

Expression und funktionelle Bedeutung des Glycin-Rezeptors in
humanen gingivalen Keratinozyten. Mögliche Implikationen für eine
therapeutische Anwendung von Glycin im Rahmen der
Parodontitistherapie

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

Teresa Kristin Schaumann
aus Bonn

2012

Angefertigt mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. A. Jäger
2. Gutachter: PD Dr. H. Dommisch

Tag der Mündlichen Prüfung: 12.10.2012

Aus der Poliklinik für Kieferorthopädie des Zentrums für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde
des Universitätsklinikums Bonn

Direktor: Prof. Dr. A. Jäger

Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	8
1. Einleitung	11
1.1 Einführung	11
1.2 Untersuchte humane gingivale Keratinozyten	12
1.3 Gingivitis/Parodontitis	14
1.4 Zelluläre Signalwege	15
1.4.1 Calcium-Signalweg	15
1.4.2 Interleukin-1 β -Signalweg	17
1.4.3 Interleukin-1 und Calcium	19
1.4.4 NF κ B-Aktivierung	21
1.5 Glycin	22
1.5.1 Die Aminosäure Glycin	22
1.5.2 Glycinrezeptor	23
1.5.3 Glycin-Signalweg	26
1.6 Untersuchte Mediatoren der Immunantwort	28
1.7 Fragestellung und Ziel der Arbeit	32
2. Material	34
2.1 Gewebe	34
2.2 Chemikalien, Reagenzien und Medien	34
2.3 Verbrauchsmaterialien	36
2.4 Antikörper	36
2.5 Geräte	37
2.6 Software	38
3. Methoden	39
3.1 Versuchsaufbau	39
3.2 Zellkulturmethoden	39
3.2.1 Probengewinnung und Anlegen der Primärkultur von humanen gingivalen Keratinozyten	39
3.2.2 Herstellung der Nährmedien	40
3.2.3 Mediumwechsel	41
3.2.4 Subkultivierung der Zellen	42
3.2.5 Kryokonservierung der Zellen	42

3.2.6 Zellaussaat	43
3.3 Etablierung der Versuchsbedingungen	43
3.4 Stimulation von Gingivaepithelzellen mit Interleukin-1 β / Behandlung mit Glycin.....	44
3.5 Verfahren zur quantitativen Genexpressionsdarstellung	46
3.5.1 RNA-Extraktion	46
3.5.2 RNA-Quantifizierung.....	47
3.5.3 cDNA-Synthese	47
3.5.4 Real-Time-PCR	48
3.6 Statistische Datenauswertung.....	51
3.7 Immunhistochemische Färbung der Gewebeschnitte und Zellen	52
3.7.1 Prinzip der Immunhistochemie	52
3.7.2 Protokoll der Immunhistochemie.....	53
3.7.4 Auswertung der Immunhistochemie.....	55
3.8 Immunfluoreszenzanalyse der Zellen.....	55
3.8.1 Prinzip der Immunfluoreszenz.....	55
3.8.2 Protokoll der Immunfluoreszenz	56
3.8.3 Auswertung der Immunfluoreszenz	57
4. Ergebnisse	58
4.1 Nachweis des Glycinrezeptors in humanen gingivalen Keratinozyten.....	58
4.1.1 Immunhistochemischer Nachweis des Glycinrezeptors im Gewebeschnitt und in-vitro	58
4.1.2 Nachweis des Glycinrezeptors über Immunfluoreszenz	60
4.2 Real-Time-PCR-Analysen	60
4.2.1 Etablierung der Real-Time-PCR	60
4.2.2. Etablierung der Versuchsbedingungen	61
4.2.3 Genexpressionsanalysen der Stimulationsversuche	66
4.3 Nachweis der Translokation von NF κ B in den Zellkern durch Immunfluoreszenz.....	71
5. Diskussion.....	77
5.1 Diskussion der Methoden.....	78
5.2 Diskussion der Ergebnisse	79
5.2.1 Expression des Glycinrezeptors in humanen gingivalen Keratinozyten.....	79
5.2.2 Diskussion der Ergebnisse der Vorversuche.....	81
5.2.3 Diskussion der Ergebnisse des Hauptversuchs.....	83

5.2.4 Translokation von NFκB.....	92
6. Zusammenfassung.....	95
7. Literaturverzeichnis.....	97
8. Danksagung	106

Abkürzungsverzeichnis

α	=	alpha
Abb.	=	Abbildung
Aqua dest.	=	destilliertes Wasser
β	=	beta
bp	=	Basenpaar
BSA	=	engl. albumin bovine serum
$^{\circ}\text{C}$	=	Grad Celsius
Ca^{2+}	=	Calcium
CaMK	=	Calcium-Calmodulin-abhängige Kinase
cAMP	=	zyklisches Adenosinmonophosphat (engl. cyclic adenosine monophosphate)
cDNA	=	komplementäre Desoxyribonukleinsäure (engl. complementary DNA)
Cl^{-}	=	Chlorid
CRAC	=	engl. calcium-release-activated calcium-current
CREB	=	engl. cAMP response-element-binding protein
C_t	=	Schwellenzyklus (engl. cycle threshold)
DAB	=	Diaminobenzidin
DAG	=	Diacylglycerol
DAPI	=	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DMEM	=	Medium für die Zellkultur (engl. Dulbecco's Modified Eagles-Medium)
DNA	=	Desoxyribonukleinsäure (engl. desoxyribonucleid acid)
dNTPs	=	Desoxynucleotidtriphosphat
EDTA	=	Ethylendiamintetraacetat
ER	=	endoplasmatisches Retikulum
ERK	=	engl. extracellular-regulated kinase
et al.	=	und Mitarbeiter (lat. et alii)
FAK	=	engl. focal adhesion kinase
g	=	mittlere Erdschwerebeschleunigung

GECs	=	Gingivaepithelzellen (engl. gingival epithel cells)
GlyR	=	Glycinrezeptor
I- κ B	=	Inhibitor Faktor Kappa B
IL	=	Interleukin
IL-AcP	=	engl. interleukin-1 receptor accessory protein
IL-1R	=	Interleukin-1-Rezeptor
IP ₃	=	Inositol-1,4,5-triphosphat
IRAK	=	engl. IL-R-associated kinase
KGM	=	Medium für die Zellkultur (engl. keratinocyte growth medium)
LPS	=	Lipopolysaccharid
LTB ₄	=	Leukotrien B4
MAPK	=	Ras-mitogen-aktivierte Proteinkinase
MEF2	=	engl. myocyte enhancer factor 2
μ g	=	Mikrogramm
mM	=	Millimolar
μ m	=	Mikrometer
MMP	=	Matrix-Metalloproteinase
mRNA	=	Messenger-Ribonukleinsäure (engl. messenger ribonucleid acid)
mV	=	Millivolt
MYD88	=	engl. myeloid differentiation primary response gene 88
NADPH	=	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NFAT	=	engl. nuclear factor of activated T-cell
NF κ B	=	Nukleärer Faktor Kappa B
ng	=	Nanogramm
nM	=	Nanomolar
nm	=	Nanometer
PBS	=	phosphatgepufferte Salzlösung (engl. phosphate buffered saline)
PCR	=	Polymerasenkettenreaktion (engl. polymerase chain reaction)
PGE ₂	=	Prostaglandin E ₂
PLC	=	Phospholipase C

pmol	=	pikomol
PTP	=	Protein-Tyrosin-Phosphatase
RNA	=	Ribonukleinsäure (engl. ribonucleid acid)
RNase	=	Ribonuklease, Enzym zur Spaltung der RNA
RT-PCR	=	Reverse Transkriptase Polymerasenkettenreaktion
SFK	=	engl. Src family kinases
SHP2	=	engl. Src homology phosphatase 2
SMEM	=	Medium für die Zellkultur (engl. Supplemented Eagle's Minimum Essential Medium)
SMOC	=	engl. Second Messenger operated canal
SOC	=	engl. store operated channel
Tab.	=	Tabelle
TBS	=	engl. Tris buffered saline
TLR	=	Toll-like Rezeptor
TNF α	=	Tumornekrosefaktor α
TOLLIP	=	engl. Toll-interacting protein
TRAF6	=	engl. TNF receptor-associated factor 6
VOC	=	engl. voltage-operated calcium channel

1. Einleitung

1.1 Einführung

Laut der vierten Deutschen Mundgesundheitsstudie (DMS IV) leiden über 50 % der 35- bis 44-Jährigen in Deutschland unter einer mittelschweren Form der Parodontitis. Bei einem weiteren Fünftel liegt diese Erkrankung sogar in schwerer Form vor. Über die letzten Jahre betrachtet bedeutet dies eine deutliche Inzidenzsteigerung um 26,9 Prozentpunkte.

Unter Parodontitis versteht man die Entzündung des Zahnhalteapparates mit Bildung von Zahnfleischtaschen und Abbau von Knochen. Abzugrenzen davon ist die Gingivitis (Zahnfleischentzündung), bei der nur das gingivale Gewebe betroffen ist. Der Schweregrad einer Parodontiserkrankung wird in erster Linie durch die Tiefe der Zahnfleischtaschen bestimmt. So spricht man bei 4 bis 5 mm Tiefe von einer mittelschweren, ab 6 mm Tiefe von einer schweren Form der Parodontitis (Micheelis und Schiffner, 2006).

Parodontale Erkrankungen werden u.a. durch Bakterien verursacht. Basierend auf den Koch-Postulaten von 1890 wurden für das Krankheitsbild der Parodontitis drei parodontalpathogene Leitbakterien identifiziert: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* und *Bacteroides forsythus* (Müller, 2006). Auch das Immunsystem des Wirtes spielt bei Parodontalerkrankungen eine entscheidene Rolle. So kommt es bei einer Entzündungsreaktion, wie etwa Gingivitis oder Parodontitis, zur vermehrten Bildung inflammatorischer Zytokine. Diese spielen auf der einen Seite eine wesentliche Rolle bei der Aktivierung des Immunsystems und damit bei der Bekämpfung der Entzündung. Auf der anderen Seite sind sie mitverantwortlich für den Abbau und damit für den Verlust von Gewebe des Zahnhalteapparates. Während der Entzündungsreaktion führen Aktivitätsänderungen in zellulären Signalwegen zu spezifischen Genexpressionsmustern und steigern die Genexpression der Zytokine und verschiedener anderer Entzündungsmediatoren.

In verschiedenen *in-vitro*-Studien wurde nach therapeutischen Angriffspunkten in dieser Pathogenese gesucht. Einen möglichen Angriffspunkt für ein Therapeutikum stellt der Calcium (Ca^{2+})-Signalweg der Zelle dar. *Porphyromonas gingivalis*, einer der parodontalpathogenen Hauptbakterien, aktiviert das Ca^{2+} -Signalssystem der Zelle und vermittelt so seine

pathogene Wirkung (Izutsu et al., 1996). Das Zytokin Interleukin-1 β (IL-1 β) aktiviert ebenfalls das Ca²⁺-System der Zelle und lässt einen ähnlichen Mechanismus vermuten.

Der Einfluss von IL-1 β auf die Pathogenese entzündlicher Erkrankungen ist unumstritten (Dinarello, 1996). Eine erhöhte Interleukin-1-Konzentration in der gingivalen Sulkusflüssigkeit korreliert mit dem Auftreten von Parodontalerkrankungen und der Entwicklung einer Gingivitis (Kinane et al., 1992; Ebersole et al., 1993). Aufgrund seiner pro-inflammatorischen Eigenschaften wird bei *in-vitro*-Versuchen IL-1 β als Stimulans eingesetzt, um eine Entzündungsreaktion zu simulieren. Somit wird die Voraussetzung geschaffen, die anti-inflammatorische Wirkung eines Therapeutikums zu untersuchen.

Der Aminosäure Glycin wird eine solche anti-inflammatorische, immunmodulierende und zytoprotektive Eigenschaft zugeschrieben (Zhong et al., 2003). Glycin wirkt über einen Rezeptor, der einen Chloridkanal öffnet. Über den Chlorideinstrom kann nach Zhongs Hypothese ein Ca²⁺-Influx in die Zelle abgeschwächt werden. Diese Überlegungen legen nahe, dass die anti-inflammatorische Komponente von Glycin durch Beeinflussung des Ca²⁺-Signalweges der Zelle wirkt. In der Tat wurde in mehreren Studien beschrieben, dass der inhibitorische Neurotransmitter Glycin eine weiterreichende Rolle im Signaltransduktionskomplex einer Zelle hat, als nur die hemmende Wirkung in der neuronalen Signalvermittlung (den Eynden et al., 2009). Aus zahnmedizinischer Sicht ist die Wirkung von Glycin insbesondere auf nicht-neuronale Zellen interessant, speziell auf Zellen des Zahnhalteapparates. In dieser Arbeit wird daher die funktionelle Bedeutung des Glycinrezeptors in humanen gingivalen Keratinozyten untersucht.

1.2 Untersuchte humane gingivale Keratinozyten

Das Gingivaepithel stellt den am weitesten außen gelegenen Teil des Zahnhalteapparates dar. Die Gingiva lässt sich topografisch einteilen: Die freie (marginale) Gingiva ist ein beweglicher Gewebestreifen, welcher der Schmelz-Zement-Grenze folgt und beim Erwachsenen etwa 1,5 bis 2 mm breit ist. Die befestigte Gingiva schließt sich an die freie Gingiva an und reicht bis zur Mukogingivalen Grenzlinie. Die freie Gingiva besteht aus Gingivaepithel und dem daruntergelegenen gingivalen Bindegewebe. Das orale Gingivaepithel ist ein mehrschichtiges Plattenepithel, etwa 0,2-0,3 mm dick. Im Bereich der freien Gingiva ist es teilweise verhornt

(parakeratinisiert), im Bereich der befestigten Gingiva ist es keratinisiert (Müller, 2006). Mikroskopisch lässt sich ein Stratum basale, Stratum spinosum, Stratum granulosum und Stratum corneum erkennen. Eine Basalmembran trennt das Epithel vom darunterliegenden Bindegewebe. Die Basalzellen sind mitotisch aktiv und gewährleisten die Epithelerneuerung. Im Stratum spinosum differenzieren die Zellen. Das Stratum granulosum ist durch erkennbare Keratohyalingranula charakterisiert. Die oberste Schicht besteht aus einer Hornschicht, die unterschiedlich dick ist und z.T. noch pyknotische Zellkerne enthält (Garant, 2003).

Als weiteres spezialisiertes Gingivaepithel ist das orale Sulkusepithel zu nennen. Es bildet die innere Wand der physiologisch etwa 0,5 mm tiefen Zahnfleischfurche (Sulcus gingivae) und ist unverhornt. Das so genannte Saumeepithel ist das der Zahnoberfläche aufgelagerte Epithel der freien Gingiva. Es bildet mit seiner innersten Zellschicht und einer internen Basallamina aus Glykoproteinen bzw. Kollagen und Hemidesmosomen den Epithelansatz am Zahn. Ist diese Verbindung zwischen Zahnoberfläche und Epithel intakt, stellt sie einen bakteriendichten Verschluss der Körperoberfläche dar. Im Sulkus-Bereich besitzen die Zellen eine sehr hohe Erneuerungsrate. Außerdem liegt in diesem Bereich eine hohe Konzentration an Antikörpern und Leukozyten zur peripheren Infektionsabwehr vor (Müller, 2006).

Der topografische Aufbau zeigt, dass Gingivaepithelien als Grenzfläche zwischen der äußeren Umwelt und dem darunterliegenden parodontalen Gewebe fungieren. Epithelzellen stellen nicht nur eine mechanische Barriere dar, sondern sind auch wichtiger Teil des angeborenen Immunsystems. Sie schützen das darunterliegende Gewebe vor physikalischen Noxen, Mikroorganismen und toxischen Produkten (Sandros et al., 2000). Lange Zeit wurde den gingivalen Epithelzellen eine passive Rolle im entzündlichen Geschehen der Parodontitis zugeschrieben. Dale (2002) zeigte eine neue Perspektive auf und beschrieb die aktive Rolle dieser Zellen in der angeborenen Immunabwehr. Keratinozyten sind in der Lage auf den Kontakt mit Bakterien oder bakterieller Plaque zu reagieren. Durch eine Sekretion von Interleukin-8, anderen Chemokinen und Zytokinen können sie Zellen des Immunsystems aktivieren und neutrophile Granulozyten anlocken. Keratinozyten sind fähig antimikrobielle Peptide zu synthetisieren. Diese Peptide sind Teil der unspezifischen Immunabwehr. Auch im Rahmen der erworbenen Immunantwort spielt das Gingivaepithel eine Rolle: Nicht nur über Zytokine, sondern auch über Langerhanszellen und dendritische Zellen, die im Epithel lokalisiert sind,

besteht eine Verbindung zur spezifischen Immunabwehr. Ein bakterieller Reiz kann weitere Effekte auf Keratinozyten haben, wie etwa vermehrte Proliferation der Zellen oder Veränderungen in Signalkaskaden. Bezüglich der Ca^{2+} -Signal-kaskade wurde dies von Isutzu et al. (1996) und von Belton et al. (2004) gezeigt.

1.3 Gingivitis/Parodontitis

In der Mitte der Sechziger Jahre hatte man für die Pathogenese von Parodontalerkrankungen ein klares Ursache-Wirkungs-Prinzip vor Augen. Das entwickelte Modell setzte bakterielle Plaque als direkten, primären Faktor für die Entstehung von Gingivitis und Parodontitis fest (Kornman, 2008). Auch wenn in den folgenden Jahren gezeigt wurde, dass dieser Erklärungsansatz zu monokausal ist, unterscheidet die Deutsche Gesellschaft für Parodontologie (2002) nach wie vor zwischen Plaque-induzierter und Nicht-Plaque-induzierter Gingivitis.

Die ersten Zellen, die mit der bakterienhaltigen Plaque in Kontakt kommen und so direkt und indirekt geschädigt werden, sind die Keratinozyten der oralen Gingiva. Parodontale Erkrankungen beginnen typischerweise mit einer Gingivitis, d.h. mit einer Entzündung des gingivalen Gewebes ohne Beteiligung der restlichen Strukturen des Zahnhalteapparates.

Eine chronische marginale Gingivitis ist klinisch durch eine sichtbare ödematöse Rötung, Konturverlust des marginalen Saums, Verlust von gingivalem Attachment, Blutungen und erhöhter Produktion von Sulkusflüssigkeit charakterisiert (Cimasoni, 1983).

Es lassen sich drei Stadien beobachten: Das erste Stadium umfasst die akute Entzündung, mit Infiltration von neutrophilen Granulozyten und Veränderungen im Bereich der Gefäße und Keratinozyten, sowie Kollagen-Degradation. Das Komplementsystem, das Kinin-System und die Arachidonsäure-Verstoffwechslung werden aktiviert (Attstrom und Egelberg, 1970). Dann folgt die frühe Läsion mit einem Lymphozyteninfiltrat, vor allem T-Lymphozyten. Das dritte Stadium, die etablierte Läsion, ist eher durch B-Lymphozyten und Plasmazellen dominiert. Eine Gingivitis ist reversibel, da noch kein Gewebeverlust eingesetzt hat. Durch intensive Plaquekontrolle kann also eine klinische Gingivitis beseitigt werden (Loe et al., 1965). Für die Prävention von Parodontalerkrankungen ist der Gesundheitszustand des gingivalen Gewebes von großer Bedeutung. Eine fortschreitende Gingivitis kann sich in tieferliegende Strukturen ausbreiten und

zu progressiver Zerstörung parodontalen Gewebes führen, einschließlich des Alveolarknochens. Eine Gingivitis muss jedoch nicht zwangsläufig in einer Parodontitis münden (Listgarten et al., 1985).

In den Modellen der späten 80er Jahre wurde die gleichzeitig protektive und destruktive Wirkung der Wirtsantwort diskutiert: Immunoinflammatorische Mechanismen der Zellen, aktiviert durch spezifische Bakterien, bzw. vor allem durch bakterielle Lipopolysaccharide, führen über die Bildung von katabolen Zytokinen und inflammatorischen Mediatoren wie Matrix-Metalloproteinasen, Interleukin-1 und Prostaglandinen (PGE_2) zur Gewebeerstörung (Kornman, 2008). Das heißt, Plaquebakterien und deren Stoffwechselendprodukte haben sowohl einen direkten pathologischen Effekt auf die Zellen, als auch einen indirekten Effekt, der über das Immunsystem des Wirtes wirkt.

1.4 Zelluläre Signalwege

1.4.1 Calcium-Signalweg

In eukaryotischen Zellen werden über Ca^{2+} -Signalwege eine Vielzahl von zellulären Prozessen kontrolliert. Ca^{2+} als sogenannter „Second Messenger“ regelt sowohl sich schnell auswirkende neuronale Aktivitäten oder sekretorische Prozesse, als auch längerfristig angelegte Veränderungen. Diese sind auf Transkriptionsebene zu finden. Es handelt sich dabei unter anderem um Veränderungen in der Zelldifferenzierung oder funktionelle Veränderungen von Immunzellen (Dolmetsch et al., 1997; Berridge et al., 2000; Gill et al., 2006; Oh-hora und Rao, 2008).

Anders als andere „Second Messenger“ kann Calcium nicht metabolisiert werden, weshalb die Zelle über Mechanismen verfügt die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration zu regulieren. Sowohl der Influx über Kanäle der Plasmamembran, als auch die Freisetzung von Ca^{2+} aus intrazellulären Speichern kann in Eukaryoten gesteuert werden. Über eine Änderung der Ca^{2+} -Konzentration im Zellkern kann die Expression verschiedener Gene beeinflusst werden (Dolmetsch et al., 1997; Hardingham et al., 1997; Healy et al., 1997; Hardingham et al., 2001).

Im Laufe einer bakteriellen Infektion geschieht eine Signalvermittlung unter anderem über Oszillation der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration. Nachgewiesen wurde dies zum Beispiel für einen der parodontalpathogenen Leitbakterien *Porphyromonas gingivalis*. Izutsu et al. (1996) zeigten, dass *Porphyromonas gingivalis* in primär kultivierte gingivale Keratinozyten eindringen und das Ca^{2+} -Signalsystem der Zelle aktivieren kann. Ein beobachteter Anstieg der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration, sowie ein Ca^{2+} -Anstieg im Zellkern wurde durch *Porphyromonas gingivalis* induziert. Belton et al. (2004) zeigten mit Hilfe von La^{3+} (Lanthanum), einem Inhibitor vieler Ca^{2+} -Kanäle, dass der intrazelluläre Ca^{2+} -Anstieg durch einen Influx durch spezifische Ca^{2+} -Kanäle erfolgte und nicht etwa durch Perforationen der Plasmamembran nach der Invasion von *Porphyromonas gingivalis*. Der genaue Mechanismus, wie Bakterien einen Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration verursachen, ist noch nicht ausreichend geklärt. Grundsätzlich kann Ca^{2+} über zwei Wege ins Zytoplasma gelangen. Der Extrazellulärraum stellt aufgrund der 20000-fach höheren Ca^{2+} -Konzentration, verglichen mit intrazellulär, eine Art Speicher dar, aus dem Calcium in die Zelle einströmen kann. Als zweiter Ca^{2+} -Speicher dient das endoplasmatische Retikulum (ER).

Ein Erklärungsmodell für Eukaryoten geht davon aus, dass während des Ca^{2+} -Signalweges bakterielle Lipopolysaccharide (LPS) den Toll-like Rezeptor 4 (TLR4) aktivieren. Dadurch kommt es zur Aktivierung der Phospholipase C (PLC). Die PLC hydrolysiert Phosphatidylinositol-3,4-bisphosphat, sodass die „Second Messenger“ Inositol-1,4,5-triphosphat (IP_3) und Diacylglycerol (DAG) entstehen. IP_3 bindet an die IP_3 -Rezeptoren an der ER-Membran (Gill et al., 2006). Diese Rezeptoren bewirken einen Ca^{2+} -Ausstrom aus dem ER, was zu einem schnellen, initialen Konzentrationsanstieg von Calcium im Zytoplasma führt (Patterson et al., 2004). Ein langsamer, länger anhaltender Ca^{2+} -Einstrom wird über weitere Kanäle erreicht. Dabei handelt es sich um IP_3 -Kanäle in der Plasmamembran und um Proteinkanäle (CRAM1) deren Öffnung vom Ca^{2+} -Gehalt im ER abhängt (Peinelt et al., 2006; Soboloff et al., 2006; Vig et al., 2006; Zhang et al., 2006; Feske, 2007). Der Ca^{2+} -Ausstrom aus dem ER bewirkt zusätzlich die Öffnung sogenannter „store-operated“ Kanäle (SOCs) in der Plasmamembran, die einen CRAC-Strom (Ca^{2+} -release-activated- Ca^{2+} -current), einen anhaltenden Ca^{2+} -Einfluss von extrazellulär, erlauben. Diese CRAC-Ströme wurden in vielen Zelltypen gefunden, so auch in gingivalen Keratinozyten (Fatherazi et al., 2003; Fatherazi et al., 2004). Als weitere Ca^{2+} -Kanäle in der

Plasmamembran vieler Zellen sind spannungsabhängige Kanäle, VOCs (voltage operated canals), zu nennen, die bei einer Depolarisation der Plasmamembran öffnen. Ein weiterer Ca^{2+} -Kanal, der in verschiedenen Zellen gefunden wurde, ist der SMOC (Second messenger operated canal) (Parekh und Putney, 2005). Sowohl schnell einsetzende Ca^{2+} -Ströme, als auch verzögerte, langanhaltende Ca^{2+} -Einströme konnten in humanen gingivalen Keratinozyten evoziert werden und deuten auf die Existenz entsprechender Ca^{2+} -Kanäle in diesen Zellen hin (Fatherazi et al., 2003; Fatherazi et al., 2004).

Eine hohe intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration beeinflusst viele Proteine und Transkriptionsfaktoren. Die Phosphatase Calcineurin und der „nuclear factor of activated T-cell“ (NFAT) werden aktiviert. Des weiteren zeigen sich Auswirkungen auf die Ca^{2+} -Calmodulin-abhängige Kinase (CaMK) und das „cAMP-responsive-element-binding protein“ (CREB). Es gibt Effekte auf den „myocyte enhancer factor 2“ (MEF2), der sowohl über den Calcineurin-, als auch über den CaMK-Signalweg aktiviert wird. Auch der Transkriptionsfaktor NF κ B (Nukleärer Faktor Kappa B) wird aktiviert. Gleichzeitig wird durch die DAG-Produktion die Ras-mitogen-activated protein kinase (MAPK) und die Proteinkinase C aktiviert. Diese wiederum aktiviert die Transkriptions-faktoren AP-1 (ein Komplex aus c-jun und c-fos) und NF κ B (Feske, 2007). Über viele Pfade des Ca^{2+} -Signalweges wird im Endeffekt die Produktion von Zytokinen, inflammatorischen Mediatoren und Enzymen beeinflusst, die zu Zellproliferation oder Zelltod führen können. Makrophagen werden aktiviert, produzieren reaktive Sauerstoffmoleküle und Nitrogen-verbindungen, die der Zelle direkt oder indirekt schaden können (Zhong et al., 2003).

1.4.2 Interleukin-1 β -Signalweg

Interleukin-1 ist ein potentes Zytokin. Weniger als 10 Liganden müssen an die IL-1 Rezeptoren einer Zelle binden, um eine starke Antwort zu generieren. Verglichen dazu benötigen andere Rezeptorsysteme eine 10 bis 100-fach höhere Ligandenbindung (Dinarello, 1996). Bindet ein Ligand an den IL-1RI Rezeptor (Interleukin-1 Rezeptor I) mit Co-Rezeptor, können verschiedene Signalwege aktiviert werden. Diese Signalwege führen zur Expressionssteigerung solcher Gene, die für pro-inflammatorische oder gewebezerstörende Faktoren codieren (Qwarnstrom et al., 1991; Luo et al., 1997; Zhu et al., 1998; Maraldi et al., 1999; Matthews und O'Neill, 1999;

Palsson et al., 2000; Boch et al., 2001; Bergman et al., 2003). Über einen Pfad des IL-1 Signalweges wird die Expression der sogenannten „early response“-Gene c-fos und c-jun stimuliert, die für verschiedene Zellaktivitäten verantwortlich sind. C-jun reguliert Gene für Kollagenasen und Inhibitoren von Matrix-Metalloproteinasen (Boch et al., 2001). Andere Signale, die über IL-1-Ligandenbindung generiert werden, führen zur Phosphorylierung verschiedener Kinasen und Rezeptor-assoziiierter Proteine, induzieren die MAPK-Kaskade, führen zu Ca^{2+} -Flüssen über eine focal adhesion kinase (FAK), bewirken Zellkontraktionen und die Reorganisation des Aktinzytoskeletts. Außerdem führen sie zur Translokation von Signalmolekülen in den Zellkern (Luo et al., 1997; Zhu et al., 1998; Maraldi et al., 1999; Matthews und O'Neill, 1999; Palsson et al., 2000; Redlich et al., 2002).

Der IL-1-Rezeptor gehört zur IL-1/Toll-like-Rezeptor-Familie. Diese Rezeptoren enthalten in ihrer zytoplasmatischen Domäne eine hoch konservierte Region, TIR Domäne genannt (O'Neill und Dinarello, 2000; Janssens und Beyaert, 2003). Vertreter dieser Rezeptorart finden sich u.a. auch in parodontalem Gewebe und in Entzündungszellen. Viele dieser Rezeptoren erkennen spezifisch Bakterienzellwandkomponenten. So wird der TLR4 in Anwesenheit von LPS aktiviert (Takeuchi et al., 1999; Wang et al., 2000).

Man unterscheidet zwei membrangebundene IL-1-Rezeptoren, den Typ I und Typ II. Bindet ein Ligand an IL-1RI wird eine Signalkaskade in Gang gesetzt. IL-1RII bindet IL-1, wirkt aber als kompetitiver Inhibitor und reduziert so die IL-1-Aktivität (Colotta et al., 1993). Ein stabilisierender Co-Rezeptor (IL-1 receptor accessory protein, IL-1AcP) wird rekrutiert sobald ein Ligand gebunden hat und ist für eine optimale Signalvermittlung über IL-1RI notwendig. Es bildet sich ein Rezeptorkomplex: IL-1RAcP interagiert mit der Rezeptorkomponente MyD88 (myeloid differentiation primary response gene 88), einem Adaptermolekül, dass den IL-1-Rezeptor mit nachfolgenden Signalmolekülen verbindet. Über eine Death-Domäne interagiert MyD88 mit IRAK (IL-1R-assoziiierter Kinase) und IRAK-2. Diese Assoziation IRAK-MyD88 ist kurzlebig und wird über Phosphorylierung reguliert. TOLLIP (Toll-interacting protein) lagert sich dem Komplex an (Qwarnstrom et al., 1991; Burns et al., 1998; Burns et al., 2000; Boch et al., 2001). Nachdem IRAK phosphoryliert wurde, assoziiert es mit dem TNF receptor associated factor 6, TRAF6 (Burns et al., 2000). Diese Assoziation ist notwendig für die nachfolgende IL-1 induzierte Aktivierung des nukleären Faktors- κB (NF κB), denn TRAF6 verbindet den

IL-1-Rezeptor mit nachgeschalteten katalytischen Effektormolekülen. Mindestens 13 verschiedene Proteine wurden identifiziert, die mit TRAF6 interagieren (Wajant et al., 1999). Es wird angenommen, dass eine dieser Interaktionen über die Assoziation mit der mitogen-activated protein kinase (MAPK) erfolgt (Abbildung 1).

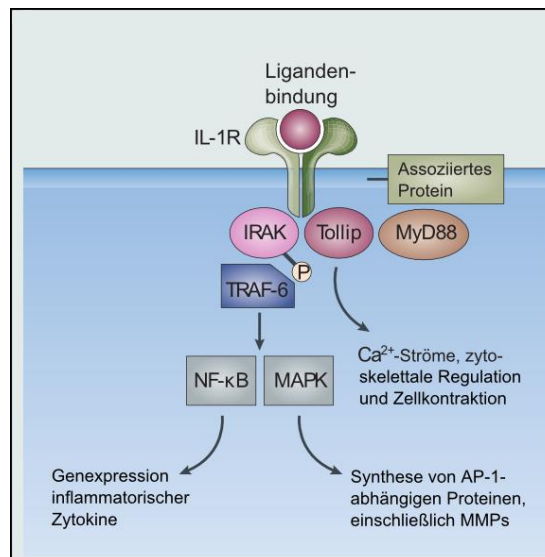


Abb. 1: Interleukin-1-Signalweg.

Nach Ligandenbindung von IL-1 am IL-1-Rezeptor (IL-1R1) kommt es zur Phosphorylierung verschiedener Kinasen und Rezeptor-assoziiierter Proteine. Dies führt zur Induktion von mitogen-activated protein kinase (MAPK)-Kaskaden, zu Ca²⁺-Strömen, Zellkontraktion und zytoskelettaler Reorganisation, zur Translokation von Signalmolekülen in den Kern und zur Synthese von AP-1-abhängigen Proteinen via Transkription der Gene c-fos und c-jun. IRAK, IL-R-associated kinase; MMP, Matrix-Metalloproteinase; MYD88, myeloid differentiation primary response gene 88; NF-κB, Nukleärer Faktor-κB; TOLLIP, Toll-interacting protein; TRAF6, TNF receptor-associated factor 6. Modifiziert nach McCulloch et al. (2006).

1.4.3 Interleukin-1 und Calcium

IL-1β vermittelt unter anderem auch einen Anstieg der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration. Dieser Anstieg ist abhängig von fokalen Adhäsionskomplexen und deren Abhängigkeit von der Src homology phosphatase 2 (SHP2). Es zeigt sich, dass verschiedene makromolekulare Komplexe in den IL-1 Signalweg involviert sind. Eine räumlich enge Beziehung besteht zwischen dem IL-1-Rezeptor und der adhäsiven Domäne mesenchymaler Zellen. Diese fokalen Adhäsionskomplexe enthalten zusätzlich zu den zytoskelettalen Strukturproteinen und

Integrinen verschiedene Signalmoleküle, so z.B. auch eine Phospholipase $C\gamma$. In Fibroblasten, Synoviozyten und Chondrozyten ist die Beziehung zwischen IL-1-Rezeptoren und fokalen Adhäsionskomplexen äußerst wichtig für die IL-1-Signaltransduktion. Eine Tyrosinphosphorylierung und die Aktivierung der focal adhesion kinase (FAK) kommen nur in Verbindung mit diesen Komplexen vor. Ohne die Aktivierung der FAK können keine IL-1 induzierten Ca^{2+} -Ströme fließen (Arora et al., 1995). Zwei weitere Proteine, die sich den fokalen Adhäsionskomplexen im Zusammenhang mit der IL-1-Signaltransduktion anlagern, sind die SHP2 und die Protein-Tyrosin-Phosphatase α (PTP α) (Schoenwaelder et al., 2000; Kodama et al., 2001). Über SHP2 wird das Ausmaß und die Kinetik der Extracellular regulated kinase (ERK)-Aktivierung reguliert (Miyamoto et al., 1995; Carmona-Cuenca et al., 2006). Eine wichtige Rolle spielt SHP2 bei der IL-1 induzierten PLC γ -Phosphorylierung. SHP2 fördert über IP $_3$ den IL-1 induzierten Ca^{2+} -Ausstrom aus dem endoplasmatischen Retikulum (Wang et al., 2005). Im Rahmen dieser Kaskade ist auch eine Rekrutierung von extrazellulärem Ca^{2+} denkbar, da Ca^{2+} -durchlässige Ionenkanäle im Laufe der IL-1-Signaltransduktion über Serin/Threoninphosphorylasen phosphoryliert werden können, so die Öffnungswahrscheinlichkeiten verändert und ein Ca^{2+} -Einstrom ermöglicht werden (Arora et al., 1995). Der erreichte Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration ist essentiell für die IL-1-Signalvermittlung zur ERK und für nachfolgende Signalwege, die zur Matrix-Zerstörung führen (Lo et al., 1998). PTP α interagiert mit SHP2 (Abb. 2) und moduliert, möglicherweise über direkte oder indirekte Regulation von SHP2, die IL-1 β induzierte Maturation der fokalen Adhäsionskomplexe und die nachfolgenden Signalwege (McCulloch et al., 2006).

