

Aus der Abteilung für Zahnerhaltungskunde und Parodontologie
des CharitéCentrums 3 für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde
der Medizinischen Fakultät Charité - Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Expression humaner beta-Defensine und
proinflammatorischer Zytokine im gesunden
und entzündeten Pulpagewebe**

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae dentarie (Dr. med. dent.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité - Universitätsmedizin Berlin

von

Michael Wolgin

aus Samara/Russland

Gutachter: 1. Prof. Dr. A. M. Kielbassa
2. Prof. Dr. med. A. R. Pries
3. Prof. Dr. G. Schmalz

Datum der Promotion: 18.09.2009

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
2 Literaturübersicht	2
2.1 Anatomie und Physiologie der menschlichen Zahnpulpa	2
2.2 Pulpitis	4
2.3 Pathogenese der Pulpitis	4
2.4 Pathophysiologie der Pulpitis.....	5
2.4.1 Formen der Pulpitis.....	5
2.4.2 Diagnostik der Pulpitis	6
2.5 Molekularbiologie der Pulpitis	7
2.6 Defensine	9
2.6.1 Struktur und Wirkungsweise der Defensine	10
2.6.2 Klassifikation der Defensine	14
2.7 Humane beta-Defensine	14
2.7.1 Humane beta-Defensine in der Mundhöhle	15
2.7.2 Bedeutung humaner beta-Defensine bei Erkrankungen der Mundhöhle	17
3 Fragestellung und Ziele der Arbeit	20
4 Material und Methoden	21
4.1 Übersicht	21
4.2 Probengewinnung.....	21
4.3 RNA-Extraktion aus den Gewebeproben.....	22
4.4 Reverse-Transkriptase – Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)	24
4.4.1 Reverse Transkription (cDNA-Synthese).....	24
4.4.2 Real-Time PCR	25
4.5 Gewinnung der Positivkontrollen und Standardkurven	26
4.6 Quantitative Bestimmung der Expression.....	28
4.6.1 Quantitative Bestimmung des Housekeeping-Gens	29

4.6.2 Quantitative Bestimmung der Expression von Entzündungsmarkern und Defensinen	30
4.7 Auswertung der PCR	31
4.8 Gelelektrophorese	31
4.9 Statistische Auswertung der Ergebnisse	31
5 Ergebnisse	32
5.1 Quantitativer Nachweis von proinflammatorischen Zytokinen	32
5.3 Quantitativer Nachweis von beta-Defensinen	35
6 Diskussion	38
6.1 Diskussion der Methode	38
6.2 Diskussion der Ergebnisse	39
6.3 Ausblick	42
7 Schlussfolgerungen	45
8 Zusammenfassung	46
9 Abstract	47
10 Literaturverzeichnis	48
11 Anhang	59
11.1 Geräte- und Materialienliste	59
11.2 Abkürzungsverzeichnis	61
11.3 Danksagung	63
11.4 Eidesstattliche Erklärung	64

Summary

Statement of problem: Human beta-defensins (hBDs) are antimicrobial peptides that play an important role in the innate host defense against bacterial invasion, contribute to promotion of adaptive immune responses and show chemotactic activities. Until now, the role of hBDs in the human dental pulp has not been adequately investigated.

Objectives: The aim of this study was to determine the expression of hBD-1, -2, -3, -4 and proinflammatory cytokines TNF- α , COX-2, IL-1 β and -6 in healthy and inflamed human dental pulps. In the present study cytokines were used as molecular diagnostic markers for pulpal inflammation.

Materials and methods: Samples of healthy and inflamed dental pulps were obtained from extracted third molars and during treatment of pulpitic teeth. Pulp tissue specimens were immediately frozen in liquid nitrogen with addition of RNA stabilization reagent and stored at -80 °C. Total RNA was extracted from homogenized pulp tissue using the TRIzol method. Gene expression was assessed using Reverse Transcriptase Reaction and Real-Time-PCR. Differences in gene expression between healthy and inflamed pulps were compared using Mann-Whitney-U test.

Results: The expression of human beta-defensins and cytokines was observed in human dental pulps. HBD-2 and -3 were only weakly expressed in healthy and inflamed pulps. In contrast, the expression of hBD-1 and -4 was significantly increased in inflamed compared to healthy pulps. The expression of TNF- α , COX-2, IL-1 β (but not IL-6) was also significantly increased during inflammation.

Conclusions: These results suggest that beta-defensins obviously play a role in the innate pulpal host defence.

Keywords: beta-Defensines, cytokines, inflammation, pulpitis, PCR

1 Einleitung

Das Fortschreiten einer tiefen Karies ruft seitens des Pulpa-Dentin-Komplexes eine Abwehrreaktion hervor. Physikalische, chemische und biologische Reize (wie Bakterien und deren Stoffwechselprodukte) werden durch entzündliche Reaktionen der Pulpa und durch Bildung von Tertiärdentin erwidert und kompensiert [Beer *et al.* 2004; Smith 2002]. Dabei scheint die angeborene lokale Immunantwort eine wesentliche Rolle zu spielen [Dale 2002; Dommisch *et al.* 2005; Dommisch *et al.* 2007]. Einen wichtigen und in der jüngeren Vergangenheit häufig untersuchten Teil des angeborenen Immunsystems stellen die antimikrobiellen Peptide (APs) dar [Dale 2002; Schroder 1999].

Von großem Interesse ist eine Familie der APs – die humanen beta-Defensine (hBDs). Diese Peptide werden aufgrund ihrer starken antimikrobiellen Wirkung als natürliche oder körpereigene Antibiotika bezeichnet [Dale & Krisanaprakornkit 2001; Schroder 1999]. hBDs besitzen neben der direkten Wirkung auf Mikroorganismen zusätzlich auch zytokin-ähnliche Eigenschaften und verbinden somit lokale angeborene und spezifische Immunantwort miteinander [Boman 1995; Marshall 2004; van Wetering *et al.* 1999; Yang *et al.* 2007]. Der Hauptexpressionsort der beta-Defensine sind Epithelien. Allerdings wurden hBDs auch in der menschlichen Zahnpulpa nachgewiesen [Dommisch *et al.* 2005]. Frühere Untersuchungen zeigten erhöhte Expressionen von humanen beta-Defensinen in den Zellen unterschiedlich stark entzündeter gegenüber gesunden Geweben [Schneider *et al.* 2005]. Die genaue Rolle dieser Peptide in der Zahnpulpa ist jedoch bisher weitgehend ungeklärt.

In dieser Arbeit wurden daher die Expressionsmuster humaner beta-Defensine hBD-1, -2, -3 und des erst kürzlich beschriebenen hBD-4, sowie der proinflammatorischen Zytokine COX-2, IL-1 β , IL-6 und TNF- α im gesunden und entzündeten Pulpagewebe untersucht.

2 Literaturübersicht

2.1 Anatomie und Physiologie der menschlichen Zahnpulpa

Das Pulpaorgan befindet sich innerhalb des Zahnes in der Pulpakammer. Die Kronenpulpa sieht makroskopisch der Form der Zahnkrone ähnlich, die Wurzelpulpa ist dagegen länglich und füllt das Volumen der Wurzelkanäle aus [Meyer & Scheele 1954; Schumacher 1990]. Die zentrale Region der Pulpa enthält Nervenfasern und Blutgefäße, die über das Foramen apicale mit Nerven und Gefäßen des Parodonts und des Alveolarknochens in Verbindung stehen [Hellwig *et al.* 1999; Schumacher 1990; Tillmann 1997]. Um die zentrale Region herum befindet sich das eigentliche Pulpagewebe, welches in drei Zonen unterteilt wird (Abbildung 1): die zellreiche, die zellfreie (oder Weilsche) Zone und die Odontoblastenschicht [Baume 1980; Chiego 1994; Junqueira & Carneiro 1996].

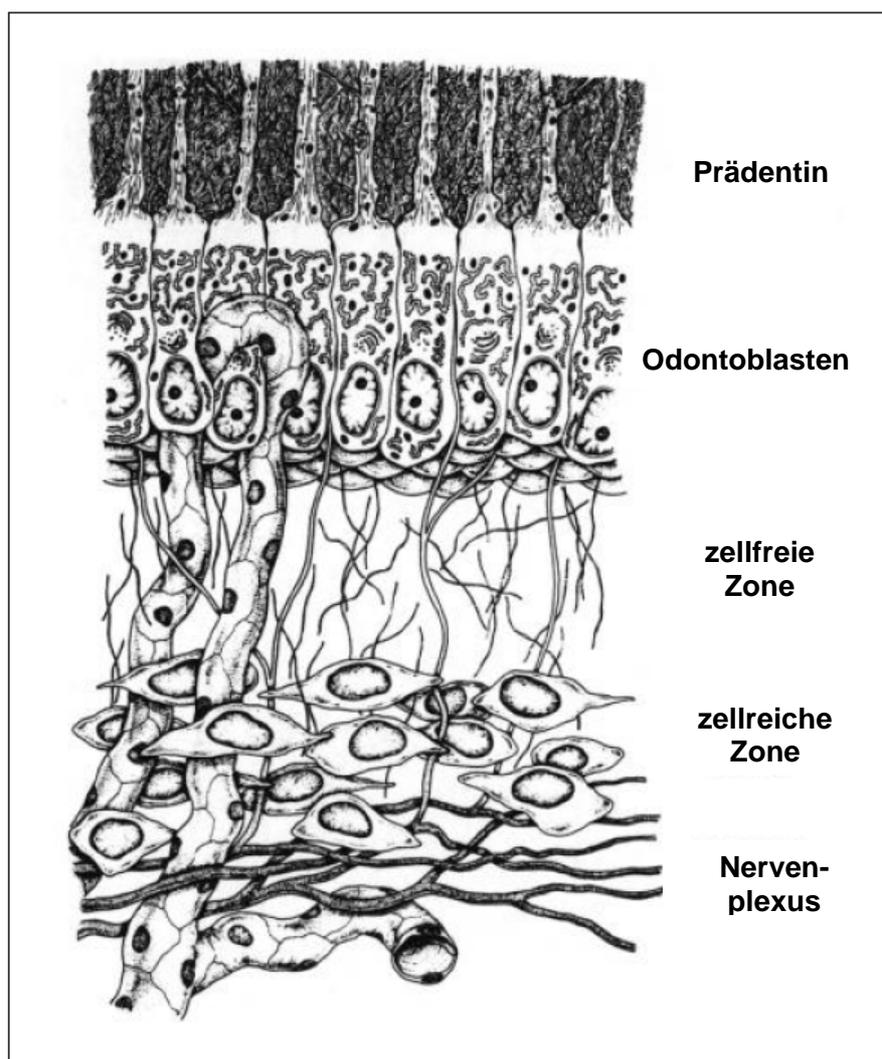


Abb. 1 Die Zonen der Pulpa (Chiego 1994)

Die zellreiche Zone enthält überwiegend Fibroblasten und nicht differenzierte Mesenchymzellen [Chiego 1994; Junqueira & Carneiro 1996], die in der Lage sind, zu den Odontoblasten-ähnlichen Zellen zu differenzieren [Shiba *et al.* 2003]. In der Weilschen Zone befinden sich Kapillaren und Nervenfasern, die eine netzartige Struktur (Rashkow Plexus) bilden [Chiego 1994; Junqueira & Carneiro 1996]. In der äußersten Schicht der Pulpa befinden sich Odontoblasten, welche mit ihren langen Vortsätzen weit in die Dentinkanälchen reichen [Chiego 1994; Junqueira & Carneiro 1996; Piesco 1994; Torneck 1985]. Aus diesem Grund wird das Gebilde aus Pulpa und Dentin nicht physiologisch getrennt behandelt, sondern als Pulpa-Dentin-Komplex bezeichnet [Piesco 1994; Smith 2002; Torneck 1985] (Abbildung 2). Darüber hinaus befinden sich im Pulpagewebe Abwehrzellen, darunter Histozyten, Makrophagen, Granulozyten, Mast- und Plasmazellen [Chiego 1994; Junqueira & Carneiro 1996].

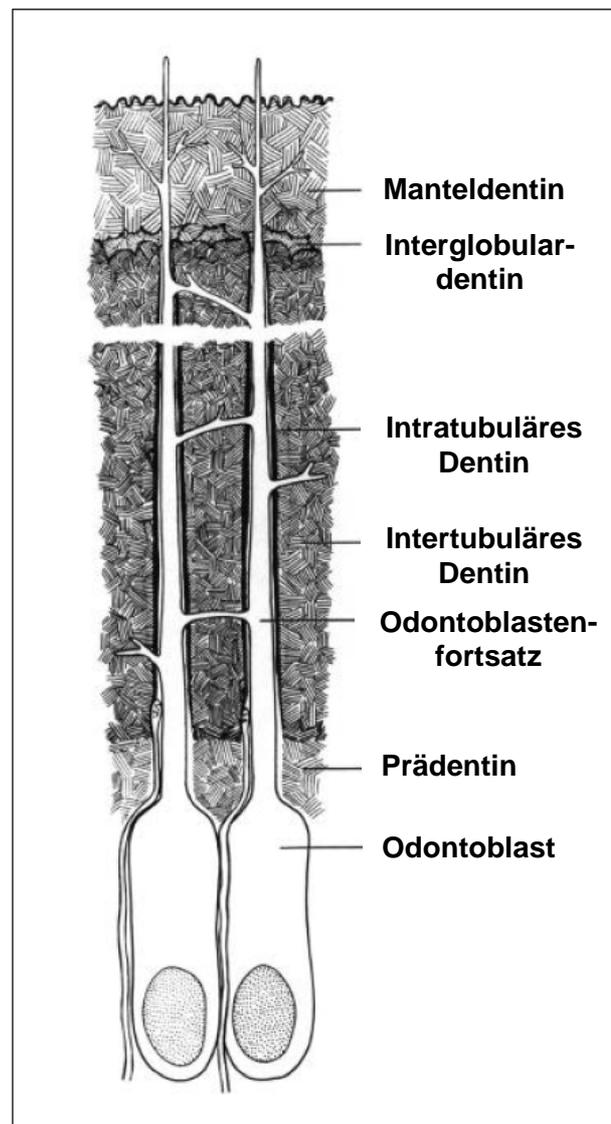


Abb.2 Pulpa-Dentin Komplex (Piesco 1994)

Die wichtigsten physiologischen Funktionen der Pulpa sind die Ernährungsfunktion, sowie sensitive und protektive Funktionen [Hellwig *et al.* 1999; Smith 2002]. Diese Funktionen hängen eng miteinander zusammen und fördern reparative Vorgänge in der Pulpa [Hellwig *et al.* 1999; Smith 2002]. Disfunktionen des Pulpagewebes unterschiedlicher Genese können zu irreversiblen Veränderungen der Pulpa und zur Pulpanekrose führen [Hellwig *et al.* 1999; Smith 2002]. Die häufigste Erkrankung der Pulpa stellt die Entzündung des Pulpagewebes (Pulpitis) dar, welche meist durch das Fortschreiten der Karies verursacht wird [Hellwig *et al.* 1999; Smith 2002].

2.2 Pulpitis

Die Vorgänge, die während einer Pulpitis ablaufen, sind den entzündlichen Vorgängen in jedem anderen Bindegewebe des Körpers ähnlich [Smith 2002]. Grundsätzlich ist die Entzündung eine Abwehrreaktion des Organismus, welche eine protektive Wirkung auf die nicht betroffenen Organe hat. Dies soll das Fortschreiten der Infektion unterbinden [Gulbins & Lang 2007; Jelkmann 2007]. Die anatomischen Gegebenheiten der Pulpa können dieses Geschehen jedoch negativ beeinflussen. Die von der Zahnhartsubstanz umgebene, enge Pulpakammer stellt dabei Grenzen zur Ausbreitung des entzündlichen Ödems dar [Klimm 2003], so dass frühere Theorien die sogenannte Selbststrangulation für das Absterben der Pulpa verantwortlich machten. Nach neuen Erkenntnissen scheint jedoch weniger die Strangulation der Pulpa, als vielmehr ein hämorrhagischer Infarkt für eine spätere Nekrose der Pulpa verantwortlich zu sein [Schäfer 2005].

2.3 Pathogenese der Pulpitis

Der wichtigste ätiologische Faktor einer Pulpitis ist die Invasion von Bakterien oder deren Stoffwechselprodukte in die Pulpakammer [Beer *et al.* 2004; Klimm 2003]. Die Bakterien können durch unterschiedliche Wege in die Pulpa gelangen. Am häufigsten stellen kariöse Läsionen oder Kronen- und Wurzelfrakturen Eintrittspforten für Bakterien dar [Klimm 2003]. Die Bakterien können durch direkte Zell- und Gewebsschädigung und/oder durch Toxinfreisetzung eine Gewebereaktion auslösen [Hahn *et al.* 2005]. Die Adhäsion von Bakterien kann durch die Interaktion bakterieller Proteine mit Oberflächenmolekülen (Glykoproteine oder Glykolipide) der Gewebezellen zustande kommen [Hahn *et al.* 2005]. Weitere pathogene Zellwandbestandteile von Bakterien sind Endotoxine, wobei einzelne Zellwand-Strukturen einerseits hochpotente Antigene darstellen und andererseits direkt das Komplementsystem über den alternativen Weg

aktivieren können [Herbst & Hubner 2001]. Eine Pulpitis kann auch durch iatrogene Reize, wie der Überhitzung des Pulpagewebes durch das Beschleifen der Zahnhartsubstanz verursacht werden [Strub 2004]. Erhöhte Temperaturen bewirken dabei eine Denaturierung von Proteinen und die Aufhebung der Membranintegrität [Herbst & Hubner 2001; Strub 2004]. Direkte Traumata der Zähne bewirken neben einem erhöhten Infektionsrisiko die unmittelbare Zerstörung der Zellen, ganzer Gewebeschichten oder der Blutgefäße [Herbst & Hubner 2001]. Diese physikalischen, chemischen oder biologischen Noxen lösen eine lokale Immunantwort des Pulpagewebes aus [Herbst & Hubner 2001].

2.4 Pathophysiologie der Pulpitis

Wie bei jeder anderen Entzündung auch findet zu Beginn einer Pulpitis eine lokale Kreislaufstörung statt [Hammer 1998]. Währenddessen kommt es zu einer Hyperämie der Pulpa. Die zuführende Gefäße sind erweitert und die Arterien sind prall mit Erythrozyten gefüllt. Die aktive Hyperämie geht anschließend schnell in eine passive über, die durch eine Drosselung der Gefäße im Bereich des Foramen apicale bedingt ist [Hammer 1998]. Dadurch kommt es zur Verlangsamung des Blutstroms. In dieser Phase findet die Marginilisation der Leukozyten in den Kapillaren statt [Herbst & Hubner 2001]. Des Weiteren findet der Austritt flüssiger Bestandteile aus den Blutgefäßen sowie eine aktive und passive Migration zelliger Bestandteile in die umliegende Gewebe statt [Jontell *et al.* 1998]. Zusätzlich kommt es zu einer Mobilisierung von Bindegewebszellen wie Histiozyten, die dem retikulo-endothelialen System angehören [Herbst & Hubner 2001]. Der Hyperämie folgt ein Austritt von serösem Exsudat in das Gewebe. Mit dem Austritt von Leukozyten beginnt die nächste Stufe der Entzündung, die eitrige Entzündung [Herbst & Hubner 2001]. Beide Entzündungstypen können sich zunächst auf einen Teil der Pulpa beschränken, das Endstadium der Entzündung stellt in der Regel die Nekrose dar [Hammer 1998].

2.4.1 Formen der Pulpitis

Klinische Formen der Pulpitis stimmen meistens mit den oben beschriebenen Stadien der Entzündung überein. Dementsprechend unterscheidet man zwischen akuten und chronischen Pulpitiden. Die akuten Pulpitisformen lassen sich wie folgt einteilen [Klimm 2003]:

- Pulpitis acuta serosa partialis
- Pulpitis acuta serosa radicularis
- Pulpitis acuta purulenta partialis
- Pulpitis acuta purulenta radicularis

Die chronische Pulpitiden lassen sich in folgende Formen einteilen [Klimm 2003]:

- Pulpitis chronica clausa
- Pulpitis chronica aperta ulcerosa
- Pulpitis chronica aperta granulomatosa (Pulpapolyyp)
- Pulpitis chronica clausa granulomatosa (internes Granulom)

Für die Behandlung der Pulpitis ist aus klinischer Sicht allerdings wichtiger, zwischen einer reversiblen und irreversiblen Form zu unterscheiden. Allerdings ist es oft schwierig, diese Differentialdiagnose anhand klinischer Symptome zu stellen [Kokkas *et al.* 2007; Pezelj-Ribaric *et al.* 2002].

2.4.2 Diagnostik der Pulpitis

Während der klinischen Untersuchung einer Pulpitis ergeben sich oft folgende Befunde [Klimm 2003]:

Zeichen der reversiblen Pulpitis:

- kurz anhaltende Schmerzen auf kalt und warm
- Schmerzen lassen nach, sobald der Reiz unterbrochen wird.

Zeichen der irreversiblen Pulpitis:

- spontan auftretende Schmerzen (Pulpitis serosa und purulenta)
- anhaltende Schmerzen auf kalt und warm (Pulpitis serosa)
- der betroffene Zahn ist von Patienten häufig nicht eindeutig lokalisierbar (Pulpitis serosa)
- Schmerzen verstärken sich Nachts (Pulpitis purulenta)
- lang anhaltende Schmerzen durch Wärmereiz (Pulpitis purulenta)
- Kälte lindert den Schmerz (Pulpitis purulenta)
- wenn die Entzündung auf das periapikale Gewebe übergreift, wird der Zahn berührungsempfindlich und vom Patienten als "zu hoch" empfunden (Pulpitis purulenta)

Zur Problematik einer klinischen Untersuchung gehören u. a. die Subjektivität der Empfindungen seitens des Patienten und die Subjektivität der Befunde seitens des Behandlers, weshalb eine eindeutige Differentialdiagnose der reversiblen und irreversiblen Pulpitis oft nur mit Hilfe von labordiagnostischen Methoden, wie z. B. immunhistologischer Färbung oder molekularbiologischer Untersuchungen möglich ist [Kokkas *et al.* 2007; Pezelj-Ribaric *et al.* 2002]. Die Unterscheidung dieser Pulpitisformen ist jedoch aus klinischer Sicht wichtig, da theoretisch bei einer reversiblen Pulpitis, im Gegensatz zur irreversiblen Form, eine konservative Therapie mit dem Ziel Erhaltung der Pulpavitalität möglich ist.

