

**Der Einfluss von Histamin auf die Expression von CCL20  
und IL-8 in gingivalen Fibroblasten**

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

Stephanie Elisabeth Plötz  
aus Vechta

2013

Angefertigt mit Genehmigung der  
Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Priv.-Doz. Dr. med. dent. H. Dommisch
2. Gutachter: Prof. Dr. med. W. Götz
3. Gutachter: Priv.-Doz. Dr med. dent. S. Lossdörfer

Tag der Mündlichen Prüfung: 17.10.2013

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

**Meinen Eltern**



## Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>8</b>
<b>1. Einleitung</b>	<b>10</b>
1.1 Ätiologie der Parodontitis	10
1.2 Gingivale Fibroblasten	11
1.3 Untersuchte Mediatoren der Immunantwort	12
1.3.1 Zytokine	12
1.3.2 Interleukin-8	14
1.3.3 Chemokin-Ligand-20	15
1.4 Untersuchte Liganden	16
1.4.1 Rezeptoren (pattern-recognition-receptors)	16
1.4.2 PAM3CSK4 (Toll-like-receptor-2-Ligand)	17
1.4.3 LPS (Toll-like-receptor-4-Ligand)	17
1.4.4 Histamin (H <sub>1</sub> - H <sub>4</sub> -Rezeptor-Agonist)	18
1.4.5 Cetirizin ( H <sub>1</sub> - Rezeptor-Antagonist)	19
1.5 Fragestellungen und Ziele der Arbeit	21
<b>2. Material und Methode</b>	<b>22</b>
2.1 Versuchsaufbau	22
2.2 Vorversuch	22
2.3 Hauptversuch	23
2.4 Material und Reagenzien	23
2.5 Gewinnung gingivaler Gewebeproben	24
2.6 Kultur humaner gingivaler Fibroblasten (HGF)	25
2.7 RNA-Extraktion	25
2.8 RNA-Konzentrationsbestimmung	26
2.9 Reverse Transkription	27
2.10 Real-Time-Polymerasekettenreaktion	28
2.11 Optimierung der Real-Time-PCR	30
2.12 Auswertung der Real-Time-PCR	31
2.13 ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)	32
2.14 Statistische Auswertung der quantitativen Genexpressionsanalyse	33

<b>3. Ergebnisse</b>	<b>34</b>
3.1 Quantitative Analyse der Expression von CCL20	<b>34</b>
3.1.1 Einfluss von Histamin auf die Genexpression von CCL20	<b>34</b>
3.1.2 Einfluss von Pam3CSK4 in Kombination mit Histamin auf die Genexpression von CCL20	<b>35</b>
3.1.3 Einfluss von LPS in Kombination mit Histamin auf die Genexpression von CCL20	<b>36</b>
3.1.4 Vergleich der Genexpression von CCL20 nach Histamin-Stimulation und kombinierter Behandlung	<b>37</b>
3.1.5 Einfluss des H <sub>1</sub> -Rezeptors auf die Histamin-induzierte Genexpression von CCL20	<b>39</b>
3.1.6 Quantitative Proteinexpression von CCL20 in HGFs	<b>41</b>
3.2 Quantitative Analyse der Expression von IL-8	<b>44</b>
3.2.1 Einfluss von Histamin auf die Genexpression von IL-8	<b>44</b>
3.2.2 Einfluss von Pam3CSK4 in Kombination mit Histamin auf die Genexpression von IL-8	<b>45</b>
3.2.3 Einfluss von LPS in Kombination mit Histamin auf die Genexpression von IL-8	<b>46</b>
3.2.4 Vergleich der Genexpression von IL-8 nach Histamin-Stimulation und kombinierter Behandlung	<b>47</b>
3.2.5 Einfluss des H <sub>1</sub> -Rezeptors auf die Histamin-induzierte Genexpression von IL-8	<b>49</b>
3.2.6 Quantitative Proteinexpression von IL-8 in HGFs	<b>51</b>
<b>4. Diskussion</b>	<b>54</b>
4.1 Einleitung	<b>54</b>
4.2 Bewertung der Methoden	<b>55</b>
4.3 Diskussion der Ergebnisse	<b>57</b>
4.4 Ausblick	<b>60</b>
<b>5. Zusammenfassung</b>	<b>62</b>
<b>6. Literaturverzeichnis</b>	<b>64</b>

**7. Danksagung****76**

## Abkürzungsverzeichnis

Abb.	=	Abbildung
a	=	alpha
Å	=	Ångström
Aqua dest.	=	destilliertes Wasser
β	=	beta
bp	=	Basenpaar
°C	=	Grad Celsius
CCL20	=	Chemokin-Ligand-20
cDNA	=	komplementäre Desoxyribonukleinsäure (copy desoxyribonucleic acid)
CO <sub>2</sub>	=	Kohlendioxid
C <sub>t</sub>	=	Schwellenzyklus (treshold cycle)
DMEM	=	Dulbecco's Modified Eagles-Medium
DNA	=	Desoxyribonukleinsäure (desoxyribonucleic acid)
E	=	Effizienz
<i>E. coli</i>	=	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	=	Ethylendiamintetraessigsäure (ethylendiamintetraacetate)
ELISA	=	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
et al.	=	und Mitarbeiter (et alii)
Fa.	=	Firma
FCS	=	Fötale Kälberserum
GAPDH	=	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
g	=	Gramm
h	=	Stunde
hBD-1	=	humanes β-Defensin 1
hBD-2	=	humanes β-Defensin 2
hgF	=	humane gingivale Fibroblasten
IL-8	=	Interleukin 8
kDa	=	Kilodalton
kg	=	Kilogramm

LPS	=	Lipopolysaccharid
min.	=	Minute
ml	=	Milliliter
mm	=	Millimeter
mM	=	Millimolar
mRNA	=	Boten-Ribonukleinsäure (messenger ribonucleic acid)
ng	=	Nanogramm
nm	=	Nanometer
Pam3CSK4	=	Pam3-Cystin-Serin-Lysin-4
PCR	=	Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction)
PDGF	=	platelet-derived growth factor
pH	=	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
RNA	=	Ribonukleinsäure (ribonucleic acid)
rpm	=	Umdrehungen pro Minute (rounds per minute)
RT	=	Reverse Transkriptase
RT-PCR	=	Reverse Transkriptase Realtime-Polymerasekettenreaktion
sec	=	Sekunde/n
t	=	Zeit
TLR	=	Toll-Like-Rezeptor
U	=	Enzymatische Einheit/en (unit/s)
µg	=	Mikrogramm
µl	=	Mikroliter
µm	=	Mikrometer
µM	=	Mikromolar

# 1. Einleitung

## 1.1 Ätiologie der Parodontitis

Die Hauptursache für das Entstehen einer Parodontitis ist die bakterielle Infektion. Ausschlaggebend ist die Entstehung einer mikrobiellen Plaque, die in mehreren Phasen erfolgt. Die Plaque besteht hauptsächlich aus Nahrungsresten und Bakterien sowie deren Stoffwechselprodukten. Die Mikroorganismen, die in der sub- und supragingivalen Plaque lokalisiert sind, stellen hierbei den wichtigsten pathogenen Faktor dar (Müller, 2006). Die Entstehung des Biofilms geschieht über mehrere Stadien. Zunächst bildet sich innerhalb weniger Minuten ein sogenanntes Pellicel aus Glykoproteinen des Speichels. Es kommt zur Assoziation bei der sich die Mikroorganismen locker an den Zahn anlagern können. Einige wenige Bakterien besitzen spezielle Oberflächenmoleküle (Adhäsine), mit welchen diese sich an Pellicelrezeptoren fest verankern können und an die später weitere Mikroorganismen adhäreren können. Diese vermehren sich und bilden Mikrokolonien aus Streptokokken, die extrazelluläre Polysaccharide zum Schutz der Bakterien bilden. Der mit parodontopathogenen Mikroorganismen besiedelte Biofilm induziert eine Entzündungsreaktion in dem große Mengen von Metaboliten freigesetzt werden, die durch das Saumepithel in das umliegende parodontale Bindegewebe diffundieren. Dazu gehören Fettsäuren wie Propionsäure, Peptide wie das N-Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin (FMLP) und besonders die Lipopolysaccharide (LPS, Endotoxin) gramnegativer Bakterien (Wilson et al., 1996). LPS stammen aus der Zellwand gramnegativer Bakterien und sind mitverantwortlich bei der Aktivierung des Immunsystems und der damit verbundenen Ausschüttung von Zytokinen. Ihr hohes immunologisches Potential führt zu einer starken Immunantwort des Wirtes (Teng, 2003), welche zunächst zu einer Gingivitis führt.

Auf alle diese Virulenzfaktoren reagieren die Zellen des Saumepithels mit der Freisetzung körpereigener proinflammatorischer Mediatoren wie Interleukin-1 (IL-1), Interleukin-8 (IL-8), Prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), Tumor-Nekrose-Faktor  $\alpha$  (TNF  $\alpha$ ) und Matrix-Metallo-Proteinase (Abe et al., 1991).

Durch die direkte Einwirkung der bakteriellen proteolytischen Enzyme und Zytokine folgt, wenn auch nur zu einem kleinen Anteil, der durch körpereigene Abwehrmechanismen

induzierte Abbau von Bindegewebe und Knochen, was als Attachmentverlust bezeichnet wird (Nieminen et al., 1995). Hierbei spielt unter anderem das biogene Amid Histamin eine wichtige Rolle. Es wird aus perivaskulären Mastzellen freigesetzt und veranlasst das Endothel IL-8 in die Gefäße auszuschütten. Somit ist es in der Lage, die Entzündungsreaktion zu verstärken (Wolf et al., 2004). Ist der Immunstatus reduziert und sind oben genannte Risikofaktoren, sowie proinflammatorische Mediatoren (Zytokine, Chemokine) präsent, so kann bei Überhandnahme von anaeroben pathogenen Bakterien aus einer Gingivitis eine Parodontitis entstehen. Aus dem Saumepithel wird Taschenepithel, welches nach lateral und apikal proliferiert. In diesen so entstandenen Taschen sammeln sich pathogene Bakterien, welche die Parodontitis in ihrem Verlauf und Fortschreiten fördern. (Wolf et al., 2004). Zusätzliche exogene Risikofaktoren tragen zu unterschiedlicher Schädigung parodontaler Strukturen bei. Dazu gehören z.B. Mundhygiene und systemische Erkrankungen wie Diabetes mellitus, sowie genetische Dispositionen (Martin et al., 2001; Sculean et al., 2002). In hohem Maße begünstigend wirken sich das Rauchen auf die Entstehung und Progredienz einer Parodontitis aus, Nikotin beeinflusst die orale neutrophile Chemotaxis sowie die Phagozytose (Kremer et al., 2000). Stressfaktoren stehen ebenso im Verdacht einen Einfluss auf die Entstehung und den Verlauf von Parodontitis zu haben. Auch mit zunehmenden Alter steigt die Wahrscheinlichkeit, an Parodontitis zu erkranken (Ogawa et al., 2002).

## **1.2 Gingivale Fibroblasten**

Die Gingiva setzt sich aus einer Vielzahl verschiedener Zellen zusammen. Gingivale Fibroblasten (HGFs) machen den Hauptbestandteil des gingivalen Gewebes aus (Lekic et al., 1997; Sugawara et al., 1998). Diese exprimieren, wie in früheren Studien herausgefunden wurde, Immunrezeptoren, wie zum Beispiel Toll-like-Rezeptoren (Tamai et al., 2002). Stimuliert man diese Rezeptoren mit Liganden wie LPS, induzieren sie mittels unterschiedlicher Signalkaskaden die Produktion einer Vielzahl verschiedener Zytokine, wie beispielsweise IL-1, IL-6 oder IL-8 (Minami et al., 2007). Des Weiteren

konnte gezeigt werden, dass HGFs hauptsächlich Histamin-1-Rezeptoren exprimieren und auf Stimulation mit Histamin mit einer erhöhten IL-8 Produktion reagieren (Minami et al., 2007). Eine weitere Studie zeigte, dass gingivale Fibroblasten keine sogenannte LPS-Toleranz aufweisen, um einer überschießenden Immunantwort auf LPS vorzubeugen; anders als zum Beispiel Monozyten und Makrophagen es tun. Stattdessen halten diese die Produktion inflammatorischer Zytokine wie IL-8 aufrecht, und eine Entzündung kann weiter unterhalten werden (Ara et al., 2009). Diese Erkenntnisse bestätigen, dass gingivale Fibroblasten aktiv an der Immunantwort und entzündlichen Prozessen teilnehmen und deren Untersuchung somit sehr interessant im Hinblick auf die durchgeführte Studie ist.

### **1.3 Untersuchte Mediatoren der Immunantwort**

#### **1.3.1 Zytokine**

Bei der Wirtsabwehr unterscheidet man grundsätzlich die unspezifische, natürlich vorhandene, angeborene Immunität von der spezifischen, erworbenen Immunität. Bei Entzündungen, so auch bei Parodontitis, kommt es zu einem Zusammenspiel beider Systeme, sowie unter anderem zu einer erhöhten Ausschüttung proinflammatorischer und kataboler Zytokine, welche die Entzündungsreaktion hochregulieren. Die für diese Arbeit betrachteten Mediatoren werden im Folgenden genauer beschrieben.

Zytokine sind (Glyko-)Proteine, die von vielen Zellen gebildet werden können (Horn et al., 2002). Die Immun- und Entzündungsreaktionen werden in ihrer Stärke und Dauer durch diese Proteine gesteuert (Roitt, 1993). Ihre Wirkung entfalten diese vorwiegend in unmittelbarer Nähe der sezernierenden Zellen. Zytokine können autokrin, parakrin und endokrin wirken, je nachdem in welcher Konzentration diese gebildet werden und ob diese die Blutbahn erreichen (Horn et al., 2002). Ein Großteil der Zytokine wird als Interleukine bezeichnet, die zum Teil im Dienst der unspezifischen Abwehr stehen und teilweise Aufgaben im Rahmen der spezifischen Abwehr erfüllen. Zytokine wirken im Körper nicht alleine, sondern im Zusammenspiel mit vielen anderen Zytokinen, die additiv, synergistisch oder antagonistisch wirken. Es lassen sich somit Zytokine

unterscheiden, die eine proliferative Wirkung entfalten und solche, die eine hemmende Wirkung auf das Zellwachstum bewirken (Horn et al., 2002).

Zusammengefasst kontrollieren Zytokine sowohl Wachstum und Differenzierung als auch das Überleben von Zellen.

Als Wachstumsfaktoren beeinflussen Zytokine die Hämatopoese und Lymphopoese und regulieren die Entwicklung von Vorläuferzellen zu differenzierten Zelltypen (Culig, 2010).

Als Interleukine übernehmen Zytokine verschiedene Aufgaben in der Regulation der Immunabwehr, der Entzündungsreaktion und der Apoptose (Hansbro et al., 2011).

Auch als Chemokine üben sie eine wichtige Funktion im Rahmen der Immunabwehr aus. Kommt es zu einer Infektion, Verletzung oder Entzündung, so wird ihre Produktion ausgelöst und diese Freisetzung lockt Immunzellen an (Kayser et al., 2010). So wirken sie also wie ein Alarmsignal.

In der frühen Phase der Entzündung führt die Interaktion zwischen exogenen pathogenen Keimen und den Zellen der angeborenen Immunabwehr (z.B. neutrophile Granulozyten, Makrophagen und NK-Zellen) zu einer Induktion der Zytokine TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, IL-8, IL-12 und IL-18 (Doenecke et al., 2005, Schooltink et al., 2003; Theoharides et al., 2010). Die Zytokine wiederum aktivieren Zellen der erworbenen Immunabwehr (Th1- und Th2-Zellen) und führen somit zur Ausbildung einer protektiven Immunantwort.

Als proinflammatorisch werden Zytokine bezeichnet, die eine Entzündungsreaktion fördern, wie zum Beispiel IL-1, IL-6 und TNF- $\alpha$ . Als antiinflammatorisch hingegen gelten diejenigen, die der Aktivität proinflammatorischer Zytokine entgegenwirken, wie IL-4, IL-10 und IL-3 (Koolmann et al., 2002).

Zytokine spielen also eine bedeutende Rolle für die Antwort der angeborenen und erworbenen Immunität auf eine Infektion (Romagnani, 2000; Janeway, 2002; Miller et al., 2011).

### 1.3.2 Interleukin-8 (IL-8)

Neben der hohen Vielfalt der vielen verschiedenen immunologischen Effektorzellen spielen die Interleukine eine wichtige Rolle im Rahmen der frühen Immunantwort. Sie bilden eine große Gruppe innerhalb der Zytokine, welche für die Kommunikation der Immunabwehrzellen untereinander zuständig sind. Das in der vorliegenden Arbeit betrachtete Interleukin-8 (IL-8) ist eine Komponente des angeborenen Immunsystems (Ganz, 2003; Struyf et al., 2003).

IL-8 ( $\alpha$ -Form) ist ein Peptidhormon, welches als körpereigener Botenstoff der Zellen des Immunsystems agiert, und durch Viren, bakterielle Lipopolysaccharide (LPS), IL-1 und TNF- $\alpha$  aber auch durch Concanavalin A, doppelsträngige RNA, IL-1 $\beta$ , -7 und -17 induziert werden kann. Synthetisiert wird es von Monozyten, Makrophagen, neutrophilen Granulozyten, Fibroblasten, Endothelzellen, Pulpafibroblasten (Patel et al., 2003) sowie von Odontoblasten (van Furth, 1992; Dommisch et al., 2007a; Levin et al., 1999).

Das Interleukin-8 ist im Gegensatz zu allen anderen Zytokinen in der Lage, neutrophile Granulozyten zu aktivieren und erhöht die Chemotaxis für alle bekannten beweglichen Immunzellen (Xie, 2001). In verschiedenen Experimenten mit Pulpafibroblasten konnte die gesteigerte IL-8-Konzentration nach Stimulation mit *Prevotella intermedia* (Tokuda et al., 2002), *F. nucleatum* (Thaweboon et al., 2006), Lipopolysacchariden des Bakteriums *E. coli* (Chang et al., 2005), Substanz P, *Streptococcus mutans* (*S. mutans*) (Dommisch et al., 2011) und Calcitonin Gene-Related Peptide (Patel et al., 2003) nachgewiesen werden. Auch die Expression von IL-8 in der Odontoblastenzellschicht nach Stimulation mit LPS des *E. coli* wurde demonstriert (Levin et al., 1999). Des Weiteren konnte die mRNA-Expression von IL-8 in odontoblasten-ähnlichen Zellen nach Stimulation mit dem antimikrobiellen Peptid hBD-2 beschrieben werden (Dommisch et al. 2007a).

Für Odontoblasten der Zahnpulpa konnte gezeigt werden, dass die mRNA-Expression von IL-8 durch LPS von *E. coli* sowie von hBD-2 stimuliert werden kann (Levin et al., 1999).

Gingivale Fibroblasten synthetisieren IL-8 nach bakterieller Stimulation oder Stimulation mit bakteriellen Bestandteilen (Ara et al., 2009). In der vorliegenden Arbeit sollte die Expressionsrate von IL-8 nach bakterieller Stimulation und Zugabe von Histamin in gingivalen Fibroblasten näher untersucht werden.

