL-4 die Bildung und Entwicklung einer weiteren proinflammatorischen T-Zell-Untereinheit, der TH17-Zellen, hemmt (Laurence et al., 2007). Bei Autoimmunerkrankungen in der Behandlung von Psoriasispatienten wird IL-4 hilfreich eingesetzt (Ghoreschi et al., 2003). Nachgewiesen wurde auch eine hemmende Wirkung von IL-4 auf Osteoklastenbildung bei Arthritispatienten, die unkontrolliert sonst zur Knochenresorption führen kann (Miossec et al., 1994; Kamel et al., 2005).

Durch die hemmende Wirkung auf die Produktion der inflammatorischen Zytokine IL-1, IL-6 und TNF- α verschiebt IL-4 die Abwehrlage in Richtung humorale Abwehr (Horn et al., 2002).

1.4 Defensine

Defensine sind antimikrobielle Peptide mit antimikrobieller Wirkung gegen grampositive und gramnegative Bakterien, Pilze und einige membranumgebende Viren und gehören dem angeborenen Immunsystem an (Ganz, 2003). Außerdem haben Defensine einen immunmodulatorischen Effekt und wirken somit auf einige Zellen des Immunsystems chemotaktisch oder proinflammatorisch (Lehrer, 2004).

Defensine lassen sich in die Untergruppen α - und β -Defensine unterteilen, welche sich durch den jeweiligen Cysteingehalt und die entsprechenden intramolekularen Verknüpfungen (Disulfidbrücken) unterscheiden (Ganz&Weiss, 1997). Die Disulfidbrücken dienen der Stabilisierung der dreidimensionalen Struktur der α - und β -Defensine, die sich aus α -Helix- und β -Faltblattstrukturelementen zusammensetzen (Hill et al., 1991). Die bisher beschriebenen α -Defensine sind Humanes Neutrophiles Peptid (HnP) 1-4 und Humanes Defensin 5-6.

Die bekannten β -Defensine heißen Humane β -Defensine (HBD) 1-4 (Fellermann et al., 2001; Garcia et al., 2001, Harder et al., 2000; Lehrer&Ganz, 1999; Krisanaprakornkit et al., 2000; Nicolas et al., 1995; Schröder, 1999b). In Epithelien des Interstitiums, der Trachea, des Urogenitaltraktes, der Vagina, der Tonsillen, der Epithelien der Haut bzw. Schleimhaut, der Zunge, der Speicheldrüsen und in Keratinozyten des oralen Gewebes werden die β -Defensine exprimiert (Dale&Krisanaprakornkit, 2001; Dunsche et al., 2001 und 2002; Ganz, 2003; Islam et al., 2001; Krisanaprakornkit et al., 1998; Takahashio et al., 2001). Die Expression in Pulpazellen konnte 2005 nachgewiesen werden (Dommisch et al., 2005a, Chung et al., 2007).

Die häufig enthaltenen positiven Aminosäuren Lysin und Arginin sorgen für die positive Nettoladung der Defensine (Kationen). Defensine haben ein Molekulargewicht von 3,5-6,5 kDa und enthalten 33-47 Aminosäuren (Hill et al., 1991).

Aufgrund zahlreicher Experimente wird angenommen, dass Defensine eine wichtige Rolle in den ersten Stadien einer Infektion spielen (Initiale Immunantwort) (Lehrer, 2004; Ganz, 2003).

In-vitro-Versuche haben gezeigt, dass Defensine schon bei mikromolaren Konzentrationen eine biologische Aktivität entfalten können. Je nach Bakterienstamm ist diese Aktivität in Bezug auf die antimikrobiellen Eigenschaften abhängig von der Salz- bzw. Plasmakonzentration. Der Wirkungsmechanismus antimikrobieller Peptide lässt sich in mehrere Phasen untergliedern. Die amphiphilen Defensine binden in der ersten Phase, der Initialphase, mit der positiv geladenen Seite an die äußere, negativ geladene Membran der Bakterien. Durch das vorherrschende transmembrane Potential und elektrostatische Kräfte können diese mit dem hydrophoben Anteil

in die Lipidschicht der Bakterien eindringen und sich zu einer sogenannten Teppichformation zusammenlagern („carpet-model“) (Hover et al., 2000; Ganz, 2003). Die Spannung der bakteriellen Membran wird dadurch so verändert, dass die Defensine zu Oligomeren aggregieren und poren- bzw. spannungsabhängige Kanäle ausbilden können („wormhole-“ oder „pore-model“) (Hill et al., 1991). Die kationischen Aminosäuren Arginin und Lysin ordnen sich um die ca. 25 Å großen Hohlräume der Poren bzw. Kanäle (Ganz, 2003). Es entsteht eine zylindrische Anordnung der Defensinaggregate (Schröder, 1999a). Zum einen wird die Membranspannung dadurch wieder herabgesetzt, andererseits erhöht sich die Permeabilität für niedermolekulare Substanzen (Ganz, 2003). Folge sind ein vollständiger Ladungs- und Wasseraustausch, sowie Ionen-transport durch die Membran, die den osmotischen Zelltod des Mikroorganismus nach sich ziehen (Schröder, 1999a).

In Versuchen mit Membran-depolarisierenden Substanzen konnte gezeigt werden, dass Defensine ein negatives Membranpotential benötigen, um an die Lipidschicht binden zu können (Hill et al., 1991). Ein hoher elektrischer Potentialgradient kann nur durch lebensfähige Bakterien aufrecht erhalten werden und ist damit essentiell für die antimikrobielle Wirkung humaner β -Defensine (Schröder, 1999a). Die Membranzusammensetzung bei humanen Zellen ist mit der der Bakterienzellen nicht identisch. Dadurch entstehen auch Unterschiede in den membranalen Potentialgradienten. So ist es körpereigenen Zellen möglich, sich vor autotoxischen Reaktionen durch Defensine zu schützen. Darüber hinaus enthalten humane Zellmembranen einen hohen Anteil an Cholesterol, dem ein hemmender Effekt auf die biologische Aktivität der Defensine nachgewiesen wurde (Schröder, 1999a).

1.4.1 β -Defensine

β -Defensine sind niedermolekulare, kationische Peptide und weisen eine Länge von 35-50 Aminosäuren mit antiparalleler Faltung auf (Schulz et al., 2005). Sie besitzen sechs Cysteinreste, die untereinander drei charakteristische Disulfidbrücken, auf den Positionen 1:5, 2:4 und 3:6, ausbilden (Miyasaki&Lehrer, 1998).

Humane β -Defensine werden zunächst als Präpropeptide synthetisiert (Dale und Krisanaprakornkit, 2001) und nach der Reifung in primären, sauren Granula gespeichert. Später fusionieren diese mit Phagozytose-Vesikeln (Ganz, 2003).

Die Synthese humaner β -Defensine in gingivalen Epithelzellen wird durch die Anwesenheit pathogener Mikroorganismen stimuliert. Dieser Mechanismus könnte ausschlaggebend für die Aufrechterhaltung des oralen Milieus im Sinne einer Balance zwischen mikrobieller Besiedelung und epithelialer Abwehr sein (Dale, 2000; Chung et al., 2007).

Neben antimikrobiellen Eigenschaften besitzen Defensine im Rahmen des angeborenen Immunsystems zytokin-ähnliche und chemotaktische Funktionen (Lehrer, 2004; Niyonsaba et al., 2004; Yang et al., 1999; Yang et al., 2000). Darüber hinaus stimulieren β -Defensine Epithelzellen zur Synthese von immunmodulatorischen Botenstoffen (IL-6,-10 und -18) (Niyonsaba et al., 2007, Dommisch et al., 2007) und haben positive Einflüsse auf ihre Migration und Proliferation (Niyosaba et al., 2007).

1.4.1.1 Humanes- β -Defensin-1 (hBD-1)

Erstmals isoliert wurde das Humane- β -Defensin-1 (hBD-1) aus dem Plasma von Patienten mit fortgeschrittenen, entzündlichen Nierenerkrankungen und die Epithelzellen des Urogenitaltrakts dabei als Syntheseort für hBD-1 entdeckt (Bensch et al., 1995). Die Expression von hBD-1 wurde anschließend auch in Epithelien der Haut (Schröder, 1999b), der Mundschleimhaut (Dunsche et al., 2002), des Gastrointestinaltraktes (Islam et al., 2001), des Respirationstraktes (Harder et al., 1997) und auch in Odontoblastenzellen nachgewiesen (Dommisch et al., 2005a). HBD-1 wirkt bakterizid gegen gramnegative Bakterien (Dale et al., 2001; Dunsche et al., 2001; Ganz et al., 1997; Harder et al., 1997; Krisanaprakornkit et al., 1998; Mathews et al., 1999; Sahasrabudhe et al., 2000).

Das humane β -Defensin-1 ist ein basisches Peptid mit einem Molekulargewicht von 3,9 kDa und aus 36 Aminosäuren aufgebaut (Schröder, 1999). Intramolekular bestehen drei Disulfidbrücken, wodurch die entsprechende Peptidkonformation bestimmt wird (Bensch et al., 1995; Diamond et al., 1996).

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

HBD-1 wird als konstitutiv exprimiertes antimikrobielles Peptid humaner Epithelien angesehen (Schröder, 1999).

1.4.1.2 Humanes- β -Defensin-2 (hBD-2)

Humanes- β -Defensin-2 wurde 1997 erstmals in der menschlichen Epidermis von Psoriasispatienten isoliert und bestimmt (Schröder&Harder et al., 1999). Es ist ein basisches Peptid mit einem Molekulargewicht von 4 kDa und 41 Aminosäureresten mit einer großen Anzahl von Arginin und Lysin (Harder et al., 1997, Schröder, 1999b). Sowohl in den Epithelien der Haut, der Mundschleimhaut, des Gastrointestinaltraktes, des Respirationstraktes und ebenfalls in Odon-

toblasten konnte eine bakteriell induzierbare Expression von hBD-2 gezeigt werden (Schröder, 1999b; Dunsche et al., 2002; Islam et al., 2001; Harder et al., 1997; Dommisch et al., 2005a).

Durch Inkubation kultivierter Epithelzellen mit Bakterien, deren Stoffwechselprodukten oder mit Zytokinen konnte eine vermehrte Synthese von hBD-2 im Vergleich zur unstimulierten Kultur gezeigt werden (Schröder, 1999). Weiterhin zeigte sich eine effektive, antimikrobielle Aktivität gegenüber gramnegativen Bakterien und *Candida albicans*, während lediglich bakteriostatische Effekte auf grampositive Bakterien nachzuweisen waren. Das Epithel der Mundschleimhaut und die Odontoblastenzellschicht der Pulpa weisen im Gegensatz zu den epithelialen Geweben ebenfalls die Expression von hBD-2 unter gesunden Bedingungen auf (Dale&Krisanaprakornkit, 2001; Dunsche et al., 2002; Dommisch et al., 2005a/b).

Als Faktoren, die unter gesunden Bedingungen zu dieser Expression führen, werden neben dem auch kommensal vorkommenden *Fusobacterium nucleatum*, ebenfalls Zytokine und hormonelle (neuroendokrine) Einflüsse diskutiert (Dale, 2000; Ganz, 2003; Krisanaprakornkit et al., 2000).

HBD-2 unterscheidet sich von anderen humanen antimikrobiellen Peptiden durch seine hohe Wirksamkeit gegenüber gram-negativen Erregern wie *Candida albicans*, *E. coli*, *F. nucleatum*., *Pseudomonas aeruginosa* und Hefe (Dale&Krisanaprakornkit, 2001; Sawasaki et al., 2002; Meyer et al., 2004) sowie bakteriostatisch gegenüber grampositiven Bakterien, wie *Staphylococcus aureus* (Harder et al., 1997). Eine Wirksamkeit gegenüber grampositiven Erregern, wie dem Bakterium *Staphylococcus aureus*, zeigte sich lediglich in der Hemmung des Wachstums (Schröder, 1999; Harder et al., 1997; Dunsche et al., 2002).

Beim Vergleich von erkrankter und gesunder Gingiva konnten unterschiedliche Genexpressionsraten von hBD-1 und -2 festgestellt werden (Dommisch et al., 2005b). Es konnte gezeigt werden, dass die Genexpression von hBD-2 über den Proteinase-aktivierten Rezeptor-2 in Gingivaepithelzellen durch das parodontopathogene Bakterium *Porphyromonas gingivalis* stimuliert wird (Dommisch et al., 2007c).

1.5 Mediatorfunktionen humaner β -Defensine

Humane β -Defensine weisen neben antimikrobiellen Eigenschaften gegenüber Mikroorganismen auch chemotaktische und zytokin-ähnliche Mediatorfunktionen im Rahmen des angeborenen Immunsystems auf (Lehrer, 2004; Niyonsaba et al., 2004; Yang et al., 1999; Yang et al., 2000). Direkte Effekte des humanen β -Defensin-2 auf unausgereifte, dendritische Zellen konnten innerhalb des Epithelverbandes nachgewiesen werden. In diesem Kontext wurde beobachtet, dass hBD-2 maßgeblich an der Ausreifung dendritischer Zellen beteiligt ist.

Weiterhin haben humane β -Defensine zusätzlich zu der zytokin-ähnlichen Wirkung auch chemotaktische Eigenschaften inne. Die β -Defensine dienen dazu, die lokale Präsenz von Zellen der Immunabwehr zu fördern. Es gelang bis jetzt in Zellkulturexperimenten chemotaktische Einflüsse auf die Rekrutierung von Monozyten, T-Gedächtniszellen (Yang et al., 1999), Mastzellen und neutrophilen Granulozyten nachzuweisen (Niyonsaba et al., 2004).

Eine Studie hat gezeigt, dass humane β -Defensine auch einen direkten Effekt auf Epithelzellen (Keratinozyten) in Bezug auf die Synthese immunmodulatorischer Botenstoffe erzeugen können. Es war möglich, den Anstieg der Expression von Interleukin-6, -10 und -18 sowie des Makrophagen inflammatorischen Peptids-3 α (MIP-3 α) und den positiven Einfluss auf die Migration und Proliferation als unmittelbare Antwort auf die Anwesenheit humaner β -Defensine zu beobachten (Niyonsaba et al., 2007) und weiterhin die Wirkungsweise humaner β -Defensine auf die epitheliale Zelldifferenzierung zu zeigen.

In einer weiteren Studie wurde gezeigt, dass humane β -Defensine in der Lage sind positive, direkte Einflüsse auf Migration und Proliferation von Epithelzellen auszuüben (Niyonsaba et al., 2007).

1.6 Mediatoren der Immunantwort

1.6.1 CC-Chemokin-Ligand-20 (CCL20)

CCL20 ist ein homeostatisches und inflammatorisches Chemokin der CC-Familie. Es zeigt eine niedrige Sequenzähnlichkeit mit anderen humanen CC-Chemokinen.

Die konstitutive Expression von CCL20, welches früher auch als liver and activation-regulated chemokine (LARC) bezeichnet wurde, ist ursprünglich in der Leber beschrieben worden (Hieshima et al., 1997). Weiter ist CCL20 auch in Mukosa-assoziiertem lymphatischem Gewebe (MALT), anderem lymphatisches Gewebe sowie Lungengewebe konstitutiv exprimiert (Hromas et al., 1997, Schutyser et al., 2003). CCL20 ist ebenfalls in Makrophagen, dendritischen Zellen (DC), B-Zellen, T-Zellen und eosinophilen Granulozyten vorhanden. Darüberhinaus wurde eine niedrige konstitutive CCL20 Expression für Kolonmukosa, Pankreas, Prostata, Zervix und Haut beschrieben (Schutyser et al., 2003). Die Expression von CCL20 zeigt sich ebenso in verschiedenen malignen Geweben wie u.a. beim kolorektalen Karzinom (KRK), Nierenzellkarzinom, Mammakarzinom, Pankreaskarzinom, Zervixkarzinom, Endometriumkarzinom, Melanom, papillären Schilddrüsenkarzinom, Lymphom, Leukämie, Glioblastom und beim hepatozellulären Karzinom nachgewiesen (Schutyser et al., 2003). Im Darmepithel wird CCL20 besonders im Deckepithel der Peyer'schen Plaques gebildet und ist zuständig für die lokale Migration von dendritischen Zellen (DC) und die Expression seines Rezeptors CCR6 (Iwasaki et al., 2000; Tanaka et al., 1999).

Die Sekretion von CCL20 findet hauptsächlich auf der basolateralen Seite der Mukosazellen statt. Die CCL20 Sekretion wird gesteigert sowohl durch proinflammatorische Stimuli wie TNF- α und IL-1 β (Izadpanah et al., 2001, Fujii et al., 2001, Kwon et al., 2002) als auch durch bakterielle Invasion. Eine Steigerung von CCL20-m-RNA und CCL20-Proteinexpression in Epithelzellen ist in vivo wie auch in vitro nachzuweisen (Fujii et al., 2004; Izadpanah et al., 2001; Scheerens et al., 2001).

Die Expression von CCL20 in diesem breiten Spektrum von Zell- und Gewebetypen, sowie die Vielfalt von CCL20-induzierenden Substanzen lassen darauf schließen, dass CCL20 und CCR6 vor allem die epitheliale Oberfläche betreffend ebenso in normalen, wie in pathologischen Prozessen, involviert sind. Dies betrifft vor allem die Haut und die Mukosa unter entzündlichen Bedingungen. Das Ligand-Rezeptor-Paar CCL20/CCR6 ist verantwortlich für die Chemoattraktion von unreifen DC bei intestinaler Entzündung oder Antigen-Stimulation (Caux et al., 2000), sowie

für die Chemoattraktion von Effektor-Gedächtnis-T- und B-Zellen (Fujii et al., 2004; Idzadpanah et al., 2001; Scheerens et al., 2001).

1.6.2 Interleukin-1 β (IL-1 β)

Interleukin-1 ist eine Zytokinfamilie bestehend aus zwei agonistisch wirkenden pleiotropen Proteinen IL- α und IL- β . Beide Zytokine werden anfangs als 31 kD-Präproteine synthetisiert und später durch ihre spezifischen Proteinasen zu reifen 17 kD-Proteinen gespalten.

Interleukin-1 β (IL-1 β) ist ein proinflammatorisches Zytokin, welches zahlreiche Funktionen sowohl in der angeborenen als auch in der adaptiven Immunabwehr übernimmt (Janeway, 2002). Es besitzt ein geringes Molekulargewicht von 15 kDa.

IL-1 β ist nur als reifes Sekretprotein aktiv (Dinarello, 2005) und wird hauptsächlich von Blut-Monozyten aber auch von polymorphkernigen Granulozyten, Gefäßendothelzellen, Epithelzellen, Keratinozyten, Fibroblasten, T- und B-Lymphozyten, Osteoklasten und Osteozyten produziert (Dinarello, 1996). Das Zytokin ist ein zentraler Botenstoff in der Antwort des Gastorganismus auf eine Reihe von Fremdeinflüssen, wie zum Beispiel Lipopolysaccharide als exogene Pyrogene (Dinarello, 2005).

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 β die Biosynthese von Cyclooxygenase und Prostaglandin E₂, was zu generellen Symptomen wie Fieber führen kann (Schmidt, 2000; Rivest et al, 2000). Mit Hilfe immunhistochemischer Untersuchungen konnte die Expression von Interleukin-1 β 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 β in der Glandula submandibularis stimuliert (Yao et al., 2005).

IL-1 β triggert die Interleukin-6-Freisetzung und bewirkt im Knochenmark die vermehrte Freisetzung neutrophiler Granulozyten (Rivest et al., 2000).

1.6.3 Interleukin-8 (IL-8)

Interleukin-8 ist ein Chemokin der CXC-Familie. Es wird von Monozyten, Makrophagen, neutrophilen Granulozyten, Fibroblasten, Endothelzellen, Pulpafibroblasten (Patel et al., 2003) sowie Odontoblasten (van Furth, 1992; Dommisch et al., 2007b; Levin et al., 1999) synthetisiert.

IL-8 wirkt als chemotaktischer Faktor für neutrophile und basophile Granulozyten sowie für T-Lymphozyten und führt in diesen Zellen zur Stoffwechselaktivierung (Xie, 2001). Es erhöht die Chemotaxis für alle bekannten beweglichen Immunzellen. Ähnlich wie IL-6 kann es durch Viren, bakterielle Lipopolysaccharide, TNF- α und ebenso durch Concanavalin A, doppelsträngige RNA, IL-1 β , IL-7 und IL-17 induziert werden.