2.5 Molekularbiologie der Pulpitis

Das Pulpagewebe ist, wie jedes andere Bindegewebe des Organismus auch, in der Lage, unterschiedliche inflammatorischen Mediatoren zu exprimieren [Kokkas *et al.* 2007; Pezelj-Ribaric *et al.* 2002; Veerayutthwilai *et al.* 2007]. Die hauptsächliche Funktion dieser Mediatoren ist die Beseitigung der gewebeirritierenden Faktoren und die Minimierung ihrer schädigenden Effekte [Pries & Zakrzewicz 2005]. Viele inflammatorische Mediatoren spielen eine große Rolle bei der Regulation des entzündlichen Prozesses. Histamin und Serotonin regulieren beispielsweise Vasodilatation und Gefäßpermeabilität, Cyclooxygenase reguliert die Prostaglandinsynthese. Zahlreiche Zytokine wirken selbst bakterizid oder verbinden angeborene und spezifische Abwehr miteinander [Pries & Zakrzewicz 2005]. Zytokine sind meist kleine Proteine, die von Zellen freigesetzt werden, um eine auto- oder parakrine Wirkung auf das Gewebe zu erzielen [Pries & Zakrzewicz 2005]. In der Pulpa werden die Zytokine nicht nur durch inflammatorische Zellen, wie Makrophagen oder Lymphozyten, sondern auch durch Fibroblasten, Endothelzellen und Odontoblasten exprimiert [Kokkas *et al.* 2007; Pezelj-Ribaric *et al.* 2002; Veerayutthwilai *et al.* 2007]. Nach ihren Hauptfunktionen lassen sich Zytokine unterteilen in [Pries & Zakrzewicz 2005]:

- Entzündungsfördernde: IL-1, -6, -8, -17, TNF- α
- Entzündungshemmende: IL-10, -11, -13, TGF- β
- Hämatopoese-fördernde: IL-3, -5, -7, -11, G-CSF, M-CSF, GM-CSF, SCF
- Immunregulatorische: IL-2, -4, -10, -12, -13, -15, -16, IFN- γ , TGF- β
- Antiinfektiöse: IFN- α , - β , IL-28, -29, TNF- α
- Antiproliferative: IFN- γ , TNF- α , TGF- β

Zur Expression der Zytokine wird die Zelle durch Aktivierung spezieller membrangebundener Rezeptoren angeregt, welche die Anwesenheit bestimmter bakterieller Virulenzfaktoren registrieren und das Signal in das Zellinnere weiterleiten [Pries & Zakrzewicz 2005]. Die eingeleitete Reaktionskaskade löst die Aktivierung bestimmter Genabschnitte aus, in denen das Kommando zur Synthese von Zytokinen kodiert ist. Es kommt zur so genannten Genexpression [Iwamura & Nakayama 2008]. Die Zytokine werden anschließend von der Zelle synthetisiert, sezerniert oder im endoplasmatischen Retikulum gespeichert. Die Zytokine entfalten ihre mediatorische Wirkung durch Aktivierung unterschiedlicher Rezeptoren an den Effektorzellen oder wirken direkt antimikrobiell [Pries & Zakrzewicz 2005]. Darüber hinaus können sich Zytokine gegenseitig in ihrer Wirkung beeinflussen [Lin *et al.* 2002; Lu *et al.* 2002].

Die Expression der Zytokine in der Zahnpulpa ist relativ gut erforscht [Hahn & Liewehr 2007a; Hahn & Liewehr 2007b; Hahn & Liewehr 2007c]. Unter anderem wurde *in-vitro* der Einfluss von bakteriellen LPS auf die Expression unterschiedlicher Zytokine in Pulpafibroblasten untersucht [Veerayutthilai *et al.* 2007]. Mit Hilfe von PCR oder Immunhistochemie wurden Expressionsmuster von IL-6, IL-1 β , IL-2, IL-8 und IL-18 [Coil *et al.* 2004; Hosoya & Matsushima 1997; Hosoya *et al.* 1996; Levin *et al.* 1999; Lu *et al.* 2002; Nagaoka *et al.* 1996; Yang *et al.* 2003] sowie TNF- α , COX-2 [Chang *et al.* 2003; Veerayutthilai *et al.* 2007] und andere Zytokine [Cohen *et al.* 1985; Piattelli *et al.* 2004] untersucht. Zahlreiche Studien untersuchten nicht nur die Qualität und Quantität des Transkripts von Zytokinen, sondern mit Hilfe von ELISA oder Western Blot auch die Endprodukte der Genexpression (Peptide) [Huang *et al.* 1999; Nakanishi *et al.* 2001; Rauschenberger *et al.* 1997]. Insgesamt wurde in allen oben genannten Studien eine Induktion der Genexpression von Zytokinen als Antwort auf die Stimulation der Zellkulturen mit bakteriellen Endotoxinen beobachtet.

Auch die Mechanismen des gegenseitigen Einflusses unterschiedlicher Zytokine in den Pulpazellen wurden untersucht. So konnte eine stimulierende Wirkung von IL-1 und TNF- α auf die Expression von IL-6 und COX-2 nachgewiesen werden [Lin *et al.* 2002; Yang *et al.* 2003]. Nicht nur Entzündungsmediatoren oder Endotoxine zeigen eine Auswirkung auf die Expression von IL-1 β , IL-6, IL-8 oder TNF- α in den Pulpazellen [Chang *et al.* 2003; Hosoya & Matsushima 1997; Hosoya *et al.* 1996; Nagaoka *et al.* 1996; Veerayutthilai *et al.* 2007; Yang *et al.* 2003]. Auch die Stimulation der Pulpafibroblasten mit Neuropeptiden, welche beispielsweise im Laufe einer

kieferorthopädischen Behandlung produziert werden, führte zum signifikanten Einstieg der Genexpression dieser Zytokine [Yamaguchi *et al.* 2004].

Darüber hinaus wurde das Pulpagewebe hinsichtlich der Expression der Zytokine im gesunden und entzündeten Zustand in mehreren Experimenten untersucht. Erhöhte Expression von IL-1, -2, -6, -8, -18 [D'Souza *et al.* 1989; Huang *et al.* 1999; Lin *et al.* 2002; McLachlan *et al.* 2004; Nakanishi *et al.* 1995; Rauschenberger *et al.* 1997; Zehnder *et al.* 2003] sowie TNF- α und COX-2 [Kokkas *et al.* 2007; Nakanishi *et al.* 2001; Pezelj-Ribaric *et al.* 2002] im Pulpagewebe symptomatischer Zähne konnten in mehreren Studien nachgewiesen werden. In der Literatur finden sich jedoch widersprüchliche Angaben über die Expression von IL-1 α , IL-1 β und TNF- α in gesunden und entzündeten Proben der Zahnpulpa. Während mehrere Autoren über ähnliche Expressionsmuster wie unter In-vitro-Bedingungen berichten, konnte in den anderen Studien gezeigt werden, dass IL-1 α , IL-1 β und in einigen Fällen auch TNF- α während einer Pulpitis nicht verstärkt exprimiert werden [Kokkas *et al.* 2007; Zehnder *et al.* 2003]. Dabei wurde die Bedeutung unterschiedlicher Entzündungsgrade des Pulpagewebes und der Entzündungsdauer diskutiert [Kokkas *et al.* 2007].

Eine systematische Betrachtung der Ergebnisse bereits durchgeführter Studien lässt darauf schließen, dass im Pulpagewebe während der Pulpitis eine erhöhte Genexpression der Zytokine vorliegt. Die meisten Zytokine sind somit sichere Entzündungsmarker.

2.6 Defensine

Die Problematik der Resistenzbildung von Bakterien gegen konventionelle Antibiotika ist augenblicklich ein häufig diskutiertes Thema in der zugänglichen Literatur. Obwohl in den letzten Jahrzehnten viele neue antimikrobielle Präparate, wie Cephalosporine der dritten und der vierten Generation, Imipenem, Fluorchinolone usw. entwickelt worden sind, scheint die Resistenzbildung der Bakterien ständig zu wachsen [Kern 1999]. Die Entdeckung von antimikrobiellen Peptiden, den so genannten „natürlichen“ Antibiotika, lässt eine Alternative zu konventionellen Präparaten möglich erscheinen. Zu den meisterforschten Gruppen der antibakteriellen Peptide gehören die Defensine. Die Erforschung der Defensine brachte neue und interessante Erkenntnisse über einige bisher unbekannte Aspekte der angeborenen Immunität ans Licht. Diese Forschungsergebnisse lassen eine bedeutende Rolle der Defensine in den Prozessen der lokalen Immunantwort des Organismus vermuten.

2.6.1 Struktur und Wirkungsweise der Defensine

Humane Defensine sind, ähnlich wie die meisten antimikrobiellen Peptide, kleine kationische Eiweiße mit einer niedrigen molekularen Masse von ca. 4-6 kDa. Defensine sind aus 33-47 Aminosäuren aufgebaut und besitzen drei intramolekulare Disulfidbrücken [Dale & Krisanaprakornkit 2001; Schneider *et al.* 2005; Schroder 1999]. Diese Peptide stellen einen phylogenetisch alten Abwehrmechanismus gegen einwandernde Infektion von Bakterien, Pilzen und Viren dar und sind ein Teil der angeborenen lokalen Immunantwort des Organismus [Boman 1995; Marshall 2004; Yang *et al.* 2007]. Das angeborene Immunsystem ist nicht nur für eine lokale Immunantwort essenziell, sondern besitzt auch mediatorische Funktionen und verbindet das unspezifische angeborene und das spezifische Immunsysteme miteinander [Boman 1995; Marshall 2004; Yang *et al.* 2007].

Die Wirkungsweise der Defensine ist noch nicht vollständig geklärt. Zurzeit wird davon ausgegangen, dass diesem Mechanismus die amphiphilen Eigenschaften und starke positive Ladung der Defensine zur Grunde liegen. Dank dieser Eigenschaften sind Defensine in der Lage, an die bakterielle Membran anzudocken und Poren in der Membran zu bilden [Lourenzoni *et al.* 2007; Morgera *et al.* 2008; Pazgier *et al.* 2007]. Die Annäherung der Defensine an die Bakterien erfolgt elektrostatisch. Die stark negativen Membranen der Bakterien interagieren mit den stark positiv geladenen Peptiden; dabei kommt es jedoch aus einem noch nicht ausreichend geklärten Grund zu keinen Interaktionen zwischen negativ geladenen Körperzellen und Defensinen [Boman 1995; Dale 2002; Dale & Krisanaprakornkit 2001; Selsted & Ouellette 2005]. Vermutlich spielt hier der hohe Cholesteringehalt der Körperzellen eine Rolle, wodurch die Aktivität der Defensine auf der Oberfläche der cholesterinhaltigen Zelle unterdrückt wird [Boman 1995; Dale 2002; Dale & Krisanaprakornkit 2001; Selsted & Ouellette 2005]. Die anschließende Porenbildung in den bakteriellen Membranen beruht wahrscheinlich auf amphiphilen Eigenschaften der Defensine, welche einen hydrophilen und einen hydrophoben Teil in ihrer Struktur besitzen. Dank diesen Eigenschaften sind Defensin-Moleküle in der Lage, hydrophobe lipidhaltige Schicht zu überwinden und sich somit in die bakterielle Membran zu integrieren [Dale 2002; Dale & Krisanaprakornkit 2001; Schneider *et al.* 2005]. Die meisten Mikroorganismen sind nicht in der Lage, den auf diese Weise entstehenden Flüssigkeits- und Mineralverlust zu kompensieren und gehen dadurch zur Grunde [Schneider *et al.* 2005; Schroder 1999] (Abbildung 3).

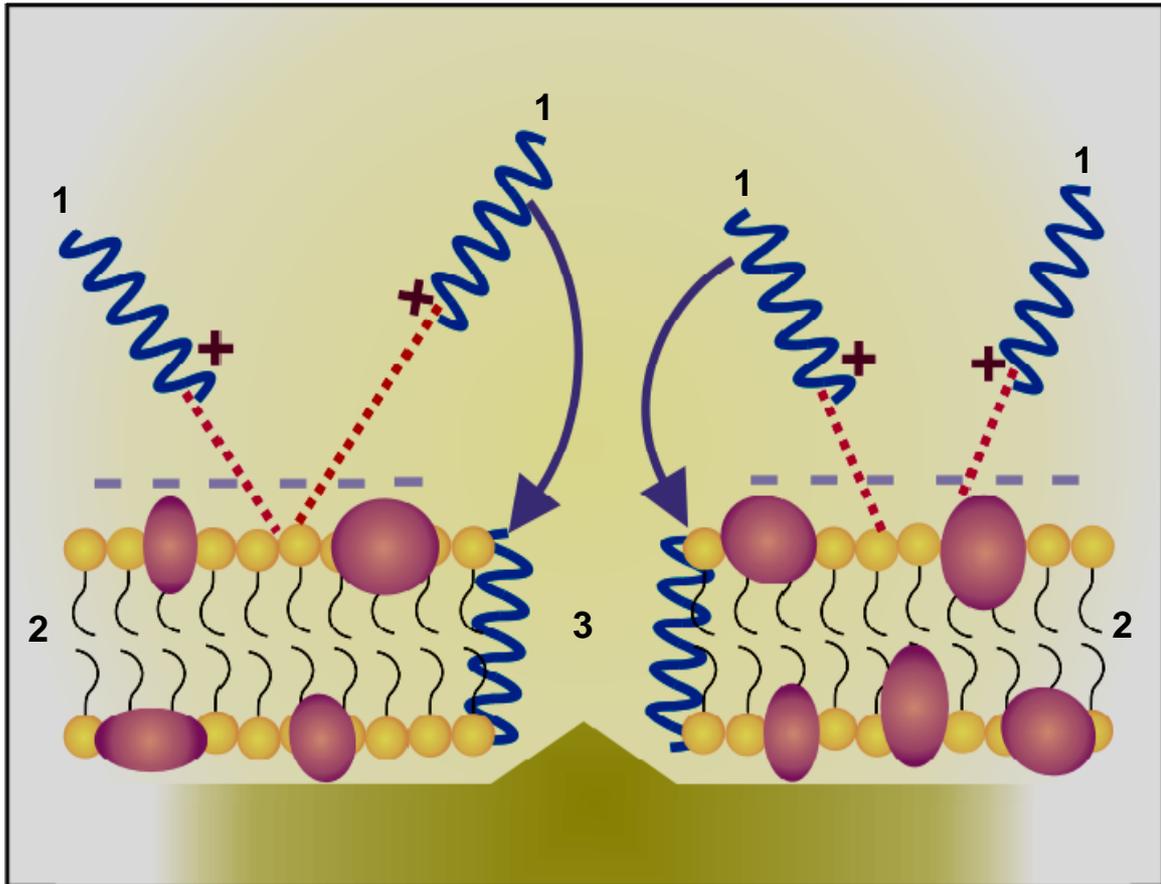


Abb. 3 Interaktion zwischen den positiv geladenen Defensinmolekülen (1) und der stark negativ geladenen bakteriellen Membran (2). Anschließende Integration der Defensin-Moleküle in die Lipiddoppelschicht und Porenbildung (3) (Modifiziert nach H. Chen)

Defensine werden von unterschiedlichen Körperzellen exprimiert, synthetisiert und in die direkte Umgebung ausgeschüttet. Manche Defensine (wie hBD-1) werden dabei konstitutiv exprimiert, das heißt, dass die Genexpression in jedem Zustand der Zelle immer konstant bleibt. Die anderen Defensine (wie hBD-2) können dagegen induziert werden [Feucht *et al.* 2003; Seo *et al.* 2001]. Der Induktionsmechanismus der Genexpression von Defensinen ist relativ gut in der zugänglichen Literatur beschrieben. Viele Mikroorganismen besitzen ähnliche Strukturen, die von den Körperzellen mit Hilfe spezieller Rezeptoren erkannt (diskriminiert) werden können. Hierbei handelt es sich meistens um bestimmte Membranbestandteile der Mikroorganismen, wie Lipopolysaccharide (LPS), Peptidoglykane oder Lipoteichonsäure, welche für die Rezeptoren der Körperzellen erkennbare „Motive“ bilden, die so genannten Pathogen Associated Molecular Patterns (PAMPs) [Reinhold *et al.* 2005]. Die PAMPs diskriminierenden Rezeptoren werden als patterns recognition receptors (PRR) bezeichnet [Pivarcsi *et al.* 2004]. Darunter befindet sich die Gruppe der Toll-like

Rezeptoren (TLRs) [Jiang *et al.* 2006; Mutoh *et al.* 2007], vor allem TLR-4, die am Anfang des Induktionsmechanismus der Genexpression von Defensinen steht. Das TLR-4 Rezeptor funktioniert zusammen mit CD-14 Rezeptor, welches PAMPs erkennt und das Signal über TLR-4 nach einem Second-messenger-Prinzip ins Zellinnere weiterleitet [O'Neill 2006]. Die nachfolgende Reaktionskaskade löst dann die Aktivierung der Genexpression aus. Zu den Besonderheiten der Defensin-Synthese gehört eine Zwischenspeicherung einer inaktiven Form des Protheins (Propeptid) im endoplasmatischen Retikulum, wo dieser durch Einwirkung bestimmter Enzyme nach Bedarf aktiviert werden kann [Chen *et al.* 2006; Sahasrabudhe *et al.* 2000]. Der Mechanismus der Induktion einer Genexpression von Defensinen ist in Abbildung 4 dargestellt.

Die Wirkungsweise der Defensine beruht somit auf physikalischen Prinzipien. Dies könnte erklären, warum im Laufe der Evolution fast keine Resistenz der Mikroorganismen gegenüber den Defensinen entwickelt worden ist [Boman 1995; Dale & Krisanaprakornkit 2001; Morgera *et al.* 2008; Pazgier *et al.* 2007]. Jedoch ist es experimentell gelungen, eine Resistenz bestimmter Mikroorganismen gegen Defensine zu induzieren [Peschel 2002]. So wurden die für Resistenzbildung verantwortlichen Gene von *Porphyromonas gingivalis* erfolgreich mittels oxidativen und thermischen Stress koaktiviert [Shelburne *et al.* 2005]. Außerdem wurde berichtet, dass die LPS von *Porphyromonas gingivalis* und *Capnocytophaga ochracea* eine inhibierende Wirkung auf TLR-Rezeptoren besitzen [Yoshimura *et al.* 2002].

Die Mechanismen der antiviralen und antitoxischen Wirkung der Defensine sind nicht ausreichend geklärt. Vermutlich sind einige Defensine in der Lage, Adhäsionsrezeptoren bestimmter Viren zu blockieren. So wurde eine Inaktivierung von Heparinsulfat und Glykoprotein B, also Adhäsionsrezeptoren der HSV-2 Viren, durch Defensine beschrieben [Hazrati *et al.* 2006; Quinones-Mateu *et al.* 2003; Sun *et al.* 2005].