### 1.3.3 Chemokin-Ligand-20 (CCL20)

Der Chemokin-Ligand-20 (C-C-Form), auch LARC (liver activation regulated chemokine) oder MIP3A (Macrophage Inflammatory Protein-3) genannt, ist ein kleines homöostatisches und inflammatorisches Zytokin, welches zu der Familie der CC-Chemokine gehört. Es zeigt eine niedrige Sequenzähnlichkeit mit anderen humanen CC-Chemokinen und wirkt stark chemotaktisch auf Lymphozyten (Hieshima et al., 1997). Das CCL20-Protein von 70 Aminosäuren hat eine relative Masse von 8025, einen isoelektrischen Punkt von 9,7 und beinhaltet charakteristisch für CC-Chemokine vier Cysteine (Schutyser et al., 2003). Den Zielzellen entlockt es die jeweiligen Effekte, indem es an den Chemokin-Rezeptor CCR6 bindet und diesen aktiviert (Perez-Canadillas et al., 2001; Baba et al., 1997). Die Genexpression von CCL20 kann unter anderem von Lipopolysacchariden (LPS) und inflammatorischen Zytokinen, wie Interferon- $\gamma$ , und bakterieller Invasion induziert und von IL-10 runterreguliert werden (Schutyser et al., 2000). CCL20 wird in verschiedenen Geweben exprimiert, wobei die höchsten Expressionsraten in Lymphozyten, Lymphknoten, Leber, und Appendix beobachtet werden (Hieshima et al., 1997; Rossi et al., 1997). Des Weiteren wird CCL20 auch in Mukosa-assoziiertem lymphatischem Gewebe (MALT) sowie Lungengewebe konstitutiv exprimiert (Hromas et al., 1997; Schutyser et al., 2003).

Da CCL20 in diesem breiten Spektrum von Zell- und Gewebetypen exprimiert wird, und es eine Vielfalt von CCL20-induzierenden Substanzen gibt, kann darauf geschlossen werden, dass CCL20 und CCR6 sowohl in normalen als auch in pathologischen Prozessen involviert sind. Die Gegenwart von inflammatorischen Mediatoren und bakterieller Invasion verursacht eine Steigerung von CCL20-mRNA und CCL20-Proteinexpression in Epithelzellen sowohl *in vivo*, als auch *in vitro* (Fujiie et al., 2001; Izadpanah et al., 2001; Scheerens et al., 2001). Eine weitere Studie konnte aufzeigen, dass die Stimulation von gingivalen Epithelzellen und Fibroblasten durch die Pathogene *Streptococcus gordonii* und *Porphyromonas gingivalis* zu einem Anstieg der Expression von CCL20 führte (Dommisch et al., 2012). Die intrazelluläre Signaltransduktion zur Expression von CCL20 in *P. gingivalis*-stimulierten gingivalen Epithelzellen wurde über Phospholipase C, p38/MAPK und NF- $\kappa$ B übermittelt (Dommisch et al., 2010).

In der vorliegenden Arbeit sollte herausgefunden werden, wie sich die Expressionsrate von CCL20 in gingivalen Fibroblasten nach Stimulation mit Histamin verhält.

## 1.4 Untersuchte Liganden

### 1.4.1 Rezeptoren (*Pattern-recognition-receptors; PRRs*)

Wird der Körper mit Mikroorganismen besiedelt, kommt es zu einer Entzündungsreaktion. Vermittelt wird diese Infektion zunächst über Liganden mittels sogenannter pattern recognition receptors (PRRs) und „pathogen associated microbial pattern“ (PAMP). Wichtige PAMP sind z. B. das Lipopolysaccharid von gramnegativen Bakterien, Lipoteichonsäure von grampositiven Bakterien und bakterielle DNA (Messina et al., 1991). Die PRR lassen sich funktionell in drei Klassen unterteilen: sezernierende, endozytierende und signaltransferierende Rezeptoren (Medzhitov et al., 2000). Zur Gruppe der signaltransferierenden Rezeptoren gehören vor allem die Toll-like-Rezeptoren (TLR). Diese spielen in der vorliegenden Arbeit insofern eine Rolle, als dass der Virulenzfaktor LPS als natürlicher Ligand von TLR-4 und Pam3CSK4 als synthetischer Aktivator von TLR-2 verwendet wurden. Wie in vorausgegangenen Studien herausgefunden wurde, exprimieren auch humane gingivale Fibroblasten Toll-like-Rezeptoren, wie zum Beispiel TLR-2 und -4, sowie die Histaminrezeptoren 1 und 2 (Mahanonda et al., 2007).

TLR aktivieren die Immunabwehrzellen und rufen eine akute Entzündungsreaktion hervor. Mit Hilfe unterschiedlicher Signaltransduktionskaskaden leiten sie die Information der Mikroorganismenerkennung ins Innere der Zelle und induzieren dort die Expression verschiedener Gene der Immunantwort (Medzhitov und Janeway, 1997).

Bis heute wurden im humanen Genom 10 verschiedene TLR identifiziert und einige von ihnen genauer charakterisiert (Zhang et al., 2004). Jeder TLR hat sein eigenes Zell- und Gewebeverteilungsmuster und bindet mehr oder weniger spezifisch ein pathogen-assoziiertes Molekül. Aus diesem Grund können unterschiedliche Pathogenarten erkannt werden (Hornung et al., 2002).

Die in dieser Arbeit verwendeten, im Folgenden beschriebenen Liganden binden alle an einen der oben erwähnten Rezeptoren.

#### **1.4.2 Pam3CSK4 (synthetischer Toll-like-Rezeptor-2-Ligand)**

Pam3CSK4 ist ein synthetisches triacetyliertes Lipopeptid, welches den acylierten Amino-Terminus von bakteriellen Lipoproteinen imitiert, und somit proinflammatorische Eigenschaften aufweist. Bakterielle Lipoproteine gehören einer großen Familie von proinflammatorischen Zellwandbestandteilen an, die sowohl in grampositiven als auch gramnegativen Bakterien enthalten sind. Pam3CysSerLys4 (Pam3CSK4) ist ebenso ein potenter Aktivator des proinflammatorischen Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B (Aliprantis et al., 1999). Die Wirkung von Pam3CSK4 wird durch den Toll-like-Rezeptor-2, der mit dem Toll-like-Rezeptor-1 durch seine zytoplasmatischen Domäne verbunden ist, vermittelt. Dadurch wird die Signalkaskade für die Aktivierung von NF- $\kappa$ B induziert (Ozinsky et al., 2000). In der vorliegenden Arbeit dient Pam3CSK4 als Virulenzfaktor für humane gingivale Fibroblasten zur Induktion der Expression von CCL20 und IL-8.

#### **1.4.3 LPS von *Escherichia coli* (Toll-like-Rezeptor-4-Ligand)**

Lipopolysaccharide (LPS) sind Verbindungen aus Polysacchariden und Lipo-Bestandteilen, welche in der äußeren Membran gramnegativer Bakterien enthalten sind. Es sind hochmolekulare, thermostabile Substanzen, die sowohl pyrogen, als auch immunogen wirken (Oethringer, 1997). Sie bestehen im Allgemeinen aus drei Teilbereichen: Lipid A, welches als Endotoxin wirkt, einer Kernregion und einem Polysaccharid. Zerfallen die Bakterien, werden diese Endotoxine frei und üben eine toxische Wirkung auf die umliegenden Gewebe aus. (Rivest et al., 2000) Es wird angenommen, das LPS auf Grund seiner Fähigkeit, Entzündungen zu verursachen und Gewebeszerstörung zu fördern, ein Hauptfaktor in der Pathogenese parodontaler Erkrankungen ist. Die Eliminierung solcher bakterieller Komponenten ist notwendig, um Parodontalerkrankungen erfolgreich zu bekämpfen. (Ara et al., 2009). Nach Bindung von LPS führt die Aktivierung des Toll-like-Rezeptor-4 zur Sekretion proinflammatorischer Zytokine und Chemokine.

Eine frühere Studie bewies die erhöhte Anfälligkeit TLR-4-defizienter Mäuse für Infektionen mit gramnegativen Bakterien (Iwasaki und Medzhitov, 2004; Takeda et al., 2003) was die wichtige Funktion der TLR im Rahmen der Immunabwehr verdeutlicht. In dieser Versuchsreihe wurde LPS von *Escherichia coli* als Virulenzfaktor zur Stimulation der gingivalen Fibroblasten verwendet, um die Genexpression von CCL20 und IL-8 zu induzieren.

#### **1.4.4 Histamin ( $H_1$ - $H_4$ -Rezeptor-Agonist)**

Das biogene Amid Histamin ist ein Gewebshormon und Neurotransmitter, welches größtenteils in Gewebsmastzellen und basophilen Granulozyten gebildet wird (Wu et al., 2004). Zusätzlich kann Histamin aber auch von dem Mastzell-unabhängigen Enzym Histidindecaboxylase (HDC) gebildet werden, welches unter anderem von LPS induziert wird (Wu et al., 2004). Bei allergischen und auch bei entzündlichen Reaktionen (Parodontitis) wird Histamin freigesetzt, es ist eine wichtige Mediators substanz der Immunabwehr. Die Wirkung von Histamin wird über bislang vier bekannte Histamin-Rezeptoren, den  $H_1$ -,  $H_2$ -,  $H_3$ - und  $H_4$ -Rezeptoren, vermittelt (Parsons et al., 2006). Alle Histamin-Rezeptoren sind G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (Dy und Schneider, 2004). Sie sind zwar einheitlich strukturiert, unterscheiden sich jedoch erheblich in ihrer Funktion, Signalübertragung, Verbreitung und Ligandenspezifität. Die Aktivierung von Histamin- $H_1$ -Rezeptoren hat eine wichtige Funktion bei der durch Histamin induzierten allergischen Reaktion vom Typ-I, welche durch IgE-Antikörper vermittelt wird, und eine anaphylaktische Sofortreaktion in Mastzellen bzw. basophilen Granulozyten zur Folge hat (Mutschler et al., 2001). Die Verbreitung dieses Rezeptors erstreckt sich umfassend über das gesamte ZNS. Desweiteren wird er peripher sowohl in Zellen des Immunsystems als auch der glatten Muskulatur gefunden. Die Stimulation des  $H_1$ -Rezeptors führt zu einer  $G_{q/11}$ -Protein-gekoppelten Aktivierung der Phospholipase C und ist verbunden mit einer Freisetzung von  $Ca^{2+}$  aus intrazellulären Speichern (Haas et al., 2008). Der Histamin- $H_2$ -Rezeptor ist bei der Produktion der Magensäure in den Belegzellen der Magenschleimhaut von großer Bedeutung und wie der Histamin- $H_1$ -

Rezeptor weitläufig verbreitet. Er vermittelt einen relaxierenden Effekt auf Blutgefäße und führt zu einer Erhöhung der Herzfrequenz. Er zeigt konstitutive Aktivität, ist intrazellulär  $G_s$ -gekoppelt und wirkt somit über die Aktivierung der Adenylylzyklase (Sheng et al., 1991).

Der Histamin- $H_3$ -Rezeptor kommt nahezu im ganzen ZNS und in der Peripherie im Magen sowie im bronchialen und kardiovaskulären System vor. Dort entfaltet er seine Wirkung als präsynaptischer Autorezeptor und hemmt durch einen negativen Rückkopplungs-Mechanismus die Synthese und Freisetzung von Histamin. Er ist  $G_{i/o}$ -gekoppelt. Dadurch moduliert er verschiedene Signaltransduktionswege, z.B. die Inhibierung der Adenylylzyklase, die Aktivierung der Phospholipase  $A_2$ , die MAP-Kinase, Phospholipase C, die intrazelluläre Mobilisierung von Kalziumionen oder die Inhibierung des  $Na^+/H^+$ -Austauschers (Clark und Hill, 1996; Leurs et al., 2005; Bongers et al., 2007).

Der Histamin- $H_4$ -Rezeptor ist hauptsächlich auf Zellen des blutbildenden Systems und des Immunsystems lokalisiert. Hier reguliert der Rezeptor primär die Funktion von Mastzellen, Eosinophilen, Basophilen, Dendriten und T-Zellen. Er spielt also eine wichtige Rolle im Rahmen von Immun- und Entzündungsreaktionen (Zhang et al., 2007; Zampeli und Tiligada, 2009). Der Histamin- $H_4$ -Rezeptor ist ebenso  $G_{i/o}$ -gekoppelt (Liu et al., 2001).

Aus den Effekten, die Rezeptor-vermittelt sind, ergeben sich je nach Lokalisation und Art des entsprechenden Histamin-Rezeptorsubtyps ( $H_1$ - $H_4$ ) unterschiedliche Auswirkungen im Organismus, die physiologisch von unterschiedlicher Bedeutung sind. In dieser Arbeit ist der  $H_1$ -Rezeptor von Bedeutung, da gingivale Fibroblasten hauptsächlich  $H_1$ -Rezeptoren exprimieren (Minami et al., 2008) und auch die Wirkung von Cetirizin über den  $H_1$ -Rezeptor vermittelt wird (Gillard et al., 2002).

#### **1.4.5 Cetirizin ( $H_1$ -Rezeptor-Antagonist)**

Antihistaminika bzw. Histamin-Rezeptorantagonisten, sind Wirkstoffe, die die Wirkung des körpereigenen Botenstoffs Histamin abschwächen oder aufheben können, indem

sie nach dem Prinzip der kompetitiven Rezeptorbindung um die Histamin-Bindungsstellen an den Histamin-Rezeptoren konkurrieren. Diese binden an den Rezeptor und stabilisieren ihn in seiner inaktiven Konformation, wodurch die physiologischen und pathophysiologischen Effekte von Histamin verringert werden (Leurs et al., 2002).

Bisher wurden vier Histamin-Rezeptor-Subtypen nachgewiesen; der H<sub>1</sub>- , H<sub>2</sub>- , H<sub>3</sub>- und H<sub>4</sub>-Rezeptor (Parsons et al., 2006). Antihistaminika werden für die vier verschiedenen Histamin-Rezeptoren entsprechend den Rezeptor-Subtypen in H<sub>1</sub>-, H<sub>2</sub>- H<sub>3</sub>- und H<sub>4</sub>-Antihistaminika unterteilt. Einzig die H<sub>1</sub>- und H<sub>2</sub>-Antihistaminika besitzen eine erprobte und breite therapeutische Bedeutung. H<sub>1</sub>-Antihistaminika wiederum werden in Präparate der ersten, zweiten und dritten Generation eingeteilt (Gillard et al., 2005).

Cetirizin ist ein Antihistaminikum vom Ethylendiamintyp der 2. Generation. Es blockiert den H<sub>1</sub>-Rezeptor und verhindert somit das Andocken von Histamin und die darauf folgende Ausschüttung von Entzündungsmediatoren, wie unter anderen die der Interleukine. Antihistaminika werden beispielsweise bei allergischen Reaktionen verabreicht, um die Symptome zu mildern (Gillard et al., 2002),

In einer tierexperimentellen Parodontitisstudie konnte bereits gezeigt werden, dass der lokale Einsatz des Histaminrezeptor<sub>2</sub>-Antagonisten Cimetidin über den Zeitraum von 6 Wochen zu einem verminderten Knochenverlust (> 90 %) im Vergleich zur Kontrollgruppe führte (Hasturk et al., 2006). In dieser Studie sollte die Wirksamkeit von Cetirizin auf die Histaminrezeptoren an gingivalen Fibroblasten getestet werden.

## 1.5 Fragestellung und Ziele der Arbeit

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Expression der proinflammatorischen Mediatoren CCL20 und IL-8 in humanen gingivalen Fibroblasten (HGFs) systematisch untersucht werden. Durch gezielte Stimulation von HGFs mit bakteriellen Virulenzfaktoren (LPS, Pam3CSK4) sollte aufgezeigt werden, ob die Expression von CCL20 und IL-8 spezifisch beeinflusst werden kann. Weiterhin sollte untersucht werden, ob Histamin die Expression von CCL20 und IL-8 in HGFs beeinflusst und ob Histamin selbst in seiner Wirkungsweise durch den H<sub>1</sub>-Rezeptorblocker Cetirizin moduliert werden kann.

1. Kann Histamin die Expression von CCL20 und IL-8 in HGFs beeinflussen?
2. Welchen Einfluss hat die Applikation einzelner TLR-Agonisten auf die Expression von CCL20 und IL-8 in HGFs?
3. Wie wirkt sich die kombinierte Stimulation mit Histamin und TLR-Agonisten auf die Expression von CCL20 und IL-8 in HGFs aus?
4. Welchen Einfluss hat der H<sub>1</sub>-Rezeptor auf die Regulation der Expression von CCL20 und IL-8?

Zusammenfassend war das Ziel dieser Arbeit, den Einfluss von Histamin in Kombination mit LPS und Pam3CSK4 auf die Expression von CCL20 und IL-8 im Rahmen der angeborenen Immunantwort humaner gingivaler Fibroblasten (HGFs) zu untersuchen.

## **2. Material und Methode**

### **2.1 Versuchsaufbau**

Im Rahmen routinemäßig durchgeführter oralchirurgischer Maßnahmen wurden humane gingivale Fibroblasten (HGFs) gewonnen (2.3). Mit Hilfe dieser Gewebe wurden weitere HGFs kultiviert und durch Stimulation mit den Virulenzfaktoren LPS und Pam3CSK4 sowie mit Histamin allein und schließlich in Co-Stimulation von LPS, Pam3CSK4 und Histamin auf die Expression von CCL20 und IL-8 untersucht (2.4). Abschließend wurde durch Zugabe von Cetirizin versucht, eine kompetitive Hemmung am Histaminrezeptor und somit eine regulierende Wirkung auf die Histaminausschüttung aufzuzeigen. Die Versuche mit den HGFs wurden in einem 3-fach-Ansatz mit Zellen von drei unterschiedlichen Donoren durchgeführt. Zur Auswertung der Genexpression wurde die quantitative Real-Time-PCR sowie das ELISA-Verfahren herangezogen.

### **2.2 Vorversuch**

Da nicht bekannt war, in welcher Konzentration und nach welcher Zeit LPS und Pam3CSK4 am wirksamsten in Bezug auf die CCL20 und IL-8-Ausschüttung sind, wurden humane gingivale Fibroblasten (HGFs) in Vorversuchen zunächst mit LPS (1, 10, 50, 100, 300, 500 µg/ml) und Pam3CSK4 (1, 10, 100, 300, 900 ng/ml) in Konzentrationsreihen stimuliert, um diejenige Konzentration mit der höchsten Genexpression der Zielgene CCL20 und IL-8 zu bestimmen. Mit dieser ermittelten Konzentration wurden weitere HGFs in einem Zeitversuch unterschiedlich lange (6, 12, 24, 48 h) inkubiert, um zur optimalen Konzentration auch den Zeitpunkt der maximalen Expression der Zielgene zu ermitteln. Um herauszufinden, ob auch die Wirkung von Histamin konzentrationsabhängig ist, wurde eine Konzentrationsreihe mit Histamin (1, 10, 100, 1000 µM) für 24 h isoliert durchgeführt und diejenige Konzentration mit der höchsten Genexpression von CCL20 und IL-8 für die weiteren Versuche verwendet.

Diese Vorversuche wurden mit den gingivalen Fibroblasten eines einzigen Donors, jedoch in einem 3-fachen Ansatz durchgeführt. Die aus diesen Versuchen hervorgegangenen Werte wurden für die Durchführung des Hauptversuches verwendet. Das Housekeeping-Gen war GAPDH und die quantitative Analyse der Expression von CCL20 und IL-8 wurde mit Hilfe der Real-Time-PCR durchgeführt.