In verschiedenen Experimenten mit Pulpafibroblasten konnte die gesteigerte IL-8-Konzentration nach Stimulation mit *Prevotella intermedia* (Tokuda et al., 2002), *F. nucleatum* (Thaweboon et al., 2006), Lipopolysaccharide des Bakteriums *E. coli* (Chang et al., 2005), Substanz P, *Streptococcus mutans* (*S. mutans*) (Dommisch et al., 2011) und calcitonin gene-related peptide (Patel et al., 2003) nachgewiesen werden. Auch die Expression von IL-8 in der Odontoblastenzellschicht nach Stimulation mit LPS des *E. coli* wurde demonstriert (Levin et al., 1999). Vergleichbar mit IL-6 konnte die mRNA-Expression von IL-8 in odontoblasten-ähnlichen Zellen nach Stimulation mit dem antimikrobiellen Peptid hBD-2 beschrieben werden (Dommisch et al. 2007b). Für Odontoblasten der Zahnpulpa konnte gezeigt werden, dass die mRNA-Expression von IL-8 durch LPS von *E. coli* sowie von hBD-2 stimuliert werden kann (Levin et al., 1999).

Ein wichtiger Angriffspunkt des Chemokins sind neutrophile Granulozyten. IL-8 stellt einen starken proinflammatorischen Mediator dar und wirkt außerdem pro-angiogen (Xie, 2001).

Synthetisiert wird IL-8 in Form eines Propeptids, posttranslational findet durch limitierte Proteolyse eine Umwandlung zu verschiedenen Wirkformen statt.

1.7 Ziel der Arbeit und Fragestellungen

Hauptziel der Arbeit war es zu klären, ob humane β -Defensine in Gingivaepithel- (GECs) und Gingivafibroblastenzellen (HGFs) als Teil der antiinflammatorischen Regulation bzw. Antwort, also unter Einfluss von IL-4, exprimiert bzw. reguliert werden. Ein weiteres Ziel war es, den Einfluss des Zytokins IL-4 auf das Genexpressionsmuster des Chemokins CCL20 und der Zytokine IL-1 β und IL-8 in GECs und HGFs zu untersuchen und zu analysieren.

Fragestellungen, die im Rahmen dieser Arbeit angegangen werden:

1. Ist die Expression der humanen β -Defensine-1, und -2 in HGFs in vitro nachweisbar?
2. Zeigt die Applikation von IL-4 Effekte auf die Genexpression der humanen β -Defensine hBD-1 und hBD-2 in beiden Zellgruppen GECs und HGFs?
3. Beeinflusst IL-4 die Genexpression von CCL20?
4. Beeinflusst IL-4 die Genexpression der proinflammatorischen Mediatoren IL-1 β und IL-8?
5. Welchen Einfluss hat die zeitliche Dauer der Applikation von IL-4 auf die Genexpression der Zielgene in GECs und HGFs?
6. Können Unterschiede zwischen GECs und HGFs festgestellt werden?

2 Material und Methoden

2.1 Versuchsaufbau

Im Rahmen routinemäßig durchgeführter oralchirurgischer Maßnahmen wurden Gingivaepithelzellen (GECs) sowie Gingivafibroblastenzellen (HGFs) gewonnen (2.3). Mit Hilfe dieser Gewebe wurden weitere GECs und HGFs kultiviert. Diese wurden auf die Expression von Mediatoren des Immunsystems untersucht (2.4) und mit humanen IL-4 stimuliert. Die Versuche der GECs und HGFs wurden in einem 3-fach-Ansatz mit Zellen von drei unterschiedlichen Donoren durchgeführt. Zur Auswertung der Genexpression wurde die quantitative Real-Time-PCR herangezogen.

2.2 Material und Reagenzien

Die in den Versuchsreihen verwendeten Kulturschalen und Zellschaber wurden von der Fa. Labomedic GmbH (Bonn) bezogen. Die benötigten Eppendorf- Tubes und Pipettenspitzen zur Durchführung der Versuche wurden von der Fa. Sarstedt (Nümbrecht) geliefert. Das Zellkulturmedium DMEM (Dulbecco`s Modified Eagles-Medium) zur Anzucht der Zellen stammt von der Fa. PAA Laboratories GmbH (Cölbe). KGM wurde von Promocell (Heidelberg) bezogen. Das in den Versuchsreihen verwendete Aqua dest. wurde von der Fa. Braun Melsungen AG (Melsungen) verwendet. Der Trypsininhibitor wurde von der Fa. Roche Diagnostics GmbH (Mannheim) bezogen. Die Trypsin-EDTA-Lösung wurde von der Fa. Sigma-Aldrich GmbH (Taufkirchen) geliefert und CO₂ wurde von der Fa. Linde (Höllriegelskreuth) bestellt. IL-4 kam von Promokine (Heidelberg).

2.3 Probengewinnung oraler Gewebe

Bei den Versuchen wurden GECs und HGFs verwendet. Die Zellen stammen von gesunden Patienten, die sich aus oral-chirurgischen Gründen in der Behandlung der Poliklinik für Chirurgische Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde (Direktor: Prof. Dr. G. Wahl) im Universitätsklinikum Bonn befanden. Die Versuche der GECs und HGFs wurden in einem 3-fach-Ansatz mit Zellen von drei unterschiedlichen Donoren durchgeführt. Die GECs stammen von einer Patientin, geboren am 18.09.1987, von einer Patientin, geboren am 16.09.1983 und einem Patienten, geboren am 05.03.1981. Die HGFs stammen von einem Patienten, geboren am 13.02.1989, einem Patienten, geboren am 14.05.1990, und einer Patientin, geboren am 12.06.1993. Die Patienten wur-

den ausreichend darüber aufgeklärt, dass mit ihrem Einverständnis zur Probenentnahme keine zusätzlichen Materialentnahmen verbunden seien. Nach der Probenentnahme wurden die Zellen unmittelbar post operationem für die Zellkultur vorbereitet. Diese Studie wurde von der Ethikkommission der Universität Bonn geprüft und genehmigt (Antrag Ethikkommission AZ.: 142/05).

2.4 Kultur primärer Zellen

Die Gewebeproben wurden sofort nach der Entnahme aseptisch in 4 ml Kulturmedium, bestehend aus DMEM, 10% FCS, Penicillin, Streptomycin und Amphotericin von der Fa. PAA Laboratories GmbH (Cölbe), kultiviert. Ein Inkubator der Fa. Thermo (Dreieich) wurde für die Kultivierung der Zellen bei 37°C und 5% CO₂ verwendet. Das Kulturmedium wurde im Zweitagesrhythmus gewechselt. Für die Anzucht einer Zellkulturen wurden ca. 4 Wochen in Anspruch genommen. Hatten die Zellen eine Konfluenz von 90% erreicht, wurden diese in Kryoröhrchen von der Fa. Nalgene CRYOWARE™ (Nunc International, Rochester, NY, USA) überführt und bei -80°C eingefroren. Im Rahmen vorangegangener Untersuchungen im Labor der Poliklinik für Parodontologie, Zahnerhaltung und Präventive Zahnheilkunde des Zentrums für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde der Rheinischen-Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, wurde die Kultur der Gingivaepithelzellen zur Kontrolle der Genexpression der oben genannten Gene etabliert.

Gingivagewebeproben wurden über Nacht bei 4°C in 1 ml Dispase-4 (Fa. PAA) inkubiert, anschließend wurde die Epithelschicht isoliert. Zell-Zell-Kontakte der Epithelzellen wurden durch eine 30 minütige Inkubation bei 37°C in 1 ml Trypsin-EDTA-Lösung proteolytisch hydrolysiert. Die so gewonnenen Epithelzellen wurden dreimal mit je 1 ml DMEM/10% FCS gewaschen, um die Protease zu inaktivieren. Anschließend sind die Zellen in 4 ml Kulturmedium (KGM= keratinocyte growth medium) eingebracht und danach bei 37°C und 5% CO₂ in einem Inkubator der Fa. Thermo (Dreieich) inkubiert worden. Für die Genexpressionsanalyse wurden die Zellen zu einer Konfluenz von ca. 80%-90% herangezüchtet.

Gingivafibroblasten wurden mit 4 ml PBS gewaschen, der Überstand wurde entfernt. 1ml 1-fach Trypsin (0,05%)/EDTA (0,02%) wurde hinzugefügt, die Inkubation dauerte über 5-10 min. bei 37°C. Als Zellen sich vom Boden zu lösen begannen, wurden diese in Falcon-Röhrchen pipettiert, 5ml DMEM wurde hinzupipettiert. Abzentrifugiert wurde die Lösung bei 800rpm bei 5°C über 5 min. Der Überstand wurde verworfen. Ein Pellet wurde in 1ml DMEM resuspendiert, in eine große Flasche T75 mit 24 ml DMEM pipettiert. 1ml Zellsuspension wurde dazupipettiert und in den Brutschrank bei 37°C gegeben. Am nächsten Tag wurde das Medium gewechselt, daraufhin alle 2 Tage. Die Trypsinierung war erreicht, wenn die Flasche bis zu 80% bewachsen

war. Das Medium wurde darauhin verworfen, die Flasche mit 4ml PBS gewaschen und mit 4ml 1-fach Trypsin/EDTA für 5-10 min. inkubiert.

2.5 Molekularbiologische Experimente zur qualitativen Genexpressionsanalyse

2.5.1 Qualitative Genexpressionsdarstellung

Die Gesamt-RNA wurde für die qualitative Genexpressionsanalyse von GECs und HGFs mit dem RNeasy Protect Mini Kit von der Fa. Qiagen (Hilden) extrahiert. Die Extraktion erfolgte nach Herstellerprotokoll für humane Zellkulturen. Alle Gewebeproben wurden mit dem entsprechenden Äquivalent Lysis-Puffer RLT (10 µl 2-Mercaptoethanol; 990 µl RLT) versetzt und homogenisiert. Die gelösten Proben wurden auf eine RNeasy-Säule pipettiert und zentrifugiert (10.000 rpm; 15 Sekunden). Es folgte nach Zugabe von 700 µl RW1-Puffer ein weiterer Zentrifugationsschritt (10.000 rpm; 15 Sekunden). Die Säulen wurden zweimal mit 500 µl RPE-Puffer gewaschen (10.000 rpm; 2 Minuten). Als letzter Schritt erfolgte die Eluation der auf den Säulen gebundenen RNA zweimal mit je 50 µl RNase-freiem Aqua dest. (10.000 rpm; 1 Minute). Das Ergebnis von 100 µl Volumen Gesamt-RNA wurde bei -80 °C gelagert.

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 µg/µl) vermischt und 5 Minuten bei 65 °C denaturiert. Die Proben wurden auf Raumtemperatur abgekühlt und daraufhin mit 2 µl 10fach RT-Puffer, 4 µl MgCl₂ (25 mM), 2 µl DTT (Dithiothreitol) (100 mM), 1 µl RNase-OUT (40 U/µl), 1 µl SuperScript™ II Reverse Transkriptase (50 U/µl) versetzt und für 50 Minuten bei 42 °C inkubiert. Das Gemisch wurde anschließend für 15 Minuten bei 72 °C denaturiert. Durch die Zugabe von 1 µl RNase H (2 U/µl) für 20 Minuten bei 37 °C folgte der RNase-Verdau. Die für alle Versuche verwendeten Reagenzien wurden von der Fa. Invitrogen GmbH (Karlsruhe) bezogen.

2.5.2 Standard-Polymerasekettenreaktion

Für die qualitative Amplifizierung der Gene hBD-1, -2, CCL20, IL-8 und IL-1 β 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-RT-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 (siehe Tabelle 1).

Gen	PCR-Primersequenzen	
β-Aktin	▶	5'-CATGGATGATGATATCGCCGCG-3'
	◀	5'-ACATGATCTGGGTCATCTTCTGC-3'
hBD-1	▶	5'-CATGAGAACTTCCTACCTTCTGC-3'
	◀	5'-TCACTTGCAGCACTTGGCCTT-3'
hBD-2	▶	5'-CATGAGGGTCTTGTATCTCCTCT-3'
	◀	5'-CCTCCTCATGGCTTTTTGCAGC-3'
CCL20	▶	5'-TTTATTGTGGGCTTCACACG-3'
	◀	5'-GATTTGCGCACACAGACAAC-3'
IL-1β	▶	5'-ATGGCAGAAGTACCTGAGCTCGC-3'
	◀	5'-TTAGGAAGACACAAATTGCATGGTG-3,
IL-8	▶	5'-ATGACTTCCAAGCTGGCCGTGG-3'
	◀	5'-TAGAATTCTCAGCCCTCTTCAAAAAC-3'

Tabelle 1: Darstellung der PCR-Primersequenzen der bei der Standard und der Real-Time-PCR verwendeten Primer

2.6 Stimulation von GECs und HGFs mit IL-4

Das humane Zytokin IL-4 wurde von Santa Cruz (Heidelberg) geliefert. Zellen der 2. Passage wurden für die Stimulationsversuche in Kulturschalen (Durchmesser: 35 mm) mit 2 ml Kulturmedium, bestehend aus DMEM, 10% FCS, Penicillin, Streptomycin und Amphotericin von der Fa. PAA Laboratories GmbH zu einer Zelldichte von 80-90% Konfluenz etabliert. Als Kontrolle wurde PBS (phosphate buffered saline) dem Kulturmedium hinzugefügt. Unmittelbar vor Versuchsbeginn wurde das Kulturmedium mit serumfreiem Medium ausgetauscht. Das humane IL-4 wurde in einer Konzentration von 1ng/ml auf die GECs und HGFs gegeben und bei 37°C inkubiert. Nach Abschluss der Stimulation über den Zeitraum 0, 30, 120 und 240 Minuten wurde das Medium mit samt dem humanen IL-4 aus der Zellkulturschale aspiriert. Anschließend erfolgte die Zellysis, RNA-Extraktion und cDNA-Synthese wie unter 2.7 beschrieben.

2.7 Quantitative Genexpressionsdarstellung

Die quantitative Genexpressionsanalyse erfolgte in GECs und HGFs. Nach Abschluss der Stimulationsversuche aus Punkt 2.6 wurden die mRNA-Extraktion und die cDNA-Synthese für die quantitative Genexpressionsanalyse in GECs und HGFs wie unter Punkt 2.7.1 beschrieben durchgeführt.

2.7.1 Real-Time-Polymerasekettenreaktion

Zur Durchführung der quantitativen Amplifizierung der Gene hBD-1, -2, CCL20, IL-1 β und IL-8 wurde der iCycler der Fa. Bio-Rad (München) zu Hilfe genommen, mit dem die Real-Time-PCR-Analysen durchgeführt wurden. 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. Da nach einer Denaturierung der DNA diese einzelsträngig wird, verhindert diese dadurch eine Interkalation mit dem Farbstoff. Die Primer hybridisieren während der Annealing-Phase an der Zielsequenz der DNA-Matrize und generieren in der Elongationsphase einen Doppelstrang, in den sich der Farbstoff somit mehr und mehr einlagern kann. Ist das Ende einer Elongationsphase erreicht, stellt sich 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.

Der beschriebene Ablauf wiederholt sich in jedem Zyklus, so dass es möglich ist, auf einem angeschlossenen Computermonitor das gemessene Fluoreszenzsignal zu einem beliebigen Zeitpunkt abzulesen. Am Ende wird die Polymerasekettenreaktion als exponentielle Funktion graphisch dargestellt. Die iCycler[®]-Software errechnet eine so genannte Schwellenlinie (Baseline), welche den Übergang des Graphen in die exponentielle Phase der Polymerasekettenreaktion markiert. So beschreibt dieser Übergang das Erreichen einer PCR-Produktkonzentration, die höher ist als die Hintergrundfluoreszenz im Reagenzgefäß (Gibson et al., 1996).

Wird die exponentielle Phase erreicht, ergibt diese den so genannten Schwellenwert [„threshold cycle“ (C_t-Wert)], der anhand der Zyklenzahl festgelegt wird. Je später, d.h. mit zunehmender Zyklenzahl, die Probe diese Schwelle erreicht, desto geringer fällt die Konzentration der cDNA aus (Higuchi et al., 1993).

Zur Durchführung der quantitativen Amplifizierung wurde jeweils 1 µl der entsprechenden cDNA zu einem Mix aus 0,125 µl Primer (je 100 pmol/µl), 12,5 µl 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 µl Aqua dest. (RNase-frei) gegeben. Die Reagenzien wurden von der Fa. Bio-Rad (München) bezogen. Um dem Entstehen unterschiedlicher Konzentrationen durch ungenaues Pipetieren zu entgehen, wurde ein Gesamtgemisch („Mastermix“) aus dem iQTMSYBR[®] Green Supermix, Aqua dest. und Primern hergestellt.

Die Denaturierungsphase am Anfang der PCR wurde auf 3 Minuten bei 95 °C gesetzt. 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 fand die Elongationsphase (72 °C, 30 Sekunden) statt. Die Real-Time-PCR zeigte in Summe 40 dieser Zyklen.

Jedes Experiment setzte sich aus einer PCR-Negativkontrolle, sowie der jeweiligen cDNA-Probe und einer Verdünnungsreihe der PCR-Positivkontrolle zusammen. Bei der PCR-Negativkontrolle wurde anstatt cDNA Wasser zum Probenmix gegeben. Es sollte hier keinerlei PCR-Produkt entstehen bzw. gemessen werden. Damit die durch unterschiedliche Primer generierten Werte bzw. zwei getrennte Real-Time-Polymerasekettenreaktionen miteinander verglichen werden konnten, mussten die Primereffizienzen bestimmt werden. Diese wurden mit Hilfe von Verdünnungsreihen der klonierten cDNA (Standard) über eine Standardkurve ermittelt, die einer Linearregression, umgekehrt zur logarithmischen Funktion der Fluoreszenzaufzeichnung aus der PCR besteht.

Aus der Steigung dieser Standardkurve ließ sich der Wert für die Primereffizienz ermitteln.

2.8 Auswertung der quantitativen PCR

Anhand der unstimulierten Kontrolle und des Housekeeping-Gens β -Aktin wurden alle untersuchten Proben ausgewertet. Wie schon gezeigt wurde, wird die β -Aktin mRNA in allen Zellen in einem nahezu gleichen Verhältnis exprimiert (Thellin et al., 1999; Bustin, 2000; Ke et al., 2000; Bustin, 2002; Vandesompele et al., 2002).

Um die quantitativen Real-Time-PCR auswerten zu können, wurde die Normalisierung der Ergebnisse anhand der Genexpression von den β -Aktin-Primern zur Normalisierung der Ergebnisse vorgenommen (Thellin et al., 1999; Bustin, 2000; Ke et al., 2000; Bustin, 2002; Vandesompele et al., 2002).

Alle Ergebnisse wurden zunächst durch den oben beschriebenen Schwellenwert (C_t-Wert) dargestellt.

Mit der Methode nach Pfaffl ist es möglich, die Änderung der Genexpression im Vergleich zum Housekeeping-Gen und zur unstimulierten Kontrolle zu ermitteln.

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.

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

Formel 1: Primereffizienz

Die Berechnung der jeweiligen ΔC_t -Werte der einzelnen Proben erfolgte in einem weiteren Rechenschritt.

Es wurde eine Differenz gebildet, bei welcher der ΔC_t -Wert aus dem C_t-Wert des Housekeeping-Genes und dem des Zielgens der unstimulierten Kontrolle ermittelt wurde. Dieses entsprach der Referenz.

Die zweite Differenz für den ΔC_t -Wert wurde aus dem C_t-Wert des House-Keeping-Genes und dem des Zielgens der untersuchten Probe (Wert für das Zielgen) berechnet.

Die Ermittlung des entsprechenden Quotienten, welcher die x-fache Änderung der Genexpression angab, fand in einer weiteren Formel statt:

$$\text{Quotient} = (E_{\text{Zielgen}})_{\text{-ct-Zielgen(Kontrolle-Probe)}} / (E_{\text{Referenz}})_{\text{-ct-Referenz(Kontrolle-Probe)}}$$

Formel 2: Quotient der Änderung der Genexpression (Pfaffl, 2001)

2.9 Statistische Auswertung der quantitativen Genexpressionsanalyse

Die statistische Auswertung wurde mit dem Programm SPSS (Student Version 18), lizenziert für das Universitätsklinikum Bonn, durchgeführt.

