

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

**Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie der  
Technischen Universität München, Klinikum rechts der Isar  
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. Dr. K.-D. Wolff)**

**Quantitative Untersuchungen zur differenzierten  
Expression von Effektormolekülen der angeborenen  
Immunabwehr zwischen extraoraler Haut und  
Mundschleimhaut**

Christian Müller

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin  
der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen  
Grades eines

**Doktors der Zahnheilkunde**

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. E. J. Rummeny

Prüfer der Dissertation:

1. Priv.-Doz. Dr. Dr. M. R. Kesting
2. Univ.-Prof. Dr. Dr. K.-D. Wolff

Die Dissertation wurde am 07.02.13 bei der Technischen Universität München  
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin  
am 13.11.13 angenommen.

Meinen Eltern

*Teilergebnisse dieser Dissertationsschrift wurden veröffentlicht:*

Kesting M. R., Mueller, C., Wagenpfeil, S., Stoeckelhuber, M., Steiner, T., Bauer, F., et al. Quantitative comparison of the expression of antimicrobial peptides in the oral mucosa and extraoral skin. *Br J Oral Maxillofac Surg.* 2012 Jul; 50(5): 447-453

**Inhaltsverzeichnis**

<b>Tabellenverzeichnis</b>	vi
<b>Abbildungsverzeichnis</b>	viii
<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	ix
<b>1. Einleitung</b>	1
<b>2. Problemstellung</b>	8
<b>3. Material und Methoden</b>	9
3.1. Probenentnahme	9
3.2. Quantitative Echtzeit-Polymerase Kettenreaktion	10
3.2.1. Herstellung von Standards für die quantitative Echtzeit-Polymerase Kettenreaktion	11
3.2.2. Primer	13
3.2.3. Gelelektrophorese	13
3.2.4. Isolation der Ribonukleinsäure	15
3.2.5. Reverse Transkription	17
3.2.6. Quantitative Echtzeit-Polymerase Kettenreaktion	18
3.2.7. Statistische Auswertung	19
3.3. Western blot	20
3.3.1. Probenaufarbeitung	20
3.3.2. Proteinbestimmung	21
3.3.3. Gelelektrophorese	24
3.3.3.1. Herstellung des Polyacrylamidgels	24
3.3.3.2. Probenvorbereitung	24
3.3.3.3. Gelelektrophorese	25

---

3.3.4. Blotten der Proteine	26
3.3.5. Antikörperreaktion	27
3.3.5.1. Blocken	27
3.3.5.2. Primärantikörper	27
3.3.5.3. Sekundärantikörper	28
3.3.6. Enhanced Chemiluminescence Reaktion	28
3.3.7. Statistische Auswertung	29
3.4. Immunhistologie	29
3.4.1. Fixierung und Einbetten	30
3.4.2. Paraffinschnitte	31
3.4.3. Immunhistologische Färbung	31
3.4.3.1. Färbeprotokoll Avidin-Biotin Komplex Methode	31
3.4.3.2. Positiv- und Negativkontrolle	33
3.4.4. Auswertung	33
<b>4. Ergebnisse</b>	<b>34</b>
4.1. Ergebnisse der quantitativen Echtzeit-Polymerase Kettenreaktion	34
4.2. Ergebnisse des Western blot	37
4.3. Ergebnisse der Immunhistologie	42
<b>5. Diskussion</b>	<b>44</b>
<b>6. Zusammenfassung</b>	<b>51</b>

---

<b>7. Literaturverzeichnis</b>	52
<b>Anhang A: Verwendetes Material für die Quantitative Echtzeit-Polymerase Kettenreaktion</b>	62
A.1. Verwendete Geräte und Software	62
A.2. Verwendetes Verbrauchsmaterial	63
<b>Anhang B: Verwendetes Material für den Western blot</b>	65
B.1. Verwendete Geräte und Software	65
B.2. Verwendetes Verbrauchsmaterial	67
B.3. Verwendete Antikörper	69
B.4. Verwendete Puffer und Lösungen	70
<b>Anhang C: Verwendetes Material für die Immunhistologie</b>	73
C.1. Verwendete Geräte	73
C.2. Verwendetes Verbrauchsmaterial	74
C.3. Verwendete Antikörper	77
C.4. Verwendete Puffer und Lösungen	78
<b>Dankvermerk</b>	80
<b>Lebenslauf</b>	81