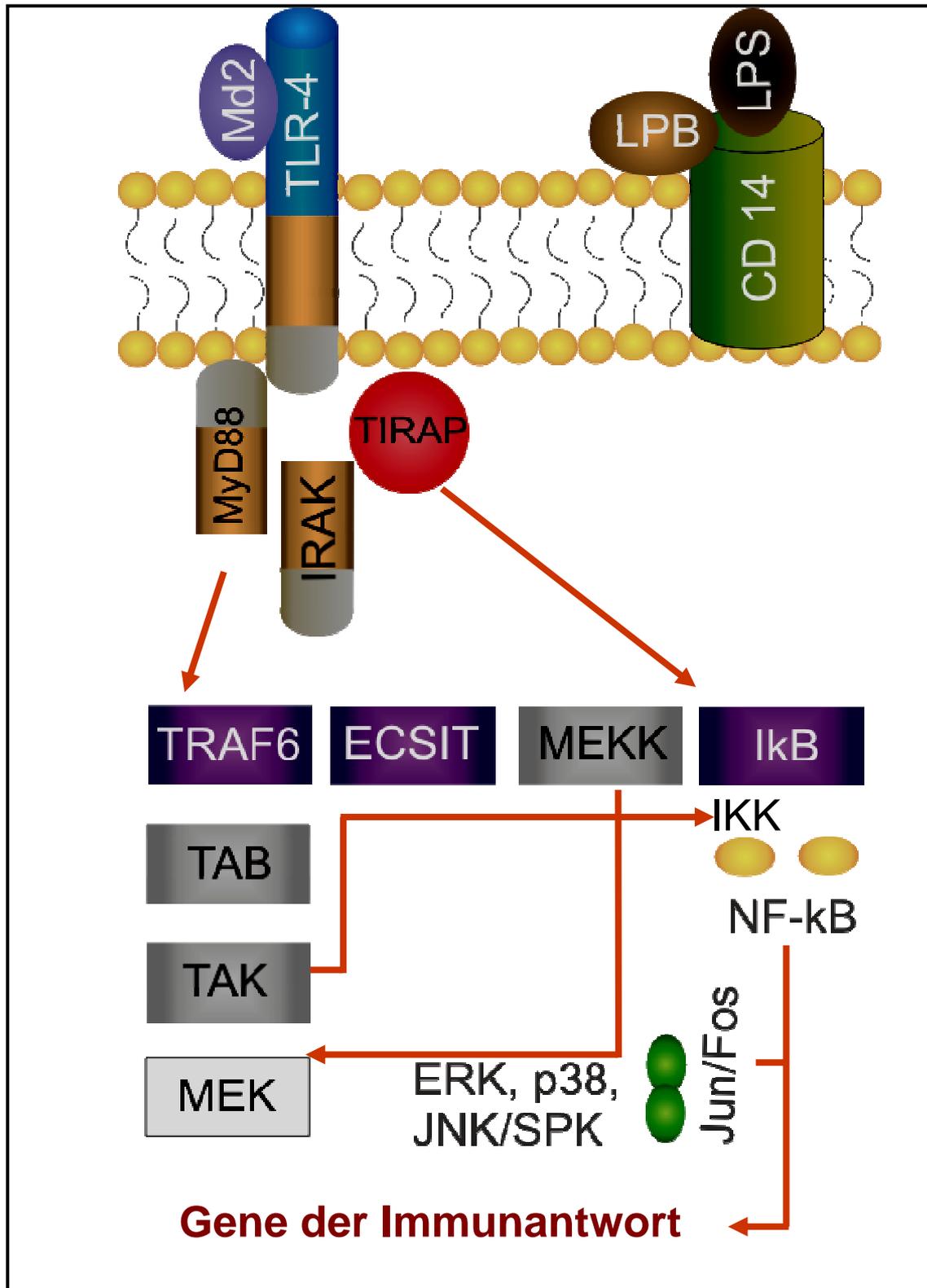


Abb. 4 Induktion einer angeborenen Immunantwort. ERK: Extrazellulärsignal-regulierte Kinase; IKK: I κ Kinase; IRAK: IL-1-Rezeptor-assoziierte Kinase; JNK: c-Jun N-terminale Kinase; LPS: Lipopolysaccharid; LBR: LPS-bindendes Protein; NF- κ B nukleärer Faktor κ B; SPK: Stress-aktivierte Proteinkinase; TIRAP: „Toll-IL-1R (TIR) domain-containing adapter protein“; TLR-4: Toll-like-Rezeptor 4; TRAF: Tumornekrose-Faktor-Rezeptor-assoziiierter Faktor 6 (Modifiziert nach G. Baumgarten)

2.6.2 Klassifikation der Defensine

Defensine sind antimikrobielle Peptide, die drei intramolekulare Disulfidbrücken besitzen und hauptsächlich β -Faltblattstruktur aufweisen. Zurzeit sind drei Untergruppen der Defensine bekannt, die sich unter anderem in den Positionen dieser Disulfidbrücken unterscheiden. Dementsprechend werden folgende Defensine (in Klammern sind Genpolymorphysmen angegeben) differenziert [White *et al.* 1995]:

- α -Defensine (Gene: DEFA1, DEFA1A3, DEFA3, DEFA4, DEFA5, DEFA6)
- β -Defensine (Gene: DEFB1, DEFB4, DEFB103A / DEFB103B, DEFB107A / DEFB107B DEFB110 bis DEFB133)
- θ -Defensine (Gen DEFT1P)

Da sich die humanen alpha-Defensine vor allem in den primären (azurophilen) Granula neutrophiler Granulozyten finden lassen, werden diese Human Neutrophil Peptides (HNP) genannt. Bis jetzt sind vier alpha-Defensine beschrieben worden (HNP-1 bis -4) [Boman 1995; Dale & Krisanaprakornkit 2001; Schneider *et al.* 2005]. Humane beta-Defensine werden insbesondere an epithelialen Oberflächen produziert. Derzeit sind vier beta-Defensine bekannt (hBD-1 bis -4) [Yang *et al.* 2007].

2.7 Humane beta-Defensine

Die Gruppe humaner beta-Defensine umfasst hBD-1, hBD-2, hBD-3 und hBD-4, deren Hauptexpressionsort Epithelzellen sind. Bei den beta-Defensinen wird zwischen konstitutiven und induzierbaren Formen unterschieden. Den beta-Defensinen wird eine wichtige Rolle in der angeborenen lokalen Immunantwort zugeschrieben, da diese die ersten körpereigenen Substanzen sind, welche gegen schädliche Mikroorganismen eine Wirkung entfalten.

Das humane beta-Defensin-1 ist ein aus 36 Aminosäuren bestehendes Peptid mit einem Molekulargewicht von 3,9 kDa [Schroder 1999]. HBD-1 wurde zunächst aus dem Plasma der Patienten mit entzündlichen Nephropatien isoliert. Dabei wurden die Epithelzellen des Urogenitaltraktes als Syntheseort für hBD-1 identifiziert [Bensch *et al.* 1995]. Die Expression von hBD-1 wurde außerdem auch in Epithelien der Haut [Schroder 1999], des Gastrointestinaltraktes [O'Neil *et al.* 1999] und des Respirationstraktes [Hiratsuka *et al.* 1999; Singh *et al.* 1998] nachgewiesen. HBD-1 besitzt antimikrobielle Eigenschaften gegenüber grampositiven und gramnegativen

Bakterien und Pilzen [Bensch *et al.* 1995; Diamond *et al.* 2001; Jurevic *et al.* 2003; O'Neil *et al.* 1999].

Das humane beta-Defensin-2 hat ein Molekulargewicht von 4 kDa und ist aus 41 Aminosäuren aufgebaut [Schroder 1999]. Zum ersten Mal wurde hBD-2 in der Epidermis von Patienten mit Psoriasis entdeckt [Schroder 1999]. Anschließend konnte gezeigt werden, dass auch in den Epithelien der Haut und des Respirationstraktes hBD-2 exprimiert wird [O'Neil *et al.* 1999; Schroder 1999]. Für hBD-2 konnte eine hohe antimikrobielle Aktivität gegenüber gramnegativen Bakterien und Pilze, jedoch lediglich bakteriostatische Effekte auf grampositive Bakterien nachgewiesen werden.

Das 5,12 kDa schwere, aus 45 Aminosäuren bestehende humane beta-Defensin-3 wurde ebenfalls erstmals aus der Haut von Psoriasis-Patienten isoliert [Batoni *et al.* 2006]. Wenig später wurde dieses Peptid in den Epithelzellen der reproduktiven Organe, des Gastrointestinal- und Respirationstraktes entdeckt [Joly *et al.* 2004]. Dem hBD-3 wird von allen bekannten Defensinen die stärkste antimikrobielle Aktivität zugeschrieben. HBD-3 wirkt schon in niedrigen Konzentrationen sowohl gegen grampositive und gramnegative Bakterien als auch gegen Pilzen toxisch [Maisetta *et al.* 2006].

Über das humane beta-Defensin-4 ist derzeit noch sehr wenig bekannt. Dieses Defensin wurde während der Analyse der genomischen Sequenz von Menschen entdeckt [Chen *et al.* 2006; Garcia *et al.* 2001] und wurde bis jetzt nur in wenigen Geweben (wie respiratorische und orale Epithelien) nachgewiesen [Vankeerberghen *et al.* 2005; Yanagi *et al.* 2005]. Ähnlich wie hBD-2 gilt auch das hBD-4 als induzierbar und besitzt eine hohe antimikrobielle Wirkung [Chen *et al.* 2006; Garcia *et al.* 2001; Vankeerberghen *et al.* 2005; Yanagi *et al.* 2005].

2.7.1 Humane beta-Defensine in der Mundhöhle

Die Mundhöhle des Menschen ist, im Vergleich zu allen anderen Abschnitten des Gastrointestinaltraktes, am stärksten mit unterschiedlichen Mikroorganismen kolonisiert. Bis zu 500 taxonomische Einheiten von Bakterien, Protozoa, Pilzen und Viren, Stellvertreter sowohl pathogener als auch kommensaler Flora können sich gleichzeitig in der menschlichen Mundhöhle befinden [Marsh & Martin 2002]. Die epithelialen Strukturen der Mundhöhle spielen dementsprechend eine wichtige Rolle in der Formierung der lokalen Abwehr und der Barrierefunktion der Schleimhaut. Die

Ergebnisse früherer Untersuchungen lassen dabei eine Bedeutung der humanen beta-Defensine vermuten [Dale & Krisanaprakornkit 2001].

Das Plattenepithel der Mundhöhle ist überwiegend mehrschichtig und verhornt. Mit Hilfe der In-situ-Hybridisierung wurden einzelne Schichten der Mundschleimhaut auf Expression von beta-Defensinen untersucht [Abiko *et al.* 2001]. Die Ergebnisse zeigten einen hohen Gehalt der exprimierten mRNA von hBD-1 und -2 in den suprabasalen Schichten des Gingivaepithels, insbesondere in den unteren Schichten des Stratum spinosum [Abiko *et al.* 2001]. Die Konzentration der Peptide war dagegen höher in den oberen Schichten des Stratum spinosum und vor allem im Stratum granulosum, was später auch für hBD-3 in Wangen- und Zungenschleimhaut beschrieben wurde [Dunsche *et al.* 2002]. Eine ähnliche Verteilung wurde auch in der entzündeten Gingiva beobachtet [Dommisch *et al.* 2005; Dunsche *et al.* 2002].

Überraschenderweise ist es nicht gelungen, nennenswerte Mengen humaner beta-Defensine im Saum- und Sulkusepithel zu finden; dagegen war die Expression humaner alpha-Defensine in diesen Bereichen beachtlich [Dale *et al.* 2001]. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass beta-Defensine überwiegend von differenzierteren Zellen exprimiert und synthetisiert werden und die Synthese dieser Peptide vom Grad der Differenzierung abhängt [Abiko *et al.* 2001; Dale *et al.* 2001]. Die Bestätigung dafür scheinen Ergebnisse einer Untersuchung der Expression von hBD-2 im squamosen Zellkarzinom zu liefern. Dabei zeigte sich die Expression von hBD-2 [Sawaki *et al.* 2002], jedoch nicht von hBD-1 [Wenghoefer *et al.* 2008], verstärkt in den Hyperkeratose-Bereichen im Vergleich zu weniger oder nicht keratinisierten Bereichen des Karzinoms. Zusätzlich wurden weniger und besser differenzierte Karzinome miteinander verglichen, wobei in allen weniger differenzierten Tumoren keine Expression von hBD-2 nachgewiesen werden konnte [Sawaki *et al.* 2002]. Die Autoren wiesen darauf hin, dass diese Ergebnisse jedoch wahrscheinlich auf gesunde Gingiva nicht übertragbar sind, da ihre Beobachtungen im pathologisch alterierten Gewebe durchgeführt wurden [Sawaki *et al.* 2002].

Humane beta-Defensine wurden darüber hinaus auch im Gewebe der Zahnpulpa entdeckt [Dommisch *et al.* 2005]. Den Autoren dieser Studie gelang es, mit Hilfe von Polymerasekettenreaktion (PCR) die Expression von hBD-1 und -2 in homogenisierten Pulpen intakter menschlicher Weisheitszähne nachzuweisen. Die Auswertung der PCR-Produkte zeigte die Anwesenheit des Transkripts von hBD-1 in allen und von hBD-2 in

einigen Proben der Pulpa [Dommisch *et al.* 2005]. Gleichzeitig wurde eine immunohistochemische Untersuchung der Proben vorgenommen, welche eine hohe Konzentration des hBD-1 und eine vergleichsweise niedrigere des hBD-2 Transkripts im Zytoplasma der Odontoblasten zeigte [Dommisch *et al.* 2005].

Die Erforschung des Gewebes von Speicheldrüsen führte ebenso zur Entdeckung von humanen beta-Defensinen in diesen Organen. Die Angaben darüber allerdings variieren in der zugänglichen Literatur [Abiko *et al.* 2003]. So wurde in einer Studie die Expression von hBD-1 im Epithel der kleinen Speicheldrüsen, ebenso wie in den Glandulae submandibularis und parotis beschrieben [Mathews *et al.* 1999; Sahasrabudhe *et al.* 2000]. Die Expression von hBD-2 konnte in den Speicheldrüsen nicht nachgewiesen werden. Die Ergebnisse einer anderen Studie zeigen dagegen die Anwesenheit des Transkripts von hBD-2, ebenso wie von hBD-3 im Gewebe der Glandula sublingualis, submandibularis und parotis [Dunsche *et al.* 2002]. Mit Hilfe von HPLC und Western Blott wurden hBD-1 und -2 in einer Konzentration von ca. 150 ng/ml im Speichel nachgewiesen. Die Autoren vermuteten jedoch die Quelle dieser Peptide nicht in den Speicheldrüsen, sondern in den Epithelzellen der Mundhöhle [Mathews *et al.* 1999; Sahasrabudhe *et al.* 2000].

Neuerdings ist es gelungen, die Expression von hBD-1, -2 und -3 auch im Knochengewebe nachzuweisen [Warnke *et al.* 2006]. Im ersten Teil der Studie wurde die Expression dieser beta-Defensine in den Kulturen der aus der Kompakta eines intakten retromolaren menschlichen Knochens stammenden Osteoblasten bestimmt. Dies konnte auch mit Hilfe einer immunohistochemischen Färbung bestätigt werden. Im zweiten Teil des Experiments konnte zusätzlich eine Immunoreaktivität eines chronisch infizierten Knochens, vor allem an der Grenze zwischen Knochensubstanz und Knochenmark, gezeigt werden. Die immunohistologische Färbung eines nicht infizierten Knochens wies dagegen signifikant niedrigere Expression von hBD-1, -2, und -3 auf. Diese Ergebnisse zeigten eindeutig, dass beta-Defensine nicht ausschließlich in epithelialen Strukturen exprimiert werden [Warnke *et al.* 2006].

2.7.2 Bedeutung humaner beta-Defensine bei Erkrankungen der Mundhöhle

Der pathologische Zustand der Gewebe führt zu Veränderungen der Genexpression von beta-Defensinen; dabei wurde eine hohe interindividuelle Variabilität in der Expression beobachtet [Tao *et al.* 2005]. Die Einwirkung unterschiedlicher Reize auf eine defensinproduzierende Zelle führt jedoch bei allen Genotypen zu einer Induktion

der Genexpression [Seo *et al.* 2001]. Zu diesen Reizen gehören beispielsweise bakterielle Endotoxine, wie LPS, sowie proinflammatorische Zytokine, wie TNF- α oder Interleukine.

Die Angaben über das Expressionsmuster von hBD-1 variieren in der zugänglichen Literatur. Laut einigen Studien zeigt die Expression von hBD-1 einen konstitutiven Charakter [Dale & Krisanaprakornkit 2001; Dommisch *et al.* 2005; Hacker 2006]. So wurden Proben der gesunden und entzündeten Gingiva ebenso wie mit verschiedenen bakteriellen LPS stimulierte Zellen untersucht [Krisanaprakornkit *et al.* 1998]. In diesen Proben und Kulturen wurden lediglich die vorher genannten interindividuellen, jedoch keine in Verbindung mit einer Entzündung oder Stimulation stehenden signifikanten Unterschiede bei der Expression von hBD-1 beobachtet [Dommisch *et al.* 2005; Krisanaprakornkit *et al.* 1998; Liu *et al.* 2001; Premratanachai *et al.* 2004; Saitoh *et al.* 2004]. Ähnliche Ergebnisse lieferten Untersuchungen der Zahnpulpa und der Pulpazellen. In der gesunden Zahnpulpa oder in kultivierten Pulpazellen ließ sich ein hoher Gehalt der hBD-1 mRNA nachweisen; dagegen war die Expression dieses Peptids in entzündeten Proben oder bei mit LPS stimulierten Zellen sogar herabgesetzt oder unverändert [Dommisch *et al.* 2007; Hacker 2006; Veerayutthilai *et al.* 2007].

In anderen Studien wurde die Expression von hBD-1 jedoch als stimulierbar beschrieben. So zeigten In-vitro-Studien eine deutliche Steigerung der Genexpression von hBD-1 in den mit Phorbol 12-Myristat 13-Acetat (PMA) und mit lebenden Spezies der mit *Porphyromona gingivalis* stimulierten Kulturen der immortalisierten und primären oralen Keratinozyten [Seo *et al.* 2001; Vankeerberghen *et al.* 2005]. Ähnlich verhielt sich die Expression von hBD-1 im entzündeten Gewebe der Speicheldrüsen und in Gastrointestinaltrakt [Bajaj-Elliott *et al.* 2002; Sahasrabudhe *et al.* 2000].

Die Expression von hBD-2 wurde ebenfalls in verschiedenen In-vivo und In-vitro-Studien untersucht. Die Stimulation immortalisierter und primärer Keratinozyten mit LPS kommensaler und pathogener Bakterien, UV-Licht und proinflammatorischen Zytokinen führte zu einer Induktion der Expression von hBD-2 und -3 [Feucht *et al.* 2003; Krisanaprakornkit *et al.* 2000; Seo *et al.* 2001; Vankeerberghen *et al.* 2005]. Die Ergebnisse der Studien zeigten allerdings auch Unterschiede in der Genexpression, die offensichtlich durch verschiedene bakterielle Arten und Serotypen hervorgerufen wurde. Dies führte zu der Vermutung, dass die Induktion der Expression von hBD-2 und -3 ein selektiver Prozess ist [Feucht *et al.* 2003; Vankeerberghen *et al.* 2005].

Die Untersuchungen der Proben entzündeter und gesunder Gingiva zeigten ebenfalls die interindividuelle Variabilität der Expression von hBD-2 und -3 [Dommisch *et al.* 2005]; auch wurde eine herabgesetzte Genexpression dieser Defensine in den Gingivaproben von Parodontitis-Patienten beschrieben [Bissell *et al.* 2004; Lu *et al.* 2004; Lu *et al.* 2005]. Diese Beobachtungen widersprechen den Ergebnissen vieler Laborstudien, die eindeutig eine Induktion der Expression von hBD-2 und -3 durch Einwirkung von LPS oder proinflammatorischen Zytokinen zeigten. Als mögliche Ursache wird von den Autoren der Studien das Vorhandensein von proinflammatorischen Zytokinen im gesunden Gewebe diskutiert, welche zur Aktivierung der Genexpression von Defensinen auch bei einer Entzündungsfreiheit führen könnten [Bissell *et al.* 2004; Lu *et al.* 2004; Lu *et al.* 2005].

Während einer akuten Entzündung der Gingiva (Gingivitis) wurde ähnlich wie bei einer Pilzinfektion (Kandidose) im Gegensatz zu gesunden Proben eine erhöhte Expression von hBD-2 beobachtet [Abiko *et al.* 2002; Dommisch *et al.* 2005]. Andere Untersuchungen zu einer Pilzinfektion, u. a. an künstlich hergestellten oralen Epithelien (RHOE), zeigten dagegen eine herabgesetzte Expression von hBD-1, -2 und -3 während einer Kandidose [Lu *et al.* 2006]. Die RHOE Kulturen besitzen eine ähnliche Struktur wie das Gewebe der oralen Schleimhaut. Nach einer Infektion der Kultur mit pathogenen Stämmen von *Candida albicans* wurde erstmal eine Induktion der Expression von beta-Defensinen beobachtet, die allerdings im Laufe der Zeit schwächer wurde [Lu *et al.* 2006]. Der Mechanismus des Widerstands von *Candida albicans* gegen die lokale Immunantwort ist nicht bekannt [Lu *et al.* 2006].

Die nicht infektiösen Krankheiten der Mundhöhle können ebenfalls die Expression von Defensinen beeinflussen. In den Regionen mit Hyperkeratose und Leukoplakie wurde verstärkte Genexpression von beta-Defensinen beobachtet [Abiko *et al.* 2002]. Noch stärker ausgeprägt war die Expression in den mit Lichen planus befallenen Bereichen der Schleimhaut [Abiko *et al.* 2002].

3 Fragestellung und Ziele der Arbeit

In früheren Studien wurde bereits die Bedeutung der humanen beta-Defensine für die lokale Immunantwort des Organismus gegen einwandernde Mikroorganismen untersucht. Dabei entfalten diese Peptide eine direkte antimikrobielle und mediatorische Wirkung. Humane beta-Defensine werden nicht ausschließlich in Epithelzellen, sondern auch in Zellen anderer Gewebegruppen exprimiert und synthetisiert, darunter auch in der Zahnpulpa [Dommisch *et al.* 2005; Dommisch *et al.* 2007]. Die Genexpression humaner beta-Defensine wird durch Bakterien oder deren Stoffwechselprodukte induziert und scheint sich zwischen der gesunden und der entzündeten Geweben zu unterscheiden. Aufgrund dieser Erkenntnisse ergaben sich folgende Ziele und Fragestellungen:

- (1) Findet die Genexpression der proinflammatorischen Zytokine TNF- α , COX-2, IL-1 β und -6 im Pulpagewebe statt?
- (2) Wie unterscheidet sich die Genexpression von proinflammatorischen Zytokinen TNF- α , COX-2, IL-1 β und -6 während der klinisch diagnostizierten Pulpitis?
- (3) Lässt sich eine klinisch diagnostizierte Pulpitis mit Hilfe der labordiagnostischen Methoden, der PCR, bestätigen?
- (4) Findet die Genexpression von humanen beta-Defensin-1, -2, -3 und -4 im Pulpagewebe statt?
- (5) Wie unterscheidet sich die Genexpression von humanen beta-Defensinen-1, -2, -3 und -4 im Pulpagewebe während der klinisch und molekularbiologisch diagnostizierten Pulpitis (μ_2) im Vergleich zu deren Expression in der gesunden Pulpa (μ_1)?

Für die Annahme, dass die Genexpression von hBD-1, -2, -3 und -4 in der gesunden (μ_1) und entzündeten (μ_2) Pulpa sich nicht unterscheidet, lautete die Nullhypothese (H_0):

$$H_0: \mu_1 = \mu_2$$

Für die Alternativhypothese (H_A) galt dann:

$$H_A: \mu_1 \neq \mu_2$$

4 Material und Methoden

4.1 Übersicht

Die Proben der gesunden und entzündeten Pulpa wurden während chirurgischer oder endodontischer Eingriffe gewonnen. Die Diagnose „Pulpitis“ wurde anhand klinischer Symptome gestellt. Nach der RNA-Extraktion und reversen Transkription wurde eine quantitative Real-Time Polymerase-Ketten-Reaktion durchgeführt, die Ergebnisse wurden anschließend statistisch ausgewertet.