Es wird beschrieben, dass trotz blockierter ERK über künstliche Erhöhung des intrazellulären Ca^{2+} -Gehalts der Signalweg aufrechterhalten werden kann. Verändert man die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration, entstehen regulatorische Signale, welche die Transkription von Genen wie c-fos kontrollieren (Hardingham et al., 1998). Die Fähigkeit von IL-1 „early-response Gene“ wie c-fos zu regulieren könnte also auf die physikalische Nähe der intrazellulären Ca^{2+} -Speicher zu membran-assoziierten FAC-Proteinen und somit auf den eben beschriebenen Signalweg zurückzuführen sein (Ma et al., 2000).

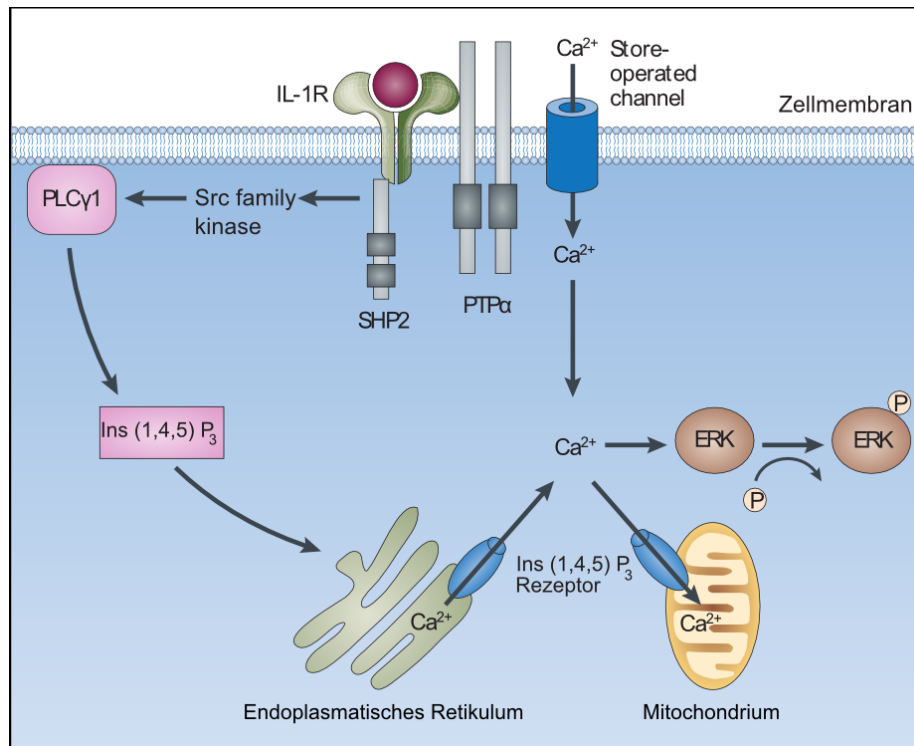


Abb. 2: Interleukin-1 vermitteltes Calciumsignal.

Protein-Tyrosin-Phosphatasen (PTPs) wie Src homology phosphatase 2 (SHP2) und PTP α binden an den fokalen Adhäsionskomplex und generieren zusammen mit dem aktivierten IL-1-Rezeptor über die Src family kinases (SFK) weitere Signale und bewirken einen Ca²⁺-Ausstrom aus dem endoplasmatischen Retikulum. Dieser Ca²⁺-Ausstrom ist ausschlaggebend für die Signalvermittlung zur extracellular-regulated kinase (ERK) und für nachfolgende Signalwege. Modifiziert nach McCulloch et al. (2006).

1.4.4 NF κ B-Aktivierung

Über den IL-1-Signalweg wird unter anderem der Transkriptionsfaktor NF κ B aktiviert. Zu dieser Aktivierung sind verschiedene regulatorische Proteine wie MyD88, IRAK, TRAF6 etc. nötig (Jefferies et al., 2001). Im inaktiven Zustand liegt NF κ B als Komplex mit I- κ B (Inhibitor Faktor Kappa B) im Zytoplasma vor. Eine I κ B-Kinase bewirkt durch die Phosphorylierung und proteolytische Degradation des inhibitorischen κ B-Kinase-Komplexes die Freisetzung von NF κ B-Dimeren, wie p50, p52 und p65RelA (Ling et al., 1998). Diese werden aktiv in den Zellkern transportiert und aktivieren die Transkription entsprechender Zielgene, indem sie an die Promotorregionen der Gene binden. NF κ B reguliert die Expression von über 150 Zielgenen. Die meisten dieser Gene codieren für Proteine, die im Regulationsprozess von Immunantwort, antipathogener Reaktion und zellulärem Stress beteiligt sind (Foo und Nolan, 1999; Pahl, 1999).

Zu diesen Proteinen gehören Chemokine und Zytokine wie z.B. IL-6 und IL-8, Proteine zur Antigenpräsentation, Akute-Phase-Proteine wie Interferon- γ und IL-18, die für die T-Helfer-Zellen wichtig sind (Kojima et al., 1999; Molinero et al., 2004). Die meisten Gene steigern durch ihre Expression den Widerstand der Zelle gegenüber zellulärem Stress und verhindern eine Apoptose. NF κ B hat auch eine kontrollierende Funktion im Zellzyklus (Seitz et al., 2000). Es ist beschrieben, dass die Phosphorylierung von I κ B α 30 min nach IL-1 β -Stimulation beginnt und nach einer Stunde ein Maximum erreicht. 15 min nach IL-1 β -Stimulation sind MAPK und „c-jun transkription factor“ phosphoryliert. Nach 2 h beginnen NF κ B und der Transkriptionsfaktor AP-1 (Activating Protein-1) aktiv zu werden und die Transkription inflammatorischer Gene zu verändern. Über Immunfärbung mit einem anti-NF κ B p65 Antikörper wurde die nukleäre Translokation von NF κ B in IL-1 β -vorbehandelten Fibroblasten (5 ng/ml IL-1 β für 2h) gezeigt (Vardar-Sengul et al., 2009). Steinberg et al. (2006) zeigten die Translokation von NF κ B in den Zellkern humaner gingivaler Keratinozyten. Über indirekte Immunfluoreszenz wiesen sie bei unstimulierten Zellen den Transkriptionsfaktor im Zytoplasma nach. Nach einer Stimulation mit 200 units IL-1 β (entspricht 1 ng/ml) für 3, 6, 12 und 24 h bemerkten sie, dass eine maximale Ansammlung von NF κ B im Kern nach 6 h erreicht wurde. Danach wurde der Transkriptionsfaktor langsam wieder ins Zytoplasma zurückverteilt.

1.5 Glycin

1.5.1 Die Aminosäure Glycin

L-Glycin ist die kleinste und einfachste Aminosäure. Sie besteht aus einem Kohlenstoffatom mit einer Amino- und einer Carboxylgruppe. Glycin ist hydrophil und proteinogen. Man findet Glycin als inhibitorischen Neurotransmitter im zentralen Nervensystem. Glycin kommt in vielen humanen Geweben vor und ist eine Schlüsselsubstanz im Metabolismus von Proteinen, Peptiden, Nukleotiden, etc. So ist Glycin auch am Aufbau des fibrösen Proteins Kollagen beteiligt, das nicht nur im parodontalen Bindegewebe eine wichtige Rolle spielt.

Bezüglich der biologischen Aktivität wurde Glycin in nicht-neuronalem Gewebe lange Zeit als neutral angesehen. Untersuchungen mit verschiedenen Zelltypen zeigten jedoch, dass Glycin

eine anti-inflammatorische, immunmodulatorische und zytoprotektive Wirkung hat (Wheeler et al., 1999; Zhong et al., 2003; Gundersen et al., 2005). Während der letzten Jahre zeigten mehrere Studien einen signifikanten Effekt von Glycin auf die Aktivität von Immunzellen. Sowohl Immunzellen der angeborenen als auch der erworbenen Immunabwehr konnten durch Glycin beeinflusst werden. Hierzu zählen Lymphozyten, aber auch Makrophagen und polymorphnukleäre Leukozyten (Spittler et al., 1999; Stachlewitz et al., 2000; Froh et al., 2002). Gezeigt wurde eine protektive Wirkung bei Anoxia bedingter Toxizität oder in Versuchen mit oxidativem Stress. Auch wurde beobachtet, dass eine mit Glycin angereicherte Diät einen protektiven Effekt nach Lebertransplantation hatte. Hier wirkte Glycin unter anderem gegen das Krankheitsbild einer LPS-induzierten Letalität. Weitere Studien zeigten, dass prophylaktische oder therapeutische Anwendung von Glycin positive Effekte bei Leberfibrose, alkoholischer Hepatitis, endotoxin-induziertem Schock, Tumoren wie Melanomen, Nephrotoxizität, experimenteller Arthritis und anderen Krankheiten mit inflammatorischer Komponente hatte (Wheeler et al., 1999; Bruck et al., 2003; Zhong et al., 2003; Gundersen et al., 2005). Breivik et al. (2005) zeigten, dass ein Glycinzusatz im Trinkwasser einen inhibitorischen Effekt auf den experimentell induzierten parodontalen Breakdown-Prozess bei Ratten hatte. Der parodontale Knochenverlust konnte hier durch Glycinapplikation signifikant reduziert werden.

Der genaue Mechanismus, über den Glycin seine protektive Wirkung entfaltet, ist noch nicht vollständig geklärt. Diskutiert wird eine Hemmung des Ca^{2+} -Signalweges durch Glycin, Hemmung der inflammatorischen Zellaktivität, Verminderung der Bildung von freien Radikalen und anderen toxischen Mediatoren oder eine Verhinderung von Zellnekrosen durch Blockade von Membranpermeabilitäten (Zhong et al., 2003).

Glycin ist kostengünstig, leicht zu beschaffen und zeigt eine geringe Toxizität, aber weitgefächerte biologische Effekte. Dies macht die Substanz Glycin als Therapeutikum interessant.

1.5.2 Glycinrezeptor

1982 wurde erstmalig ein Glycinrezeptor mit Hilfe von Strychnin-Affinitätschromatographie aus dem Rückenmark der Ratte isoliert (Pfeiffer et al., 1982). Der Glycinrezeptor (GlyR) gehört zur

Familie der Cysteine-loop-Rezeptoren und ist ein ligandengesteuerter Ionenkanal. Fünf Untereinheiten des Rezeptors wurden identifiziert. 48 kDa α -Untereinheiten ($\alpha 1$ - $\alpha 4$), die für die Ligandenbindung wichtig sind, und strukturelle 58 kDa β -Untereinheiten bilden als symmetrisch angeordneter pentamerischer Komplex einen transmembranären Chlorid-Kanal (Rajendra et al., 1997; Webb und Lynch, 2007).

Die Untereinheiten zeigen zu 47 % eine homologe Aminosäuresequenz. Ein weiteres Glycinrezeptor-assoziiertes Polypeptid mit 98 kDa wurde als zytoplasmatisches anchoring-Protein, Gephyrin, identifiziert (Kirsch und Betz, 1995; Meyer et al., 1995). Die Strychnin-bindende Untereinheit $\alpha 1$ zeigt Ähnlichkeiten zum Acetylcholinrezeptor.

Alle bisher charakterisierten Glycinrezeptoren sind entweder α -Untereinheiten-Homomere oder Heteromere aus α - und β -Untereinheiten. Embryonale Rezeptoren enthalten $\alpha 2$ -Homomere, während adulte Rezeptoren vorwiegend $\alpha 1\beta$ -Heteromere in einem stöchiometrischen Verhältnis von 2:3 enthalten. Der genaue Aufbau des Glycinrezeptors wurde bisher vor allem für synaptische Glycinrezeptoren, meist in Zellen des zentralen Nervensystems der Ratte, beschrieben. Bei diesen Glycinrezeptoren besteht jede Untereinheit aus einer etwa 210 Aminosäuren langen extrazellulären, ligandenbindenden Domäne und vier transmembranären α -Helices, M1-M4 genannt (Webb und Lynch, 2007). Die extrazelluläre Domäne enthält eine α -Helix nahe des Aminoendes, gefolgt von einer Serie an 10 β -Strängen. Die β -Stränge bilden eine gewundene Sandwich-Struktur mit zwei hydrophoben cores und ligandenbindenden Aussparungen an den Grenzflächen der Untereinheiten. Sowohl die α -Untereinheit, als auch die β -Untereinheit sind an der Koordination des Liganden beteiligt (Lynch, 2004; Grudzinska et al., 2005) (Abb. 3). Der Glycinrezeptor bildet eine Disulfid-gebundene Schleife, was als charakteristisches Merkmal der Cys-loop-Rezeptoren gilt. Eine zweite Cys-loop-Schleife beinhaltet die Hauptdomäne zur Glycinbindung (Rajendra et al., 1995). Die konservierte Cys-Schleife und die Schleife, die den β -Strang 2 und 3 verbindet, ragen vom unteren Teil der Rezeptorstruktur bis zu den transmembranären Domänen und gewährleisten die Informationsübertragung von der Agonisten-Bindungsstelle zur Aktivierungszone des Rezeptors im Kanal. Diese Domänen vermitteln also den Öffnungsmechanismus des Kanals (Webb und Lynch, 2007). Die transmembranären Domänen M3 und M4 sind durch eine lange intrazelluläre Domäne verbunden und besitzen Phosphorylierungsstellen, deren physiologische Relevanz noch

nicht geklärt wurde. Bindungsstellen für zytoplasmatische Faktoren wie etwa Gephyrin oder Ubiquitin lassen sich hier ebenfalls finden. Diese Anordnung variiert zwischen den verschiedenen Untereinheiten (Buttner et al., 2001; Kim et al., 2006).

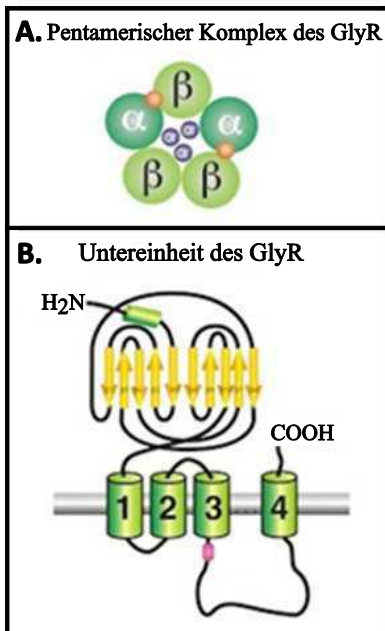


Abb. 3: Aufbau des Glycinrezeptors.

A: Die adulte Isoform des GlyR stellt heteromere Komplexe aus zwei α - und drei β -Untereinheiten dar. Der GlyR bildet einen pentameren Chlorid-Kanal. Die Bindungsstelle für Glycin (rot) befindet sich zwischen benachbarten α - und β -Untereinheiten.

B: Eine GlyR-Untereinheit besteht aus einem langen extrazellulären N-Terminus gefolgt von vier Transmembranomänen, die durch Schleifen miteinander verbunden sind.

(Villmann, 2011)

In der Medulla spinalis, die einen Teil des zentralen Nervensystems darstellt, wurde der Wirkmechanismus von Glycin und seinem Rezeptor ausreichend charakterisiert. Hier hat Glycin eine hemmende Wirkung auf die Neurotransmission in motorischen und sensorischen Reflexkreisen. Der inhibitorische Neurotransmitter Glycin aktiviert einen Glycin-abhängigen Chlorid-Kanal, der sich in der postsynaptischen Membran befindet. Durch einen Chlorid-Influx wird eine Depolarisation der Plasmamembran verhindert und das exzitatorische Signal der Nervenzelle wird nicht entlang des Axons weitergeleitet. Glycinergische Synapsen finden sich auch im Hirnstamm, Cerebellum und in der Retina. Auch extrasynaptische Glycinrezeptoren sind im zentralen Nervensystem verteilt. Bei einigen weißen Blutzellen, Alveolarmakrophagen, Kupffer-Zellen, neutrophilen Granulozyten, Endothelzellen und Lymphozyten konnte ein Glycinrezeptor nachgewiesen und ähnliche inhibitorische Effekte des Glycins beobachtet werden. Der Nachweis eines Glycinrezeptors in nicht-neuronalen Zellen wurde nicht nur pharmakologisch über eine spezifische Inhibition des Rezeptors durch Strychnin, sondern auch molekular erbracht (Wheeler et al., 1999; Bruck et al., 2003; Zhong et al., 2003; Gundersen et al., 2005; Webb und Lynch, 2007). Froh et al. (2002) wiesen die mRNA der α - und

β -Untereinheiten des Glycinrezeptors in Kupfferzellen der Ratte, peritonealen Neutrophilen, in Makrophagen der Milz und in Alveolarmakrophagen nach.

Nachdem Bondy et al. (1982) die Existenz von Strychnin-bindenden Rezeptoren im Pigmentepithel der Retina aufzeigten, suchten Denda et al. (2003) das Vorkommen von Glycinrezeptoren in anderen Epithelien. Sie konnten eine Immunreaktivität gegen eine der Untereinheiten des Glycinrezeptors in epidermalen Keratinozyten finden und vermuten eine Bedeutung für die epidermale Homeostase und den Reparaturprozess der kutanen Barrierefunktion.

1.5.3 Glycin-Signalweg

Die wichtigsten Agonisten des Glycinrezeptors sind, außer Glycin, die Aminosäuren β -Alanin und Taurin. Auch GABA aktiviert den Glycinrezeptor, aber mit geringerer Wirksamkeit (Schmieden et al., 1993). Unter allen Agonisten hat Glycin die höchste Affinität und ermöglicht die effizienteste Aktivierung des Glycinrezeptors (Lewis et al., 2003). Kinetik-Analysen zeigten, dass für die effiziente Rezeptoraktivierung eines α 1- oder α 2-Homomer-Glycinrezeptors mindestens zwei Glycinmoleküle benötigt werden (Beato et al., 2002; Gentet und Clements, 2002; Mangin et al., 2003). Legendre (1998) sprach von zwei Bindungsstellen für Glycin, Burzomato et al. (2004) beschrieben drei Glycin-Bindungsstellen in heteromeren α 1 β -Glycinrezeptoren. Das Alkaloid Strychnin ist ein potenter Antagonist zu Glycin und inhibiert kompetitiv alle bekannten Isoformen des Glycinrezeptors mit nanomolarer Affinität. Man bedient sich dieser Eigenschaft z.B. auch zur Purifikation und Charakterisierung des Glycinrezeptors (Webb und Lynch, 2007).

Für synaptische Glycinrezeptoren wird beschrieben, dass es bei anhaltender Applikation eines Agonisten zur Desensibilisierung des Rezeptors kommt. Das heißt, es wird ein Zustand erreicht, in dem der Kanal geschlossen bleibt, obwohl der Agonist dem Rezeptor weiter angeboten wird. Die Frequenz der De- und Resensibilisierung kann über pharmakologische Agonisten beeinflusst werden (Jones und Westbrook, 1996).

Wie bereits beschrieben entfaltet Glycin seine Wirkung durch die Hemmung von Ca^{2+} -Strömen. Basierend auf dieser Annahme wurden verschiedene Studien durchgeführt. So erhöhte in einer Studie von Yamashina et al. (2001) Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) den

intrazellulären Ca^{2+} -Spiegel in Endothelzellen, was durch Glycin geblockt werden konnte. In isolierten Hepatozyten verhinderte Glycin den Anstieg intrazellulären Calciums, der durch Prostaglandin E2 (PGE2) und Phenylephrine ausgelöst wurde (Qu et al., 2002). Anscheinend greift Glycin in die zellulären Signalwege ein.

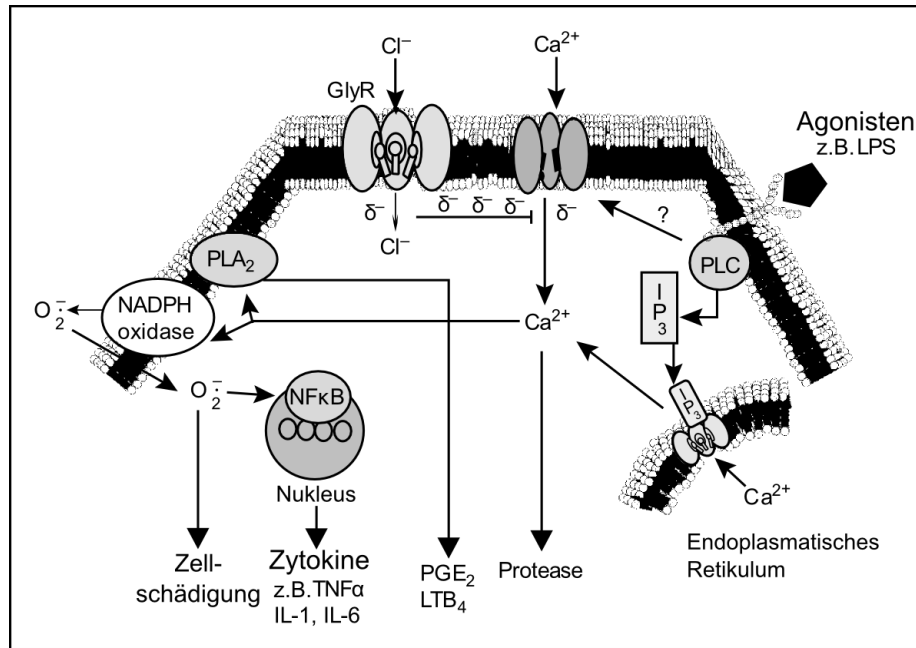


Abb. 4: Zhongs und Wheelers Arbeitshypothese: Glycin hemmt den Agonisten-induzierten Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration.

Die Ligandenbindung eines Agonisten, wie beispielsweise eines Endotoxins (LPS), führt zur Aktivierung von Phospholipase C (PLC) und zur Bildung von Inositol-1,4,5-Triphosphat (IP_3). IP_3 induziert die Freilassung von Ca^{2+} aus intrazellulären Speichern. Gleichzeitig führt die Depolarisation der Plasmamembran zur Öffnung von spannungsgesteuerten Ca^{2+} -Kanälen und bedingt einen Ca^{2+} -Influx von Extrazellulär. Der ansteigende intrazelluläre Ca^{2+} -Spiegel dient als Signal für viele intrazelluläre Prozesse: Aktivierung der Phospholipase A_2 (PLA_2), die zur Bildung von Arachidonsäure und zur Produktion von vasoaktiven und chemotaktisch aktiven Mediatoren wie Prostaglandinen und Leukotrienen führt. Aktivierung der NADPH-Oxidase führt zur Bildung von O_2^- , was zu Zellschädigung und zur Aktivierung von Transkriptionsfaktoren wie NF κ B führt. So kommt es zur Produktion pro-inflammatorischer und mitogener Zytokine, wie TNF α , IL-1 und IL-6. Bei gleichzeitiger Glycinwirkung aktiviert die Aminosäure einen ligandengesteuerten Chloridkanal in der Plasmamembran der Kupfferzellen. Dieser bewirkt einen Chlorid-Influx, der zu einer Hyperpolarisation der Membran führt. Der Anstieg an intrazellulärem Ca^{2+} wird dadurch abgeschwächt. Intrazelluläre Signalwege und Zytokin-Produktion, die von intrazellulärem Ca^{2+} abhängen, werden gehemmt.

GlyR, Glycinrezeptor; TNF α , Tumor Nekrose Faktor- α ; LTB $_4$, Leukotrien B4; NADPH, Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (Wheeler et al., 1999; Zhong et al., 2003).

Modifiziert nach Zhong et al. (2003).

Einer dieser bereits beschriebenen Signalwege führt nach LPS-Induktion über die Aktivierung von Phospholipase C zur IP_3 -Produktion. Daraus folgt ein Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration, weiterer Ca^{2+} -Einstrom folgt durch spannungsgesteuerte Ca^{2+} -Kanäle und es kommt zur Produktion pro-inflammatorischer Zytokine. Dieser Effekt konnte in Kupfferzellen durch eine gleichzeitige Behandlung der Zellen mit Glycin verringert werden (Froh et al., 2002). Der genaue Mechanismus, wie Glycin das Ansteigen des intrazellulären Ca^{2+} -Spiegels verhindert, ist noch nicht vollständig geklärt. Eine Arbeitshypothese von Zhong et al. (2003) besagt, dass durch die Aktivierung des Glycinrezeptors der Ca^{2+} -Signalweg unterbrochen wird. Der Ca^{2+} -Signalweg ist hoch komplex und verläuft über verschiedene Pfade und Rezeptoren. Deshalb ist es unwahrscheinlich, dass Glycin alle dieser Rezeptoren blockiert. Wahrscheinlicher ist, dass Glycin ein Milieu schafft, das den Ca^{2+} -Signalweg unterbindet. Nach Zhong et al. (2003) öffnet sich in Anwesenheit von Glycin der Glycin-gesteuerte Chlorid-Kanal und bedingt einen Chlorid-Einstrom (Abb. 4). Dieser führt zur Hyperpolarisation der Plasmamembran und bewirkt einen Zustand, der das Öffnen der Ca^{2+} -Kanäle in der Plasmamembran erschwert. So wird ein weiterer Ca^{2+} -Einstrom verhindert. Zusätzlich kann der Chlorid-Einstrom auch die IP_3 -gesteuerten Calcium-Kanäle blockieren und den Ausstrom aus den intrazellulären Speichern unterbinden (Wheeler et al., 1999; Gundersen et al., 2005).

1.6 Untersuchte Mediatoren der Immunantwort

Zytokine wirken immunmodulierend und dienen der Kommunikation von Abwehrzellen (Ibelgaufts, 2002). Um eine adäquate Immunreaktion auf ein Pathogen zu generieren, ist ein ausgeglichenes Verhältnis zwischen pro- und anti-inflammatorischen Mediatoren notwendig. Über pro-inflammatorische Mediatoren wie Interleukin-1, IL-6, IL-8 etc. wird das Pathogen bekämpft. Anti-inflammatorische Zytokine, wie IL-10, limitieren den inflammatorischen Prozess und beenden die Immunreaktion wieder, um eine Schädigung des Organismus zu vermeiden (Grutz, 2005).

Matrix-Metalloproteinasen sind Zink-abhängige Endopeptidasen und können die extrazelluläre Matrix degradieren. Sie sind bei Apoptosevorgängen sowie bei Immunantworten des Wirtes (Chemokin/Zytokine-Aktivierung) beteiligt (Van Lint und Libert, 2007).

Interleukin-1 β

Interleukin-1 β (IL-1 β) ist ein pro-inflammatorisches, multifunktionales Zytokin. Sein Signalweg zieht Kaskaden nach sich, die einerseits die Immunantwort des Wirtes unterstützen, andererseits bei der entzündlich bedingten Gewebeerstörung mitwirken (O'Neill und Dinarello, 2000). Die biologischen Funktionen von IL-1 β überlappen teilweise mit denen von TNF α (Tumornekrosefaktor α) und IL-6 (Dinarello, 1996). Über den IL-1-Signalweg werden verschiedene Gene beeinflusst. Dazu gehören Gene, die für Zytokine (IL-1, IL-6), Zytokin-Rezeptoren, Akute-Phase-Proteine, Wachstumsfaktoren, „Tissue remodeling“-Enzyme, Adhäsionsmoleküle und andere inflammatorische Faktoren (TNF α , PGE2 und Matrix-Metalloproteinasen) codieren, welche die Degradation der extrazellulären Matrix im Rahmen von Parodontalerkrankungen und anderer entzündlicher Erkrankungen vorantreiben. Außerdem wird durch IL-1 die Expression der „early response“ Gene c-fos und c-jun stimuliert (Dinarello, 1996; Dayer und Bresnihan, 2002; Goldring, 2003; Loos et al., 2005; Steinberg et al., 2006). IL-1 β unterstützt die Chemotaxis der neutrophilen Granulozyten sowie die T- und B-Zell-Aktivierung (Steinberg et al., 2006). Bei Patienten mit rheumatoider Arthritis konnte über die Antagonisierung des IL-1-Rezeptors der Entzündungsschmerz und die Knochenresorption verringert werden (Bresnihan und Cunnane, 1998). Schytte Blix et al. (1999) zeigten, dass das LPS des *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* humane Blutzellen zur IL-1- und TNF α -Produktion anregte. Auch durch physikalische oder thermische Verletzung, ultraviolette Strahlung und verschiedene Zytokine wie granulocyte-macrophage-colony-stimulation factor, TNF α , IL-6, TGF α und IL-1 α , sowie durch IL-1 β selbst wird in humanen Keratinozyten die Genexpression von IL-1 β induziert (Ansel et al., 1990; Dinarello, 1996).

Interleukin-6

Interleukin-6 (IL-6) ist ein multifunktionales Zytokin, das die Entzündungsreaktion des humanen Organismus reguliert. Es gibt zwei IL-6-Rezeptoren: einen membrangebundenen, der nur auf Leberzellen und Leukozyten vorkommt, und einen löslichen Rezeptor, der bei Ligandenbindung als Komplex an das Glykoprotein gp130 in der Membran sehr vieler Zelltypen binden kann und diese aktiviert. Eine Janus-aktivierte Kinase wird dann phosphoryliert und der JAK-STAT-Signalweg sowie der MAP-Kinase-Weg aktiviert. Über den MAP-Kinase-Weg wird die

Transkription verschiedener Zielgene reguliert (Heinrich et al., 2003; Fischer, 2006). Im Rahmen einer Entzündungsreaktion kommt es zur Infiltration von neutrophilen Granulozyten, parallel steigt die Konzentration des löslichen IL-6-Rezeptors und ein IL-6-Signal führt zur Akkumulationsbegrenzung der neutrophilen Granulozyten. Des Weiteren werden T-Lymphozyten angezogen. IL-6 ist also wichtig für den Übergang der angeborenen zur adaptiven Immunantwort. IL-6 hat pro- und anti-apoptotische Wirkung auf Leukozyten und bewirkt die Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen (Jones, 2005). Eine systemische Wirkung wurde nachgewiesen, so wirkt IL-6 als Mediator für die Produktion von Akute-Phase-Proteinen und ist an der Fieberreaktion beteiligt (Löffler, 2005).

Interleukin-8

Interleukin-8 (IL-8) ist ein Chemokin, das neutrophile Granulozyten aktiviert (Baggiolini und Clark-Lewis, 1992). Die Fähigkeit neutrophile Granulozyten anzulocken und zu aktivieren macht IL-8 zum inflammatorischen Mediator. Viele Zellen haben die Fähigkeit IL-8 zu bilden. So wurde IL-8-mRNA in Endothelzellen, Fibroblasten, Keratinozyten und weiteren Zellen nachgewiesen (Baggiolini et al., 1989). IL-1 und TNF sind die wichtigsten Stimuli und induzieren die Expression und Sekretion von IL-8. Da auf einen IL-1- oder TNF-Stimulus der IL-8-Spiegel ubiquitär ansteigt, nimmt dieses Interleukin eine bedeutende Rolle im Rahmen einer Entzündung und einer Immunreaktion des Wirtes ein (Baggiolini und Clark-Lewis, 1992). IL-8 besitzt neben der proinflammatorischen Wirkung auch eine antiinflammatorische Komponente. IL-8 kann die Adhäsion von Leukozyten an aktivierten Endothelzellen verhindern und somit eine Entzündungsreaktion unterdrücken (Ibelgaufts, 2002).

Interleukin-10

Interleukin 10 (IL-10) ist ein wichtiges immunmodulatorisches Zytokin mit antiinflammatorischen Eigenschaften und wird vor allem von Monozyten und TH2-Lymphozyten sezerniert (Grutz, 2005). IL-10 verhindert die nukleäre Translokation des Transkriptionsfaktors NF κ B, die essentiell für die Genexpression inflammatorischer Zytokine ist (Wang et al., 1995). So hemmt IL-10 unter anderem die Synthese von IFN γ , IL-1, IL-2, IL-6 und TNF β . T-Zell-Aktivierung und Antigenpräsentation werden durch IL-10 gehemmt und so Entzündungsprozesse limitiert.

Auch die Cyclooxygenase-2 wird gehemmt. B-Lymphozyten-Proliferation und Antikörperbildung werden unterstützt (Ibelgaufts, 2002). Zusammen mit TGF- β ist IL-10 das wichtigste anti-entzündliche Zytokin. Beide sind wichtig für die Entwicklung der Immuntoleranz (Grutz, 2005).

Matrix-Metalloproteinase 2, Matrix-Metalloproteinase 3, Vascular Endothelial Growth Factor

Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) sind am Breakdown-Prozess der extrazellulären Matrix beteiligt. Dies kann im Rahmen physiologischer Prozesse, wie Gewebe-Remodeling, oder im Rahmen krankhafter Prozesse, wie Arthritis oder Parodontitis, der Fall sein. Die meisten MMPs werden als inaktive Proproteine sezerniert und dann durch extrazelluläre Proteinase gespalten und aktiviert.

MMP2 (Matrix-Metalloproteinase 2) ist ein Enzym, das Typ IV-Kollagen, eine Hauptkomponente der Basalmembran, abbaut. Somit nimmt MMP2 eine besondere Rolle in entzündlichen Antworten und bei Gewebeerstörung im Rahmen parodontaler Erkrankungen ein (NCBI, 2011).

MMP3 (Matrix-Metalloproteinase 3) ist ein Enzym, das Fibronectin, Laminin, Kollagen III, IV, IX und X sowie Proteoglykane des Knorpels abbaut. MMP3 spielt u.a. eine Rolle in der Wundheilung, in der Progression von Artherosklerose und in der Tumorentstehung (NCBI, 2011).