Es wurde eine rein deskriptive Statistik erhoben, wobei der Mittelwert, Minimum, Maximum und die Standardabweichung angegeben worden sind.

Zur Aussage von Genexpressionsänderungen ist die Analyse bezüglich des gesamten Zeitintervalls (t0 bis 240 Minuten) berücksichtigt worden.

3 Ergebnisse

Im Rahmen oralchirurgischer Eingriffe wurden Gingivaepithelzellen (GECs) und Gingivafibroblastenzellen (HGFs) gewonnen. Es folgte die qualitative Genexpressionsanalyse der humanen β -Defensine-1 und -2 sowie des Chemokins CCL20 und der Interleukine IL-1 β und IL-8 in den oben genannten GECs und HGFs (siehe 9.1). Zum Schluss wurde die quantitative Genexpressionsanalyse von hBD-1, -2, CCL20, IL-1 β und IL-8 nach Stimulation von GECs und HGFs mit dem humanen Zytokin IL-4 durchgeführt.

3.1 Qualitative Genexpressionsanalyse

Zur qualitativen Genexpressionsanalyse der humanen β -Defensine-1 und -2, des Chemokins CCL20 und der Interleukine IL-1 β und IL-8 wurden GECs und HGFs auf die Anwesenheit der bereits genannten Gene untersucht.

Als Housekeeping-Gen wurde bei allen Versuchen β -Aktin verwendet.

Gen	Gingivafibroblastenzellen	Gingivaepithelzellen
hBD-1	+	++
hBD-2	+	++
CCL20	+	++
IL-1 β	+	++
IL-8	+	++

Tabelle 2: Genexpression von hBD-1, -2, CCL20, IL-1 β und IL-8 in GECs und HGFs; +=detektiert. Die Genexpressionsprofile für hBD-1, hBD-2, CCL20, IL-1 β , IL-8 zeigen höhere Werte in GECs vs HGFs.

In beiden Zellgruppen konnte die in vivo Genexpression von hBD-1, -2, CCL20, IL-1 β und IL-8 gezeigt werden.

3.2 Optimierung der Real-Time-PCR

Um die Bedingungen der Real-Time-PCR zu verbessern, wurde für jedes Primerpaar mit Hilfe gepolter cDNA das Temperaturoptimum bestimmt.

Mit Hilfe von Verdünnungsreihen wurden die Effizienzen zur Berechnung der relativen Genexpressionen nach Pfaffl (2001) ermittelt, diese sind in Tabelle 3 dargestellt.

Unter optimalen Bedingungen generiert die PCR mit cDNA Proben eine einzelne DNA-Bande, wobei gleichzeitig keine Bande mit Wasser als PCR-Negativkontrolle erkennbar ist.

Gen	Effizienz
β-Aktin	1,85
hBD-1	2,08
hBD-2	2,05
CCL20	2,40
IL-1 β	1,85
IL-8	1,94

Tabelle 3: Darstellung der Effizienzen von β -Aktin, hBD-1, hBD-2, CCL20, IL-1 β und IL-8 aus der Real-Time-PCR

3.3 Quantitative Genexpressionsanalyse

Aufgrund der Ergebnisse der qualitativen Expressionanalyse wurden in der Versuchsreihe Gingivaepithelzellen (GECs) und Gingivafibroblastenzellen (HGFs) in einem 3-fach Ansatz mit IL-4 in einer Konzentration von 1 ng/ml stimuliert.

Im Anschluss daran wurden die Genexpressionsraten von hBD-1, -2, CCL20, IL-1 β und IL-8 wie unter 2.7-2.9 beschrieben, bestimmt.

Alle untersuchten Proben wurden anhand der unstimulierten Kontrolle und des Housekeeping-Gens β -Aktin ausgewertet.

3.3.1 Genexpression von hBD-1 nach Stimulation mit IL-4 bei GECs

Die Expression von hBD-1 konnte sowohl in unstimulierten als auch in stimulierten GECs nachgewiesen werden.

Im Zeitversuch über t30, t120 und t240 wurde eine gleichbleibende Expressionsleistung von hBD-1 bei unstimulierten GECs verzeichnet. Nach Stimulation von GECs mit IL-4 wurde innerhalb des Zeitversuchs von t30, t120 und t240 im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle keine signifikante Änderung der Expressionsleistung festgestellt (siehe Abbildung 1).

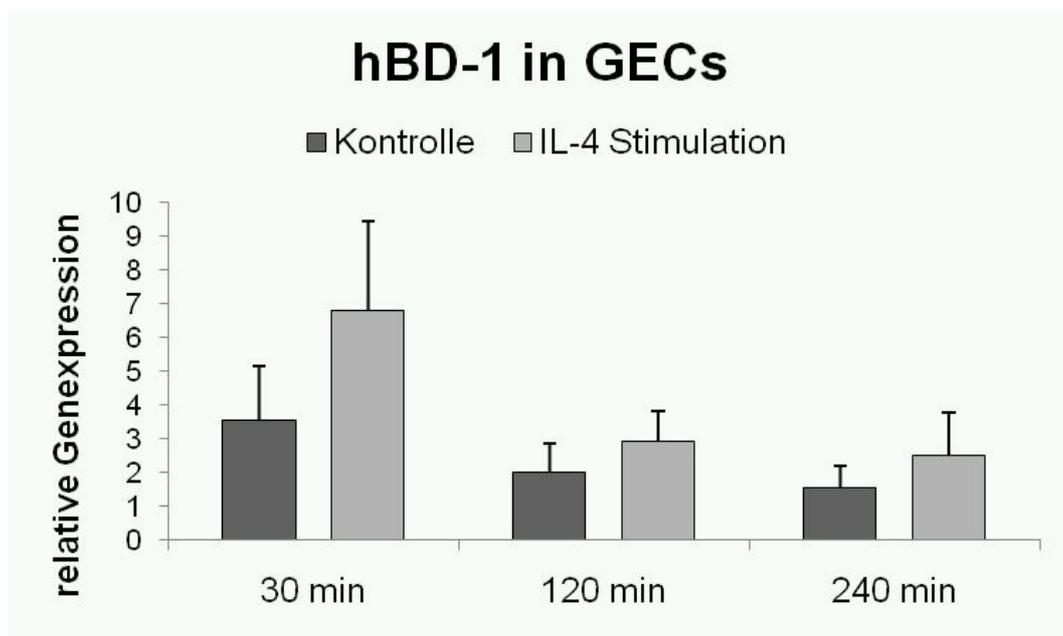


Abbildung 1: relative Genexpression von hBD-1 bei GECs

Darstellung der relativen Genexpression von hBD-1 bei GECs ohne Stimulation (Kontrollwert=dunkler Balken) und nach Stimulation mit 1 ng/ml IL-4 (hellgrauer Balken).

Die Balken entsprechen den Mittelwerten, die Fehlerbalken entsprechen den Standardabweichungen. Insgesamt konnte nach der Stimulation mit 1 ng/ml IL-4 keine signifikante Änderung der Genexpression von hBD-1 festgestellt werden.

3.3.2 Genexpression von hBD-2 nach Stimulation mit IL-4 bei GECs

Sowohl in unstimulierten als auch in stimulierten GECs konnte die Expression von hBD-2 nachgewiesen werden.

Eine Expressionssteigerung wurde im Zeitversuch über t30, t120 und t240 von hBD-2 bei unstimulierten GECs bei t240 verzeichnet. Im Vergleich zu t30 und t120 steigt die Expression bei t240 deutlich an ($P=0,011$). Nach Stimulation von GECs mit IL-4 zeigte sich innerhalb des Zeitversuchs von t30, t120 und t240 im Vergleich zu t30 ($P=0,03$) und t120 ($P=0,025$) eine deutlich gesteigerte Expressionsleistung von hBD-2 bei t240 (siehe Abbildung 2).

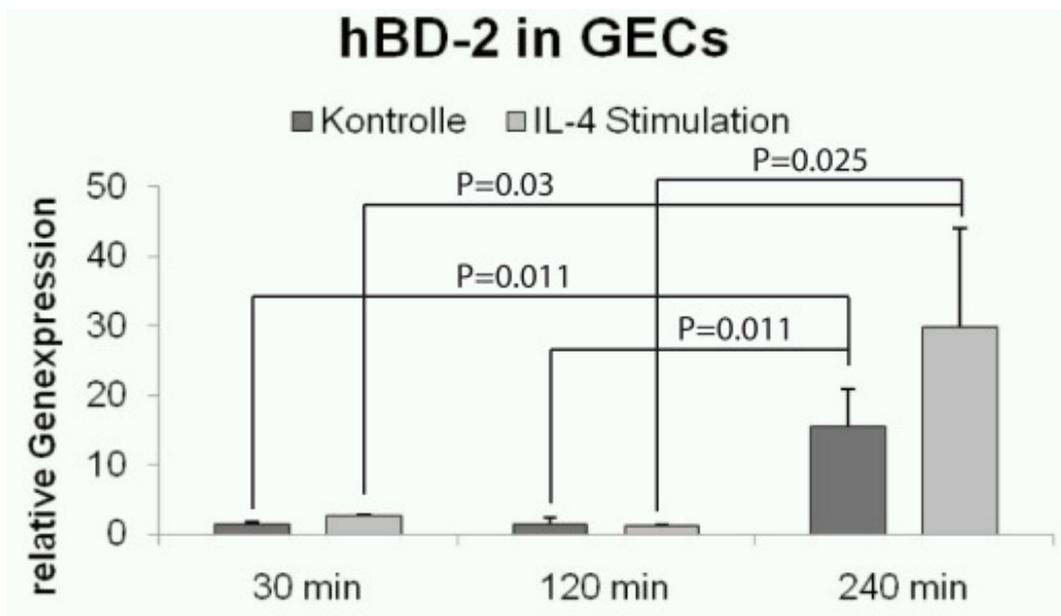


Abbildung 2: relative Genexpression von hBD-2 bei GECs

Darstellung der relativen Genexpression von hBD-2 bei GECs ohne Stimulation (Kontrollwert=dunkler Balken) und nach Stimulation mit 1 ng/ml IL-4 (hellgrauer Balken).

Die Balken entsprechen den Mittelwerten, die Fehlerbalken entsprechen den Standardabweichungen. Erkennbar bei t240 ist eine signifikant gesteigerte Genexpression von hBD-2 in GECs nach Stimulation mit IL-4 im Vergleich zu t120 ($P=0,25$) und t30 ($P=0,03$).

3.3.3 Genexpression von CCL20 nach Stimulation mit IL-4 bei GECs

Nachweisbar ist die Expression von CCL20 sowohl in unstimulierten wie auch in stimulierten GECs.

Bei CCL20 konnte bei unstimulierten GECs im Zeitversuch über t30, t120 und t240 und nach Stimulation von GECs mit dem Gen IL-4 über die gesamte Zeit keine geänderte Expressionsraten verzeichnet werden (siehe Abbildung 3).

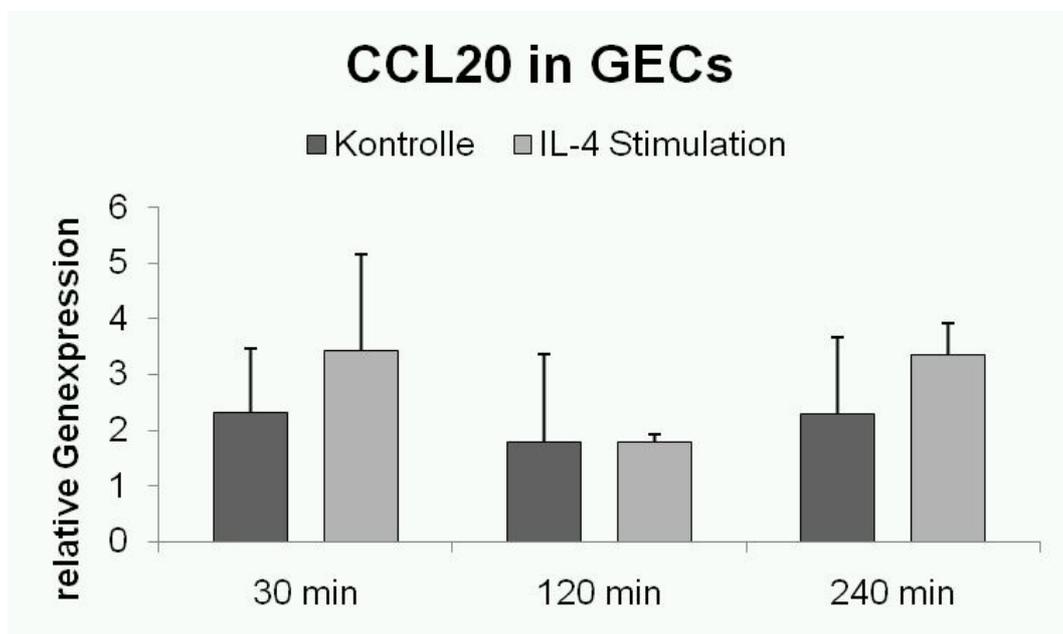


Abbildung 3: relative Genexpression von CCL20 bei GECs

Darstellung der relativen Genexpression von CCL20 bei GECs ohne Stimulation (Kontrollwert=dunkler Balken) und nach Stimulation mit 1 ng/ml IL-4 (hellgrauer Balken).

Die Balken entsprechen den Mittelwerten, die Fehlerbalken entsprechen den Standardabweichungen. Nach der Stimulation mit 1 ng/ml IL-4 war insgesamt keine signifikante Änderung der Genexpression von CCL20 feststellbar.

3.3.4 Genexpression von IL-1 β nach Stimulation mit IL-4 bei GECs

Die Expression von IL-1 β ließ sich sowohl in unstimulierten als auch in stimulierten GECs nachweisen.

Im Zeitversuch über t30, t120 und t240 wurde keine veränderte Expressionsleistung von IL-1 β bei unstimulierten GECs festgestellt. Nach anschließender Stimulierung von GECs mit IL-4 konnte innerhalb des Zeitversuchs von t30, t120 und t240 im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle keine Genexpressionsänderung von IL-1 β verzeichnet werden (siehe Abbildung 4).

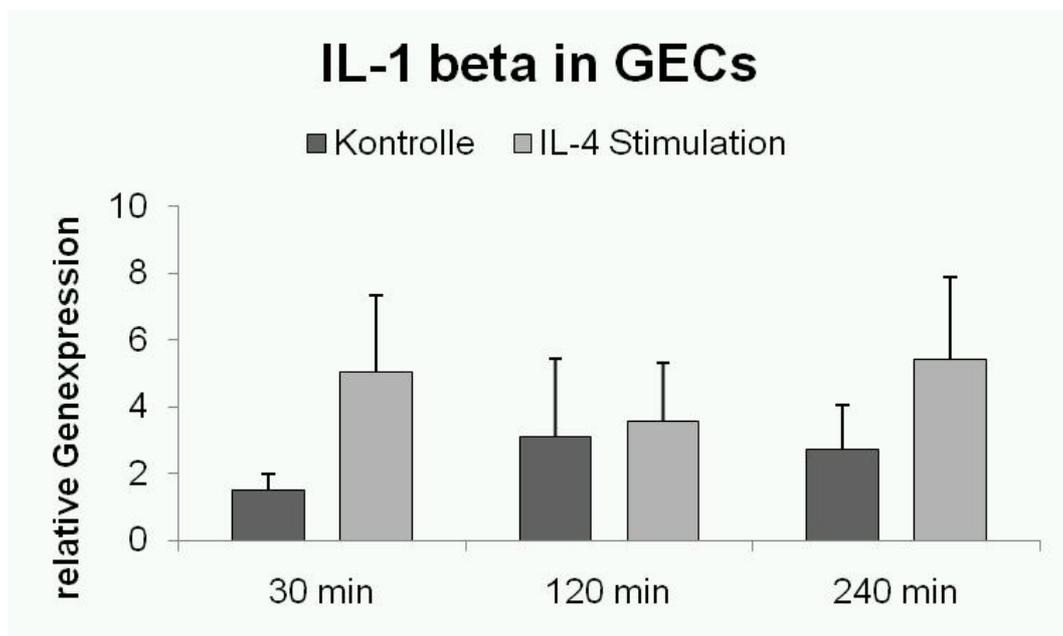


Abbildung 4: relative Genexpression von IL-1 β bei GECs

Darstellung der relativen Genexpression von IL-1 β bei GECs ohne Stimulation (Kontrollwert=dunkler Balken) und nach Stimulation mit 1 ng/ml IL-4 (hellgrauer Balken).

Die Balken entsprechen den Mittelwerten, die Fehlerbalken entsprechen den Standardabweichungen. Eine signifikante Änderung der Genexpression von IL-1 β nach der Stimulation mit 1 ng/ml IL-4 ließ sich nicht feststellen.

3.3.5 Genexpression von IL-8 nach Stimulation mit IL-4 bei GECs

Die Expression von IL-8 konnte sowohl in unstimulierten als auch in stimulierten GECs nachgewiesen werden.

Eine gleichbleibende Expressionsleistung wurde für das Gen IL-8 über die Zeit über t30, t120 und t240 bei unstimulierten GECs registriert. Nach Stimulation von GECs mit IL-4 ließ sich innerhalb des Zeitversuchs von t30, t120 und t240 im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle keine Änderung der Expression von IL-8 feststellen (siehe Abbildung 5).

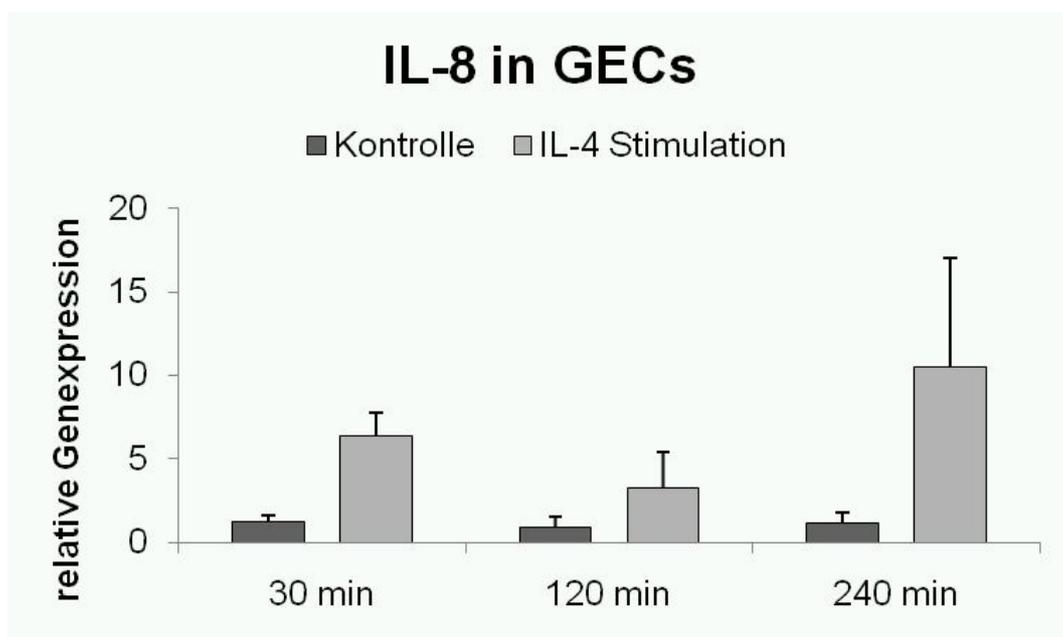


Abbildung 5: relative Genexpression von IL-8 bei GECs

Darstellung der relativen Genexpression von IL-8 bei GECs ohne Stimulation (Kontrollwert=dunkler Balken) und nach Stimulation mit 1 ng/ml IL-4 (hellgrauer Balken).

Die Balken entsprechen den Mittelwerten, die Fehlerbalken entsprechen den Standardabweichungen. Insgesamt war nach der Stimulation mit 1 ng/ml IL-4 keine signifikante Änderung der Genexpression von IL-8 festzustellen.

3.3.6 Genexpression von hBD-1 nach Stimulation mit IL-4 bei HGFs

In unstimulierten wie auch in stimulierten HGFs ließ sich die Expression von hBD-1 nachweisen. Bei unstimulierten HGFs wurde innerhalb des Stimulationszeitraumes über t30, t120 und t240 eine gleichbleibende Expressionsleistung von hBD-1 bei verzeichnet.