4.2 Probengewinnung

Die Proben der Pulpa stammten von Patienten, die sich einer routinemäßigen chirurgischen oder endodontischen Behandlung im CharitéCentrum 3, Charité-Universitätsmedizin Berlin, unterzogen haben. Alle Patienten gaben, gemäß der Empfehlung der Zentralen Ethikkommission, nach vorheriger Aufklärung ihre Einwilligung in die vorliegende Untersuchung [CGE 2003]. Patienten, die in den zurückliegenden 24 Stunden Analgetika genommen hatten, wurden von der Teilnahme an der Studie ausgeschlossen. Die als „gesund“ klassifizierten Pulpen stammten von kariesfreien, vitalen dritten Molaren, welche aus chirurgischen oder kieferorthopädischen Gründen operativ entfernt werden mussten. Die Proben der entzündeten Pulpa wurden aus den kariösen, vitalen Zähnen gewonnen, die Symptome einer Pulpitis, andauernde oder spontane Schmerzen und starke Reaktion auf thermische Reize zeigten. Diese Pulpen stammten entweder aus nicht erhaltungswürdigen dritten Molaren, oder wurden während einer Vitalexstirpation gewonnen. Die extrahierten Zähne wurden mittels eines diamantierten Bohrers (Komet, Lemgo, Deutschland) der Länge nach aufgetrennt. Dabei wurde mit Wasserkühlung gearbeitet, um mögliche thermische Schädigung des Gewebes zu vermeiden (Abbildungen 5a und 5b). Das Pulpagewebe wurde anschließend mit Hilfe eines Handexcavators aus dem Pulpenkavum entfernt und unter Zugabe eines RNA-Stabilisationsreagens (Qiagen, Hilden Deutschland) in ein Kryoröhrchen (Nunc, Roskilde, Dänemark) überführt. Lagerung und Transport der Proben erfolgten in einem Kryobehälter in flüssigem Stickstoff (Abbildungen 6a und 6b).



a



b

Abb. 5a, 5b Separierter dritter Molar.



a



b

Abb. 6a, 6b Aus einem dritten Molaren gewonnene Zahnpulpa (die hier abgebildete Pulpa wurde aufgrund des nicht abgeschlossenen Wurzelwachstums nicht weiterverarbeitet).

4.3 RNA-Extraktion aus den Gewebeproben

Die Extraktion der RNA erfolgte mit Hilfe der TRIzol Methode (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland). Das Gewebe wurde mittels eines Dounce-Homogenisators (Sartorius, Göttingen, Deutschland) homogenisiert. Dabei wurde unter ständiger Kühlung mit Eis gearbeitet, um die Aktivität der im Gewebe enthaltenen RNAsen zu inaktivieren. Das Biopsat wurde mit 750 µl TRIzol-Reagenz bis zur vollständigen Auflösung des Gewebes homogenisiert. Nach dem Gewebeaufschluß wurde das Volumen mit RNase-freiem Wasser auf 1000 µl aufgefüllt, um ein Volumenverhältnis von TRIzol-Reagenz zu der Probensuspension von 3:1 zu gewährleisten.

Die Probe wurde fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, um eine komplette Dissoziation der Nukleoproteinkomplexe zu erreichen. Anschließend wurden 200 µl Chloroform zugegeben, das Gefäß verschlossen, 15 Sekunden von Hand geschüttelt und erneut drei Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurde der Ansatz 15

Minuten lang mit 10.000 rpm bei 4 °C zentrifugiert (Eppendorf, Hamburg, Deutschland). Dadurch ergaben sich zwei scharf voneinander abgetrennte Phasen. Die obere (wässrige) Phase enthielt die RNA, die untere (organische Phenol-Chloroformphase) enthielt DNA und Proteine. Die obere farblose, wässrige Phase wurde abgenommen und in ein steriles 1,5 ml Gefäß überführt. Anschließend erfolgte die RNA-Präzipitation durch Zugabe von 500 µl Isopropanol. Zur RNA-Fällung wurde das Gefäß bei Raumtemperatur für 10 Minuten inkubiert und dann bei 4 °C für 10 Minuten bei 10.000 rpm zentrifugiert (Eppendorf, Hamburg, Deutschland).

Der Überstand wurde möglichst vollständig dekantiert. Um die restlichen Salze und Isopropanolrückstände auszuwaschen, wurde das Zentrifugat (Pellet) mit 1000 µl Ethanol (75 %) versetzt und vorsichtig vermischt. Der Ansatz wurde sofort bei 5.000 rpm fünf Minuten bei 4 °C zentrifugiert; der Überstand wurde verworfen. Das Gefäß wurde mit geöffnetem Deckel stehen gelassen, um den restlichen Alkohol möglichst vollständig verdunsten zu lassen. Das Pellet wurde mit 50 µl Rnase-freiem Wasser durch mehrmaliges Aufziehen mit der Pipettenspitze gelöst und anschließend für 10 Minuten bei 55 °C im Hybridisationsofen (Hybaid Shake 'n' Stack, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) inkubiert, um den Lösevorgang zu vervollständigen.

Nach der Trockenzeit der RNA wurden 30 µl DEPC-Wasser (Diethylpyrocarbonat mit Aqua dest. 1:1000 verdünnt) hinzugegeben. Die Lagerung erfolgte bei -80 °C. Der Absorptionswert, die Absorptionsverhältnisse (Ratio), die RNA-Konzentration, die relative Reinheit der RNA (Purity), die relative RNA-Ausbeute, sowie Proteinkonzentration wurden anschließend mittels eines Spektrometers (Biochrom, Cambridge, England) bestimmt.

Die Quantifizierung der RNA wurde bei 260 nm (OD₂₆₀) und 280 nm (OD₂₈₀) durchgeführt, wobei eine OD₂₆₀ von 1 der RNA-Konzentration von 40 µg/ml entsprach [Sambrook 2001]. Dazu wurden am Spektrometer folgende Einstellungen vorgenommen: Die Zellweglänge wurde entsprechend der verwendeten Messküvette auf 5 mm und der Quotient von OD_{260nm}/OD_{280nm} auf 1,8 eingestellt; für die Messung der RNA wurde im Menü Faktor 40 gewählt. Die RNA-haltige Lösung wurde für die Messung 1:5 verdünnt (2 µl Probe + 8 µl DEPC-Wasser). Als Referenz diente DEPC-Wasser. Alle Proben wurden je nach Materialmenge auf eine Endkonzentration von 1 µg RNA pro µl DEPC-Wasser eingestellt.

4.4 Reverse-Transkriptase – Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)

Als RT-PCR wird eine Kombination zwischen Umschreiben einer exprimierten RNA (mRNA) in die DNA (cDNA) und darauf folgende Amplifizierung des gesuchten Genprodukts mittels einer Polymerase Kettenreaktion (PCR) bezeichnet. Im ersten Schritt erfolgt die Hybridisierung eines Oligo-(dT) Primers an die aus dem Gewebe isolierte Poly(A)⁺-RNA. Dieser Primer markiert den so genannten Poly(A)-Schwanz der mRNA und leitet so in Anwesenheit von dem Enzym „Reverse Transkriptase“ die Synthese des komplementären DNA-Strangs ein. Die so synthetisierte cDNA kann in einer darauf folgender PCR amplifiziert werden. Die Detektion des Produkts kann je nach Methode auf unterschiedliche Weise erfolgen. In der vorliegenden Arbeit wurde eine Real-Time PCR verwendet.

4.4.1 Reverse Transkription (cDNA-Synthese)

Für die Reverse Transkription der gewonnenen RNA wurde ein RT-Kit (Promega, Wisconsin, USA) verwendet. Das Vorgehen entsprach den Herstellerangaben und begann mit Zubereitung eines RT-Puffer-Mixes in einem dünnwandigen PCR-Röhrchen. Dazu wurden pro Ansatz 1 µl (200 U) Reverse Transkriptase, 1,25 µl, 10 mM dNTP, 5 µl 5× Puffer und 2,75 µl RNase-freies Wasser verwendet. Das Gesamtvolumen des Mixes pro Ansatz betrug somit 10 µl, bei mehrfachen Ansätzen wurden zusätzlich 10% Pipettierfehler einkalkuliert (Tabelle 1).

Die Zugabe der Reversen Transkriptase und 10 mM dNTP erfolgte bei der Temperatur von ca. 4 °C [Levin *et al.* 1999]; beim Auftauen von 5×Puffer wurde explizit auf vollständige Lösung des Puffers geachtet. Anschließend erfolgte die Zubereitung von RNA-Mix. Das Gesamtvolumen pro Ansatz betrug 15 µl und beinhaltete 2 µl oligo-dT Primer, ein der Ausgangskonzentration entsprechendes Volumen RNA und ein variables Volumen RNase-freies Wassers. Die Herstellung des RNA-Mixes erfolgte auf Eis. Die darauf folgende Aufschmelzung der Sekundärstruktur der RNA erfolgte bei 70 °C über 8 min in einem PCR-Cycler (UNO-Thermoblock, Biometra, Göttingen, Deutschland) (Tabelle 1).

Anschließend wurden die Reaktionsgefäße sofort aus dem heißen Block genommen und auf Eis gestellt, um die Rückfaltung der RNA zu verhindern. Danach wurde dem RNA-Mix pro Ansatz 10 µl RT-Puffer-Mix zugegeben. Die reverse Transkription erfolgte dann über 60 min bei 42 °C und wurde mit Inaktivierung der

Reversen Transkriptase über 10 min bei 70 °C und Abkühlung auf 4 °C beendet (Tabelle 1). Die Aufbewahrung der cDNA erfolgte bei -20 °C.

Tab. 1 Pipettierschema und PCR-Cycler-Programmierung zur RT der isolierten RNA aus dem Pulpagewebe.

Reagenzien RNA-Mix	Ausgangskonzentration	Endkonzentration	Volumen
DEPC-Wasser			variabel 1-13 µl
Gesamt-RNA	variabel	1 µg	variabel 1-13 µl
Oligo-dT		1 µg	2 µl
Gesamtvolumen			15 µl
Inkubation im PCR-Cycler 8 min bei 70 °C. Danach sofort auf Eis.			

Reagenzien RT-Puffer-Mix	Volumen	Endkonzentration
Reverse Transkriptase	1 µl	200 U
dNTP	1,25 µl	10 mM (1 µg)
Puffer	5 µl	5×
DEPC-Wasser	2,25 µl	
Gesamt-volumen	10 µl	

Gesamtvolumen	25 µl	
Programmierung des PCR-Cyclers	60 min bei 42 °C	reverse Transkription
	10 min bei 70 °C	Denaturierung der RT
	5 min bei 4 °C	danach Lagerung bei -20 °C

4.4.2 Real-Time PCR

Die Polymerase Kettenreaktion (PCR) erlaubt eine Vervielfältigung (Amplifizierung) von gewünschten DNA-Abschnitten, welche mit spezifischen Oligonukleotiden (Primern) markiert werden. Unter Zugabe der thermostabilen DNA-Polymerase dienen diese Primer als Startmoleküle für die Synthese von DNA. Das Enzym Taq-Polymerase wurde ursprünglich aus einem thermophilen Bakterium *Thermus aquaticus* isoliert. Die Thermostabilität des Enzyms ist für die PCR essenziell, da die Reaktion bei wechselnden Temperaturen bis zu 80-90 °C durchgeführt wird. Eine exponentielle Amplifizierung der DNA verläuft in einer zyklischen Reaktionsabfolge, welche Denaturierung der DNA, Primeranlagerung an die spezifische DNA-Fragmente (Annealing) und Verlängerung des betroffenen DNA-Abschnittes (Elongation) beinhaltet. Die PCR ist eine sehr sensitive Methode, mit deren Hilfe wesentlich höhere DNA-Konzentrationen erreicht werden können, als im ursprünglichen Material.

Für die Real-Time PCR existieren unterschiedliche Detektionsformate. In dieser Studie wurde ein Detektionsformat angewendet, welches auf dem Gebrauch des Fluoreszenzfarbstoffs QuantiTect SYBRgreen (Qiagen, Hilden, Deutschland) basiert. Dieser Farbstoff fügt sich interkalierend in die Doppelhelix der DNA (in den kleinen Furchen zwischen den Basen) ein. Während der Bindung kommt es zu einer Emission des Lichts mit der Wellenlänge von 490 nm, und diese Emission wird im Real-Time PCR-Cycler am Ende jeder Elongationsphase gemessen. In diese Phase liegt die maximal amplifizierte Menge an doppelsträngiger DNA vor. Während der Denaturierung löst sich der Farbstoff wieder aus der doppelsträngigen DNA heraus, dabei senden freie Farbstoffmoleküle eine geringe Hintergrundfluoreszenz aus, die computer-gestützt vom eigentlichen Signal subtrahiert wird. Mit Hilfe eines Computerprogramms wird der Fluoreszenzanstieg grafisch in Kurven dargestellt, die anschließend unmittelbar ausgewertet werden können.

4.5 Gewinnung der Positivkontrollen und Standardkurven

Für die spätere Untersuchung der Genexpression von Defensinen, Zytokinen und des Housekeepinggens (siehe 4.7.1) in der Pulpa war die Herstellung positiver Kontrollen notwendig. Hierfür wurde eine Zellkultur aus Keratinozyten verwendet, in welcher die Expression der oben genannten Gene bereits in den früheren Studien nachgewiesen worden war. Hierfür wurden HaCaT Zellen verwendet, welche ähnliche Eigenschaften wie primäre Keratinozyten aufweisen. Bei der Zelllinie HaCaT (human adult low calcium temperature keratinocytes), die durch Dr. N. E. Fusenig (Deutsches Krebsforschungsinstitut, Heidelberg) entwickelt worden, handelt es sich um humane immortalisierte Keratinozyten. Diese Zelllinie ist aus diesem Grund und wegen ihrer gleichbleibenden Replikations- und Proliferationsraten einfach zu handhaben.

Die Zellen wurden in einem serumhaltigen DMEM-Medium (Biochrom, Berlin, Deutschland) in den 75 cm² Kulturflaschen (TPP, Trasadingen, Schweiz) in einem Brutschrank (Heraeus, Hanau, Deutschland) kultiviert, mehrfach durch Trypsinierung passagiert und in den 6-Well Platten (TPP) mit bakteriellen LPS der *E. coli* (Sigma-Aldrich, München, Deutschland) für vier Stunden stimuliert. Die RNA-Extraktion erfolgte mittels RNEasy Minikits (Qiagen, Hilden, Deutschland) nach Herstellerangaben. Anschließend wurde eine Reverse Transkription (siehe 4.5.1) vorgenommen. Danach wurde eine PCR mit den entsprechenden Primern für die gesuchten Gene (GAPDH, hBD-1 bis -4, TNF- α , COX-2, IL-1 und -6) getrennt voneinander angesetzt (Tabelle 2).

Die Produkte wurden nach dem Abschluss der Reaktion auf 3%igem Agarosegel (Rotigarose, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) mittels Elektrophorese aufgetrennt (siehe 4.9). Die anschließende Untersuchung des Agarosegels zeigte einzelne in UV-Licht fluoreszierende Banden von Produkten, welche beim Vergleich mit einem 20 bp DNA Ladder die Größe der gesuchten Produkte aufwiesen.

Des Weiteren erfolgte einzeln für jeden Primer eine Aufreinigung der cDNA nach Herstellerangaben aus den PCR-Produkten (QIAquick, Qiagen, Hilden, Deutschland). Diese DNA diente anschließend der Herstellung von Standardkurven. In der vorliegenden Studie wurden die Standardkurven für jedes Primerpaar in einer vorbereitenden PCR hergestellt. Hierzu wurden zunächst die cDNA-Kopien pro ml im jeden aufgereinigten PCR-Produkt mit Hilfe folgender Formel kalkuliert:

$$\text{Moleküle}/\mu\text{l} = (\text{DNA [g/ml]}/\text{DNA-Länge [Basenpaare} \times 660]) \times 6.022 \times 10^{23}$$

Danach wurde für jedes Produkt eine Verdünnungsreihe mit 1×10^2 bis 1×10^{11} Kopien hergestellt [Bongrazio *et al.* 2006]. Anschließend folgte die vorbereitende Real-Time PCR. Hierzu wurde das Prinzip der „nested“ (verschachtelten) PCR verwendet. Hierbei wird im ersten Schritt die PCR mit einem Template über wenige Zyklen durchgeführt. Das Produkt wird dabei durch die so genannten „long primer“ markiert und amplifiziert. Anschließend wird eine neue PCR mit dem PCR-Produkt aus der ersten Reaktion und neuen Primer („short primer“) eingesetzt. Diese Primer liegen weiter innen auf dem DNA-Abschnitt als die ersten, so dass in diesem zweiten Schritt nur noch die spezifischen DNA Abschnitte des ersten Schritts amplifiziert werden. Der erste Schritt wurde mit der aus den HaCaTs gewonnener Kontroll-DNA nach dem beschriebenen Prinzip durchgeführt. Für die Herstellung der Standardkurven und für PCR mit Proben wurden dementsprechend „short primer“ verwendet. Die generierten Standardkurven dienten der Quantifizierung der weiteren Reaktionen (Abbildung 7).

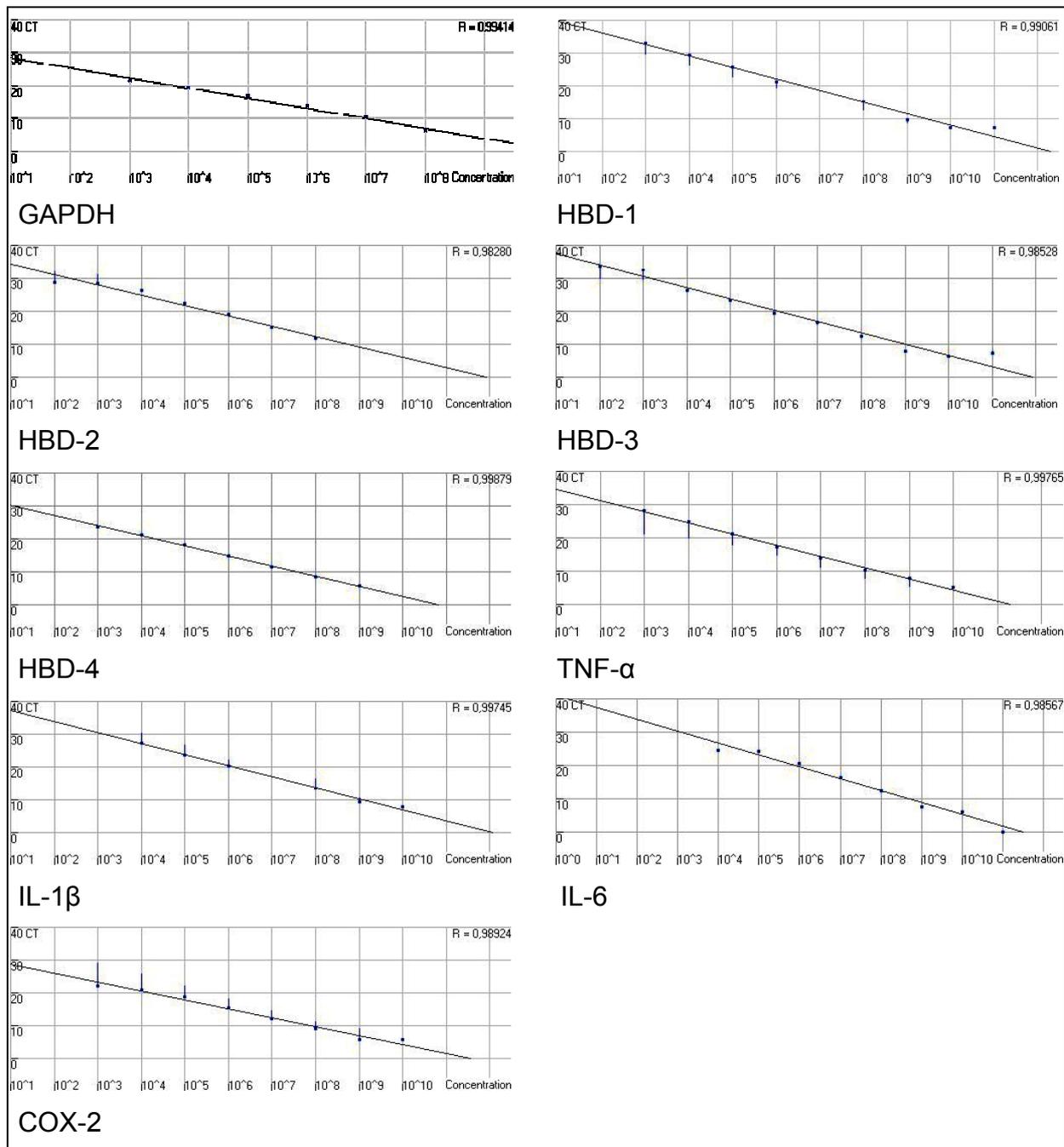


Abb. 7 Darstellung der Standardkurven für die Verdünnungsreihen 1×10^2 bis 1×10^{11} Kopien der Kontroll-DNA.

4.6 Quantitative Bestimmung der Expression

Die quantitative Bestimmung der Expression der Gene hBD-1 bis -4, TNF- α , IL-1 β , IL-6, COX-2 sowie GAPDH wurde mittels Real-Time-RT-PCR-Analyse in einem Fluoreszenz-Cycler (Rotor Gene, Corbett Robotics, Australia) durchgeführt. Die Fluoreszenzmessung erfolgte jeweils am Ende der Elongationsphase und wurde als exponentielle Funktion grafisch dargestellt. Nach Ablauf der Real-Time-PCR wurden

Schwellenwert (Threshold) und Baseline gesetzt. Die Zyklen, in den die Emissionskurve einer PCR den Schwellenwert überstieg, wurden als Ct (Crossing threshold)-Wert definiert und dienten der späteren Berechnung der Genexpression.