**Tabellenverzeichnis**

<i>Tabelle</i>	<i>Seite</i>
1.1. Wichtigste Eigenschaften der untersuchten AMP-Derivate	7
3.1. Plasmid DNA-Konzentration für Verdau und Linearisierung	12
3.2. Reaktionsansatz für Verdau und Linearisierung der Plasmide	12
3.3. Primersequenzen aus der „Universal Probe Library“, Roche	13
3.4. RNA/Primer Mischungsverhältnisse nach Herstellerangaben (SuperScript™ First Strand Synthesis System; Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland)	18
3.5. Algorithmus der qRT-PCR	19
3.6. Konzentration der Proteinstandards	22
3.7. Primärantikörperlösungen für den Western blot	27
3.8. Sekundärantikörperlösungen für den Western blot	28
3.9. Einbettprotokoll des TES-1 bei der Paraffinblockherstellung	30
4.1. Ergebnisse der qRT-PCR Auswertung	35
4.2. Ergebnisse der Western blot Auswertung	37
A.1. Verwendete Geräte und Software für die qRT-PCR	62
A.2. Verwendetes Verbrauchsmaterial für die qRT-PCR	63
B.1. Verwendete Geräte und Software für den Western blot	65
B.2. Verwendetes Verbrauchsmaterial für den Western blot	67
B.3. Verwendete Antikörper für den Western blot	69
B.4. Verwendete Puffer und Lösungen für den Western blot	70

---

C.1. Verwendete Geräte für die Immunhistologie	73
C.2. Verwendetes Verbrauchsmaterial für die Immunhistologie	74
C.3. Verwendete Antikörper für die Immunhistologie	77
C.4. Verwendete Puffer und Lösungen für die Immunhistologie	78

**Abbildungsverzeichnis**

<i>Abbildung</i>	<i>Seite</i>
1.1. Mögliche Klassifikation antimikrobieller Peptide	7
3.1. Agarose Gelelektrophorese zur Überprüfung der Primerspezifität bei der qRT-PCR	15
3.2. Auswertung der Proteinbestimmung mittels Standardkurve (Beispiel)	23
3.3. Aktin Western blot zur Überprüfung einheitlicher Gesamtproteinmenge (Beispiel)	23
4.1. Box-Plot Diagramme der qRT-PCR Ergebnisse	36
4.2. Ergebnisse des hBD-1 Western blot	38
4.3. Ergebnisse des hBD-2 Western blot	39
4.4. Ergebnisse des hBD-3 Western blot	40
4.5. Ergebnisse des Psoriasin Western blot	41
4.6. Immunhistologische Schnitte	43

**Abkürzungsverzeichnis:**

18S rRNA	18S ribosomale Ribonukleinsäure
A	Adenin
ABC-Methode	Avidin-Biotin Komplex Methode
AMP	Antimikrobielle Peptide
APS	Ammoniumperoxiddisulfat
BSA	Bovines Serum Albumin
C	Cytosin
°C	Grad Celsius
$C_6H_5Na_3O_7 \times 2H_2O$	Trinatriumcitratdihydrat
$C_6H_8O_7 \times H_2O$	Citronensäuremonohydrat
CA	Kalifornien
CD	Cluster of differentiation
cDNA	Complementary deoxyribonucleic acid
cm	Zentimeter
CO	Colorado
Cys	Cystein
DAB	Diaminobenzidin
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DGZMK	Deutsche Gesellschaft für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde
DNA	Deoxyribonucleic acid
dNTP	Deoxyribonucleotide triphosphat

---

DTT	1,4-Dithiothreit
E. coli	Escherichia coli
ECL-Lösung	Enhanced Chemiluminescence Lösung
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EE	Extraorales Epithel
EtOH	Ethanol
g	Gramm
G	Guanin
H <sub>2</sub> O	Wasser
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
hBD	Humane Beta-Defensin
hBD-1	Humane Beta-Defensin 1
hBD-2	Humane Beta-Defensin 2
hBD-3	Humane Beta-Defensin 3
HCL	Chlorwasserstoffsäure
HDP	Host defense peptides
IgG	Immunglobulin G
IL	Illinois
KCL	Kaliumchlorid
kDA	Kilodalton
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Kaliumdihydrogenphosphat
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
M	Molar