Nach Stimulation von HGFs mit IL-4 wurde innerhalb des Zeitversuchs von t30, t120 und t240 im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle keine geänderte Expression von hBD-1 festgestellt (siehe Abbildung 6).

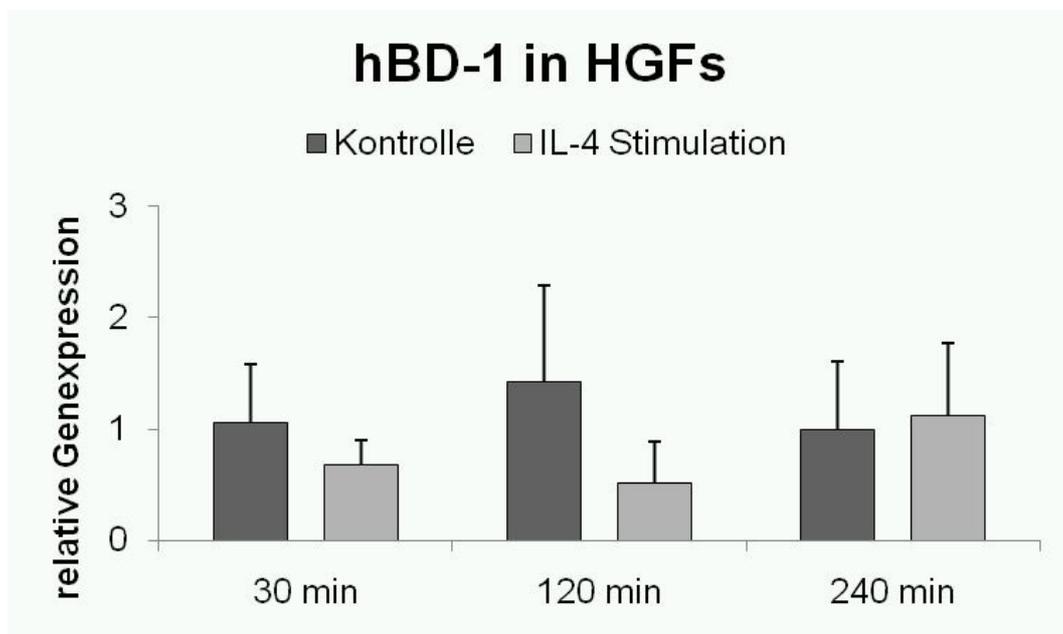


Abbildung 6: relative Genexpression von hBD-1 bei HGFs

Darstellung der relativen Genexpression von hBD-1 bei HGFs ohne Stimulation (Kontrollwert=dunkler Balken) und nach Stimulation mit 1 ng/ml IL-4 (hellgrauer Balken).

Die Balken entsprechen den Mittelwerten, die Fehlerbalken entsprechen den Standardabweichungen. Insgesamt konnte nach der Stimulation mit 1 ng/ml IL-4 keine signifikante Änderung der Genexpression von hBD-1 festgestellt werden.

3.3.7 Genexpression von hBD-2 nach Stimulation mit IL-4 bei HGFs

Nachgewiesen werden konnte die Expression von hBD-2 sowohl in unstimulierten als auch in stimulierten HGFs.

Bei hBD-2 wurde im Zeitversuch über t30, t120 und t240 eine gleichbleibende Expressionsleistung bei unstimulierten HGFs registriert. Nach Stimulation von HGFs mit IL-4 war innerhalb des Zeitversuchs von t30, t120 und t240 im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle die Tendenz einer gesteigerten Genexpression von hBD-2 bei t30 zu verzeichnen ($P=0,053$). Bei t240 zeigte sich eine verminderte Expressionsleistung von hBD-2 ($P=0,029$) im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle (siehe Abbildung 7).

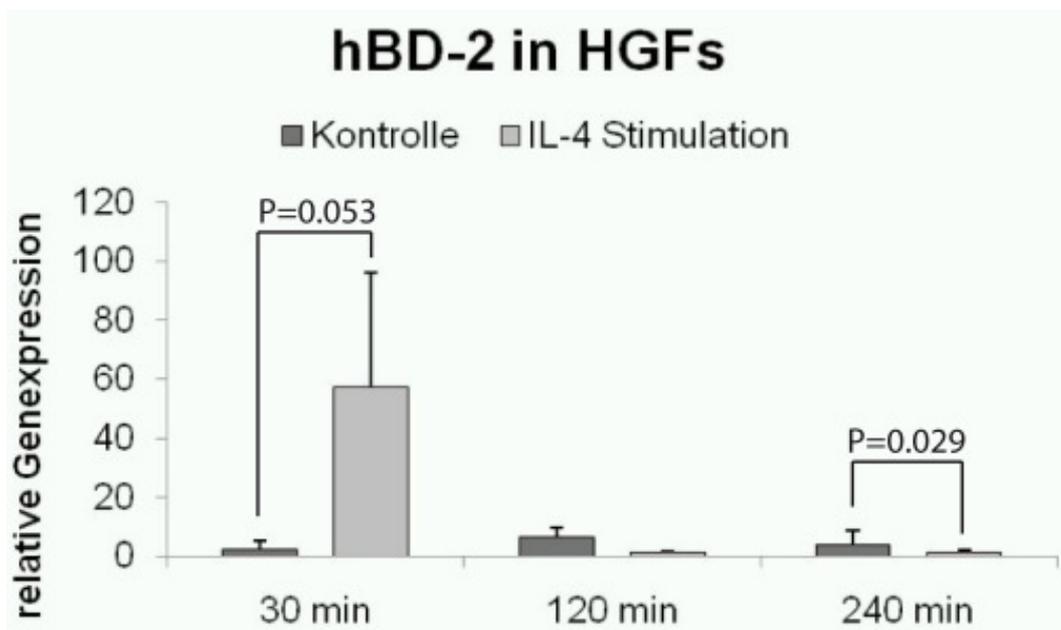


Abbildung 7: relative Genexpression von hBD-2 bei HGFs

Darstellung der relativen Genexpression von hBD-2 bei HGFs ohne Stimulation (Kontrollwert=dunkler Balken) und nach Stimulation mit 1 ng/ml IL-4 (hellgrauer Balken).

Die Balken entsprechen den Mittelwerten, die Fehlerbalken entsprechen den Standardabweichungen. Es ließ sich eine Tendenz zur erhöhten Genexpression von hBD-2 bei t30 nach Stimulation mit IL-4 bei HGFs ($P=0,053$) feststellen. Nach t240 zeigte sich die Genexpression der mRNA von hBD-2 erniedrigt ($P=0,029$).

3.3.8 Genexpression von CCL20 nach Stimulation mit IL-4 bei HGFs

Sowohl in unstimulierten als auch in stimulierten HGFs war die Expression von CCL20 nachweisbar.

Eine Veränderung im Expressionsmuster von CCL20 zeigte sich im Zeitversuch über t30, t120 und t240 bei unstimulierten HGFs bei t240. Nach Stimulation von HGFs mit IL-4 konnte innerhalb des Zeitversuchs von t30, t120 und t240 im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle insgesamt eine gesteigerte Expressionsleistung von CCL20 bei t30 ($P=0,016$) festgestellt werden (siehe Abbildung 8).

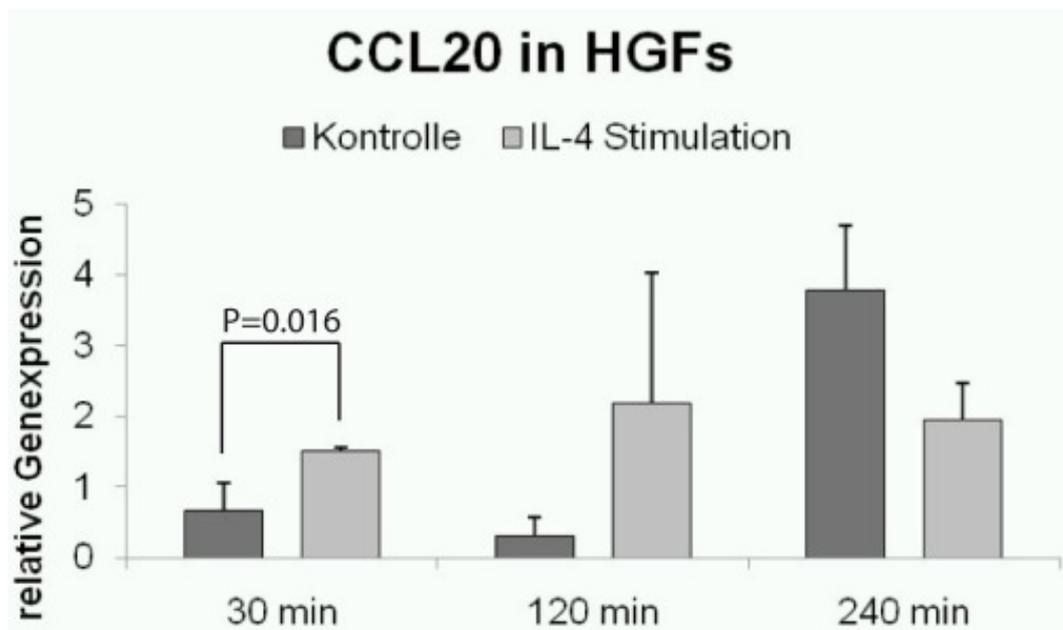


Abbildung: 8 relative Genexpression von CCL20 bei HGFs

Darstellung der relativen Genexpression von CCL20 bei HGFs ohne Stimulation (Kontrollwert=dunkler Balken) und nach Stimulation mit 1 ng/ml IL-4 (hellgrauer Balken).

Die Balken entsprechen den Mittelwerten, die Fehlerbalken entsprechen den Standardabweichungen. Ein signifikanter Unterschied in der Genexpression von CCL20 bei t30 ließ sich nach Stimulation mit IL-4 ($P=0,016$) im Vergleich zum unstimulierten Kontrollwert t30 nachweisen.

3.3.9 Genexpression von IL-1 β nach Stimulation mit IL-4 bei HGFs

In unstimulierten wie auch in stimulierten HGFs konnte die Expression von IL-1 β nachgewiesen werden.

Insgesamt wurde im Zeitversuch über t30, t120 und t240 eine gleichbleibende Expressionsleistung von IL-1 β bei unstimulierten HGFs registriert. Nach Stimulation von HGFs mit IL-4 konnte innerhalb des Zeitversuchs von t30, t120 und t240 im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle über den gesamten Stimulationszeitraum keine Änderungen beobachtet werden (siehe Abbildung 9).

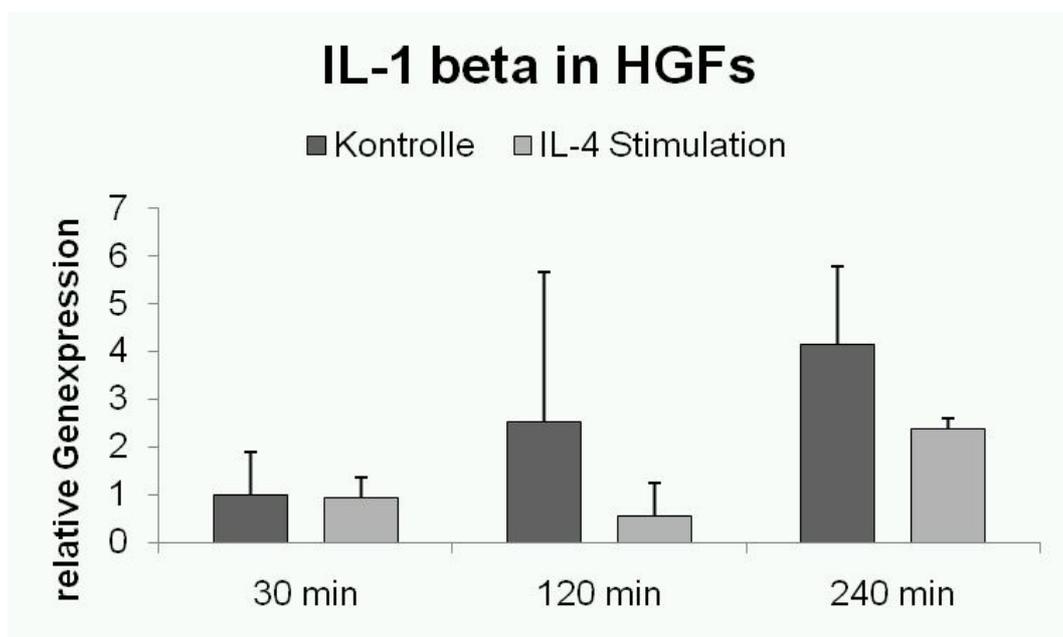


Abbildung 9: relative Genexpression von IL-1 β bei HGFs

Darstellung der relativen Genexpression von IL-1 β bei HGFs ohne Stimulation (Kontrollwert=dunkler Balken) und nach Stimulation mit 1 ng/ml IL-4 (hellgrauer Balken).

Die Balken entsprechen den Mittelwerten, die Fehlerbalken entsprechen den Standardabweichungen. Eine signifikante Änderung der Genexpression von IL-1 β konnte nach der Stimulation mit 1 ng/ml IL-4 nicht festgestellt werden.

3.3.10 Genexpression von IL-8 nach Stimulation mit IL-4 bei HGFs

Nachweisbar ist die Expression von IL-8 sowohl bei unstimulierten als auch bei stimulierten HGFs.

Bei unstimulierten HGFs konnte im Zeitversuch über t30, t120 und t240 eine gleichbleibende Expressionsleistung von IL-8 festgestellt werden. Eine signifikant geänderte Expressionsleistung von IL-8 ($P=0,019$) ließ sich nach Stimulation von HGFs mit IL-4 innerhalb des Zeitversuchs von t30, t120 und t240 im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle bei t30 registrieren (siehe Abbildung10).

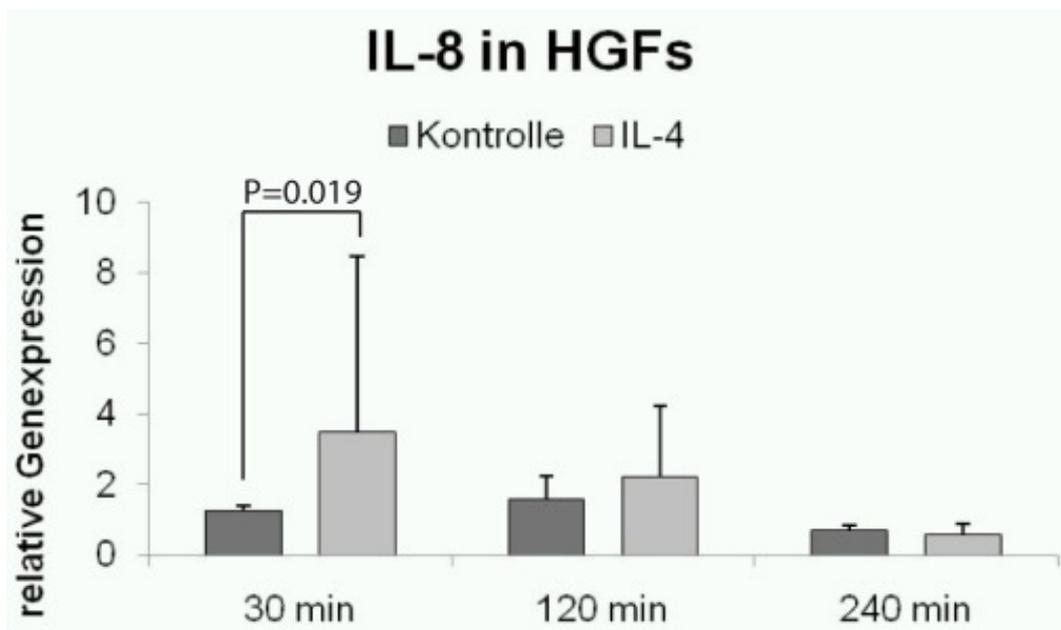


Abbildung 10: relative Genexpression von IL-8 bei HGFs

Darstellung der relativen Genexpression von IL-8 bei HGFs ohne Stimulation (Kontrollwert=dunkler Balken) und nach Stimulation mit 1 ng/ml IL-4 (hellgrauer Balken).

Die Balken entsprechen den Mittelwerten, die Fehlerbalken entsprechen den Standardabweichungen. Ein signifikanter Unterschied war in der Genexpression von IL-8 bei t30 nach Stimulation mit IL-4 ($P=0,019$) festzustellen.

4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden Untersuchungen an Kulturen von Gingivaepithel- (GECs) und Gingivafibroblastenzellen (HGFs) durchgeführt. Für die Anzucht dieser Zellen konnten im Rahmen routinemäßig durchgeführter oralchirurgischer Eingriffe Biopsien der Gingiva gewonnen werden. Mit Hilfe dieser Gewebe wurden weitere gingivale Epithelzellen (GECs) und Fibroblasten (HGFs) kultiviert.

Die Epithelien der Mundhöhle sind einem ständigen Mikroorganismenkontakt ausgesetzt und in der Lage, eine physikalische und chemische Barriere auszubilden und damit aktiv gegen die bakterielle Besiedelung zu reagieren (Schröder, 1999a). Das marginale Parodont oder auch Gingiva, ist ektodermalen Ursprungs und lässt sich aufteilen in Saumepithel, orales Sulkusepithel und orales Gingivaepithel (Lindhe, 2005). Das Epithel ist in Form eines primären Epithelansatzes über Hemidesmosomen und eine interne Basallamina aus Glycoproteinen und Kollagen am Schmelz verankert. Im oralen Gingivaepithel finden sich stets eine Reihe nichtepithelialer Zellen wie Melanozyten, Merkelzellen, Langerhanszellen und kleine Lymphozyten. Das parodontale Ligament, auch Desmodont, ist ein zell- und faserreiches, derbes Bindegewebe, das ektomesenchymalen Ursprungs ist. Zu den zellulären Elementen zählen Fibroblasten, Zementoblasten, Osteoblasten, Epithelzellen, Abwehrzellen und neurovaskuläre Elemente.

Die Hauptaufgabe der Fibroblasten ist die Bildung des Bindegewebes und der Grundsubstanz, vor allem bei der Wundheilung zeigen diese eine hohe Mitoseaktivität (Ulfig, 2003).

Die spezifischen Kompartimente der peripheren Infektionsabwehr der Gingiva schützen zumeist wirkungsvoll vor der Invasion von Bakterien der dentogingivalen Region. Eine Protektion gegen bakterielle Infektionen wird sowohl von der epithelialen als auch der Bindegewebskomponente der Gingiva gewährleistet. Die Lamina propria der Gingiva stellt dazu die zellulären und humoralen Immunkomponenten bereit (Lindhe, 2005).

Ziel dieser Arbeit war es, zunächst die Genexpression der humanen β -Defensine hBD-1 und hBD-2, des Chemokins CCL20 und der Interleukine IL-1 β und IL-8 in HGFs nachzuweisen und den Einfluss von IL-4 auf die Genexpression antimikrobieller Peptide und proinflammatorischer Mediatoren in gingivalen Zellen zu untersuchen.

Anhand der gewonnenen Zellen erfolgte eine qualitative Genexpressionsanalyse von hBD-1, -2, CCL20, IL-1 β und IL-8 mit Hilfe der RT-PCR.

Anschließend wurde eine quantitative Genexpressionsanalyse von hBD-1, -2, CCL20, IL-1 β und IL-8 nach Stimulation mit 1ng/ml Interleukin IL-4 bei GECs und HGFs mit Hilfe der RT-Real-Time-PCR durchgeführt. Die Konzentration von IL-4 mit 1ng/ml wurde gewählt, weil sie unterhalb der Grenze liegt, bei der die Proliferation von Zellen angeregt werden könnte, da die Proliferation und damit auch die Differenzierung von Zellen zu einer per se gesteigerten Genexpression von z.B. hBD-2 führen könnte (Courneya et al., 2010; Yang et al., 1996), ebenso wie die Migration, welche bei 1ng/ml unverändert bleibt (Volpert et al., 1998). Die Konzentration wurde für diese Arbeit mit 1ng/ml des Weiteren so gewählt, dass diese biologisch effektiv ist (Asano-Kato et al., 2005).