Zu jeder PCR wurden zusätzlich Negativkontrollen durchgeführt. Hierzu dienten Proben, die keine DNA enthielten (Non-Template-Kontrolle), sowie Proben mit der isolierten (siehe 4.4) RNA (Non-RT-Kontrolle). Die Non-Template-Kontrollen enthielten, neben Primer und SYBRgreen, DEPC-Wasser und sollten eine Aussage hinsichtlich Kontamination der Proben geben. Die Non-RT-Kontrollen bestanden aus nicht in cDNA umgeschriebenen Proben der isolierten RNA. Diese Kontrolle diente der Überprüfung der Reinheit der mRNA.

4.6.1 Quantitative Bestimmung des Housekeeping-Gens

Eine gebräuchliche und anerkannte Methode zur Normalisierung der PCR-Ergebnisse bei der quantitativen Auswertung ist die Verwendung von Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH). Die GAPDH ist ein Enzym der Glykolyse, welches in den Zellen eines Organismus die Umwandlung von Glycerinaldehyd-3-phosphat zu 1,3-Bisphosphoglycerat katalysiert. Da die GAPDH ein Bestandteil eines in jeder Zelle stattfindenden Prozesses ist, wird deren Gen als Housekeeping-Gen bezeichnet. Die Sequenzen der in dieser Studie verwendeten GAPDH-Primer sind in Tabelle 2 dargestellt. Die Zusammensetzungen des PCR-Mixes zur Herstellung von Standardkurven und zur Untersuchung der Proben sind Tabelle 3 zu entnehmen.

Tab. 2 In der vorliegenden Studie verwendete Primer Sequenzen

Gen	AcNo	Vorwärts	Rückwärts	Produktgröße (kb)
HBD-1 (long)	NM 005218	tcattacaattgcgctcagcag	ttgcagcacttggccttc	105
HBD-1 (short)		ggagggcaatgtctctattctg	ctctgtaacaggtgccttgaa	64
HBD-2 (long)	AF 040153	atcagccatgaggggtctgt	gagaccacaggtgccaattt	144
HBD-2 (short)		tcctcttctcgctcctctca	agggcaaaagactggatgac	102
HBD-3 (long)	NM 018661	agcctagcagctatgaggatc	cttcggcagcatttccggcca	206
HBD-3 (short)		cattatcttctgtttgcttgc	cgatctgttctcctttgga	148
HBD-4 (long)	NM 004942	tgcttaagagtggagccata	ctcctcatggcttttgcag	109
HBD-4 (short)		ccagtctttgcccctagaagg	ttttgtccagggagaccac	60
TNF- α (long)	NM 000594	cccgagtgacaagcctgtag	gaggtaacagccctctgatg	151
TNF- α (short)		ccatgtttagcaaacctca	agctggttatctcagctcca	102
IL-1 β (long)	NM 000576	ctccagggacaggatagga	tctttcaacacgcaggacag	134
IL-1 β (short)		caacaagtgggttctccatgt	gccaaggccacaggtat	72
IL-6 (long)	NM 000600	ctggctctttggagttgagg	atctgaggtgccatgct	306
IL-6 (short)		agagtgtgaggaacaagccaga	ttgccgaagagccctcag	233
COX-2 (long)	NM 000963	tgagcatctacggtttgctg	tgcttcttgggaacaactgc	158
COX-2 (short)		caggaggtcttggctggt	atcacccattcaggatgc	111
GAPDH (long)	NM 002046	cctgacctgccgtctagaaa	tactcctggaggccatgtg	276
GAPDH (short)		tcaagaaggtggtgaagcag	ccctgttctgtagccaat	198

Tab. 3 PCR-Ansatz für Real-Time PCR. Die Menge der cDNA betrug in jeder Probe 160 ng, die Endkonzentration der verwendeten Primer betrug 0,6 mM.

Komponente	Menge
Template	4 μ l
Primer	4 μ l
DEPC-Wasser	2 μ l
SYBRgreen [®]	10 μ l
<i>Total</i>	20 μl

4.6.2 Quantitative Bestimmung der Expression von Entzündungsmarkern und Defensinen

Die Sequenzen der in dieser Studie verwendeten Primer von Entzündungsmarkern TNF- α , IL-1 β , IL-6 sowie COX-2 und humanen beta-Defensinen hBD-1 bis -4 sind in Tabelle 2 dargestellt. Die Zusammensetzungen des PCR-Mixes zur Herstellung von Standardkurven und zur Untersuchung der Proben sind Tabelle 3 zu entnehmen. Die gewünschten Produkte wurden im Real-Time PCR-Cycler mit folgendem Programm vervielfältigt.

95,0° C	300 s		35 Zyklen
95,0° C	15 s		
56,0° C	30 s		
72,0° C	30 s		
72,0° C	300 s		

4.7 Auswertung der PCR

Die ermittelten Werte wurden mit den Werten des Housekeeping-Gens GAPDH normalisiert. Die Normalisierung erfolgte durch die Bildung eines Quotienten aus dem Wert der GAPDH und dem Wert des interessierenden Gens (hBD-1 bis -4, TNF- α , IL-1 β , IL-6 und COX-2) mit Hilfe von Microsoft Office Excel Software (Microsoft Office 2003, Redmond, WA, USA).

4.8 Gelelektrophorese

Zur Kontrolle der Produktgröße und -spezifität wurde in dieser Arbeit zusätzlich die Gelelektrophorese verwendet. Die Agarose (3 g) (Rotigarose; Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) wurde in 97 ml 1 \times TBE-Puffer (TRIS-Borsäure-EDTA-Puffer) gelöst und gekocht. Nach der Abkühlung, jedoch noch im flüssigen Zustand wurde dem Gel 0,5-1 μ l Ethidiumbromid (10 mg/ml) (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) hinzugegeben. Nach dem Aushärten des 3 %igen Gels erfolgte dessen Beladung mit 10 μ l des PCR-Produktes, gemischt mit 2 μ l Ladepuffer (ABgene, Surrey, Großbritannien) und anschließende Elektrophorese über eine Zeit von 60 min bei einer Spannung von 120 Volt in 500 ml 1 \times TBE-Puffer. Die Dokumentation der Ergebnisse wurden im UV-Licht Kammer (Vilber Lourmat, Marne-la-Vallée, Frankreich) mit Hilfe der Bildverarbeitungssoftware Photo Finish (GatorData, Inc., Lutz, USA) durchgeführt und aufgezeichnet.

4.9 Statistische Auswertung der Ergebnisse

Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe von SPSS for Windows 11 (SPSS, Chicago, USA). Zunächst wurde eine deskriptive Statistik mit Angaben von Medianwert, Minimum, Maximum sowie Mittelwert und Standardabweichungen durchgeführt. Der Vergleich der Genexpression von humanen beta-Defensinen-1 bis- 4, IL-1 β , IL-6, TNF- α sowie COX-2 in gesunden gegenüber entzündeten Pulpaprobe erfolgte in einem zweiten Arbeitsschritt mittels Mann-Whitney-U-Tests. In dem Test wurde ein Signifikanzniveau von $p=0,05$ angenommen. Die grafische Darstellung der Ergebnisse erfolgte über Boxplotdiagramme.

5 Ergebnisse

In dieser Studie wurden insgesamt 17 Proben der Pulpa mit dem Verfahren der quantitativen Real-Time PCR untersucht. Die Proben stammten von unterschiedlichen Patienten, bei denen gesundes (n=7) und entzündetes (n=10) Zahnpulpagewebe entnommen wurde.

5.1 Quantitativer Nachweis von proinflammatorischen Zytokinen

Die Expression von proinflammatorischen Zytokinen TNF- α , IL-1 β , IL-6 sowie COX-2 konnte qualitativ in allen Proben nachgewiesen werden (Abbildung 8).

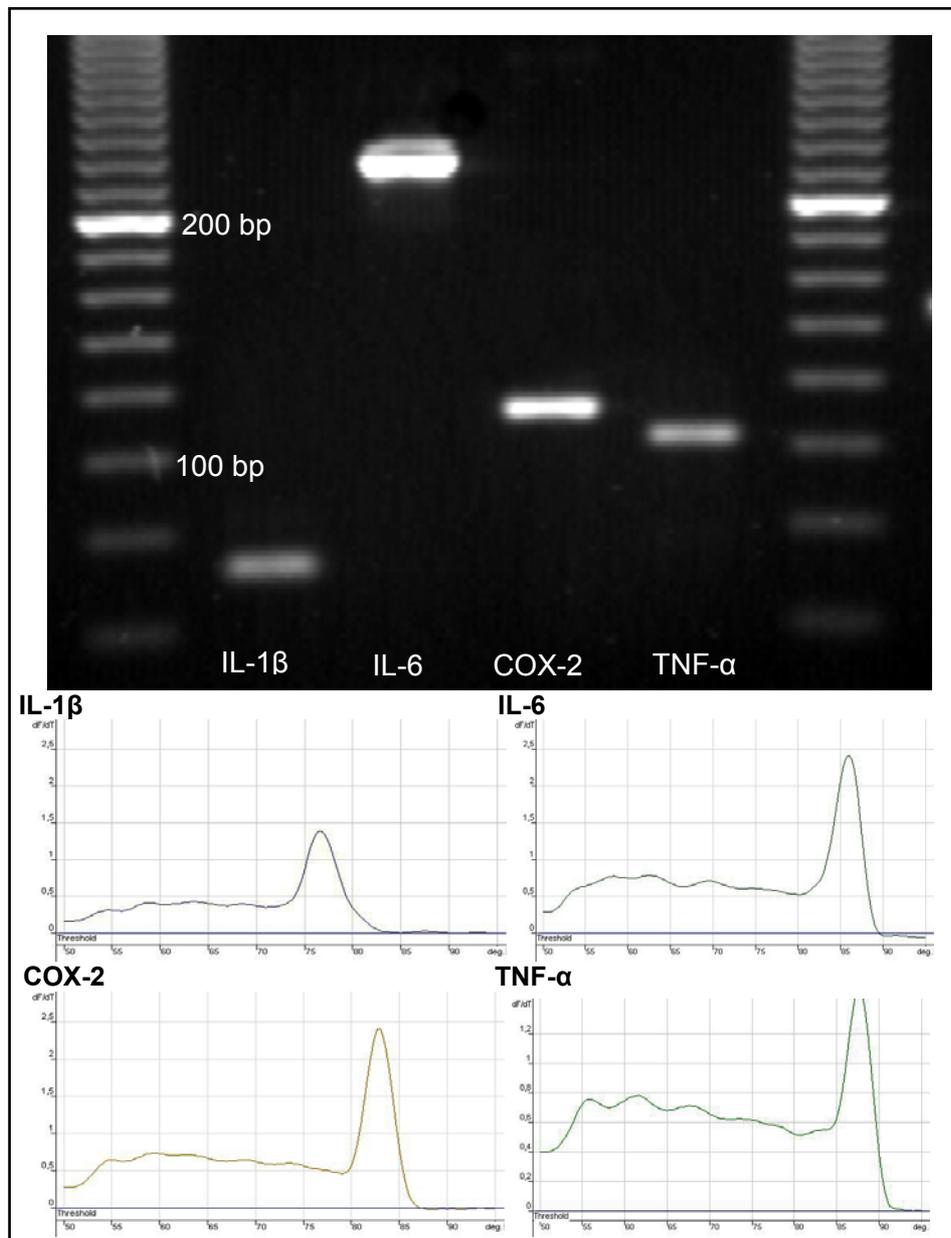


Abb. 8 Gelelektrophorese und Schmelzkurven der PCR-Produkte COX-2, TNF- α , IL-1 β und -6 (beispielhaft).

Die Ergebnisse der Real-Time PCR zeigten im Vergleich zu den gesunden eine signifikante Erhöhung der Expression von TNF- α , IL-1 β und COX-2 bei den entzündeten Pulpaprobe (Abbildungen 9-11). Die Expression von IL-6 war in den entzündeten Proben ebenfalls erhöht; signifikante Unterschiede der Expression konnten jedoch für dieses Zytokin nicht nachgewiesen werden (Abbildung 12).

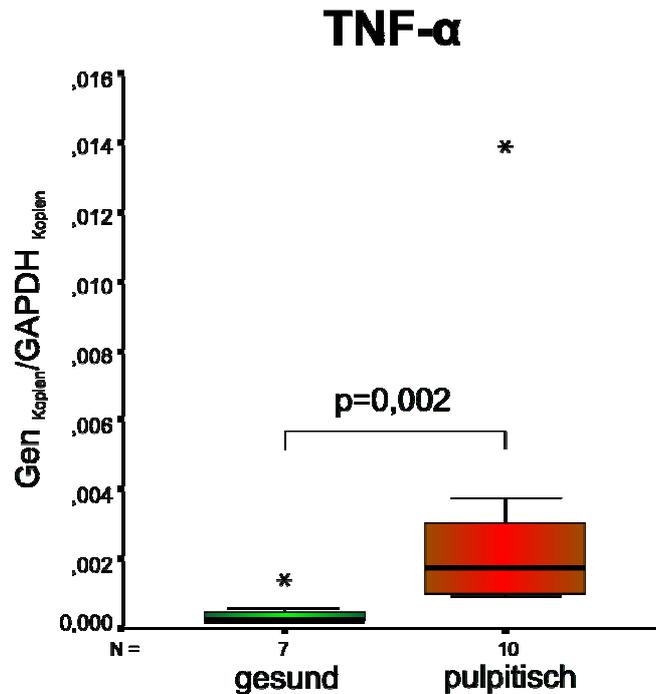


Abb. 9 Relative Expression von TNF- α in der gesunden und entzündeten Zahnpulpa.

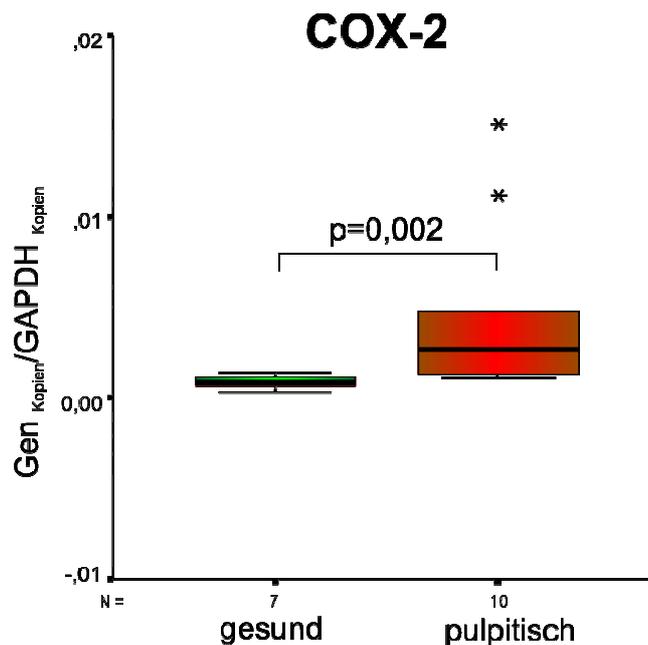


Abb. 10 Relative Expression von COX-2 in der gesunden und entzündeten Zahnpulpa.

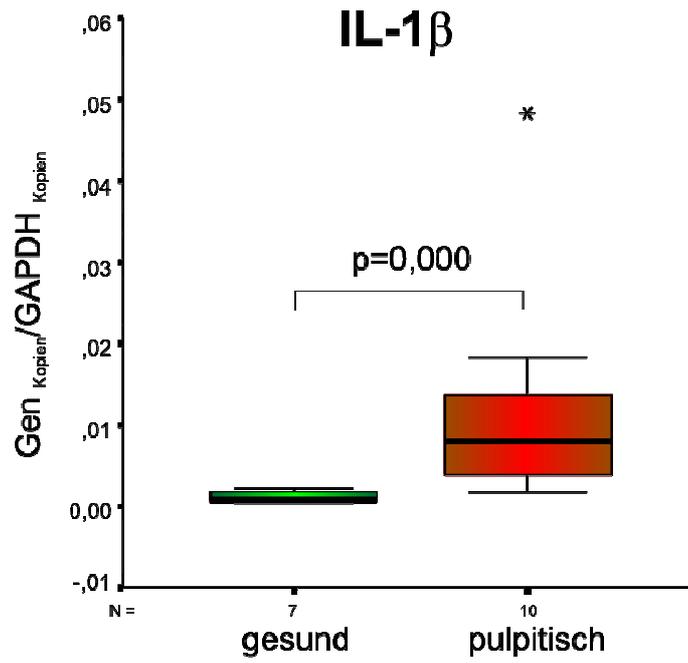


Abb. 11 Relative Expression von IL-1β in der gesunden und entzündeten Zahnpulpa.

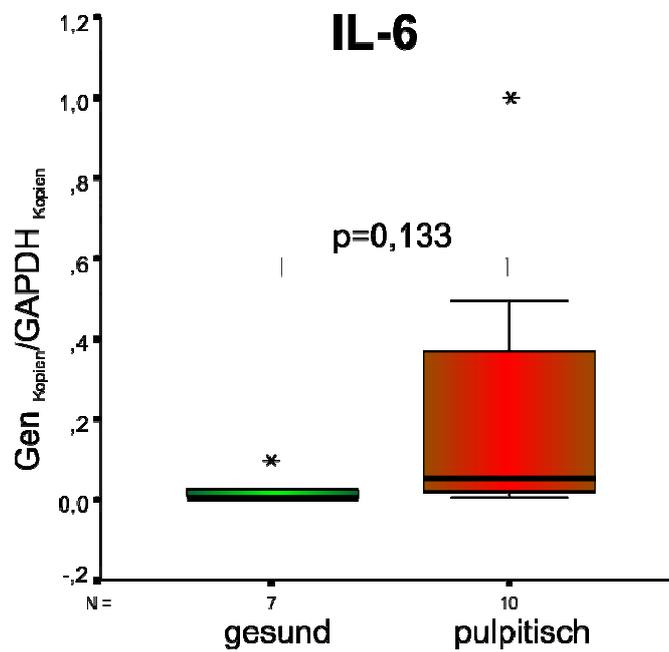


Abb. 12 Relative Expression von IL-6 in der gesunden und entzündeten Zahnpulpa.

5.3 Quantitativer Nachweis von beta-Defensinen

Die Genexpression von hBD-1 und -4 konnte in allen Pulpaprobe qualitativ nachgewiesen werden. Dagegen wurde die Genexpression von hBD-2 und -3 entsprechend jeweils in 7 bzw. 5 Proben beobachtet (Abbildung 13).

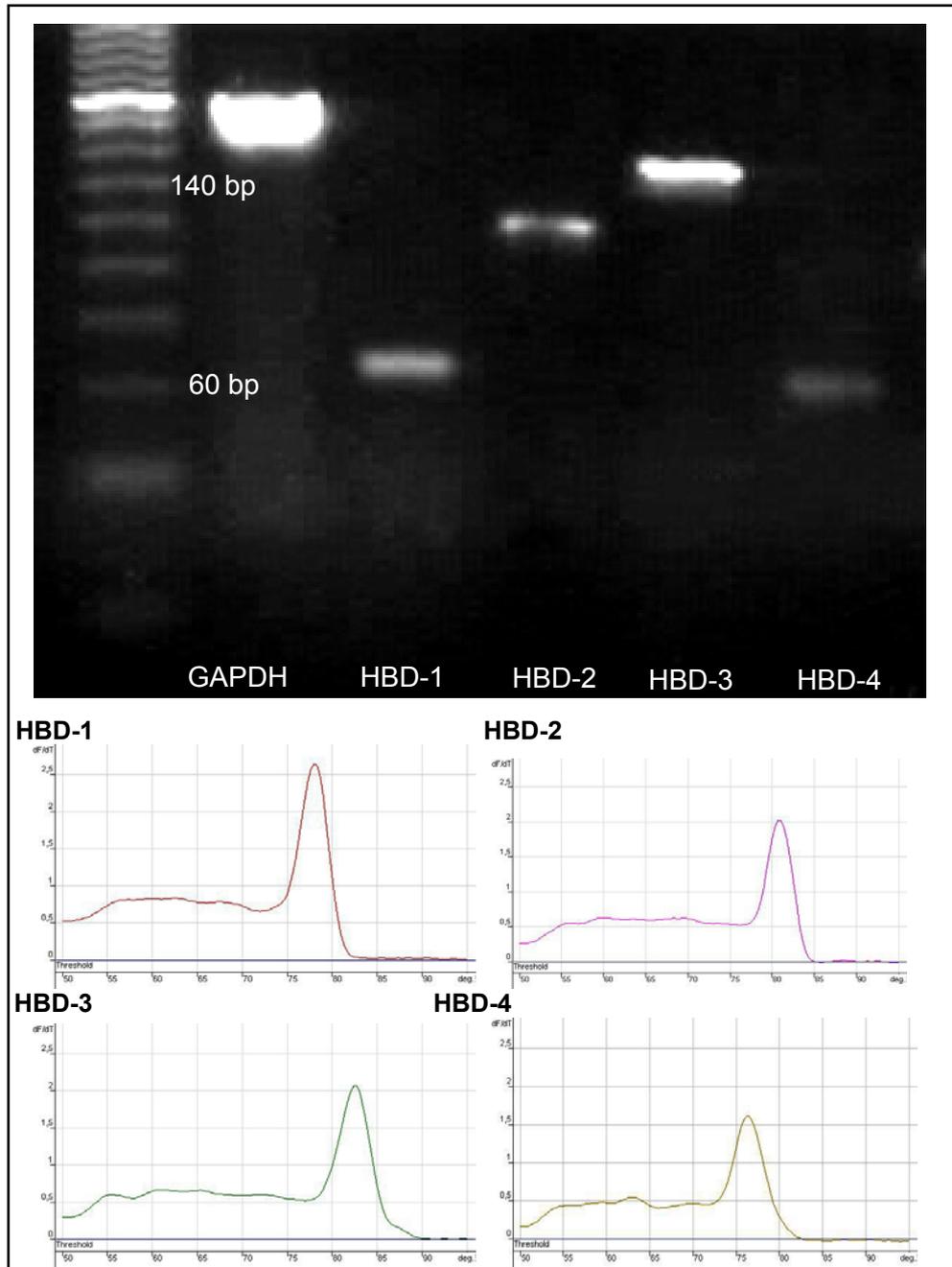


Abb.13 Gelelektrophorese und Schmelzkurven der PCR - Produkte HBD-1, -2, -3 und -4 (beispielhaft).