### **2.3 Hauptversuch**

Mit Hilfe der ermittelten Werte aus den Vorversuchen wurden im Hauptversuch humane gingivale Fibroblasten mit 50 µg/ml LPS, 300 ng Pam3CSK und 10 µM Histamin sowohl isoliert als auch in den Kombinationen LPS/Histamin und Pam3CSK4/Histamin unterschiedlich lange (2, 4, 6, 12 h) stimuliert. Ziel war es, herauszufinden ob Histamin die Expressionrate von CCL20 und IL-8 beeinflusst. Diese Versuche wurden mit den humanen gingivalen Fibroblasten von drei verschiedenen gesunden Donoren, ebenfalls in 3-fach-Ansätzen durchgeführt. Als letzter Versuch wurde eine Stimulation der HGFs mit LPS/Histamin, Pam3CSK4/Histamin und jeweils dem H<sub>1</sub>-Rezeptorblocker Cetirizin (50 nM) für die Stimulationsdauer von 6 h durchgeführt, um herauszufinden, ob mit dem Antihistaminikum der zweiten Generation die Bindung von Histamin am H<sub>1</sub>-Rezeptor kompetitiv gehemmt und somit die erhöhte Produktion von CCL20 und IL-8 wieder vermindert werden konnte. Bei allen Versuchen wurden die Ergebnisse mit dem Ergebnis der unstimulierten Kontrolle verglichen.

Als Housekeeping-Gen diente wieder GAPDH. Die quantitative Analyse der Genexpression von CCL20 und IL-8 wurde mit Hilfe der Real-Time PCR durchgeführt.

### **2.4 Material und Reagenzien**

Das Zellkulturmedium Dulbecco`s Modified Eagles-Medium (DMEM) zur Anzucht der Zellen stammt von der Fa. PAA Laboratories GmbH (Cölbe). Die zur Aufbewahrung und

Weiterverarbeitung der gesammelten Proben benötigten Eppendorf-Tubes und Pipettenspitzen stammten von der Fa. Sarstedt (Nümbrecht). Das in den Versuchsreihen verwendete Aqua dest. wurde von der Fa. Braun Melsungen AG (Melsungen) bezogen. Die Kulturschalen und Zellschaber wurden von der Fa. Labomedic GmbH (Bonn) verwendet. Die Antibiotika Penicillin, Amphotericin und Streptomycin stammten ebenfalls von der Fa. PAA Laboratories GmbH (Cölbe). Trypsininhibitor wurde von der Fa. Roche Diagnostics GmbH (Mannheim), Trypsin-EDTA-Lösung von der Fa. Sigma-Aldrich GmbH (Taufkirchen) und CO<sub>2</sub> von der Fa. Linde (Höllriegelskreuth) bestellt. Die verwendeten Virulenzfaktoren LPS und Pam3CSK4 stammten von der Fa. InvivoGen (San Diego), die Primer zum einen von der Fa. Qiagen (IL-8, GAPDH), zum anderen von der Fa. Metabion (CCL20). Das verwendete Histamin kam von der Fa. Calbiochem und der H<sub>1</sub>-Rezeptor-Antagonist Cetirizin (cetirizine dihydrochloride) von der Fa. Sigma-Aldrich. Beides wurde lyophilisiert bestellt und für die Versuche entsprechend vorbereitet.

## **2.5 Gewinnung gingivaler Gewebeproben**

Die Gewebeproben, die im Rahmen routinemäßig durchgeführter Weisheitszahnentfernungen entnommen wurden (Poliklinik für Chirurgische Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde, Direktor: Prof. Dr. G. Wahl), stammen ausschließlich von gesunden Patienten. Die Gewebeproben wurden unmittelbar nach dem Eingriff für die Zellkultur vorbereitet. Alle Patienten wurden darüber aufgeklärt, dass es mit ihrem Einverständnis zur Probenentnahme zu keinen zusätzlichen Materialentnahmen kommen würde. Diese Studie wurde von der Ethikkommission der Universität Bonn geprüft und genehmigt (Antrag Ethikkommission AZ.: 142/05).

## 2.6 Kultur humaner gingivaler Fibroblasten (HGFs)

Um die gingivalen Fibroblasten aus dem entnommenen Gewebe zu gewinnen, wurde das subepitheliale Bindegewebe enzymatisch (Dispase; Cascade Biologics, England) von der Epithelzellschicht getrennt. Das so gewonnene subepitheliale Bindegewebe wurde anschließend im Sinne der Explanttechnik in 4 ml Kulturmedium, bestehend aus DMEM, 10 % fötalem Kälberserum (FCS) und 1 % Penicillin/Streptomycin/Amphotericin von der Fa. PAA Laboratories GmbH (Cölbe), kultiviert. Die Charakterisierung der primären HGF-Kulturen erfolgte sowohl histomorphologisch als auch molekularbiologisch über die Genexpressionsanalyse des Keratinozytenwachstumsfaktors (KGF) und Keratin 13 (als Kontrolle). Die Kultivierung sowie Stimulation der Zellen erfolgte bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> in einem Inkubator der Fa. Thermo (Dreieich). Das Medium (DMEM) wurde in einem Drei-Tagesrhythmus gewechselt. Die Anzucht einer Zellkultur aus gingivalen Fibroblasten nahm ca. 2-3 Wochen in Anspruch. Zeigten die Zellen eine Konfluenz von ca. 90 %, wurden sie in Kryoröhrchen von der Fa. Nalgene CRYOWARE™ (Nunc International, Rochester, NY, USA) überführt und bei -80 °C eingefroren. Die Kultur der gingivalen Fibroblasten zur Kontrolle der Genexpression der oben genannten Gene wurde im Rahmen vorangegangener Untersuchungen im Labor der Poliklinik für Parodontologie, Zahnerhaltung und Präventive Zahnheilkunde des Zentrums für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde der Rheinischen-Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn etabliert. Für die Genexpressionsanalyse wurden die Zellen zu einer Konfluenz von ca. 80-90 % herangezüchtet.

## 2.7 RNA-Extraktion

Für die qualitative Genexpressionsanalyse von humanen gingivalen Fibroblasten wurde die Gesamt-RNA mit dem RNeasy Protect Mini Kit extrahiert, welches von der Fa. Qiagen (Hilden) bezogen wurde. Die RNA-Extraktion wurde nach Herstellerprotokoll für humane Zellkulturen durchgeführt. Die Lysispufferproben wurden mit 400 µl Ethanol (70 %) versetzt, gevortext und auf die RNeasy-Säulen gegeben (12000 rpm; 30 Sekunden).

Die Lösung wurde verworfen. Nach einer Zugabe von 700  $\mu\text{l}$  RW1-Puffer auf die Säule fand ein weiterer Zentrifugationsschritt statt (12.000 rpm; 30 Sekunden). Die Lösung wurde wieder verworfen. Daraufhin wurden die Säulen zweimal mit 500  $\mu\text{l}$  RPE-Puffer gewaschen (10.000 rpm; 2 Minuten), wobei die Lösung nach dem ersten Durchgang erneut verworfen wurde. Tube und Lösung wurden verworfen. Die Säule wurde auf ein neues Tube überführt und erneut bei 10.000 rpm für 2 Minuten zentrifugiert. Zuletzt wurde die Säule auf 1,5 ml Eppendorftubes überführt und die auf ihnen gebundene RNA mit 55  $\mu\text{l}$  RNase-freiem Aqua dest. eluiert (10.000 rpm; 1 Minute). Danach wurde die zentrifugierte Lösung aus dem Tube aufgenommen und erneut auf die Säule überführt (10.000 rpm; 1 Minute). Das resultierende Volumen von 55  $\mu\text{l}$  Gesamt-RNA wurde bei -80 °C gelagert.

## **2.8 RNA-Konzentrationsbestimmung**

Die Konzentration der RNA-Menge wurde in 1  $\mu\text{l}$  Lösung mit dem Nanodrop (Thermo Scientifics, PEQLAB Biotechnologie, Erlangen, Deutschland) und dem Programm Nanodrop-1000 v3.5.2. bei 260 nm in ng/ $\mu\text{l}$  gemessen). Zum Kalibrieren wurde 1  $\mu\text{l}$  destilliertes Wasser auf den Probenhalter gegeben. Nachdem dieser mit einem feuchten Tuch gereinigt wurde, wurde 1  $\mu\text{l}$  RNA der jeweiligen Probe auf den Probenhalter pipettiert. Die Absorption der jeweiligen RNA-Lösung wurde mit 260 nm im Spektralphotometer ermittelt. Die Konzentrationsbestimmung beruht auf dem Absorptionsmaximum der aromatischen Pyridin- und Pyrimidinringe der Nukleinsäurebasen bei 260 nm. Die RNA-Konzentration konnte unter der Rubrik ng/ $\mu\text{l}$  an ihrem jeweiligen Wert abgelesen werden. Die gewünschte RNA-Menge für die cDNA-Synthese betrug 500 ng (Dommisch et al., 2007). Um diese Konzentration zu erlangen, mussten die aus der Nano-Drop-Messung erhaltenen RNA-Werte (ng/ $\mu\text{l}$ ) für jede Probe dementsprechend umgerechnet und die errechnete Menge der RNA-Lösung in  $\mu\text{l}$  für die jeweiligen Proben festgelegt werden. Alle verwendeten Reagenzien wurden von der Fa. Invitrogen GmbH (Karlsruhe) bezogen.

## 2.9 Reverse Transkription

Unter einer reversen Transkription versteht man das Überschreiben der genetischen Information von einem mRNA-Strang in eine komplementäre DNA (cDNA), sprich cDNA-Synthese. Man spricht von reverser, also umgekehrter Transkription, da es sich im Vergleich zur Mehrzahl zellulärer Transkriptionsvorgänge um genetische Informationsüberschreibung in rückwärtiger Richtung handelt. Dieser Vorgang benötigt ein Enzym, die Reverse Transkriptase (RNA-abhängige DNA-Polymerase). Ein synthetisches Oligonukleotid des Gens wird als Starter (Primer) für die Reverse Transkriptase benutzt. In der Regel werden Oligonukleotide aus Thymidinbasen, sogenannte Oligo(dT)20-Primer, verwendet, die üblicherweise aus 15-20 Nukleotiden bestehen. Der Primer muss ein freies 3'-OH-Ende besitzen und komplementär zur RNA sein. Die isolierte Poly-A-RNA wird mit dem Starter-Oligonukleotid hybridisiert und ermöglicht der Reversen Transkriptase, die komplementäre cDNA zu synthetisieren. Die reverse Transkription der aus den Proben gewonnenen RNA wurde mit dem iScript Select für RT-PCR der Fa. Bio-Rad Laboratories (München) durchgeführt. Die Anwendung erfolgte nach Herstellerangaben. Nach Auftauen der Proben wurden jeweils x µl RNA (die im vorausgegangenen Schritt errechnete µl-Menge um auf eine RNA-Gesamtkonzentration von 500 ng zu kommen) und 13-x µl H<sub>2</sub>O in ein steriles Eppendorf-Tube überführt und 1 µl iScript reverse Transkriptase, 2 µl Oligo(dT)-Primer und 4 µl 5fach iScript select reactionmix aus dem iScript Select cDNA Synthesis Kit hinzu gegeben. Dies ergab ein Gesamtvolumen von 20 µl. Im Anschluss erfolgte die Inkubation des Gemisches im MyCycler der Fa. Bio-Rad (München) bei 42 °C für 90 min mit anschließender Deaktivierung für 5 min bei 85 °C. Die so gewonnene cDNA wird als Matrize für die Polymerasekettenreaktion genutzt (Verres et al., 1987). Die Proben wurden bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

## 2.10 Real-Time-Polymerasekettenreaktion

Für die quantitative Amplifizierung der Gene IL-8, CCL20 und GAPDH wurden Real-Time-PCR-Analysen mit dem iCycler der Fa. Bio-Rad Laboratories (München) durchgeführt. Die Detektion der PCR-Produkte erfolgte mit dem im Reagenzmix enthaltenen, interkalierenden Fluoreszenzfarbstoff SYBRGreen I<sup>®</sup>. Dieser Farbstoff bindet in der doppelsträngigen DNA und emittiert Licht der Wellenlänge von 490 nm. Auf diese Weise konnte eine kontinuierliche Fluoreszenzmessung des PCR-Produktes, Zyklus für Zyklus, aufgezeichnet werden.

Nach einer Denaturierung der DNA wird diese einzelsträngig und verhindert dadurch eine Interkalation mit dem Farbstoff. Während der Annealing-Phase hybridisieren die Primer an ihrer Zielsequenz der DNA-Matrize und generieren in der Elongationsphase einen Doppelstrang, in den sich der Farbstoff mehr und mehr einlagern kann. Am Ende der Elongationsphase stellt sich somit ein Maximum an gebundenem SYBR-Green<sup>®</sup>-Farbstoff dar. Während dieser Phase eines Zyklus in der Polymerasekettenreaktion wird die Messung mit Hilfe der iCycler<sup>®</sup> Kamera durchgeführt. Dieser Ablauf wiederholt sich in jedem Zyklus, so dass auf einem angeschlossenen Computermonitor das gemessene Fluoreszenzsignal zu einem beliebigen Zeitpunkt abgelesen werden kann. Schließlich wird die Polymerasekettenreaktion als exponentielle Funktion graphisch dargestellt. Die iCycler<sup>®</sup>-Software errechnet eine so genannte Schwellenlinie (Baseline), welche den Übergang des Graphen in die exponentielle Phase der Polymerasekettenreaktion markiert. Dieser Übergang beschreibt das Erreichen einer PCR-Produktkonzentration, die höher ist als die Hintergrundfluoreszenz im Reagenzgefäß (Gibson et al., 1996). Wird die exponentielle Phase erreicht, ergibt dieses den so genannten Schwellenwert [„threshold cycle“ (Ct-Wert)]. Dieser Ct-Wert wird anhand der Zyklenzahl festgelegt. Je später, d.h. mit zunehmender Zyklenzahl, die Probe diese Schwelle erreichte, desto geringer fällt die Konzentration der cDNA aus (Higuchi et al., 1993).

Zur quantitativen Amplifizierung wurde jeweils 1 µl der entsprechenden cDNA zu einem Mix aus 2,5 µl Primer (je 100 mol/µl), 12,5 µl iQTMSYBR<sup>®</sup> Green Supermix [MgCl<sub>2</sub>(6 mM)], dNTP (0,4 mM dATP, dGTP, dTTP, dCTP), Taq DNA Pol (50 U/ml), SYBR Green (20 nM), (pH 8,4)] und 9 µl Aqua dest. (RNase-frei) gegeben. Die Reagenzien wurden von der Fa. Bio-Rad (München) bezogen. Es wurde ein Gesamtgemisch („Mastermix“)

aus dem iTMSYBR<sup>®</sup> Green Supermix, Aqua dest. und Primern hergestellt, um unterschiedliche Konzentrationen durch ungenaues Pipettieren zu vermeiden. Zu Beginn der PCR wurde eine Denaturierungsphase von 3 Minuten bei 95 °C angesetzt. Innerhalb eines Real-Time-PCR-Zyklus fand zunächst eine Denaturierung der cDNA-Moleküle statt (95 °C; 15 Sekunden). Darauf folgte die Hybridisierung der Primer an die cDNA-Fragmente bei experimentell ermittelter Annealingtemperatur (30 Sekunden). Im Anschluss erfolgte die Elongationsphase (72 °C, 30 Sekunden). Insgesamt umfasste die Real-Time-PCR 40 dieser Zyklen.

Jedes Experiment setzte sich aus einer PCR-Negativkontrolle, sowie der jeweiligen cDNA-Proben und einer Verdünnungsreihe der PCR-Positivkontrolle zusammen. Bei der PCR-Negativkontrolle wurde anstatt cDNA 1µl Aqua dest. zum Probenmix gegeben. Es sollte hier keinerlei PCR-Produkt entstehen bzw. gemessen werden.

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

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

**Formel 1:** Primereffizienz (Tabelle 1, 2.11)

## 2.11 Optimierung der Real-Time-PCR

Um die Bedingungen der Real-Time-PCR zu optimieren, wurde für jedes einzelne Gen mit den entsprechenden klonierten PCR-Produkten die optimale Temperatur (Annealing-Temperatur) der dazugehörigen Primer bestimmt. Die Primer von Qiagen (IL-8, GAPDH) liefen laut Herstellerangaben bei 60 °C, bei dem Primer von Metabion (CCL20) wurde ein Temperaturgradient gefahren und die PCR-Produkte anschließend mittels Gelelektrophorese überprüft. Auch hier lief die PCR bei 60 °C. Die Effizienzen zur Berechnung der relativen Genexpressionen (Pfaffl, 2001) wurden mit Hilfe von Verdünnungsreihen ermittelt. Diese sind in Tabelle 1 dargestellt.

Gene	Effizienz	°C
GAPDH	1,98	60
IL-8	1,94	60
CCL20	2,04	60

**Tab. 1:** Darstellung der Effizienzen und Annealing-Temperaturen von GAPDH, IL-8 und CCL20 aus der Real-Time-PCR

Die optimale Primereffizienz beträgt 2,0. Das bedeutet, dass in jedem PCR-Zyklus eine Verdopplung der vorhandenen DNA stattfindet. Dieser Wert kann theoretisch nicht überschritten werden, in der Praxis kommt es jedoch häufig vor, dass Werte von 2,0 oder mehr erreicht werden. Erklären lässt sich dies durch das Entstehen von Nebenprodukten neben dem spezifischen Amplikon.

## 2.12 Auswertung der Real-Time-PCR

Alle untersuchten Proben wurden anhand der unstimulierten Kontrolle und der Expression des Housekeeping-Gens GAPDH ausgewertet. Ein Housekeeping-Gen sollte die Eigenschaft aufweisen, sich in seinen Expressionswerten nicht zu verändern. Unter dieser Voraussetzung kann das Housekeeping-Gen dann als Referenzwert dienen. Es ermöglicht so relative Aussagen über Amplikons anderer Gene und unterschiedlicher PCR-Läufe, durch Vergleich der Expression im gleichen Versuch (Simon et al., 2004). GAPDH eignet sich deshalb so gut als Housekeeping-Gen, weil sich in Vorversuchen gezeigt hat, dass es unter verschiedenen Untersuchungsbedingungen sehr konstant exprimiert wurde (Zimmermann et al., 2003). Bei der Auswertung der quantitativen Real-Time-PCR wurde die Normalisierung der Ergebnisse anhand der Genexpression von GAPDH-Primern vorgenommen (Bustin, 2002 und 2000; Ke et al., 2000; Thellin et al., 1999; Vandesompele et al., 2002). Alle Ergebnisse wurden zunächst durch den oben beschriebenen Schwellenwert (Ct-Wert) dargestellt. Die Methode nach Pfaffl ermittelt die Änderung der Genexpression im Vergleich zum Housekeeping-Gen und zur unstimulierten Kontrolle. Der Wert wird hier als x-fache Änderung der entsprechenden Genexpression angegeben (Pfaffl, 2001). Im ersten Schritt wurde die Primereffizienz der Referenz- und der Zielprimer errechnet. In einem zweiten Rechenschritt wurden die jeweiligen  $\Delta\text{Ct}$ -Werte der einzelnen Proben erarbeitet. Es wurde eine Differenz gebildet, bei welcher der  $\Delta\text{Ct}$ -Wert aus dem Ct-Wert des Housekeeping-Gens und dem des Zielgens der unstimulierten Kontrolle ermittelt wurde. Dieses entsprach der Referenz. Die zweite Differenz für den  $\Delta\text{Ct}$ -Wert wurde aus dem Ct-Wert des Housekeeping-Gens und dem des Zielgens der untersuchten Probe (Wert für das Zielgen) berechnet. In einer weiteren Formel wurde dann der entsprechende Quotient ermittelt, welcher die x-fache Änderung der Genexpression angab:

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

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

### **2.13 ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)**

Um die durch die PCR erzielten Ergebnisse bezüglich der Proteinexpression von CCL20 und IL-8 zu verifizieren, wurde ein Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) mit dem Quantikine ELISA (Human IL-8 und CCL20/MIP 3a) der Firma R&D Systems durchgeführt.