---

mA	Milliampere
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mm	Millimeter
mRNA	Messenger ribonucleic acid
MRSA	Methicillin resistenter Staphylococcus aureus
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	Dinatriumhydrogenphosphatdihydrat
NaCl	Natriumchlorid
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Natriumdihydrogenphosphatmonohydrat
NaOH	Natriumhydroxid
nm	Nanometer
NTC	No template control
OM	Orale Mukosa
p	Probability-Wert
PBS-Puffer	Phosphat based saline-Puffer
pH	Potential of hydrogen
qRT-PCR	Quantitative Echtzeit-Polymerase Kettenreaktion
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Revolutions per minute
rRNA	Ribosomale Ribonukleinsäure
S	Svedberg

---

s	Sekunden
SDS	Natriumdodecylsulfat
T	Thymin
TAE-Puffer	Tris-Acetat-Ethylendiamintetraessigsäure-Puffer
TBS	Tris buffered Saline
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TRIS	Tris-hydroxymethyl-aminomethan
TWEEN	Polyoxyethylensorbitanmonolaurat
V	Volt

## 1. Einleitung

Operative Eingriffe im Kopfbereich bieten aufgrund der starken Vaskularisation gute anatomische Voraussetzungen für eine erfolgreiche Wundheilung. Dies trifft insbesondere für Eingriffe in der Mundhöhle zu. So wird beispielsweise die Wahrscheinlichkeit einer Wundheilungsstörung nach operativer Weisheitszahnextraktion in der Literatur als gering eingeschätzt. In einer Studie wurde für die Wahrscheinlichkeit einer Infektion der Alveole nach operativer Entfernung der Dritten Molaren im Unterkiefer ein Wert von 0,6% ermittelt [Malkawi, Z., 2011, S. 322-324]. Zwar kommt es bei Zahnextraktionen ohne Antibiotikummedikation in bis zu 80% der Fälle zu Bakteriämien [Lockhart, P. B., 2008, S. 3121], jedoch liegt die Wahrscheinlichkeit postoperativer Wundinfektionen lediglich bei 1,6% [Adeyemo, W. L., 2006, S. 4]. Aus diesem Grund wird in einer Stellungnahme der Deutschen Gesellschaft für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde (DGZMK) keine routinemäßige Antibiotikaphylaxe für Zahnextraktionen empfohlen [Nkenke, E., 2008, S. 2]. Berücksichtigt man, dass die intraorale Wundheilung in der Mundhöhle durch verschiedene Faktoren erheblich erschwert wird, ist die Leistung des menschlichen Immunsystems beachtlich. In der Mundhöhle sind eine Vielzahl von Mikroorganismen, zum Teil in sehr hoher Quantität, vorhanden. Untersuchungen ergaben Werte von mindestens 6 Milliarden Bakterien aus 700 Spezies [Aas, J. A., 2005, S. 5721; Parahitayawa, N. B., 2010, S. 136]. Desweiteren ist das Mundschleimhautepithel im physiologischen Zustand größtenteils nicht verhornt (mit Ausnahme der keratinisierten Gingiva) und besitzt eine geringere mechanische Abwehrbarriere als verhorntes Epithel. Somit ist die Mundhöhle ein gutes Beispiel für die Effektivität des menschlichen Immunsystems. Aufgrund des enormen Potentials und dem gesteigerten Auftreten von gegen Antibiotika resistenten Bakterien ist das angeborene Immunsystem vor einiger Zeit in den Fokus der wissenschaftlichen Forschung gerückt [Gould, I. M., 2008, S. 53-59; Livermore, D. M., 2004, S. 7; Wilson, M. A., 2003, S. 38-40].