Die quantitative Auswertung der Genexpression von hBD-1 und -4 zeigte ein signifikant höheres Expressionsniveau der beiden Defensine in den entzündeten Pulpaprobe gegenüber gesunden Pulpen (Abbildungen 14 und 15).

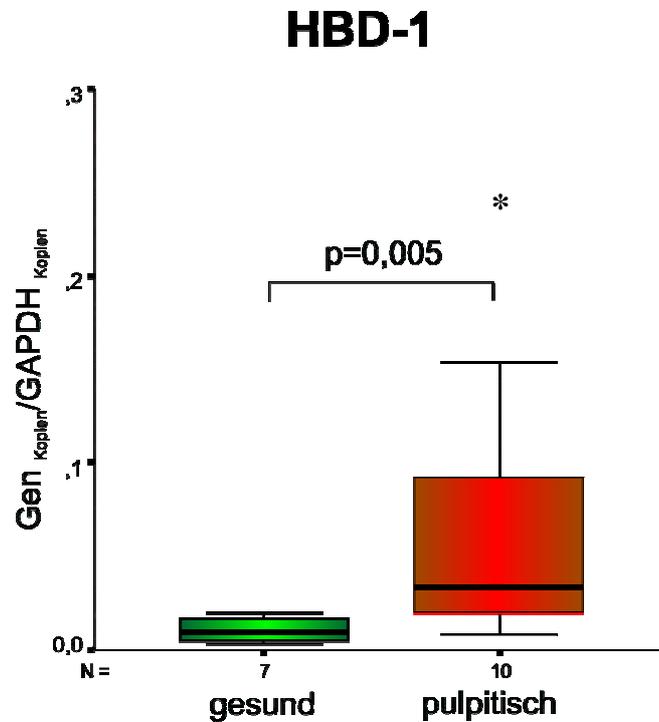


Abb. 14 Relative Expression von hBD-1 in der gesunden und entzündeten Zahnpulpa.

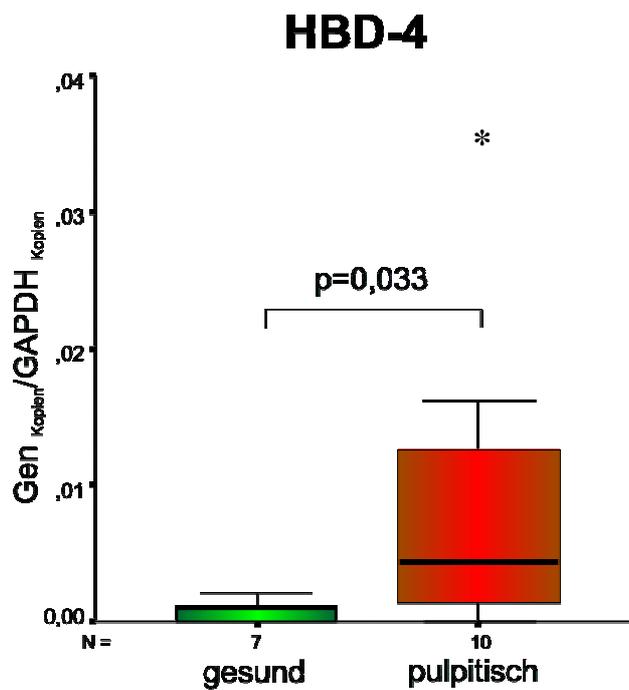


Abb. 15 Relative Expression von hBD-4 in der gesunden und entzündeten Zahnpulpa.

Die Expression von hBD-2 und -3 war ebenfalls in den pulpitischen Proben erhöht, signifikante Unterschiede zu der Expression von diesen Defensinen im gesunden Zustand der Pulpa konnten allerdings nicht nachgewiesen werden (Abbildungen 16 und 17). Insgesamt wurden in allen Proben sehr niedrige Expressionen von hBD-2 und -3 in Vergleich zu hBD-1, -4 und Zytokinen beobachtet.

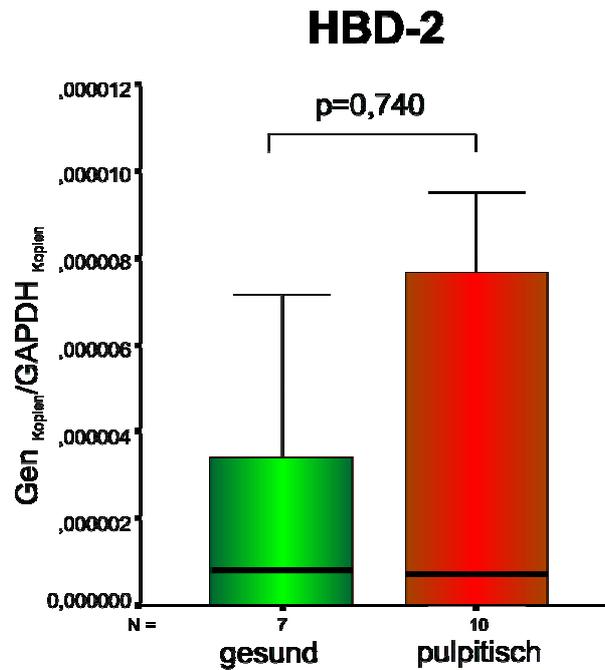


Abb. 16 Relative Expression von hBD-2 in der gesunden und entzündeten Zahnpulpa.

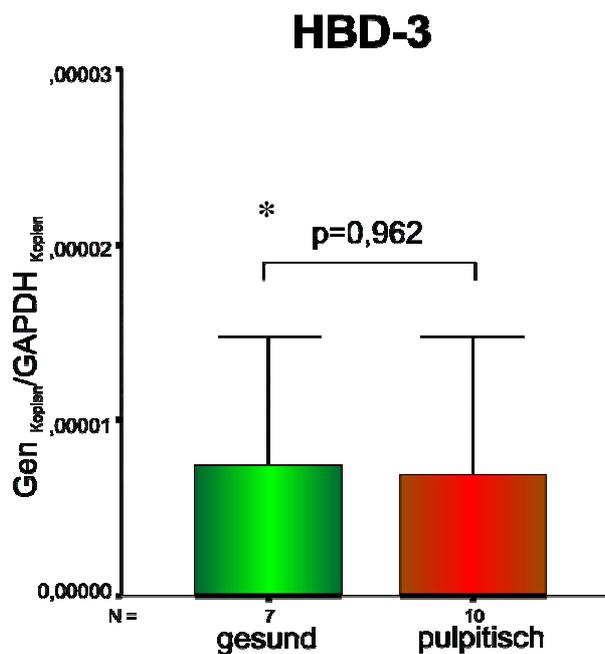


Abb. 17 Relative Expression von hBD-3 in der gesunden und entzündeten Zahnpulpa.

6 Diskussion

6.1 Diskussion der Methode

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung der Expression der humanen beta-Defensine-1, -2, -3 und -4 sowie der proinflammatorischen Zytokine und Entzündungsmediatoren IL-1, IL-6, TNF- α und COX-2 in gesunder und entzündeter Zahnpulpa.

Die gesunden Proben stammten aus extrahierten dritten Molaren, welche vital, symptomlos, kariesfrei, aber aus kieferorthopädischen oder chirurgischen Gründen nicht erhaltungswürdig waren. Die entzündeten Proben stammten zum Teil aus extrahierten, nicht erhaltungswürdigen pulpitischen dritten Molaren oder wurden während einer Vitalexstirpation aus pulpitischen Zähnen gewonnen. Um eine eventuelle Beeinflussung der Genexpression von Entzündungsmediatoren, Zytokinen oder Defensinen durch Pharmazeutika auszuschließen, wurden Patienten, die vor der Behandlung Analgetika eingenommen hatten, in dieser Arbeit nicht berücksichtigt. Die Diagnose „Pulpitis“ wurde anhand klinischer Symptome (spontaner und/oder andauernder Schmerz sowie starke Reaktion der betroffenen Zähne auf thermische Reize) gestellt. Um die Aktivität der im Pulpagewebe vorhandenen RNAsen herabzusetzen, wurde ein RNA-Stabilisationsreagenz verwendet. Die so stabilisierten Proben wurden im flüssigen Stickstoff (-196 °C) sofort eingefroren und gelagert.

Das Homogenisieren des Pulpagewebes wurde mit Hilfe eines Glass-Glass Homogenisators durchgeführt, welcher währenddessen ständig mit Eis gekühlt wurde um die Aktivität der RNAsen zu minimieren. Gleichzeitig erfolgte auch die RNA-Extraktion mittels TRizol-Methode [Sambrook 2001]. Diese Methode wurde der RNEasy Methode aufgrund der höheren Ausbeute der totalen RNA aus kleinen Gewebemengen vorgezogen [Sambrook 2001]. Die Konzentrationen der extrahierten RNA wurden anschließend photometrisch evaluiert; dabei wurden unterschiedliche Konzentrationen der RNA in unterschiedlichen Proben gemessen. Um die Konzentrationen der cDNA und dadurch auch die Ergebnisse der späteren PCR nicht zu beeinflussen, wurden die RNA-Konzentrationen in allen Proben auf 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ geeicht.

In der vorliegenden Studie wurden alle Untersuchungen mit Hilfe der quantitativen Real-Time-PCR durchgeführt. Der entscheidende Vorteil dieser hoch sensitiven Methode ist, dass die Amplifizierung der PCR-Produkte in jeder zu untersuchenden Probe direkt am Monitor abgelesen und gemessen werden kann; es bedarf dabei also

keiner zusätzlichen Untersuchung des Agarosegels und dessen Densitometrie. Das Arbeitsprinzip der Methode beruht auf einer Änderung des Fluoreszenzsignals, welches entweder durch fluoreszierenden Primer oder durch fluoreszierende interkalierende Bestandteile des Mastermix erzeugt wird. In dieser Studie wurde der Fluoreszenzfarbstoff SYBRgreen verwendet. Für die Anwendung dieser Substanz war es notwendig, die Konzentration der eingesetzten Primer, sowie die Annealingtemperatur in einem Vorversuch zu optimieren. Im Vorversuch wurden ebenfalls die internen Standards für die spätere PCR hergestellt. Dazu wurden das Prinzip der Nested-PCR und aus den mit LPS stimulierten, immortalisierten Keratinozyten HaCaT isolierten Kontroll-DNA, verwendet. Vor dem Herstellen der Standard-Kurven wurde das PCR-Produkt aufgereinigt und photometriert. Dies wurde unternommen, um die Zahl der Genkopien für die spätere Auswertung zu berechnen. Anschließend erfolgte die Herstellung der 10er Verdünnungsreihen und der Standardkurven für jeden Primer.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Expression des Enzyms Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) als interner Standard verwendet. GAPDH ist ein Enzym der Glykolyse, welches in menschlichen Zellen konstitutiv exprimiert wird und als Housekeeping Gen bei einer PCR verwendet werden kann. Die Konzentrationen der aus den Pulpaprobe isolierten RNA können sich interindividuell sehr stark unterscheiden. Aus diesem Grund war eine Normalisierung der PCR Ergebnisse mit dem Expressionslevel der GAPDH in jeder Probe erforderlich.

6.2 Diskussion der Ergebnisse

Die typischen Symptome einer Pulpitis sind spontan auftretende und andauernde Schmerzen, eine erschwerte Lokalisation des betroffenen Zahnes durch den Patienten sowie eine starke Reaktion des betroffenen Zahnes auf thermische Reize. Die subjektiven Empfindungen des Patienten oder des Behandlers erlauben oft keine eindeutige Aussage über den Entzündungsgrad der Pulpa [Kokkas *et al.* 2007; Pezelj-Ribaric *et al.* 2002]. Dies erscheint nur möglich mit Hilfe unterschiedlicher labordiagnostischer Methoden wie zum Beispiel PCR [Kokkas *et al.* 2007; Pezelj-Ribaric *et al.* 2002]. In dieser Studie handelte es sich um die Proben der gesunden und entzündeten Zahnpulpa. Als Kontrolle der tatsächlich vorhandenen Entzündung wurden die Gene der COX-2, IL-1, IL-6 und TNF- α untersucht. In früheren Studien wurden diese Entzündungsmediatoren und proinflammatorische Zytokine in vielen Geweben

(darunter auch in der Zahnpulpa) als induzierbar und entzündungsassoziiert identifiziert [D'Souza *et al.* 1989; Huang *et al.* 1999; Kokkas *et al.* 2007; Lin *et al.* 2002; McLachlan *et al.* 2004; Nakanishi *et al.* 1995; Nakanishi *et al.* 2001; Pezelj-Ribaric *et al.* 2002; Rauschenberger *et al.* 1997; Zehnder *et al.* 2003]. Somit könnte die tatsächlich vorhandene Entzündung der Pulpa anhand der erhöhten Expression von COX-2, IL-1, IL-6 und TNF- α ermittelt werden. Die Ergebnisse der vorliegenden Studie bestätigen die Annahmen: die Genexpression der proinflammatorischen Zytokine TNF- α , COX-2, IL-1 β und -6 findet im Pulpagewebe statt und unterscheidet sich in gesunden und entzündeten Pulpen. Eine klinisch diagnostizierte Pulpitis lässt sich durch verstärkte Genexpression von proinflammatorischen Zytokinen und Entzündungsmediatoren molekularbiologisch bestätigen. Somit konnten die ersten drei Fragestellungen der vorliegenden Arbeit positiv beantwortet werden.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigten, dass humane beta-Defensin-1 bis -4 nicht nur in den Epithelzellen, sondern auch im Pulpagewebe, exprimiert werden. Somit wurde auch die vierte Fragestellung positiv beantwortet. Diese Beobachtungen bestätigen Ergebnisse früherer Studien, in welchen die Expression von hBD-1 und -2 in der Pulpa bereits beschrieben wurde [Dommisch *et al.* 2005; Hacker 2006; Veerayutthilai *et al.* 2007]. Ähnlich wie in der vorliegenden Arbeit wurde eine starke Expression von hBD-1 in allen Pulpaprobe und eine schwache von hBD-2 in einigen Proben beobachtet [Dommisch *et al.* 2005]. Zusätzlich wurde in der vorliegenden Studie zum ersten Mal die Expression von hBD-3 und -4 im Gewebe der Zahnpulpa nachgewiesen, wenngleich die Expression von hBD-3 in der Zahnpulpa ähnlich schwach und unregelmäßig wie die von hBD-2, zu sein scheint.

Warum nicht in allen Proben der Pulpa hBD-2 und -3 exprimiert wurde, ist nicht geklärt. Möglicherweise spielen interindividuelle genetische Unterschiede der Probanden hierfür eine Rolle [Saitoh *et al.* 2004]. Potentiell sind Pulpazellen wie Odontoblasten oder Odontoblastenähnliche Fibroblasten in der Lage, mRNA von hBD-2 zu exprimieren [Dommisch *et al.* 2007; Veerayutthilai *et al.* 2007]. Auch die Defensine selbst scheinen sich in deren Expression gegenseitig zu beeinflussen; so wurde in einer früheren Studie eine regulatorische, genauer gesagt eine inhibierende Wirkung vom rekombinanten hBD-2 auf die Expression von hBD-1 nachgewiesen [Dommisch *et al.* 2007].

Frühere Studien zeigten Unterschiede in der Expression von humanen beta-Defensinen im gesunden und entzündeten Gewebe. So konnte zum Beispiel festgestellt werden, dass die Expression der mRNA von humanen beta-Defensinen in verschiedenen Geweben während einer Entzündung erhöht ist [Abiko *et al.* 2002; Ashitani *et al.* 2007; Dommisch *et al.* 2005; Warnke *et al.* 2006]. Die fünfte Fragestellung dieser Arbeit war die vergleichende Untersuchung der Genexpression von hBD-1 bis -4 in den gesunden und entzündeten Pulpen. Diese Fragestellung konnte lediglich für hBD-1 und -4, jedoch nicht für hBD-2 und -3 positiv beantwortet werden. Die Ergebnisse zeigten gegenüber den gesunden eine signifikante Steigerung der Expression von hBD-1 und hBD-4 in den entzündeten Proben. Bei der Expression von hBD-2 und -3 wurde ebenfalls eine Steigerung beobachtet, die allerdings nicht signifikant war.

Diese Beobachtungen bestätigen die Theorie, dass die Defensine während einer Entzündung vermehrt exprimiert werden [Boman 1995; Dale 2002; Dale & Krisanaprakornkit 2001]. Dies gilt insbesondere für hBD-2, -3, und -4, welche in früheren Studien bereits als induzierbar beschrieben worden sind [Feucht *et al.* 2003; Garcia *et al.* 2001; Krisanaprakornkit *et al.* 2000; Seo *et al.* 2001; Vankeerberghen *et al.* 2005]. Dagegen gilt hBD-1 als konstitutiv exprimiert [Dale & Krisanaprakornkit 2001; Dommisch *et al.* 2005; Hacker 2006]. Die Angaben zur Expression von hBD-1 variieren in der zugänglichen Literatur jedoch erheblich. In zahlreichen Studien wurde eine Induzierbarkeit der Expression von hBD-1 nachgewiesen [Bajaj-Elliott *et al.* 2002; Sahasrabudhe *et al.* 2000], oder sie konnte *in-vitro* erreicht werden [Seo *et al.* 2001; Vankeerberghen *et al.* 2005]. Die Untersuchungen unterschiedlicher menschlicher Gewebe, wie Speicheldrüsen, Gingiva und anderer Epithelien, zeigten signifikante Steigerungen der Genexpression von hBD-1 während entzündlicher Prozesse [Bajaj-Elliott *et al.* 2002; Sahasrabudhe *et al.* 2000; Seo *et al.* 2001; Vankeerberghen *et al.* 2005]. Darüber hinaus konnte die Expression dieses Defensins nach Stimulation von Keratinozyten mit UV-Licht, TNF- α , LPS, Interferon- γ (IFN- γ), Aminosäuren sowie Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) erreicht werden [Seo *et al.* 2001]. Die Stimulation von Odontoblasten mit rhBD-2 und LPS führte in zwei weiteren Studien jedoch zu einer Minderung der Expression von hBD-1 [Dommisch *et al.* 2007; Veerayutthwilai *et al.* 2007]. Ähnliche Beobachtungen wurden auch bei Untersuchungen des Pulpagewebes gemacht, wobei die Autoren als möglichen Grund für eine verminderte Expression von

hBD-1 im entzündeten Pulpagewebe eine Nekrose der Pulpa vermuteten [Hacker 2006].

In der vorliegenden Arbeit wurde ausschließlich vitales Gewebe untersucht. Das Gewebe stammte von Patienten, die jegliche Medikation in den letzten 24 Stunden verneint haben. Zusätzlich lassen sich methodische Unterschiede [Bongrazio *et al.* 2006] zu der vorherigen Studie feststellen, wie zum Beispiel die Lagerung der Pulpa, das Homogenisieren oder die eingesetzten RNA-Konzentrationen.

Ein möglicher Grund für die Beobachtung einer verstärkten Expression von hBD-1 im Pulpagewebe könnte die Tatsache sein, dass es während einer Entzündung zur Migration von weiteren defensin-exprimierenden Zellen in das Gewebe kommt [Boman 1995; Marshall 2004; van Wetering *et al.* 1999; Yang *et al.* 2007]. Frühere Untersuchungen zeigten, dass Monozyten und Makrophagen, die in den ersten Stadien der Entzündung im Gewebe vermehrt zu finden sind, ähnlich wie Epithelzellen humane beta-Defensine, darunter auch hBD-1, exprimieren [Wehkamp *et al.* 2003]. Zusätzlich liegen Studien vor, die eine verstärkte Genexpression von hBD-1 in den mit IFN- γ und LPS stimulierten Monozyten zeigen [Duits *et al.* 2002]. Ein anderer möglicher Grund für die beobachtete Steigerung der Expression von hBD-1 könnte ein ähnlicher genetischer Mechanismus wie bei Keratinozyten sein. Bei diesen Zellen wurden in der DNA ähnliche Motive in der Nukleotidensequenz bei hBD-1, IL-6 und IFN- γ kodierenden Genen nachgewiesen, die so genannten „consensus sites“. Bei der Aktivierung von IL-6 und IFN- γ könnte automatisch das hBD-1 Gen exprimiert werden [van Wetering *et al.* 1999].

In der vorliegenden Arbeit konnte die angenommene Nullhypothese teilweise widerlegt und die Alternativhypothese teilweise bestätigt werden, weil nicht bei allen untersuchten humanen beta-Defensinen eine signifikante Steigerung der Genexpression während der klinisch und molekularbiologisch diagnostizierten Pulpitis beobachtet wurde.

6.3 Ausblick

Die Bedeutung der humanen beta-Defensine in der entzündlichen Reaktion der Pulpa ist noch nicht ausreichend geklärt. Erste Ergebnisse lassen jedoch vermuten, dass humane beta-Defensine eine wichtige Rolle in der lokalen unspezifischen Immunantwort in der Pulpa spielen könnten. Ungeklärt bleibt auch, wie sich das Fortschreiten der Karies in den mineralisierten Geweben des Zahnes auf die

Expression und Synthese von antimikrobiellen Peptiden auswirkt und inwiefern beta-Defensine die Kariesprogression beeinflussen können.