In einem thermozyklischen Verfahren, der Polymerasekettenreaktion (PCR), wurde die Expressionsbestimmung aller untersuchten Gene (hBD-1, -2, CCL20, IL-1 β und IL-8) durchgeführt. Es ist möglich, während dieser Reaktion kleine Mengen spezifischer DNA-Fragmente mit hoher Ausbeute (exponentiell) zu amplifizieren. Die Real-Time-Polymerasekettenreaktion, welche zur quantitativen Analyse der Genexpressionen verwendet wurde, ist wesentlich sensitiver. Dies ermöglicht, neben der üblichen Amplifizierung der cDNA, zusätzlich eine Quantifizierung mit Hilfe von Fluoreszenzmessungen innerhalb eines Zyklus zu erreichen. Die Fluoreszenz nimmt dabei proportional zur Menge der generierten Produkte zu und dient der Datenerhebung, sobald ein Anstieg über die Hintergrund-Fluoreszenz verzeichnet werden kann (Schwellenwertzyklus / „Crossing point“) (Bustin, 2000; Bustin, 2002).

β -Aktin, das Bestandteil des Zytoskeletts und ein häufiges Protein in Eukaryonten ist, besitzt eine konstitutive, nicht-alternierende Expression. Das Protein ist daher geeignet, den Erfolg der PCR unmittelbar zu überprüfen und wurde somit für alle durchgeführten Polymerasekettenreaktionen als interner Standard gewählt.

Sollte dieser Standard nicht detektiert werden können, muss davon ausgegangen werden, dass die PCR (oder ein vorangegangener Versuchsanteil wie mRNA-Isolierung und/oder cDNA-Synthese) nicht optimal verlaufen ist. Des Weiteren wird durch Bezugnahme aller ermittelten Werte zu β -Aktin ein Vergleich zwischen den einzelnen Genen ermöglicht, d. h. es findet eine Relativierung statt. GAP-DH (Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase) kann als eine Alternative zu β -Aktin einen weiteren internen Standard darstellen. Die Dehydrogenase ist aufgrund möglicher Variationen innerhalb der Transkriptionslevel, verursacht durch verschiedene Zellmetabolismen (z. B. Insulinabhängigkeit) (Bustin et al., 2000), in dieser Arbeit nicht verwendet.

Sowohl im Rahmen der qualitativen als auch quantitativen Analyse konnte in allen Proben die Genexpression von β -Aktin nachgewiesen werden. Deshalb war es möglich, die C_t -Werte der zu untersuchenden Gene hBD-1, -2, CCL20, IL-1 β und IL-8, des Standards β -Aktin und der jeweili-

gen unstimulierten Kontrollen mit den entsprechenden Primereffizienzen mittels der Formel nach Pfaffl in Korrelation zu bringen und die relativen Expressionen zu berechnen (Pfaffl, 2001).

Zu den Mikroorganismen, die orale Gewebe ständig besiedeln, zählen unter anderem grampositive und gramnegative Bakterien, Pilze und Viren. In diversen Studien konnte bereits gezeigt werden, dass hBD-1, hBD-2, CCL20, IL-1 β und IL-8 in Epithelien der Mundhöhle exprimiert werden (Krisanaprakornkit et al., 1998; Dale & Krisanaprakornkit, 2001; Dunsche et al., 2002; Dale & Fredericks, 2005; Dommisch et al., 2005a, 2005b). Die Genexpression der genannten Gene erfolgte dabei nicht nur unter entzündlichen Bedingungen, sondern auch während gesunder oraler Verhältnisse in Anwesenheit der kommensalen Mundflora (Krisanaprakornkit et al., 2000; Dommisch et al., 2005b).

In der vorliegenden Arbeit wurde die Genexpression der humanen Defensine hBD-1 und hBD-2, des Chemokins CCL20 und der Interleukine IL-1 β und IL-8 in GECs bestätigt. Eine neue Erkenntnis ist, dass wie in dieser Arbeit gezeigt wurde hBD-1 in HGFs exprimiert wird.

Ziel dieser Arbeit war es zu untersuchen, ob humane β -Defensine in GECs und HGFs als Teil des angeborenen Immunsystems im Rahmen der antiinflammatorischen Antwort reguliert werden. Die Zellen wurden daher mit dem antiinflammatorischen Mediator IL-4 stimuliert.

Insgesamt konnte nach der Stimulation mit 1 ng/ml IL-4 keine signifikante Änderung der Genexpression von hBD-1 festgestellt werden. Dieses Ergebnis passt zu der Aussage von Schröder 1999, dass hBD-1 als ein konstitutiv exprimiertes antimikrobielles Peptid humaner Epithelien angesehen wird. Auch in anderen früheren Arbeiten konnte die konstitutive Expression von hBD-1 in GECs nachgewiesen werden (Ganz & Weiss, 1997; Lehrer, 2004). hBD-1 besitzt eine besonders hohe Wirksamkeit gegenüber *E. coli* und eine breite Wirksamkeit gegenüber anderen verschiedenartigen Bakterien und Pilzen (Tanida et al., 2003). Das Wirkungsspektrum erstreckt sich unterschiedlich selektiv auf die, auf den Epithelien physiologisch vorhandene Mikroflora (Schröder, 1999; Dale und Krisanaprakornkit, 2001; Jurevic et al., 2003).

Für hBD-2 ließen sich zwei wesentliche Regulationsmechanismen beobachten. Einerseits zeigte die Genexpressionsanalyse, dass die Applikation von IL-4 nach 240 Minuten zu einer gesteigerten Expression der mRNA von hBD-2 im Vergleich zu den früheren Zeitpunkten führte. IL-4 ist dafür bekannt, als antiinflammatorisches Zytokin eine hemmende Wirkung auf die Entzündungsreaktion zu haben und steht im Dienste der spezifischen Abwehr (Horn et al., 2002). Die in dieser Arbeit gezeigten Regulationen der mRNA von hBD-2 lassen vermuten, dass IL-4 die Synthese von hBD-2 in gingivalen Epithelzellen positiv beeinflusst. Dies könnte auf eine gesteigerte antimikrobielle Aktivität im Rahmen der antiinflammatorischen Reaktion hindeuten. Andererseits

konnte für die unstimulierten Kontrollen ebenfalls signifikante Änderungen in der Genexpression von hBD-2 nach 240 Minuten im Vergleich zu 30 und 120 Minuten beobachtet werden. Es ist bekannt, dass die Expression von hBD-2 in gingivalen Epithelschichten von Zellen höherer Differenzierung nachzuweisen ist (Dale 2001). Während hBD-1 eher in basalen Epithelschichten exprimiert wird, kann die Expression von hBD-2 eher im Stratum spinosum bzw. Stratum granulosum des gingivalen Epithels nachgewiesen werden (Dale 2001). Es besteht ein Zusammenhang von Involukrin, einem epithelialen Differenzierungsfaktor, und der Expression von hBD-2. Im Rahmen der Experimente wurden Zellen mit einer Konfluenz von 90% eingesetzt. Interzelluläre Kontakte begünstigen die Differenzierung durch die vermehrte Bildung von Differenzierungsfaktor wie Involukrin (Dale et al., 2001). Für die in dieser Arbeit dargestellte Expression könnte vermutet werden, dass auch hier eine Progression der zellulären Differenzierung über die Zeit stattgefunden hat und somit ebenfalls in unstimulierten Kontrollen eine gesteigerte Genexpression von hBD-2 über die Zeit beobachtet werden konnte bzw. Variationen in der Zelldichte in einzelnen Zellkulturen vorlagen.

In-vitro Analysen der Genexpression des humanen β -Defensins-2 in GECs zeigten in vorangegangenen Versuchen einen Anstieg der mRNA-Synthese als Reaktion auf die Stimulation mit Bakterien, bakteriellen Antigenen (Krisanoprakornkit et al., 2002) oder Zytokinen (Schröder, 1999). Untersuchungen an Biopsien der Gingiva erbrachten schon eine erhöhte mRNA-Expression von hBD-2 in der entzündeten Gingiva (Gingivitis) im Vergleich zur gesunden Gingiva und Gingiva von Patienten mit Parodontitis (Dommisch et al., 2005b). Ebenfalls wurde im Rahmen von Untersuchungen mit unterschiedlichen epithelialen Geweben schon bewiesen, dass die Expression von hBD-2 von dem Grad der Entzündung abhängig ist (Dale, 2000; Ong et al., 2002). Das Epithel der Mundschleimhaut und die Odontoblastenzellschicht der Pulpa weisen dazu, im Gegensatz zu den epithelialen Geweben ebenfalls die Expression von hBD-2 unter gesunden Bedingungen auf (Dale und Krisanaprakornkit, 2001; Dunsche et al., 2002; Dommisch et al., 2005a/b).

CCL20 ist wie hBD-1 und hBD-2 ein antimikrobielles Peptid mit mediator-ähnlichen Eigenschaften. Die antimikrobiellen Peptide hBD-2 und CCL20 weisen ein ähnliches antimikrobielles Wirkungsspektrum sowie strukturelle Verwandtschaft auf. Orale pathogene Mikroorganismen wie *P. gingivalis* könnten die Genexpression beider Peptide gleichfalls positiv beeinflussen (Dommisch et al., 2007, Dommisch et al., 2008; Dommisch et al., 2009), was auf gemeinsame antimikrobielle Mechanismen schließen lässt. Die Analyse der Experimente im Rahmen dieser Arbeit zeigte, dass der antiinflammatorische Mediator IL-4 kaum Einfluss auf die Genexpression, im Vergleich

zu hBD-2, nimmt. Hierbei änderte sich die Genexpression von CCL20 weder unter dem Einfluss von IL-4 über die Zeit noch in den unstimulierten Kontrollen.

Es ist eine neue Erkenntnis, dass IL-4 offenbar die Expression von hBD-2 und CCL20 differenziell beeinflusst. Dieser Erkenntnis sollte in weiterführenden Studien nachgegangen werden.

IL-1 β und IL-8 sind proinflammatorische Mediatoren. IL-4 zeigt als antiinflammatorischer Mediator in gingivalen Epithelzellen keinen signifikanten Einfluss auf IL-1 β und IL-8 über die Zeit, auch in den unstimulierten Kontrollwerten lässt sich kein Unterschied der Genexpression von IL-1 β und IL-8 über die Zeit erkennen. Da IL-4 ein antiinflammatorischer Mediator ist, ist biologisch nicht zu erwarten, dass durch IL-4 eine proinflammatorische Reaktion ausgelöst wird.

Bei hBD-1 bei HGFs konnte nach der Stimulation mit 1 ng/ml IL-4 keine signifikante Änderung der Genexpression festgestellt werden. Es lässt sich wie auch bei den GECs, eine ähnlich konstitutive Genexpression vermuten. Das Wirkungsspektrum von hBD-1 erstreckt sich unterschiedlich selektiv auf die, auf den Epithelien physiologisch vorhandene Mikroflora (Schröder, 1999; Dale&Krisanaprakornkit, 2001; Jurevic et al., 2003).

Eine Tendenz zur erhöhten Genexpression von hBD-2 bei t30 zeigte sich nach Stimulation mit IL-4 bei HGFs. Eine erniedrigte Genexpression der mRNA von hBD-2 bei HGFs wurde nach t240 festgestellt.

Ein Unterschied in der Expressionsänderung von hBD-2 bei den HGFs im Vergleich zu den GECs lässt sich in soweit erkennen, dass die Expressionsänderung von hBD-2 bei den HGFs viel früher geschieht als bei den GECs. Eine Erklärung dafür lässt sich im subepithelialen Kompartiment finden. Die GECs sind ständig einer Vielzahl von Mikroorganismen ausgesetzt und bilden mit den angeborenen Mechanismen des Immunsystems somit die erste Barriere gegen den Eintritt von Mikroorganismen an Grenzflächen wie Haut und Schleimhäuten. Die Regulationsmechanismen sind so fein, dass meist keine klinisch erkennbaren Entzündungszeichen ablaufen. Dringen Mikroorganismen ins subepitheliale Kompartiment, so muss rasch eine Barriere aufgebaut werden, um tieferes Eindringen von Mikroorganismen zu vermeiden. Die Expression wird zu einer früheren Zeit angeregt. Die erniedrigte Genexpression bei t240 lässt sich möglicherweise damit erklären, dass durch die anfänglich gesteigerte Expressionsleistung eine reziproke Hemmung von hBD-2 selbst ausgelöst wird.

Deutlich wurde ein signifikanter Unterschied in der Genexpression von CCL20 bei t30 nach Stimulation mit IL-4. Die Analyse der Experimente im Rahmen dieser Arbeit zeigte, dass der antiinflammatorische Mediator IL-4 bei den HGFs im Gegensatz zu den GECs Einfluss auf die Ge-

nexpression von CCL20 im Vergleich zu hBD-2 nimmt. Hierbei änderte sich die Genexpression von CCL20 unter dem Einfluss von IL-4 über die Zeit bei t30.

Auch hier könnte sich eine Erklärung der gesteigerten Genexpressionsleistung von CCL20 im subepithelialen Kompartiment finden. Ein Anstieg der Expression von CCL20 macht es bei Antigenkontakt gerade in der Anfangsphase einer Entzündung möglich, schnell entzündungshemmend einzugreifen. In vorangegangenen Studien wurde schon aufgezeigt, dass die Sekretion von CCL20 durch proinflammatorische Stimuli wie TNF- α und IL-1 β (Izadpanah et al., 2001, Fujii et al., 2001, Kwon et al., 2002) als auch durch bakterielle Invasion gesteigert werden kann. Eine Steigerung von CCL20-m-RNA und CCL20-Proteinexpression in Epithelzellen ist sowohl in vivo als auch in vitro nachzuweisen (Fujii et al., 2004; Izadpanah et al., 2001; Scheerens et al., 2001). Ebenso wurde bewiesen, dass das Ligand-Rezeptor-Paar CCL20/CCR6 für die Chemoattraktion von unreifen DC bei intestinaler Entzündung oder Antigen-Stimulation verantwortlich ist (Caux et al., 2000). Dieser Mechanismus könnte durch eine zusätzliche Bereitstellung von CCL20 aus HGFs mit unterstützt werden.

Nach der Stimulation mit 1 ng/ml IL-4 konnte bei der Genexpression von IL-1 β keine signifikante Änderung festgestellt werden. Ein Einfluss von IL-4 auf den proinflammatorischen Mediator auf die entzündliche Reaktion bei HGF lässt sich nicht konstatieren. IL-1 β ist ein proinflammatorisches Zytokin, welches zahlreiche Funktionen sowohl in der angeborenen als auch in der adaptiven Immunabwehr übernimmt (Janeway, 2002). Neuere Studien haben erwiesen, dass IL-4 in menschlichen Synovial- und Gingivafibroblasten zur Unterdrückung von IL-1 induzierter Metalloproteinase-3 (MMP-3) Expression führt (Jenkins et al, 2004; Stewart et al, 2007). MMP-3 gilt als gewebschädigendes Enzym, welches das Eindringen der Mikroorganismen ins Gewebe und die damit verbundene destruktive Parodontolyse begünstigt (Faurischou&Borregaard 2003). Durch die MMPs wird die extrazelluläre Matrix der Gingiva und des Parodontalligaments abgebaut, was den zum Verlust von parodontalem Gewebe (Attachment) zur Folge hat.

Eine gesteigerte Expressionsänderung von IL-8 bei t30 war nach Stimulation mit IL-4 zu verzeichnen. Auch hier könnte der anfängliche Expressionsanstieg durch das subepitheliale Kompartiment erklärt werden. Eine schnelle Expressionsteigerung bringt frühzeitige Bekämpfung in der Initialphase der Entzündung. IL-8 wirkt als chemotaktischer Faktor für neutrophile und basophile Granulozyten sowie für T-Lymphozyten und führt in diesen Zellen zur Stoffwechselaktivierung (Xie, 2001). Es erhöht die Chemotaxis für alle bekannten beweglichen Immunzellen. IL-8 stellt einen starken proinflammatorischen Mediator dar und wirkt außerdem pro-angiogen (Xie, 2001).

In vorangegangenen Studien wurde bereits bewiesen, dass IL-8 durch Viren, bakterielle Lipopolysaccharide, TNF- α , durch Concanavalin A, doppelsträngige RNA, IL-1 β , IL-7 und IL-17 induziert werden kann. In verschiedenen Experimenten mit Pulpafibroblasten konnte die gesteigerte IL-8-Konzentration nach Stimulation mit *P. intermedia* (Tokuda et al., 2002), *F. nucleatum* (Thaweboon et al., 2006), Lipopolysaccharide des Bakteriums *E. coli* (Chang et al., 2005), Substanz P, *S. mutans* (Dommisch et al., 2009) und Calcitonin Gene-Related Peptide (Patel et al., 2003) nachgewiesen werden. Die Expression von IL-8 in der Odontoblastenzellschicht nach Stimulation mit LPS des *E. coli* wurde ebenso demonstriert (Levin et al., 1999). Vergleichbar mit IL-6 konnte die mRNA-Expression von IL-8 in Odontoblasten-ähnlichen Zellen nach Stimulation mit dem antimikrobiellen Peptid hBD-2 beschrieben werden (Dommisch et al. 2007b).

Interessant, auch im Hinblick auf die Parodontitiserstehung und –etablierung, wäre für zukünftige Untersuchungen, die untersuchten Zelltypen mit unterschiedlichen Konzentrationen von IL-4 zu testen. In dieser Arbeit wurden die antimikrobiellen Peptide und proinflammatorischen Mediatoren mit IL-4 in einer Konzentration von 1ng/ml stimuliert. Die Konzentration 1ng/ml wurde gewählt, weil sie unterhalb der Grenze liegt, bei der die Proliferation von Zellen angeregt werden könnte, da die Proliferation und damit auch die Differenzierung von Zellen zu einer per se gesteigerten Genexpression von z.B. hBD-2 führen könnte (Courneya et al., 2010; Yang et al., 1996), ebenso wie die Migration, welche bei 1ng/ml unverändert bleibt (Volpert et al., 1998). Die Konzentration wurde für diese Arbeit mit 1ng/ml des Weiteren so gewählt, dass diese biologisch effektiv ist (Asano-Kato et al., 2005). Auch wäre ein weiterer Versuchsansatz, die unterschiedlichen Konzentrationen zusätzlich über einen längeren Zeitraum zu testen, um tendenzielle Änderungen in der Genexpressionsleistung verzeichnen zu können.

Aufgrund der limitierten experimentellen Ansätze sollten die in dieser Arbeit dargestellten signifikanten Veränderungen als Auffälligkeiten interpretiert werden.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass mehr Genexpressionsänderungen bei den Gingivafibroblasten im Vergleich zu den Gingivaepithelzellen zu verzeichnen waren. Lehrer postulierte bereits 2004, dass die oralen Epithelzellen einem ständigen direkten Kontakt mit einer Vielzahl von Mikroorganismen und deren Stoffwechselprodukte ausgesetzt sind, ohne dass klinische Anzeichen einer Entzündung auftreten. Eine feine Grundregulierung ohne überschießende Expressionsänderungen, finden sich hier bei den GECs bei hBD-1, CCL20, IL-1 β und IL-8 und bei den HGFs nur bei hBD-1 und IL-1 β , womit sich die These der feinen Regulierungsmechanismen ohne überschießende Genexpressionsänderung bestätigen lässt. Treten Mikroorganismen ins subepitheliale Kompartiment, so muss eine schnelle Antigenbekämpfung erfolgen.

Eine gesteigerte Expressionsleistung der antimikrobiellen Peptide und proinflammatorischen Mediatoren könnte eine Folge sein.

Die vorliegende Arbeit zeigte erstmals Änderungen der Genexpression der antimikrobiellen Peptide hBD-2 und CCL20 sowie von IL-8 unter dem Einfluss von IL-4 in GECs und HGFs. Weiterführende Studien könnten zu einem besseren Verständnis bezüglich der Rolle antiinflammatorischer Peptide im Rahmen der antiinflammatorischen Reaktion führen.

5 Zusammenfassung

Die Oberflächen der Mundhöhle sind permanent einer Vielzahl von Mikroorganismen ausgesetzt. Dennoch sind die epithelialen Gewebe in der Lage, eine gesunde Homöostase in der Mundhöhle aufrecht zu erhalten. Diese wird durch die Synthese antimikrobieller Peptide (AMPs) wie die humanen β -Defensine 1 und -2 (hBD-1 und hBD-2) sowie dem CC-Chemokin Ligand 20 (CCL20) erreicht. AMPs zeigen neben direkten antimikrobiellen Effekten gegenüber Mikroorganismen mediator-ähnliche Eigenschaften und können somit die Immunantwort beeinflussen. Interleukin-4 (IL-4) ist ein pleiotropes Molekül, welches eine Vielzahl physiologischer Effekte auf unterschiedliche Zielzellen ausübt und im Rahmen der antiinflammatorischen Immunantwort eine wichtige Rolle spielt. Ziel dieser Arbeit war es zu untersuchen, ob antimikrobielle Peptide wie hBD-1, hBD-2 und CCL20 als Teil des angeborenen Immunsystems in gingivalen Epithelzellen und Fibroblasten im Rahmen der antiinflammatorischen Immunantwort unter dem Einfluss von IL-4 reguliert werden.