Die Detektion der Proteine erfolgte mittels der sogenannten "Sandwich-Technik". Dabei werden zwei Antikörper verwendet, die beide spezifisch an das nachzuweisende Antigen binden. Hierbei binden beide Antikörper an unterschiedlichen Stellen (Epitope) an das Antigen, da sie sich sonst gegenseitig behindern würden. Der erste Antikörper wird an eine feste Phase (Mikrotiterplatte mit 96 wells) gebunden. Die Proben mit den nachzuweisenden Antigenen werden dann in die wells gegeben und eine Zeit lang inkubiert. Während dieser Zeit bindet der an die Platte gebundene Antikörper das in der Probe vorhandene Antigen. Nach Ablauf der Inkubationsphase wird die Platte gewaschen: Die ungebundenen Bestandteile der Probe werden dadurch entfernt, und zurück bleibt nur das am Antikörper gebundene Antigen. Im nächsten Schritt wird ein zweiter Antikörper zur Detektion zugegeben der ein anderes Epitop als der vorhergehende Antikörper erkennt und an dessen Ende ein Reporterenzym gebunden ist. Dieser zweite Antikörper bindet ebenfalls an das Antigen, und es entsteht der Antikörper-Antigen-Antikörper-Komplex. Daher stammt auch der Name „Sandwich-ELISA“. Durch erneutes Waschen der Platte wird der überschüssige Detektionsantikörper ausgewaschen. Erst jetzt kann das Antigen detektiert und quantifiziert werden: Es wird ein zum Reporterenzym passendes chromogenes Substrat zugegeben. Dieses wird vom Enzym zu einem Reaktionsprodukt umgesetzt dessen Nachweis durch Farbumschlag erfolgt. Für quantitative Nachweise wird üblicherweise eine Serie mit bekannten Antigenkonzentrationen (Standardreihe) durchgeführt, um eine Kalibrierungskurve für das gemessene Signal zu erhalten.

Zur Detektion der Proteine CCL20 und IL-8 wurde zunächst eine Standard-Verdünnungsreihe nach Herstellerangaben angesetzt. Alle Reagenzien wurden auf Raumtemperatur gebracht. Die Protokolle variieren je nach gesuchtem Gen in Bezug auf die Antikörper, Puffer und Inkubationszeiten. Es wurden 100 µl des jeweiligen Assay Diluent je well pipettiert und 50 µl Standard, Kontrolle oder Probe in Duplikaten

hinzupipettiert und mit Folien versiegelt. Anschließend wurden die Proben 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach viermaliger Anwendung von 300 µl Waschpuffer (wash buffer concentrate+ H<sub>2</sub>O) wurden je well 100 µl IL-8/CCL20- Conjugate aufgetragen und erneut mit Folie versiegelt. Erneut wurde 1 h bei Raumtemperatur inkubiert und mit 4 mal 300 µl Waschpuffer gereinigt. Für die Messung der optischen Dichte wurde eine Substrate Solution, bestehend aus je 100 µl Color Reagent A+B (200 µl) je well direkt vor Gebrauch pipettiert und 30 min im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss wurden je well 50 µl Stop Solution hinzugegeben. Die Messung der optischen Dichte des Farbumschlags von blau nach gelb und somit der Zytokin-Konzentration wurde mittels eines Microplate Readers bei einer Wellenlänge von 450 nm mit Subtraktion der Referenzwellenlänge (540 nm oder 570 nm) innerhalb von 30 min gemessen.

Die Protokolle wurden streng nach den Herstellerangaben durchgeführt.

## **2.14 Statistische Auswertung der quantitativen Genexpressionsanalyse**

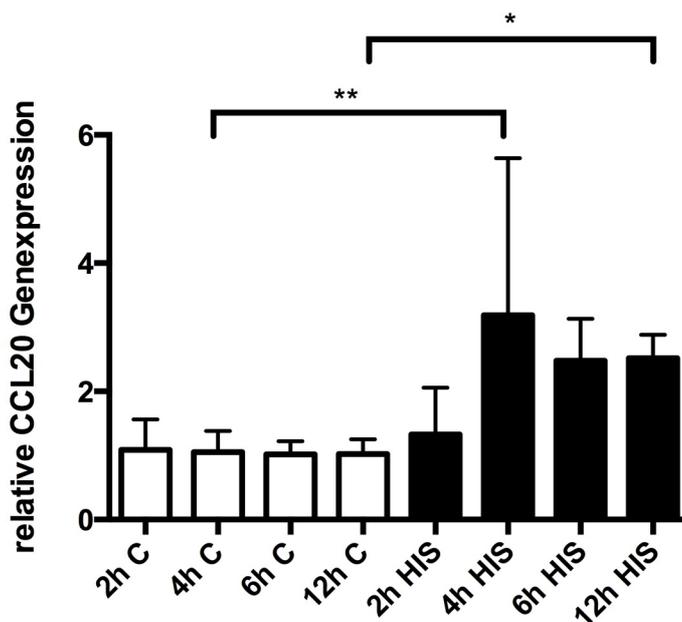
Die statistische Auswertung wurde mit dem Programm GraphPad Prism<sup>®</sup> (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA), lizenziert für das Universitätsklinikum Bonn, durchgeführt. Es wurde zunächst eine rein deskriptive Statistik erhoben, wobei der Mittelwert, Minimum, Maximum und die Standardabweichung angegeben worden sind. In einem zweiten Arbeitsschritt wurde eine One-Way ANOVA mit Korrektur für wiederholte, multiple Messungen (Turkey's Test) durchgeführt. Abschließend wurden die p-Werte für die einzelnen Unterschiede mit Hilfe des T-Tests (zweiteilig) verglichen (Brosius, 2002). In allen Tests wurde ein Signifikanzniveau von  $p \leq 0,05$  angenommen.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Quantitative Analyse der Expression von CCL20

##### 3.1.1 Einfluss von Histamin auf die Genexpression von CCL20

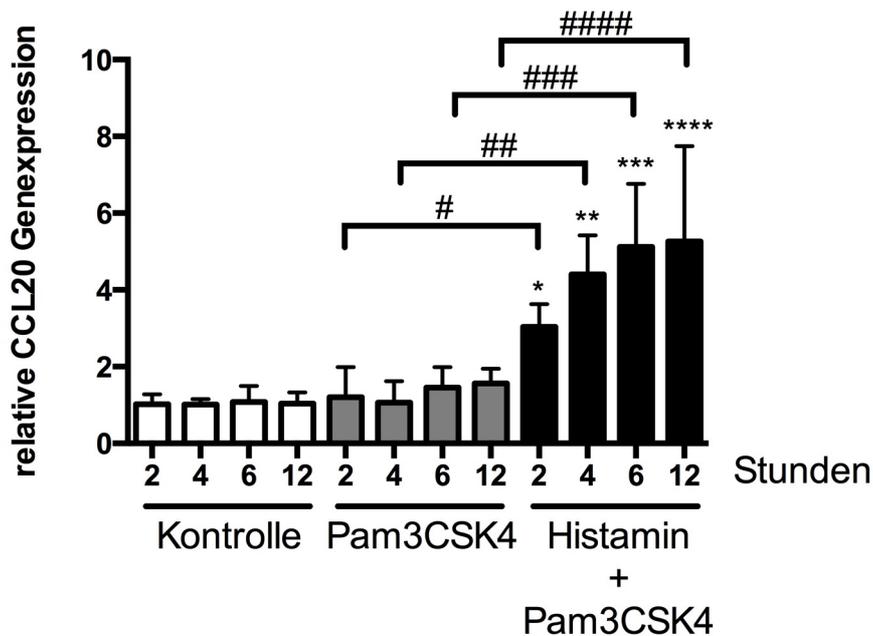
Die Stimulation von HGFs mit Histamin führte im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle zu einer signifikant erhöhten Genexpression von CCL20 nach 4 bzw. 12 Stunden ( $p = 0,0198$  bzw.  $p < 0,0001$ ). Die Abbildung 1 zeigt die Genexpression von CCL20 über den Zeitraum von 2, 4, 6 und 12 Stunden.



**Abb. 1:** Darstellung der Genexpression von CCL20 in HGFs nach Stimulation mit Histamin. Die weißen Balken zeigen die Ergebnisse für unstimulierte Kontrollzellen über die Zeit. Die schwarzen Balken repräsentieren die Ergebnisse nach Stimulation mit Histamin. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung an. C, Kontrollzellen; His, Histamin. \*,  $p < 0,0001$ ; \*\*,  $p = 0,0198$ .

### 3.1.2 Einfluss von Pam3CSK4 in Kombination mit Histamin auf die Genexpression von CCL20

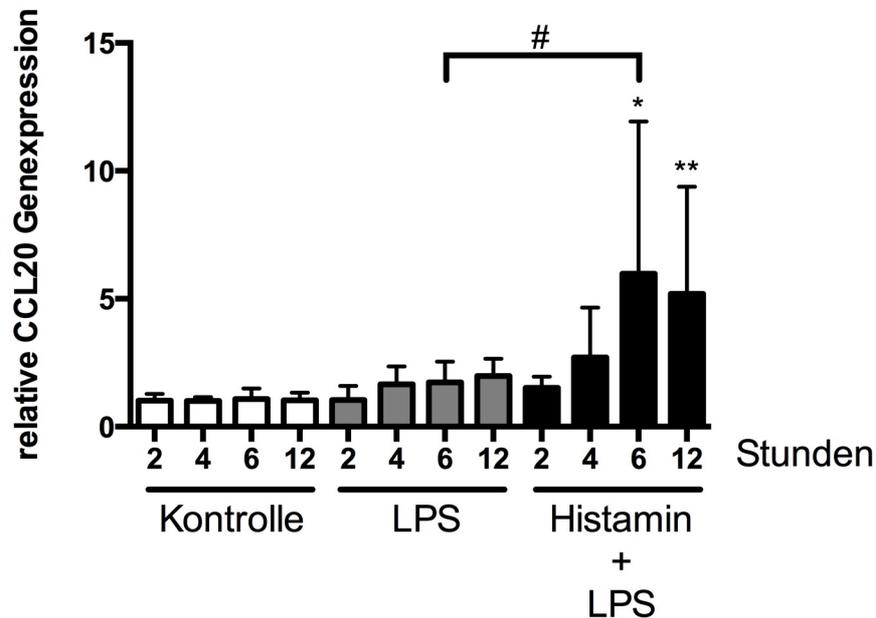
Die Stimulation von HGFs mit Pam3CSK4 allein führte nicht zu einer Änderung der Genexpression von CCL20 über den untersuchten Zeitraum. Im Vergleich sowohl zur unstimulierten Kontrolle als auch zur Stimulation mit Pam3CSK4 allein, resultierte die Anwendung der Kombination Pam3CSK4 und Histamin in einer signifikant erhöhten Genexpression von CCL20 für jeden der untersuchten Zeiträume ( $p < 0,0004$ ; siehe Abb. 2).



**Abb. 2:** Darstellung der Genexpression von CCL20 in HGFs. Die weißen Balken zeigen die Ergebnisse für unstimulierte Kontrollzellen, die grauen Balken die Ergebnisse nach Stimulation mit Pam3CSK4 und die schwarzen Balken repräsentieren die Ergebnisse nach Stimulation mit der Kombination Pam3CSK4 und Histamin. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung an. \*\*\*\*\*,  $p < 0,0001$ ; #####,  $p < 0,0004$ .

### 3.1.3 Einfluss von LPS in Kombination mit Histamin auf die Genexpression von CCL20

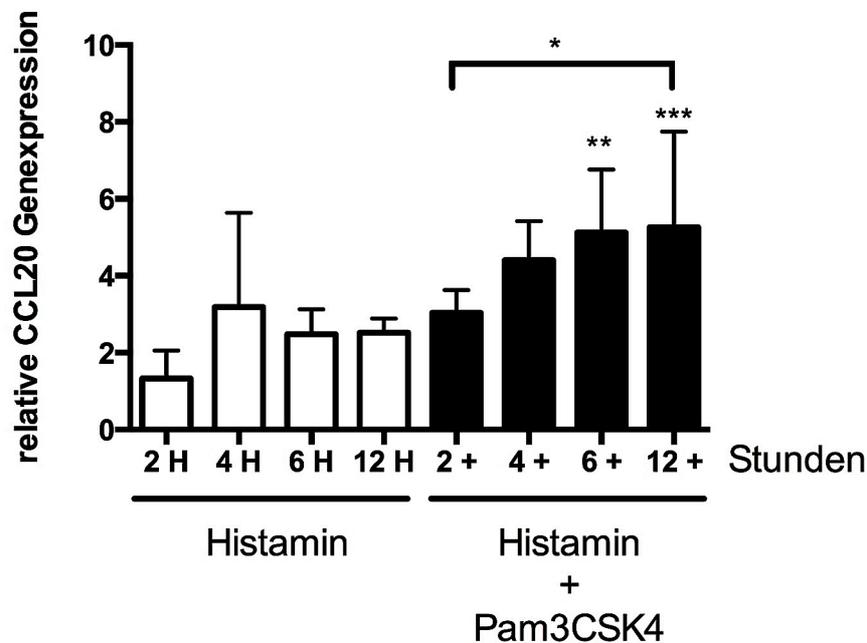
Die Stimulation von HGFs mit LPS allein führte nicht zu einer Änderung der Genexpression von CCL20 über den untersuchten Zeitraum. Im Vergleich sowohl zur unstimulierten Kontrolle als auch zur Stimulation mit Pam3CSK4 allein, resultierte die Kombination von Pam3CSK4 mit Histamin in einer signifikant erhöhten Genexpression von CCL20 nach 6 bzw. 12 Stunden ( $p < 0,05$ ; siehe Abb. 3).



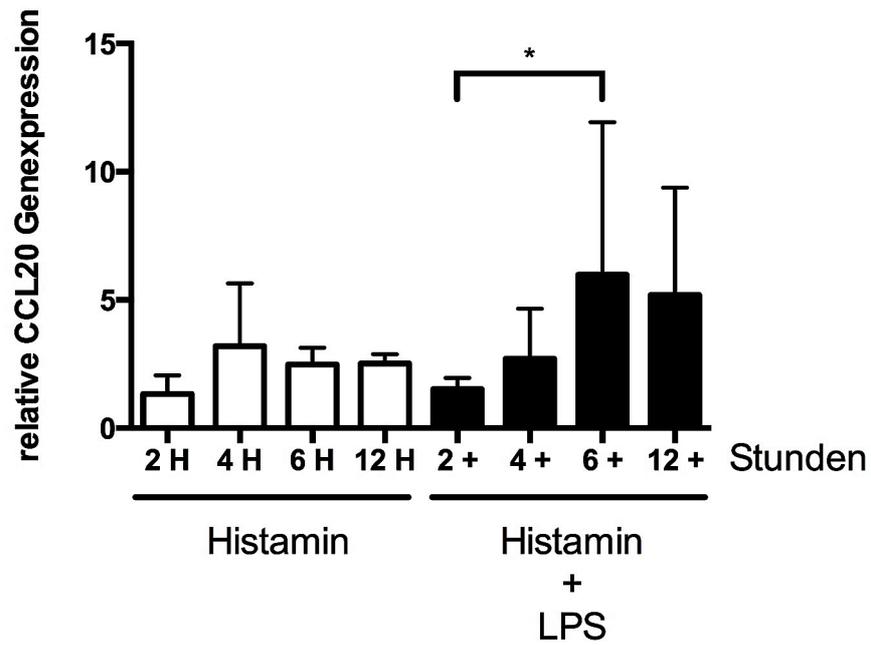
**Abb. 3:** Darstellung der Genexpression von CCL20 in HGFs. Die weißen Balken zeigen die Ergebnisse für unstimulierte Kontrollzellen, die grauen Balken die Ergebnisse nach Stimulation mit LPS und die schwarzen Balken repräsentieren die Ergebnisse nach Stimulation mit der Kombination LPS und Histamin. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung an. \*,  $p = 0,0256$ ; \*\*,  $p = 0,0091$ ; #,  $p = 0,05$ .

### 3.1.4 Vergleich der Genexpression von CCL20 nach Histamin-Stimulation und kombinierter Behandlung

Der Vergleich der Geneexpression von CCL20 nach Stimulation mit Histamin alleine und der kombinierten Stimulation mit Pam3CSK4 zeigte, dass die kombinierte Stimulation zu einer signifikanten, zeitabhängigen Erhöhung führte (siehe Abb. 4). Die Kombination von Histamin mit LPS resultierte in einer erhöhten Genexpression von CCL20 innerhalb der experimentellen Gruppe (siehe Abb. 5).



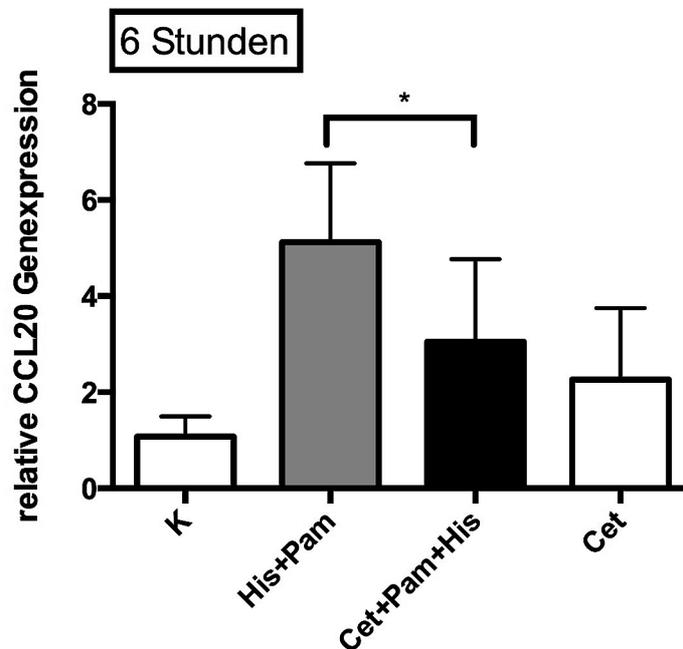
**Abb. 4:** Darstellung der Genexpression von CCL20 in HGFs nach Stimulation mit Histamin sowie der Kombination Histamin mit Pam3CSK4. Die weißen Balken zeigen die Ergebnisse nach isolierter Stimulation mit Histamin über die Zeit. Die schwarzen Balken repräsentieren die Ergebnisse nach kombinierter Stimulation mit Histamin und Pam3CSK4. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung an. \*,  $p = 0,0189$ ; \*\*,  $p = 0,0004$ ; \*\*\*,  $p = 0,0047$ .