Einige Laboruntersuchungen konnten interessante Erkenntnisse über Interaktionen von Defensinen mit verschiedenen kariogenen Bakterien liefern [Maisetta *et al.* 2006; Ouhara *et al.* 2005]. Dabei scheinen hBD-2, -3 und neuerdings auch hBD-4 aufgrund ihrer starken antimikrobiellen Eigenschaften größere Rolle als hBD-1 zu spielen [Batoni *et al.* 2006; Garcia *et al.* 2001; Maisetta *et al.* 2006; Maisetta *et al.* 2003; Maisetta *et al.* 2005; Maisetta *et al.* 2008]. Eine wichtige und interessante Erkenntnis über hBD-2 war die Entdeckung seiner Fähigkeit, die Differenzierung von Pulpafibroblasten in Odontoblasten und somit die Produktion vom tertiären Dentin zu regulieren. In einer früheren Studie konnte gezeigt werden, dass hBD-2 die Expression von Dentin-Sialophosphoprotein, welches in die Dentinogenese involviert ist, in Pulpazellen induzieren kann [Shiba *et al.* 2003]. So könnten zum Beispiel synthetisch hergestellte humane beta-Defensine als Bestandteil von Unterfüllungsmaterialien neben ihren antimikrobiellen Effekt auch eine initiierende Wirkung auf reparative Prozesse in Pulpa ausüben. Weitere Grundlagenstudien sind notwendig, um Interaktionen von humanen beta-Defensinen miteinander und mit anderen Komponenten des Immunsystems zu untersuchen.

Die bedeutendste Eigenschaft der beta-Defensine ist die antimikrobielle Wirkung. Die Erkenntnisse früherer Studien lassen jedoch vermuten, dass die Expression dieser Peptide in den Zellen der Pulpa geringer ist, als in den Epithelien, sodass die Konzentration von beta-Defensinen und deren Wirkung im Pulpagewebe wahrscheinlich als relativ gering einzuschätzen ist. Aus diesem Grund wurden bereits Versuche unternommen, die Expression von beta-Defensinen durch Eingriffe in die genomische DNA von Fibroblasten anzuregen. Dabei handelte es sich um eine Transfektion von defensin-produzierenden Keratinozyten und nicht defensin-produzierenden Fibroblasten mit retroviralen und lentiviralen, hBDs-tragenden Vektoren. Insbesondere nach einer Zugabe des lentiviralen Vektors SIN18cPPTRhMLV waren die Fibroblasten in der Lage, hBD-2 und -3 zu exprimieren und zu synthetisieren [Yin *et al.* 2006; Yin *et al.* 2006]. Auf dieser Grundlage wurde ein In-vivo- und ein In-vitro-Modell für die antimikrobielle Gentherapie entwickelt. Für diese Modelle wurden die hBD-2 Gene verwendet. In verschiedene murine und humane Zelllinien, darunter Fibroblasten, wurde ein hBD-2-tragender retroviraler Vektor transferiert. Daraufhin wurden diese Zellen mit *Escherichia coli* stimuliert, um die Expression von hBD-2 anzuregen. Die Auswertung

der Ergebnisse zeigte in allen transferierten Zelllinien eine Expression von hBD-2. Anschließend wurde das Experiment mit lebenden Labormäusen durchgeführt. Nach der Immunisierung wurden die Mäuse mit *Escherichia coli* infiziert. Das Gewebe der immunisierten Mäuse zeigte bei der Auswertung geringere Konzentration der vitalen Bakterien als bei den Mäusen der Kontrollgruppe. Auf diese Weise ist gelungen, die antimikrobielle Aktivität des hBD-2 und die Möglichkeit für eine Verstärkung der lokalen Immunantwort durch Transfektion der hBD-2 Gene in die nicht defensin-produzierende Zellen zu demonstrieren [Yin *et al.* 2006]. In einer weiteren Tierstudie ist es gelungen, eine adaptive Immunantwort gegen parodontopathogene Erreger mit Hilfe eines defensinhaltigen Präparates zu induzieren [Brogden *et al.* 2003].

Die Entwicklung eines medikamentösen oder präventiven Ansatzes für die Therapie der vitalen Pulpa mit humanen beta-Defensinen könnte vor den oben genannten Hintergründen in der Zukunft als längerfristiges Ziel gelten.

7 Schlussfolgerungen

Aus den Ergebnissen der durchgeführten Arbeit lassen sich folgende Schlussfolgerungen ziehen:

- (1) Proinflammatorische Zytokine TNF- α , COX-2, IL-1 β und -6 werden im Pulpagewebe exprimiert.
- (2) Während der Pulpitis kommt es in der Pulpa zu statistisch signifikanten Veränderungen der Genexpression von proinflammatorischen Zytokinen TNF- α , COX-2 und IL-1 β , jedoch nicht von IL-6.
- (3) Eine klinisch diagnostizierte Pulpitis lässt sich mit Hilfe der labordiagnostischen Methoden, der PCR, bestätigen.
- (4) Humane beta-Defensine-1, -2, -3 und -4 werden im Pulpagewebe exprimiert.
- (5) Während der Pulpitis kommt es in der Pulpa zu statistisch signifikanten Veränderungen der Genexpression von humanen beta-Defensinen-1 und -4, jedoch nicht von hBD-2 und -3.

Bei der Entzündung der menschlichen Zahnpulpa scheinen humane beta-Defensine eine Rolle zu spielen. Die genaue Bedeutung der beta-Defensine sowie ihre potenziellen therapeutischen und diagnostischen Anwendungsmöglichkeiten während Pulpitis bleibt weiteren Untersuchungen vorbehalten.

8 Zusammenfassung

Problemstellung: Humane beta-Defensine (hBDs) sind antimikrobielle Peptide, die in der Formierung der angeborenen, lokalen Immunantwort eine wichtige Rolle zu spielen scheinen. Die Bedeutung dieser Peptide in der menschlichen Zahnpulpa ist noch nicht ausreichend geklärt.

Zielsetzung: Das Ziel der Studie war, die Genexpression der humanen beta-Defensine-1, -2, -3 und -4 sowie TNF- α , COX-2, IL-1 β und -6 im gesunden und entzündeten Pulpagewebe zu untersuchen. Die Expression von proinflammatorischen Zytokinen diente in der vorliegenden Arbeit als Kontrolle der tatsächlich vorhandenen Entzündung.

Material und Methoden: Die gesunden und entzündeten Pulpen wurden entweder durch Vitalexstirpation oder post extractionem entnommen. Die Proben wurden unter Zugabe von RNA-Stabilisationsreagens sofort nach der Entnahme bis zur weiteren Verarbeitung in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert. Die mRNA wurde nach dem Homogenisieren der Proben mittels TRIzol-Methode extrahiert und anschließend in einer Reverse-Transkriptase-Reaktion in cDNA umgeschrieben. Die quantitative Analyse der Genexpression erfolgte mittels Real-Time-Polymerasekettenreaktion. Die Auswertung der Ergebnisse wurde mittels Mann-Whitney-U-Tests durchgeführt.

Ergebnisse: Die Genexpression von humanen beta-Defensinen und proinflammatorischen Zytokinen findet im Pulpagewebe statt. HBD-2 und hBD-3 wurden sowohl in gesunden als auch in entzündeten Pulpen nur schwach exprimiert. Für hBD-1 und hBD-4 konnten in entzündeten Pulpen im Vergleich zu gesunden Proben signifikant erhöhte Genexpressionen nachgewiesen werden. Die Genexpression für die proinflammatorischen Zytokine TNF- α , COX-2 und IL-1 β war gegenüber den gesunden bei den entzündeten Pulpen erhöht. Für das proinflammatorische Zytokin IL-6 konnten keine signifikante Unterschiede bezüglich der Genexpression gefunden werden.

Schlussfolgerung: Humane beta-Defensine-1 und -4 sowie die proinflammatorischen Zytokine TNF- α , COX-2 und IL-1 β werden in entzündeten Pulpen verstärkt exprimiert. Die Expression dieser Peptide spielt eine Rolle bei der entzündlichen Reaktion der menschlichen Pulpa.

Schlagwörter: beta-Defensine, Zytokine, Entzündung, Pulpitis, PCR

9 Abstract

Statement of problem: Human beta-defensins (hBDs) are antimicrobial peptides that play an important role in the innate host defense against bacterial invasion, contribute to promotion of adaptive immune responses and show chemotactic activities. Until now, the role of hBDs in the human dental pulp has not been adequately investigated.

Objectives: The aim of this study was to determine the expression of hBD-1, -2, -3, -4 and proinflammatory cytokines TNF- α , COX-2, IL-1 β and -6 in healthy and inflamed human dental pulps. In the present study cytokines were used as molecular diagnostic markers for pulpal inflammation.

Materials and methods: Samples of healthy and inflamed dental pulps were obtained from extracted third molars and during treatment of pulpitic teeth. Pulp tissue specimens were immediately frozen in liquid nitrogen with addition of RNA stabilization reagent and stored at -80 °C. Total RNA was extracted from homogenized pulp tissue using the TRIzol method. Gene expression was assessed using Reverse Transcriptase Reaction and Real-Time-PCR. Differences in gene expression between healthy and inflamed pulps were compared using Mann-Whitney-U test.

Results: The expression of human beta-defensins and cytokines was observed in human dental pulps. HBD-2 and -3 were only weakly expressed in healthy and inflamed pulps. In contrast, the expression of hBD-1 and -4 was significantly increased in inflamed compared to healthy pulps. The expression of TNF- α , COX-2, IL-1 β (but not IL-6) was also significantly increased during inflammation.

Conclusions: These results suggest that beta-defensins obviously play a role in the innate pulpal host defence.

Keywords: beta-Defensines, cytokines, inflammation, pulpitis, PCR

10 Literaturverzeichnis

1. Abiko Y, Jinbu Y, Noguchi T, Nishimura M, Kusano K, Amaratunga P, Shibata T, Kaku T. Upregulation of human beta-defensin 2 peptide expression in oral lichen planus, leukoplakia and candidiasis. An immunohistochemical study. *Pathol Res Pract* 2002;198:537-42.
2. Abiko Y, Nishimura M, Kaku T. Defensins in saliva and the salivary glands. *Med Electron Microsc* 2003;36:247-52.
3. Abiko Y, Suraweera AK, Nishimura M, Arakawa T, Takuma T, Mizoguchi I, Kaku T. Differential expression of human beta-defensin 2 in keratinized and non-keratinized oral epithelial lesions; immunohistochemistry and in situ hybridization. *Virchows Arch* 2001;438:248-53.
4. Ashitani J, Matsumoto N, Nakazato M. Elevated levels of antimicrobial peptides in bronchoalveolar lavage fluid in patients with chronic eosinophilic pneumonia. *Respiration* 2007;74:69-75.
5. Bajaj-Elliott M, Fedeli P, Smith GV, Domizio P, Maher L, Ali RS, Quinn AG, Farthing MJ. Modulation of host antimicrobial peptide (beta-defensins 1 and 2) expression during gastritis. *Gut* 2002;51:356-61.
6. Batoni G, Maisetta G, Esin S, Campa M. Human beta-defensin-3: a promising antimicrobial peptide. *Mini Rev Med Chem* 2006;6:1063-73.
7. Baume L. The biology of pulp and dentine. A historic, terminologic-taxonomic, histologic-biochemical, embryonic and clinical survey. *Monogr Oral Sci* 1980;8:1-220.
8. Beer R, Baumann M, Kielbassa A (eds.). *Taschenatlas der Endodontie*. Thieme, Stuttgart 2004:2-12
9. Bensch KW, Raida M, Magert HJ, Schulz-Knappe P, Forssmann WG. hBD-1: a novel beta-defensin from human plasma. *FEBS Lett* 1995;368:331-35.
10. Bissell J, Joly S, Johnson GK, Organ CC, Dawson D, McCray PB, Jr., Guthmiller JM. Expression of beta-defensins in gingival health and in periodontal disease. *J Oral Pathol Med* 2004;33:278-85.
11. Boman HG. Peptide antibiotics and their role in innate immunity. *Annu Rev Immunol* 1995;13:61-92.

12. Bongrazio M, Da Silva-Azevedo L, Bergmann EC, Baum O, Hinz B, Pries AR, Zakrzewicz A. Shear stress modulates the expression of thrombospondin-1 and CD36 in endothelial cells in vitro and during shear stress-induced angiogenesis in vivo. *Int J Immunopathol Pharmacol* 2006;19:35-48.
13. Brogden KA, Heidari M, Sacco RE, Palmquist D, Guthmiller JM, Johnson GK, Jia HP, Tack BF, McCray PB. Defensin-induced adaptive immunity in mice and its potential in preventing periodontal disease. *Oral Microbiol Immunol* 2003;18:95-99.
14. CGE. Committee Statement: The use of human body materials for purposes of medical research. Accessed on 20.02.2003 (<http://www.zentrale-ethikkommission.de/page.asp?his=0.1.22>).
15. Chang YC, Huang FM, Yang SF, Liu CM, Lai CC, Chan Y, Hsieh YS. Induction of cyclooxygenase-2 mRNA and protein expression in human pulp cells stimulated with black-pigmented bacteroides. *J Endod* 2003;29:240-43.
16. Chen H, Xu Z, Peng L, Fang X, Yin X, Xu N, Cen P. Recent advances in the research and development of human defensins. *Peptides* 2006;27:931-40.
17. Chiego D. Histology of pulp. In J Avery (ed.). *Oral Development and Histology*. Thieme, New York 1994:262-81.
18. Cohen JS, Reader A, Fertel R, Beck M, Meyers WJ. A radioimmunoassay determination of the concentrations of prostaglandins E2 and F2alpha in painful and asymptomatic human dental pulps. *J Endod* 1985;11:330-35.
19. Coil J, Tam E, Waterfield JD. Proinflammatory cytokine profiles in pulp fibroblasts stimulated with lipopolysaccharide and methyl mercaptan. *J Endod* 2004;30:88-91.
20. D'Souza R, Brown LR, Newland JR, Levy BM, Lachman LB. Detection and characterization of interleukin-1 in human dental pulps. *Arch Oral Biol* 1989;34:307-13.
21. Dale BA. Periodontal epithelium: a newly recognized role in health and disease. *Periodontol* 2000 2002;30:70-78.
22. Dale BA, Kimball JR, Krisanaprakornkit S, Roberts F, Robinovitch M, O'Neal R, Valore EV, Ganz T, Anderson GM, Weinberg A. Localized antimicrobial peptide expression in human gingiva. *J Periodontal Res* 2001;36:285-94.
23. Dale BA, Krisanaprakornkit S. Defensin antimicrobial peptides in the oral cavity. *J Oral Pathol Med* 2001;30:321-27.

24. Diamond DL, Kimball JR, Krisanaprakornkit S, Ganz T, Dale BA. Detection of beta-defensins secreted by human oral epithelial cells. *J Immunol Methods* 2001;256:65-76.
25. Dommisch H, Acil Y, Dunsche A, Winter J, Jepsen S. Differential gene expression of human beta-defensins (hBD-1, -2, -3) in inflammatory gingival diseases. *Oral Microbiol Immunol* 2005;20:186-90.
26. Dommisch H, Winter J, Acil Y, Dunsche A, Tiemann M, Jepsen S. Human beta-defensin (hBD-1, -2) expression in dental pulp. *Oral Microbiol Immunol* 2005;20:163-66.
27. 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* 2007;40:300-307.
28. Duits LA, Ravensbergen B, Rademaker M, Hiemstra PS, Nibbering PH. Expression of beta-defensin 1 and 2 mRNA by human monocytes, macrophages and dendritic cells. *Immunology* 2002;106:517-25.
29. Dunsche A, Acil Y, Dommisch H, Siebert R, Schroder JM, Jepsen S. The novel human beta-defensin-3 is widely expressed in oral tissues. *Eur J Oral Sci* 2002;110:121-24.
30. Feucht EC, DeSanti CL, Weinberg A. Selective induction of human beta-defensin mRNAs by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in primary and immortalized oral epithelial cells. *Oral Microbiol Immunol* 2003;18:359-63.
31. Garcia JR, Krause A, Schulz S, Rodriguez-Jimenez FJ, Kluver E, Adermann K, Forssmann U, Frimpong-Boateng A, Bals R, Forssmann WG. Human beta-defensin 4: a novel inducible peptide with a specific salt-sensitive spectrum of antimicrobial activity. *Faseb J* 2001;15:1819-21.
32. Gulbins E, Lang K. Immunsystem. In R Schmidt, G Tews (eds.). *Physiologie des Menschen*. Springer, Berlin 2007:551-62.
33. Hacker J: Differentielle Expression humaner beta-Defensine-1 und -2 in gesunder und entzündeter Zahnpulpa. *Zahnmed Diss, Bonn* 2006:31-46
34. Hahn CL, Liewehr FR. Innate immune responses of the dental pulp to caries. *J Endod* 2007a;33:643-51.
35. Hahn CL, Liewehr FR. Relationships between caries bacteria, host responses, and clinical signs and symptoms of pulpitis. *J Endod* 2007b;33:213-19.

36. Hahn CL, Liewehr FR. Update on the adaptive immune responses of the dental pulp. *J Endod* 2007c;33:773-81.
37. Hahn H, Klein P, Giesbrecht P, Streeck R. Bakterien: Definition und Aufbau In H Hahn (ed.). *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie*. Springer, Berlin 2005:169-79.
38. Hammer F: Vergleich von Nd:YAG Laserkürettage und konventioneller Wurzelreinigung bezüglich histologischer und morphologischer Veränderungen ; eine in vivo Studie. *Zahnmed Diss, Marburg* 1998:35-42
39. Hazrati E, Galen B, Lu W, Wang W, Ouyang Y, Keller MJ, Lehrer RI, Herold BC. Human alpha- and beta-defensins block multiple steps in herpes simplex virus infection. *J Immunol* 2006;177:8658-66.
40. Hellwig E, Klimek J, Attin T (eds.). *Einführung in die Zahnerhaltung*. Urban & Fischer, München, Jena 1999:218-22
41. Herbst H, Hubner JH. Teaching of histopathology on the Internet. *Verh Dtsch Ges Pathol* 2001;85:72-79.
42. Hiratsuka T, Nakazato M, Ashitani J, Matsukura S. A study of human beta-defensin-1 and human beta-defensin-2 in airway mucosal defense. *Kansenshogaku Zasshi* 1999;73:156-62.
43. Hosoya S, Matsushima K. Stimulation of interleukin-1 beta production of human dental pulp cells by *Porphyromonas endodontalis* lipopolysaccharide. *J Endod* 1997;23:39-42.
44. Hosoya S, Matsushima K, Ohbayashi E, Yamazaki M, Shibata Y, Abiko Y. Stimulation of interleukin-1beta-independent interleukin-6 production in human dental pulp cells by lipopolysaccharide. *Biochem Mol Med* 1996;59:138-43.
45. Huang GT, Potente AP, Kim JW, Chugal N, Zhang X. Increased interleukin-8 expression in inflamed human dental pulps. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1999;88:214-20.
46. Iwamura C, Nakayama T. Toll-like receptors in the respiratory system: their roles in inflammation. *Curr Allergy Asthma Rep* 2008;8:7-13.
47. Jelkmann W. Blut. In R Schmidt, G Tews (eds.). *Physiologie des Menschen*. Springer, Berlin 2007: 523-49.
48. Jiang HW, Zhang W, Ren BP, Zeng JF, Ling JQ. Expression of toll like receptor 4 in normal human odontoblasts and dental pulp tissue. *J Endod* 2006;32:747-51.

49. Joly S, Maze C, McCray PB, Jr., Guthmiller JM. Human beta-defensins 2 and 3 demonstrate strain-selective activity against oral microorganisms. *J Clin Microbiol* 2004;42:1024-29.
50. Jontell M, Okiji T, Dahlgren U, Bergenholtz G. Immune defense mechanisms of the dental pulp. *Crit Rev Oral Biol Med* 1998;9:179-200.
51. Junqueira L, Carneiro J (eds.). *Histologie*. Springer, Berlin 1996:421-35
52. Jurevic RJ, Bai M, Chadwick RB, White TC, Dale BA. Single-nucleotide polymorphisms (SNPs) in human beta-defensin 1: high-throughput SNP assays and association with *Candida* carriage in type I diabetics and nondiabetic controls. *J Clin Microbiol* 2003;41:90-96.
53. Kern WV. Antibiotics, new pathogens, new drug resistance. *Ther Umsch* 1999;56:691-97.
54. Klimm W (ed.). *Endodontologie. Grundlagen und Praxis*. Deutscher Ärzte-Verlag, Köln 2003:99-123
55. Kokkas AB, Goulas A, Varsamidis K, Mirtsou V, Tziafas D. Irreversible but not reversible pulpitis is associated with up-regulation of tumour necrosis factor-alpha gene expression in human pulp. *Int Endod J* 2007;40:198-203.
56. Krisanaprakornkit S, Kimball JR, Weinberg A, Darveau RP, Bainbridge BW, Dale BA. Inducible expression of human beta-defensin 2 by *Fusobacterium nucleatum* in oral epithelial cells: multiple signaling pathways and role of commensal bacteria in innate immunity and the epithelial barrier. *Infect Immun* 2000;68:2907-15.
57. Krisanaprakornkit S, Weinberg A, Perez CN, Dale BA. Expression of the peptide antibiotic human beta-defensin 1 in cultured gingival epithelial cells and gingival tissue. *Infect Immun* 1998;66:4222-28.
58. 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;107:131-37.
59. Lin SK, Kuo MY, Wang JS, Lee JJ, Wang CC, Huang S, Shun CT, Hong CY. Differential regulation of interleukin-6 and inducible cyclooxygenase gene expression by cytokines through prostaglandin-dependent and -independent mechanisms in human dental pulp fibroblasts. *J Endod* 2002;28:197-201.
60. Liu F, Abiko Y, Nishimura M, Kusano K, Shi S, Kaku T. Expression of inflammatory cytokines and beta-defensin 1 mRNAs in porcine epithelial rests of Malassez in vitro. *Med Electron Microsc* 2001;34:174-78.