Der Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) ist ein Signalmolekül, das in der Angiogenese und Lymphangiogenese eine wichtige Rolle spielt. Die VEGF-Familie umfasst fünf Wachstumsfaktoren, wobei VEGFA der Prototyp ist (Senger et al., 1983). Sowohl der Ligand VEGF als auch der VEGF-Rezeptor werden durch HIF (hypoxia-inducible factor) reguliert. Erhöhte Expression der entsprechenden Gene findet man bei vermehrtem Gewebewachstum, sei es im physiologischen Zusammenhang, z.B. bei der embryonalen Entwicklung und in der Wundheilung, oder sei es im pathologischen Rahmen bei der Tumorentstehung (Germain, Monnot et al. 2010). VEGF wird von den meisten parenchymalen Zellen gebildet und wird parakrin und autokrin sezerniert (Lee et al., 2007). Brown et al. (1992) zeigten, dass die Expression von VEGF in Keratinozyten während der Wundheilung stark hochreguliert wurde. Vermutet wird ein Zusammenhang mit der Angiogenese während der Bildung des granulären Gewebes (Nissen et al., 1998).

1.7 Fragestellung und Ziel der Arbeit

In vorausgegangenen Studien konnte in verschiedenen nicht-neuronalen Zellen die Existenz eines extrasynaptischen Glycinrezeptors gezeigt werden (Zhong et al., 2003). In humanen gingivalen Keratinozyten konnte bislang noch kein Glycinrezeptor nachgewiesen werden.

Glycin wird insbesondere auch eine anti-inflammatorische Wirkung zugeschrieben. Nach Untersuchungen an Kupfferzellen stellten Wheeler et al. (1999) eine Arbeitshypothese auf, die den Glycineffekt mit Hilfe von Chloridströmen erklärt. Zhong et al. (2003) führten diese weiter aus.

Es stellte sich die Frage, ob in gingivalen Keratinozyten durch eine Glycinapplikation eine Modifizierung inflammatorischer Signalwege bewirkt werden kann und Veränderungen von Entzündungsmarkern auf Transkriptionsebene herbeigeführt werden können. Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine mögliche Modulation der Expression immunologisch relevanter Gene (IL-1, IL-6, IL-8 und IL-10) durch Glycin nach IL-1 β -Stimulation untersucht. Gleichzeitig sollte die Fortleitung der Inflammation über den NF κ B-Signalweg analysiert werden.

Das Ziel dieser Arbeit war, eine mögliche funktionelle Bedeutung des Glycinrezeptors in humanen gingivalen Keratinozyten darzustellen.

Folgende spezifische Fragestellungen sollten untersucht werden:

1. Kann die Expression des Glycinrezeptors in humanen gingivalen Keratinozyten im Gewebeschnitt und *in-vitro* nachgewiesen werden?
2. Kann die Änderung der Genexpression von Entzündungsmarkern durch eine Stimulation gingivaler Keratinozyten mit IL-1 β *in-vitro* verifiziert werden?
3. Kann diese Expressionsänderung durch eine Behandlung der Zellen mit Glycin beeinflusst werden?
4. Was geschieht bei isolierter Glycinapplikation auf kultivierte gingivale Keratinozyten? Wird die Genexpression der Entzündungsmarker verändert?
5. Kann die Translokation des Transkriptionsfaktors NF κ B in den Zellkern gingivaler Keratinozyten bei IL-1 β -Stimulus bestätigt werden?
6. Beeinflusst eine Behandlung der kultivierten gingivalen Keratinozyten mit Glycin die durch IL-1 β induzierte Translokation von NF κ B in den Zellkern?

Da Glycin in vorausgegangenen Studien eine anti-inflammatorische Wirkung und eine Bedeutung im Reparaturprozess der kutanen Barrierefunktion zeigte, hat diese Aminosäure das klinische Potential, einen prophylaktischen oder therapeutischen Einsatz in der Parodontitistherapie zu finden. Durch die Untersuchung therapeutisch zu nutzender Angriffspunkte im Entzündungsgeschehen kann diese Arbeit eventuell einen Beitrag in der Entwicklung neuer Therapieansätze leisten.

2. Material

2.1 Gewebe

Bei dem entnommenen Gewebe handelte es sich um Gingivaproben aus dem Molarenbereich gesunder Patientinnen und Patienten. Die Proben wurden im Rahmen von Weisheitszahnentfernungen gewonnen. Die Patientendaten wurden anonymisiert. Diese Studie wurde von der Ethikkommission der Universität Bonn geprüft und genehmigt (Antrag Ethikkommission AZ.: Lfd. Nr. 29/08).

2.2 Chemikalien, Reagenzien und Medien

Antibiotika/Antimykotikalösung	(Fa. PAA Laboratories GmbH, Cölbe, D)
Aqua dest.	(Fa. Braun, Melsungen AG, D)
Aquatex	(Fa. MERCK KGaA, Darmstadt, D)
BSA, approx. 99 %	(engl. albumin bovine serum; Albumin Fraktion V; Fa. Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen, D)
CaCl ₂	(Fa. MERCK KGaA, Darmstadt, D)
cDNA-Synthese Kit	(iScript™ Select cDNA Synthesis Kit; Fa. BioRad, München, D)
CO ₂	(Fa. Linde, Höllriegelskreuth, D)
DAB, 10x	(Fa. Thermo Fisher Scientific Pierce GmbH, Bonn, D)
DAPI	(Fa. Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen, D)
DePex	(Fa. Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, D)
Einfriermedium	(Cryo-SFM; Fa. PromoCell GmbH, Heidelberg, D)
Ethanol	(Fa. Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen, D)
Formaldehydlösung, 4 %	(Fa. MERCK KGaA, Darmstadt, D)
Fötales Kälberserum	(engl. fetal calf serum, FCS; Fa. PAA Laboratories GmbH, Cölbe, D)
Gewebe-Einbettmedium	(Paraplast plus; Fa. Leica Biosystems, Richmond, USA)

Glycin, min. 99 %	(Fa. Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen, D)
Hämalaun	(Mayers, 1:2 sauer; Fa. MERCK KGaA, Darmstadt, D)
H ₂ O ₂ , 30 %	(Fa. MERCK KGaA, Darmstadt, D)
IL-1 β	(Fa. PromoCell GmbH, Heidelberg, D)
Isopropanol	(Fa. MERCK KGaA, Darmstadt, D)
Kollagenase	(type 4; Fa. PAA Laboratories GmbH, Cölbe, D)
Methanol	(Fa. Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen, D)
Mowiol/DABCO	(Fa. Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D)
Nährmedium	(Dulbecco's Modified Eagle Medium, DMEM; Fa. PAA Laboratories GmbH, Cölbe, D) (Keratinocyte Growth Medium, KGM; Fa. PromoCell GmbH, Heidelberg, D)
Nährmedium glycinfrei	(Supplemented Eagle's Minimum Essential Medium, SMEM; Fa. GIBCO/Invitrogen GmbH, Darmstadt, D)
Paraformaldehyd	(Fa. Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen, D)
PBS	(Dulbecco's, Ca ²⁺ u. Mg ²⁺ frei; Fa. PAA Laboratories GmbH, Cölbe, D)
PCR-Kit	(IQ™ SYBR® Green Supermix; Fa. Biorad, München, D)
Primer	(Fa. Metabion, Martinsried, D)
RNA Extraktionskit	(Rneasy® Mini Kit; Fa. Qiagen, Hilden, D)
Stable Peroxide Substrate Buffer, 1x	(Fa. Thermo Fisher Scientific GmbH, Bonn, D)
Stickstoff	(Fa. Linde, Höllriegelskreuth, D)
SupplementMix	(Fa. PromoCell GmbH, Heidelberg, D)
TBS x10	(Fa. MERCK KGaA, Darmstadt, D)
Triton X-100	(Fa. Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen, D)
10x Trypsin EDTA, 0.5 % (w/v)	(Fa. PAA Laboratories GmbH, Cölbe, D)
Trypsininhibitor	(Fa. Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, D)
Xylol	(Fa. AppliChem GmbH, Darmstadt, D)
Xylolersatz	(Roti®-Histol; Fa. Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D)

2.3 Verbrauchsmaterialien

Deckgläschen	(Microscope cover glasses, \varnothing 15 mm, Stärke 1; Fa. Menzel GmbH + Co. KG, Braunschweig, D) (Thermanox plastic coverslips, \varnothing 13 mm; Fa. NUNC, Rochester, NY USA)
Einfrierröhrchen	(Cryogenic Vials; Fa. Nalgene Nunc International, Hereford, UK)
Handschuhe	(Fa. Ansell GmbH, München, D)
Kulturflaschen	(250 ml; 75 cm ² Wachstumsfläche; Fa. Greiner Bio-One GmbH, Solingen, D)
Kulturschalen	(60 x 15 mm; 20,4 cm ² Wachstumsfläche; Fa. Greiner Bio-One GmbH, Solingen, D)
Objektträger	(75 x 25 x 1,00 mm; Fa. Thermo Fisher Scientific GmbH, Bonn, D)
Parafilm	(Fa. Pechiney Plastic Packaging Company, Chicago, USA)
Pasteurpipetten	(230 mm lang; Fa. Brand, Wertheim, D)
PCR-Reaktionsgefäße	(0,2 ml, domed lid; Fa. BioRad, München, D)
Pipetenspitzen	(Fa. Starlab GmbH, Ahrensburg, D)
Reaktionsgefäße	(Falcon 50 ml; Fa. Greiner, Nürtingen, D) (1,5 ml, Fa. Eppendorf, Hamburg, D)
Skalpelle	(Fa. Aesculap AG, Tuttlingen, D)
Sterilfilter	(Porengröße 0,2 μ l; Fa. Santorius Stedim, Aubagne, F)
Well-Platten	(6-well-Platten, 24-well-Platten; Fa. Greiner Bio-One GmbH, Solingen, D)
Zellschaber	(Fa. Labomedic GmbH, Bonn, D)

2.4 Antikörper

Anti-Glycine receptor	(Fa. SYSY, Göttingen, D)
-----------------------	--------------------------

Purified anti-NFκB p65 (Fa. BioLegend, Uithoorn, NL)
 Sekundärantikörper (EnVision anti rabbit, Fa. DAKO, Hamburg, D)

2.5 Geräte

Absaugpumpe (Fa. Schütt Labortechnik, Göttingen, D)
 Analysenwaage (Fa. Sartorius AG, Göttingen, D)
 Ausgießstation (Tissue-Tek®; Fa. Sakura, Staufen, D)
 Brutschrank (Fa. Thermo, Dreieich, D)
 Cryo 1°C Freezing Container (Fa. Nalgene Nunc International, Hereford, UK)
 Entwässerungs- und Einbettautomat (Tissue Tek VIP; Fa. Vogel, Gießen, D)
 Fluoreszenzmikroskop (AXIO Imager A1, Fa. Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen, D)
 Gefrierschrank (-20°C; Fa. Liebherr Premium GmbH, Ochsenhausen, D)
 (-80°C Revco; Fa. Thermo Fisher Scientific GmbH, Bonn, D)
 iCycler Thermal Cycler (Fa. BioRad, München, D)
 Kryobehälter (Arpege 40; Fa. AIR LIQUIDE GmbH, Düsseldorf, D)
 Kühlschrank (4°C; Fa. Liebherr Premium GmbH, Ochsenhausen, D)
 Lichtmikroskop (Fa. Exacta + OpTech GmbH, München, D)
 (Axioskop 2, Fa. Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen, D)
 Mikrotom (Microm cool-cut; Fa. Thermo Fisher Scientific Germany Ltd. & Co. KG, Bonn, D)
 Pinzette (Fa. Hammacher, Solingen, D)
 Pipetten (Fa. Eppendorf, Hamburg, D)
 Spektrophotometer (Nanodrop ND-1000; Fa. Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, D)
 Sterilbank (Biohazard; Fa. Clean Air, Landsberg, D)

Thermomixer	(Fa. Eppendorf, Hamburg, D)
Tissue-Tek®	(Sakura Finetek GmbH, Staufen, D)
Wasserbad	(Fa. Memmert GmbH, Schwabach, D)
Zentrifugen	(Fa. Thermo Fisher Scientific Germany Ltd. & Co. KG, Bonn, D) (Fa. Eppendorf, Hamburg, D) (Fa. Qualitron Systems, Michigan, USA)

2.6 Software

Digitales Bildanalyseprogramm	(Axio Vision Rel. 4.7)
iCycler-Software	(iCycler iQ Optical System Software Version 3.1)
Statistik- und Analysesoftware	(GraphPad Prism Version 4.03)
Tabellenkalkulationsprogramm	(Microsoft Excel 2007)
The National Center of Biotechnology Information	(http://www.ncbi.nlm.nih.gov/)

3. Methoden

3.1 Versuchsaufbau

Es wurden Gingivaproben bei oralchirurgischen Eingriffen im Sinne von Weisheitszahnentfernungen gewonnen und aufbereitet. Primäre Zelllinien wurden kultiviert und mit IL-1 β stimuliert und/oder mit Glycin behandelt. Zellen drei verschiedener Donoren wurden verwendet. Es folgte zum einen die quantitative Auswertung der Genexpression von β -Aktin, IL-1 β , IL-6, IL-8 und IL-10 (in Vorversuchen zusätzlich MMP2, MMP3 und VEGF) mit Hilfe der Real-Time-Polymerasekettenreaktion. Zum anderen wurden in Gewebeschnitten und Kulturen gingivaler Keratinozyten der Glycinrezeptor immunhistochemisch sowie mittels Immunfluoreszenz gefärbt und zuletzt NF κ B in Gingivaepithelzellen mit Hilfe von indirekter Immunfluoreszenz lokalisiert.

3.2 Zellkulturmethoden

Alle Arbeiten wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Die Keratinozyten wurden bei wasserdampfgesättigter Atmosphäre, 37°C und 5 % CO₂-Partialdruck im Brutschrank inkubiert. Unsterile Lösungen wurden mittels Sterilfilter der Porengröße 0,2 μ l filtriert.

3.2.1 Probengewinnung und Anlegen der Primärkultur von humanen gingivalen Keratinozyten

Die Gewebeproben stammen von Patienten mit gesunden, entzündungsfreien Parodontien. Die Gewebestücke fielen im Rahmen oralchirurgischer Weisheitszahnentfernungen an. Die Patientinnen und Patienten befanden sich im Universitätsklinikum Bonn in Behandlung (Poliklinik für Chirurgische Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde, Direktor: Universitäts-Prof. Dr. G. Wahl).

Aus den Gewebeproben wurden zum einen Gewebeschnitte für die Immunhistochemie hergestellt, zum anderen Zellen für die Primärkultur gewonnen.

Unmittelbar nach der Entnahme wurden die Gewebestücke in je ein 1,5 ml Eppendorf Gefäß mit 1 ml PBS (phosphatgepufferte Salzlösung) und 1 % Antibiotika/Antimykotikalösung überführt, um ein Austrocknen des Gewebes zu verhindern. Innerhalb weniger Stunden wurden die Proben wieder entnommen und in je ein 1,5 ml Eppendorf Gefäß mit 200-300 µl Kollagenase 2 gegeben. Nach einer Inkubationszeit von 2:30-3:00 h im Brutschrank bei 37°C wurden die Proben mit einer sterilen Pinzette in eine mit 2 ml PBS gefüllte Zellkulturschale gelegt und zum Waschen hin- und herbewegt. Anschließend wurde auf steriler, trockener Unterlage mit Hilfe von Pinzetten das Epithel vom Bindegewebe getrennt und, je nach Größe, das Epithelstück mit dem Skalpell zerteilt. Die so präparierten Epithelstücke wurden zusammen mit 1 fach Trypsin/EDTA (Ethylendiamintetraacetat) in einer Konzentration von 0,05 % in PBS in ein Eppendorf Gefäß gegeben und für 15 min bei einer Mischfrequenz von 1000 1/min und 37°C im Thermomixer platziert um die Epithelzellen aus dem Zellverband herauszulösen. Danach wurde Trypsininhibitor in einer Endkonzentration von 1 mg/ml hinzugegeben. Nach kurzem Auf- und Abpipettieren wurde für 2 min bei 800 g zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abpipettiert und verworfen. Etwa 50 µl Flüssigkeit wurden im Gefäß belassen. In eine mit 4 ml KGM (Keratinocyte Growth Medium, Vollmedium mit 1 % Antibiotika/Antimykotikalösung) und 100 µl Trypsininhibitor vorbereitete Schale (20,4 cm² Wachstumsfläche) wurden die Gewebereste und die Restflüssigkeit gegeben und die Schale anschließend in den Inkubator gestellt. Es sollten mindestens 2×10^6 Zellen pro Schale (20,4 cm² Wachstumsfläche) ausgesät worden sein. Zum Anheften und Ausbreiten der Zellen wurde die Schale bei 37°C und 5 % CO₂ Partialdruck für 2-4 Tage inkubiert, ohne dass ein Mediumwechsel durchgeführt wurde.

3.2.2 Herstellung der Nährmedien

Bei einer Zellkultur sind die Zellen vom Organismus isoliert. Unter diesen *in-vitro*-Bedingungen muss, u.a. durch das Medium, eine Umgebung geschaffen werden, die Proliferation, Wachstum und Ausübung von typischen Zellfunktionen erlaubt (Lidl, 2002). Als Nährmedium wurde für unsere Versuche serumfreies KGM benutzt. Es handelt sich dabei um ein Vollmedium, d.h. es enthält nicht nur essentielle, sondern auch nicht-essentielle Verbindungen und ermöglicht so eine höhere Zellwachstumsrate als ein Minimalmedium. Es wurden CaCl₂ und ein Supplement

Mix der Firma PromoCell zum Medium hinzugefügt, so dass eine Endkonzentration von 0,4 % Rinderhypophysenextrakt (Bovine Pituitary Extract), 0,125 ng/ml Epidermal Growth Factor, 5 µg/ml menschliches Insulin, 0,33 µg/ml Hydrocortison, 10 µg/ml menschliches Transferrin, 0,39 µg/ml Epinephrin und 0,15 mM CaCl₂ im Medium vorlag. Außerdem wurden 1 % Antibiotika/Antimykotikalösung (10.000 Units/ml Penicillin G; 10 mg/ml Streptomycinsulfat; 25 mg/ml Amphotericin B und 0,9 % NaCl) zugefügt.

Als glycinfreies Nährmedium wurde SMEM (Supplemented Eagle's Minimum Essential Medium) angesetzt. Dieses Medium enthält in der Grundzusammensetzung kein L-Glutamin, kein Biotin, kein CaCl₂ und kein Glycin. Als Zusätze wurden eine Antibiotika/Antimykotikalösung der Firma PAA in einer Endkonzentration von 1 % und 0,15 mM CaCl₂ hinzugefügt. Das Medium enthält kein Serum. SMEM ist ein Minimalmedium, d.h. es enthält nur die minimal nötigen Inhaltsstoffe, die für die Vitalitätserhaltung und das Wachstum der Zellen nötig sind. Das Verhalten der Keratinozyten unter diesen Bedingungen wurde in Vorversuchen getestet.

3.2.3 Mediumwechsel

Bestimmte Bestandteile des Nährmediums, wie z.B. Nährstoffe und Zusätze, werden von den Zellen metabolisiert oder zerfallen bei 37°C mit der Zeit. Außerdem häufen sich Stoffwechselendprodukte der Zellen an. Für das Wachstum und die Vitalitätserhaltung der Zellen ist es deshalb wichtig bei einer pH-Wertänderung des Mediums, angezeigt durch einen Farbumschlag des Phenolrotindikators ins Gelbliche oder Rot-violette, das Medium zu wechseln. Die Intervalle, in denen das Medium erneuert werden muss, variieren von Zelllinie zu Zelllinie (Lidl, 2002). Bei den untersuchten Keratinozyten erwies sich ein Rhythmus von 2-3 Tagen als optimal. So wurde ein annähernd konstantes Milieu für die Zellen gewährleistet. Das Medium wurde im Wasserbad bei 37°C erwärmt und das verbrauchte Medium unter sterilen Bedingungen mittels Pasteurpipette und Pumpe abgesaugt. In die 60 x 25 mm Kulturschalen wurden 4 ml, in die 6-well-Platten wurden pro Well 3 ml, in die 24-well-Platten 1 ml pro Well und in die 250 ml Kulturflasche 12-14 ml frisches Medium mit der Pipette vorsichtig hinzugegeben. Hierbei sollte der Zellrasen nicht zerstört werden. Es folgte weitere Inkubation im Brutschrank (37°C und 5 % CO₂ Partialdruck).

3.2.4 Subkultivierung der Zellen

Sobald die primären Zellen in der Originalschale eine Konfluenz von ca. 80-90 % zeigten, wurden sie passagiert. Dazu wurde mit Hilfe einer Pasteurpipette und einer Pumpe das Medium abgesaugt. Dann folgte ein Waschschrift mit PBS. Dabei wurden 2 ml PBS auf die Schale gegeben, die Schale geschwenkt und das PBS wieder abgesaugt. Dann wurden die Zellen mit Hilfe von Trypsin/EDTA 1-fach in einer Konzentration von 0,05 % in PBS abgelöst, während eine 10 minütige Inkubation im Brutschrank erfolgte. Es folgte eine Kontrolle unter dem Lichtmikroskop, um sicher zu gehen, dass sich die Zellen vollständig vom Boden der Schale gelöst hatten. 2 ml DMEM-Medium mit 10 % FCS-Serum (fötales Kälberserum) wurden benutzt um die Protease Trypsin zu blockieren. Die Zellsuspension wurde mit einer Pipette aufgenommen und auf zwei Eppendorf Gefäße verteilt. Es folgte eine Zentrifugation für 2 min bei 800 g. Der Überstand wurde abpipettiert und verworfen. Die Zellpellets wurden wieder zusammengeführt und mit 1 ml KGM resuspendiert. In einer Kulturflasche (75 cm² Wachstumsoberfläche) wurden 15 ml KGM vorgelegt und die Zellsuspension in die Flasche überführt. Die Zellen wurden weiter kultiviert. Mediumwechsel wurde im 2-3 Tagesrhythmus vorgenommen und bei Konfluenz wurde die Zellkultur gesplittet. Für das Ablösen der Zellen vom Flaschenboden wurden entsprechend höhere Volumina benutzt (mit 6 ml PBS gespült; auf 4 ml PBS 480 µl Trypsin/EDTA 1x; 15 ml DMEM als Trypsininhibitor in einem Falcon-Reaktionsgefäß).

Einige Zellen wurden bis zur dritten Passage kultiviert, dann direkt ausgesät und für die Stimulationsversuche oder die immunhistochemischen und Immunfluoreszenz-Analysen vorbereitet. Der Rest der Zellen wurde nach der zweiten Passage kryokonserviert.

3.2.5 Kryokonservierung der Zellen

Um auf die Zelllinien langfristig zugreifen zu können, wurden Zellen, die nicht unmittelbar gebraucht wurden, kryokonserviert. Dazu wurden die Zellen nach dem Ablösen mit Trypsin durch Zentrifugation pelletiert und in gekühltem, serumfreien Einfriermedium (Cryo-SFM der Firma Promocell) aufgenommen. Dann wurde die Zellsuspension in gekühlte Einfrierröhrchen abgefüllt, in einen Cryo 1°C Freezing Container der Firma Nalgene Nunc gestellt und für zwei

Tage bei -80°C gelagert. Der mit Isopropanol gefüllte Einfriercontainer gewährleistet ein kontrolliertes Abkühlen der Zellen um $-1^{\circ}\text{C}/\text{ml}$ pro min. Danach wurden die Zellen in einen Kryobehälter/Stickstofftank überführt.

Beim späteren Auftauen wurden die Zellen im 37°C -Wasserbad erwärmt und in 5 ml vorgewärmtes KGM-Medium pipettiert. Im Anschluss wurde die Zellsuspension 2 min bei 800 g zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und das Pellet in frischem Medium resuspendiert. Die Zellen wurden in Zellkulturflaschen (75 cm^2 Wachstumsoberfläche) weiter inkubiert (37°C und 5 % CO_2 Partialdruck). Nach weiterer Kultivierung und Mediumwechsel alle 2-3 Tage konnten die Zellen für Versuche ausgesät werden.

3.2.6 Zellaussaat

Für die Stimulationsversuche wurden die Zellen auf 6-well-Platten mit 3 ml KGM pro Well umgesetzt, wobei entsprechend dem bereits beschriebenen Verfahren vorgegangen wurde. Die Zellen befanden sich in der vierten Passage. Sie wurden weiter bei 37°C , 5 % CO_2 Partialdruck und Mediumwechsel alle 2-3 Tage kultiviert. Zum Zeitpunkt der Stimulation war eine 80-90 %ige Konfluenz erreicht.

Ein Teil der Zellen wurde auf 24-well-Platten mit 1 ml KGM pro Well ausgesät. Auf dem Boden der Wells wurden kreisförmige Plastikdeckgläschen (\varnothing 13 mm, einseitig beschichtet) als Vorbereitung für die immunhistochemische Analyse und Glasdeckgläschen (\varnothing 15 mm) für die Immunfluoreszenzanalysen platziert. Zur Anzucht der Zellen auf den Deckgläschen wurden sie im Brutschrank (37°C , 5 % CO_2 Partialdruck, Mediumwechsel alle 2-3 Tage) inkubiert. Als Vorbereitung für die Färbungen sollten die Zellen auf den Deckgläschen angewachsen sein und einen zu 80-90 % konfluenten Zellrasen gebildet haben.

3.3 Etablierung der Versuchsbedingungen

Im Rahmen von Vorversuchen wurden die beiden Medien, KGM und SMEM, verglichen. Dazu wurden Keratinozyten in KGM angezogen und kultiviert, wie in 3.2.1 beschrieben. Die Zellen

wurden auf 6-well-Platten ausgesät. Die Hälfte der Zellen wurde 1 h vor Versuchsbeginn in SMEM, glycinfrei, kultiviert. Der Versuch bestand aus einer Stimulation mit IL-1 β [1ng/ml] für verschiedene Zeitspannen. Die Stimulation wurde durch die Aspiration des Mediums inklusive des Stimulans IL-1 β beendet. Es folgte Zellernte, Zelllysis, RNA-Extraktion und cDNA-Synthese. Es wurde die quantitative Amplifizierung der Gene β -Aktin, IL-1 β , MMP2, MMP3, IL-6, IL-8 und VEGF per Real-Time-Polymerasekettenreaktion (PCR)-Analyse untersucht.

Für eine Optimierung der Konzentration des Stimulans IL-1 β und um den Einfluss der Glycinkonzentration während der Stimulation abschätzen zu können wurde ein weiterer Vorversuch angesetzt. Hierbei wurde bei gleichen Versuchsvoraussetzungen die IL-1 β Konzentration variiert und mit unterschiedlichen Glycinkonzentrationen kombiniert. Alle Zellen wurden 1 h vor Versuchsbeginn mit SMEM kultiviert. Nach Beendigung der Stimulationen, Zellernte, Zelllysis, RNA-Extraktion und cDNA-Synthese wurde eine Real-Time-PCR-Analyse für die Gene β -Aktin, IL-1 β und IL-6 durchgeführt.

3.4 Stimulation von Gingivaepithelzellen mit Interleukin-1 β / Behandlung mit Glycin

Nach Auswertung der Vorversuche wurden die Stimulationsversuche des Hauptversuches unter optimierten Bedingungen durchgeführt. Für die Stimulationsversuche im Rahmen der Genexpressionsanalyse wurden Keratinozyten auf 6-well-Platten zu einer Zelldichte von 80-90 % Konfluenz gezüchtet. Eine Stunde vor der Stimulation wurde einmal mit PBS gewaschen, um Glycinreste des glycinhaltigen Mediums (KGM) zu entfernen. Nach dem Waschschrift wurden alle Zellen in glycinfreiem Medium (3 ml SMEM) 1 h lang, bis zum Beginn der Stimulation, kultiviert. Vorher war dem Medium 0,15 mM CaCl₂ beigefügt worden. Die Stimulation erfolgte mit IL-1 β [5 ng/ml]. Die Stimulationsdauer betrug 30 min, bzw. 60 min. Gleichzeitig wurde die Glycinkonzentration des Mediums mit 0 mM und 1 mM Glycin variiert. Dadurch ergaben sich für den Versuch 8 Gruppen mit je 11 Proben (Tabelle 1). Die Primärzellen stammten von Gingivaproben dreier Patienten.

Tab. 1: Versuchsgruppen des Stimulationsversuches im Rahmen der Genexpressionsanalyse. 8 Gruppen mit je 11 Proben wurden für 30 und 60 min verschiedenen Konzentrationen an IL-1 β und Glycin ausgesetzt. Gruppe 1 und Gruppe 5 entsprechen den Kontrollen für die Auswertung der relativen Genexpressionsänderung. Gingivaproben von 3 Patienten, n = 11. \emptyset = keine Stimulation mit IL-1 β .

Stimulationsdauer [min]	30				60			
Gruppe	1	2	3	4	5	6	7	8
Glycinkonzentration [mM]	0	0	1	1	0	0	1	1
IL-1β-Stimulation[ng/ml]	\emptyset	5	\emptyset	5	\emptyset	5	\emptyset	5
Replikate	11	11	11	11	11	11	11	11

Die Stimulation begann mit einem Mediumwechsel. In 3 ml frischem SMEM pro Well (9,6 cm² Wachstumsoberfläche) war die entsprechende Konzentration an IL-1 β enthalten. Das Glycin (Fa. Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen) wurde zuvor in Zellkulturwasser gelöst um zunächst eine 1 molare Lösung herzustellen, steril filtriert (Porengröße des Filters 0,2 μ l) und je nach Gruppe dem Medium zugegeben. Beendet wurde die Stimulation durch die Aspiration des Mediums, es folgte sofort die Zellernte. Dazu wurde zweimal mit PBS (ohne Ca²⁺ und Mg²⁺) sorgfältig gewaschen. Dann wurden die Zellen in RLT-Lysispuffer (300 μ l/Well) der Firma Qiagen mit einem sterilen Schaber von oben nach unten vorsichtig abgelöst. Die Zellsuspension wurde mittels Pipette noch einige Male durchmischt, aufgenommen und die Zellen eines Wells in je ein steriles, RNase freies Eppendorf Gefäß (1,5 ml) gegeben und bei -80°C weggefroren.

Für die Stimulation von Gingivaepithelzellen mit IL-1 β und die Behandlung mit Glycin im Rahmen der zellbiologischen Analysen wurden die auf Deckgläsern angewachsenen Keratinozyten genutzt. Sie zeigten zum Zeitpunkt der Stimulation einen zu 80-90 % konfluenten Zellrasen. Für den immunhistochemischen Nachweis und die Immunfluoreszenzmarkierung des Glycinrezeptors wurden die Zellen nicht stimuliert. Für die Markierung des Transkriptionsfaktors Nf κ B wurden Stimulationsversuche, angelehnt an den Hauptversuch, durchgeführt. Wegen der Eigenfluoreszenz der Plastikdeckgläschen wurden die Zellen für die Immunfluoreszenzmarkierung auf Glasdeckgläschen angezogen. Die Zellen wurden 16 h vor Stimulationsbeginn mit PBS gewaschen und dann in SMEM (mit 0,15 mM CaCl₂) kultiviert. Einem Teil der Zellen wurde 1 h vor Stimulation SMEM (mit 0,15 mM CaCl₂) + 1 mM Glycin als Medium gegeben. Die

Stimulation erfolgte mit 5 ng/ml IL-1 β für 2 h und 6 h, angelehnt an die Arbeiten von Steinberg et al. (2006) und Vardar-Sengul et al. (2009). Unstimulierte Zellen in beiden Gruppen dienten als Kontrollen. Nach Stimulationsende wurde das Medium abgesaugt, mit PBS gewaschen und die Deckgläschen für die Immunfluoreszenzmarkierung vorbereitet.

3.5 Verfahren zur quantitativen Genexpressionsdarstellung

3.5.1 RNA-Extraktion

Die RNA-Extraktion wurde mit dem Rneasy MiniKit der Firma Qiagen (Hilden) durchgeführt, das Herstellerprotokoll jedoch leicht modifiziert. Die Zellsuspensionen der verschiedenen Gruppen wurden nach der Zellernte in je einem Eppendorf Gefäß bei -80°C aufbewahrt. Die Zellen in Lysis-Puffer wurden auf Eis aufgetaut. Der Lysispuffer enthält Mercaptoethanol und Guanidiumthiocyanat. Dadurch wird eine Zelllyse erreicht und RNasen (Ribonukleasen) werden inaktiviert, so dass intakte RNA isoliert werden kann. Es wurden je 300 μ l Ethanol (70 %) zugegeben und durch Auf- und Abpipettieren der Inhalt des Reaktionsgefäßes vermischt. Nun wurde die gesamte Lösung eines Reaktionsgefäßes auf die Membran einer RNeasy mini spin Säule pipettiert. Der 70%ige Ethanol bewirkt, dass die RNA an die Kieselerde-Membran gebunden wird. Durch eine Zentrifugation für 30 sec bei 800 g wurde nun nicht gebundenes Material abzentrifugiert, im unteren Teil der Säule aufgefangen und verworfen. Die RNA blieb an die Matrix gebunden. Es folgte ein Waschvorgang mit 700 μ l RW1-Buffer. Es wurde wieder 30 sec lang mit 800 g zentrifugiert und das aufgefangene Filtrat verworfen. Um mögliche Kontaminationen an der Membran herauszuwaschen erfolgte ein Waschen mit 500 μ l RPE-Buffer mit anschließender Zentrifugation (1 min; 800 g). Das Filtrat wurde mitsamt des Sammelgefäßes verworfen und die Säule auf ein steriles Eppendorf Gefäß (1,5 ml), das als neues Sammelgefäß diente, gesteckt. Hierbei war darauf zu achten, dass kein Restethanol (RPE-Buffer) an der Säule verblieb, da sonst nachfolgende Reaktionen eventuell behindert worden wären. Es folgte die Elution der RNA mit zweimal 30 μ l RNase-freiem Wasser und zweimaliger Zentrifugation (jeweils 1 min und 800 g). Die isolierte RNA in 60 μ l RNase-freiem Wasser konnte bei -80°C weggefroren werden.

3.5.2 RNA-Quantifizierung

Die Konzentrationsbestimmungen der isolierten RNA-Proben erfolgte mit dem NanoDrop®-ND-1000-Spektrophotometer der Firma Peqlab Biotechnologie GmbH. Für eine Messung wurde 1 µl der isolierten RNA in RNase-freiem Wasser verwendet. Die RNA-Konzentration wurde durch eine Absorptionsmessung bei der Wellenlänge 260 nm bestimmt. Als Leerwert wurde RNase-freies Wasser verwendet. Eine Absorptionseinheit A_{260} entspricht 40 µg RNA/ml. Nach den Messungen konnte die RNA-Konzentration c über die folgende Formel berechnet werden:

$$c \left[\frac{\mu\text{g RNA}}{\text{ml}} \right] = A_{260} \times 40$$

3.5.3 cDNA-Synthese

Zur Synthese der cDNA wurde das iScript™ Select cDNA Synthesis Kit benutzt. Zur cDNA-Erststrangsynthese wurden nach der RNA-Quantifizierung 1 µg denaturierte RNA von jeder Probe in je ein 1,5 ml Eppendorf Gefäß pipettiert und je 2 µl oligo (dt)₂₀ primer hinzugefügt, gemischt und abzentrifugiert (30 sec bei 800 g). Es folgte die Denaturierung: jede Probe wurde für 5 min im Thermomixer auf 65°C erhitzt um so die RNA zu entfalten und die Bindung des Primers an den Poly-A-Schwanz der RNA zu ermöglichen. Für den Mastermix wurden pro Probe 4 µl 5x iScript select reaction mix und 1 µl iScript reverse transcriptase in einem Eppendorf Gefäß gemischt und herunterzentrifugiert (30 sec bei 800 g). Nach dem Abkühlen der Proben und kurzem Abzentrifugieren des Kondensats wurden jedem Reaktionsgefäß 5 µl des Mastermix hinzugefügt, gemischt und abzentrifugiert (30 sec bei 800 g). Nun wurden die Proben 60 min lang bei 42°C im Thermomixer inkubiert, so dass optimale Bedingungen für den Ablauf der reversen Transkription gegeben waren. Anschließend wurde die Temperatur für 15 min auf 85°C erhöht um die cDNA-Synthese zu stoppen. Das Endprodukt wurde nach dem Abkühlen und kurzem Abzentrifugieren des Kondensats mit je 30 µl DNase freiem Wasser aufgefüllt, zentrifugiert und bei -20°C weggefroren.