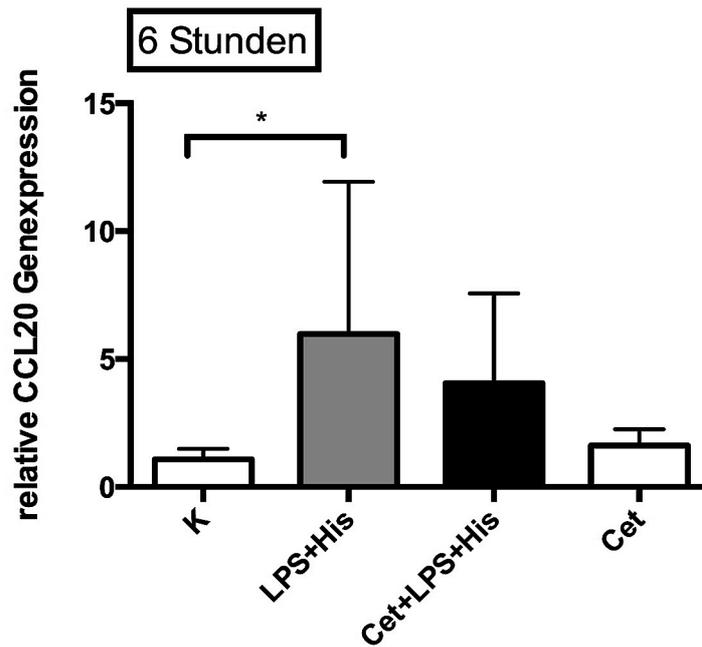
**Abb. 5:** Darstellung der Genexpression von CCL20 in HGFs nach Stimulation mit Histamin sowie der Kombination Histamin mit LPS. Die weißen Balken zeigen die Ergebnisse nach isolierter Stimulation mit Histamin über die Zeit. Die schwarzen Balken repräsentieren die Ergebnisse nach kombinierter Stimulation mit Histamin und LPS. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung an. \*,  $p = 0,0397$ .

### 3.1.5 Einfluss des H<sub>1</sub>-Rezeptors auf die Histamin-induzierte Genexpression von CCL20

Die Anwendung des H<sub>1</sub>-Rezeptorantagonisten Cetirizin führte nach Stimulation mit Histamin und Pam3CSK4 zu einer signifikanten Reduktion der Genexpression von CCL20 im Vergleich zur kombinierten Stimulation mit Histamin und Pam3CSK4 ( $p = 0,0276$ ; siehe Abb. 6). Ein ähnliches Muster zeigte die Genexpressionsanalyse von CCL20 in HGFs nach Stimulation mit Histamin und LPS (siehe Abb. 7).



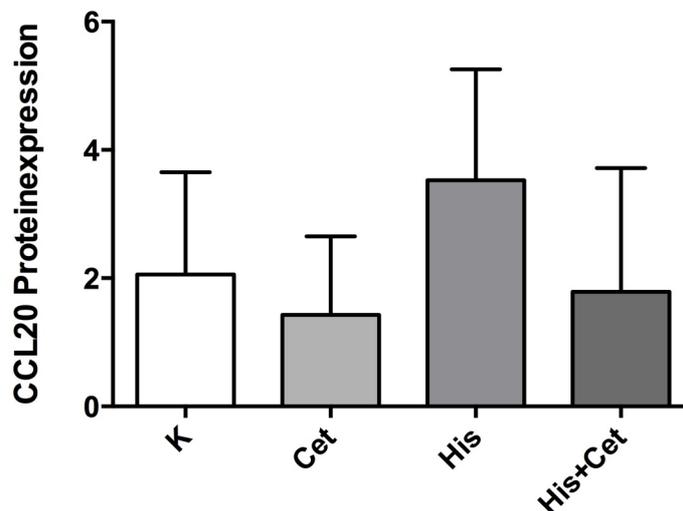
**Abb. 6:** Darstellung der Genexpression von CCL20 in HGFs nach Stimulation mit der Kombination Histamin und Pam3CSK4. Die weißen Balken zeigen die Ergebnisse für unstimulierte Kontrollzellen sowie für die Cetirizin-Kontrolle. Der graue Balken repräsentiert die Ergebnisse der kombinierten Behandlung und der schwarze Balken den Einfluss des H<sub>1</sub>-Rezeptorantagonisten. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung an. K, Kontrolle; Cet, Cetirizin; His, Histamin; Pam, Pam3CSK4. \*,  $p = 0,0276$ .



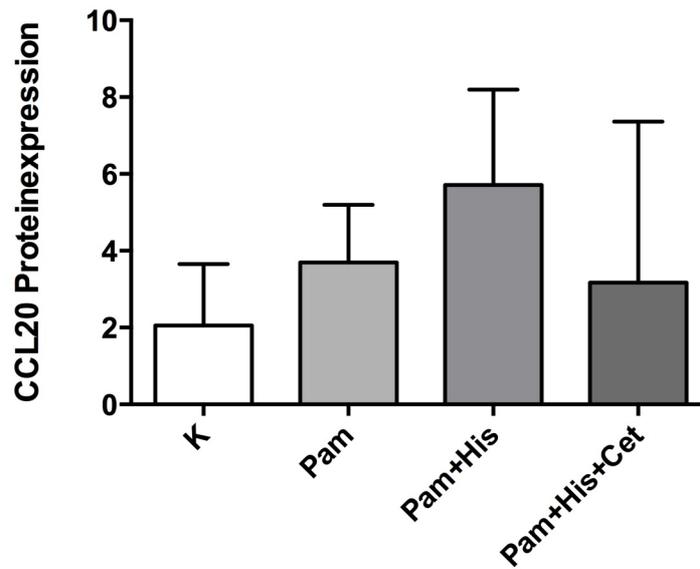
**Abb. 7:** Darstellung der Genexpression von CCL20 in HGFs nach Stimulation mit der Kombination Histamin und LPS. Die weißen Balken zeigen die Ergebnisse für unstimulierte Kontrollzellen sowie für die Cetirizin-Kontrolle. Der graue Balken repräsentiert die Ergebnisse der kombinierten Behandlung und der schwarze Balken den Einfluss des  $H_1$ -Rezeptorantagonisten. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung an. K, Kontrolle; Cet, Cetirizin; His, Histamin; LPS, Lipopolysaccharide von *E. coli*. \*,  $p = 0,0256$ .

### 3.1.6 Quantitative Proteinexpression von CCL20 in HGFs

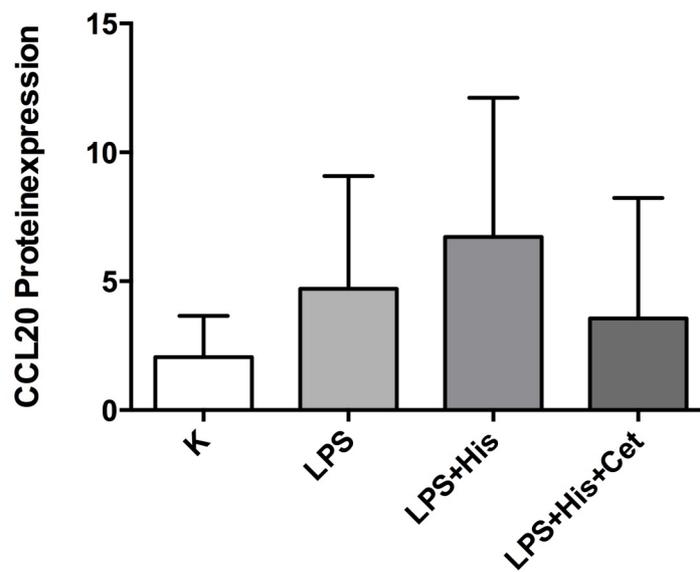
Die Proteinexpression von CCL20 war nach Histaminstimulation tendenziell erhöht bzw. erniedrigt, wenn die Zellen zuvor mit dem H<sub>1</sub>-Rezeptorantagonisten behandelt wurden (siehe Abb. 8). Vergleichbare Proteinexpressionmuster zeigten sich auch für die kombinierte Stimulation Histamin mit Pam3CSK4 (siehe Abb. 9) bzw. LPS (siehe Abb. 10) und der gleichzeitigen Anwendung des H<sub>1</sub>-Rezeptorantagonisten Cetirizin. Signifikante Unterschiede konnten im Rahmen der Proteinexpressionsanalyse von CCL20 nicht festgestellt werden.



**Abb. 8:** Darstellung der Proteinexpression von CCL20 in HGFs. Der weiße Balken entspricht der unstimulierten Kontrolle, der hellgraue Balken der Cetirizinkontrolle, der mittelgraue Balken der Stimulation mit Histamin und der dunkelgraue Balke repräsentiert die Ergebnisse der kombinierten Behandlung mit dem H<sub>1</sub>-Rezeptorantagonisten. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung an. Die Werte auf der y-Achse entsprechen der Proteinkonzentration in pg/ml. K, Kontrolle; Cet, Cetirizin; His, Histamin.



**Abb. 9:** Darstellung der Proteinexpression von CCL20 in HGFs. Der weiße Balken entspricht der unstimulierten Kontrolle, der hellgraue Balken der Cetirizinkontrolle, der mittelgraue Balken der Stimulation mit Histamin und der dunkelgraue Balke repräsentiert die Ergebnisse der kombinierten Behandlung mit dem  $H_1$ -Rezeptorantagonisten. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung an. Die Werte auf der y-Achse entsprechen der Proteinkonzentration in pg/ml. K, Kontrolle; Cet, Cetirizin; His, Histamin.

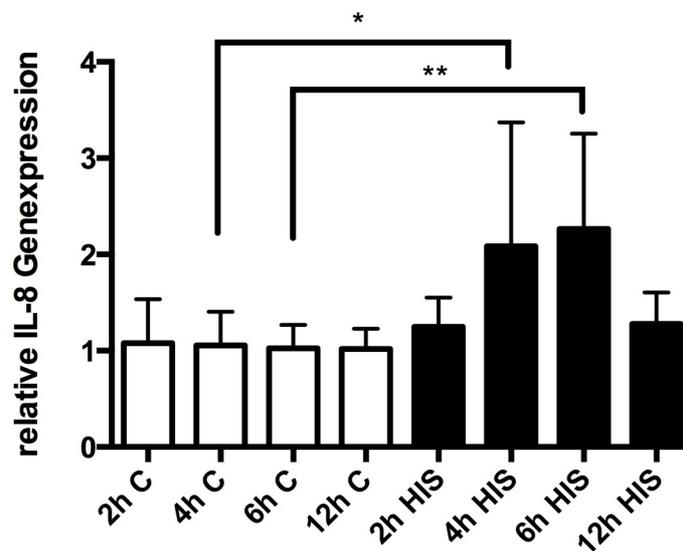


**Abb. 10:** Darstellung der Proteinexpression von CCL20 in HGFs. Der weiße Balken entspricht der unstimulierten Kontrolle, der hellgraue Balken der Cetirizinkontrolle, der mittelgraue Balken der Stimulation mit Histamin und der dunkelgraue Balke repräsentiert die Ergebnisse der kombinierten Behandlung mit dem  $H_1$ -Rezeptorantagonisten. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung an. Die Werte auf der y-Achse entsprechen der Proteinkonzentration in pg/ml. K, Kontrolle; Cet, Cetirizin; His, Histamin.

## 3.2 Quantitative Analyse der Expression von IL-8

### 3.2.1 Einfluss von Histamin auf die Genexpression von IL-8

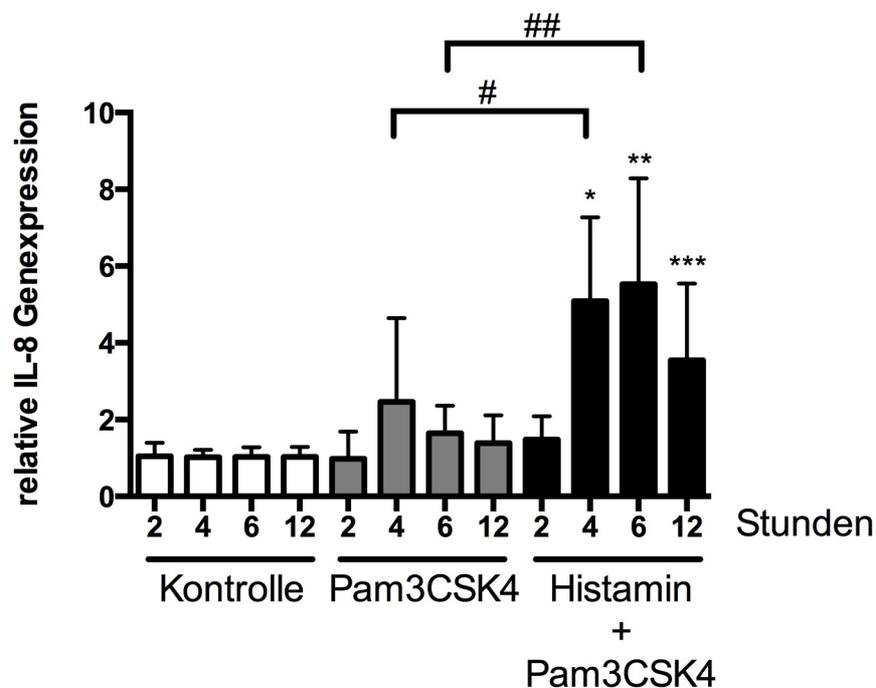
Die Stimulation von HGFs mit Histamin führte im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle zu einer signifikant erhöhten Genexpression von IL-8 nach 4 bzw. 6 Stunden ( $p = 0,0339$  bzw.  $p = 0,0036$ ). Die Abbildung 11 zeigt die Genexpression von IL-8 über den Zeitraum von 2, 4, 6 und 12 Stunden.



**Abb. 11:** Darstellung der Genexpression von IL-8 in HGFs nach Stimulation mit Histamin. Die weißen Balken zeigen die Ergebnisse für unstimulierte Kontrollzellen über die Zeit. Die schwarzen Balken repräsentieren die Ergebnisse nach Stimulation mit Histamin. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung an. C, Kontrollzellen; His, Histamin. \*,  $p = 0,0339$ ; \*\*,  $p = 0,0036$ .

### 3.2.2 Einfluss von Pam3CSK4 in Kombination mit Histamin auf die Genexpression von IL-8

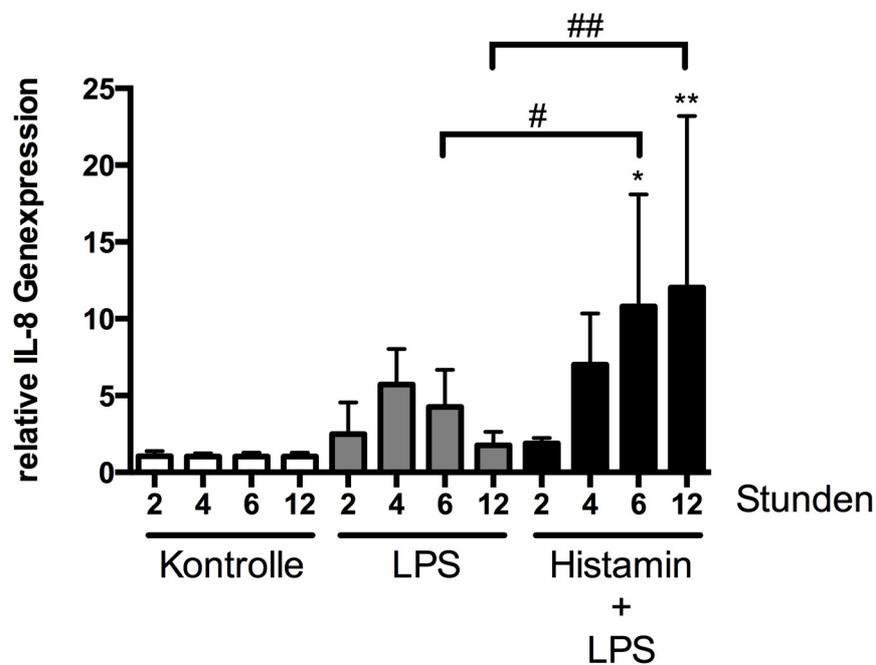
Die Stimulation von HGFs mit Pam3CSK4 allein führte nicht zu einer Änderung der Genexpression von IL-8 über den untersuchten Zeitraum. Im Vergleich sowohl zur unstimulierten Kontrolle als auch zur Stimulation mit Pam3CSK4 allein, resultierte die Kombination von Pam3CSK4 mit Histamin in einer signifikant erhöhten Genexpression von IL-8 für jeden der untersuchten Zeiträume ( $p < 0,00212$ ; siehe Abb. 12).



**Abb. 12:** Darstellung der Genexpression von IL-8 in HGFs. Die weißen Balken zeigen die Ergebnisse für unstimulierte Kontrollzellen, die grauen Balken die Ergebnisse nach Stimulation mit Pam3CSK4 und die schwarzen Balken repräsentieren die Ergebnisse nach Stimulation mit der Kombination Pam3CSK4 und Histamin. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung an. \*,  $p < 0,0001$ ; \*\*,  $p = 0,0002$ ; \*\*\*,  $p = 0,0018$ ; #,  $p = 0,00212$ ; ##,  $p = 0,0009$ .

### 3.2.3 Einfluss von LPS in Kombination mit Histamin auf die Genexpression von IL-8

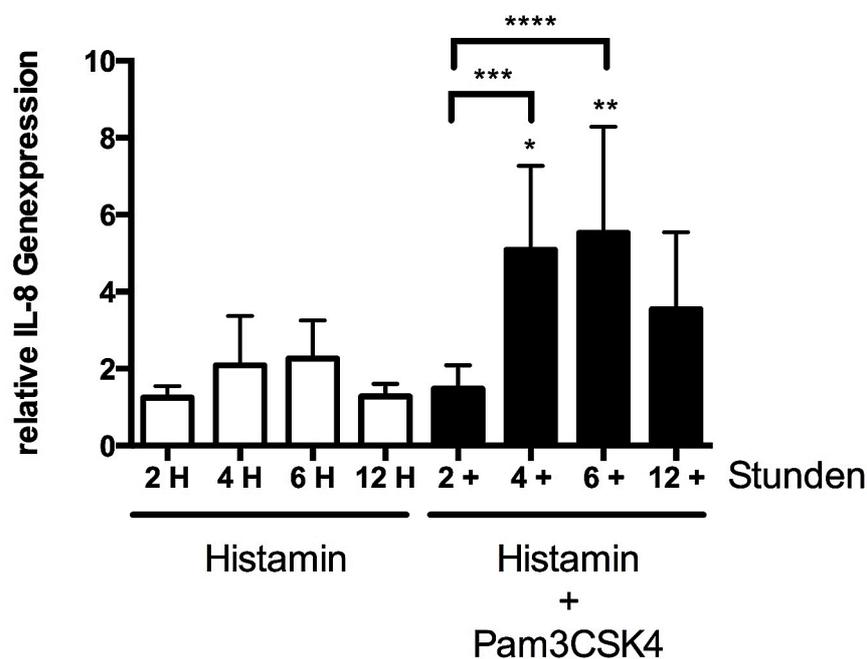
Die Stimulation von HGFs mit LPS allein führte nicht zu einer Änderung der Genexpression von IL-8 über den untersuchten Zeitraum. Im Vergleich sowohl zur unstimulierten Kontrolle als auch zur Stimulation mit Pam3CSK4 allein, resultierte die Kombination von Pam3CSK4 mit Histamin in einer signifikant erhöhten Genexpression von IL-8 nach 6 bzw. 12 Stunden ( $p < 0,05$ ; siehe Abb. 13).