61. Lourenzoni MR, Namba AM, Caseli L, Degreve L, Zaniquelli ME. Study of the interaction of human defensins with cell membrane models: relationships between structure and biological activity. *J Phys Chem B* 2007;111:11318-29.
62. Lu HX, Xiao MZ, Niu ZY, Guo XM, Zhao SL, Wang HG, Guo HY. Effect of IL-1ra on human dental pulp cells and pulpal inflammation. *Int Endod J* 2002;35:807-11.
63. Lu Q, Jayatilake JA, Samaranayake LP, Jin L. Hyphal invasion of *Candida albicans* inhibits the expression of human beta-defensins in experimental oral candidiasis. *J Invest Dermatol* 2006;126:2049-56.
64. Lu Q, Jin L, Darveau RP, Samaranayake LP. Expression of human beta-defensins-1 and -2 peptides in unresolved chronic periodontitis. *J Periodontal Res* 2004;39:221-27.
65. Lu Q, Samaranayake LP, Darveau RP, Jin L. Expression of human beta-defensin-3 in gingival epithelia. *J Periodontal Res* 2005;40:474-81.
66. Maisetta G, Batoni G, Esin S, Florio W, Bottai D, Favilli F, Campa M. In vitro bactericidal activity of human beta-defensin 3 against multidrug-resistant nosocomial strains. *Antimicrob Agents Chemother* 2006;50:806-9.
67. Maisetta G, Batoni G, Esin S, Luperini F, Pardini M, Bottai D, Florio W, Giuca MR, Gabriele M, Campa M. Activity of human beta-defensin 3 alone or combined with other antimicrobial agents against oral bacteria. *Antimicrob Agents Chemother* 2003;47:3349-51.
68. Maisetta G, Batoni G, Esin S, Raco G, Bottai D, Favilli F, Florio W, Campa M. Susceptibility of *Streptococcus mutans* and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* to bactericidal activity of human beta-defensin 3 in biological fluids. *Antimicrob Agents Chemother* 2005;49:1245-48.
69. Maisetta G, Di Luca M, Esin S, Florio W, Brancatisano FL, Bottai D, Campa M, Batoni G. Evaluation of the inhibitory effects of human serum components on bactericidal activity of human beta defensin 3. *Peptides* 2008;29:1-6.
70. Marsh P, Martin M (eds.). *Orale Mikrobiologie*. Thieme, Stuttgart 2002:1-5
71. Marshall RI. Gingival defensins: linking the innate and adaptive immune responses to dental plaque. *Periodontol 2000* 2004;35:14-20.
72. Mathews M, Jia HP, Guthmiller JM, Losh G, Graham S, Johnson GK, Tack BF, McCray PB, Jr. Production of beta-defensin antimicrobial peptides by the oral mucosa and salivary glands. *Infect Immun* 1999;67:2740-5.

73. McLachlan JL, Sloan AJ, Smith AJ, Landini G, Cooper PR. S100 and cytokine expression in caries. *Infect Immun* 2004;72:4102-8.
74. Meyer W, Scheele E. Die Anatomie der Wurzelkanäle. *Dtsch Zahnärztl Z* 1954;497-500.
75. Morgera F, Antcheva N, Pacor S, Quaroni L, Berti F, Vaccari L, Tossi A. Structuring and interactions of human beta-defensins 2 and 3 with model membranes. *J Pept Sci* 2008;14:518-23.
76. Mutoh N, Tani-Ishii N, Tsukinoki K, Chieda K, Watanabe K. Expression of toll-like receptor 2 and 4 in dental pulp. *J Endod* 2007;33:1183-6.
77. Nagaoka S, Tokuda M, Sakuta T, Taketoshi Y, Tamura M, Takada H, Kawagoe M. Interleukin-8 gene expression by human dental pulp fibroblast in cultures stimulated with *Prevotella intermedia* lipopolysaccharide. *J Endod* 1996;22:9-12.
78. Nakanishi T, Matsuo T, Ebisu S. Quantitative analysis of immunoglobulins and inflammatory factors in human pulpal blood from exposed pulps. *J Endod* 1995;21:131-36.
79. Nakanishi T, Shimizu H, Hosokawa Y, Matsuo T. An immunohistological study on cyclooxygenase-2 in human dental pulp. *J Endod* 2001;27:385-88.
80. O'Neil DA, Porter EM, Elewaut D, Anderson GM, Eckmann L, Ganz T, Kagnoff MF. Expression and regulation of the human beta-defensins hBD-1 and hBD-2 in intestinal epithelium. *J Immunol* 1999;163:6718-24.
81. O'Neill LA. How Toll-like receptors signal: what we know and what we don't know. *Curr Opin Immunol* 2006;18:3-9.
82. Ouhara K, Komatsuzawa H, Yamada S, Shiba H, Fujiwara T, Ohara M, Sayama K, Hashimoto K, Kurihara H, Sugai M. Susceptibilities of periodontopathogenic and cariogenic bacteria to antibacterial peptides, beta-defensins and LL37, produced by human epithelial cells. *J Antimicrob Chemother* 2005;55:888-96.
83. Pazgier M, Li X, Lu W, Lubkowski J. Human defensins: synthesis and structural properties. *Curr Pharm Des* 2007;13:3096-118.
84. Peschel A. How do bacteria resist human antimicrobial peptides? *Trends Microbiol* 2002;10:179-86.
85. Pezelj-Ribaric S, Anic I, Brekalo I, Miletic I, Hasan M, Simunovic-Soskic M. Detection of tumor necrosis factor alpha in normal and inflamed human dental pulps. *Arch Med Res* 2002;33:482-84.

86. Piattelli A, Rubini C, Fioroni M, Tripodi D, Strocchi R. Transforming growth factor-beta 1 (TGF-beta 1) expression in normal healthy pulps and in those with irreversible pulpitis. *Int Endod J* 2004;37:114-19.
87. Piesco N. Histology of dentin. In J Avery (ed.). *Oral Development and Histology*. Thieme, New York 1994:242-60.
88. Pivarcsi A, Koreck A, Bodai L, Szell M, Szeg C, Belso N, Kenderessy-Szabo A, Bata-Csorgo Z, Dobozy A, Kemeny L. Differentiation-regulated expression of Toll-like receptors 2 and 4 in HaCaT keratinocytes. *Arch Dermatol Res* 2004;296:120-24.
89. Premratanachai P, Joly S, Johnson GK, McCray PB, Jr., Jia HP, Guthmiller JM. Expression and regulation of novel human beta-defensins in gingival keratinocytes. *Oral Microbiol Immunol* 2004;19:111-17.
90. Pries A, Zakrzewicz A. Abwehr und Immunität. In P Deetjen, E Speckmann, J Hescheler (eds.). *Physiologie*. Urban & Fischer, München 2005:379-415.
91. Quinones-Mateu ME, Lederman MM, Feng Z, Chakraborty B, Weber J, Rangel HR, Marotta ML, Mirza M, Jiang B, Kiser P, Medvik K, Sieg SF, Weinberg A. Human epithelial beta-defensins 2 and 3 inhibit HIV-1 replication. *Aids* 2003;17:39-48.
92. Rauschenberger CR, Bailey JC, Cootauco CJ. Detection of human IL-2 in normal and inflamed dental pulps. *J Endod* 1997;23:366-70.
93. Reinhold P, Rosenbruch M, Theegarten D, Dalhoff K. Pulmonary infection models--7. Workshop on work crises "Comparative pathology and pathophysiology of the respiratory system" of the German Veterinary Medical Society in co-operation with the sections of infectious diseases and tuberculosis and cell biology of the German Society of Pneumology on 17 Mar 2005 om Berlin. *Pneumologie* 2005;59:411-27.
94. Sahasrabudhe KS, Kimball JR, Morton TH, Weinberg A, Dale BA. Expression of the antimicrobial peptide, human beta-defensin 1, in duct cells of minor salivary glands and detection in saliva. *J Dent Res* 2000;79:1669-74.
95. Saitoh M, Abiko Y, Shimabukuro S, Kusano K, Nishimura M, Arakawa T, Nakashima K, Takuma T, Kaku T, Igarashi S. Correlated expression of human beta defensin-1, -2 and -3 mRNAs in gingival tissues of young children. *Arch Oral Biol* 2004;49:799-803.
96. Sambrook J, Fritsch E, Maniatis T. Extraction, purification, and analysis of messenger RNA from eukaryotic cells (chapter 7). In Ford N, Nolan C, Ferguson M (ed.). *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbour 1989: 7.3–7.87.

97. Sawaki K, Mizukawa N, Yamaai T, Yoshimoto T, Nakano M, Sugahara T. High concentration of beta-defensin-2 in oral squamous cell carcinoma. *Anticancer Res* 2002;22:2103-7.
98. Schäfer E. Struktur der Pulpa und ihre Erkrankungsformen. In D Heidemann (ed.). *Endodontie*. Urban & Fischer, München 2005:12-13.
99. Schneider JJ, Unholzer A, Schaller M, Schafer-Korting M, Korting HC. Human defensins. *J Mol Med* 2005;83:587-95.
100. Schroder JM. Epithelial peptide antibiotics. *Biochem Pharmacol* 1999;57:121-34.
101. Schumacher GH, Schmidt H, Böring H, Richter W (eds.). *Anatomie und Biochemie der Zähne*. Verlag Volk und Gesundheit, Berlin 1990: 211-27
102. Selsted ME, Ouellette AJ. Mammalian defensins in the antimicrobial immune response. *Nat Immunol* 2005;6:551-57.
103. Seo SJ, Ahn SW, Hong CK, Ro BI. Expressions of beta-defensins in human keratinocyte cell lines. *J Dermatol Sci* 2001;27:183-91.
104. Shelburne CE, Coulter WA, Olguin D, Lantz MS, Lopatin DE. Induction of beta-defensin resistance in the oral anaerobe *Porphyromonas gingivalis*. *Antimicrob Agents Chemother* 2005;49:183-87.
105. Shiba H, Mouri Y, Komatsuzawa H, Ouhara K, Takeda K, Sugai M, Kinane DF, Kurihara H. Macrophage inflammatory protein-3alpha and beta-defensin-2 stimulate dentin sialophosphoprotein gene expression in human pulp cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;306:867-71.
106. Singh PK, Jia HP, Wiles K, Hesselberth J, Liu L, Conway BA, Greenberg EP, Valore EV, Welsh MJ, Ganz T, Tack BF, McCray PB, Jr. Production of beta-defensins by human airway epithelia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:14961-66.
107. Smith A. Dentin Formation and Repair. In K Hargreaves, H Goodis (eds.). *Setzer and Bender's dental pulp*. Quintessence, Berlin 2002:41-63.
108. Strub J, Türp J, Witkowski S, Hürzeler M, Kern M (ed.). *Curriculum Prothetik*. Quintessenz, Berlin 1994:585-96
109. Sun L, Finnegan CM, Kish-Catalone T, Blumenthal R, Garzino-Demo P, La Terra Maggiore GM, Berrone S, Kleinman C, Wu Z, Abdelwahab S, Lu W, Garzino-Demo A. Human beta-defensins suppress human immunodeficiency virus infection: potential role in mucosal protection. *J Virol* 2005;79:14318-29.

110. Tao R, Jurevic RJ, Coulton KK, Tsutsui MT, Roberts MC, Kimball JR, Wells N, Berndt J, Dale BA. Salivary antimicrobial peptide expression and dental caries experience in children. *Antimicrob Agents Chemother* 2005;49:3883-88.
111. Tillmann B (ed.). *Farbatlas der Anatomie Zahnmedizin / Humanmedizin: Kopf - Hals - Rumpf*. Thieme, Stuttgart 1997:98-122
112. Torneck C. Dentin-pulp complex. In A Ten Cate (ed.). *Development, Structure, and Function*. The C. V. Mosby Company, St. Louis, Toronto, Princeton 1985:146-82.
113. van Wetering S, Sterk PJ, Rabe KF, Hiemstra PS. Defensins: key players or bystanders in infection, injury, and repair in the lung? *J Allergy Clin Immunol* 1999;104:1131-38.
114. Vankeerberghen A, Nuytten H, Dierickx K, Quiryne M, Cassiman JJ, Cuppens H. Differential induction of human beta-defensin expression by periodontal commensals and pathogens in periodontal pocket epithelial cells. *J Periodontol* 2005;76:1293-303.
115. Veerayutthwilai O, Byers MR, Pham TT, Darveau RP, Dale BA. Differential regulation of immune responses by odontoblasts. *Oral Microbiol Immunol* 2007;22:5-13.
116. Warnke PH, Springer IN, Russo PA, Wiltfang J, Essig H, Kosmahl M, Sherry E, Acil Y. Innate immunity in human bone. *Bone* 2006;38:400-8.
117. Wehkamp J, Harder J, Weichenthal M, Mueller O, Herrlinger KR, Fellermann K, Schroeder JM, Stange EF. Inducible and constitutive beta-defensins are differentially expressed in Crohn's disease and ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis* 2003;9:215-23.
118. Wenghoefer M, Pantelis A, Dommisch H, Reich R, Martini M, Allam JP, Berge S, Jepsen S, Winter J. Decreased gene expression of human beta-defensin-1 in the development of squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2008;37:660-63.
119. White SH, Wimley WC, Selsted ME. Structure, function, and membrane integration of defensins. *Curr Opin Struct Biol* 1995;5:521-27.
120. Yamaguchi M, Kojima T, Kanekawa M, Aihara N, Nogimura A, Kasai K. Neuropeptides stimulate production of interleukin-1 beta, interleukin-6, and tumor necrosis factor-alpha in human dental pulp cells. *Inflamm Res* 2004;53:199-204.

121. Yanagi S, Ashitani J, Ishimoto H, Date Y, Mukae H, Chino N, Nakazato M. Isolation of human beta-defensin-4 in lung tissue and its increase in lower respiratory tract infection. *Respir Res* 2005;6:130.
122. Yang D, Liu ZH, Tewary P, Chen Q, de la Rosa G, Oppenheim JJ. Defensin participation in innate and adaptive immunity. *Curr Pharm Des* 2007;13:3131-39.
123. Yang LC, Tsai CH, Huang FM, Liu CM, Lai CC, Chang YC. Induction of interleukin-6 gene expression by pro-inflammatory cytokines and black-pigmented *Bacteroides* in human pulp cell cultures. *Int Endod J* 2003;36:352-57.
124. Yin C, Dang HN, Gazor F, Huang GT. Mouse salivary glands and human beta-defensin-2 as a study model for antimicrobial gene therapy: technical considerations. *Int J Antimicrob Agents* 2006;28:352-60.
125. Yin C, Dang HN, Zhang HB, Gazor F, Kim D, Sorensen OE, Huang GT. Capacity of human beta-defensin expression in gene-transduced and cytokine-induced cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2006;339:344-54.
126. Yoshimura A, Kaneko T, Kato Y, Golenbock DT, Hara Y. Lipopolysaccharides from periodontopathic bacteria *Porphyromonas gingivalis* and *Capnocytophaga ochracea* are antagonists for human toll-like receptor 4. *Infect Immun* 2002;70:218-25.
127. Zehnder M, Delaleu N, Du Y, Bickel M. Cytokine gene expression-part of host defence in pulpitis. *Cytokine* 2003;22:84-8.

11 Anhang

11.1 Geräte- und Materialienliste

1. Brutschrank (Heraeus, Hanau, Deutschland)
2. Chloroform (Caelo, Hilden, Deutschland)
3. Diamantierte Bohrer (Komet, Lemgo, Deutschland)
4. DNA-Aufreinigungs kit, QIAquick (Qiagen, Hilden, Deutschland)
5. Dounce-Homogenisators (Sartorius, Göttingen, Deutschland)
6. Fluoreszenzfarbstoff, QuantiTect SYBRgreen® (Qiagen, Hilden, Deutschland)
7. Hybaid Hybridisation Ofen (Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, USA)
8. Isopropanol (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland)
9. Kit für Reverse Transkription (Promega, Wisconsin, USA)
10. Kryoröhrchen (Nunc, Roskilde, Dänemark)
11. Kulturflaschen (TPP, Trasadingen, Schweiz)
12. Laminarbank (Heraeus, Hanau, Deutschland)
13. LPS (Sigma-Aldrich, München, Deutschland)
14. Mikroskop (Carl Zeiss, New York, USA)
15. Nukleotidenmix (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland)
16. PCR-Softstrips 0,2 µl (Biozym Scientific GmbH, Hess. Oldendorf, Deutschland)
17. Pipetten (Nunc, Roskilde, Dänemark)
18. Primer für die PCR (MWG Biothec, Ebersberg, Deutschland)
19. Reaktionsgefäße 1,5 ml (Nunc, Roskilde, Dänemark)
20. RNA-Extraktionskit, RNEasy Minikit (Qiagen, Hilden, Deutschland)
21. RNA-Extraktionskit, TRIzol (Invitrogen, California, USA)

22. RNA-Stabilisationsreagenz, RNAlater (Qiagen, Hilden, Deutschland)
23. RT-PCR-Cycler (Rotor Gene, Corbett Robotics, Australien)
24. Spektrometer (Biochrom, Cambridge, England)
25. SPSS-Software (SPSS Inc., Chicago, USA)
26. Stickstoffbehälter (Taylor-Wharton, Husum, Deutschland)
27. UNO-Thermoblock (Biometra, Göttingen, Deutschland)
28. UV-Licht Kammer (Vilber Lourmat, Marne-la-Vallée, Frankreich)
29. Waage (Sartorius, Göttingen, Deutschland)
30. Zelllinie HaCaT (Deutsches Krebsforschungsinstitut, Heidelberg, Deutschland)
31. Zentrifuge (Eppendorf, Hamburg, Deutschland)

11.2 Abkürzungsverzeichnis

1. Abb.	=	Abbildung
2. AcNo	=	„Accession Number“, Identifikationsnummer für DNA-Frequenzen
3. APs	=	antimikrobiellen Peptide
4. cDNA	=	“copy Desoxyribonukleinsäure”
5. ° C	=	(Grad) Celsius
6. COX-2	=	Cyclooxygenase-2
7. C _t	=	Schwellenzyklus
8. DNA	=	“desoxyribonucleic acid” Desoxyribonukleinsäure
9. <i>E. coli</i>	=	<i>Escherichia coli</i>
10. Fa.	=	Firma
11. g	=	Gramm
12. HBD	=	humanes beta-Defensin
13. HNP	=	humanes neutrophile Peptid
14. IFN	=	Interferon
15. IL	=	Interleukin
16. kb	=	Kilobasen
17. kDa	=	Kilodalton
18. LPS	=	Lipopolysaccharide
19. M	=	Mol
20. mM.	=	Millimolar
21. min	=	Minute
22. ml	=	Milliliter
23. mm	=	Millimeter
24. mRNA	=	„messenger ribonucleic acid“, Messenger-Ribonukleinsäure
25. n	=	“number”, Fallzahl
26. ng	=	Nanogram
27. nm	=	Nanometer
28. OD	=	Optische Dichte

29. p	=	Signifikanzbereich
30. PCR	=	„polymerase chain reaction“, Polymerasekettenreaktion
31. pH	=	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
32. Poly-A ⁺	=	Polyadenylatschwanz der mRNA
33. rhBD-2	=	rekombinantes humane beta-Defensin-2
34. RNA	=	„ribonucleic acid“, Ribonukleinsäure
35. rpm	=	„revolutions per minute“, Umdrehungen pro Minute
36. RT	=	Reverse Transkription
37. RT-PCR	=	Reverse Transkription- Polymerasekettenreaktion
38. s	=	„second“, Sekunde
39. Taq	=	<i>Thermus aquaticus</i>
40. TBE	=	TRIS-Borsäure-EDTA
41. TGF-β	=	Transforming Growth Factor-beta
42. TLR	=	Toll-like Rezeptor
43. TNF-α	=	Tumor Necrosis Factor-alpha
44. U	=	„unit(s)“, Einheit(en)
45. UV	=	Ultraviolett
46. µg	=	Mikrogramm
47. µl	=	Mikroliter

11.3 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen danken, die mir mein Studium und die Vollendung meiner Promotion ermöglichten:

Herrn Prof. Dr. Andrej M. Kielbassa und Herrn Prof. Dr. Axel Pries danke ich für die Möglichkeit, in ihren Arbeitskreisen meine Promotionsarbeit anfertigen zu dürfen.

Herrn Prof. Dr. Jörg Eberhard danke ich für die anspruchsvolle und interessante Promotions-Thematik.

Herrn Dr. Andreas Zakrzewicz danke ich sehr für die Einweisung und Hilfe bei der Durchführung der Polymerasekettenreaktion. Dr. Luis DaSilva-Azevedo möchte ich für die Unterstützung bei der Arbeit mit Zellkulturen danken.

Für viele fruchtbare Gespräche und Anregungen danke ich sehr Dr. Peter Tschope, Dr. Hendrik Meyer-Lückel, Stephan Bogner und Juliane Vaudt.

Diese Gelegenheit möchte ich nutzen, Frau Prof. Dr. Andrea Maria Schmidt-Westhausen, Herrn Dr. Dietrich Klinggräff und Ilja Klück sehr für ihre großen Bemühungen bei der Beschaffung des Materials zu danken.

Ganz besonders möchte ich mich bei Herrn Dr. Sebastian Paris für Durchsicht des Manuskripts, sowie für ständige fachliche und moralische Unterstützung in allen Belangen meiner Promotionsarbeit bedanken.

Natürlich danke ich meinen Eltern Olga und Anatoli Feldtser, die mir das Studium erst ermöglichten und mich jederzeit unterstützten, sowie meiner Freundin Tatjana, die meiner Arbeit viel Verständnis und Geduld entgegenbrachte.

11.4 Eidesstattliche Erklärung

Ich, Michael Wolgin erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: „Expression humaner beta-Defensine und proinflammatorischer Zytokine im gesunden und entzündeten Pulpagewebe“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.

Berlin, den 31.01.2009

Michael Wolgin