3.5.4 Real-Time-PCR

Ansatz und Durchführung der Real-Time-PCR

Die Echtzeit-Polymerasen-Kettenreaktion ist eine molekularbiologische Methode, die zur Amplifizierung von DNA oder RNA dient. Es wurden Real-Time-PCR-Analysen der Gene β -Aktin, IL-1 β , MMP2, MMP3, IL-6, IL-8 und VEGF im Rahmen der Vorversuche und β -Aktin, IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10 im Hauptversuch durchgeführt. Hierzu wurde der iCycler® Thermal Cycler und IQ™ SYBR® Green Supermix der Firma BioRad, München, verwendet. In dem Reagenzmix war der interkalierende Fluoreszenzfarbstoff SYBRGreen I® enthalten. Er bindet in der doppelsträngigen DNA, absorbiert Licht der Wellenlänge 494 nm und emittiert Licht mit 524 nm (Zipper et al., 2004). So detektiert er die PCR-Produkte. Mit zunehmender Menge an PCR-Produkt steigt also die gemessene Fluoreszenz. Der iCycler zeichnet die amplifikationsspezifischen Fluoreszenzsignale kontinuierlich auf. Um Pipettierfehler zu minimieren wurde ein Gesamtgemisch (Mastermix) der Reagenzien in einem Eppendorf Gefäß angefertigt. 24 μ l des Mastermixes wurden eingesetzt und setzten sich im einzelnen zusammen aus: 12,5 μ l IQ™ SYBR® Green Supermix, 11,375 μ l DNase freiem Wasser und 0,125 μ l des jeweiligen Primermixes. Bei einem PCR-Gesamtvolumen von 25 μ l (24 μ l Mastermix + 1 μ l cDNA) betrug die Primerkonzentration 0,5 pmol/ μ l. Der Mastermix wurde vorsichtig gemischt und kurz in der Tischzentrifuge zentrifugiert. Im PCR-Reaktionsgefäß (0,2 ml) wurden je Probe 1 μ l cDNA vorgelegt und 24 μ l vom Mastermix dazugegeben. Nach kurzer Zentrifugation in der Tischzentrifuge wurden die Reaktionsgefäße im iCycler platziert und das Programm gestartet. Dieses begann mit einer 5 minütigen Denaturierungsphase bei 95°C. Nun folgte der eigentliche Real-Time-PCR-Zyklus mit einer Denaturierung der cDNA-Moleküle (95°C; 15 sec), d.h. die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den DNA-Doppelsträngen wurden gelöst. Während der folgenden Hybridisierung kühlte der iCycler auf die für das jeweilige Primerpaar optimale Annealingtemperatur (z.B. 68°C, 30 sec für IL-1 β Primer) ab. Die optimale Temperatur wurde mittels Temperaturgradienten ermittelt. Das Primerpaar lagert sich an zwei Stellen eines Einzelstranges an und markiert so die Zielsequenz, die später mit Hilfe der Taq Polymerase und der dNTPs (Desoxynucleotidtriphosphate) amplifiziert wird. Es folgte die Elongationsphase für 30 sec bei 72°C. Dies ist die optimale Temperatur für die Taq Polymerase, ein Enzym, das den Aufbau des gegenläufigen

DNA-Stranges katalysiert. Dieser definierte Zyklus wurde insgesamt 40 mal wiederholt. Die Amplifizierung der gewünschten DNA-Abschnitte erfolgt exponentiell. Zusätzlich zu den Proben wurden eine Positivkontrolle und eine Negativkontrolle mitgeführt. Die Positivkontrolle bestand aus einem zuvor gebildeten und sequenzierten PCR-Produkt, das mit Hilfe des spezifischen Primer synthetisiert wurde. Als Negativkontrolle wurde Wasser statt cDNA benutzt. Nach der beendeten Real-Time-PCR wurde ein Dissoziationsprogramm angeschlossen. Das PCR-Produkt wurde langsam erhitzt und der Schmelzpunkt ermittelt. Dieser ist für jedes Produkt, je nach Länge und Sequenz, spezifisch. Wären außer dem gewünschten Produkt noch andere amplifiziert worden, z.B. wegen Verunreinigung der Proben, hätte dies festgestellt werden können.

Primerdesign und Effizienzprüfung

Die Primer wurden alle mit einer Software des National Center of Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) mit folgenden Vorgaben entworfen: die Oligonukleotidprimer sollten Intron-überspannend sein, damit sie nur an cDNA binden. Sie sollten etwa 200 bp lang sein, Anfang und Ende sollte nicht komplementär sein und die Annealingtemperatur für Vorwärts- und Rückwärtsprimer sollte möglichst gleich sein (NCBI, 2011). Die Primer wurden von der Firma Metabion, Martinsried synthetisiert. Die verwendeten Primersequenzen sind in Tab. 2 aufgelistet. Die jeweilige Annealingtemperatur wurde mit einem Temperaturgradienten bestimmt und die spezifische Amplifikation in Ethidiumbromid-Agarosegel verifiziert. Auch die Schmelzkurve des Dissoziationsprotokolls diente zur Überprüfung der Primer. Um die PCR-Effizienz zu prüfen wurde eine Verdünnungsreihe der primerspezifischen, sequenzierten PCR-Produkte angesetzt und die Amplifikationsraten der angesetzten Verdünnungsreihe verglichen. Aus den Werten ließ sich eine Standardkurve generieren. Aus der exponentiellen Funktion wurde ein lineares Regressionsmodell, umgekehrt zur logarithmischen Funktion der Fluoreszenzaufzeichnung aus der PCR, erstellt. Aus der Steigung konnte dann die Effizienz ermittelt werden ($E=10^{-1/Steigung\ der\ Standardkurve}$). Im Idealfall liegt die Effizienz eines Primers bei 100 % ($E=2$), dann wird in jedem Zyklus die PCR-Produktmenge verdoppelt. Den genauen Effizienz-Wert zu kennen ist vor allem dann wichtig, wenn mit unterschiedlichen Primern generierte Werte miteinander verglichen werden sollen.

Tab. 2: PCR-Primersequenzen für β -Aktin, IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, MMP2, MMP3 und VEGF (sense: Vorwärts-Primer; antisense: Rückwärts-Primer)

Gen	PCR-Primersequenz
β -Aktin	sense 5'-CATGGATGATGATATCGCCGCG-3' antisense 5'-ACATGATCTGGGTCATCTTCTCG-3'
IL-1 β	sense 5'-ATGGCAGAAGTACCTGAGCTCGC-3' antisense 5'-TTAGGAAGACACAAATTGCATGGTG-3'
IL-6	sense 5'-ATGAACTCCTTCTCCACAAGC-3' antisense 5'-CTACATTTGCCGAAGAGCCC-3'
IL-8	sense 5'-ATGACTTCCAAGCTGGCCGTGG-3' antisense 5'-TGAATTCTCAGCCCTCTTCAAAAAC-3'
IL-10	sense 5'-TTAAGGGTTACCTGGGTTGC-3' antisense 3'-GCCTTGCTCTTGTTCACA-3'
MMP2	sense 5'-TTCCTGGGCAACAAATATGA-3' antisense 5'-GAACAGGCTGTACCCTTGGT-3'
MMP3	sense 5'-ATCGATGCAGCCATTTCTGATAAGG-3' antisense 5'-TCAACAATTAAGCCAGCTGTTACT-3'
VEGF	sense 5'-CAGACCCTGGTGGACATCTT-3' antisense 5'-TTGATCCGCATAATCTGCAT-3'

Auswertung der Real-Time-PCR

Das Dissoziationsprotokoll sollte nur einen Gipfel in der Schmelzkurve der PCR-Produkte zeigen. Mehrere Gipfel sprechen für eine Verunreinigung der Probe oder eine nicht spezifische Primersequenz.

Da sich im Optimalfall in jedem PCR-Zyklus die PCR-Produktmenge verdoppelt, kann die Polymerasenkettenreaktion als exponentielle Funktion dargestellt werden. Am Übergang von der linearen zur exponentiellen Phase legt die Software des iCyclers einen Schwellenwert fest. Die Kurve jeder Probe kreuzt diesen Schwellenwert an der Stelle, an der die PCR-Produktkonzentration ein stärkeres Fluoreszenzsignal erzeugt als die Hintergrundfluoreszenz im

Reagenzgefäß. Diese PCR-Produktkonzentration wird nach einer bestimmten Zyklenzahl erreicht, die im Cycle threshold (C_t -Wert) ausgedrückt wird (Gibson et al., 1996). Je weniger Zyklen benötigt werden um den Schwellenwert zu erreichen, desto mehr cDNA des Zielgens war am Anfang in der Probe (Higuchi et al., 1993). Somit stellt der C_t -Wert ein Maß für die Quantität der cDNA dar. Die Berechnung der relativen Expressionsänderung erfolgte nach der $\Delta\Delta C_t$ -Methode. Hierbei wird das PCR-Signal einer durch Real-Time-PCR analysierten Probe, ausgedrückt durch den C_t -Wert, zunächst mit einem Referenzgen normalisiert und so der ΔC_t -Wert gebildet ($C_t^{\text{Zielgen}} - C_t^{\text{Referenzgen}} = \Delta C_t$). β -Aktin, eines der sogenannten Referenzgene, ist ein ubiquitär vorkommendes Protein des Zytoskeletts. Es wird in den meisten Zellen reichlich exprimiert (Bustin, 2000). Die mRNA-Synthese dieses Gens wird als konstant angesehen, auch unter experimenteller Stimulation der Zellen. Deshalb ist β -Aktin als Referenzgen geeignet (Marten et al., 1994). Der ermittelte ΔC_t -Wert wird dann in Relation zum gleichermaßen ermittelten ΔC_t -Wert einer anderen Probe gesetzt. Diese andere Probe war eine unstimulierte Kontrolle und wird auch Kalibrator genannt. Es ergibt sich ein $\Delta\Delta C_t$ -Wert.

$$\Delta\Delta C_t = \left[\left(C_t^{\text{Zielgen}} - C_t^{\text{Referenzgen}} \right) \text{ der unstimulierten Kontrolle} \right] - \left[\left(C_t^{\text{Zielgen}} - C_t^{\text{Referenzgen}} \right) \text{ der zu untersuchenden Probe} \right]$$

Bei dieser Methode werden die Primereffizienzen in der Rechnung nicht berücksichtigt. In diesem Falle stellte das kein Problem dar, da die Expression für β -Aktin und für die Zielgene aus demselben Zelllysat bestimmt wurden, die Amplikons nicht länger als 150 bp waren, die Primer optimiert wurden und die Primereffizienzen (Tab. 3) nahe $E=2$ waren. Die Formel $\text{Ratio} = 2^{-\Delta\Delta C_t}$ beschreibt nun die Genexpressionsänderung einer Probe, normalisiert zu einem Referenzgen und relativ zum Kalibrator (Livak und Schmittgen, 2001).

3.6 Statistische Datenauswertung

Die Datenaufbereitung erfolgte in Microsoft Excel 2007. Wie in 3.5.3 beschrieben, wurden die Ratio-Werte der Proben für folgende Gene im Hauptversuch errechnet: β -Aktin, IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10. Zur Berechnung der ΔC_t -Werte wurden Mittelwerte aus den Daten der unstimulierten Kontrollen gebildet. Es wurden Mittelwerte der $2^{-\Delta\Delta C_t}$ Werte von 11 Proben pro Stimulationsgruppe gebildet. Dementsprechend wurden Standardabweichungen berechnet. Die

graphische Darstellung erfolgte mit Hilfe des Programms GraphPad Prism Version 4.03. Zur Veranschaulichung der Daten wurden Balkendiagramme erstellt, aus denen man Mittelwert und Standardabweichung ablesen kann. Es wurde der T-Test für unabhängige Stichproben durchgeführt. So konnten statistisch signifikante Unterschiede ermittelt werden. Die Signifikanzschwelle wurde auf 5 % ($p < 0,05$) festgelegt.

3.7 Immunhistochemische Färbung der Gewebeschnitte und Zellen

Zum einen wurden Gingivagewebeschnitte genutzt, um mittels Immunhistochemie den Glycinrezeptor anzufärben. Zum anderen wurde ein Teil der kultivierten Zellen für den immunhistochemischen Nachweis des Glycinrezeptors in humanen gingivalen Keratinozyten vorbereitet.

3.7.1 Prinzip der Immunhistochemie

Das Prinzip der immunhistochemischen Färbung basiert darauf, dass mit Hilfe von Antikörpern spezielle Antigene einer Zelle sichtbar gemacht werden. Der Primärantikörper erkennt mit seinem F(ab)₂-Fragment das Antigen. Im Rahmen dieser Arbeit fungierte als Antigen der Glycinrezeptor. Dementsprechend wurde ein Primärantikörper Anti-Glycine receptor der Firma SYSY, Göttingen, eingesetzt. Dieser monoklonale Antikörper vom Isotyp IgG1 ist spezifisch für die $\alpha 1$ -Untereinheit des Glycinrezeptors in humanen (sowie einigen tierischen) Zellen. Er wurde durch die Immunisierung von Kaninchen gewonnen. In dieser Arbeit wurde ein Sekundärantikörper eingesetzt, der mit einer Meerrettichperoxidase gekoppelt ist. Er erkennt das Fc-Fragment des Primärantikörpers. Durch die Reaktion der Peroxidase mit ihrem Substrat entsteht ein sichtbarer Farbstoff. Da das Enzym mit dem Sekundärantikörper und nicht mit dem Primärantikörper verbunden ist, nennt man dieses Verfahren die indirekte Methode.

3.7.2 Protokoll der Immunhistochemie

Protokoll der Immunhistochemie für Gewebeschnitte

Die Gewebeproben wurden 24 h lang in 4 %igem neutral gepufferten Formaldehyd fixiert. Dann wurde das Gewebestück auf etwa 4 mm x 4 mm x 4 mm zugeschnitten und in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert (in 70 %igem Ethanol, dann in 80 %igem Ethanol, in 95 %igem Ethanol, nochmals in 95 %igem Ethanol und in 100 %igem Ethanol). Dann wurde mittels eines Xylolersatzes der Alkohol aus dem Gewebe entfernt. Diese Schritte wurden durch den Entwässerungs- und Einbettautomaten der Firma Vogel durchgeführt. Danach wurde das Gewebestück mit flüssigem Paraffin (55-58°C) infiltriert und eingebettet. Es wurde ein Tissue-Tek®-Ausgießstation der Firma Sakura benutzt und Einbettkassetten von Labomedic. Mit dem Mikrotom wurden 3 µm dicke Schnitte angefertigt. Abschließend wurden die Präparate 24 h bei 37°C getrocknet.

Vor der immunhistochemischen Färbung der Gewebeschnitte müssen diese entparaffiniert und rehydratisiert werden, sonst kann es zu Störungen der nachfolgenden Immunreaktion und so zu einem fehlerhaften Färbemuster kommen. Der aus den Gingivaproben angefertigte Gewebeschnitt wurde durch folgende Reagenzien geführt: zweimal für je 10 min durch Xylol, dann zweimal für je 5 min durch absoluten Alkohol. Es folgten 5 min in 96 %igem Alkohol, dann 5 min in 70 %igem Alkohol und abschließend 5 min in destilliertem Wasser. Dann schloss sich ein 10-minütiges Spülen in TBS (Tris buffered saline; 1-fach Lösung) an. Es erfolgte eine 10-minütige Blockierung der endogenen Peroxidase in 70 ml Methanol und 700 µl 30 %igem H₂O₂. Die Blockierung erfolgte im Dunkeln. Es wurde anschließend 10 min lang in TBS gespült. Die Inkubation mit dem Primärantikörper wurde bei 4°C über Nacht durchgeführt. Der Primärantikörper Anti-Glycine receptor wurde in einer Verdünnung 1:50 in 1 %igem TBS/BSA (engl. albumin bovine serum) verwendet. Jeweils ein Schnitt in jeder Färbeserie diente als Negativkontrolle und wurde anstatt mit dem Primärantikörper mit Antikörperverdünnungsmedium behandelt. Die darauffolgenden Schritte erfolgten identisch für Negativkontrollen wie für die anderen Gewebeschnitte. Ebenso wurde bei jeder Färbung eine Positivkontrolle mitgeführt. Nach der Nacht wurden die Schnitte für 10 min in TBS gespült und es folgte die Inkubation mit dem HRP-konjugierten Sekundärantikörper (DAKO Envision Rabbit) für

30 min. Nach wiederholtem 10-minütigen Spülen in TBS wurde 8 min lang mit Diaminobenzidin (DAB) gefärbt. Anschließend wurde erneut mit TBS gewaschen. 1 sec lang wurde mit Mayers saurem Hämalaun gegengefärbt, um die Zellkerne sichtbar zu machen. Das Bläuen erfolgte für 4 min unter fließendem Leitungswasser. Nun wurden die Präparate dehydratisiert. Dazu wurde eine aufsteigende Alkoholreihe angesetzt (Zweimal 2 min in absolutem Alkohol, dann zweimal 2 min in Xylol). Abschließend wurden die Schnitte mit DePex eingedeckt.

Protokoll der Immunhistochemie für Zellen

Von den Plastikdeckgläschen mit adhären Zellen in der 24-well-Platte wurde das PBS mittels Pasteurpipette und Pumpe abgesaugt. Die Deckgläschen wurden mittels Pinzette vorsichtig entnommen und in eine frische 24-well-Platte gelegt. Es folgten drei Waschschrirte mit je 400 µl PBS für 5 min. Nach dem letzten Absaugen des PBS wurden die Zellen mit 350 µl Paraformaldehyd 4 % pro Well für 10 min fixiert. Es folgten drei Waschschrirte à 5 min mit je 400 µl PBS. Nach dem letzten Absaugen wurde je Well 350 µl Triton X-100 für 6 min hinzugegeben. Triton solubilisiert die Zellmembran. Es folgten wiederum drei Waschschrirte mit je 400 µl PBS für 5 min. Nach dem letzten Absaugen des PBS wurden unspezifische Antigenbindungsstellen durch die einstündige Inkubation mit 1%igem BSA blockiert. Anschließend wurden 200 µl des zellspezifischen Primärantikörpers (Anti-Glycine receptor) auf die Wells gegeben, so dass die Deckgläschen ganz bedeckt waren. Nun wurde über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Der Antikörper gegen den Glycinrezeptor wurde in einer Konzentration von 1:50 eingesetzt. Bei jeder Färbung wurden Positiv- und Negativkontrollen mitgeführt. Am darauffolgenden Morgen wurde zunächst dreimal mit 400 µl PBS für 5 min gewaschen, um die ungebundenen Antikörper herauszuspülen. Dann wurde der Sekundärantikörper der Firma DAKO (Envision Rabbit) sparsam auf die gesamte Deckgläschenoberfläche gegeben und bei Raumtemperatur für 30 min inkubiert. Danach wurde mit 200 µl PBS gewaschen und dann für 8 min mit je 170 µl Diaminobenzidin (DAB) gefärbt. Es folgten drei Waschschrirte mit je 200 µl PBS für 5 min. Dann erfolgte die Gegenfärbung mit Hämalaun (1:2 sauer) für 5 sec. Abschließend wurden die Präparate 5 min gewässert und dann mit Aquatex, einem wässrigen Eindeckmittel, eingedeckt.

3.7.4 Auswertung der Immunhistochemie

Die Präparate wurden im Durchlichtmikroskop der Firma Zeiss untersucht. Sowohl bei der Zytochemie, als auch bei den Gewebeschnitten wurde auf Expression und Lokalisation des Glycinrezeptors geachtet. Von allen Präparaten wurden Bilder aufgenommen. Es wurde eine 10- bis 40-fache Objektivvergrößerung gewählt. Es erfolgte eine genaue Inspektion und Begutachtung der Präparate, ohne jedoch eine Graduierung der Färbereaktion vorzunehmen.

3.8 Immunfluoreszenzanalyse der Zellen

Ein weiterer Teil der kultivierten Zellen wurde auf Glasdeckgläschen vorbereitet, um mittels Immunfluoreszenz den Glycinrezeptor in Keratinozyten zu markieren. Weiterhin wurde der Transkriptionsfaktor NfκB im Zellzytoplasma und im Kern mit Hilfe von Immunfluoreszenz untersucht.

3.8.1 Prinzip der Immunfluoreszenz

Benutzt man als Sekundärantikörper einen Antikörper, der an fluoreszierende Substanzen, sogenannte Fluorochrome, gekoppelt ist und bedient sich der Fluoreszenzmikroskopie, so spricht man von indirekter Immunfluoreszenz. Der bereits beschriebene Primärantikörper gegen den Glycinrezeptor wurde auch bei der Immunfluoreszenzanalyse verwendet. Für den Nachweis von NfκB wurde ein Primärantikörper genutzt, der mit der C-terminalen Region des Transkriptionsfaktors reagiert (bisher getestet bei humanen, Ratten- und Mauszellen). Es handelte sich ebenfalls um einen Antikörper der Klasse IgG, der durch die Immunisierung von Kaninchen generiert wurde. Ein Immunfluoreszenz-Cy3-Sekundärantikörper wurde verwendet, um den Purified anti-NFκB p65 Antikörper und den Anti-Glycine receptor-Antikörper zu detektieren. 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI), ein fluoreszenzmarkierter Ligand, wurde gleichzeitig eingesetzt, um den Zellkern sichtbar zu machen. Dies ist möglich, da DAPI an DNA bindet. DAPI emittiert nach Anregung blaues Licht, somit kommt es nicht zu Signalüberschneidungen mit dem eingesetzten, rot leuchtenden Sekundärantikörper.

3.8.2 Protokoll der Immunfluoreszenz

Das PBS wurde nach den Stimulationsversuchen mittels Pasteurpipette und Pumpe von den Glasdeckgläschen mit adhärenen Zellen abgesaugt, die Deckgläschen mittels Pinzette vorsichtig entnommen und in eine frische 24-well-Platte gelegt. Es folgten drei Waschschrirte mit je 400 µl PBS für 5 min. Nach dem letzten Absaugen des PBS wurden die Zellen mit 350 µl Paraformaldehyd 4 % pro Well für 10 min fixiert. Es folgten drei Waschschrirte à 5 min mit je 400 µl PBS. Nach dem letzten Absaugen wurden je Well 350 µl Triton X-100 für 6 min hinzugegeben. Es folgten wiederum drei Waschschrirte mit je 400 µl PBS für 5 min. Nach dem letzten Absaugen des PBS wurden unspezifische Antigenbindungsstellen durch die einstündige Inkubation mit 1 %igem BSA blockiert. Anschließend wurden 200 µl des zellspezifischen Primärantikörpers (Anti-Glycine receptor oder Purified Anti-NFκB P65 Antibody) auf eine mit Parafilm abgedeckte Glasplatte gegeben und die Deckgläschen so darauf platziert, dass die zu färbende Oberfläche auf der Glasplatte mit dem Antikörper zu liegen kam und ganz bedeckt war. Nun wurde über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Der Anti-Glycine receptor-Antikörper wurde in einer Konzentrationen von 1:250 eingesetzt, der Purified Anti-NFκB P65 Antikörper in der Konzentration 1:100 in 1 %iger TBS/BSA Lösung. Diese TBS/BSA Lösung wurde am selben Tag frisch angesetzt mit 0,1 g BSA-Pulver und 10 ml 1x TBS-Puffer. Positiv- und Negativkontrollen wurden bei jeder Färbung mitgeführt, um unspezifische Anfärbungen sowie Hintergrundfärbungen zu erkennen bzw. auszuschließen. Am nächsten Tag wurden die Deckgläschen vorsichtig zurück in die Wells gebracht und dreimal 5 min mit 400 µl gespült. Für die Inkubation mit dem Sekundärantikörper wurden die Deckgläschen wieder auf der Glasplatte platziert, die mit 45 µl Antikörpermisch pro Deckgläschen bestückt war. Die Inkubation dauerte 50 min im Dunkeln bei Raumtemperatur. Dann wurden die Deckgläschen wieder in die Wells gelegt und mit 400 µl PBS dreimal 5 min gespült. Für die Kernfärbung wurde DAPI als Stocklösung 1 mg/ml mit Zellkulturwasser 1:5000 verdünnt, auf die Glasplatte gegeben, darauf die Deckgläschen platziert und 8 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Zurück in den Wells wurden die Präparate zweimal mit Aqua dest. gewaschen und dann mit Mowiol/DABCO eingedeckt.

3.8.3 Auswertung der Immunfluoreszenz

Für die Fluoreszenzmikroskopie stand ein Epifluoreszenzmikroskop der Firma Zeiss zu Verfügung. Es wurde der Fluorchrom zur Lichtemission angeregt, das markierte Antigen leuchtete rot. Eingebaute Filter stellen sicher, dass nur das abgestrahlte Licht beobachtet wird. Um die Zellkerne beurteilen zu können, wurden die Präparate im DAPI-Kanal betrachtet. Angeregt mit ultraviolettem Licht fluoresziert DAPI mit blauer bis cyaner Farbe. Nach Interkalation in die DNA beobachtet man ein Emissionsmaximum bei 461 nm. Mit einer Kamera wurden Bilder in 40 facher Objektivvergrößerung angefertigt. Das Programm Axio Vision Rel. 4.7 ermöglichte es, Bilder übereinanderzulegen und so mit DAPI markierte Zellkerne in Bezug zum markierten Glycinrezeptor zu setzen. Zur inhaltlichen Auswertung der NFκB-Analysen wurde die zelluläre Lokalisation von NFκB in Bezug zu den Stimulationsversuchen gesetzt.

4. Ergebnisse

4.1 Nachweis des Glycinrezeptors in humanen gingivalen Keratinozyten

4.1.1 Immunhistochemischer Nachweis des Glycinrezeptors im Gewebeschnitt und *in-vitro*

Der Gewebeschnitt aus einer Gingivabiopsie wurde mit einem Anti-Glycine receptor-Antikörper gefärbt. Unter dem Mikroskop zeigten sich stark gefärbte Keratinozyten in allen Zellschichten des oralen Gingivaepithels, außer im Stratum corneum. Die erkennbare Färbereaktion war über das gesamte Zellinnere verteilt, eine primär membranständige Färbung war mit der gewählten Darstellung nicht dokumentierbar (Abb. 5A, 5B).

Für den *in-vitro*-Nachweis des Rezeptors wurden die auf Deckgläschen adhärenenten Keratinozyten als primäre Zellkulturen kultiviert, dann fixiert, die Membran solubilisiert und mit Anti-Glycine receptor-Antikörper inkubiert. Alle Zellen zeigten eine starke Färbung. Der angefärbte Glycinrezeptor zeigte wie auf den Gewebeschnitten eine Lokalisation im Zytoplasma (Abb. 6).

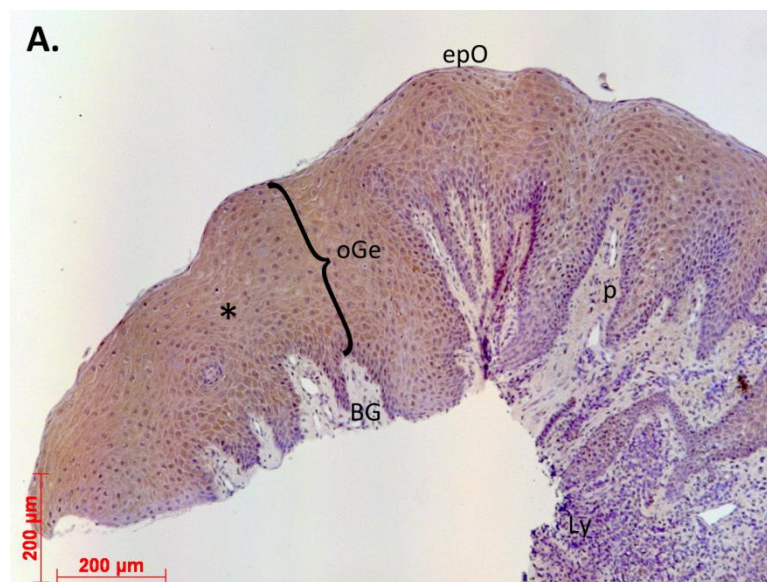


Abb. 5A: Immunhistochemische Färbung des Glycinrezeptors.

Gewebeschnitt oraler Gingiva. Die Keratinozyten sind positiv für den Glycinrezeptor. 10-fache Objektivvergrößerung. **epO** epitheliale Oberfläche; **oGe** orales Gingivaepithel; **BG** subepitheliales Bindegewebe (derb, fibrös); **Lp** bindegewebige Lamina propria; **Ly** Lymphozyteninfiltrat; * Braunfärbung der Zellen entspricht einer positiven immunhistochemischen Färbereaktion des Glycinrezeptors. Eine Submukosa fehlt.

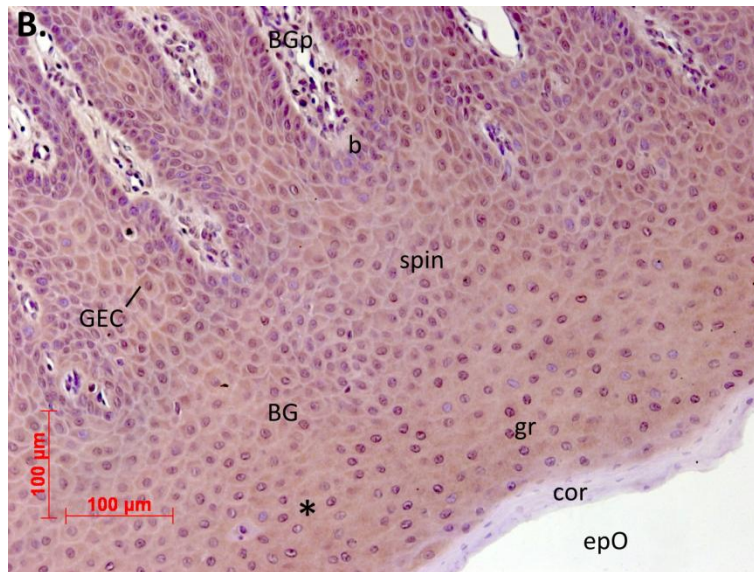


Abb. 5B: Detailaufnahme.

20-fache Objektivvergrößerung. **b** stratum basale (zuständig für Zellnachschiebung); **spin** stratum spinosum; **gr** stratum granulosum (nicht deutlich ausgeprägt); **cor** stratum corneum (parakeratinisiert, mit z.T. noch pyknotischen Zellkernen); **BGp** Bindegewebspapillen der Lamina Propria; **F** Fibroblasten; **GEC** gingivale Keratinozyten; * Braunfärbung der Zellen entspricht einer positiven immunhistochemischen Färbereaktion des Glycinrezeptors.

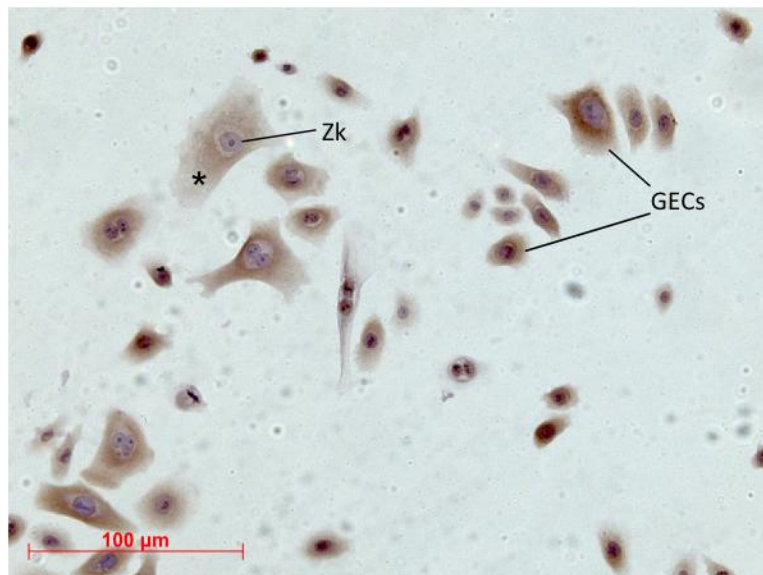


Abb. 6: Immunhistochemische Färbung des Glycinrezeptors.

Auf Deckgläschen kultivierte humane gingivale Keratinozyten. Alle Zellen zeigen eine Expression des Glycinrezeptors im Zellinneren. 40-fache Objektivvergrößerung. **GECs** gingivale Keratinozyten; **Zk** Zellkern; * Färbereaktion des Glycinrezeptors im Zellinneren/Zytoplasma.

4.1.2 Nachweis des Glycinrezeptors über Immunfluoreszenz

Die auf Deckgläschen adhärennten Keratinozyten wurden als primäre Zellkulturen angezchtet, dann fixiert, die Membran solubilisiert und mit Anti-Glycine receptor-Antikörper in einer 1:250 fachen Verdünnung gefärbt. Der Zellkern wurde mit DAPI 1:5000 angefärbt. Zellkern und Glycinrezeptor zeigten unter dem Fluoreszenzmikroskop ein starkes Signal. Der angefärbte Glycinrezeptor zeigte wiederum eine Lokalisation im Zellinneren (Abb. 7).

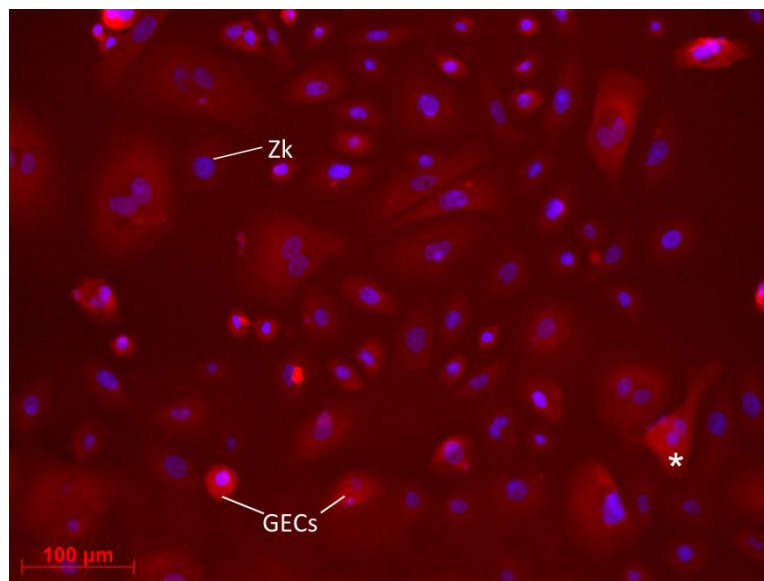


Abb. 7: Immunfluoreszenzanalyse des Glycinrezeptors.