Ein wichtiger Bestandteil des angeborenen Immunsystems in Haut und Schleimhaut sind kleine Peptide, sogenannte „host defense peptides“ (HDP) [Steintraesser, L., 2008, S. 528], welche auch unter dem Namen „antimikrobielle Peptide“ (AMP) bekannt sind. Der Begriff „antimikrobielle Peptide“ entstammt ihrer

Entdeckung, während die Bezeichnung „host defense peptides“ eher die Funktion dieser Peptide verdeutlicht [Nakatsuji, T. and Gallo, R. L., 2011, S. 1]. Zum ersten Mal wurden AMP in den 1960er Jahren in Granulozyten von Meerschweinchen und Hasen entdeckt [Zeya, H. I. and Spitznagel, J. K., 1966, S. 750]. Die antibakterielle Fähigkeit dieser Peptide wurde 1987 bekannt, als Zasloff ein bis dato unbekanntes Peptid aus dem afrikanischen Krallenfrosch isolierte, welches er Magainin nannte [Zasloff, M., 1987, S. 5449-5453]. Aufgefallen war Zasloff zuvor die gute Wundheilung des Krallenfrosches, die er als Versuchstiere benutzte. In den letzten Jahrzehnten wurden über 1500 dieser Peptide beschrieben und in Datenbanken ([aps.unmc.edu/AP/main.php](http://aps.unmc.edu/AP/main.php); Stand: November 2012) gelistet [Wang, G., 2009, S. 936; Wang, Z. and Wang, G., 2004, S. 590]. AMP sind Effektormoleküle des angeborenen Immunsystems und üben vielfältige physiologische Funktionen aus. Antimikrobielle Aktivität, Inaktivierung von Viren, Vermittlung des angeborenen und erworbenen Immunsystems, sowie Modulation der Angiogenese sind hier als Beispiele zu nennen [Yang, D., 2004, S. 191-201]. Desweiteren können sie vor mikrobakterieller Besiedelung schützen und spielen daher eine wichtige Rolle bei der Immunreaktion der intraoralen und extraoralen Mukosa, sowie der Epidermis [Braff, M. H., 2005, S. 12; Kaus, A., 2008, S. 32-40; Schitteck, B., 2008, S. 135-143]. AMP unterstützen das Immunsystem im Kampf gegen Bakterien, Viren und Pilze, indem sie unter anderem durch den Einbau ionendurchlässiger Kanäle in die Lipiddoppelschicht der Zellmembranen zum Tod der Zielzelle führen [Kagan, B. L., 1990, S. 212; Lehrer, R. I., 1989, S. 555]. Dieser Mechanismus ist auch als „Shai-Matsuzaki-Huang Modell“ bekannt [Wehkamp, J., 2005, S. 406]. Vor kurzem wurde publiziert, dass AMP eine wichtige Rolle bei der Regulation der Wundheilung innehaben [Steinstraesser, L., 2008, S. 531-532]. Auch beim Erhalt der oralen Gesundheit spielen sie eine Rolle [Dale, B. A. and Fredericks, L. P., 2005, S. 1] und können eventuell inhibitorisch bei Gingivitis [Dommisch, H., 2005, S. 189] und Parodontitis [Dale, B. A. and Fredericks, L. P., 2005, S.10] wirken.

Obwohl AMP Gegenstand vieler Forschungsprojekte sind, hat sich jedoch bis jetzt noch kein einheitlicher Standard in ihrer Klassifikation durchgesetzt. Eine mögliche Einteilung der AMP und ihrer Funktionen im menschlichen Organismus ist in Abbildung 1.1. dargestellt. Als zwei wichtige Hauptgruppen der AMP sind die „Cathelicidine“ und „Defensine“ zu nennen. Die Nomenklatur orientiert sich an den molekularen, sowie immunologischen Eigenschaften der einzelnen Peptide. So

wurden zum Beispiel die „Cathelicidine“ nach ihrer gemeinsamen „cathelin domain“ am N-Terminus benannt [Mendez-Samperio, P., 2010, S. 1791; Zanetti, M., 1995, S. 2]. Der Begriff „Defensine“ bezieht sich auf ihre Abwehrfunktion gegen mikrobielle Besiedlung. Eine weitere Möglichkeit zur Nomenklatur ist der Bezug zur Synthese oder Entdeckung, wie bei dem AMP Psoriasin. Dieses wurde zuerst bei Patienten, die an Schuppenflechte (Psoriasis) erkrankt waren entdeckt [Madsen, P., 1991, S. 701; Watson, P. H., 1998, S. 567].