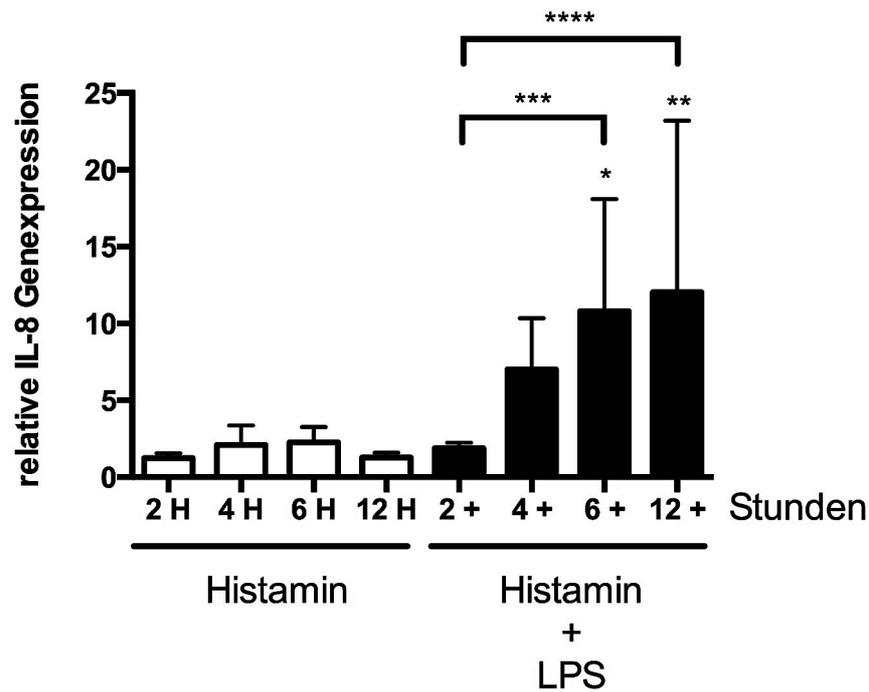
**Abb. 13:** Darstellung der Genexpression von IL-8 in HGFs. Die weißen Balken zeigen die Ergebnisse für unstimulierte Kontrollzellen, die grauen Balken die Ergebnisse nach Stimulation mit LPS und die schwarzen Balken repräsentieren die Ergebnisse nach Stimulation mit der Kombination LPS und Histamin. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung an. \*,  $p = 0,001$ ; \*\*,  $p = 0,0093$ ; #,  $p = 0,0207$ ; ##,  $p = 0,0093$ .

### 3.2.4 Vergleich der Genexpression von IL-8 nach Histamin-Stimulation und kombinierter Behandlung

Der Vergleich der Geneexpression von IL-8 nach Stimulation mit Histamin alleine und der kombinierten Stimulation mit Pam3CSK4 sowie LPS zeigte, dass die kombinierte Stimulation zu einer signifikanten, zeitabhängigen Erhöhung führte (siehe Abb. 14 bzw. Abb. 15).



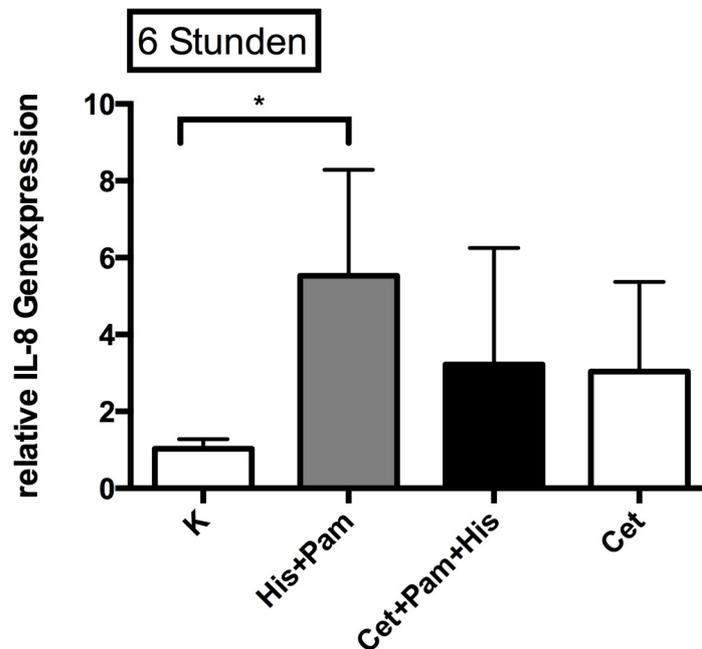
**Abb. 14:** Darstellung der Genexpression von IL-8 in HGFs nach Stimulation mit Histamin sowie der Kombination Histamin mit Pam3CSK4. Die weißen Balken zeigen die Ergebnisse nach isolierter Stimulation mit Histamin über die Zeit. Die schwarzen Balken repräsentieren die Ergebnisse nach kombinierter Stimulation mit Histamin und Pam3CSK4. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung an. \*,  $p = 0,0026$ ; \*\*,  $p = 0,0042$ ; \*\*\*,  $p = 0,0002$ ; \*\*\*\*,  $p = 0,0006$ .



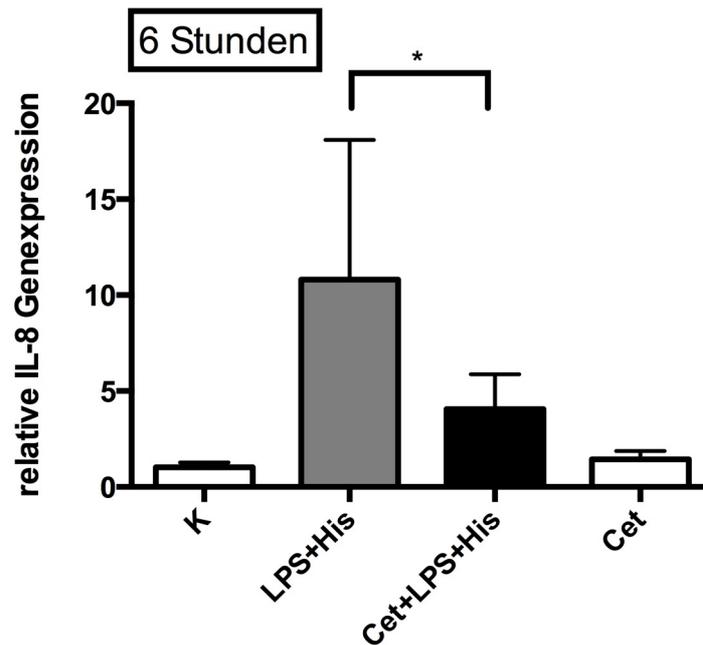
**Abb. 15:** Darstellung der Genexpression von IL-8 in HGFs nach Stimulation mit Histamin sowie der Kombination Histamin mit LPS. Die weißen Balken zeigen die Ergebnisse nach isolierter Stimulation mit Histamin über die Zeit. Die schwarzen Balken repräsentieren die Ergebnisse nach kombinierter Stimulation mit Histamin und LPS. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung an. \*,  $p = 0,003$ ; \*\*,  $p = 0,0107$ ; \*\*\*,  $p = 0,002$ ; \*\*\*\*,  $p = 0,0150$ .

### 3.2.5 Einfluss des H<sub>1</sub>-Rezeptors auf die Histamin-induzierte Genexpression von IL-8

Die Anwendung des H<sub>1</sub>-Rezeptorantagonisten Cetirizin führte nach Stimulation mit Histamin und LPS zu einer signifikanten Reduktion der Genexpression von IL-8 im Vergleich zur kombinierten Stimulation mit Histamin und Pam3CSK4 ( $p = 0,0157$ ; siehe Abb. 17). Ein ähnliches Muster zeigte die Genexpressionsanalyse von IL-8 in HGFs nach Stimulation mit Histamin und Pam3CSK4 (siehe Abb. 16).



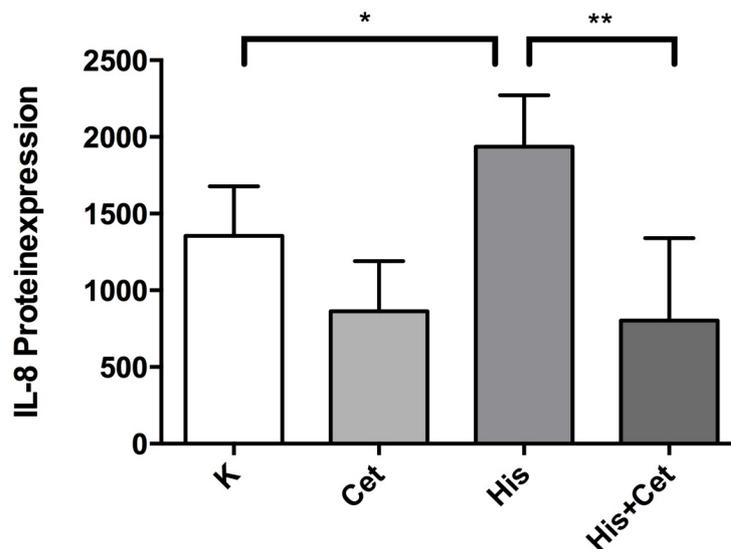
**Abb. 16:** Darstellung der Genexpression von IL-8 in HGFs nach Stimulation mit der Kombination Histamin und Pam3CSK4. Die weißen Balken zeigen die Ergebnisse für unstimulierte Kontrollzellen sowie für die Cetirizin-Kontrolle. Der graue Balken repräsentiert die Ergebnisse der kombinierten Behandlung und der schwarze Balken den Einfluss des H<sub>1</sub>-Rezeptorantagonisten. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung an. K, Kontrolle; Cet, Cetirizin; His, Histamin; Pam, Pam3CSK4. \*,  $p = 0,0002$ .



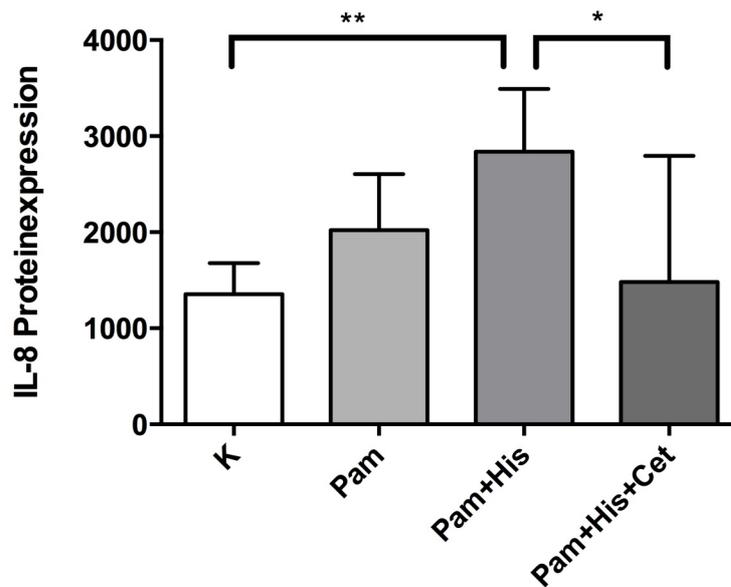
**Abb. 17:** Darstellung der Genexpression von IL-8 in HGFs nach Stimulation mit der Kombination Histamin und LPS. Die weißen Balken zeigen die Ergebnisse für unstimulierte Kontrollzellen sowie für die Cetirizin-Kontrolle. Der graue Balken repräsentiert die Ergebnisse der kombinierten Behandlung und der schwarze Balken den Einfluss des  $H_1$ -Rezeptorantagonisten. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung an. K, Kontrolle; Cet, Cetirizin; His, Histamin; LPS, Lipopolysaccharide von *E. coli*. \*,  $p = 0,0157$ .

### 3.2.6 Quantitative Proteinexpression von IL-8 in HGFs

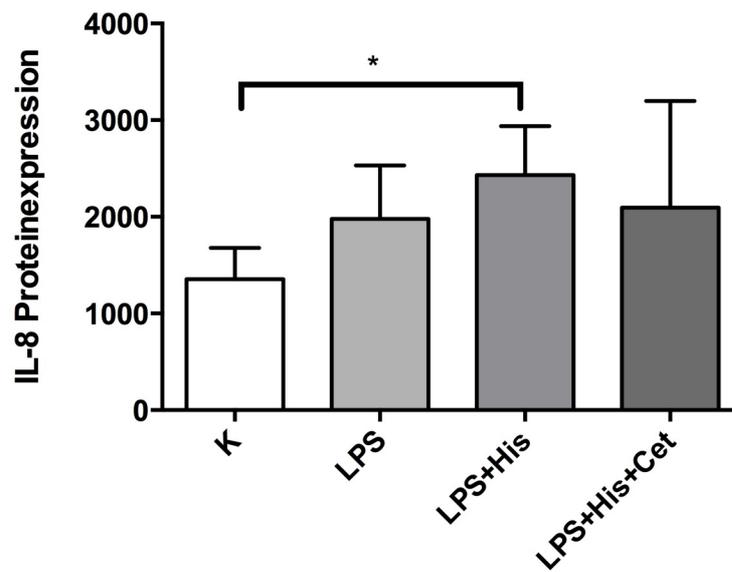
Die Proteinexpression von IL-8 war nach Histaminstimulation signifikant erhöht bzw. erniedrigt, wenn die Zellen zuvor mit dem H<sub>1</sub>-Rezeptorantagonisten behandelt wurden ( $p = 0,0047$  bzw.  $p = 0,0003$ ; siehe Abb. 18). Vergleichbare Proteinexpressionmuster zeigten sich auch für die kombinierte Stimulation Histamin mit Pam3CSK4 und der gleichzeitigen Anwendung des H<sub>1</sub>-Rezeptorantagonisten Cetirizin ( $p = 0,0002$  bzw.  $p = 0,0308$ ; siehe Abb. 19). Die kombinierte Stimulation mit Histamin und LPS führte zu einer signifikant erhöhten Proteinexpression von IL-8 ( $p = 0,0003$ ; siehe Abb. 20).



**Abb. 18:** Darstellung der Proteinexpression von IL-8 in HGFs. Der weiße Balken entspricht der unstimulierten Kontrolle, der hellgraue Balken der Cetirizinkontrolle, der mittelgraue Balken der Stimulation mit Histamin und der dunkelgraue Balken repräsentiert die Ergebnisse der kombinierten Behandlung mit dem H<sub>1</sub>-Rezeptorantagonisten. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung an. Die Werte auf der y-Achse entsprechen der Proteinkonzentration in pg/ml. K, Kontrolle; Cet, Cetirizin; His, Histamin. \*,  $p = 0,0047$ ; \*\*,  $p = 0,0003$ .



**Abb. 19:** Darstellung der Proteinexpression von CCL20 in HGFs. Der weiße Balken entspricht der unstimulierten Kontrolle, der hellgraue Balken der Cetirizinkontrolle, der mittelgraue Balken der Stimulation mit Histamin und der dunkelgraue Balken repräsentiert die Ergebnisse der kombinierten Behandlung mit dem H<sub>1</sub>-Rezeptorantagonisten. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung an. Die Werte auf der y-Achse entsprechen der Proteinkonzentration in pg/ml. K, Kontrolle; Cet, Cetirizin; His, Histamin. \*,  $p = 0,0308$ ; \*\*,  $p = 0,0002$ .



**Abb. 20:** Darstellung der Proteinexpression von IL-8 in HGFs. Der weiße Balken entspricht der unstimulierten Kontrolle, der hellgraue Balken der Cetirizinkontrolle, der mittelgraue Balken der Stimulation mit Histamin und der dunkelgraue Balken repräsentiert die Ergebnisse der kombinierten Behandlung mit dem H<sub>1</sub>-Rezeptorantagonisten. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung an. Die Werte auf der y-Achse entsprechen der Proteinkonzentration in pg/ml. K, Kontrolle; Cet, Cetirizin; His, Histamin. \*, p = 0,0003.

## 4. Diskussion

### 4.1 Einleitung

In gesunden Individuen ist das gingivale Gewebe von einer Vielzahl bakterieller Mikroorganismen besiedelt, dennoch verbleibt die Gingiva in Gegenwart von nicht-pathogenen Mikroorganismen meistens gesund und entzündungsfrei. Generell stellt zunächst das epitheliale Gewebe die erste Linie der Abwehr dar, welche den Körper vor dem Eindringen der Mikroorganismen schützt. Zur Aufrechterhaltung einer gesunden Homöostase bietet das epitheliale Gewebe suffiziente lokale Immunmechanismen. Neben einer rigiden physikalischen Barriere wird eine so genannte chemische Barriere in Form der Synthese antimikrobieller Peptide innerhalb des epithelialen Zellverbandes bereitgestellt (Chung et al., 2007). In den vergangenen Jahren standen vermehrt gingivale Epithelzellen im Fokus der Erforschung oraler Gewebe. Speziell untersucht wurden humane  $\beta$ -Defensine (hBD-2), welche eine besondere Rolle während der frühen gingivalen Entzündungsreaktion zu spielen scheinen (Dommisch et al., 2005). Dass auch gingivale Fibroblasten in der Lage sind, sich im Rahmen der frühen Immunabwehr zu beteiligen, konnte bereits gezeigt werden (Rizzo et al., 2008). Darüber hinaus spielt Histamin im Rahmen der Immunantwort eine wichtige proinflammatorische Rolle, da es in der Lage ist, die Synthese proinflammatorischer Mediatoren in gingivalen Fibroblasten zu erhöhen und somit Entzündungsreaktionen zu verstärken (Minami et al., 2007). Trotz vieler molekularbiologischer Untersuchungen, die unser Wissen über die molekularen Signalwege der frühen Immunantwort in den letzten Jahrzehnten stark erweitert konnten, ist es notwendig, die Immunmechanismen weiter zu erforschen (Medzhitov, 2007; Takeda et al., 2003).

Die vorliegende Studie befasst sich mit dem Einfluss von Histamin auf die Expression von CCL20 und IL-8 in gingivalen Fibroblasten, welche für die parodontale Entzündungsreaktion von wichtiger Bedeutung zu sein scheinen.

## 4.2 Bewertung der Methoden

Im Rahmen dieser Stimulationsexperimente sollten mögliche immunmodulierende Effekte von Histamin auf die Expression von CCL20 und IL-8 in gingivalen Fibroblasten nachgewiesen werden. Dafür wurden die im Zuge routinemäßig durchgeführter oralchirurgischer Eingriffe entnommenen Gewebeproben in Anlehnung an frühere Studien und bewährte Protokolle (Dommisch et al., 2007c; 2012) aufbereitet. Die herangezögten Kulturen wurden mit den natürlichen Virulenzfaktor LPS, dem synthetischen Pathogen Pam3CSK4 und dem Gewebshormon und Neurotransmitter Histamin über einen Zeitraum von 2, 4, 6 und 12 Stunden stimuliert. Diese Zeitspannen wurden gewählt, um speziell die frühe Antwort bezüglich der Expression der oben genannten Mediatoren zu untersuchen. Daraufhin erfolgte die Co-Stimulation von Histamin mit sowohl LPS, als auch Pam3CSK4. Abschließend wurde in einem weiteren Versuch den Zellen zusätzlich noch Cetirizin zugesetzt, um den Einfluss des H<sub>1</sub>-Rezeptors auf die Expression von CCL20 und IL-8 in HGFs zu untersuchen. Nachdem die mRNA aus den Gewebeproben extrahiert wurde, erfolgte die RNA-Konzentrationsbestimmung durch Messung der optischen Dichte. So konnte sichergestellt werden, dass in allen Proben eine nahezu gleiche Menge RNA für die cDNA-Synthese vorhanden war. Nach der cDNA-Synthese wurde eine quantitative Genexpressionsanalyse für CCL20 und IL-8 mit Hilfe der Real-Time-Polymerasekettenreaktion (PCR) durchgeführt.