Auf Deckgläschen kultivierte humane gingivale Keratinozyten. Alle Zellen zeigen eine Expression des Glycinrezeptors im Zellinneren. Anfärbung des Zellkerns mit DAPI. 20-fache Objektivvergrößerung. **GECs** gingivale Keratinozyten; **Zk** Zellkern; *Färbereaktion des Glycinrezeptors im Zellinneren/Zytoplasma.

4.2 Real-Time-PCR-Analysen

4.2.1 Etablierung der Real-Time-PCR

Um die Bedingungen für die Real-Time-PCR zu optimieren, wurde für jedes untersuchte Gen mit Hilfe entsprechend klonierter, Primer spezifischer PCR-Produkte die optimale Anlagerungstemperatur der dazugehörigen Primer bestimmt. Die Effizienzen für alle Primerpaare wurden über Verdünnungsreihen ermittelt. Diese sind, zusammen mit den optimierten Annealingtemperaturen, in Tab. 3 dargestellt.

Tab. 3: Darstellung der Effizienzen und Annealingtemperaturen von β -Aktin, IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, VEGF, MMP2 und MMP3 aus der Real-Time-PCR ($^{\circ}$ C: Temperaturoptimum).

Gen	Effizienz	Temperatur ($^{\circ}$ C)
β -Aktin	1.84	69
IL-1 β	1.83	68
IL-6	2.12	68
IL-8	2.02	68
IL-10	1.94	65
MMP2	1.99	63
MMP3	2.06	69
VEGF	1.96	63

4.2.2. Etablierung der Versuchsbedingungen

Vorversuche

Im Laufe einer Entzündungsreaktion wird das Expressionsmuster immunologisch wichtiger Gene verändert. IL-1 β induziert die Expression von Genen, die als Entzündungsmarker gelten. Beim Krankheitsbild der Gingivitis oder Parodontitis ist die IL-1 β -Konzentration in der Sulkusflüssigkeit erhöht und Gingivaepithelzellen (GECs) kommen in direkten Kontakt mit IL-1 β . Daher wurde IL-1 β im Vorversuch (und auch später im Hauptversuch) als Stimulans gewählt. Verschiedene IL-1 β -Konzentrationen wurden ausgetestet. Parallel wurden die Zellen verschiedenen Glycinkonzentrationen ausgesetzt, um den Einfluss von Glycin auf die relative Genexpression der Entzündungsmarker zu untersuchen.

Um glycinfreie Versuchsbedingungen zu etablieren, wurden Vorversuche sowohl in glycinhaltigem, als auch in glycinfreiem Medium durchgeführt und die Ergebnisse der Genexpressionsanalyse verglichen. Die Vorversuche wurden in Einfach- oder Doppelbestimmung durchgeführt, es erfolgte keine weitergehende statistische Auswertung. Die beschriebenen Ergebnisse geben nur Hinweise auf festgestellte Tendenzen an.

Einfluss der Medien KGM und SMEM auf die Genexpression verschiedener Entzündungsmarker

Ein Vollmedium wie KGM ermöglicht eine hohe Zellwachstumsrate, ein Minimalmedium wie SMEM enthält nur die nötigen Inhaltsstoffe, die für die Vitalitätserhaltung und das Wachstum der Zellen nötig sind. Die Kultivierung der Zellen ist grundsätzlich in beiden Medien möglich. Für die Aufzucht von Keratinozyten hat sich KGM bewährt. Da KGM jedoch Glycin enthält, kann eine Beeinflussung der Stimulationsversuche nicht ausgeschlossen werden.

Um zu überprüfen, ob die Kultivierung der Keratinozyten im Minimalmedium SMEM Einfluss auf die IL-1 β induzierten Genexpressionsänderungen der untersuchten Entzündungsmarker hat, wurde ein Stimulationsversuch mit IL-1 β durchgeführt und die Expressionsdaten der in SMEM kultivierten Zellen mit den Expressionsdaten der in KGM kultivierten Zellen verglichen. Dazu wurde ein Teil der Zellen, die in KGM kultiviert worden waren, 1 h vor Stimulationsbeginn in SMEM, glycinfrei, kultiviert. Zellen in KGM und in SMEM wurden für 60, 120, 240 und 480 min mit IL-1 β stimuliert. Unstimulierte Zellen in KGM und SMEM dienten zu jedem Zeitpunkt als Kontrollen. Es erfolgte die quantitative Genexpressionsanalyse für IL-1 β , IL-6, IL-8, MMP2, MMP3 und VEGF. Da die Vorversuche nur zur Etablierung der Versuchsbedingungen dienten, wurde eine Einfachbestimmung der Proben durchgeführt (n = 1).

Die Expression von IL-1 β , IL-6, IL-8, MMP2, MMP3 und VEGF konnte in IL-1 β stimulierten Gingivaepithelzellen dargestellt werden. Die unstimulierten Kontrollen nach 60, 120, 240 und 480 min dienten als Kalibrator.

Durch IL-1 β -Stimulation mit der Konzentration [1ng/ml] konnte in gingivalen Keratinozyten tendenziell eine Expressionsänderung immunologisch wichtiger Gene erreicht werden. Dies wurde sowohl in Zellen, die in Vollmedium gehalten wurden, als auch in Zellen, die in glycinfreiem Medium gehalten wurden, beobachtet.

Tab. 4: Einfluss der Medien KGM und SMEM auf die Genexpression verschiedener Entzündungsmarker.

x-fache Genexpression im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle verschiedener Gene in GECs nach IL-1 β -Stimulation. n = 1 (keine weitergehende statistische Auswertung).

- A. Relative Genexpression von IL-1 β .
- B. Relative Genexpression von IL-6.
- C. Relative Genexpression von IL-8.
- D. Relative Genexpression von MMP2.
- E. Relative Genexpression von MMP3.
- F. Relative Genexpression von VEGF.

A. IL-1 β Stimulation [1 ng/ml]	IL-1 β	
	KGM	SMEM
Zeit [min]		
60	+2,3	+3,5
120	-1,5	+3,5
240	-1,4	+1,3
480	-1,4	-1,5

B. IL-1 β Stimulation [1 ng/ml]	IL-6	
	KGM	SMEM
Zeit [min]		
60	+8,6	± 0
120	± 0	+29,9
240	-10,5	+4,3
480	-52,6	kein Wert

C. IL-1 β Stimulation [1 ng/ml]	IL-8	
	KGM	SMEM
Zeit [min]		
60	+1,0	+1,3
120	+1,4	-1,5
240	-1,2	+1,9
480	-1,3	-2,0

D. IL-1 β Stimulation [1 ng/ml]	MMP2	
	KGM	SMEM
Zeit [min]		
60	+1,2	+1,1
120	+1,2	-1,2
240	-2,6	-1,2
480	-1,3	-1,8

E. IL-1 β Stimulation [1 ng/ml]	MMP3	
	KGM	SMEM
Zeit [min]		
60	+16,0	+2,1
120	+1,6	kein Wert
240	+1,1	+2,0
480	-10,0	-1,6

F. IL-1 β Stimulation [1 ng/ml]	VEGF	
	KGM	SMEM
Zeit [min]		
60	+2,8	-1,5
120	+1,9	-1,1
240	-1,3	-1,9
480	+1,2	-2,6

Einfluss der IL-1 β -Konzentration und der Glycin-Konzentration auf die Genexpression verschiedener Entzündungsmarker

Kultivierte Keratinozyten wurden mit IL-1 β stimuliert, um eine Entzündung zu simulieren. Im Vorversuch wurden zwei verschiedene IL-1 β -Konzentrationen ausgetestet, um eine effektive Stimulation *in-vitro* zu erreichen. Die Stimulation erfolgte mit 1 ng/ml und 5 ng/ml für eine Zeitdauer von 30, 60 und 120 min. Es wurde die relative Genexpression von IL-1 β und IL-6 analysiert.

Auch die Glycinkonzentration des Mediums wurde in diesem Vorversuch zwischen 0 mM, 1 mM und 5 mM variiert. Für diesen Vorversuch wurde eine Doppelbestimmung der Proben durchgeführt (n = 2).

Expression von IL-1 β , IL-6 nach IL-1 β -Stimulation und Glycinbehandlung

Die Genexpression von IL-1 β und IL-6 konnte in IL-1 β stimulierten Gingivaepithelzellen mit und ohne Glycinapplikation dargestellt werden.

Als Kalibrator wurde zu jedem Zeitpunkt eine unstimulierte, aber mit entsprechender Glycinkonzentration behandelte Probe verwendet. So konnte isoliert die IL-1 β induzierte Expressionsänderung in Anwesenheit verschiedener Glycinkonzentrationen analysiert werden.

Die Genexpressionsanalysen der Gene IL-1 β und IL-6 zeigten, dass über eine IL-1 β -Stimulation tendenziell eine Expressionssteigerung induziert werden konnte. Die Konzentrationserhöhung des Stimulans IL-1 β von 1 ng/ml auf 5 ng/ml konnte die relative Genexpressionssteigerung von IL-6 zum frühen Zeitpunkt (nach 30 min) noch verstärken.

Der gleiche Versuchsansatz (Stimulation mit 5 ng/ml für 30 min) kombiniert mit einer Glycinbehandlung der Zellen bewirkte eine tendenziell verminderte Genexpression der Gene IL-1 β und IL-6. Dieser Effekt zeigte sich für IL-6 verstärkt bei einer Glycinbehandlung mit 1 mM im Vergleich zu 5 mM (Tab. 5).

Tab. 5: Expression von IL-1 β , IL-6 nach IL-1 β -Stimulation und Glycinbehandlung. x-fache Genexpression im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle. n = 2 (keine weitergehende statistische Auswertung).

A. Relative Genexpression von IL-1 β in GECs. Die Erhöhung der IL-1 β Konzentration von 1 ng/ml auf 5 ng/ml erreichte keine stärkere Genexpression. Die Erhöhung der Glycinkonzentration von 1 mM auf 5 mM verstärkte die Expressionsänderung, die durch Glycin bewirkt wurde, nicht bedeutend.

B. relative Genexpression von IL-6 in GECs. Bei Stimulation mit 5 ng/ml IL-1 β zeigte sich eine stärkere Expressionsänderung nach 30 min. Der Versuchsansatz mit 1 mM Glycin hatte nach 30 min einen stärkeren Effekt als mit 5 mM Glycin.

A. IL-1β					
IL-1 β Stimulation	1 ng/ml	5 ng/ml	1 ng/ml	5 ng/ml	5 ng/ml
Glycinkonzentration	0 mM	0 mM	1 mM	1 mM	5 mM
Zeit [min]					
30	+2,0	-1,2	+1,2	-1,2	-1,8
60	+1,2	+1,7	-1,4	+1,1	+1,3
120	-2,0	-1,6	-1,2	-1,5	-1,2

B. IL-6					
IL-1 β Stimulation	1 ng/ml	5 ng/ml	1 ng/ml	5 ng/ml	5 ng/ml
Glycinkonzentration	0 mM	0 mM	1 mM	1 mM	5 mM
Zeit [min]					
30	+1,7	+2,8	-3,7	-3,2	-1,5
60	-1,4	-1,1	+1,1	+1,5	+1,0
120	-3,0	-1,3	-1,7	-2,2	+1,2

Expression von IL-1 β und IL-6 nach Glycinbehandlung

Die relative Genexpression von IL-1 β und IL-6 wurde analysiert, um die isolierte Wirkung von Glycin auf orale Keratinozyten zu untersuchen. Als Kalibrator diente die unstimulierte Kontrollgruppe nach 30, 60 und 120 min. Die Expression von IL-1 β und IL-6 konnte in glycinbehandelten Gingivaepithelzellen sowie in der unstimulierten Kontrolle dargestellt werden.

IL-1 β zeigte tendenziell eine Expressionssteigerung im Medium mit einer Glycinkonzentration von 5 mM nach 30 min. Nach 60 und 120 min konnte dieser Effekt nicht mehr beobachtet werden (Abb. 8).

IL-6 zeigte ebenfalls eine tendenziell erhöhte Expression nach 30 min bei einer Behandlung mit 5 mM Glycin. Nach 60 und 120 min war keine erhöhte mRNA-Expression mehr festzustellen (Abb. 8).

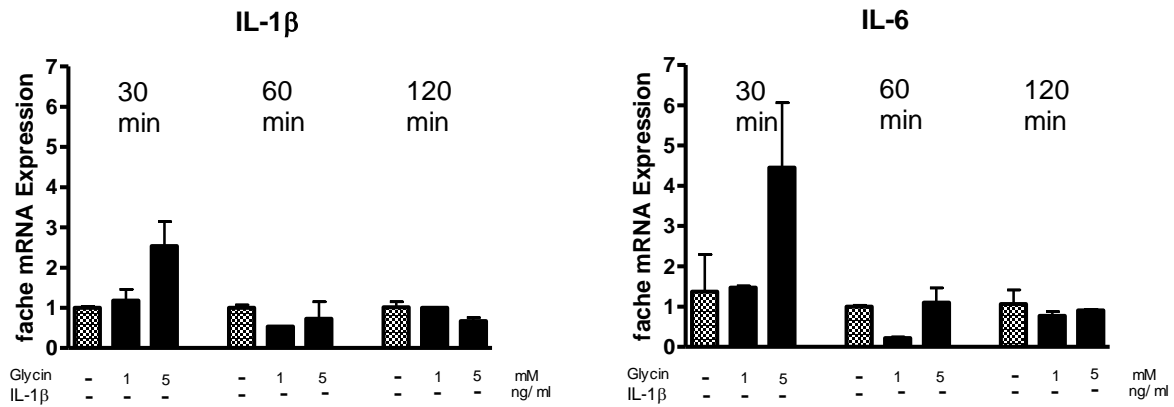


Abb. 8: Expression von IL-1 β und IL-6 nach isolierter Glycinbehandlung.

Es erfolgte keine weitergehende statistische Analyse (n = 2).

A. Relative Genexpression von IL-1 β in GECs nach Glycinapplikation. Es zeigte sich eine verstärkte mRNA-Expression nach 30 min bei einer Behandlung mit 5 mM Glycin.

B. Relative Genexpression von IL-6 in GECs nach Glycinapplikation. Es zeigte sich eine verstärkte mRNA-Expression nach 30 min bei einer Behandlung mit 5 mM Glycin.

4.2.3 Genexpressionsanalysen der Stimulationsversuche

Hauptversuch

Nach der Auswertung der Vorversuche wurden die Stimulationsversuche des Hauptversuchs unter optimierten Bedingungen durchgeführt. Dafür wurden die Zellen für 30 und 60 min mit IL-1 β in einer Konzentration von 5 ng/ml stimuliert. Sie wurden eine Stunde vor Stimulationsbeginn in glycinfreiem Medium kultiviert. Ein Teil der Zellen wurde gleichzeitig mit der IL-1 β -Stimulation einer Glycinkonzentration von 1 mM ausgesetzt (Versuchsgruppen des Stimulationsversuches siehe Tab. 1).

Um die isolierte Wirkung von Glycin beurteilen zu können, wurden unstimulierte Zellen für die gleiche Zeitspanne von 30 und 60 min mit der Glycinkonzentration von 1 mM behandelt.

Die relativen Genexpressionsdaten von IL-1 β , IL-6, IL-8 und IL-10 nach jeweils 30 und 60 min Stimulation wurden bestimmt. Als Kontrollgruppen dienten unstimulierte Zellen 30 und 60 min nach dem letzten Mediumwechsel mit glycinfreiem Medium (SMEM).

Ziel war es, die Genexpressionsprofile aus den verschiedenen Versuchsreihen miteinander zu vergleichen und so die Wirkung von Glycin auf gingivale Keratinozyten zu untersuchen. Alle untersuchten Proben wurden mit der unstimulierten, glycinfreien Kontrolle des jeweiligen Zeitpunktes kalibriert und mit dem Referenzgen β -Aktin normalisiert. Pro Versuchsgruppe wurden 11 Proben untersucht (n = 11) und die Ergebnisse statistisch ausgewertet.

Die Expression von IL-1 β , IL-6, IL-8 und IL-10 konnte sowohl in IL-1 β stimulierten Gingivaepithelzellen mit und ohne Glycinapplikation als auch in unstimulierten Gingivaepithelzellen in glycinhaltigem Medium sowie in den glycinfrei gehaltenen Kontrollen dargestellt werden.

Expression von IL-1 β nach IL-1 β -Stimulation und/oder Glycinbehandlung

Weder IL-1 β in einer Konzentration von 5 ng/ml noch Glycin in einer Konzentration von 1 mM hatten einen signifikanten Effekt auf die mRNA-Expression von IL-1 β im untersuchten Zeitraum von 30 und 60 min (Abb. 9).

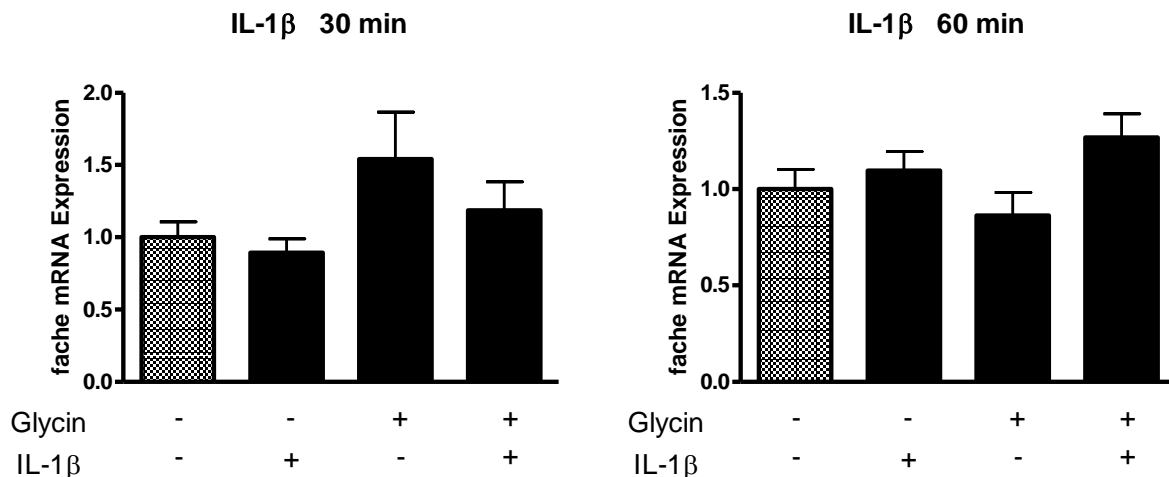


Abb. 9: Relative Genexpression von IL-1 β in GECs nach IL-1 β -Stimulation und/oder Glycinbehandlung.

Mittelwerte und Standardabweichungen von n = 11 Proben.

Weder nach 30 min noch nach 60 min konnte durch die Stimulation mit IL-1 β und/oder durch die Behandlung mit Glycin eine signifikante Expressionsänderung gegenüber der unstimulierten Kontrolle (Ratio = 1) bewirkt werden.

Expression von IL-6 nach IL-1 β -Stimulation und/oder Glycinbehandlung

Nach 30 min IL-1 β -Stimulation zeigte IL-6 eine signifikante Erhöhung der Expression (2,3-fache mRNA-Expression) gegenüber der unstimulierten, in glycinfreiem Medium kultivierten Kontrolle. Die Glycinkonzentration von 1 mM im Nährmedium induzierte während der Versuchsdauer von 30 min eine signifikant erhöhte IL-6 mRNA-Expression (3,4-fache mRNA-Expression). Bei IL-1 β -Stimulation und gleichzeitiger Applikation von Glycin wurde die IL-6-Expression nach 30 min nicht hochreguliert, sondern zeigte ein unverändertes Expressionsniveau (0,8-fache mRNA-Expression) im Vergleich zur unstimulierten Probe. Vergleicht man dieses Expressionsniveau mit der Expressionsstärke bei alleiniger IL-1 β -Stimulation, erkennt man dementsprechend einen signifikanten Expressionsunterschied bei den beiden Versuchsgruppen (Abb. 10).

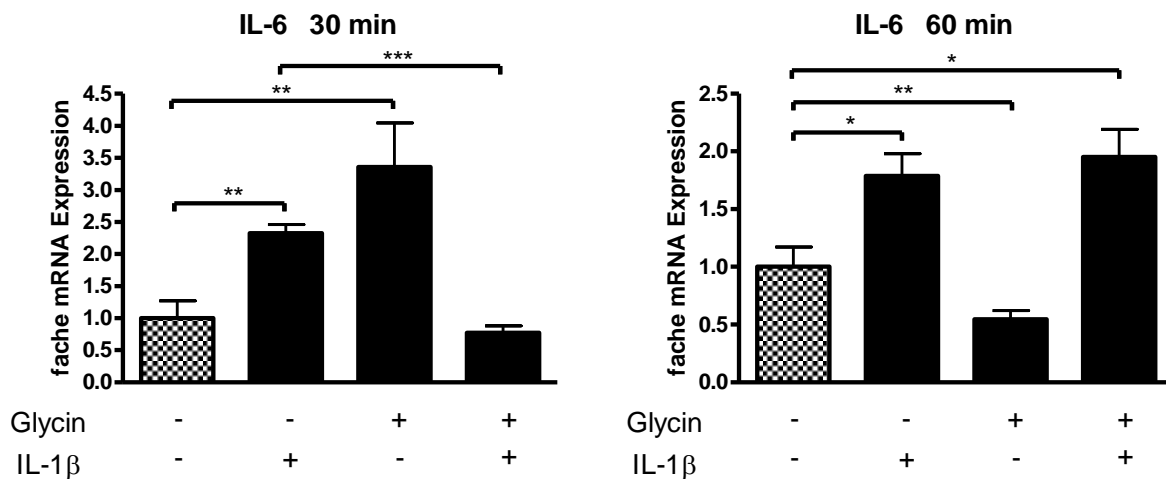


Abb. 10: Relative Genexpression von IL-6 in GECs nach IL-1 β -Stimulation und/oder Glycinbehandlung.

Mittelwerte und Standardabweichungen von n = 11 Proben.

Nach 30 min und nach 60 min IL-1 β -Stimulation zeigte sich eine signifikante Erhöhung der mRNA-Expression gegenüber der Kontrolle (Ratio = 1), die unstimuliert in glycinfreiem Medium gehalten wurde ($p = 0,0019$ (**)) bzw. $p = 0,0201$ (*). Nach 30 min Glycinbehandlung zeigte IL-6 eine signifikante Erhöhung der mRNA-Expression ($p = 0,0099$ (**)). Bei gleichzeitiger IL-1 β -Stimulation und Glycinbehandlung wurde IL-6 im Vergleich zur Kontrolle nicht vermehrt exprimiert. Es zeigte sich hier aber ein signifikanter Expressionsunterschied zur IL-1 β -stimulierten Probe ($p < 0,0001$ (***)).

Glycin bewirkte nach 60 min eine signifikant niedrigere IL-6-Genexpression ($p = 0,0058$ (**)). IL-1 β mit gleichzeitiger Glycinapplikation induzierte nach 60 min eine signifikant erhöhte IL-6-Expression ($p = 0,0114$ (*)).

Nach 60 min IL-1 β -Stimulation war die IL-6-Expression signifikant erhöht (1,8-fache mRNA-Expression). Glycin dagegen bewirkte nach 60 min eine signifikante Verringerung der IL-6-Genexpression (0,6-fache mRNA-Expression). Im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle wurde die IL-6-Expression nach 60 min IL-1 β -Stimulation auch in Anwesenheit von Glycin signifikant hochreguliert (2,0-fache mRNA-Expression). Im Vergleich zum Expressionsmaß nach 60 min IL-1 β -Stimulation ohne gleichzeitige Glycinapplikation zeigte sich kein signifikanter Unterschied (Abb. 10).

Expression von IL-8 nach IL-1 β -Stimulation und/oder Glycinbehandlung

Weder IL-1 β noch Glycin hatten nach 30 min einen signifikanten Effekt auf die mRNA-Expression von IL-8 (Abb. 11).

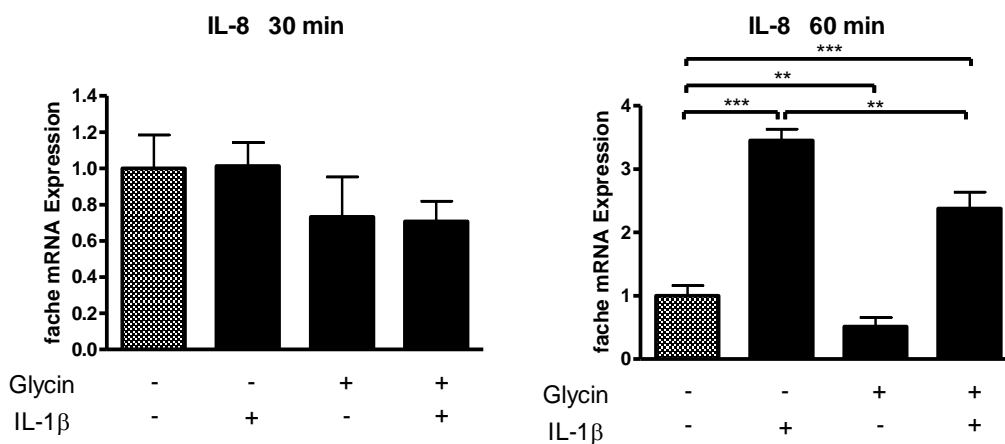


Abb. 11: Relative Genexpression von IL-8 in GECs nach IL-1 β -Stimulation und/oder Glycinbehandlung.

Mittelwerte und Standardabweichungen von $n = 11$ Proben.

Weder IL-1 β noch Glycin hatten einen signifikanten Effekt auf die IL-8-Genexpression nach 30 min. Nach 60 min zeigte sich eine signifikante Expressionserhöhung gegenüber der Kontrolle (Ratio = 1), induziert durch IL-1 β ($p < 0,0001$ (***)). Glycin bewirkte eine signifikante Runterregulierung der IL-8-Expression ($p = 0,0083$ (**)). In Bezug auf die unstimulierte Kontrolle zeigte sich bei IL-1 β -Stimulation mit Glycin nach 60 min eine signifikante IL-8-Expressions-erhöhung ($p = 0,0006$ (***)). Im Vergleich zur Expressionsstärke nach alleiniger IL-1 β -Applikation war diese Erhöhung signifikant geringer ($p = 0,0028$ (**)).

Nach 60 min zeigte sich im Rahmen der IL-1 β -Stimulation eine signifikante Erhöhung der Genexpression von IL-8 gegenüber der unstimulierten, in glycinfreiem Medium gehaltenen

Kontrolle (3,5-fache mRNA-Expression). Isolierte Glycinapplikation bewirkte eine signifikante Verringerung der IL-8-Expression nach 60 min (0,5-fache mRNA-Expression, bezogen auf die Kontrolle). IL-1 β -Stimulation mit gleichzeitiger Glycinbehandlung der Zellen bewirkte einen signifikanten Anstieg der IL-8-Expression (2,4-fache mRNA-Expression). Verglichen mit der Expressionsstärke bei alleiniger IL-1 β -Stimulation, war dieser Anstieg signifikant geringer (Abb.11).

Expression von IL-10 nach IL-1 β -Stimulation und/oder Glycinbehandlung

IL-1 β sowie Glycin hatten nach 30 min keinen signifikanten Effekt auf die mRNA-Expression von IL-10 (Abb. 12).

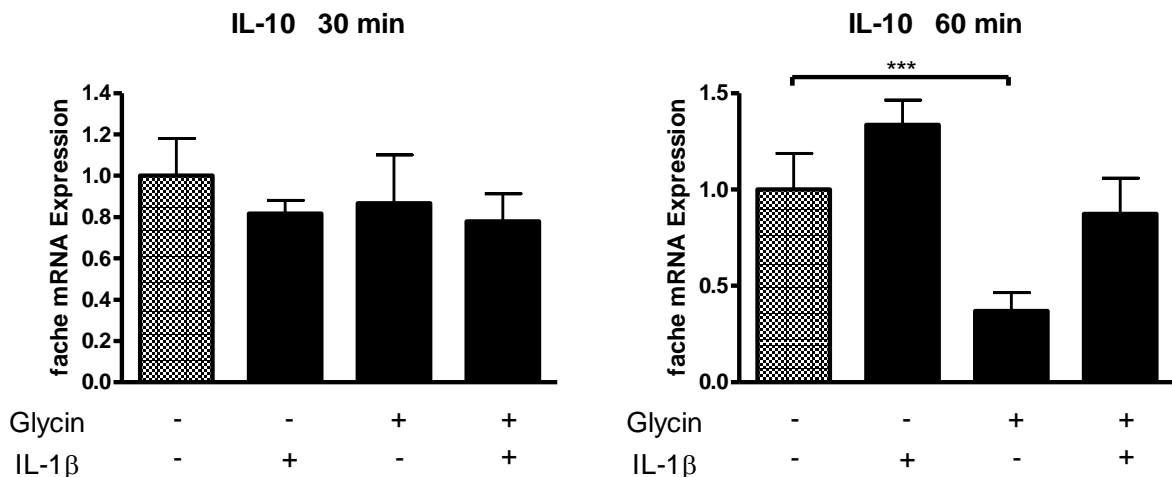


Abb. 12: Relative Genexpression von IL-10 in GECs nach IL-1 β -Stimulation und/oder Glycinbehandlung.

Mittelwerte und Standardabweichungen von n = 11 Proben.

Nach 30 min Stimulation mit IL-1 β mit und ohne Glycin zeigte sich kein signifikanter Effekt auf die IL-10-Expression. Die Glycinbehandlung bewirkte nach 60 min eine signifikante Verringerung der Expressionsrate gegenüber der Kontrolle (Ratio = 1), die weder mit IL-1 β noch mit Glycin behandelt wurde ($p = 0,0007$ (***)). Die IL-10-Expressionrate nach IL-1 β -Stimulation in Anwesenheit von Glycin zeigte ein vergleichbares Niveau zur unstimulierten Kontrolle nach 60 min.

Der durch IL-1 β induzierte Effekt einer Genexpressionssteigerung von IL-10 nach 60 min war nicht signifikant gegenüber der unstimulierten, in glycinfreiem Medium kultivierten Kontrolle. Glycin hatte eine signifikante Wirkung auf IL-10, es kam zu einer verminderten Genexpression

nach 60 min (0,4-fache mRNA-Expression). Die IL-10-Expressionsrate nach 60 min IL-1 β -Stimulation in Anwesenheit von Glycin zeigte ein vergleichbares Niveau zur unstimulierten Kontrolle (Abb. 12).

4.3 Nachweis der Translokation von NF κ B in den Zellkern durch Immunfluoreszenz

Im Rahmen einer immunologischen Reaktion auf einen Entzündungsreiz kommt es zur Translokation des Transkriptionsfaktors NF κ B vom Zytoplasma in den Zellkern. Zur Ergänzung der Expressionsdaten wurde diese NF κ B-Translokation als Hinweis auf die inflammatorische oder anti-inflammatorische Wirkung der Stimulanzen mittels Immunfluoreszenz untersucht.

Die Zellen wurden 16 h vor Stimulationsbeginn in SMEM, einem glycinfreien Medium, kultiviert. Beim Mediumwechsel 1 h vor IL-1 β -Stimulation wurde bei einem Teil der Zellen dem SMEM 1 mM Glycin hinzugegeben. Die IL-1 β -Stimulation erfolgte mit einer Konzentration von 5 ng/ml. Als Stimulationsdauer wurde, angelehnt an die Arbeit von Steinberg et al. (2006) und an die Arbeit von Vardar-Sengul et al. (2009), 2 h und 6 h gewählt. Versuche wurden an Kulturen von drei Spendern durchgeführt. Es erfolgt die exemplarische Darstellung repräsentativer Befunde.

Immunfluoreszenzanalyse von NF κ B in unstimulierten Gingivaepithelzellen

Unstimulierte Keratinozyten, die in allen Schritten der Vorbereitung und Färbung entsprechend der anderen Präparate behandelt wurden, dienten als Kontrolle, um die Ausgangslokalisierung des Transkriptionsfaktors zu beurteilen. Das Signal der Immunfluoreszenz zeigte sowohl 2 h als auch 6 h nach Mediumwechsel den angefärbten Transkriptionsfaktor NF κ B im Zytoplasma der Zellen. Die Zellkerne zeigten kaum Färbung (Abb. 13A/B).

Immunfluoreszenzanalyse von NF κ B in Interleukin-1 β -stimulierten Gingivaepithelzellen

Die IL-1 β -Stimulation [5 ng/ml] der Keratinozyten bewirkte eine Translokation von NF κ B in den Zellkern. Das Immunfluoreszenzsignal zeigte 2 h nach Stimulation eine Lokalisation von NF κ B sowohl im Zellkern als auch im Zytoplasma an. Das Signal im Zellkern und somit die Konzentration an NF κ B im Kern war etwas stärker als im Zytoplasma der Zelle (Abb. 14A).

Nach 6 h befand sich tendenziell noch mehr NFκB im Zellkern. Das Immunfluoreszenzsignal nahm im Kern zu, im Zytoplasma ab (Abb. 14B).

Immunfluoreszenzanalyse von NFκB in Glycin-behandelten Gingivaepithelzellen

Die Immunfluoreszenzanalyse von NFκB bei isolierter Glycinapplikation zeigte eine Anhäufung von NFκB im Zellkern nach 2 h. Im Zytoplasma war das Fluoreszenzsignal schwächer. Durch die Glycinapplikation wurde eine Translokation von NFκB in den Zellkern bewirkt (Abb. 15A).

6 h nach dem Wechsel auf das mit Glycin [1 mM] versetzte Medium zeigte sich eine Rückverteilung von NFκB ins Zytoplasma. Im Zellkern zeigte sich ein geringeres Fluoreszenzsignal des angefärbten Transkriptionsfaktors als im Zytoplasma (Abb. 15B).

Immunfluoreszenzanalyse von NFκB in Interleukin-1β-stimulierten Gingivaepithelzellen in Anwesenheit von Glycin

Die Immunfluoreszenzanalysen nach IL-1β-Stimulation [5 ng/ml] der Keratinozyten, die in einem Medium mit 1 mM Glycin kultiviert wurden, zeigten nach 2 h keine Translokation des angefärbten NFκB in den Zellkern (Abb.16A).

Nach 6 h war eine leichte Verstärkung des Fluoreszenzsignals im Zellkern zu erkennen (Abb. 16B).