Defensine bestehen aus 28 bis 44 Aminosäuren und sind in einer Beta-Faltblattstruktur, die durch drei Disulfidbrücken stabilisiert wird, aufgebaut. Unterteilt werden diese in die Subgruppen Alpha- und Beta-Defensine. Sie unterscheiden sich in der Position des Cystein (Cys) an den Disulfidbrücken. Vom N-Terminus ausgehend haben Alpha-Defensine ihre Disulfidbrücken an Cys1-Cys6, Cys2-Cys4 und Cys3-Cys-5 und Beta-Defensine an Cys1-Cys5, Cys2-Cys4 und Cys3-Cys6 [Steinstraesser, L., 2009, S. 3955]. Die Expression der Defensine wird unter anderem durch Toll-Like-Rezeptoren vermittelt [Gilmore, K., 2009, S. 779; Schroder, J. M. and Harder, J., 2006, S. 479]. Defensine sind möglicherweise im Stande sich an Zellmembranen zu binden und durch Opsonierung das erworbene Immunsystem zu aktivieren [Yang, D., 2002, S. 294].

In dieser Dissertationsschrift wurden vier AMP untersucht. Diese sollen im Folgenden kurz vorgestellt werden. Im Detail handelt es sich um das humane Beta-Defensin 1 (hBD-1), das humane Beta-Defensin 2 (hBD-2), das humane Beta-Defensin 3 (hBD-3) und das bereits erwähnte Psoriasin. Die humanen Beta-Defensine (hBD) sind eine große Untergruppe der Defensine.

hBD-1 wird in CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> T-Zellen, Keratinozyten und verschiedenen Hautdrüsen, wie den Talgdrüsen, Fettdrüsen, den Glandulae ceruminosae und Ziliardrüsen gebildet [Harder, J., 1997, S. 861; Steinstraesser, L., 2008, S. 529; Stoeckelhuber, M., 2006, S. 881; Stoeckelhuber, M., 2008, S. 234]. hBD-1 besitzt ein Wirkspektrum gegen grampositive und gramnegative Bakterien. Zum ersten Mal wurde dieses Protein im Jahre 1995 aus dem dialysierten Plasma von Patienten mit entzündlichen Nierenerkrankungen isoliert [Bensch, K. W., 1995, S. 331].

Das hBD-2 Protein wurde erstmalig in der Epidermis von Psoriasis Patienten entdeckt [Harder, J., 1997, S. 861]. hBD-2 wird ebenfalls in CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> T-Zellen, Keratinozyten, in Drüsenzellen (Talg, Fett und Ziliardrüsen), sowie zusätzlich in Mastzellen synthetisiert und zeigt Wirksamkeit gegen grampositive und gramnegative

Bakterien. Ebenso ist eine Aktivität gegen verschiedene Pilzstämme festzustellen [Harder, J., 1997, S. 861; Schitteck, B., 2008, S. 135-143; Steinstraesser, L., 2008, S. 529; Stoeckelhuber, M., 2006, S. 881; Stoeckelhuber, M., 2008, S. 234].

Keratinocyten, Monozyten und CD4<sup>+</sup> T-Zellen sind in der Lage hBD-3 zu bilden [Harder, J., 1997, S. 861; Schitteck, B., 2008, S. 135-143; Steinstraesser, L., 2008, S. 529]. hBD-3 wurde im Jahre 2000 entdeckt [Jia, H. P., 2001, S. 213]. Dieses Peptid ist ebenfalls aktiv gegen Pilze und grampositive sowie gramnegative Bakterien [Harder, J., 1997, S. 861; Schitteck, B., 2008, S. 135-143; Steinstraesser, L., 2008, S. 529].