In dieser Studie wurden alle Untersuchungen mit Hilfe der Real-Time-PCR durchgeführt. Hierbei handelt es sich um ein thermozyklisches Verfahren, womit bereits kleine Mengen von DNA-Fragmenten mit hoher Ausbeute (exponentiell) amplifiziert werden. Die zur Analyse der Genexpression verwendete Real-Time-PCR ist ein sehr sensitives Verfahren und erlaubt neben der üblichen Amplifizierung der cDNA zusätzlich eine Quantifizierung mit Hilfe von Fluoreszenzmessungen. Die Fluoreszenzaufzeichnung aus einer Probe erfolgt dann, wenn das Fluoreszenzsignal des amplifizierten Produktes mindestens 5 % stärker ist als die Hintergrundfluoreszenz der Reaktion (Schwellenwertzyklus / „Crossing point“) (Bustin, 2002 und 2000). Im Rahmen dieser Arbeit wurde der interkalierende Fluoreszenzfarbstoff SYBR- Green<sup>®</sup> eingesetzt. Für die Anwendung einer interkalierenden (fluoreszierenden) Substanz war es wichtig, zunächst die

einzelnen Zyklusabschnitte der Polymerasekettenreaktion zu optimieren (Vandesompele et al., 2002). Die Konzentration der eingesetzten Primer, sowie die Annealing-temperaturen (Anlagerungstemperaturen der Primer) mussten in Vorversuchen optimiert werden, damit keine unspezifischen Amplifikationen das Interkalieren von SYBR-Green® in Primer-Dimeren ermöglichten (Bustin, 2002; Vandesompele et al., 2002). Dabei können auch entstandene Primerdimere aufgrund eines SYBR-Green®-Fluoreszenzsignal identifiziert werden, wenn das PCR-Produkt entweder fehlt oder nur in einem geringen Maße vorhanden ist (Bustin, 2002). Um Artefakte durch unspezifische PCR-Fragmente auszuschließen, wurde im Anschluss an jede PCR eine Schmelzkurve angefertigt. In einer Schmelzkurve besitzen alle PCR-Produkte, je nach Größe und molekularer Zusammensetzung, unterschiedliche Schmelzpunkte und können daher in dieser Kurve voneinander differenziert werden. Für die quantitative Analyse der Genexpression wurde zunächst das mRNA-Level des sogenannten Housekeeping-Gens untersucht. Als Housekeeping-Gene werden Gene bezeichnet, die Zellen zumeist gleichmäßig, d.h. konstitutiv in Zellen exprimieren (Dheda et al., 2004; Thellin et al. 1999). GAPDH (Glycerin-aldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase) ist eins der am meisten genutzten Housekeeping-Gene beim Vergleich von Genexpressionswerten (Barber et al., 2005). Die Darstellung der mRNA-Expression von GAPDH bietet daher die Möglichkeit, zunächst den Erfolg der reversen Transkriptions-Polymerasekettenreaktion zu überprüfen, und darüber hinaus die ermittelten Ct-Werte der Zielgene zu normalisieren. Sollte dieser Standard nicht detektiert werden können, muss man davon ausgehen, dass die PCR (oder ein vorangegangener Versuchsanteil wie mRNA-Isolierung und/oder cDNA-Synthese) nicht optimal verlaufen ist. Die Genexpression von GAPDH konnte jedoch in allen Proben sowohl im Rahmen der qualitativen als auch der quantitativen Analyse nachgewiesen werden. Aufgrund dessen konnten die C<sub>t</sub>-Werte der zu untersuchenden Gene CCL20, IL-8 sowie des Housekeeping-Gens GAPDH und der jeweiligen unstimulierten Kontrollen zusammen mit den entsprechenden Primereffizienzen mittels der Formel nach Pfaffl in Korrelation gebracht und die relativen Expressionen berechnet werden (Pfaffl, 2001). Als Alternative zu GAPDH ist als weiterer interner Standard  $\beta$ -Aktin zu erwähnen. Abschließend wurde das Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)-Verfahren durchgeführt, um mittels Antikörper-Antigen-Antikörper-Bindung (Sandwich-Verfahren), zusätzlich zu der gemessenen mRNA-Expression von CCL20 und IL-8 durch die PCR, die Expression der entstandenen

Proteine zu ermitteln. Dies ist ein in der Wissenschaft etabliertes Verfahren zur Detektion von ausgesuchten Antigenen (Lequin, 2005). Dafür wurden in dieser Arbeit die jeweils für die PCR hergestellten Proben verwendet, in denen sich die nachzuweisenden Zytokine befanden. Um Ungenauigkeiten beim Pipettieren der einzelnen Volumina zu vermeiden, wurden zuvor Gesamtgemische hergestellt („MasterMix“).

### 4.3. Diskussion der Ergebnisse

In der hier durchgeführten Arbeit konnte in Vorversuchen zunächst eine erhöhte mRNA-Expression von CCL20 und IL-8 in humanen gingivalen Fibroblasten nach Stimulation mit Histamin (10 $\mu$ M) aufgezeigt werden.

Während LPS und Pam3CSK4 alleine keine relevante Erhöhung der Genexpression hervorriefen, konnte Histamin in isolierter Stimulation zu einer signifikanten Steigerung der Genexpression von CCL20 und IL-8 in HGFs im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle führen.

Interleukin-8 ist als Komponente des angeborenen Immunsystems in proinflammatorische Reaktionen involviert und wird im Rahmen bakterieller Infektionen oder Stimulation mit bakteriellen Bestandteilen von gingivalen Fibroblasten vermehrt synthetisiert (Akira et al., 1990; Schröder und Christophers, 1992). Kürzlich veröffentlichte Studien konnten bereits zeigen, dass gingivale Fibroblasten sowohl IL-8 nach Stimulation mit bakteriellen Bestandteilen wie LPS, als auch CCL20 nach Stimulation mit *Porphyromonas gingivalis* vermehrt exprimierten (Dommisch et al., 2012; Ara et al., 2009).

Auch die Rolle von Chemokinen bei parodontalen Erkrankungen wurde schon in anderen Arbeiten behandelt. Hierbei wurde ebenfalls die Genexpression von CCL20, jedoch in gingivalen Epithelzellen untersucht (Dommisch et al., 2007). Dabei fand man heraus, dass sowohl CCL20, als auch das humane  $\beta$ -Defensin 2 als Antwort auf Proteasen (Gingipaine), die von *Porphyromonas gingivalis* sezerniert wurden, verstärkt exprimiert wurden. Hier konnte LPS als weiterer Virulenzfaktor jedoch, anders als in dieser Arbeit gezeigt, keine Hochregulierung von CCL20 hervorrufen, da nach Gabe von

Proteasehemmern die Genexpression von CCL20 trotz weiterer Stimulation mit LPS blockiert wurde (Dommisch et al., 2007). Eine weitere Studie zeigte, dass CCL20 in HGFs auf Stimulation mit *Porphyromonas gingivalis* vermehrt exprimiert wurde (Dommisch et al., 2012). Auch in der vorliegenden Arbeit konnte eine erhöhte Expression von CCL20 auf Stimulation mit TLR-Agonisten aufgezeigt werden. Dies verdeutlicht, dass das antimikrobielle Peptid eine wichtige Rolle im Rahmen der angeborenen Immunantwort spielt.

Die Effekte von Histamin auf die frühe Immunantwort (hier CCL20 und IL-8) von gingivalen Fibroblasten wurden bislang wenig untersucht. Es scheint aber im Rahmen der zellspezifischen Regulation proinflammatorischer Mediatoren in HGFs eine nicht unerhebliche Mediatorfunktion zu übernehmen (Minami et al., 2007).

In einer weiteren Versuchsreihe dieser Studie wurden humane gingivale Fibroblasten zusätzlich zu LPS bzw. Pam3CSK4 mit Histamin in der oben genannten Konzentration co-stimuliert. Es zeigte sich, dass die daraufhin gemessene mRNA-Expression von CCL20 und besonders von IL-8 signifikant höher war als bei den jeweils isolierten Stimulationen. Dabei konnte nach 6 Stunden ein Maximalwert für die Expressionen in nahezu allen Versuchen gemessen werden. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass Histamin bei gleichzeitiger Anwesenheit von TLR-Agonisten (LPS und Pam3CSK4) eine viel stärkere Immunantwort in HGFs hervorrufen könnte. Die anschließende Durchführung des ELISA-Tests ergab, dass die gemessene Proteinexpression von CCL20 und IL-8 bei kombinierter Stimulation von Histamin mit den Cofaktoren LPS und Pam3CSK4 höher war, als bei isolierter Stimulation mit Histamin, LPS und Pam3CSK4. Die Ergebnisse des ELISA-Verfahrens führten somit in dieser Versuchsreihe zu einer vergleichbaren Aussage im Bezug auf die Ergebnisse der PCR. Des Weiteren konnte der ELISA-Test zeigen, dass die gingivalen Fibroblasten in allen Versuchsreihen deutlich weniger CCL20 exprimierten als IL-8. Diese Gegebenheit kann durch die individuelle proinflammatorische Reaktion der gingivalen Fibroblasten auf die Stimulation mit Histamin und LPS/Pam3CSK4 erklärt werden und deckt sich mit den Ergebnissen der PCR. Auch hier wurde auf Ebene der Genexpression deutlich mehr IL-8 exprimiert. In allen Versuchsreihen können zudem, trotz dem Ansetzen von Mastermixen bei der PCR und dem ELISA-Verfahren, sowohl Pipettier-, also auch Messfehler nicht komplett ausgeschlossen werden, womit sich vereinzelt abweichende Werte erklären lassen können.

Um einen Einfluss auf die Immunantwort gingivaler Fibroblasten zu haben, muss es also Histaminrezeptoren auf deren Oberfläche geben. Dies konnte in voraus gegangenen Studien bereits gezeigt werden. Demnach besitzen gingivale Fibroblasten die Histaminrezeptoren H<sub>1</sub>R und H<sub>2</sub>R. Histamin induziert jedoch womöglich über H<sub>1</sub>R, nicht jedoch über H<sub>2</sub>R eine erhöhte Ausschüttung von IL-8 (Minami et al., 2007).

Das Zusammenspiel von Histamin und LPS ist wechselseitig. Es gibt mehrere Zellen, die Histamin produzieren, zum einen Mastzellen und zum anderen Monozyten (Wu et al., 2004). Da Mastzellen sowohl in gesunder als auch in Gingivitis-bedingten Läsionen (Gemmell et al., 2004) und zusätzlich in hohem Maße in chronisch entzündeten gingivalen Geweben entdeckt wurden (Steinsvoll et al., 2004), werden diese als Quelle von Histamin angenommen. Zusätzlich kann Histamin aber auch von dem Mastzell-unabhängigen Enzym Histidindecaboxylase (HDC) gebildet werden, welches unter anderem von LPS induziert wird (Wu et al., 2004). Dies bedeutet, dass einerseits LPS die Histaminproduktion anregt und andererseits Histamin wiederum die Wirkung von LPS verstärkt. An dieser Stelle wird deutlich, welche Bedeutung Histamin in der Unterhaltung der Parodontitis hat und dass eine Kontrolle der Histaminrezeptoren eine fortschrittliche Maßnahme in der Bekämpfung von Parodontitis sein könnte.

In früheren Studien konnte ebenfalls gezeigt werden, dass Histamin die Immunantwort von humanen gingivalen Fibroblasten zusätzlich zur Reaktion auf bakterielle Produkte wie Lipopolysaccharide (LPS) deutlich amplifizieren kann (Uehara und Takada, 2007), die Produktion proinflammatorischer Mediatoren wie IL-8 in gingivalen Fibroblasten erhöht und somit in der Lage ist, Entzündungsreaktionen zu verstärken (Minami et al., 2007).

Diese Erkenntnis stimmt mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit überein und bestätigt diese. Um die Frage zu beantworten, ob der H<sub>1</sub>-Rezeptor auf den untersuchten HGFs an der Vermittlung der dargestellten Effekte beteiligt war, wurde den Zellen zusätzlich ein spezifischer Rezeptorantagonist (Cetirizin) für eine Stimulationsdauer von 6 Stunden zugegeben. Es konnte gezeigt werden, dass die mRNA-Expression von CCL20 und IL-8 nach Zugabe von Cetirizin in allen Versuchsreihen geringer war als bei der Co-Inkubation von Histamin und Pam3CSK4 bzw. Histamin und LPS jeweils ohne Cetirizin. Auch wenn die Unterschiede nicht in jeder Versuchsreihe das Signifikanzniveau erreichen konnten, so war das Expressionsmuster von CCL20 und IL-8 nach Applikation der H<sub>1</sub>-Rezeptorantagonisten jeweils vergleichbar.

Die anschließende Durchführung des ELISA-Tests ergab auch hier, dass es nach Zugabe von Cetirizin zu einer deutlich geringeren Proteinexpression von CCL20 und IL-8 kam, als nach den Stimulationen jeweils ohne Cetirizin. Die Ergebnisse des ELISA-Verfahrens führten somit auch in dieser Versuchsreihe zu einer vergleichbaren Aussage im Bezug auf die Ergebnisse der PCR.

Diese lassen darauf schließen, dass Cetirizin auch in gingivalen Fibroblasten die H<sub>1</sub>-Rezeptoren kompetitiv besetzte, somit einen hemmenden Einfluss auf die Histaminwirkung hatte und folglich zu einer verminderten Expression inflammatorischer Zytokine führen konnte. Die Expression der Mediatoren war vermindert. Die Effekte von Cetirizin in gingivalen Fibroblasten wurden bisher kaum untersucht, jedoch konnten früher erschienene Studien am Kaninchenmodell zeigen, dass eine lokale Behandlung mit dem H<sub>2</sub>-Rezeptorantagonisten Cimetidin über den Zeitraum von 6 Wochen zu einem verminderten Knochenverlust (> 90 %) im Vergleich zur Kontrollgruppe führte (Hasturk et al., 2006).

Weiterführende Studien könnten hier ansetzen und die Wirkungsweise von Cetirizin und weiteren Antihistaminika untersuchen, um eventuelle Therapieansätze zur Behandlung von Parodontitis weiter zu verfolgen.

#### **4.4 Ausblick**

Für zukünftige Untersuchungen wäre es interessant, weitere Effekte von Histamin genauer darzustellen und gegebenenfalls neue Erkenntnisse bezüglich der Therapie, im Speziellen der Prävention gingivaler Entzündungen, zu sammeln, um in Zukunft der Parodontitis möglicherweise medikamentös Einhalt zu gebieten. Die Infektion mit parodontal-pathogenen Bakterien, organisiert im dentalen Biofilm, spielt in der Ätiopathogenese parodontaler Entzündungen eine entscheidende Rolle (Sanz et al., 2011; Marsh et al., 2011). Es ist bekannt, dass auch bei vollständig zahnlosen Patienten parodontalpathogene Bakterien nachgewiesen werden können. Zwar ist die Anzahl der Bakterien im Vergleich zu Patienten mit Parodontitis vermindert, aber z.B. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* kann in der Mundhöhle auch nach Extraktion aller Zähne nachgewiesen werden (Quirynen et al., 2011). Auf der Basis der Ergebnisse

der vorliegenden Studie könnten neue therapeutische Konzepte erarbeitet werden, die darauf abzielen könnten, Expressionsprofile interner Mediatoren wie z.B. Histamin zu modulieren. Zusammenfassend konnte im Rahmen dieser Studie erstmals der stimulierende Effekt von Histamin in Co-Inkubation mit LPS und Pam3CSK4 auf die Expression von IL-8 und CCL20 in gingivalen Fibroblasten dargestellt werden. Zugleich wurde die Expression in Anwesenheit eines H<sub>1</sub>-Rezeptorantagonisten herunterreguliert. Gingivale Fibroblasten spielen damit eine wichtige Rolle im Rahmen der lokalen angeborenen Immunantwort des gingivalen Gewebes.

## 5. Zusammenfassung

In gesunden Individuen ist die Gingiva von einer Vielzahl bakterieller Mikroorganismen besiedelt, dennoch verbleibt das gingivale Gewebe in Anwesenheit von nicht-pathogenen Mikroorganismen meistens gesund und entzündungsfrei. Neben einer rigiden physikalischen Barriere bietet das gingivale Gewebe eine so genannte chemische Barriere in Form der Synthese antimikrobieller Peptide. Der Chemokin-Ligand-20 (CCL20) ist ein antimikrobielles Peptid, welches effektiv gegenüber gramnegativen Bakterien wirken kann. Ebenso wie Interleukin-8 (IL-8) spielt CCL20 eine wichtige Rolle in der angeborenen Immunantwort in einer Vielzahl unterschiedlicher Gewebe. Auch Histamin ist ein weiterer Mediator, welcher in entzündlichen Reaktionen involviert ist.

Ziel dieser Arbeit war es, zu untersuchen, welchen Einfluss Histamin auf die Expression der proinflammatorischen Mediatoren CCL20 und IL-8 in gingivalen Fibroblasten ausübt. Darüber hinaus war es von Interesse, ob Histamin die frühe angeborene Immunantwort auf Agonisten für Toll-like-Rezeptoren (TLRs) modifizieren kann.

Dazu wurden Kulturen von gingivalen Fibroblasten (HGFs) von drei unterschiedlichen gesunden Donoren, mit Lipopolysaccharid (LPS) von *Escherichia coli* (TLR-4 Agonist), Pam3CSK4 (TLR-2 Agonist), und Histamin sowohl isoliert, als auch in Kombination stimuliert.

In einem weiteren Versuchsansatz wurde der H<sub>1</sub>-Rezeptorantagonist Cetirizin während der Stimulation hinzugegeben. Nach Abschluss der Stimulationsexperimente wurde die RNA aus den Zellen extrahiert und die cDNA-Synthese mit oligo-(dT)-Primern) durchgeführt. Die quantitative Auswertung der Genexpression von CCL20, IL-8 und der Glycerinaldehyd-3-Phosphatdehydrogenase (GAPDH; Housekeeping-Gen) wurde mit Hilfe der Real-Time-PCR vorgenommen. Zusätzlich wurde die Proteinexpression der untersuchten Mediatoren mittels Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) analysiert.

Die Ergebnisse zeigten, dass Histamin in der Lage war, die Expression von CCL20 und IL-8 in HGFs signifikant zu erhöhen. Nach kombinierter Stimulation mit Histamin und LPS bzw. Pam3CSK4 konnte ein weiterer Anstieg der Genexpression von CCL20 und IL-8 im Vergleich zur Stimulation mit den einzelnen TLR-Agonisten oder mit Histamin allein beobachtet werden. Die Anwendung des Histaminrezeptor-Antagonisten Cetirizin

fürte zu einer verminderten Expression von CCL20 und IL-8 im Vergleich zur kombinierten Stimulation.

Die vorliegende Arbeit konnte den stimulativen Einfluss von Histamin auf die Expression der Mediatoren CCL20 und IL-8 in HGFs zeigen. Dieser Effekt war abhängig vom H<sub>1</sub>-Rezeptor auf den untersuchten HGFs. Die Ergebnisse dieser und weiterer Studien könnten dazu führen, dass neue therapeutische Konzepte entstehen, die darauf abzielen, Expressionsprofile interner Mediatoren wie z.B. Histamin zu modulieren. Hieraus könnten darüber hinaus neue lokal-präventive Strategien entwickelt werden, die zur Aufrechterhaltung einer gesunden oralen Homöostase beitragen können.