Es wurden Kulturen primärer gingivaler Epithelzellen (GECs, n=3) und Fibroblasten (HGFs, n=3) von drei unterschiedlichen Donoren angezogen und mit IL-4 (1ng/ml) über einen Zeitraum von 30, 120 und 240 Minuten stimuliert. Die quantitative Genexpressionsanalyse von hBD-1, hBD-2, CCL20, Interleukin-1 β (IL-1 β), Interleukin-8 (IL-8) sowie dem Housekeeping- Gen β -Aktin erfolgte mit Hilfe der Real-Time-PCR.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigten, dass alle oben aufgeführten Gene sowohl in GECs als auch in HGFs exprimiert werden. Während die Stimulation mit IL-4 über 240 Minuten zu einer erhöhten Genexpression von hBD-2 in GECs führte, konnte in HGFs eine erniedrigte mRNA-Expression von hBD-2 festgestellt werden. Darüberhinaus konnte unter dem Einfluss von IL-4 nach 30 Minuten eine erhöhte mRNA-Expression von CCL20 und IL-8 gezeigt werden.

Die vorliegende Arbeit zeigt erstmals eine differentielle und Zelltyp-spezifische Genexpression antimikrobieller Peptide in GECs und HGFs unter dem Einfluss von IL-4. Die mögliche Rolle antimikrobieller Peptide im Rahmen antiinflammatorischer Immunprozesse sollte in weiterführenden Studien untersucht werden.

6 **Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 1: relative Genexpression von hBD-1 bei GECs	40
Abbildung 2: relative Genexpression von hBD-2 bei GECs	41
Abbildung 3: relative Genexpression von CCL20 bei GECs	42
Abbildung 4: relative Genexpression von IL-1 β bei GECs	43
Abbildung 5: relative Genexpression von IL-8 bei GECs	44
Abbildung 6: relative Genexpression von hBD-1 bei HGFs	45
Abbildung 7: relative Genexpression von hBD-2 bei HGFs	46
Abbildung: 8 relative Genexpression von CCL20 bei HGFs	47
Abbildung 9: relative Genexpression von IL-1 β bei HGFs	48
Abbildung 10: relative Genexpression von IL-8 bei HGFs	49

7 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Darstellung der PCR-Primersequenzen der bei der Standard und der Real-Time-PCR verwendeten Primer.....	32
Tabelle 2: Genexpression von hBD-1, -2, CCL20, IL-1 β und IL-8 in GECs und HGFs; +=detektiert. Die Genexpressionsprofile für hBD-1, hBD-2, CCL20, IL-1 β , IL-8 zeigen höhere Werte in GECs vs HGFs.	37
Tabelle 3: Quantitative Genexpressions-Ergebnisse von hBD-1 im 3-fach Versuch bei GECs..	63
Tabelle 4: Quantitative Genexpressions-Ergebnisse von hBD-2 im 3-fach Versuch bei GECs..	63
Tabelle 5: Quantitative Genexpressions-Ergebnisse von CCL20 im 3-fach Versuch bei GECs.	63
Tabelle 6: Quantitative Genexpressions-Ergebnisse von IL-1 β im 3-fach Versuch bei GECs....	64
Tabelle 7: Quantitative Genexpressions-Ergebnisse von IL-8 im 3-fach Versuch bei GECs.....	64
Tabelle 8: Quantitative Genexpressions-Ergebnisse von hBD-1 im 3-fach Versuch bei HGFs..	64
Tabelle 9: Quantitative Genexpressions-Ergebnisse von hBD-2 im 3-fach Versuch bei HGFs..	64
Tabelle 10: Quantitative Genexpressions-Ergebnisse von CCL20 im 3-fach Versuch bei HGFs	65
Tabelle 11: Quantitative Genexpressions-Ergebnisse von IL-1 β im 3-fach Versuch bei HGFs..	65
Tabelle 12: Quantitative Genexpressions-Ergebnisse von IL-8 im 3-fach Versuch bei HGFs....	65
Tabelle 13: Mittelwertgleichheit von hBD-1 im 3-fach Versuch bei GECs bei 95% Konfidenzintervall der Differenz	66
Tabelle 14: Mittelwertgleichheit von hBD-2 im 3-fach Versuch bei GECs bei 95% Konfidenzintervall der Differenz	66
Tabelle 15: Mittelwertgleichheit von CCL20 im 3-fach Versuch bei GECs bei 95% Konfidenzintervall der Differenz	66
Tabelle 16: Mittelwertgleichheit von IL-1 β im 3-fach Versuch bei GECs bei 95% Konfidenzintervall der Differenz	66
Tabelle 17: Mittelwertgleichheit von IL-8 im 3-fach Versuch bei GECs bei 95% Konfidenzintervall der Differenz	66
Tabelle 18: Mittelwertgleichheit von hBD-1 im 3-fach Versuch bei HGFs bei 95% Konfidenzintervall der Differenz	67
Tabelle 19: Mittelwertgleichheit von hBD-2 im 3-fach Versuch bei HGFs bei 95% Konfidenzintervall der Differenz	67

Tabelle 20: Mittelwertgleichheit von CCL20 im 3-fach Versuch bei HGFs bei 95% Konfidenzintervall der Differenz	67
Tabelle 21: Mittelwertgleichheit von IL-1 β im 3-fach Versuch bei HGFs bei 95% Konfidenzintervall der Differenz	67
Tabelle 22: Mittelwertgleichheit von IL-8 im 3-fach Versuch bei HGFs bei 95% Konfidenzintervall der Differenz	67

8 Formelverzeichnis

Formel 1: Primereffizienz	35
Formel 2: Quotient der Änderung der Genexpression (Pfaffl, 2001)	35

9 Anhang

9.1 Ergebnisse der Genexpression von hBD-1, hBD-2, CCL20, IL-1 β und IL-8 bei Gingivaepithel (GECs)- und Gingivafibroblastenzellen (HGFs)

hBD-1	Gruppe	N	Mittelwert	Standardabweichung
	Kontrolle 30	3	3.5580	1.60429
	IL-4 30	3	6.8182	2.61833
	Kontrolle 120	3	1.9819	0.86069
	IL-4 120	3	2.9075	0.88769
	Kontrolle 240	3	1.5455	0.63086
	IL-4 240	3	2.5111	1.27046

Tabelle 3: Quantitative Genexpressions-Ergebnisse von hBD-1 im 3-fach Versuch bei GECs

hBD-2	Gruppe	N	Mittelwert	Standardabweichung
	Kontrolle 30	3	1.3548	0.4660
	IL-4 30	3	2.6939	0.19484
	Kontrolle 120	3	1.3903	0.98135
	IL-4 120	3	1.1838	0.14647
	Kontrolle 240	3	15.4574	5.40570
	IL-4 240	3	29.8414	14.24160

Tabelle 4: Quantitative Genexpressions-Ergebnisse von hBD-2 im 3-fach Versuch bei GECs

CCL20	Gruppe	N	Mittelwert	Standardabweichung
	Kontrolle 30	3	2.3071	1.17052
	IL-4 30	3	3.4228	1.74196
	Kontrolle 120	3	1.7899	1.57495
	IL-4 120	3	1.7964	0.14163
	Kontrolle 240	3	2.2846	1.39727
	IL-4 240	3	3.3477	0.56604

Tabelle 5: Quantitative Genexpressions-Ergebnisse von CCL20 im 3-fach Versuch bei GECs

IL-1β	Gruppe	N	Mittelwert	Standardabweichung
	Kontrolle 30	3	1.4921	0.51884
	IL-4 30	3	5.0568	2.27778
	Kontrolle 120	3	3.1188	2.32414
	IL-4 120	3	3.5549	1.75230
	Kontrolle 240	3	1.4921	0.51884
	IL-4 240	3	5.4030	2.48722

Tabelle 6: Quantitative Genexpressions-Ergebnisse von IL-1 β im 3-fach Versuch bei GECs

IL-8	Gruppe	N	Mittelwert	Standardabweichung
	Kontrolle 30	3	1.2066	0.39193
	IL-4 30	3	6.3609	1.44367
	Kontrolle 120	3	0.8982	0.61206
	IL-4 120	3	3.2881	2.14848
	Kontrolle 240	3	1.1821	0.58853
	IL-4 240	3	10.5409	6.46688

Tabelle 7: Quantitative Genexpressions-Ergebnisse von IL-8 im 3-fach Versuch bei GECs

hBD-1	Gruppe	N	Mittelwert	Standardabweichung
	Kontrolle 30	3	1.0561	0.52203
	IL-4 30	3	0.6772	0.22523
	Kontrolle 120	3	1.4301	0.85660
	IL-4 120	3	0.5171	0.37322
	Kontrolle 240	3	0.9999	0.60356
	IL-4 240	3	1.1273	0.64634

Tabelle 8: Quantitative Genexpressions-Ergebnisse von hBD-1 im 3-fach Versuch bei HGFs

hBD-2	Gruppe	N	Mittelwert	Standardabweichung
	Kontrolle 30	3	2.4055	2.75438
	IL-4 30	3	57.4436	38.48673
	Kontrolle 120	3	6.2711	3.42662
	IL-4 120	3	1.2867	0.61911
	Kontrolle 240	3	3.7336	4.79175
	IL-4 240	3	1.2654	0.72164

Tabelle 9: Quantitative Genexpressions-Ergebnisse von hBD-2 im 3-fach Versuch bei HGFs

Tabelle 10: Quantitative Genexpressions-Ergebnisse von CCL20 im 3-fach Versuch bei HGFs

CCL20	Gruppe	N	Mittelwert	Standardabweichung
	Kontrolle 30	3	0.6651	0.39261
	IL-4 30	3	752.0682	1299.99396
	Kontrolle 120	3	0.3221	0.24731
	IL-4 120	3	46.7888	77.25898
	Kontrolle 240	3	3.7823	0.91397
	IL-4 240	3	1.9511	0.52502

Tabelle 11: Quantitative Genexpressions-Ergebnisse von IL-1 β im 3-fach Versuch bei HGFs

IL-1β	Gruppe	N	Mittelwert	Standardabweichung
	Kontrolle 30	3	1.0099	0.87599
	IL-4 30	3	0.9352	0.44313
	Kontrolle 120	3	2.5216	3.14725
	IL-4 120	3	0.5669	0.68615
	Kontrolle 240	3	4.1460	1.65026
	IL-4 240	3	2.3733	0.22168

Tabelle 12: Quantitative Genexpressions-Ergebnisse von IL-8 im 3-fach Versuch bei HGFs

IL-8	Gruppe	N	Mittelwert	Standardabweichung
	Kontrolle 30	3	1.2727	0.11760
	IL-4 30	3	3.5072	4.97725
	Kontrolle 120	3	1.5962	0.64739
	IL-4 120	3	2.2205	2.02427
	Kontrolle 240	3	0.6946	0.16128
	IL-4 240	3	0.5974	0.32057

9.2 Ergebnisse für die Mittelwertgleichheit bei GECs und HGFs für hBD-1, hBD-2, CCL20, IL1- β und IL-8

hBD-1	Gruppe	Untere	Obere
	Kontrolle 30 vs 120	-1.34233	4.49439
	Kontrolle 30 vs240	-0.75083	4.77582
	Kontrolle 120 vs 240	-1.27412	2.14706

Tabelle 13: Mittelwertgleichheit von hBD-1 im 3-fach Versuch bei GECs bei 95% Konfidenzintervall der Differenz

hBD-2	Gruppe	Untere	Obere
	Kontrolle 30 vs 120	-1.776690	1.70596
	Kontrolle 30 vs240	-22.79996	-5.40523
	Kontrolle 120 vs 240	0.98135	0.56658

Tabelle 14: Mittelwertgleichheit von hBD-2 im 3-fach Versuch bei GECs bei 95% Konfidenzintervall der Differenz

CCL20	Gruppe	Untere	Obere
	Kontrolle 30 vs 120	-2.62826	3.66277
	Kontrolle 30 vs240	-2.89939	2.94433
	Kontrolle 120 vs 240	1.57495	0.90930

Tabelle 15: Mittelwertgleichheit von CCL20 im 3-fach Versuch bei GECs bei 95% Konfidenzintervall der Differenz

IL-1β	Gruppe	Untere	Obere
	Kontrolle 30 vs 120	-5.44398	2.19054
	Kontrolle 30 vs240	-3.51735	1.07188
	Kontrolle 120 vs 240	2.32414	1.34184

Tabelle 16: Mittelwertgleichheit von IL-1 β im 3-fach Versuch bei GECs bei 95% Konfidenzintervall der Differenz

IL-8	Gruppe	Untere	Obere
	Kontrolle 30 vs 120	-0.85672	1.47334
	Kontrolle 30 vs240	-1.10899	1.15790
	Kontrolle 120 vs 240	0.61206	0.35337

Tabelle 17: Mittelwertgleichheit von IL-8 im 3-fach Versuch bei GECs bei 95% Konfidenzintervall der Differenz

hBD-1	Gruppe	Untere	Obere
	Kontrolle 30 vs 120	-1.98202	1.23397
	Kontrolle 30 vs240	-1.22296	1.33538
	Kontrolle 120 vs 240	-1.24949	2.10996

Tabelle 18: Mittelwertgleichheit von hBD-1 im 3-fach Versuch bei HGFs bei 95% Konfidenzintervall der Differenz

hBD-2	Gruppe	Untere	Obere
	Kontrolle 30 vs 120	-10.91295	3.18174
	Kontrolle 30 vs240	-10.18769	7.53158
	Kontrolle 120 vs 240	-6.90543	11.98053

Tabelle 19: Mittelwertgleichheit von hBD-2 im 3-fach Versuch bei HGFs bei 95% Konfidenzintervall der Differenz

CCL20	Gruppe	Untere	Obere
	Kontrolle 30 vs 120	-0.40086	1.08674
	Kontrolle 30 vs240	-4.71180	-1.52273
	Kontrolle 120 vs 240	-4.97796	-1.94244

Tabelle 20: Mittelwertgleichheit von CCL20 im 3-fach Versuch bei HGFs bei 95% Konfidenzintervall der Differenz

IL-1β	Gruppe	Untere	Obere
	Kontrolle 30 vs 120	-6.74854	3.72498
	Kontrolle 30 vs240	-6.13106	-0.14121
	Kontrolle 120 vs 240	-7.32081	4.07211

Tabelle 21: Mittelwertgleichheit von IL-1 β im 3-fach Versuch bei HGFs bei 95% Konfidenzintervall der Differenz

IL-8	Gruppe	Untere	Obere
	Kontrolle 30 vs 120	-1.37822	0.73125
	Kontrolle 30 vs240	0.25820	0.89812
	Kontrolle 120 vs 240	-0.16782	1.97111

Tabelle 22: Mittelwertgleichheit von IL-8 im 3-fach Versuch bei HGFs bei 95% Konfidenzintervall der Differenz

10 Literaturverzeichnis

Adell R, Eriksson B, Lekholm U, Branemark PI, Jemt T. Long-term follow-up study of osseointegrated implants in the treatment of totally edentulous jaws. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1990; 5: 347-359

Akashi K. The role of interleukin-4 in the negative regulation of leukemia cell growth, *Leuk Lymphoma* 1993; 9: 205-209

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

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

Akashi K, Shibuya T, Harada M, Takamatsu Y, Uike N, Eto T, Niho Y. Interleukin 4 suppresses the spontaneous growth of chronic myelomonocytic leukemia cells, *J Clin Invest* 1991; 88: 223-230

Ara T, Kurata K, Hirai K, Uchihashi T, Uematsu T, Imamura Y, Furusawa K, Kurihara S, Wang PL. Human gingival fibroblasts are critical in sustaining inflammation in periodontal disease. *J Periodontal Res* 2009; 44: 21-27

Armitage GC. Development of Classification System for Periodontal Disease and Conditions; *Annual of Periodontol* 1999; 4: 1-6

Asano-Kato N, Fukagawa K, Okada N, Kawakita T, Takano Y, Dogru M, Tsubota K, Fujishima H. TGF-beta1, IL-1beta and TH2 cytokines stimulate vascular endothelial growth factor production from conjunctival. *Exp Eye Res* 2005, 80: 555-560

Bain CA. Implant installation in the smoking patient. *Periodontol* 2003; 33: 185-186

Baron M, Haas R, Tepper G, Watzek G. Die experimentell induzierte Periimplantitis- Ein Literaturüberblick über unterschiedliche Behandlungsmethoden. *Clin Oral Impl Res* 2001; 12 :358-363

Behneke A, Behneke N. Komplikationen in der Belastungsphase und ihre Therapiemöglichkeiten. In: Koeck B., Wagner W. (Hrsg.): *Implantologie. Praxis der Zahnheilkunde*. München- Jena: Urban und Fischer, 2004 b: 351-356

Benninghoff A, Drenckhahn D. *Anatomie. Makroskopische Anatomie, Histologie, Embryologie, Zellbiologie*. München: Urban und Fischer, 2008: 108-109

- Bensch KW, Raida M, Mägert HJ, Schulz-Knappe P, Forssmann WG. hBD-1: A novel β -defensin from human plasma. *FEBS Lett* 1995; 386: 331-335
- Bissel J, Joly S, Johnson GK, Organ CC, Dawson D, McCray PB Jr, Guttmiller JM. Expression of β -defensins in gingival health and in periodontal disease. *J Oral Pathol Med* 2004; 33: 278-285
- Brown MA, Hural J. Functions of IL-4 and control of its expression. *Crit Rev Immunol* 1997; 17: 1-32
- Bustin SA. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol* 2000; 25: 169-193
- Bustin SA. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *J Mol Endocrinol* 2002; 29: 23-39
- Calder PC, Yaqoob P. Glutamine and the immune system. *Amino Rev Acids* 1999; 17: 227-241
- Catani L, Amabile M, Luatti S, Valdre L, Vianelli N, Martinelli G, Tura S. IL-4 downregulates nuclear factor-erythroid 2 expression in primary megakaryocytes and in megakaryoblastic cell lines. *Stem Cells* 2001; 19: 339-349
- 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
- Caux C, Ait-Yahia S, Chemin K, de Bouteiller O, Dieu-Nosjean MC, Homey B, Massacrier C, Vanbervliet B, Zlotnik A, Vicari A. Dendritic cell biology and regulation of dendritic cell trafficking by chemokines. *Sem Immunopathol* 2000; 22: 345-369
- Chang J, Zhang C, Tani-Ishii N, Shi S, Wang CY. NF-kappaB activation in human dental pulp stem cells by TNF and LPS. *J Dent Res* 2005; 84: 994-998
- Chen HJ, Paul WE. Cultured NK1.1(C)CD4(C) T cells produce large amounts of IL-4 and IFN-gamma upon activation by anti-CD3 or CD1. *J Immunol* 1997; 159: 2240-2249
- 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: 3073-3083
- Clogston CL, Boone TC, Crandall BC, Mendiaz EA, Lu HS. Disulfide structures of human interleukin-6 are similar to those of human granulocyte colony stimulating factor. *Arch Biochem Biophys* 1989; 272: 144-151
- Coffman RL, Lebman DA, Rothman P. Mechanism and regulation of immunoglobulin isotype switching. *Adv Immunol* 1993; 54: 229-270