Psoriasin wird in Keratinocyten gebildet, ist gegen grampositive und gramnegative Bakterien aktiv [Schitteck, B., 2008, S. 135-143; Steinstraesser, L., 2008, S. 529] und weist eine starke Aktivität gegen Escherichia coli (E.coli) auf [Glaser, R., 2005, S. 61]. Benannt wurde Psoriasin nach seiner erstmaligen Isolierung aus Hautläsionen bei Patienten, die an Psoriasis erkrankt waren [Glaser, R., 2005, S. 59; Madsen, P., 1991, S. 709]. Obwohl das Krankheitsbild der Psoriasis die Integrität der Haut reduziert, leiden diese Patienten nicht im Extremen an Hautinfektionen. So treten Hautkrankheiten wie Urtikaria oder atopische Dermatitis bei Psoriasis Patienten auffallend seltener auf [Henseler, T. and Christophers, E., 1995, S. 983]. Gleichzeitig wird bei diesen Patienten Psoriasin stark verstärkt exprimiert [Madsen, P., 1991, S. 709]. Dies könnte in direktem Zusammenhang stehen. Jedoch ist eine Hochregulation des Psoriasin nicht nur auf das Krankheitsbild der Schuppenflechte beschränkt [Kesting, M. R., 2010, S. 124]. In seiner Wirkungsweise den bereits vorgestellten Defensinen ähnelnd, kann Psoriasin die bakteriellen Zellmembranen durch Permeabilisation zerstören [Michalek, M., 2009, S. 743-745], sowie als chemischer Lockstoff für Leukozyten wirken [Wolf, R., 2008, S. 6]. Tabelle 1.1. zeigt einen Überblick über die vier genannten AMP.

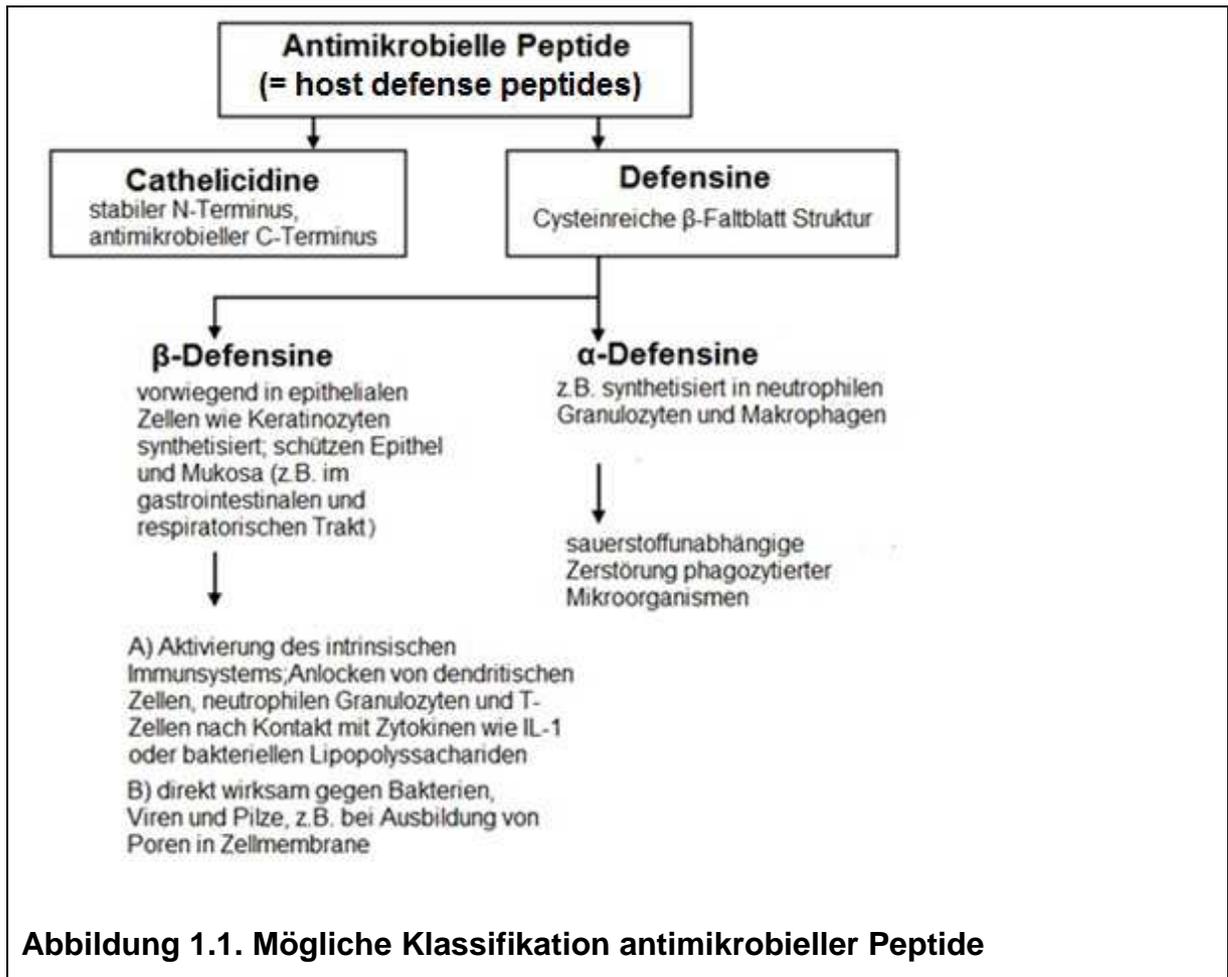
Eines der großen aktuellen medizinischen Probleme ist das zunehmende Auftreten von Bakterienstämmen, die gegen konventionelle Antibiotika Resistenzen entwickelt haben [Gyssens, I. C., 2011, S. 12; Stefani, S. and Varaldo, P. E., 2003, S. 1180; Witte, W., 2008, S. 365]. Dies macht sich unter anderem an einer Zunahme an Wundinfektionen durch grampositive Bakterien bemerkbar [Wilson, M. A., 2003, S. 37]. Vor allem multiresistente Keime, die gegen mehrere Antibiotika resistent sind, machen die Entwicklung von Alternativtherapeutika erforderlich [Livermore, D. M., 2004, S. 3; Wise, R., 2011, S. 1939]. Ebenfalls können multiresistente Keime