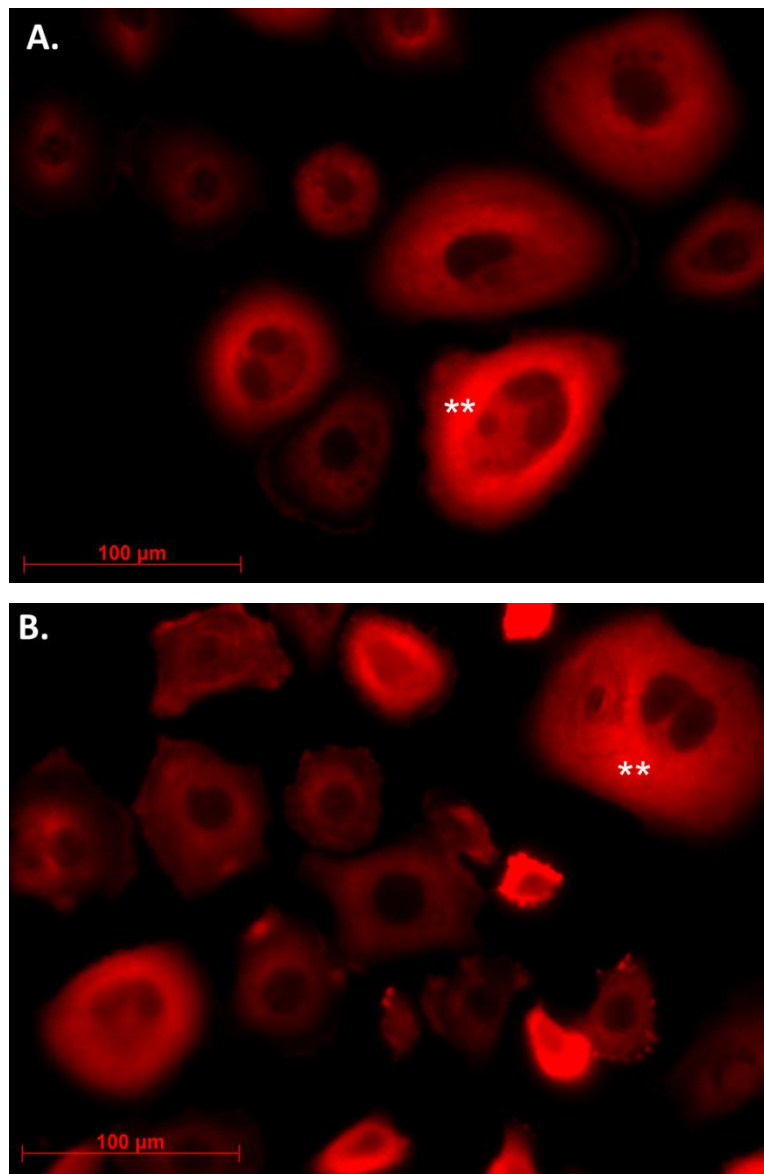


Abb. 13: Anfärbung des Transkriptionsfaktors NFκB mittels Immunfluoreszenz.

Unstimulierte GECs (0 ng/ml IL-1β, 0 mM Glycin). 40-fache Objektivvergrößerung.

A. 2 h nach Mediumwechsel. Die Immunfluoreszenzanalyse zeigte ein starkes Signal im Zytoplasma der Zelle (**), nicht im Zellkern.

B. 6 h nach Mediumwechsel. Die Immunfluoreszenzanalyse zeigte ein starkes Signal im Zytoplasma der Zelle (**), nicht im Zellkern.

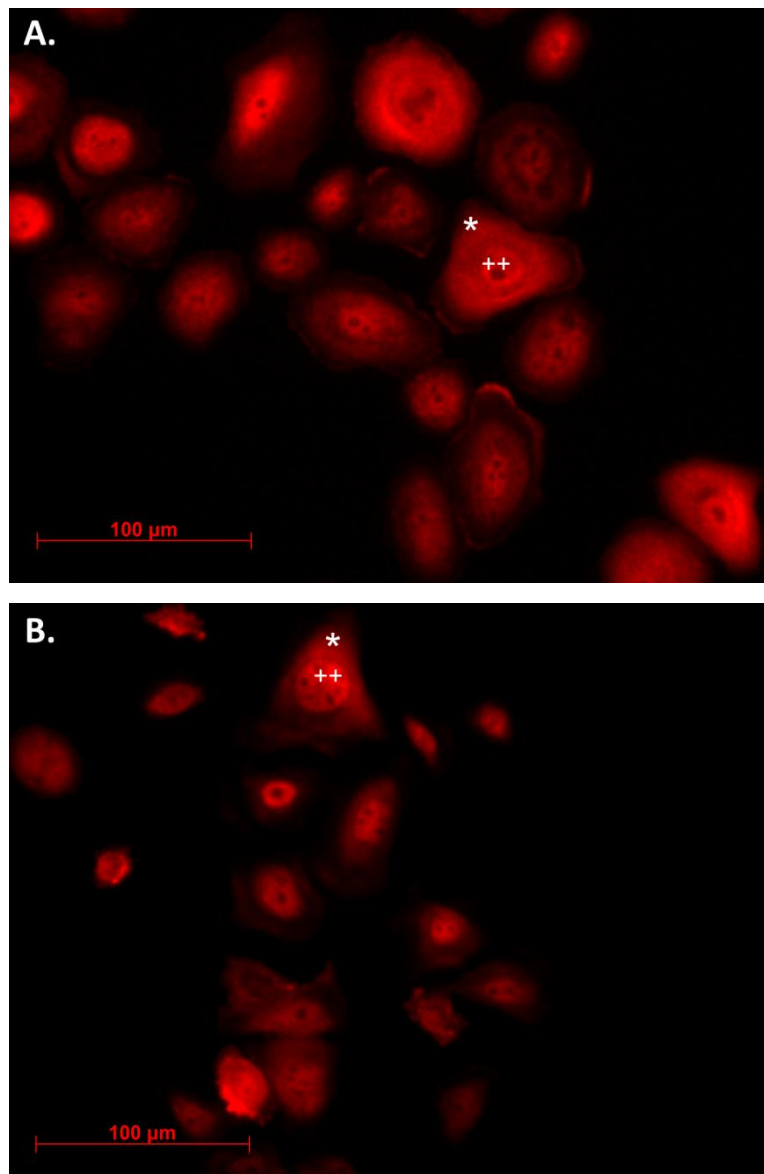


Abb. 14: Anfärbung des Transkriptionsfaktors NF κ B mittels Immunfluoreszenz.
IL-1 β -stimulierte GECs (5 ng/ml IL-1 β). 40-fache Objektivvergrößerung.

A. 2 h nach Mediumwechsel. Immunfluoreszenzanalysen zeigten ein starkes Signal im Zellkern der Keratinozyten (++) und ein etwas schwächeres im Zytoplasma (*).

B. 6 h nach Mediumwechsel. Immunfluoreszenzanalysen zeigten ein starkes Signal im Zellkern der Keratinozyten (++) und ein schwaches Signal im Zytoplasma (*).

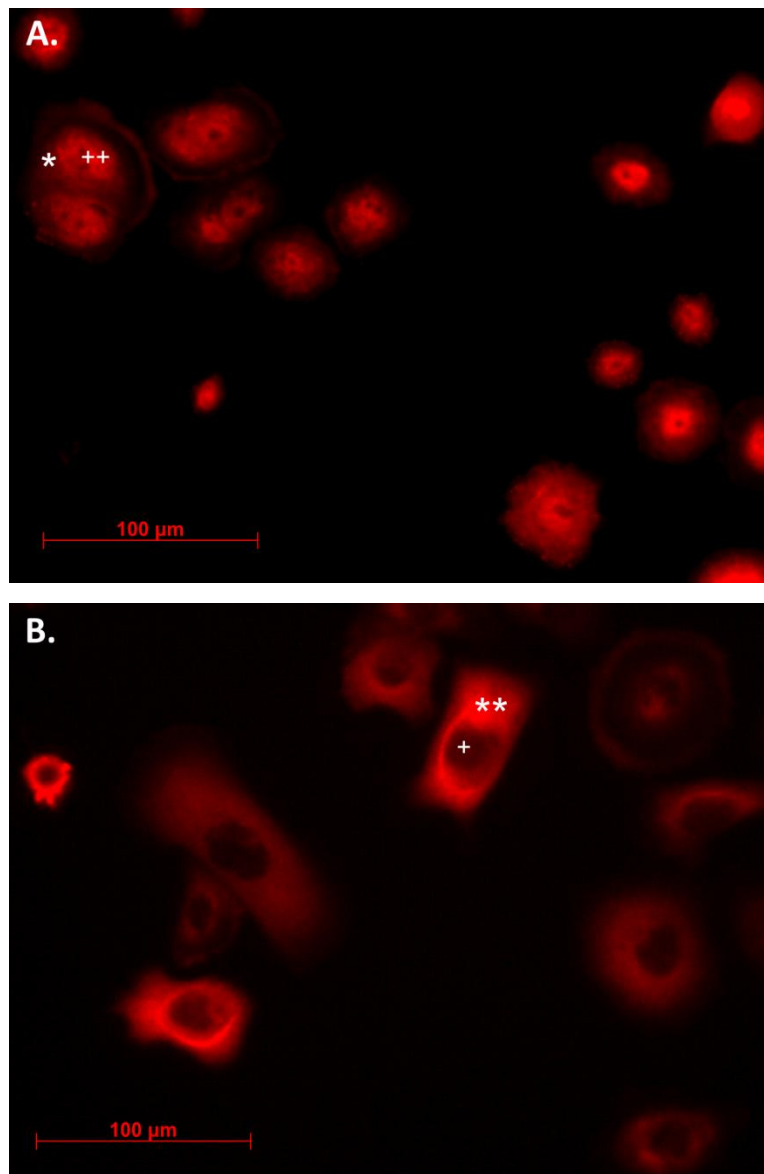


Abb. 15: Anfärbung des Transkriptionsfaktors NFκB mittels Immunfluoreszenz.

Glycin-behandelte GECs (1 mM Glycin). 40-fache Objektivvergrößerung.

A. 2 h nach Mediumwechsel. Die Lokalisation von NFκB im Zellkern (++) und geringere Verteilung im Zytoplasma (*) ist erkennbar.

B. 6 h nach Mediumwechsel. Lokalisation von NFκB im Zytoplasma (**). Der Zellkern zeigte ein schwächeres Signal (+).

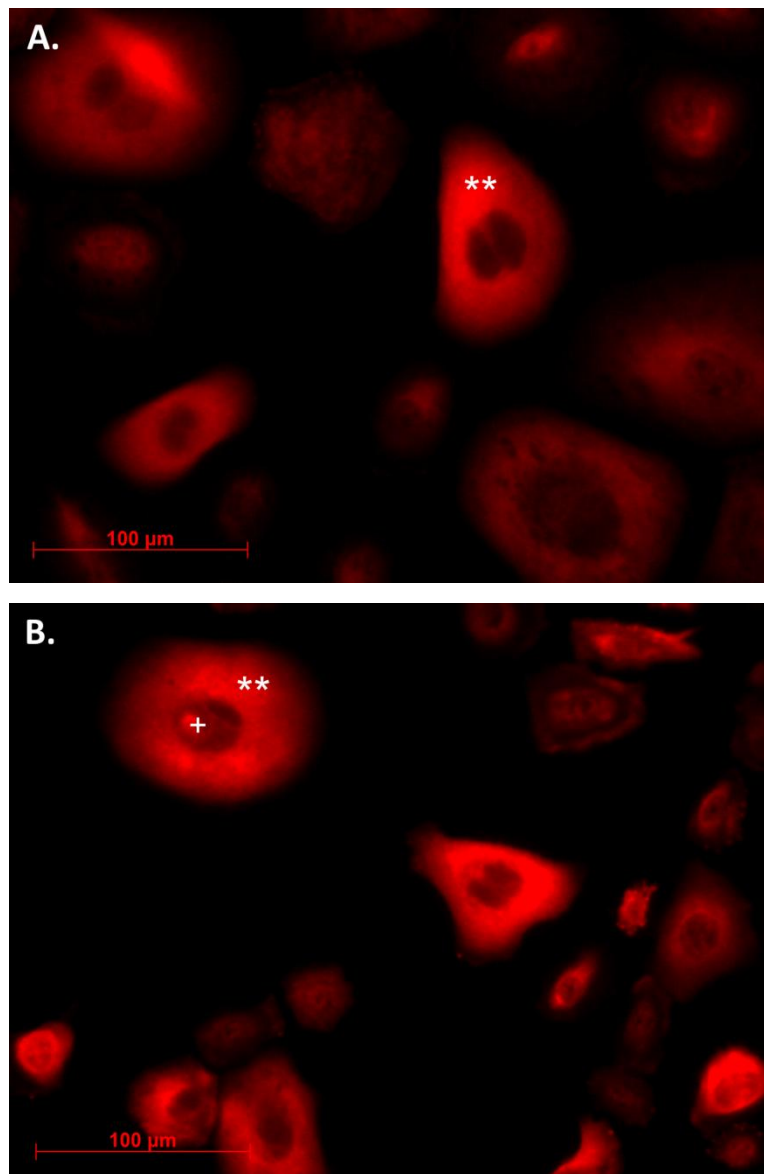


Abb. 16: Anfärbung des Transkriptionsfaktors NFκB mittels Immunfluoreszenz. Glycin-behandelte und IL-1β-stimulierte GECs (1 mM Glycin und 5 ng/ml IL-1β). 40-fache Objektivvergrößerung.

A. 2 h nach Mediumwechsel. Lokalisation von NFκB im Zytoplasma (**).

B. 6 h nach Mediumwechsel. Das Fluoreszenzsignal des Transkriptionsfaktors NFκB ist stark im Zytoplasma der Zelle (**) und leicht im Zellkern (+).

5. Diskussion

Die Keratinozyten der oralen Gingiva gehören zu den ersten Zellen, die mit bakterienhaltiger Plaque der Mundhöhle in Kontakt kommen. Das Gingivaepithel stellt eine Grenzfläche zwischen Umwelt und Organismus dar und dient nicht nur als physikalische Barriere, sondern auch als Barriere gegen den Eintritt von Mikroorganismen. Diese Schutzfunktion wird unter anderem auch über die Synthese antimikrobieller Peptide vermittelt, die Teil der unspezifischen Immunabwehr sind. Unter gesunden Bedingungen tritt trotz hoher bakterieller Kontamination der Mundhöhle nur selten eine Infektion auf (Dale und Krisanaprakornkit, 2001; Dale, 2002). Über die aktive Sekretion von Chemokinen und Zytokinen sind Gingivaepithelzellen ebenfalls an der Interaktion zwischen angeborenem und erworbenem Immunsystem beteiligt. Über das von Keratinozyten gebildete IL-6-Signal werden u.a. T-Lymphozyten angelockt, was wichtig für den Übergang der angeborenen zur erlernten Immunantwort ist (Jones, 2005).

Die Genexpression von Interleukin 6, sowie anderer immunologisch wichtiger Mediatoren wurde im Rahmen dieser Arbeit untersucht. Im Verlauf einer Gingivitis wird die Genexpression pro-inflammatorischer Entzündungsmarker verändert. So wird während einer Entzündung *in vivo*, oder bei einem *in-vitro*-Versuch über die Stimulation mit IL-1 β , die Genexpression von IL-1 β , IL-6 und IL-8 erhöht (Vardar-Sengul et al., 2009).

Die anti-inflammatorische Wirkung einer Substanz kann demnach über Expressionsanalysen dieser Gene überprüft werden. In den letzten Jahren zeigten verschiedene Untersuchungen, dass Glycin einen signifikanten Effekt auf die Aktivierung von Immunzellen des angeborenen und erworbenen Immunsystem hatte (Spittler et al., 1999; Stachlewitz et al., 2000; Froh et al., 2002). Aufgrund der anti-inflammatorischen Wirkung von Glycin wäre eine therapeutische Anwendung bei parodontalen Entzündungen denkbar. Dies bewog uns dazu, in einer *in-vitro*-Studie Gingivaepithelzellen mit Glycin zu behandeln.

Dazu wurden Zellkulturen gingivaler Keratinozyten etabliert und verschiedene Stimulationsversuche durchgeführt. Es handelte sich um Gingivaepithelzellen von drei verschiedenen Donoren. Ziel der Arbeit war es, die Genexpression von IL-1 β , IL-6, IL-8 und IL-10 in humanen gingivalen Keratinozyten nach der Stimulation mit IL-1 β mit und ohne zusätzliche Glycinapplikation zu untersuchen. Darüber sollte die Frage nach einer immunmodulierenden

Wirkung von Glycin geklärt und auf die funktionelle Bedeutung des Glycinrezeptors geschlossen werden. Nach Auswertung verschiedener Vorversuche wurde sich für eine Stimulation mit 5 ng/ml IL-1 β und für eine Behandlung mit 1 mM Glycin entschieden. Als Stimulationszeitraum wurden 30 min und 60 min gewählt. Es folgte die quantitative Genexpressionsanalyse für IL-1 β , IL-6, IL-8 und IL-10 mittels Real-Time-Polymerasekettenreaktion.

Ergänzend wurde über Immunfluoreszenzanalysen die Lokalisation von NF κ B in Zusammenhang mit inflammatorischen und anti-inflammatorischen Effekten der Stimulanzen untersucht, um so die Ergebnisse der Expressionsanalyse zu ergänzen und funktionell zu überprüfen.

5.1 Diskussion der Methoden

Bei *in-vitro*-Versuchen ist es wichtig, die primäre Kulturzusammensetzung zu erhalten. Schnell wachsende Zellen, wie z.B. Fibroblasten können bei entsprechenden Bedingungen langsamer wachsende Zellarten überwuchern. Um dies zu verhindern wurden bei der Probenaufbereitung Bindegewebe und Gingivaepithel enzymatisch voneinander getrennt. Zusätzlich wurde ein auf Keratinozyten abgestimmtes Nährmedium (Keratinocyte Growth Medium, KGM) eingesetzt und durch häufige Medienwechsel nicht-adhärenente Zellen beseitigt. Durch regelmäßige Sichtung der Zellen unter dem Lichtmikroskop wurde die Zusammensetzung der Zellkultur regelmäßig überprüft. Diese sollte möglichst nah an den *in-vivo* Verhältnissen sein.

Die Real-Time-PCR ist ein thermozyklisches Verfahren, das bereits sehr geringe Mengen an DNA und RNA nachweisen kann. Es handelt sich dabei um eine Methode, die sich in vielen unterschiedlichen Bereichen der Medizin bewährt und etabliert hat. Die RT-PCR (Reverse Transkriptase Polymerasekettenreaktion) ist ein sehr sensitives Verfahren, das kleine Mengen an DNA-Fragmenten mit hoher Ausbeute (exponentiell) amplifiziert. Da es sich um eine Nachweismethode auf Transkriptions- und nicht auf Proteinebene handelt, werden eher falsch positive Ergebnisse erzielt. Denn eine Kontamination oder unspezifische Amplifikation kann zu PCR-Produkten führen, die unter Umständen nicht von den erwarteten Produkten zu unterscheiden sind. Das Ergebnis der PCR hängt vor allem von der Qualität der cDNA und der Affinität der Primerpaare zur cDNA ab.

Durch die Berechnung und Etablierung optimaler Annealingtemperaturen wurde versucht, für jedes Primerpaar optimale Bedingungen zu schaffen. Die Negativkontrolle, die u.a. die Annealingtemperatur des Primers für das jeweilige Gen überprüft, zeigte zu keinem Zeitpunkt ein PCR-Produkt. Auch der spezifische Schmelzpunkt im Dissoziationsprotokoll zeigte keinen Hinweis auf eine Verunreinigung der Proben, bzw. unspezifische Amplifikation anderer Gene. In allen Proben konnte die Genexpression von β -Aktin nachgewiesen werden. Für die quantitative Analyse der Genexpression wurde dieses gleichmäßig exprimierte β -Aktin, das im Zytoskelett von Eukaryoten vorkommt, zur Normalisierung der ermittelten C_t -Werte der Zielgene verwendet. Mit Hilfe dieser Normalisierung und der Miteinbeziehung unstimulierter Kontrollen, die als Kalibrator dienten, konnte die $\Delta\Delta C_t$ -Methode angewendet werden und so die relative Expression der zu untersuchenden Gene berechnet werden. Die Ergebnisse wurden dokumentiert und mit der Statistik- und Analysesoftware GraphPad Prism Version 4.03 dargestellt.

Zum Nachweis des Glycinrezeptors in humanen gingivalen Keratinozyten wurden Gewebeschnitte und eine primäre Zellkultur immunhistochemisch untersucht. Die Spezifität des verwendeten Antikörpers, der gegen die α -Untereinheit des Glycinrezeptors gerichtet ist, wurde zunächst anhand von Epidermis-Gewebeschnitten überprüft (Ergebnis nicht gezeigt). Hier zeigte sich, wie auch von Denda et al. (2003) in einer Studie belegt, eine starke Immunreaktivität in epidermalen Keratinozyten.

Die Färbung des Glycinrezeptors in den kultivierten Zellen erfolgte mit demselben Antikörper. Es wurde darauf geachtet, dass die Zellen auf den Deckgläschen angewachsen waren und einen zu 80-90 % konfluenten Zellrasen bildeten. Um eine Eigenfluoreszenz der Deckgläschen zu vermeiden, wurden spezielle Glasdeckgläschen der Firma Menzel verwendet.

5.2 Diskussion der Ergebnisse

5.2.1 Expression des Glycinrezeptors in humanen gingivalen Keratinozyten

Erstmals konnte in humanen gingivalen Keratinozyten ein extrasynaptischer Glycinrezeptor nachgewiesen werden. Der verwendete Antikörper bindet spezifisch an die $\alpha 1$ -Untereinheit des

Glycinrezeptors. Der Nachweis gerade dieser Untereinheit ist für die funktionelle Bedeutung des Glycinrezeptors von Bedeutung, da hier die sogenannte „Tasche“ zur Glycinbindung liegt (Lynch, 2004).

Die genaue Charakterisierung des Glycinrezeptors erfolgte u.a. durch Webb und Lynch (2007) an neuronalen Zellen. Der Aufbau des Rezeptors mit transmembranären Domänen und extrazellulären Agonisten-Bindungsstellen, sowie einem Chlorid-sensitiven transmembranären Kanal lässt sich gut mit funktionellen Beobachtungen hinsichtlich inhibitorischer Chloridionenströme vereinbaren. Auch Zhong et al. (2003) gingen von einer membranären Lokalisation des Glycinrezeptors, v.a. auch in nicht-neuronalen Zellen aus und entwickelten so ein Erklärungsmodell für die Glycinwirkung auf Kupfferzellen. Die Voraussetzung für die Übertragung dieses Modells auf Gingivaepithelzellen wäre eine membranäre Lokalisation des Glycinrezeptors. Denda et al. (2003) sprachen erstmals vom immunhistochemischen Nachweis des Glycinrezeptors in epidermalen Keratinozyten, zeigten jedoch keine immunhistochemischen Bilder, die auf eine genaue Lokalisation des Rezeptors schließen lassen konnten. Unsere Untersuchungen an Gewebeschnitten humaner Epidermis konnten keine klare Aussage einer Membranständigkeit des Rezeptors zulassen (Ergebnis nicht gezeigt). Die Immunfluoreszenz- und immunhistochemische Analyse des Glycinrezeptors in Gingivaschnitten und kultivierten Zellen zeigte eine vermehrte Ansammlung des Glycinrezeptors im Zellinneren. Unabhängig davon konnte durch diese Arbeit erstmalig überhaupt der Beweis für eine Glycinrezeptor-Expression in humanen gingivalen Keratinozyten erbracht werden. Für die funktionelle Bedeutung des Glycinrezeptors ist die Frage nach der Lokalisation des Rezeptors jedoch wichtig. Sahebali et al. (2007) beobachteten den Glycinrezeptor im Zytoplasma verschiedener kultivierter Oligodendroglia-Zelllinien. Auch Bechade et al. (1996) beschrieben eine Lokalisation des Glycinrezeptors im Zellinneren von Rückenmarksneuronen. Obwohl wenig über eine Translokation des Rezeptors bekannt ist, konnte eine Ubiquitinierung mit nachfolgender Rezeptorinternalisation und Proteolyse beobachtet werden (Buttner et al., 2001). Den Eynden et al. (2009) vermuteten im Rahmen ihrer Untersuchungen an Makrogliazellen, dass die Lokalisation des Glycinrezeptors in der Plasmamembran und dementsprechend auch die funktionelle Bedeutung des Rezeptors von den Konditionen der Zellkultur abhängt. Auch schienen unbekannte Faktoren in der normalen physiologischen Umgebung von

Gewebeschnitten notwendig für eine membranäre Expression zu sein. Es stellte sich also weiterhin die Frage nach der funktionellen Bedeutung dieser Rezeptoren und einer Erklärung für die gemessenen Ionenströme. Den Eynden et al. (2009) vermuteten diesbezüglich, dass der modulatorische Effekt von Glycin auf die Aktivität der Mikroglia ein vom Glycinrezeptor unabhängiger Mechanismus sei.

Im Rahmen der Genexpressionsanalysen von Entzündungsmarkern und im Rahmen der Translokationsanalysen von NF κ B wurden in dieser Arbeit nachgeschaltete Effekte des Glycinrezeptors nachgewiesen. Es kann also davon ausgegangen werden, dass der in humanen gingivalen Keratinozyten nachgewiesene Glycinrezeptor einen Glycineffekt vermittelt. Bei den später diskutierten theoretischen Überlegungen gehen wir weiterhin von einer zumindest partiell vorhandenen Membranständigkeit des Glycinrezeptors aus und verwenden Wheelers, bzw. Zhongs Hypothese als Erklärungsgrundlage für eine funktionelle Bedeutung des Glycinrezeptors.

5.2.2 Diskussion der Ergebnisse der Vorversuche

Etablierung der Versuchsbedingungen

KGM enthält als Vollmedium verschiedene Aminosäuren, darunter auch Glycin. Da nicht abzusehen war ob, wie lange und in welchem Ausmaß das Glycin im Medium Einfluss auf die Zellen hat und so möglicherweise die Versuchsergebnisse verfälscht worden wären, wurden die Stimulationsversuche des Hauptversuches in glycinfreiem Medium, SMEM, durchgeführt. Auch Spittler et al. (1999) setzten für ihre Stimulationsversuche mit Monozyten glycinfreies Medium ein, das je nach Versuchsansatz mit Glycin in entsprechender Konzentration ergänzt wurde.

Ob in SMEM grundsätzlich eine IL-1 β vermittelte Induktion der untersuchten Gene stattfindet, wurde in Vorversuchen abgeklärt. Es zeigte sich, dass eine IL-1 β vermittelte Induktion sowohl im KGM-, als auch im SMEM-Versuchsansatz möglich war. Die Expressionsänderungen der Gene zeigten in beiden Versuchsansätzen gleiche Tendenzen. Die Expressionsmaxima der Entzündungsmarker im SMEM-Versuchsansatz wurden im betrachteten Zeitraum von 480 min meist nach 60 min IL-1 β -Stimulation detektiert. Danach zeigte sich meist eine verminderte

Expression. Im Hauptversuch wurde die Genexpression deswegen nach 30 min und 60 min Stimulationsdauer analysiert.

Um *in-vitro* die Situation einer Entzündung zu simulieren, wurde von vielen Autoren eine IL-1 β -Konzentration von 1 ng/ml zur Stimulation von Keratinozyten verwendet, da dies etwa der erhöhten IL-1 β -Konzentration entspricht, die in der gingivalen Sulkusflüssigkeit und im gingivalen Gewebe des entzündlich veränderten Parodonts gefunden wurde (Honig et al., 1989; Hou et al., 1994; Preiss und Meyle, 1994; Mathur et al., 1996). Da unter den künstlichen Bedingungen der *in-vitro*-Stimulation die Effektivität des Stimulans herabgesetzt sein kann, wurde im Vorversuch eine erhöhte Konzentration von 5 ng/ml in Anlehnung an IL-1 β -Stimulationsversuche von Vardar-Sengul et al. (2009) ausgetestet.

In bisherigen Studien wurden Immunzellen und Makrogliazellen mit 0,1-1 mM Glycin behandelt, renale Zellen, Hepatozyten und Endothelzellen mit bis zu 10 mM Glycin (den Eynden et al., 2009). Im Rahmen dieser Arbeit wurden Glycinkonzentrationen von 1 mM und 5 mM in Vorversuchen ausgetestet.

Bei der Genanalyse von IL-6 zeigte sich eine stärkere IL-1 β induzierte Expressionssteigerung bei einer Konzentration von 5 ng/ml (+2,8-fache mRNA-Expression nach 30 min) als bei 1 ng/ml (+1,7-fache mRNA-Expression). Diese, bereits durch verschiedene Studien gezeigte Hochregulierung der Expression pro-inflammatorischer Interleukine wie IL-6 durch IL-1 β -Stimulation, war Voraussetzung für die weiteren Stimulationsversuche mit Glycin, in denen die modulierende Wirkung auf den IL-1 β Effekt untersucht werden sollte (Lapp und Lapp, 2005; Vardar-Sengul et al., 2009). Es wurde eine IL-1 β -Konzentration von 5 ng/ml für den Hauptversuch festgesetzt. Eine modulierende Wirkung von Glycin, in Form einer Hemmung der IL-6-Expressionssteigerung durch IL-1 β -Stimulation ohne Glycinapplikation, wurde bereits bei der geringeren Konzentration von 1 mM erreicht (-3,2-fache mRNA-Expression nach 30 min). Eine Erhöhung der Glycinkonzentration auf 5 mM ergab keine Effektverstärkung.

Nach der Auswertung der Vorversuche wurde für den Hauptversuch eine Stimulation mit 5 ng/ml IL-1 β und eine Behandlung mit 1 mM Glycin geplant. Die Expressionsanalysen erfolgten nach 30 min und 60 min Stimulation. Diese kurzen Zeitspannen wurden gewählt, um speziell die frühe Antwort bezüglich der Expression der entsprechenden Gene zu untersuchen und das Ausmaß von sekundären Geninduktionen zu verringern.

In einem letzten Teil der Vorversuche wurde der Einfluss von Glycin als isoliertes Stimulans auf die Keratinozyten betrachtet. Die gezeigte kurzfristige Hochregulierung von IL-1 β (2,5-fache mRNA-Expression) und IL-6 (4,5-fache mRNA-Expression) nach 30 min Behandlung mit 5 mM Glycin, lässt eine inflammatorische Komponente von Glycin vermuten. Um diese unerwartete Beobachtung zu verifizieren, wurde der Hauptversuch um einen Versuchsansatz mit isolierter Applikation von Glycin [1 mM] erweitert.

5.2.3 Diskussion der Ergebnisse des Hauptversuchs

Genexpressionsanalysen der Stimulationsversuche

Die inflammatorische Wirkung von IL-1 β war in der Vergangenheit Fokus zahlreicher molekularbiologischer Untersuchungen (Dinarello, 1996). In verschiedenen Zellarten konnten Expressionssteigerungen sogenannter Entzündungsmarker, induziert durch IL-1 β -Stimulation, nachgewiesen werden (Lapp und Lapp, 2005; Vardar-Sengul et al., 2009). Steinberg et al. (2006) zeigten die IL-1 β regulierte mRNA-Expression verschiedener Gene in humanen gingivalen Keratinozyten nach einer Stimulation mit 200 units IL-1 β (entspricht 1 ng/ml). Eine erhöhte mRNA-Expression wurde bei den Genen gefunden, die im Zusammenhang mit zellulärem Stress, DNA-Reparaturvorgängen, Zellzyklus und Proliferation, antipathogenen Antworten, extrazellulärem Matrixturnover und Angiogenese eine Rolle spielen. In gingivalen Fibroblasten zeigten Vardar-Sengul et al. (2009), dass die Gene IL-6 und IL-8 durch IL-1 β -Stimulation mit 5 ng/ml eine Expressionssteigerung erfuhren. Angelehnt an diese Studie und aufgrund eigener Ergebnisse aus verschiedenen Vorversuchen wurden in der vorliegenden Studie Keratinozyten mit 5 ng/ml IL-1 β stimuliert. Es konnte gezeigt werden, dass in gingivalen Keratinozyten eine IL-1 β -Stimulation mit 5 ng/ml eine signifikante Steigerung der relativen Genexpression von IL-6 (nach 30 min und 60 min) und IL-8 (nach 60 min), bezogen auf eine nicht stimulierte, in glycinfreiem Medium kultivierte Kontrollgruppe, bewirkte.

Die IL-1 β Signalkaskade bewirkt einen Anstieg der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration (Arora et al., 1995). Das LPS parodontal pathogener Bakterien wirkt über einen ähnlichen Signalweg und führt ebenfalls zu einer erhöhten Ca²⁺-Konzentration in der Zelle. In beiden Fällen wirkt die erhöhte Ca²⁺-Konzentration im Endeffekt als Trigger-Signal für eine Expressionssteigerung

solcher Gene, die für Zytokine, inflammatorische Mediatoren und Enzyme kodieren (Zhong et al., 2003). Die Analyse solcher veränderten Genexpressionen und die Etablierung von Erklärungsmodellen auf molekularer Ebene stehen im Zusammenhang mit der Suche nach neuen potentiellen Angriffsziele zur therapeutischen Intervention, beispielsweise im Rahmen einer Parodontitistherapie (Steinberg et al., 2006).

Zhong et al. (2003) zeigten, dass Glycin als anti-inflammatorischer, immunmodulierender und zytotoxischer Wirkstoff einen intrazellulären Ca^{2+} -Anstieg infolge von LPS-Stimulation abfangen konnte. Wheeler et al. (1999) entwickelten eine Arbeitshypothese, welche die funktionelle Bedeutung des Glycinrezeptors in Kupfferzellen erklärte. In ihrem Erklärungsmodell legten sie den Schwerpunkt auf die anti-inflammatorische Wirkung von Glycin, die auf einem Chlorideinstrom basiert. Ein inflammatorischer Stimulus bewirkt einen Anstieg des intrazellulären Ca^{2+} . Vermittelt über einen Toll-like Rezeptor wird eine Tyrosinkinase aktiviert, die wiederum die Phospholipase C aktiviert. So wird IP_3 gebildet, wodurch intrazelluläre Ca^{2+} -Speicher geöffnet werden. Die gleichzeitige Depolarisation der Plasmamembran führt zum Einfluss extrazellulären Ca^{2+} und weitere spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle werden geöffnet. Ca^{2+} wirkt dann als „Second Messenger“ und stößt weitere zelluläre Signalwege an, bewirkt Zellmobilisation und Transkription, sowie letztendlich die Translation von Zytokinen. So wie LPS führt auch eine IL-1 β -Stimulation zu einem Ca^{2+} -Anstieg, unter der Voraussetzung, dass intakte Aktinfilamente vorhanden sind, die in fokale Adhäsionsmoleküle inserieren. Weitere Voraussetzung ist, dass IL-1 β schnell ansprechende Gene wie c-fos reguliert. Die Fähigkeit c-fos zu regulieren basiert auf der physikalischen Nähe von intrazellulären Ca^{2+} -Speichern zu membranassoziierten FAK-Proteinen (McCulloch et al., 2006).