- Coil J, Tam E, Waterfield JD. Proinflammatory cytokine profiles in pulp fibroblasts stimulated with lipopolysaccharide and methyl mercaptan. *J Endod* 2004; 30: 88-91
- Conrad DH, Keegan AD, Kalli KR, Van Dusen R, Rao M, Levine AD. Superinduction of low affinity IgE receptors on murine B lymphocytes by lipopolysaccharide and IL-4. *J Immunol* 1988; 141: 1091-1097
- Courneya JP, Luzina IG, Zeller CB, Rasmussen JF, Bocharov A, Schon LC, Atamas SP. Interleukin 4 and 13 modulate gene expression and promote proliferation aif primary human tenocytes. *Fibrogen Tissue Repair* 2010; 3: 9
- Culig Z. Cytokine disbalance in common human cancers. *Biochim Biophys Acta* 2010; 10: 5-8
- Dale BA. Periodontal epithelium. A newly recognized role in health and disease. *Periodontol* 2000; 30: 70-78
- Dale BA. Fascination with Epithelia: Architecture, Proteins and Functions. *J Dent Res* 2003; 82: 866-869
- Dale BA, Kimball JR, Krisanaprakornkit S, Roberts F, Robinovitch M, O'Neal R, Valore EV, Ganz T, Anderson GM, Weinberg A. Localized antimicrobial peptide expression in human gingiva. *J Periodontal Res* 2001; 36: 285-294
- Dale BA, Fredericks LP. Antimicrobial peptides in the oral environment: expression and function in health and disease. *J 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
- Defrance T, Aubry JP, Rousset F, Vanbervliet B, Bonnefoy JY, Arai N, Takebe Y, Yokota T, Lee F, Arai K. Human recombinant interleukin 4 induces Fc epsilon receptors (CD23) on normal human B lymphocytes, *J Exp Med* 1987; 165: 1459-1467
- Deppe H. Diagnostik und Therapie periimplantärer Entzündungen. In: Horch, H.-H.: (Hrsg): *Praxis der Zahnheilkunde*. München: Urban und Fischer, 2003 a: 274-285
- Deppe H, Horch HH, Kolk A. Microstructured dental implants and palatal mucosa grafts in cleft patients: A retrospective analysis. *J Cranio-Maxillofacial Surg* 2004 b: 32: 211-212
- Deutsche Gesellschaft für Parodontologie. *Klassifikationen der Parodontalerkrankungen*. Quintessenz, Berlin 2002
- Diamond G, Kaiser V, Rhodes J, Russel JP, Bevins CL. Transcriptional regulation of β -defensin gene expression in tracheal cells. *Infect Immunol* 2000; 68: 113-119

- Dinarello CA. Biologic basis for interleukin-1 in disease. *Blood* 1996; 87: 2095-2147
- Dinarello CA. Interleukin-1 β . *Crit Care Med* 2005; 33: 460-462.
- Dinarello CA. Blocking IL-1 in systemic inflammation. *J Exp Med* 2005; 201: 1355-1359
- Doenecke D, Koolman J, Fuchs G, Gerok W, Karlsons. *Biochemie und Pathobiochemie*. Stuttgart-New York: Thieme, 2005
- Dommisch H, Winter J, Ail Y, Dunsche A, Tiemann M, Jepsen S. Human β -defensin (hBD-1, -2) expression in dental pulp. *Oral Microbiol Immunol* 2005a; 20: 163-166
- Dommisch H, Ail Y, Dunsche A, Winter J, Jepsen S. Differential gene expression of human β -defensins (hBD-1, -2,-3) in inflammatory gingival diseases. *Oral Microbiol Immunol* 2005b; 20: 186-190
- 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* 2007b; 40: 300-307
- Dommisch H, Whasun OC, Maryam GR, Williams D, Rangarajan M, Curtis MA, Dale BA. Protease-Activated Receptor 2 Mediates Human B-Defensin 2 and CC Chemokine Ligand 20 mRNA Expression in Response to Proteases Secreted by *Porphyromonas gingivalis* 2007c; 75: 4326-4333
- Dommisch H, 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: 325-30.
- Dubucquoi S, Desreumaux P, Janin A, Klein O, Goldman M, Tavernier J, Capron A, Capron M. Interleukin 5 synthesis by eosinophils: association with granules and immunoglobulin-dependent secretion. *J Exp Med* 1994; 179: 703-8
- Dufhues G. Posttranslationale Modifikation von humanem IL-6: Charakterisierung der Kohlenhydrat-Seitenketten, ihre Lokalisation und Funktion. RWTH Aachen, Med Diss 1991, 1-4
- Dunsche A, Acil Y, Siebert R, Harder J, Schröder JM, Jepsen S. Expression profile of human defensins and antimicrobial proteins in oral tissues. *J Oral Pathol Med* 2001; 30: 154-158
- Dunsche A, Acil Y, Dommisch H, Siebert R, Schröder JM, Jepsen S. The novel human β -defensin-3 is widely expressed in oral tissues. *Eur J Oral Sci* 2002; 109: 121-124
- Eke PI, Braswell LD, Fritz ME. Microbiota associated with experimental peri-implantitis and periodontitis in adult *Macaca mulatta* monkeys. *J Periodontol* 1998; 69: 190-194

- Ericsson I. Biology and Pathology of Peri-implant Soft Tissues. In: Palacci P. (Hrsg.). Optimal Implantat Positioning & Soft Tissue Management for the Branemark System. Quintessence, Chicago, Berlin, Tokio, Sao Paulo, Moskau, Prag, Warschau 1995; 11-20
- Esposito M, Hirsch J, Lekholm U, Thomsen P. Differential diagnosis and treatment strategies for biologic complications and failing oral implants: A review of the literature. *Int J Oral Maxillofac Impl* 1999; 14: 473
- Faurschou M, Borregaard N. Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. *Microbes Infect* 2003; 5: 1317-1327.
- Fellermann K, Stange EF. Defensins-innate immunity at the epithelial frontier. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2001; 13: 771-776
- Feghali CA, Bost KL, Boulware DW, Levy LS. Human recombinant interleukin-4 induces proliferation and interleukin-6 production by cultured human skin fibroblasts, *Clin Immunol Immunopathol* 1992; 63: 182-187
- Feghali K, Tanabe S, Grenier D. Soluble CD14 induces cytokine release by human oral epithelial cells. *J Periodontal Res* 2011; 46: 147-152.
- Ferrick DA, Schrenzel MD, Mulvania T, Hsieh B, Ferlin WG, Lepper H. Differential production of interferon-gamma and interleukin-4 in response to Th1- and Th2-stimulating pathogens by gamma delta T cells in vivo. *Nature* 1995; 373: 255-257
- Fujii H, Itoh Y, Yamaguchi K, Yamauchi N, Harano Y, Nakajima T, Minami M, Okanoue T. Chemokine CCL20 enhances the growth of HuH7 cells via phosphorylation of p44/42 MAPK in vitro. *Biochem Biophys Res Communol* 2004; 322: 1052-1058
- Fujiie S, Hieshima K, Izawa D. Proinflammatory cytokines induce liver and activation-regulated chemokine/macrophage inflammatory protein-3 α /CCL20 in mucosal epithelial cells through NF-kappaB. *Int Immunol* 2001; 13: 1255-1263
- Ganz T, Weiss J. Antimicrobial peptides of phagocytes and epithelia. *Sem Hematol* 1997; 34: 343-354
- 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

Garcia JR, Krause A, Schulz S, Rodriguez-Jimenez FJ, Kluver E, Adermann K, Forssmann U, Frimpong-Boateng A, Bals R, Forssmann WG. Human β -defensin-4. a novel inducible peptide with a specific salt-sensitive spectrum of antimicrobial activity. *FASEB J* 2001; 15: 1819-1821

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 β -defensin (human β -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

Garg A. Peri-implant disease: the basics. *Dent Implantol* 2010; 21: 81-3

Gasparoni A, Squier CA, Fonzi L. Intercellular junctions in oral epithelial cells: ultrastructural and immunological aspects. *Ital J Anat Embryol* 2005;110: 83-91.

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

Gibson U E, Heid CA, Williams PM. A novel method for real time quantitative PCR. *Genome Research* 1996; 6: 995-1000

Gross V, Andus T, Castell J, Vom Berg D, Heinrich PC, Gerok W. O- and Nglycosylation lead to different molecular mass forms of human monocyte interleukin-6. *FEBS Lett* 1989; 247: 323-326

Grusby MJ, Nabavi N, Wong H, Dick RF, Bluestone JA, Schotz MC, Glimcher LH. Cloning of an interleukin-4 inducible gene from cytotoxic T-lymphocytes and its identification as a lipase, *Cell* 1990; 60: 451-459

Hansbro PM, Kaiko GE, Foster PS. Cytokine/anti-cytokine therapy - novel treatments for asthma? *Br J Pharmacol* 2011; 10: 14-15

Harder J, Bartels J, Christophers E, Schröder JM. A peptide antibiotic from human skin. *Nature* 1997; 387: 861

Harder J, Meyer-Hoffert U, Teran LM, Bartels J, Schwichtenberg L, Maune S, Schröder JM. *Mucosid pseudomonas aeruginosa*, TNF- α and IL-1 β , but not IL-6 induce human β -defensin-3 in respiratory epithelia. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2000; 22: 714-721

Harder J, Bartels J, Christophers E, Schröder JM. Isolation and Characterization of Human β -Defensin-3, a novel human inducible peptide antibiotic. *J Biol Chem* 2001, 276: 5570-5713

Harder J, Wehkamp J, Wehkamp K, Wehkamp-von Meissner B, Schlee M, Enders C, Sonnenborn U, Nuding S, Bendmark S, Fellermann K, Schroeder Jm, Stange EF. NF-kappaB-and AP-

- 1mediated induction of human β defensin-2 intestinal epithelial cells by *Escherichia coli* Nissle 1917: a novel effect of probiotic bacterium. *Infect Immunol* 2004; 72: 5750-5758
- Hatakeyama S, Yaegashi T, Oikawa Y, Fujiwara H, Mikami T, Takeda Y, Satoh M. Expression pattern of adhesion molecules in junctional epithelium differs from that in other gingival epithelia. *J Periodontal Res* 2006; 41: 322-328
- Heasman P. Peri-implant diseases. *Dent Update* 2010; 37: 511-512, 514-516
- Heinrich PC, Castell JV, Andus T. Interleukin-6 and the acute phase response. *Biochem J* 1990; 265: 621-636
- Heitz-Mayfield LJ. Peri-implant diseases: diagnosis and risk indicators. *Journal of clinical periodontology* 2008; 35: 292-304
- Heldin CH. Dimerization of cell surface receptors in signal transduction. *Annu Rev Cell Biol* 1995; 10:251-337
- Hershey GK, Friedrich M.F, Esswein LA, Thomas ML, Chatila TA. The association of atopy with a gain-of-function mutation in the alpha subunit of the interleukin-4 receptor, *N Engl J Med* 1997; 337: 1720-1725
- Hieshima K, Imai T, Opdenakker G, Van Damme J, Kusuda J, Tei H, Sakaki Y, Takatsuki K, Miura R, Yoshie O, Nomiya H. Molecular cloning of a novel human CC chemokine liver and activation-regulated chemokine (LARC) expressed in liver. Chemotactic activity for lymphocytes and gene localization on chromosome 2. *J Biol Chem* 1997; 272: 5846-5853
- 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, Selsted ME, Eisenberg D. Crystal structure of Defensin HNP-3, an amphiphilic dimer: mechanisms of membrane permeabilization. *Science* 1991; 251: 1481-1486
- Hoover DM, Rajashankar KR, Blumenthal R, Puri A, Oppenheim JJ, Chertov O, Lubkowski J. The structure of human beta-defensin-2 shows evidence of higher order. *J Biol Chem* 2000; 275: 32977-32918
- Hromas R, Gray PW, Chantry D, Godiska R, Krathwohl M, Fife K, Bell GI, Takeda J, Aronica S, Gordon M, Cooper S, Broxmeyer HE, Klemsz MJ. Cloning and characterization of exodus, a novel β -chemokine. *Blood* 1997; 89: 3315-3322
- Horn F, Lindenmeier G. *Biochemie des Menschen*. Stuttgart-New York: Thieme, 2002: 408-412

- Hultin M, Gustafsson A, Hallstrom H, Johansson LA, Ekfeldt A, Klinge B. Microbiological findings and host response in patients with periimplantitis. *Clin Oral Impl Res* 2002; 13: 349-358
- Hornef MW, Wick MJ, Rhen M, Normark S. Bacterial strategies for overcoming host innate and adaptive immune responses. *Nat Immunol* 2002; 3: 1033–1040
- Ibelgaufts H. Horst Ibelgaufts Cope. cytokines online pathfinder encyclopaedia. 2002, 2008; 0.014
- Into T, Inomata M, Shibata K, Murakami Y. Effect of the antimicrobial peptide LL-37 on Toll-like receptors 2-, 3- and 4-triggered expression of IL-6, IL-8 and CXCL10 in human gingival fibroblasts. *Cell Immunol* 2010; 264: 104-109
- Islam D, Bandholtz L, Nilsson J, Wigzell H, Christensson B, Agerberth B, Gudmundsson GH. Downregulation of bacterial peptides in enteric infections: a novel immune escape mechanism, with bacterial DNA as a potential regulator. *Nat Med* 2001; 7: 180-185
- Iwasaki A, Kelsall BL. Localization of distinct Peyer's patch dendritic cell subsets and their recruitment by chemokines macrophage inflammatory protein (MIP)-3 α , MIP-3 β , and secondary lymphoid organ chemokine. *J Exp Med* 2000; 191:1381-1394
- Izadpanah A, Dwinell MB, Eckmann L, Varki NM, Kagnoff MF. Regulated MIP-3 α /CCL20 production by human intestinal epithelium: mechanism for modulating mucosal immunity. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001; 280: 710-719
- Janeway CA Jr. Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. *Cold Spring Harb. Symp Quant Biol* 1989; 54: 1-13
- Janeway CA, Travers P. Die angeborene Immunität. Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg 2002, 12: 37-96
- Janeway CA Jr, Medzhitov R. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* 2002; 20: 197-216
- Jansen JH, Fibbe WE, Wientjens GJ, Willemze R, Kluin-Nelemans JC. Inhibitory effect of interleukin-4 on the proliferation of acute myeloid leukemia cells with myelo-monocytic differentiation (AML-M4/M5); the role of interleukin-6. *Leukemia* 1993; 7: 643-644
- Jayaram B, Devos R, Guisez Y, Fiers, W. Purification of human interleukin-4 produced in *Escherichia coli*. *Gene* 1989; 79: 345-354
- Jenkins K, Javadi M, Borghaei RC. Interleukin-4 suppresses IL-1 induced expression of matrix metalloproteinase-3 in human gingival fibroblasts. *J Periodontol* 2004; 75: 283-291

- Jones SA. Directing Transition from Innate to Acquired Immunity: Defining a Role for IL-6. *J Immunol* 2005; 175: 3463-3468
- Junqueira LC, Carneiro J. *Histologie*. Berlin Heidelberg. Springer Verlag 2005: 368-394
- Kamel M, Sugiyama E, Shinoda K, Hounoki H, Taki H, Maruyama M, Miyahama T, Kobayashi M. IL-4 inhibits RANKL- induced expression of NFATc1 and c-Fos: a possible mechanism for downregulation of osteoclastogenesis. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 329: 839-845
- 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
- Keegan AD. IL-4. *Cytokine Reference*. Acad Press 2000a; 9: 127-135
- Keller W, Brägger U, Mombelli A. Peri-implant microflora of implants with cemented and screw retained suprastructures. *Clin Oral Impl Res* 1998; 9: 209-217
- Khoo JJ, Forster S, Mansell A. Toll-like receptors as interferon-regulated genes and their role in disease. *J Interferon Cytokine Res* 2011 ;31: 13-25
- Kishimoto T. The biology of interleukin-6. *Blood* 1989; 74: 1-10
- Kishimoto T, Taga T, Akira S. Cytokine signal transduction. *Cell* 1994; 76: 253-262
- König KG. *Karies und Parodontopathien*. Stuttgart: Thieme, 2002: 2-11
- Koolman J, Röhm KL. *Taschenatlas der Biochemie*. Stuttgart- New York: Thieme, 2002: 392-393
- Kondo M, Takeshita T, Ishii N, Nakamura M, Watanabe S, Arai K, Sugamura K. Sharing of the interleukin-2 (IL-2) receptor gamma chain between receptors for IL-2 and IL-4. *Science* 1993; 262: 1874-1877
- 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
- Krisanaprakornkit S, Kimball JR, Weinberg A, Darveau RP, Bainbridge BW, Dale BA. Inducible expression of human β -defensin 2 by *Fusobacterium nucleatum* in oral epithelial cells: multiple signaling pathways and role of commensal bacteria in innate immunity and the epithelial barrier. *Infect Immunol* 2000; 68: 2907-2915
- Kühnel W. *Taschenatlas der Zytologie, Histologie und mikroskopischen Anatomie*. Stuttgart-New York: Thieme, 2002: 288-290

- Kuhn R, Rajewsky K, Muller W. Generation and analysis of interleukin-4 deficient mice. *Science*. 1991; 254: 707-710
- Kumar H, Kawai T, Akira S. Pathogen recognition by the innate immune system. *Int Rev Immunol* 2011; 30: 16-34
- Kwon JH, Keates S, Bassani L, Mayer LF, Keates AC. Colonic epithelial cells are a major site of macrophage inflammatory protein 3alpha (MIP-3alpha) production in normal colon and inflammatory bowel disease. *Gut* 2002; 51: 818-826
- Lang NP, Brägger U, Walther D, Beamer B, Kornman KS. Ligatureinduced peri-implant infection in cynomolgus monkeys. Clinical and radiographic findings. *Clin Oral Impl* 1993; 4: 2-11
- Lang NP. Parodontalerkrankungen – Klassifikation und Charakterisierung. *Quintessenz Bibliothek* 2003: 20-124
- Lang NP, Schätzle MA, Loe H. Gingivitis as a risk factor in periodontal disease. *J Clin Periodontol* 2009; 36: 3-8
- Laurence A, O’Shea JJ. T(H)-17 differentiation: of mice and men. *Nat Immunol* 2007; 8: 903-905
- Lautenbach E. Wörterbuch Zahnmedizin. Hanau. Verlag für Zahnmedizin 1992, 1801-1823
- Lehrer RI. Primate defensins. *Nat Rev Microbiol* 2004; 2: 727-738
- Lekholm U, Adell R, Lindhe J, Branemark PI, Eriksson B, Rockler B, Lindvall AM, Yoneyama T. Marginal tissue reactions at osseointegrated titanium fixtures. (II) A cross-sectional retrospective study. *Int J Oral Maxillofac Surg* 1986; 15: 53-61
- Letzelter F, Wang Y, Sebald W. The interleukin-4 site-2 epitope determining binding of the common receptor gamma chain. *Eur J Biochem* 1998; 257: 11-20
- Levin LG, Rudd A, Bletsas A, Reisner H. Expression of IL-8 by cells of the odontoblast layer in vitro. *Eur J Oral Sci* 1999; 107: 131-137
- Lin SK, Kuo MY, Wang JS, Lee JJ, Wang CC, Huang S, Shun CT, Hong CY. Differential regulation of interleukin-6 and inducible cyclooxygenase gene expression by cytokines through prostaglandin-dependent and -independent mechanisms in human dental pulp fibroblasts. *J Endod* 2002; 28: 197-201
- Lindhe J, Zitzmann NU, Berglundh T. Inflammatory lesions in the gingiva following resective/non-resective periodontal therapy. *J Clin Periodontol* 2005; 32: 139-146

- Löffler G, Petrides PE, Heinrich PC. Biochemie und Pathobiochemie. Heidelberg. Springer Medizin 2007: 779-782
- Loe H, Theilade E, Jensen SB. Experimental gingivitis in man. J Periodontol 1965, 36: 177-187
- Lovegrove JM. Dental plaque revisited: bacteria associated with periodontal disease. J N Z Soc Periodontol 2004; 87: 7-21
- MacDougall M, Simmons D, Luan X, Nydegger J, Feng J, Gu T T. Dentin phosphoprotein and dentin sialoprotein are cleavage products expressed from a single transcript coded by a gene on human chromosome 4. J Biol Chem 1997; 272: 835-842
- Maggi E, Parronchi P, Manetti R., Simonelli C, Piccinni MP, Ruggi FS, De Carli M, Ricci M, Romagnani S. Reciprocal regulatory effects of IFN-gamma and IL-4 on the in vitro development of human Th1 and Th2 clones, J Immunol 1992; 148: 2142-1747
- 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 β -defensin 3 in biological fluids. Antimicrob Agents Chemother 2005; 49: 1245-1248
- 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
- Medzhitov R. Recognition of microorganisms and activation of the immune response. Nature 2007; 449: 819-826
- Medzhitov R. Toll-like receptors and innate immunity. Nat Rev Immunol 2001; 1: 135-145
- Meyer Je, Harder J, Gorogh T, Weise JB, Schubert S, Jannssen D, Maune S. Human β -defensin-2 in oral cancer with opportunistic Candida infection. Anticancer Res 2004; 24: 1025-1030
- 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, β -defensins and CAP18, expressed by human keratinocytes. Infect Immunol 2003; 71: 3730-3739
- Miloux B, Laurent P, Bonnin O, Lupker J, Caput D, Vita N, Ferrara P. Cloning of the human IL-13R alpha1 chain and reconstitution with the IL4R alpha of a functional IL-4/IL-13 receptor complex. FEBS Lett 1997; 401: 163-166