schwere Komplikationen bei der Behandlung infizierter Wunden oder nach operativen Eingriffen hervorrufen. Eines der bekanntesten Beispiele hierzu ist das zunehmende Auftreten des Methicillin resistenten *Staphylococcus aureus* (MRSA). MRSA ist als einer der Hauptverursacher nosocomialer Infektionen weltweit ursächlich für gestiegene Krankenhausmorbidity und höhere Behandlungskosten von Erkrankten [Rivera, A. M. and Boucher, H. W., 2011, S. 1230]. Ernsthafte MRSA-Infektionen sind mit signifikanter Mortalität verbunden und haben einen großen Anteil an der Gesamtmortalität bei infektiösen Erkrankungen.

Die AMP werden aufgrund ihrer Wirkweise auch als "natürliche Antibiotika" bezeichnet [Sang, Y. and Blecha, F., 2008, S. 227]. In sie werden Hoffnungen hinsichtlich der Entwicklung von alternativen Wirkstoffen für konventionelle Antibiotika gesetzt [Gilmore, K., 2009, S. 782; Steinstraesser, L., 2009, S. 3961]. Aus diesem Grund wurde bereits versucht, natürliche und synthetische AMP zur Behandlung von Infektionen einzusetzen [Rennie, J., 2005, S. 298; Tew, G. N., 2010, S. 8]. Synthetische AMP-Derivate wurden in Kombination mit Antibiotika in vitro getestet. Hierbei wurde im Vergleich zu herkömmlichen Antibiotika sowohl eine erhöhte bakterizide Aktivität [Giacometti, A., 2004, S. 657], als auch eine geringe Anfälligkeit für die Entstehung resistenter Bakterien [Choi, S., 2009, S. 6972] beobachtet. Jedoch wurde auch von Resistenzbildungen [Perron, G. G., 2006, S. 253] und Zytotoxizität [Vaara, M., 2009, S. 573] berichtet. Die Reduzierung der Zytotoxizität synthetischer AMP-Derivate ist momentan Ziel weiterer Forschungen [Tew, G. N., 2010, S. 1]. Erste klinische Versuchsreihen mit AMP-Derivaten wurden bereits durchgeführt [Lipsky, B. A., 2008, S. 1538; Scott, R. W., 2008, S. 623] und eine Applikation dieser Derivate könnte bereits in näherer Zukunft eine Therapieoption bei Behandlung intraoraler Infektionen darstellen.