## 6. Literaturverzeichnis

Abe T, Hara Y, Aono M. Penetration, clearance and retention of antigen en route from the gingival sulcus to the draining lymph node of rats. *J Periodontal Res* 1991; 26: 429-439

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

Aliprantis AO, Yang RB, Mark MR, Suggett S, Devaux B, Radolf JB, Klimpel GR, Godowski P, Zychlinsky A. Cell activation and apoptosis by bacterial lipoproteins through toll-like-receptor 2. *Science* 1999; 285: 736-739

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

Baba M, Imai T, Nishimura M, Kakizaki M, Takagi S, Hieshima K, Nomiyama H, Yoshie O. Identification of CCR6, the specific receptor for a novel lymphocyte-directed CC chemokine LARC. *J Biol Chem* 1997; 272: 14893–14898

Barber RD, Harmer DW, Coleman RA, Clark BJ. GAPDH as a housekeeping gene: analysis of GAPDH mRNA expression in a panel of 72 human tissues. *Physiol Genomics* 2005; 21: 389-395

Bongers G, Bakker RA, Leurs R. Molecular aspects of the histamine H<sub>3</sub>-receptor. *Biochem Pharmacol* 2007; 73: 1195-1204

Brosius F. SPSS 11. Mitp-Verlag 2002

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

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

Chang J, Zhang C, Tani-Ishii N, Shi S, Wang CY. NF-kappaB activation in human dental pulp stem cells by TNF and LPS. *J Dent Res* 2005; 84: 994-998

Chung WO, Dommisch H, Yin, L, Dale BA. Expression of defensins in gingiva and their role in periodontal health and disease. *Curr Pharm Des* 2007; 13: 3073-3083

Clark EA, Hill SJ, Sensitivity of Histamin H<sub>3</sub>-receptor agonist-stimulated GTP $\gamma$  Binding to Pertussis Toxin, *Eur J Pharmacol* 1996; 296: 223-225

Culig Z. Cytokine disbalance in common human cancers. *Biochem Biophys Acta* 2010; 10: 5-8

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

Doenecke D, Koolman J, Fuchs G, Gerok W, Karlsons. *Biochemie und Pathobiochemie*. Stuttgart-New York: Thieme, 2005

Dommisch H, Acil Y, Dunsche A, Winter J, Jepsen S. Differential gene expression of human beta-defensin (hBD-1, -2, -3) in inflammatory gingival diseases. *Oral Microbiol Immunol* 2005; 20: 186-190

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

Dommisch H, Whasun OC, Maryam GR, Williams D, Rangarajan M, Curtis MA, Dale BA. Protease-Activated Receptor 2 Mediates Human Beta-Defensin 2 and CC Chemokine Ligand 20 mRNA Expression in Response to Proteases Secreted by *Porphyromonas gingivalis*. *Infect and Imm* 2007c; 75: 4326-4333

Dommisch H, Whasun OC, Jepsen S, Hacker BM, Dale BA. PLC, p38/MAPK, and NF- $\kappa$ B-mediated induction of MIP-3 $\alpha$ /CCL20 by *Porphyromonas gingivalis*. *Innate Immun* 2010; 16: 226–234

Dommisch H, Reinartz M, Backhaus T, Deschner J, Chung W, Jepsen S. Antimicrobial responses of primary gingival cells to *Porphyromonas gingivalis*. *J Clin Periodontol* 2012; 39: 913-922

Dy M, Schneider E. Histamine-cytokine connection in immunity and hematopoiesis. *Cytokine Growth Factor Rev* 2004; 15: 393-410

Fujiie S, Hieshima K, Izawa D, Nakayama T, Fujisawa R, Ohyanagi H, Yoshie O. Proinflammatory cytokines induce liver and activation-regulated chemokine/macrophage inflammatory protein-3 $\alpha$ /CCL20 in mucosal epithelial cells through NF-kappaB. *Int Immunol* 2001; 13: 1255-1263

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

Gemmell E, Carter CL, Seymour GJ. Mast cells in periodontal disease. *J Dent Res* 2004; 83: 384-387

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

Gillard M, Van der Perren C, Massingham R, Chatelain P. Binding characteristics of cetirizine and levocetirizine to human H(1) histamine receptors: contribution of Lys(191) and Thr(194). *Mol Pharmacol* 2002; 61: 391-399

Gillard M, Benedetti MS, Chatelain P, Baltes E. Histamine H1 receptor occupancy and pharmacodynamics of second generation H<sub>1</sub>-antihistamines. *Inflamm Res* 2005; 54: 367-369

Haas HL, Sergeeva OA, Selbach O. Histamine in the Nervous System. *Physiol Res* 2008; 88: 1183-1241

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

Hasturk H, Kantarci A, Ebrahimi N, Andry C, Holick M, Jones VL, Van Dyke TE. Topical H2 antagonist prevents periodontitis in a rabbit model. *Infect Immunol* 2006; 74: 2402-2414

Hieshima K, Imai T, Opdenakker G, Van Damme J, Kusuda J, Tei H, Sakaki Y, Takatsuki K, Miura R, Yoshie O, Nomiyama H. Molecular cloning of a novel human CC chemokine liver and activation-regulated chemokine (LARC) expressed in liver. Chemotactic activity for lymphocytes and gene localization on chromosome 2. *J Biol Chem* 1997; 272: 5846-5853

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

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

Hornung V, Rothenfusser S, Britsch S, Krug A, Jahrsdörfer B, Giese T, Endres S, Hartmann G. Quantitative expression of toll-like receptor 1-10 mRNA in cellular subsets of human peripheral blood mononuclear cells and sensitivity to CpG oligodeoxynucleotides. *J Immunol* 2002; 168: 4531-4537

Hromas R, Gray PW, Chantry D, Godiska R, Krathwohl M, Fife K, Bell GI, Takeda J, Aronica S, Gordon M, Cooper S, Broxmeyer HE, Klemsz MJ. Cloning and characterization of exodus, a novel  $\beta$ -chemokine. *Blood* 1997; 89: 3315-3322

Iwasaki A, Medzhitov R. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nat Immunol* 2004; 5: 987-995

Izadpanah A, Dwinell MB, Eckmann L, Varki NM, Kagnoff MF. Regulated MIP-3 $\alpha$ /CCL20 production by human intestinal epithelium: mechanism for modulating mucosal immunity. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001; 280: 710-719

Janeway CA Jr, Medzhitov R. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* 2002; 20: 197-216

Kayser F, Böttger E, Zinkernagel R. Taschenlehrbuch Medizinische Mikrobiologie: Immunologie, Hygiene, Infektiologie, Bakteriologie, Mykologie, Virologie, Parasitologie. Stuttgart: Thieme Verlag, 2010

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

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

Koolman J, Rohm KL. Taschenatlas der Biochemie. Stuttgart- New York: Thieme, 2002: 392- 393

Kremer HA, Loos BG, van der Welden U, Winkelhoff A, Craandijk H, Bulthuis H, Hutter J, Varoufaki A, van Steenberg M. Peptostreptococcus micros smooth and rough genotypes in periodontitis and gingivitis. *J Periodontol* 2000; 71: 209-217

Lekic PC, Pender N, McCulloch CA. Is fibroblast heterogeneity relevant to the health, diseases and treatment of periodontal tissues? *Crit Rev Oral Biol Med* 1997; 8: 253-268

Lequin RM. Enzyme immunoassay (EIA)/enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Clin Chem* 2005; 12: 2415-2418

Leurs R, Church MK, Tagliabatella M. H1-antihistamines: inverse agonism, anti-inflammatory actions and cardiac effects. *Clin Exp Allergy* 2002; 32: 489-498

Leurs R, Bakker R, Timmermann H, de Esch IH, The Histamine H3 Receptor: From Gene Cloning to H3 Receptor Drugs. *Nat Rev Drug Discov* 2005; 4: 107-120

Levin LG, Rudd A, Bletsa A, Reisner H. Expression of IL-8 by cells of the odontoblast layer in vitro. *Eur J Oral Sci* 1999; 107: 131-137

Liu C, Ma XJ, Jiang X, Wilson WJ, Hofstra CL, Blevitt J, Pyati J, Li X, Chai W, Carruthers N, Lovenberg TW. Cloning and Pharmacological Characterization of a Fourth Histamine Receptor (H4) Expressed in Bone Marrow, *Mol Pharmacol* 2001; 59: 420-426

Mahanonda R, Pichyangkul S. Toll-like receptors and their role in periodontal health and disease. *Periodontol* 2000 2007; 43: 41-55

Marsh PD, Devine DA. How is the development of dental biofilms influenced by the host? *J Clin Periodontol* 2011; 38: 28-35

Martin S, Zafiropoulos GG, Zick R, Kolb GF. Parodontitis bei Diabetes mellitus: Eine bislang unterschätzte lokale Komplikation mit systemischer Bedeutung. *Diabet Stoffwechsel* 2001; 10: 23-28

Medzhitov R, Janeway CA Jr. Innate immunity: impact on the adaptive immune response. *Curr Opin Immunol* 1997; 9: 4-9

Medzhitov R, Janeway C Jr. The Toll receptor family and microbial recognition. *Trends Microbiol* 2000; 8: 452-456

Messina JP, Gilkeson GS, Pisetsky DS. Stimulation of in vitro murine lymphocyte proliferation by bacterial DNA. *J Immunol* 1991; 147: 1759-1764

Miller AM, McInnes IB. Cytokines as Therapeutic Targets to Reduce Cardiovascular Risk in Chronic Inflammation. *Curr Pharm Des* 2011; 11: 16-19

Minami T, Kuroishi T, Ozawa A, Shimauchi H, Endo Y, Sugawara S. Histamine amplifies Immune response of Gingival Fibroblasts. *J Dent Res* 2007; 86: 1083-1088

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

Mutschler E, Geisslinger G, Kroemer HK, Schäfer-Korting M, Mutschler Arzneimittelwirkungen. Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie. Stuttgart; Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, 2001

Nieminen MS, Matilla KJ, Valtonen VV, Huttunen JK. Dental infection and the risk of new coronary events. *Clin Infect Dis* 1995; 20: 588-592

Oethringer M. Mikrobiologie und Immunologie. Gustav Fischer Verlag. Stuttgart-Jena-Lübeck-Ulm: Gustav Fischer Verlag, 1997

Ogawa H, Yoshihara A, Hirotsu T, Ando Y, Miyazaki H. Risk factors for periodontal disease progression in among elderly people. *J Clin Periodontol* 2002; 7: 592

Ozinsky A, Underhill DM, Fontenot JD, Hajjar AM, Smith KD, Wilson CB, Schroeder L, Aderem A. The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between toll-like-receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 13766-13771

Page RC, Schroeder HE. Pathogenesis of inflammatory periodontal disease. A summary of current work. *Lab Inv* 1976; 34: 235-249

Parsons M, Ganellin C. Histamine and its receptors. *Br J Pharmacol* 2006; 1: 127-135

Patel T, Park SH, Lin LM, Chiappelli F, Huang GT. Substance P induces interleukin-8 secretion from human dental pulp cells. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2003; 96: 478-485

Perez-Canadillas JM, Zaballos A, Gutierrez J, Varona R, Roncal F, Albar JP, Marquez G, Bruix M. NMR solution structure of murine CCL20/MIP-3alpha, a chemokine that specifically chemoattracts immature dendritic cells and lymphocytes through its highly specific interaction with the beta-chemokine receptor CCR6. *J Biol Chem* 2001; 276: 28372-28379

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

Quirynen M, Van Assche N. Microbial changes after full-mouth tooth extraction, followed by 2-stage implant placement. *J Clin Periodontol* 2011; 38: 581-589

Rivest S, Lacroix S, Vallières L, Nadeau S, Zhang J, Laflamme N. How the blood talks to the brain parenchyma and the paraventricular nucleus of the hypothalamus during systemic inflammatory and infectious stimuli. *Proc Soc Exp Biol Med* 2000; 221: 22-38

Rizzo A, Paolillo R, Buommino E, Lanza AG, Guida L, Annunziata M, Carratelli CR. Modulation of cytokine and beta-defensin 2 expressions in human gingival fibroblasts infected with *Chlamydia pneumoniae*. *Int Immunopharmacol* 2008; 8: 1239-1247

Roitt IM. The role of autoantigens in the driving of autoimmune diseases. *Immunol Res* 1993; 59: 119-129

Romagnani P, Annunziato F, Piccinni MP, Maggi E, Romagnani S. Cytokines and chemokines in T lymphopoiesis and T-cell effector function. *Immunol Today* 2000; 21: 416-418

Rossi DL, Vicari AP, Franz-Bacon K, McClanahan TK, Zlotnik A. Identification through bioinformatics of two new macrophage proinflammatory human chemokines: MIP-3alpha and MIP-3beta. *J Immunol* 1997; 158: 1033–1036

Sanz M, van Winkelhoff AJ. Working Group 1 of seventh European Workshop on Periodontology. Periodontal infections: understanding the complexity--consensus of the Seventh European Workshop on Periodontology. *J Clin Periodontol* 2011; 38: 3-6

Scheerens H, Hessel E, de Waal-Malefyt R, Leach MW, Rennick D. Characterization of chemokines and chemokine receptors in two murine models of inflammatory bowel disease: IL-10<sup>-/-</sup> mice and Rag-2<sup>-/-</sup> mice reconstituted with CD4<sup>+</sup>CD45RB<sup>high</sup> T cells. *Eur J Immunol* 2001; 31: 1465-1474

Schooltink H, Rose-John S. Zytokinnetzwerk. Berlin-Heidelberg: Springer Verlag, 2003; 188-196

Schröder JM, Christophers E. The biology of NAP-1/IL-8, a neutrophil-activating cytokine. *Immunol Res* 1992; 57: 387-416

Schutyser E, Struyf S, Menten P, Lenaerts JP, Conings R, Put W, Wuyts A, Proost P, Van Damme J. Regulated production and molecular diversity of human liver and activation-regulated chemokine/macrophage inflammatory protein-3 alpha from normal and transformed cells. *J Immunol* 2000; 165: 4470–4477

Schutyser E, Struyf S, Van Damme J. The CC chemokine CCL20 and its receptor CCR6. *Cytokine Growth Factor Rev* 2003; 14: 409-426

Sculean A, Jepsen S. Diabetes mellitus als Risikofaktor für Parodontitis aus Risikokompendium Parodontitis, Deutsche Gesellschaft für Parodontologie e.V., KZVH. Berlin: Quintessenz Verlags GmbH 2002: 7-16

Sheng M, Thompson MA, Greenberg ME, CREB: a Ca<sup>2+</sup> Regulated Transcription Factor Phosphorylated by Calmodulin-Dependent Kinases. *Science* 1991; 252: 1427-1430

Simon A, Labalette P, Ordinaire I, Fréalle E, Dei-Cas E, Camus D, Delhaes L. Use of fluorescence resonance energy transfer hybridization probes to evaluate quantitative real-time PCR for diagnosis of ocular toxoplasmosis. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 3681-3685

Steinsvoll S, Helgeland K, Schenck K. Mast cells- a role in peridontal Disease? *J Clin Periodontol* 2004; 31: 413-419

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

Sugawara S, Sugiyama A, Nemoto E, Rikiishi H, Takada H. Heterogeneous expression and release of CD14 by human gingival fibroblasts: characterization and CD14-mediated interleukin-8 secretion in response to lipopolysaccharide. *Infect Immun* 1998; 66: 3043-3049

Takeda K, Kaisho T, Akira S. Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol* 2003; 21: 335-376

Tamai R, Sakuta T, Matsushita K, Torii M, Takeuchi O, Akira S, Akashi S, Espevik T, Sugawara S, Takada H. Human gingival CD14(+) fibroblasts primed with gamma interferon increase production of interleukin-8 in response to lipopolysaccharide through up-regulation of membrane CD14 and MyD88 mRNA expression. *Infect Immun* 2002; 70: 1272-1278

Thaweboon B, Thaweboon S, Choonharuangdej S, Suppakpatana P. Effects of sonicated *Prevotella intermedia*, *Fusobacterium nucleatum* and *Lactobacillus casei* extracts on interleukin-8 production by human dental pulp cells. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2006; 37: 523-527

Teng YT. The role of acquired immunity in periodontal disease progression. *Crit Rev Oral Biol Med* 2003; 14: 237-252

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

Theoharides TC, Alysandratos KD, Angelidou A, Delivanis DA, Sismanopoulos N, Zhang B, Asadi S, Vasiadi M, Weng Z, Miniati A, Kalogeromitros D. Mast cells and inflammation. *Biochim Biophys Acta* 2010; 10: 45-59

Tokuda M, Miyamoto R, Sakuta T, Nagaoka S, Torii M. Substance P activates p38 mitogen-activated protein kinase to promote IL-6 induction in human dental pulp fibroblasts. *Conn Tissue Res* 2002; 46: 153-158

Uehara A, Takada H. Oral bacteria and periodontitis, with special reference to innate immune system in oral mucosa. *Clin Calcium* 2007; 17: 173-178

Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by genomic averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* 2002; 3: 7-8

Van Furth R. Mononuclear phagocytes. *Biology of monocytes and macrophages*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1992; 12: 351-357

Verres G, Gibbes RA, Scherer SE, Caskey CT. The molecular basis of the sparse for mouse mutation. *Science* 1987; 237: 415-417

Wilson M, Reddi K, Henderson B. Cytokine-inducing components of periodontopathogenic bacteria. *J Periodontal Res* 1996; 31: 393-407

Wolf HF, Rateitschak HF. *Parodontologie*. Zürich: Thieme Verlag, 2004

Wu X, Yoshida A, Sasano T, Iwakura Y, Endo Y. Histamin production via mast cell-independent induction of histidine decarboxylase in response to lipopolysaccharide and interleukin-1. *Int Immunopharmacol* 2004; 4: 513-520

Xie K. Interleukin-8 and human cancer biology. *Cytokine Growth Factor Rev* 2001; 12: 375-391

Zampeli E, Tiligada E. The Role of Histamine H4-Receptor in Immune and Inflammatory Disorders, *Br J Pharmacol* 2009; 157: 24-33

Zhang S, Li J, Jia X, Wu Y. The expression of toll-like receptor 2 and 4 mRNA in local tissues of model of oropharyngeal candidiasis in mice. *J Huazhong Univ Sci Technol Med Sci* 2004; 24: 639-641

Zhang M, Thurmond RL, Dunford PJ. The Histamine H4 Receptor: A Novel Modulator of Inflammatory and Immune Disorders. *Pharmacol Ther* 2007; 113: 594-606

Zimmermann K, Eiter T, Scheiflinger F. Consecutive analysis of bacterial PCR samples on a single electronic microarray. *J Microbiol Methods* 2003; 55: 471-477

## 7. Danksagung

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

Herrn Prof. Dr. Dr. Søren Jepsen, M.S., Direktor der Poliklinik für Parodontologie, Zahnerhaltung und Präventive Zahnheilkunde des Zentrums für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, gilt mein Dank für die Bereitstellung der finanziellen Mittel und Laboreinrichtungen.

Frau Jutta Eich und Frau Diana Lalaoui, Mitarbeiterinnen des molekular- und zellbiologischen Labors der Poliklinik für Parodontologie, Zahnerhaltung und Präventive Zahnheilkunde des Zentrums für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn gilt mein großer Dank für die tatkräftige Unterstützung bei der Durchführung der zell- und molekularbiologischen Experimente.

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