Der Glycinrezeptor besteht aus 48 kDa α -Untereinheiten und 58 kDa β -Untereinheiten in variabler Zusammensetzung und beinhaltet einen pentamerischen Komplex der einen transmembranären Chloridkanal bildet (Rajendra et al., 1997). Zhongs Hypothese besagt, dass über die Aktivierung dieses Rezeptors das Ca^{2+} abhängige Signal unterdrückt wird. Wurde durch LPS oder IL-1 β der Ca^{2+} -Signalweg angestoßen und bindet gleichzeitig Glycin extrazellulär an den Rezeptor, wird der Chloridkanal geöffnet und es folgt ein Chlorid (Cl^-)-Einstrom, der zu einer relativen Hyperpolarisation der Zelle führt. Der Ca^{2+} -Einstrom wird inhibiert, eine weitere Depolarisation wird erschwert und das Öffnen von spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanälen wird

verhindert. Auch der Potentialunterschied am endoplasmatischen Retikulum wird verändert und ein Öffnen der IP₃-Rezeptor-regulierten Ca²⁺-Kanäle erschwert (Wheeler et al., 1999). Der Ca²⁺-Signalweg wird blockiert, folgende inflammatorische Effekte werden unterdrückt.

Unsere Stimulationsversuche mit IL-1 β und gleichzeitiger Applikation von Glycin zeigten einen anti-inflammatorischen Effekt des Glycins und stützen somit diese Hypothese. In Anwesenheit von Glycin zeigte eine Stimulation mit IL-1 β keinen signifikanten Effekt auf die Genexpression von IL-6 nach 30 min, d.h. keine Expressionserhöhung, wie sie ohne Glycinapplikation gemessen worden war. Auch die Genanalyse von IL-8 zeigte nach 60 min einen durch Glycin signifikant abgeschwächten IL-1 β -Effekt verglichen mit der isolierten IL-1 β -Stimulation. Durch diese Modulation der IL-1 β -Signalkaskade könnte Glycin seine protektive Wirkung auf gingivale Keratinozyten entfalten.

Ausgehend von dieser Erkenntnis wäre eine Behandlung mit Glycin zur Begrenzung inflammatorischer Prozesse, beispielsweise im Rahmen einer Parodontitistherapie, denkbar. In anderen Gebieten der Medizin wurde bereits an einen Einsatz gegen Asthma, Sepsis, in der Transplantationsmedizin oder in der Tumorthherapie gedacht (Rao und Reddy, 1987; Jimuro et al., 1996; Rose et al., 1997; Schemmer et al., 1998). Klinische Untersuchungen sollten die protektive und therapeutische Wirkung einer Glycinapplikation im zahmedizinischen Bereich überprüfen.

Bei den *in-vitro*-Experimenten der vorliegenden Arbeit konnte die anti-inflammatorische Wirkung von Glycin zu einem späteren Zeitpunkt nicht in dem Maße bestätigt werden, wie es nach 30 min der Fall war. Die Genexpression von IL-6 zeigte nach 60 min Glycin- und IL-1 β -Behandlung ebenso eine signifikante Erhöhung wie unter alleiniger IL-1 β -Stimulation, bezogen auf die unstimulierte Kontrolle. Die Expressionsrate von IL-8 nach 60 minütiger Behandlung mit Glycin und IL-1 β zeigte, in Relation zur unstimulierten Kontrolle, eine signifikante Erhöhung wie auch die durch IL-1 β -Stimulation ohne Glycin erreichte Expressionsänderung. Ein Glycineffekt zeigte sich dennoch: IL-1 β induzierte unter Glycin eine IL-8-Expression auf geringerem Niveau. Die anti-inflammatorische Wirkung von Glycin schien folglich nach 60 min nachzulassen. Auch die Ergebnisse aus den Vorversuchen ließen eine ähnliche Tendenz erkennen: Im Versuchsansatz mit 5 ng/ml IL-1 β und 1 mM Glycin verminderte sich die Genexpression von IL-1 β und IL-6 nach 30 min und nach 120 min, nach 60 min jedoch nicht. Eine mögliche Erklärung

für diese Beobachtungen wäre eine Desensibilisierung des Glycinrezeptors nach 60 min, welche die Entfaltung der anti-inflammatorischen Wirkung von Glycin einschränkt. Studien zu dieser Thematik wiesen darauf hin, dass Kupfferzellen nach langfristigem Kontakt mit Glycin (4 wöchiger Kontakt) nicht mehr sensitiv auf die Aminosäure reagierten, alveolare Makrophagen und neutrophile Granulozyten jedoch schon. Bei all diesen Zellen war initial eine Aktivierung des Glycin-abhängigen Chloridkanals nachgewiesen worden. Vermutet wurde eine unterschiedliche Desensibilisierung aufgrund verschiedener Untereinheiten des Glycinrezeptors (Wheeler et al., 2000). Nach einem längeren Glycinkontakt wurde in Kupfferzellen und in neuronalem Gewebe eine herunterregulierte Funktion des Chloridkanals beobachtet, abhängig von der Phosphorylierung der α -Untereinheit (Akaike und Kaneda, 1989; Ruiz-Gomez et al., 1991). Ob es bereits nach 60 minütigem Glycinkontakt zu einer Funktionsminderung des Glycinrezeptors in Gingivaepithelzellen kommt, bleibt offen. Deutlich wird aber, dass Glycin nicht in jedem Falle eine anti-inflammatorische Wirkung entfalten kann.

Rausch-Fan et al. (2005) zeigten erstmalig, dass Glycin in humanen gingivalen Fibroblasten eine IL-1 β induzierte Expressionssteigerung von Prostaglandin E₂ verstärkte. Prostaglandin E₂ (PGE₂) ist zusammen mit Prostaglandin I₂ das Hauptprostaglandin, das in Entzündungsgeschehen involviert ist. PGE₂ wurde in entzündlichem Exsudat der Gingiva nachgewiesen, hat proinflammatorische und immunmodulatorische Eigenschaften und spielt eine wichtige Rolle in Entstehung und Fortschreiten von Parodontalerkrankungen (Nakashima et al., 1994; Van Dyke und Serhan, 2003). PGE₂ öffnet Ca²⁺-Kanäle in humanen gingivalen Fibroblasten sowohl in der Zellmembran als auch in intrazellulären Speichern über den IP₃-Rezeptor. Über diesen erhöhten Ca²⁺-Spiegel wird dann die bereits beschriebene Kaskade weitergeführt und bewirkt u.a. eine Hochregulation der Gene IL-1 β und IL-6 (Lee et al., 1992; Noguchi et al., 1999; Yucel-Lindberg et al., 1999; Qu et al., 2002). In der Studie von Rausch-Fan et al. (2005) führte interessanterweise auch die alleinige Behandlung mit Glycin (maximaler Einfluss bei einer Konzentration von 3 mM Glycin) zu einer erhöhten PGE₂-Expression. Daraus schlossen die Autoren, dass Glycin durch die Induktion von inflammatorischen Mediatoren eine Rolle in entzündlichen Prozessen einnehmen könnte. Dagegen spricht wiederum eine Beobachtung von Qu et al. (2002). Sie bemerkten, dass gerade der durch PGE₂ bewirkte Anstieg der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration durch Glycin geblockt werden konnte. Auch wenn Qu et al. (2002) nicht von einem direkten Zusammenhang

von Calcium-Modulation und zytoprotektivem Effekt sprechen, lässt sich mit dem Grundverständnis der Ca^{2+} -Kaskade ein ebensolcher Zusammenhang vermuten. Insgesamt wird die ambivalente Rolle von Glycin, einerseits pro-inflammatorisch (PGE_2 -Produktion erhöht in gingivalen Fibroblasten, gezeigt von Rausch-Fan et al. (2005)), andererseits anti-inflammatorisch (Abschwächung der PGE_2 -Wirkung, gezeigt von Qu et al. (2002)) deutlich.

Der ambivalente Charakter von Glycin zeigte sich auch in unseren Untersuchungen. In Einklang mit den Stimulationsergebnissen von Rausch-Fan et al. (2005), konnte in unseren Vorversuchen ein inflammatorischer Aspekt der Glycinwirkung auf unstimulierte Zellen gezeigt werden. Im Hauptversuch konnte diese Beobachtung, auch bezüglich des zeitlichen Verlaufs, bestätigt werden. 30 min nach alleiniger Glycinapplikation auf die Zellen zeigte sich eine signifikante Erhöhung der IL-6-Genexpression.

Auch die signifikante Verringerung der IL-10-Genexpression nach 60 min kann im Sinne einer inflammatorischen Wirkung von Glycin interpretiert werden. IL-10 ist ein anti-inflammatorisches Zytokin und hemmt die Proliferation von T-Lymphozyten nach Antigenpräsentation durch Monozyten (Ding und Shevach, 1992; Taga und Tosato, 1992; Moore et al., 1993). Die Expressionsanalyse von IL-10 muss allerdings differenzierter betrachtet werden. Die im Laufe einer Entzündungsreaktion durch LPS aktivierten Monozyten/Makrophagen und T-Lymphozyten produzieren zunächst pro-inflammatorische Zytokine wie beispielsweise $\text{TNF}\alpha$. Um die Entzündungsreaktion zu limitieren produzieren die Zellen im Sinne einer Gegenregulation das anti-inflammatorische Zytokin IL-10. IL-10 wird jedoch erst später synthetisiert, wenn die $\text{TNF}\alpha$ -Sekretion schon wieder unterdrückt wird (Fiorentino et al., 1989; Fiorentino et al., 1991; Ertel et al., 1995; Spittler et al., 1999). Dies erklärt, weshalb in unseren Untersuchungen zu den frühen Zeitpunkten 30 min und 60 min keine IL-1 β induzierte Expressionsänderung von IL-10 zu beobachten war. Auch der von Spittler et al. (1999) gezeigte immunmodulatorische, anti-inflammatorische Effekt von Glycin auf pro-inflammatorisch stimulierte Zellen (LPS), der zu einer beschleunigten, erhöhten IL-10-Expression führte, konnte in unseren mit IL-1 β stimulierten Keratinozyten nicht nachvollzogen werden. Möglich ist, dass diese Entwicklung zu einem späteren Zeitpunkt beobachtet hätte werden können. Nach Spittlers Beobachtungen spricht eine vermehrte IL-10-Expression für eine anti-inflammatorische Wirkung des Stimulans. Die in dieser Arbeit durch alleinige Glycinapplikation erwirkte Verminderung der IL-10-Expression nach

60 min deutete daher eher auf eine pro-inflammatorische Komponente von Glycin hin. Da die IL-10 Produktion zeitlich versetzt zur Produktion der pro-inflammatorischen Mediatoren erfolgt, kann der beobachtete Effekt der verringerten IL-10-Expression nach 60 min in inhaltlichen Zusammenhang mit den Expressionssteigerungen von IL-6 und IL-8 nach 30 min gebracht werden. Die IL-10-Expressionsdaten stützen demnach die Hypothese einer initialen pro-inflammatorischen Wirkung von Glycin auf unstimulierte Keratinozyten.

Bei der Analyse der Expressionsdaten zum späteren Zeitpunkt, also nach 60 min, fiel auf, dass die Entzündungsmarker IL-6 und IL-8 nach 60 min isolierter Glycinapplikation eine signifikant verminderte mRNA-Expression zeigten. Anscheinend bewirkte die isolierte Anwendung von Glycin, die nach 30 min Hinweis auf eine inflammatorische Reaktion der Zellen zeigte, nach 60 min einen gegenteiligen, also anti-inflammatorischen Effekt.

Die Ergebnisse zusammenfassend, ist zu sagen, dass eine isolierte Applikation von Glycin nach 30 min proinflammatorisch wirkte, aber bei gleichzeitiger IL-1 β -Stimulation eine anti-inflammatorische Wirkung, also einen abschwächenden Effekt auf die pro-inflammatorische Wirkung von IL-1 β , hatte. Im weiteren Verlauf (nach 60 min) zeigte sich eine anti-inflammatorische Wirkung der isolierten Glycinbehandlung, aber keine oder nur eine geringe anti-inflammatorische Abschwächung der pro-inflammatorischen Wirkung der IL-1 β -Stimulation.

Es stellt sich die Frage, auf welche Weise Glycin eine solch verschiedene Wirkung mit und ohne Beeinflussung durch IL-1 β -Stimulation auf die Gingivaepithelzellen ausüben kann.

Die Chloridbewegung über die Plasmamembran und somit die Wirkung von Glycin hängt, wie bereits dargestellt, stark mit der Hyper- und Depolarisation der Zelle zusammen. Die Bewegung von Chloridionen ist grundsätzlich abhängig vom Verhältnis des Membranpotentials der Zelle zum Gleichgewichtspotential von Chlorid. Bei geöffnetem Chloridkanal kann es abhängig vom Spannungspotential zu Influx oder Efflux der Chloridionen kommen. Liegt das Ruhepotential der Zelle unter dem Chloridgeleichgewichtspotential (durchschnittlich -82 mV nach Nernst), so kommt es zum Ausstrom der Chloridanionen und es folgt eine Depolarisation (Webb und Lynch, 2007). Um das Verhältnis des Ruhemembranpotentials der oralen Keratinozyten zum Chloridgeleichgewichtspotential beurteilen zu können, müsste dessen genauer Wert bekannt sein. Das Ruhemembranpotential oraler Keratinozyten wurde jedoch noch nicht detailliert

untersucht. Das Ruhemembranpotential der meisten Zellen liegt bei -60 mV bis -90 mV. Es entsteht vor allem durch die Aktivität der Na^+/K^+ -transportierenden ATPase, die auf praktisch allen tierischen Zellen vorkommt (Koolman, Röhm et al. 2003). Orale Keratinozyten zeigen einen polaren Aufbau mit Tight-Junctions und Gap-Junctions. Dadurch können sie gut ein negatives Ruhemembranpotential gegenüber dem positiven Extrazellulärraum aufrechterhalten.

Hoppe et al. (1989) wiesen nach, dass ein $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$ -Co-Transporter in Neurogliazellen zu einer erhöhten intrazellulären Chlorid-Konzentration führen kann und so zu einem weniger negativen Nernst-Potential für Chlorid führt. Bei Ligandenbindung am GABA-Rezeptor, der gewisse Gemeinsamkeiten mit dem Glycinrezeptor hat, kommt es zu einem Chloridausstrom, der gemessen werden konnte und zur Depolarisation der Zelle führte (Hoppe und Kettenmann, 1989). In Progenitorzellen der Oligodendrozyten konnte gezeigt werden, dass Glycin u.a. über die Aktivierung des Glycinrezeptors zu einer Depolarisation der Plasmamembran führte und dadurch spannungsabhängige Calciumkanäle aktivierte, wodurch ein Calcium-Influx ermöglicht wurde (Du et al., 2002; Lee et al., 2005; den Eynden et al., 2009).

Unter der Annahme, dass auch in den gingivalen Keratinozyten ein weniger negatives Nernst-Potential für Chlorid vorliegt, läge das Ruhemembranpotential der Zellen bei einem im Vergleich dazu negativeren Wert. Wird dann durch Glycin der Chloridkanal des Glycinrezeptors geöffnet, kommt es zum Ausstrom von Chloridionen aus der Zelle (Abb. 17A), eine Depolarisation folgt und spannungsabhängige Calciumkanäle werden aktiviert, wodurch ein Calcium-Influx erfolgt. Der Calcium-Signalweg führt schlussendlich zur veränderten Expression der untersuchten Entzündungsmarker (Abb. 17B).

Mit Hilfe dieses Erklärungsmodells wäre der pro-inflammatorische Effekt einer isolierten Glycinapplikation auf Gingivaepithelzellen zu verstehen (Expressionssteigerung von IL-6 nach 30 min isolierter Glycinapplikation, Expressionsminderung von IL-10 nach 60 min isolierter Glycinapplikation). Ob sich mit der Zeit die elektrophysikalischen Gegebenheiten umkehren, es damit wieder zu einem Chlorideinstrom kommt, oder ob eine Refraktärzeit des Glycinrezeptors für die Ergebnisse nach 60 min (Expressionsminderung von IL-6 nach 60 min Glycinbehandlung) verantwortlich ist, muss in weiteren Untersuchungen geklärt werden.

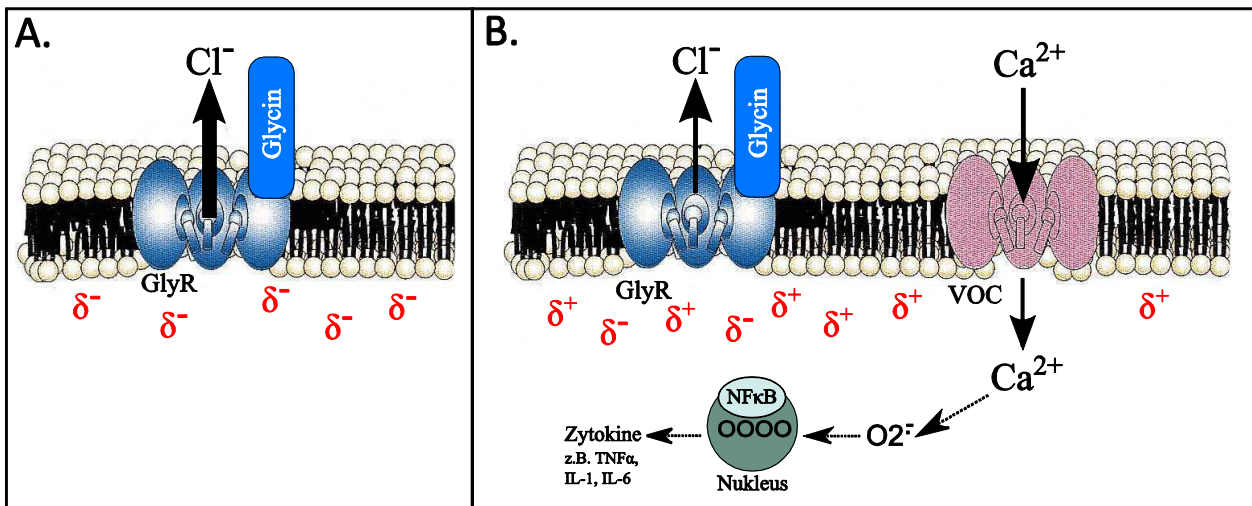


Abb. 17: Erklärungsmodell der pro-inflammatorischen Wirkung von Glycin.

A. Ausgangssituation: Das Ruhepotential der Zelle liegt unter dem Chloridgleichgewichtspotential (δ^-). Bei Glycinbindung an den Glycinrezeptor (GlyR) wird die Membran durchlässig für Chloridionen, es erfolgt ein Chloridausstrom.

B. Der Chloridausstrom führt zu einer Depolarisation der Zelle (δ^+) und kommt langsam zum Erliegen. Durch die Depolarisation werden spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle (VOC) aktiviert, es kommt zum Ca^{2+} -Influx. Der ansteigende intrazelluläre Ca^{2+} -Spiegel dient als Signal für viele intrazelluläre Prozesse und führt u.a. zur Produktion pro-inflammatorischer Zytokine.

Modifiziert nach Wheeler et al. (2000).

Obwohl im Laufe der letzten Überlegungen von einer Depolarisation der Zelle durch Glycin gesprochen wurde, hat Wheelers Arbeitshypothese, in der er von einer durch Glycin bewirkten Hyperpolarisation spricht, weiterhin Gültigkeit. Wie bereits mehrfach erwähnt, führt eine IL-1 β -Stimulation über einen intrazellulären Ca^{2+} -Anstieg zur Depolarisation der Zelle. In diesem depolarisierten Zustand ist das Membranpotential der Zelle relativ positiver und liegt damit über dem Chloridgleichgewichtspotential (Abb. 18A). Bei Durchlässigkeit der Membran für Chlorid kommt es zu einem Einstrom der Chloridionen und somit zu einer relativen Hyperpolarisation, die einen Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration abschwächt (Yim et al., 2011). Genau diese Durchlässigkeit für Chlorid wird bei der Glycinbindung an den Glycinrezeptor der Keratinozyten bewirkt (Abb. 18B, vgl. Abb. 4).

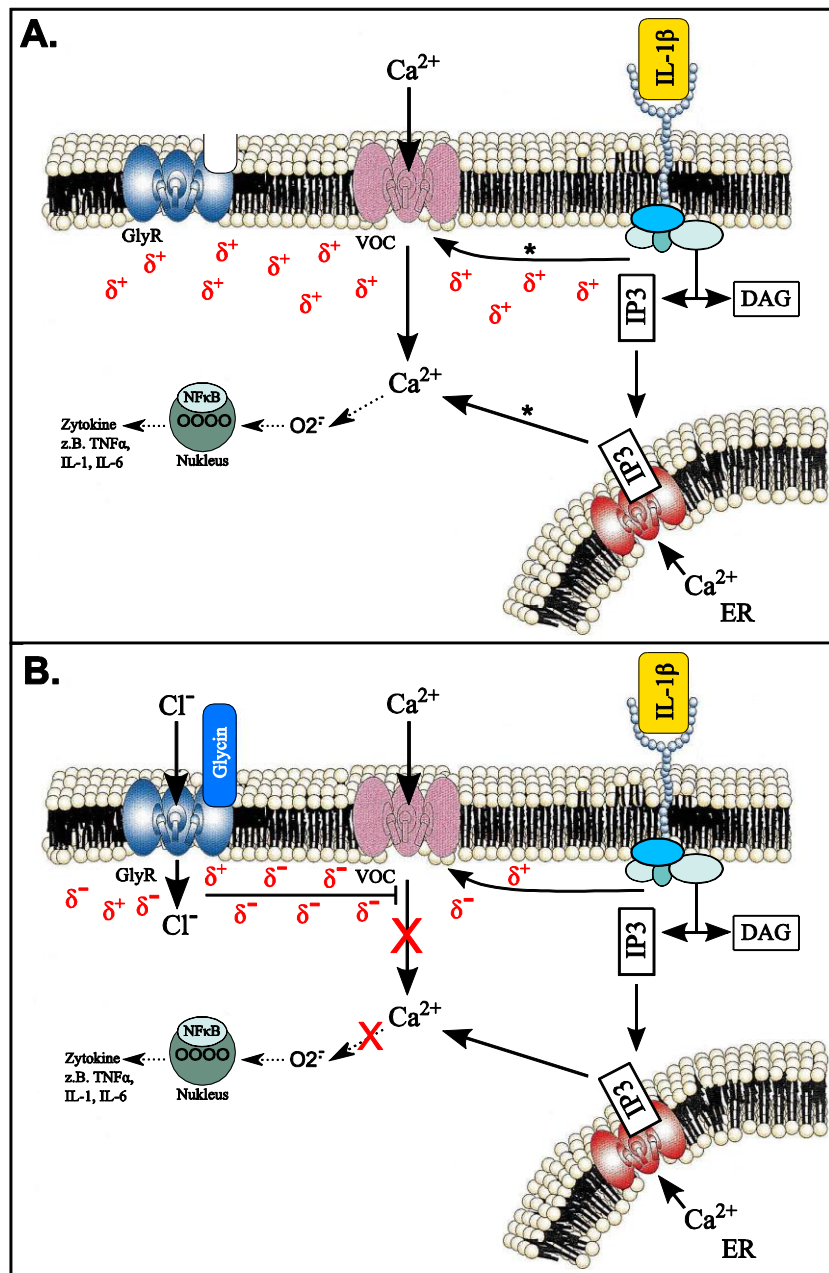


Abb. 18: IL-1 β -Stimulation in Abwesenheit (A) und Anwesenheit (B) von Glycin.

A. Pro-inflammatorische Wirkung von IL-1 β . IL-1 β -Stimulation bewirkt einen intrazellulären Ca²⁺-Anstieg (*) und führt dadurch zur Depolarisation der Zelle. Das Membranpotential der Zelle ist relativ positiver und liegt damit über dem Chloridgleichgewichtspotential (δ^+).

B. Abschwächender, anti-inflammatorischer Effekt von Glycin auf die pro-inflammatorische Wirkung von IL-1 β . Bei Glycinbindung an den Glycinrezeptor (GlyR) wird die Membran durchlässig für Chloridionen. Aufgrund des durch IL-1 β -Stimulation erzeugten relativ positiven Membranpotentials kommt es zum Chlorideinstrom in die Zelle. Der Chlorideinstrom bewirkt eine relative Hyperpolarisation der Zelle (δ^-), die den Anstieg an intrazellulärem Ca²⁺ abschwächt. Intrazelluläre Signalwege und Zytokin-Produktion, die von intrazellulärem Ca²⁺ abhängen, werden gehemmt.

Modifiziert nach Wheeler et al. (2000).

Die an Wheeler angelehnte Erklärung der anti-inflammatorischen Wirkung von Glycin während der IL-1 β -Stimulation steht somit in keinem Widerspruch zur inflammatorischen Glycinwirkung bei isolierter Applikation. Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen die Hypothese zu, dass ein anti-inflammatorischer Effekt von Glycin auf gingivale Keratinozyten im Zusammenhang mit einer inflammatorischen Stimulation möglich ist, eine isolierte Glycinapplikation jedoch auch einen inflammatorischen Effekt haben kann.

Aufgrund der dargestellten Überlegungen stellt sich die Frage nach Potentialänderungen der Gingivaepithelzellen während der Stimulationsversuche.

Messungen von Ionenströmen z.B über Patch-Clamp-Technik und intrazelluläre Ca²⁺-Konzentrationsmessungen der gingivalen Keratinozyten könnten in diesem Zusammenhang interessante Erkenntnisse liefern und Gegenstand zukünftiger Studien sein.

5.2.4 Translokation von NF κ B

NF κ B gilt als „ein zentraler Mediator der humanen Immunantwort“. Seine Aktivierung geschieht u.a. durch eine Vielzahl von Bakterien oder deren Produkte (Pahl, 1999). Die Translokation von NF κ B in den Zellkern ist auch ein notwendiger Schritt im Zuge des IL-1 β -Signalweges. Das IL-1 β -Signal beginnt mit der Ligandenbindung am membranären Rezeptor und führt über die Bindung des Transkriptionsfaktors NF κ B an die Promotorregion verschiedener Gene zur Transkription solcher Gene, die an der Immunantwort der Zelle beteiligt sind (McKay und Cidlowski, 1998).

Um die PCR-Ergebnisse zu ergänzen und die IL-1 β -Wirkung sowie die Glycinwirkung mit einer zweiten „funktionellen“ Methode zu untersuchen, wurden zeitabhängige Immunfluoreszenzanalysen zur nukleären Translokation von NF κ B durchgeführt. Humane gingivale Keratinozyten wurden mit 5 ng/ml IL-1 β stimuliert und gleichzeitig mit 0 mM oder 1 mM Glycin behandelt. Steinberg et al. (2006) untersuchten auf gleiche Weise die IL-1 β vermittelte Translokation von NF κ B in den Zellkern gingivaler Keratinozyten über indirekte Immunfluoreszenz. Sie wählten eine Stimulation von 200 units IL-1 β (entspricht 1 ng/ml) und Zeitpunkte von 3, 6, 12, und 24 h. Sie beobachteten eine maximale Translokation von NF κ B in den Kern 6 h nach der durch Zytokin-Stimulation ausgelösten Entzündungsreaktion der Keratinozyten mit anschließender

Zurückverteilung ins Zytoplasma. Auch Ergebnisse von cDNA Microarrayanalysen zeigten für die durch NFκB induzierten Gene (darunter IL-8) nach dieser Zeit von 6 h eine maximale Expression. Beeinflusst durch Steinbergs Studie wurde im Versuchsaufbau dieser Arbeit eine Stimulationsdauer von 6 h gewählt. Zusätzlich wurde eine Analyse nach 2 h durchgeführt, da unsere PCR-Untersuchungen die höchste Genaktivität zu einem früheren Zeitpunkt, nach 60 min, zeigten. Auch Vardar-Sengul et al. (2009) entschieden sich für eine NFκB-Analyse nach 2 h IL-1β-Stimulation. Sie zeigten, dass nach 2 h NFκB sowie der Transkriptionsfaktor AP-1 (Activating Protein-1) aktiv wurden und die Transkription inflammatorischer Gene veränderten.

Wie auch in früheren Studien belegt, ergab unsere Analyse der unstimulierten Zellen eine klare Verteilung des NFκBs im Zytoplasma. Im Zytoplasma liegt NFκB als inaktiver Komplex mit dem I-κB Protein vor (Havard et al., 2005; Steinberg et al., 2006). Sowohl IL-1β-Stimulation als auch isolierte Glycinbehandlung [1 mM] bewirkten eine Translokation von NFκB in den Zellkern. Hierzu muss das I-κB Protein abgespalten werden. Die NFκB-Translokation in den Kern, zusammen mit einem abnehmenden Immunfluoreszenzsignal im Zytoplasma weist typischerweise auf die funktionelle Aktivierung des Transkriptionsfaktors hin. Der aktive Transkriptionsfaktor treibt die Expression von über 150 Zielgenen an, deren Mehrheit für Proteine kodiert, die an der humanen Immunantwort beteiligt sind (Pahl, 1999). Unsere Beobachtung, dass isolierte Glycinapplikation nach 2 h den Faktor NFκB aktivierte, bestätigt unsere Ergebnisse auf der RNA-Ebene einer kurzzeitig inflammatorischen Wirkung der Aminosäure. Die nach 6 h beobachtete Zurückverteilung und Inaktivierung des Faktors deckt sich mit der aufgestellten Hypothese, dass diese Entzündungsreaktion der Zelle nur für kurze Zeit besteht. In der Expressionsanalyse von IL-6 und IL-8 zum späteren Zeitpunkt (60 min) sowie in der Immunfluoreszenzanalyse der NFκB-Lokalisation zum späteren Zeitpunkt (6 h) überwog dagegen die anti-inflammatorische Komponente der Glycinapplikation.

Die anti-inflammatorische, immunmodulierende Komponente von Glycin auf IL-1β-stimulierte Zellen zeigte sich, parallel zu den Expressionsdaten der PCR-Analyse, in der Abschwächung der IL-1β Wirkung. Die durch isolierte IL-1β-Stimulation induzierte Translokation von NFκB in den Zellkern wurde durch die Anwesenheit von Glycin zum frühen Zeitpunkt nach 2 h verhindert. Zum späten Zeitpunkt nach 6 h zeigte sich NFκB vereinzelt im Zellkern der Keratinozyten, was sich mit den Erkenntnissen aus der PCR-Analyse nach 60 min (keine/geringe anti-

inflammatorisch wirkende Abschwächung des IL-1 β -Effektes durch Glycin) deckt. Eine Refraktärzeit des Glycinrezeptors und somit eine funktionelle Einschränkung kann vermutet werden. Weiterführende Studien in dieser Richtung im Sinne einer Frequenzmodulierung der De- und Resensibilisierung des Rezeptors über pharmakologische Agonisten wären hilfreich, um die Dynamik dieses Geschehens weiter aufzuklären.

6. Zusammenfassung

Parodontalerkrankungen haben in der deutschen Bevölkerung, insbesondere bei Erwachsenen und Senioren, in den letzten Jahren erheblich zugenommen. Ursächlich für die Entstehung einer Gingivitis ist meist eine bakterienhaltige dentale Plaque. Die Auswirkungen dieser bakteriell induzierten Entzündungsreaktion der Gingivaepithelzellen kann auf molekularer Ebene anhand von Aktivitätsänderungen der zellulären Signalwege und daraus folgender Expressionsänderung pro-inflammatorischer Mediatoren nachvollzogen werden. Ziel dieser Arbeit war es, die Expression des Glycinrezeptors in humanen gingivalen Keratinozyten nachzuweisen und die funktionelle Bedeutung des Glycinrezeptors, speziell auch im simulierten Entzündungszustand der Zellen, zu untersuchen.

Der Glycinrezeptor wurde in Gingivagewebeschnitten und Zellen immunhistochemisch und mittels Immunfluoreszenz angefärbt. Primäre Gingivaepithelzellen wurden kultiviert und über einen Zeitraum von 30 bzw. 60 min mit IL-1 β stimuliert und/oder einer Glycinbehandlung ausgesetzt. Die über den Glycinrezeptor vermittelte Wirkung von Glycin auf orale Keratinozyten wurde über Genexpressionsanalysen von Entzündungsmarkern untersucht. Dazu wurde die RNA-Extraktion und die Synthese der komplementären DNA vorgenommen. Die quantitative Auswertung der mRNA-Expression von IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10 und β -Aktin (Referenzgen) erfolgte mit Hilfe der Real-Time-Polymerasenkettenreaktion. Eine Translokation des Transkriptionsfaktors NF κ B in den Zellkern der Keratinozyten, als Hinweis auf einen pro- oder anti-inflammatorischen Stimulus (IL-1 β und/oder Glycin), wurde mittels Immunfluoreszenzanalyse untersucht.

Gewebeschnitte und Zellen des Gingivaepithels zeigten eine positive Färbung des Glycinrezeptors im Zytoplasma der Zelle. Die Genexpressionsanalyse von IL-6 ergab, dass eine durch IL-1 β -Stimulation induzierte Hochregulation (2,3-fache mRNA-Expression) bei gleichzeitiger Glycinbehandlung nach 30 min geringer ausfiel (0,8-fache mRNA-Expression) als die Hochregulation nach alleiniger IL-1 β -Stimulation. Dieser Effekt konnte nach 60 min nicht mehr beobachtet werden (nach IL-1 β Stimulation 1,8-fache mRNA-Expression, nach Kombination IL-1 β /Glycin 2,0-fache mRNA-Expression). Eine isolierte Glycinapplikation zeigte nach 30 min eine IL-6-Expressionserhöhung (3,4-fache mRNA-Expression), nach 60 min eine

Expressionsverringern (0,6-fache mRNA-Expression). Bei der Analyse von IL-8 wurde die durch IL-1 β -Stimulation induzierte signifikante Expressionssteigerung nach 60 min (3,5-fache mRNA-Expression) durch die Anwesenheit von Glycin leicht abgeschwächt (2,4-fache mRNA-Expression). Glycin alleine bewirkte nach 60 min eine Expressionsminderung von IL-8 (0,5-fache mRNA-Expression). Die Genexpression von IL-10 zeigte sich nach 60 min in Anwesenheit von Glycin vermindert (0,4-fache mRNA-Expression). Die IL-1 β -Expression zeigte keine signifikanten Änderungen. Die Immunfluoreszenzanalysen des Transkriptionsfaktors NF κ B zeigten eine nukleäre Translokation des Transkriptionsfaktors nach IL-1 β -Stimulation. Diese Translokation wurde durch die zusätzliche Anwesenheit von Glycin zum frühen Zeitpunkt (nach 2 h) vollständig, dann (nach 6 h) größtenteils verhindert. Glycin alleine bewirkte nach 2 h eine Konzentrationsanreicherung von NF κ B im Zellkern, nach 6 h zeigte sich eine Rückverteilung ins Zytoplasma.

Die vorliegende Arbeit konnte erstmals die Expression des Glycinrezeptors in humanen gingivalen Keratinozyten nachweisen. Die Genexpressionsanalysen zeigten, dass Glycin sowohl ein pro- als auch ein anti-inflammatorisches Potential hat, abhängig von seiner Wirkungsdauer (nach 30 min pro-inflammatorisch, nach 60 min anti-inflammatorisch). In Verbindung mit einer IL-1 β -Stimulation der Zellen hatte Glycin nach 30 min einen abschwächenden, anti-inflammatorischen Effekt auf die pro-inflammatorische Wirkung von IL-1 β . Diese anti-inflammatorische Modulation durch Glycin zeigte sich jedoch nach 60 min nicht oder nur gering. Die Ergebnisse wurden durch Translokationsanalysen von NF κ B ergänzt und bestätigt. Auf dieser Grundlage aufbauend könnten Ansätze für die Prävention bzw. Therapie parodontaler Entzündungen entwickelt werden.