- Miller AM, McInnes IB. Cytokines as Therapeutic Targets to Reduce Cardiovascular Risk in Chronic Inflammation. *Curr Pharm Des* 2011; 11 :16-19
- Miossec P, Chomarat P, Dechanet J, Moreau F, Roux P, Delmas P, Bancherau J. IL-4 inhibits bone resorption through an effect on osteoclasts and proinflammatory cytokines in an ex vivo model of bone resorption in Rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1994; 37: 1715-1722
- Mitchell D, Yong M, Raju J, Willemsen N, Black M, Trent A, Tirrell M, Olive C. Toll-like receptor-mediated adjuvant activity and immunomodulation in dendritic cells: Implications for peptide vaccines. *Hum Vaccin* 2011 ;1: 7-8
- Mitsuyasu H, Izuhara K, Mao XQ, Gao PS, Arinobu Y, Enomoto T, Kawai M, Sasaki S, Dake Y, Hamasaki N, Shirakawa T, Hopkin JM. Ile50Val variant of IL4R alpha upregulates IgE synthesis and associates with atopic asthma. *Nat Genet* 1998; 19: 119-120
- Mombelli A, Mericske-Stern R. Microbiological features of stable osseointegrated implants used as abutments for overdentures. *Clin Oral Impl* 1990; 1: 1-7
- Mombelli A, van Oosten MA, Schurch E, Land NP. The microbiota associated with successful or failing implants. *Oral Microbiol Immunol* 1987; 2: 145-151
- Moore WE, Moore LV. The bacteria of periodontal disease 1994; *Periodontol* 2000; 5: 66-77
- Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol* 1996; 7: 2348-2357
- Mosmann TR, Sad S. The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. *J Immunol* 1996; 17: 138-146
- Nanci A, Schroeder HE. The junctional epithelium: origin, structure and significance. *Acta Med Dent Helv* 1996; 1: 155-167
- Narayanan K, Gajjaraman S, Ramachandran A, Hao J, George A. Dentin matrix protein 1 regulates dentin sialophosphoprotein gene transcription during early odontoblast differentiation. *J Biol Chem* 2006; 281: 19064-19071
- Nicolas P, Moor A. Peptides as weapons against microorganisms in the chemical defense system of vertebrates. *Annu Rev Microbiol* 1995; 49: 277-304
- Nishimura M, Abiko Y, Kusano K, Yamazaki M, Saitoh M, Mizoguchi I, Jinbu Y, Nogushi T, Kaku T. *Med Electron Microsc* 2003; 36: 94-97

- Niyonsaba F, Ogawa H, Nagaoka I. Human β -defensin-2 functions as a chemotactic agent for tumor necrosis factor alpha-treated human neutrophils. *Immunol* 2004; 111: 273-281
- Niyonsaba F, Ushio H, Nakano N, Ng W, 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
- Noelle R, Krammer PH, Ohara J, Uhr JW, Vitetta ES. Increased expression of Ia antigens on resting B cells: an additional role for B-cell growth factor, *Proc Natl Acad Sci USA* 1984; 81: 6149-6153
- Obiri NI, Debinski W, Leonard WJ, Puri RK. Receptor for interleukin 13. Interaction with interleukin 4 by a mechanism that does not involve the common gamma chain shared by receptors for interleukins 2, 4, 7, 9, and 15. *J Biol Chem* 1995; 270: 8797-804
- Obiri NI, Leland P, Murata T, Debinski W, Puri RK. The IL-13 receptor structure differs on various cell types and may share more than one component with IL-4 receptor. *J Immunol* 1997; 158: 756-64
- Okabe M, Kunieda Y, Sugiwura T, Tanaka M, Miyagishima T, Saiki I, Minagawa T, Kurosawa M, Itaya T, Miyazaki T. Inhibitory effect of interleukin-4 on the in vitro growth of Ph1-positive acute lymphoblastic leukemia cells, *Blood* 1991; 6: 1574-1580
- Paul WE. Interleukin-4: a prototypic immunoregulatory lymphokine. *Blood* 1991; 77: 1859-1870
- Paul WE, Seder RA. Lymphocyte responses and cytokines. *Cell* 1994; 76: 241-51
- Page RC, Schroeder HC. Pathogenesis of inflammatory periodontal disease. A summary of current work. *Lab Invest* 1976; 33: 235-249
- Parrissh-Novak J, Dillon SR, Nelson A, Hammomd A, Sprecher C, Gross JA, Johnston J, Madden K. IL-21 and its rezeptor are involved in NK cell expansion and regulation of lymphocyte function. *Nature* 2000; 408: 57-63
- Patel T, Park SH, Lin LM, Chiappelli F, Huang GT. Substance P induces interleukin-8 secretion from human dental pulp cells. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2003; 96: 478-485
- Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucl Acids Res* 2001; 29: 2002-2007

- Powers R, Garrett DS, March CJ, Frieden EA, Gronenborn AM, Clore GM. Three-dimensional solution structure of human interleukin-4 by multidimensional heteronuclear magnetic resonance spectroscopy 1992; 256: 1673-1677
- Presland RB, Jurevic RJ. Making sense of the epithelial barrier: what molecular biology and genetics tell us about the functions of oral mucosal and epidermal tissues. Dent Educ 2002; 66: 564-574
- Quirynen M, Listgarten MA. The distribution of bacterial morphotypes around natural teeth and titanium implants ad modum Branemark. Clin Oral Impl 1990; 1: 8-12
- Rateitschak KH, Rateitschak EM, Wolf HF. Farbatlas der Zahnmedizin 1: Parodontologie. Stuttgart: Thieme, 2004: 25-32
- Ratka-Krüger P, Horodko M, Mayer M. Ätiologie, Diagnostik, Therapie und Prävention der Periimplantitis. ZM 2001: 2764-2765
- Renvert S, Lindhe J, Meyle J; Group D of European Workshop on Periodontology. Peri-implant diseases: Consensus Report of the Sixth European Workshop on Periodontology. J Clin Periodontol 2008; 35: 282-285
- Rivest S. How the Blood Talks to the Brain Parenchyma and the Paraventricular Nucleus of the Hypothalamus During Systemic Inflammatory and Infectious Stimuli. Proc Soc Exp Biol Med 2000; 223: 22-38
- Roitt IM. Leitfaden der Immunologie-4. Blackwell- Wiss- Verlag Berlin 1993: 259-312
- Romagnani, S. Lymphokine production by human T cells in disease states, Annu Rev Immunol 1994; 12: 227-257
- Romagnani S. T-cell subsets (Th1 versus Th2). J Immunol 2000; 85: 9-18
- Romagnani S. Regulation of the T cell response. Clin Exp Allerg 2006; 36: 1357-1366
- Raman D, Sobolik-Delmaire T, Richmond A. Chemokines in health and disease. Exp Cell Res 2011; 14:124-132
- Rousset F, Malefijt RW, Slierendreg B, Aubry JP, Bonnefoy JY, Defrance T, Banchereau J, de Vries J E. Regulation of Fc receptor for IgE (CD23) and class II MHC antigen expression on Burkitt's lymphoma cell lines by human IL-4 and IFN-gamma, J Immunol 1988; 140: 2625-2632
- Russell SM, Keegan AD, Harada N, Nakamura Y, Noguchi M, Leland P, Friedmann MC, Miyajima A, Puri RK, Paul WE. Interleukin-2 receptor gamma chain: a functional component of the interleukin-4 receptor. Science 1993; 262: 1880-1883

- Sawasaki K, Mizukawa N, Yamaai T, Fukunaga J, Sugihara T. Immunohistochemical study on expression of alpha-defensin and β -defensin-2 in human buccal epithelia with candidiasis. *Oral Dis* 2002; 8: 37-41
- Scheerens H, Hessel E, de Waal-Malefyt R, Leach MW, Rennick D. Characterization of chemokines and chemokine receptors in two murine models of inflammatory bowel disease: IL-10^{-/-} mice and Rag-2^{-/-} mice reconstituted with CD4⁺CD45RB^{high} T cells. *Eur J Immunol* 2001; 31: 1465-1474
- Schmidt RF, Lang F, Thews G. *Physiologie des Menschen*. Berlin Heidelberg New York. Springer Verlag 2000: 541-542
- Schooltink H, Rose-John S. *Zytokinnetzwerk*. Berlin Heidelberg. Springer Verlag 2003, 188-196
- Schroeder HE. *Pathologie oraler Strukturen. Zähne, Pulpa, Parodont*. Karger Basel 1996, 349-369
- Schröder J-M. Antimikrobielle Peptide - Antibiotika der Zukunft? *Med Monatsschr Pharm* 1999a; 22: 270-276
- Schröder J-M. 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
- Schulz A, Klüver E, Schulz-Maronde S, Adermann K. Engineering disulfide bonds of the novel human β -defensins hBD-27 and hBD-28. Differences in disulfide formation and biological activity among human β -defensins. *Pept Sci* 2005; 80: 34-49
- Schuttyser E, Struyf S, Van Damme J. The CC chemokine CCL20 and its receptor CCR6. *Cytokine Growth Factor Rev* 2003;14: 409–426
- Sahasrabudhe KS, Kimball JR, Morton TH, Weinberg A, Dale BA. Expression of the antimicrobial peptide, human β -defensin 1, in duct cells of minor salivary glands and detection in saliva. *J Dent Res* 2000; 79: 1669-1674
- Seder RA, Boulay JL, Finkelman F, Barbier S, Ben-Sasson SZ, Le Gros G, Paul WE. CD8⁺ T cells can be primed in vitro to produce IL-4, *J Immunol* 1992; 148: 1652-1656
- Sell S. *Immunology, Immunopathology and Immunity*. Washington 2001: 77-80
- Scott P. IFN-gamma modulates the early development of Th1 and Th2 responses in a murine model of cutaneous leishmaniasis, *J Immunol* 1991; 147: 3149-3155

- Shields JG, Armitage RJ, Jamieson BN, Beverley PC, Callard RE. Increased expression of surface IgM but not IgD or IgG on human B cells in response to IL-4. *Immunol* 1989; 66: 224-227
- Silbernagel S, Despopoulos A. *Taschenatlas der Physiologie*. Stuttgart-New York: Thieme, 2000: 98-99
- Smith WL, Song I. The enzymology of prostaglandin endoperoxide H synthases-1 and -2. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 2002; 69: 115-128
- Smith LJ, Redfield C, Boyd J, Lawrence GM, Edwards RG, Smith RA, Dobson CM. Human interleukin-4. The solution structure of a four-helix bundle protein. *J Mol Biol* 1992; 224: 899-904
- Snapper CM, Finkelman FD, Paul WE. Regulation of IgG1 and IgE production by interleukin 4. *Immunol Rev* 1988; 102: 51-75
- Sørensen OE, Thapa DR, Rosenthal A, Liu L, Roberts AA, Ganz T. Differential regulation of β -defensin expression in human skin by microbial stimuli. *J Immunol* 2005; 174: 4870-4879
- Song Z, Casolaro V, Chen R, Georas SN, Monos D, Ono SJ. Polymorphic nucleotides within the human IL-4 promoter that mediate overexpression of the gene, *J Immunol* 1996; 156: 424-429
- Sordyl CM, Simons AM, Molinari JA. The microbial flora associated with stable endosseous implants. *J Oral Implantol* 1995; 21: 19-22
- Souza AW, Mesquita Júnior D, Araújo JA, Catelan TT, Cruvinel WD, Andrade LE, Silva NP. Immune system: part III. The delicate balance of the immune system between tolerance and autoimmunity. *Rev Bras Reumatol* 2010; 50: 665-679.
- Spiekermann H. *Implantologie*. In: Rateitschak, K.H. (Hrsg.): *Farbatlanten der Zahnmedizin*. Stuttgart: Thieme, 1994: 125-283
- Stewart D, Javadi M, Chambers M, Gunsolly C, Gorski G, Borghaei RC. Interleukin-4 inhibition of IL-1-induced expression of MMP-3 is independent of lipoxygenase and PPAR gamma activation in human gingival fibroblasts. *BMC Mol Biol* 2007; 8: 12-14
- Strub JR, Türp JC, Witkowski S, Hürzeler MB, Kern M. Ursachen und Therapie der periimplantären Destruktion. In: Strub, J.R., Türp, J.C., Witkowski, S., Hürzeler, M.B., Kern, M. *Prothetik. Quintessenz*, Berlin 1994: 1153-1154
- Tanaka Y, Imai T, Baba M, Ishikawa I, Uehira M, Nomiya H, Yoshie O. Selective expression of liver and activation-regulated chemokine (LARC) in intestinal epithelium in mice and humans. *Eur J Immunol* 1999; 29: 633-642

- Tanida T, Okamoto T, Okamoto A, Wang h, Hamada T, Ueta E, Osaki T. Decreased excretion of antimicrobial proteins and peptides in saliva of patients with oral candidiasis. *J Oral Pathol Med* 2003; 32: 586-594
- Takahashi A, Wada A, Ogushi K, Maeda K, Kawahara T, Mawatari K, Kurazono H, Moss J, Hirayama T, Nakaya Y. Production of β -defensin-2 by human clonic epithelial cells induced by *Salmonella enteridis* flagella filament structural protein. *FEBS Lett* 2001; 508: 484-488
- Takeda K, Kaisho T, Akira S. Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol* 2003; 21: 335- 376
- Thaweboon B, Thaweboon S, Choonharuangdej S, Suppakpatana P. Effects of sonicated *Prevotella intermedia*, *Fusobacterium nucleatum* and *Lactobacillus casei* extracts on interleukin-8 production by human dental pulp cells. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2006; 37: 523-527
- Thellin O, Zorzi W, Lakaye B, De Borman B, Coumans B, Hennen G, Grisar T, Igout A, Heinen E. Housekeeping genes as internal standards: use and limits. *J Biotechnol* 1999; 75: 291-295
- Theoharides TC, Alysandratos KD, Angelidou A, Delivanis DA, Sismanopoulos N, Zhang B, Asadi S, Vasiadi M, Weng Z, Miniati A, Kalogeromitros D. Mast cells and inflammation. *Biochim Biophys Acta* 2010; 10: 45-59
- Tony HP, Shen BJ, Reusch P, Sebald W. Design of human interleukin-4 antagonists inhibiting interleukin-4-dependent and interleukin-13-dependent responses in T-cells and B-cells with high efficiency. *Eur J Biochem* 1994; 225: 659-665
- Tokuda M, Nagaoka S, Torii M. Interleukin-10 inhibits expression of interleukin-6 and -8 mRNA in human dental pulp cell cultures via nuclear factor-kappaB deactivation. *J Endod* 2002; 28: 177-180
- Ulfing N. *Kurzlehrbuch Histologie*. Stuttgart: Thieme, 2003: 39-45
- 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: 7-8
- Van Furth R. Mononuclear phagocytes. *Biology of monocytes and macrophages*. Kluwer Academic Publishers 1992, 12: 351-357
- Van Snick J, Nordan RP. Interleukin-6. In: Habenicht A. ed. *Growth factors, differentiation factors and cytokines*. Springer Verlag Berlin 1990: 163-176

- Veerayutthwilai O, Byers M R, Pham T-TT, Darveau RP, Dale BA. Differential regulation of immune responses by odontoblasts. *Oral Microbiol Immunol* 2007; 22: 5-13
- Verardi S, Quaranta M, Bordin S. Peri-implantitis fibroblasts respond to host immune factor C1q. *J Periodontal Res* 2011; 46: 134-40
- Volpert OV, Fong T, Koch AE, Peterson JD, waltenbaugh C, Tepper RI, Bouck NP. Inhibition of angiogenesis by interleukin 4. *J Exp Med* 1998; 188: 1039-1046
- Wada N, Menicanin D, Shi S, Bartold PM, Gronthos S. Immunomodulatory properties of human periodontal ligament stem cells. *J Cell Physiol* 2009; 219: 667-76
- Wilkie BN, Mallard B. Selection for high immune responses. An alternative approach to animal health maintenance? *Vet Immunol Immunopathol* 1999; 72: 231-235
- Wu L, Feng Z, Wu Y, Lin Y, Nie X, Jing W, Qiao W, Liu L, Tang W, Zheng X, Tian W. Dentin Sialophosphoprotein-promoted mineralization and expression of odontogenetic genes in adipose-derived stromal cells. *Cell Tissues Organs* 2008; 187: 103-112
- Xie K. Interleukin-8 and human cancer biology. *Cytokine Growth Factor Rev* 2001; 12: 375–391
- Yamakoshi Y, Hu JC-C, Iwata T, Kobayashi K, Fukae M, Simmer JP. DSPP is processed by MMP-2 and MMP-20 in vitro and in vivo. *J Biol Chem* 2006; 281: 38235-38242
- Yanagisawa K, Hatta N, Watanabe I, Horiuchi T, Hasegawa H, Fujita S. IL-4 stimulates the growth of chronic myelomonocytic leukemia cells (CMMoL) once leukemic transformation has occurred. *Rev* 1995; 9: 1056-1059
- Yang D, Chertov O, Bykovskaia SN, Chen Q, Buffo M, Shogan J, Anderson M, Schröder JM, Wang JM, Howard OM, Oppenheim JJ. Beta-defensins. linking innate and adaptive immunity through dendritic and T cell CCR6. *Science* 1999; 286: 525-528
- Yang D, Chen Q, Chertov O, Oppenheim JJ. Human neutrophil defensins selectively chemoattract native T and immature dendritic cells. *J Leukoc Biol* 2000; 68: 9-14
- Yang LC, Tsai CH, Huang FM, Liu CM, Lai CC, Chang YC. Induction of interleukin-6 gene expression by pro-inflammatory cytokines and black-pigmented *Bacteroides* in human pulp cell cultures. *Int Endod* 2003; 36: 352-357
- Yang Y, Yoo HM, Choi I, Pyun KH, Byun SM, Ha H. Interleukin-4-induced proliferation in normal human keratinocytes is associated with c-myc gene expression and inhibited by genistein. *J Invest Dermatol* 1996; 107: 367-372

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

Yin L, Chung WO. Epigenetic regulation of human β -defensin 2 and CC chemokine ligand 20 expression in gingival epithelial cells in response to oral bacteria. *Mucosal Immunol* 2011;19: 148-153

Yoshimoto T, Paul WE. CD4pos, NK1.1pos T cells promptly produce interleukin-4 in response to in vivo challenge with anti-CD3. *J Exp Med* 1994; 179: 1285-1295

Yoon HS. Neonatal innate immunity and Toll-like receptor. *Korean J Pediatr* 2010; 53: 985-988

11 Danksagung

Herrn Priv.-Doz. Dr. H. Dommisch, meinem Doktorvater, Oberarzt und wissenschaftlichen Mitarbeiter der Poliklinik für Parodontologie, Zahnerhaltung und Präventive Zahnheilkunde des Zentrums für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn möchte ich danken für die Bereitstellung des Themas meiner Arbeit, für die Bereitstellung der finanziellen Mittel zur Durchführung aller Versuchsreihen, für die Auswertung der Realtime-PCR und die korrektive Unterstützung bei der Fertigstellung meiner Arbeit.

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, gilt mein Dank für die Bereitstellung der finanziellen Mittel zur Durchführung aller Versuchsreihen.

Herrn Dr. J. Winter, Diplombiologe und Leiter des zell- und molekularbiologischen Labors 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 Anleitung und Unterstützung bei der Durchführung der zell- und mikrobiologischen Experimente.

Frau Jutta Eich, medizinisch technische Assistentin (MTA) der Universität Bonn, und Frau Diana Lalaoui, MTA der Universität Bonn, danke ich für die Hilfe bei der praktischen Durchführung der zell- und molekularbiologischen Experimente.

Meiner Familie gilt an dieser Stelle ein ganz besonderer Dank für die Kraft und Unterstützung, die Geduld und den Rückhalt während der gesamten Zeit meines Studiums und meiner Dissertation.