7. Literaturverzeichnis

- Akaike N, Kaneda M. Glycine-gated chloride current in acutely isolated rat hypothalamic neurons. *J Neurophysiol* 1989; 6: 1400-1409
- Ansel J, Perry P, Brown J, Damm D, Phan T, Hart C, Luger T, Hefeneider S. Cytokine modulation of keratinocyte cytokines. *J Invest Dermatol* 1990; 6 Suppl: 101S-107S
- Arora PD, Ma J, Min W, Cruz T, McCulloch CA. Interleukin-1-induced calcium flux in human fibroblasts is mediated through focal adhesions. *J Biol Chem* 1995; 11: 6042-6049
- Attstrom R, Egelberg J. Emigration of blood neutrophils and monocytes into the gingival crevices. *J Periodontal Res* 1970; 1: 48-55
- Baggiolini M, Clark-Lewis I. Interleukin-8, a chemotactic and inflammatory cytokine. *FEBS Lett* 1992; 1: 97-101
- Baggiolini M, Walz A, Kunkel SL. Neutrophil-activating peptide-1/interleukin 8, a novel cytokine that activates neutrophils. *J Clin Invest* 1989; 4: 1045-1049
- Beato M, Groot-Kormelink PJ, Colquhoun D, Sivilotti LG. Openings of the rat recombinant alpha 1 homomeric glycine receptor as a function of the number of agonist molecules bound. *J Gen Physiol* 2002; 5: 443-466
- Bechade C, Colin I, Kirsch J, Betz H, Triller A. Expression of glycine receptor alpha subunits and gephyrin in cultured spinal neurons. *Eur J Neurosci* 1996; 2: 429-435
- Belton CM, Goodwin PC, Fatherazi S, Schubert MM, Lamont RJ, Izutsu KT. Calcium oscillations in gingival epithelial cells infected with *Porphyromonas gingivalis*. *Microbes Infect* 2004; 5: 440-447
- Bergman MR, Cheng S, Honbo N, Piacentini L, Karliner JS, Lovett DH. A functional activating protein 1 (AP-1) site regulates matrix metalloproteinase 2 (MMP-2) transcription by cardiac cells through interactions with JunB-Fra1 and JunB-FosB heterodimers. *Biochem J* 2003; Pt 3: 485-496
- Berridge MJ, Lipp P, Bootman MD. The versatility and universality of calcium signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2000; 1: 11-21
- Boch JA, Wara-aswapati N, Auron PE. Interleukin 1 signal transduction--current concepts and relevance to periodontitis. *J Dent Res* 2001; 2: 400-407
- Bondy SC, Werdel JM, Fletcher RT, Chader GJ. Retinal pigment epithelium contains a distinctive strychnine-binding site. *Neurochem Res* 1982; 12: 1445-1452
- Breivik T, Gundersen Y, Fonnum F, Vaagenes P, Opstad PK. Chronic glycine treatment inhibits ligature-induced periodontal disease in Wistar rats. *J Periodontal Res* 2005; 1: 43-47
- Bresnihan B, Cunnane G. Interleukin-1 receptor antagonist. *Rheum Dis Clin North Am* 1998; 3: 615-628
- Brown LF, Yeo KT, Berse B, Yeo TK, Senger DR, Dvorak HF, van de Water L. Expression of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) by epidermal keratinocytes during wound healing. *J Exp Med* 1992; 5: 1375-1379
- Bruck R, Wardi J, Aeed H, Avni Y, Shirin H, Avinoach I, Shahmurov M, Hershkoviz R. Glycine modulates cytokine secretion, inhibits hepatic damage and improves survival in a model of endotoxemia in mice. *Liver Int* 2003; 4: 276-282

- Burns K, Clatworthy J, Martin L, Martinon F, Plumpton C, Maschera B, Lewis A, Ray K, Tschopp J, Volpe F. Tollip, a new component of the IL-1RI pathway, links IRAK to the IL-1 receptor. *Nat Cell Biol* 2000; 6: 346-351
- Burns K, Martinon F, Esslinger C, Pahl H, Schneider P, Bodmer JL, Di Marco F, French L, Tschopp J. MyD88, an adapter protein involved in interleukin-1 signaling. *J Biol Chem* 1998; 20: 12203-12209
- Burzomato V, Beato M, Groot-Kormelink PJ, Colquhoun D, Sivilotti LG. Single-channel behavior of heteromeric alpha1beta glycine receptors: an attempt to detect a conformational change before the channel opens. *J Neurosci* 2004; 48: 10924-10940
- Bustin SA. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol* 2000; 2: 169-193
- Buttner C, Sadtler S, Leyendecker A, Laube B, Griffon N, Betz H, Schmalzing G. Ubiquitination precedes internalization and proteolytic cleavage of plasma membrane-bound glycine receptors. *J Biol Chem* 2001; 46: 42978-42985
- Carmona-Cuenca I, Herrera B, Ventura JJ, Roncero C, Fernandez M, Fabregat I. EGF blocks NADPH oxidase activation by TGF-beta in fetal rat hepatocytes, impairing oxidative stress, and cell death. *J Cell Physiol* 2006; 2: 322-330
- Cimasoni G. Crevicular fluid updated. *Monogr Oral Sci* 1983: III-VII, 1-152
- Colotta F, Sironi M, Borre A, Pollicino T, Bernasconi S, Boraschi D, Mantovani A. Type II interleukin-1 receptor is not expressed in cultured endothelial cells and is not involved in endothelial cell activation. *Blood* 1993; 5: 1347-1351
- Dale BA. Periodontal epithelium: a newly recognized role in health and disease. *Periodontol* 2000 2002: 70-78
- Dale BA, Krisanaprakornkit S. Defensin antimicrobial peptides in the oral cavity. *J Oral Pathol Med* 2001; 6: 321-327
- Dayer JM, Bresnihan B. Targeting interleukin-1 in the treatment of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2002; 3: 574-578
- den Eynden JV, Ali SS, Horwood N, Carmans S, Brone B, Hellings N, Steels P, Harvey RJ, Rigo JM. Glycine and glycine receptor signalling in non-neuronal cells. *Front Mol Neurosci* 2009: 9
- Denda M, Fuziwara S, Inoue K. Influx of calcium and chloride ions into epidermal keratinocytes regulates exocytosis of epidermal lamellar bodies and skin permeability barrier homeostasis. *J Invest Dermatol* 2003; 2: 362-367
- DGP (Deutsche Gesellschaft für Parodontologie e.V.). *Klassifikation der Parodontalerkrankungen*. Berlin: Quintessenz-Verlags-GmbH, 2002
- Dinarello CA. Biologic basis for interleukin-1 in disease. *Blood* 1996; 6: 2095-2147
- Ding L, Shevach EM. IL-10 inhibits mitogen-induced T cell proliferation by selectively inhibiting macrophage costimulatory function. *J Immunol* 1992; 10: 3133-3139
- Dolmetsch RE, Lewis RS, Goodnow CC, Healy JI. Differential activation of transcription factors induced by Ca²⁺ response amplitude and duration. *Nature* 1997; 6627: 855-858
- Du JL, Xu LY, Yang XL. Glycine receptors and transporters on bullfrog retinal Muller cells. *Neuroreport* 2002; 13: 1653-1656
- Ebersole JL, Singer RE, Steffensen B, Filloon T, Kornman KS. Inflammatory mediators and immunoglobulins in GCF from healthy, gingivitis and periodontitis sites. *J Periodontal Res* 1993; 6 Pt 2: 543-546

- Ertel W, Kremer JP, Kenney J, Steckholzer U, Jarrar D, Trentz O, Schildberg FW. Downregulation of proinflammatory cytokine release in whole blood from septic patients. *Blood* 1995; 5: 1341-1347
- Fatherazi S, Belton CM, Cai S, Zarif S, Goodwin PC, Lamont RJ, Izutsu KT. Calcium receptor message, expression and function decrease in differentiating keratinocytes. *Pflugers Arch* 2004; 1: 93-104
- Fatherazi S, Belton CM, Izutsu KT. Sequential activation of store-operated currents in human gingival keratinocytes. *J Invest Dermatol* 2003; 1: 120-131
- Feske S. Calcium signalling in lymphocyte activation and disease. *Nat Rev Immunol* 2007; 9: 690-702
- Fiorentino DF, Bond MW, Mosmann TR. Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. *J Exp Med* 1989; 6: 2081-2095
- Fiorentino DF, Zlotnik A, Mosmann TR, Howard M, O'Garra A. IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. *J Immunol* 1991; 11: 3815-3822
- Fischer CP. Interleukin-6 in acute exercise and training: what is the biological relevance? *Exerc Immunol Rev* 2006: 6-33
- Foo SY, Nolan GP. NF-kappaB to the rescue: RELs, apoptosis and cellular transformation. *Trends Genet* 1999; 6: 229-235
- Froh M, Thurman RG, Wheeler MD. Molecular evidence for a glycine-gated chloride channel in macrophages and leukocytes. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2002; 4: G856-863
- Garant P. Oral cells and tissues. Carol stream, Illinois: Quintessence Publishing, 2003
- Gentet LJ, Clements JD. Binding site stoichiometry and the effects of phosphorylation on human alpha1 homomeric glycine receptors. *J Physiol* 2002; Pt 1: 97-106
- Gibson UE, Heid CA, Williams PM. A novel method for real time quantitative RT-PCR. *Genome Res* 1996; 10: 995-1001
- Gill DL, Spassova MA, Soboloff J. Signal transduction. Calcium entry signals--trickles and torrents. *Science* 2006; 5784: 183-184
- Goldring SR. Pathogenesis of bone and cartilage destruction in rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 2003: ii11-16
- Grudzinska J, Schemm R, Haeger S, Nicke A, Schmalzing G, Betz H, Laube B. The beta subunit determines the ligand binding properties of synaptic glycine receptors. *Neuron* 2005; 5: 727-739
- Grutz G. New insights into the molecular mechanism of interleukin-10-mediated immunosuppression. *J Leukoc Biol* 2005; 1: 3-15
- Gundersen RY, Vaagenes P, Breivik T, Fonnum F, Opstad PK. Glycine--an important neurotransmitter and cytoprotective agent. *Acta Anaesthesiol Scand* 2005; 8: 1108-1116
- Hardingham GE, Arnold FJ, Bading H. Nuclear calcium signaling controls CREB-mediated gene expression triggered by synaptic activity. *Nat Neurosci* 2001; 3: 261-267
- Hardingham GE, Chawla S, Johnson CM, Bading H. Distinct functions of nuclear and cytoplasmic calcium in the control of gene expression. *Nature* 1997; 6613: 260-265
- Hardingham GE, Cruzalegui FH, Chawla S, Bading H. Mechanisms controlling gene expression by nuclear calcium signals. *Cell Calcium* 1998; 2-3: 131-134

- Havard L, Rahmouni S, Boniver J, Delvenne P. High levels of p105 (NFkB1) and p100 (NFkB2) proteins in HPV16-transformed keratinocytes: role of E6 and E7 oncoproteins. *Virology* 2005; 2: 357-366
- Healy JI, Dolmetsch RE, Timmerman LA, Cyster JG, Thomas ML, Crabtree GR, Lewis RS, Goodnow CC. Different nuclear signals are activated by the B cell receptor during positive versus negative signaling. *Immunity* 1997; 4: 419-428
- Heinrich PC, Behrmann I, Haan S, Hermanns HM, Muller-Newen G, Schaper F. Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. *Biochem J* 2003; Pt 1: 1-20
- Higuchi R, Fockler C, Dollinger G, Watson R. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology (N Y)* 1993; 9: 1026-1030
- Honig J, Rordorf-Adam C, Siegmund C, Wiedemann W, Erard F. Increased interleukin-1 beta (IL-1 beta) concentration in gingival tissue from periodontitis patients. *J Periodontal Res* 1989; 6: 362-367
- Hoppe D, Kettenmann H. GABA triggers a Cl⁻ efflux from cultured mouse oligodendrocytes. *Neurosci Lett* 1989; 3: 334-339
- Hou LT, Liu CM, Chang WK. Increased interleukin-1 beta levels in gingival crevicular fluid of Chinese periodontal patients. *J Formos Med Assoc* 1994; 2: 99-103
- Ibelgaufts H, 2002: Horst Ibelgaufts Cope: cytokine online pathfinder encyclopaedia. (Zugriffsdatum: 08/26/2011).
- Iimuro Y, Bradford BU, Forman DT, Thurman RG. Glycine prevents alcohol-induced liver injury by decreasing alcohol in the rat stomach. *Gastroenterology* 1996; 5: 1536-1542
- Izutsu KT, Belton CM, Chan A, Fatherazi S, Kanter JP, Park Y, Lamont RJ. Involvement of calcium in interactions between gingival epithelial cells and *Porphyromonas gingivalis*. *FEMS Microbiol Lett* 1996; 2-3: 145-150
- Janssens S, Beyaert R. Functional diversity and regulation of different interleukin-1 receptor-associated kinase (IRAK) family members. *Mol Cell* 2003; 2: 293-302
- Jefferies C, Bowie A, Brady G, Cooke EL, Li X, O'Neill LA. Transactivation by the p65 subunit of NF-kappaB in response to interleukin-1 (IL-1) involves MyD88, IL-1 receptor-associated kinase 1, TRAF-6, and Rac1. *Mol Cell Biol* 2001; 14: 4544-4552
- Jones MV, Westbrook GL. The impact of receptor desensitization on fast synaptic transmission. *Trends Neurosci* 1996; 3: 96-101
- Jones SA. Directing transition from innate to acquired immunity: defining a role for IL-6. *J Immunol* 2005; 6: 3463-3468
- Kim EY, Schrader N, Smolinsky B, Bedet C, Vannier C, Schwarz G, Schindelin H. Deciphering the structural framework of glycine receptor anchoring by gephyrin. *EMBO J* 2006; 6: 1385-1395
- Kinane DF, Winstanley FP, Adonogianaki E, Moughal NA. Bioassay of interleukin 1 (IL-1) in human gingival crevicular fluid during experimental gingivitis. *Arch Oral Biol* 1992; 2: 153-156
- Kirsch J, Betz H. The postsynaptic localization of the glycine receptor-associated protein gephyrin is regulated by the cytoskeleton. *J Neurosci* 1995; 6: 4148-4156
- Kodama A, Matozaki T, Shinohara M, Fukuhara A, Tachibana K, Ichihashi M, Nakanishi H, Takai Y. Regulation of Ras and Rho small G proteins by SHP-2. *Genes Cells* 2001; 10: 869-876

- Kojima H, Aizawa Y, Yanai Y, Nagaoka K, Takeuchi M, Ohta T, Ikegami H, Ikeda M, Kurimoto M. An essential role for NF-kappa B in IL-18-induced IFN-gamma expression in KG-1 cells. *J Immunol* 1999; 9: 5063-5069
- Kornman KS. Mapping the pathogenesis of periodontitis: a new look. *J Periodontol* 2008; 8 Suppl: 1560-1568
- Lapp CA, Lapp DF. Analysis of interleukin-activated human gingival fibroblasts: modulation of chemokine responses by female hormones. *J Periodontol* 2005; 5: 803-812
- Lee S, Chen TT, Barber CL, Jordan MC, Murdock J, Desai S, Ferrara N, Nagy A, Roos KP, Iruela-Arispe ML. Autocrine VEGF signaling is required for vascular homeostasis. *Cell* 2007; 4: 691-703
- Lee SC, Zhong YM, Yang XL. Expression of glycine receptor and transporter on bullfrog retinal Muller cells. *Neurosci Lett* 2005; 2: 75-79
- Lee SH, Soyoola E, Chanmugam P, Hart S, Sun W, Zhong H, Liou S, Simmons D, Hwang D. Selective expression of mitogen-inducible cyclooxygenase in macrophages stimulated with lipopolysaccharide. *J Biol Chem* 1992; 36: 25934-25938
- Legendre P. A reluctant gating mode of glycine receptor channels determines the time course of inhibitory miniature synaptic events in zebrafish hindbrain neurons. *J Neurosci* 1998; 8: 2856-2870
- Lewis TM, Schofield PR, McClellan AM. Kinetic determinants of agonist action at the recombinant human glycine receptor. *J Physiol* 2003; Pt 2: 361-374
- Lidl T. *Zell- und Gewebekultur*. Heidelberg- Berlin: Spektrum Akademischer Verlag, 2002
- Ling L, Cao Z, Goeddel DV. NF-kappaB-inducing kinase activates IKK-alpha by phosphorylation of Ser-176. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 7: 3792-3797
- Listgarten MA, Schifter CC, Laster L. 3-year longitudinal study of the periodontal status of an adult population with gingivitis. *J Clin Periodontol* 1985; 3: 225-238
- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 2001; 4: 402-408
- Lo YY, Luo L, McCulloch CA, Cruz TF. Requirements of focal adhesions and calcium fluxes for interleukin-1-induced ERK kinase activation and c-fos expression in fibroblasts. *J Biol Chem* 1998; 12: 7059-7065
- Loe H, Theilade E, Jensen SB. Experimental Gingivitis in Man. *J Periodontol* 1965: 177-187
- Löffler G. *Basiswissen Biochemie*. Heidelberg: Spronger Verlag, 2005
- Loos BG, John RP, Laine ML. Identification of genetic risk factors for periodontitis and possible mechanisms of action. *J Clin Periodontol* 2005: 159-179
- Luo L, Cruz T, McCulloch C. Interleukin 1-induced calcium signalling in chondrocytes requires focal adhesions. *Biochem J* 1997: 653-658
- Lynch JW. Molecular structure and function of the glycine receptor chloride channel. *Physiol Rev* 2004; 4: 1051-1095
- Ma HT, Patterson RL, van Rossum DB, Birnbaumer L, Mikoshiba K, Gill DL. Requirement of the inositol trisphosphate receptor for activation of store-operated Ca²⁺ channels. *Science* 2000; 5458: 1647-1651
- Mangin JM, Baloul M, Prado De Carvalho L, Rogister B, Rigo JM, Legendre P. Kinetic properties of the alpha2 homo-oligomeric glycine receptor impairs a proper synaptic functioning. *J Physiol* 2003; Pt 2: 369-386

- Maraldi NM, Marmioli S, Rizzoli R, Mazzotti G, Manzoli FA. Phosphatidylinositol 3-kinase translocation to the nucleus is an early event in the interleukin-1 signalling mechanism in human osteosarcoma Saos-2 cells. *Adv Enzyme Regul* 1999; 33-49
- Marten NW, Burke EJ, Hayden JM, Straus DS. Effect of amino acid limitation on the expression of 19 genes in rat hepatoma cells. *FASEB J* 1994; 8: 538-544
- Mathur A, Michalowicz B, Castillo M, Aeppli D. Interleukin-1 alpha, interleukin-8 and interferon-alpha levels in gingival crevicular fluid. *J Periodontal Res* 1996; 7: 489-495
- Matthews JS, O'Neill LA. Distinct roles for p42/p44 and p38 mitogen-activated protein kinases in the induction of IL-2 by IL-1. *Cytokine* 1999; 9: 643-655
- McCulloch CA, Downey GP, El-Gabalawy H. Signalling platforms that modulate the inflammatory response: new targets for drug development. *Nat Rev Drug Discov* 2006; 10: 864-876
- McKay LI, Cidlowski JA. Cross-talk between nuclear factor-kappa B and the steroid hormone receptors: mechanisms of mutual antagonism. *Mol Endocrinol* 1998; 1: 45-56
- Meyer G, Kirsch J, Betz H, Langosch D. Identification of a gephyrin binding motif on the glycine receptor beta subunit. *Neuron* 1995; 3: 563-572
- Micheelis W, Schiffner U. Vierte Deutsche Mundgesundheitsstudie (DMS IV). Köln: Deutscher Ärzte-Verlag, 2006
- Miyamoto S, Akiyama SK, Yamada KM. Synergistic roles for receptor occupancy and aggregation in integrin transmembrane function. *Science* 1995; 269: 883-885
- Molinero LL, Fuertes MB, Girart MV, Fainboim L, Rabinovich GA, Costas MA, Zwirner NW. NF-kappa B regulates expression of the MHC class I-related chain A gene in activated T lymphocytes. *J Immunol* 2004; 173: 5583-5590
- Moore KW, Ogarra A, Malefyt RD, Vieira P, Mosmann TR. Interleukin-10. *Annual Review of Immunology* 1993; 11: 165-190
- Müller HP. Checkliste Parodontologie. Stuttgart-New York: Thieme Verlag, 2006
- Nakashima K, Roehrich N, Cimasoni G. Osteocalcin, prostaglandin E2 and alkaline phosphatase in gingival crevicular fluid: their relations to periodontal status. *J Clin Periodontol* 1994; 21: 327-333
- NCBI, 2011: Entrez Gene database. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=gene> (Zugriffsdatum: 12.12.2011).
- NCBI, 2011: The National Center of Biotechnology Information. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> (Zugriffsdatum: 12.12.2011).
- Nissen NN, Polverini PJ, Koch AE, Volin MV, Gamelli RL, DiPietro LA. Vascular endothelial growth factor mediates angiogenic activity during the proliferative phase of wound healing. *Am J Pathol* 1998; 152: 1445-1452
- Noguchi K, Shitashige M, Ishikawa I. Involvement of cyclooxygenase-2 in interleukin-1alpha-induced prostaglandin production by human periodontal ligament cells. *J Periodontol* 1999; 70: 902-908
- O'Neill LA, Dinarello CA. The IL-1 receptor/toll-like receptor superfamily: crucial receptors for inflammation and host defense. *Immunol Today* 2000; 21: 206-209
- Oh-hora M, Rao A. Calcium signaling in lymphocytes. *Curr Opin Immunol* 2008; 20: 250-258
- Pahl HL. Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene* 1999; 19: 6853-6866

- Palsson EM, Popoff M, Thelestam M, O'Neill LA. Divergent roles for Ras and Rap in the activation of p38 mitogen-activated protein kinase by interleukin-1. *J Biol Chem* 2000; 11: 7818-7825
- Parekh AB, Putney JW, Jr. Store-operated calcium channels. *Physiol Rev* 2005; 2: 757-810
- Patterson RL, Boehning D, Snyder SH. Inositol 1,4,5-trisphosphate receptors as signal integrators. *Annu Rev Biochem* 2004: 437-465
- Peinelt C, Vig M, Koomoa DL, Beck A, Nadler MJ, Koblan-Huberson M, Lis A, Fleig A, Penner R, Kinet JP. Amplification of CRAC current by STIM1 and CRACM1 (Orai1). *Nat Cell Biol* 2006; 7: 771-773
- Pfeiffer F, Graham D, Betz H. Purification by affinity chromatography of the glycine receptor of rat spinal cord. *J Biol Chem* 1982; 16: 9389-9393
- Preiss DS, Meyle J. Interleukin-1 beta concentration of gingival crevicular fluid. *J Periodontol* 1994; 5: 423-428
- Qu W, Ikejima K, Zhong Z, Waalkes MP, Thurman RG. Glycine blocks the increase in intracellular free Ca²⁺ due to vasoactive mediators in hepatic parenchymal cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2002; 6: G1249-1256
- Qwarnstrom EE, MacFarlane SA, Page RC, Dower SK. Interleukin 1 beta induces rapid phosphorylation and redistribution of talin: a possible mechanism for modulation of fibroblast focal adhesion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991; 4: 1232-1236
- Rajendra S, Lynch JW, Schofield PR. The glycine receptor. *Pharmacol Ther* 1997; 2: 121-146
- Rajendra S, Vandenberg RJ, Pierce KD, Cunningham AM, French PW, Barry PH, Schofield PR. The unique extracellular disulfide loop of the glycine receptor is a principal ligand binding element. *EMBO J* 1995; 13: 2987-2998
- Rao MS, Reddy JK. Peroxisome proliferation and hepatocarcinogenesis. *Carcinogenesis* 1987; 5: 631-636
- Rausch-Fan X, Ulm C, Jensen-Jarolim E, Schedle A, Boltz-Nitulescu G, Rausch WD, Matejka M. Interleukin-1beta-induced prostaglandin E2 production by human gingival fibroblasts is upregulated by glycine. *J Periodontol* 2005; 7: 1182-1188
- Redlich K, Hayer S, Ricci R, David JP, Tohidast-Akrad M, Kollias G, Steiner G, Smolen JS, Wagner EF, Schett G. Osteoclasts are essential for TNF-alpha-mediated joint destruction. *J Clin Invest* 2002; 10: 1419-1427
- Rose ML, Germolec D, Arteel GE, Schoonhoven R, Thurman RG. Dietary glycine prevents increases in hepatocyte proliferation caused by the peroxisome proliferator WY-14,643. *Chem Res Toxicol* 1997; 10: 1198-1204
- Ruiz-Gomez A, Vaello ML, Valdivieso F, Mayor F, Jr. Phosphorylation of the 48-kDa subunit of the glycine receptor by protein kinase C. *J Biol Chem* 1991; 1: 559-566
- Sahebali S, Buckinx R, Van Den Eynden J, Rigo JM. Expression of glycine receptor and transporters in different oligodendroglial cell lines. *Neuron Glia Biol* 2007; 2: 169.
- Sandros J, Karlsson C, Lappin DF, Madianos PN, Kinane DF, Papapanou PN. Cytokine responses of oral epithelial cells to Porphyromonas gingivalis infection. *J Dent Res* 2000; 10: 1808-1814
- Schemmer P, Schoonhoven R, Swenberg JA, Bunzendahl H, Thurman RG. Gentle in situ liver manipulation during organ harvest decreases survival after rat liver transplantation: role of Kupffer cells. *Transplantation* 1998; 8: 1015-1020

- Schmieden V, Kuhse J, Betz H. Mutation of glycine receptor subunit creates beta-alanine receptor responsive to GABA. *Science* 1993; 261: 256-258
- Schoenwaelder SM, Petch LA, Williamson D, Shen R, Feng GS, Burridge K. The protein tyrosine phosphatase Shp-2 regulates RhoA activity. *Curr Biol* 2000; 23: 1523-1526
- Schytte Blix IJ, Helgeland K, Hvattum E, Lyberg T. Lipopolysaccharide from *Actinobacillus actinomycetemcomitans* stimulates production of interleukin-1 β , tumor necrosis factor- α , interleukin-6 and interleukin-1 receptor antagonist in human whole blood. *J Periodontol* 1999; 70: 34-40
- Seitz CS, Deng H, Hinata K, Lin Q, Khavari PA. Nuclear factor κ B subunits induce epithelial cell growth arrest. *Cancer Res* 2000; 60: 4085-4092
- Senger DR, Galli SJ, Dvorak AM, Perruzzi CA, Harvey VS, Dvorak HF. Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science* 1983; 220: 983-985
- Soboloff J, Spassova MA, Tang XD, Hewavitharana T, Xu W, Gill DL. Orai1 and STIM reconstitute store-operated calcium channel function. *J Biol Chem* 2006; 281: 20661-20665
- Spittler A, Reissner CM, Oehler R, Gornikiewicz A, Gruenberger T, Manhart N, Brodowicz T, Mittlboeck M, Boltz-Nitulescu G, Roth E. Immunomodulatory effects of glycine on LPS-treated monocytes: reduced TNF- α production and accelerated IL-10 expression. *FASEB J* 1999; 13: 563-571
- Stachlewitz RF, Li X, Smith S, Bunzendahl H, Graves LM, Thurman RG. Glycine inhibits growth of T lymphocytes by an IL-2-independent mechanism. *J Immunol* 2000; 165: 176-182
- Steinberg T, Dannewitz B, Tomakidi P, Hoheisel JD, Mussig E, Kohl A, Nees M. Analysis of interleukin-1 β -modulated mRNA gene transcription in human gingival keratinocytes by epithelia-specific cDNA microarrays. *J Periodontol* 2006; 77: 426-446
- Taga K, Tosato G. IL-10 inhibits human T cell proliferation and IL-2 production. *J Immunol* 1992; 149: 1143-1148
- Takeuchi O, Hoshino K, Kawai T, Sanjo H, Takada H, Ogawa T, Takeda K, Akira S. Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components. *Immunity* 1999; 11: 443-451
- Van Dyke TE, Serhan CN. Resolution of inflammation: a new paradigm for the pathogenesis of periodontal diseases. *J Dent Res* 2003; 82: 82-90
- Van Lint P, Libert C. Chemokine and cytokine processing by matrix metalloproteinases and its effect on leukocyte migration and inflammation. *J Leukoc Biol* 2007; 82: 1375-1381
- Vardar-Sengul S, Arora S, Baylas H, Mercola D. Expression profile of human gingival fibroblasts induced by interleukin-1 β reveals central role of nuclear factor- κ B in stabilizing human gingival fibroblasts during inflammation. *J Periodontol* 2009; 80: 833-849
- Vig M, Peinelt C, Beck A, Koomoa DL, Rabah D, Koblan-Huberson M, Kraft S, Turner H, Fleig A, Penner R, Kinet JP. CRACM1 is a plasma membrane protein essential for store-operated Ca²⁺ entry. *Science* 2006; 312: 1220-1223
- Villmann C, 2011: Molecular pathomechanisms in channelopathies associated with neuromolar disorders. <http://www.biochem.uni-erlangen.de/forschung/villmann/images/fig1.jpg> (Zugriffsdatum: 12.12.2011).
- Wajant H, Grell M, Scheurich P. TNF receptor associated factors in cytokine signaling. *Cytokine Growth Factor Rev* 1999; 10: 15-26

- Wang P, Wu P, Siegel MI, Egan RW, Billah MM. Interleukin (IL)-10 inhibits nuclear factor kappa B (NF kappa B) activation in human monocytes. IL-10 and IL-4 suppress cytokine synthesis by different mechanisms. *J Biol Chem* 1995; 16: 9558-9563
- Wang PL, Azuma Y, Shinohara M, Ohura K. Toll-like receptor 4-mediated signal pathway induced by Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide in human gingival fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 3: 1161-1167
- Wang Q, Downey GP, Herrera-Abreu MT, Kapus A, McCulloch CA. SHP-2 modulates interleukin-1-induced Ca²⁺ flux and ERK activation via phosphorylation of phospholipase Cgamma1. *J Biol Chem* 2005; 9: 8397-8406
- Webb TI, Lynch JW. Molecular pharmacology of the glycine receptor chloride channel. *Curr Pharm Des* 2007; 23: 2350-2367
- Wheeler M, Stachlewitz RF, Yamashina S, Ikejima K, Morrow AL, Thurman RG. Glycine-gated chloride channels in neutrophils attenuate calcium influx and superoxide production. *FASEB J* 2000; 3: 476-484
- Wheeler MD, Ikejima K, Enomoto N, Stacklewitz RF, Seabra V, Zhong Z, Yin M, Schemmer P, Rose ML, Rusyn I, Bradford B, Thurman RG. Glycine: a new anti-inflammatory immunonutrient. *Cell Mol Life Sci* 1999; 9-10: 843-856
- Wheeler MD, Rose ML, Yamashina S, Enomoto N, Seabra V, Madren J, Thurman RG. Dietary glycine blunts lung inflammatory cell influx following acute endotoxin. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2000; 2: L390-398
- Yamashina S, Konno A, Wheeler MD, Rusyn I, Rusyn EV, Cox AD, Thurman RG. Endothelial cells contain a glycine-gated chloride channel. *Nutr Cancer* 2001; 2: 197-204
- Yim PD, Gallos G, Xu D, Zhang Y, Emala CW. Novel expression of a functional glycine receptor chloride channel that attenuates contraction in airway smooth muscle. *FASEB J* 2011; 5: 1706-1717
- Yucel-Lindberg T, Nilsson S, Modeer T. Signal transduction pathways involved in the synergistic stimulation of prostaglandin production by interleukin-1beta and tumor necrosis factor alpha in human gingival fibroblasts. *J Dent Res* 1999; 1: 61-68
- Zhang SL, Yeromin AV, Zhang XH, Yu Y, Safrina O, Penna A, Roos J, Stauderman KA, Cahalan MD. Genome-wide RNAi screen of Ca(2+) influx identifies genes that regulate Ca(2+) release-activated Ca(2+) channel activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 24: 9357-9362
- Zhong Z, Wheeler MD, Li X, Froh M, Schemmer P, Yin M, Bunzendaul H, Bradford B, Lemasters JJ. L-Glycine: a novel antiinflammatory, immunomodulatory, and cytoprotective agent. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2003; 2: 229-240
- Zhu P, Xiong W, Rodgers G, Qwarnstrom EE. Regulation of interleukin 1 signalling through integrin binding and actin reorganization: disparate effects on NF-kappaB and stress kinase pathways. *Biochem J* 1998: 975-981
- Zipper H, Brunner H, Bernhagen J, Vitzthum F. Investigations on DNA intercalation and surface binding by SYBR Green I, its structure determination and methodological implications. *Nucleic Acids Res* 2004; 12: e103

8. Danksagung

Herrn Prof. Dr. A. Jäger, Direktor der Poliklinik für Kieferorthopädie des Zentrums für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde des Universitätsklinikums Bonn, danke ich an dieser Stelle herzlich für die Bereitstellung des Themas, die finanziellen Mittel zur Durchführung der Experimente und die freundliche, motivierende Zuwendung bei allen Fragen.

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 des Universitätsklinikums Bonn, danke ich für die Unterstützung bei der Durchführung der zell- und molekularbiologischen Experimente und für die wertvollen Ratschläge.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. D. Kraus, wissenschaftlicher Mitarbeiter der Poliklinik für Zahnärztliche Prothetik, Propädeutik und Werkstoffwissenschaften des Zentrums für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde des Universitätsklinikums Bonn, der durch seine Erfahrung und Kompetenz erst die Umsetzung der Experimente ermöglichte. Danke für die zuverlässige Betreuung, die Hilfestellung und Anleitung im Labor, die vielen Ratschläge und Korrekturen.

Frau D. Lalouni, MTA der Universität Bonn, danke ich für die praktische Unterstützung im Labor. Den operierenden Zahnärzten und OP-Schwestern der Poliklinik für Chirurgische Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde des Zentrums für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde des Universitätsklinikums Bonn danke ich für die Bereitstellung der Gingivaproben.

Frau H. Künstlinger, gute Freundin, Diplom-Molekulare Biomedizinerin und wissenschaftliche Mitarbeiterin am Zentrum für Pathologie der Uniklinik Köln, danke ich für die kompetente Beratung bei biochemischen Fragestellungen.

Von ganzem Herzen danke ich meiner Schwester, die für mich als Ärztin immer ein Vorbild war, und besonders meinen Eltern, die mir das Studium und damit diese Arbeit ermöglicht haben und mich stets in jederlei Hinsicht fördern. Außerdem möchte ich mich bei meinem Freund Hanno bedanken für seine Geduld und seine Hilfsbereitschaft.