Voraussetzung hierfür ist jedoch eine profunde Kenntnis der Quantität und Regulation der einzelnen AMP im physiologischen Zustand, um eine Dosierung im therapeutischen Bereich zu ermöglichen. Bis zum gegenwärtigen Zeitpunkt wurde kein quantitativer Vergleich der Expression von AMP zwischen der Mundhöhle und dem extraoralen Epithel publiziert. Nachdem die Mundschleimhaut ein hohes immunologisches Potential besitzt, ist ein Vergleich der Expression von AMP in der Mundschleimhaut im Vergleich zur Körperhaut von großem Interesse. Zum Beispiel könnte ein Grund für die hervorragende Wundheilungstendenz der Mundschleimhaut ein verstärktes beziehungsweise stärkeres Vorkommen von AMP sein. In der

vorliegenden Dissertation wurde die Nullhypothese aufgestellt, dass sich die Expression der AMP zwischen intra- und extraoralem Gewebe nicht unterscheidet. Das Gegenteil, also ein Unterschied in der Expression, wurde als Alternativhypothese festgesetzt.



**Tabelle 1.1.**

**Wichtigste Eigenschaften der untersuchten AMP-Derivate**

AMP Derivat	Größe [kDA]	Syntheseort	Wirksam gegen:
hBD-1	~4	Keratinozyten CD4 <sup>+</sup> /CD8 <sup>+</sup> T-Zellen	Gram+ Gram-
hBD-2	~5	Keratinozyten CD4 <sup>+</sup> /CD8 <sup>+</sup> T-Zellen Mastzellen	Gram+ Gram- Pilze
hBD-3	~5	Keratinozyten, Monozyten CD4 <sup>+</sup> T-Zellen	Gram+ Gram- Pilze
Psoriasin	~12	Keratinozyten	Gram+ Gram-

## 2. Problemstellung

Obwohl AMP Gegenstand zahlreicher aktueller wissenschaftlicher Untersuchungen sind, liegen bis dato noch keine Daten eines quantitativen Vergleiches der AMP-Expression zwischen intra- und extraoralem Epithel vor. Die Tatsache, dass Wundheilungsstörungen in der Mundhöhle trotz starker mikrobieller Besiedelung selten beobachtet werden, führt zu der Annahme, dass die Immunkompetenz der Mundschleimhaut sich von anderen Gewebearten unterscheidet. Ursächlich könnte beispielsweise eine vermehrte Expression der AMP eine gesteigerte Abwehrfähigkeit des intraoralen Gewebes ermöglichen. Für einen zukünftig angestrebten potentiellen Einsatz synthetischer AMP-Derivate als antiinfektiöse Therapeutika ist es von entscheidender Bedeutung, mögliche Unterschiede in der Expression einzelner AMP zwischen den oben genannten Gewebearten zu kennen.

Ziel der Untersuchungen dieser Dissertationsschrift war es durch drei verschiedene molekularbiologische Untersuchungen festzustellen, ob quantitative Unterschiede in der Expression vier verschiedener AMP (hBD-1, hBD-2, hBD-3 und Psoriasin) zwischen intra- und extraoralem Gewebe vorliegen. Hierfür wurden Gewebeproben beiden Ursprungs mit Hilfe von quantitativer Echtzeit-Polymerase Kettenreaktion (qRT-PCR), dem Western blot Verfahren und Immunhistologie untersucht.

### 3. Material und Methoden

Falls nicht anders angegeben, ist bei der Benutzung von Wasser (H<sub>2</sub>O) immer destilliertes Wasser verwendet worden. Dieses wurde mit einem Milli-Q Integral Water Purification System (Millipore GmbH, Schwalbach, Deutschland) hergestellt.

#### 3.1. Probenentnahme

Für die Untersuchungen wurde gesundes Gewebe aus extraoraler Haut und Mundschleimhaut benötigt. Es wurden nur Patienten berücksichtigt, bei denen weder infektiöse Erkrankungen, noch Erbkrankheiten bekannt waren und gleichzeitig keinerlei Anzeichen von Immundefiziten vorlagen. Die Probenentnahme fand während operativen Eingriffen in der Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie der Technischen Universität München statt. Dies geschah mit Genehmigung der örtlichen Ethikkommission (Nr.: 218308/212108) und im Einklang mit der Deklaration von Helsinki von 1997. Alle Patienten wurden präoperativ aufgeklärt und stimmten der Probeentnahme schriftlich zu. Die Proben wurden im Rahmen rekonstruktiver Maßnahmen aus überschüssigem reseziertem Gewebe, das normalerweise verworfen worden wäre, gewonnen.

Insgesamt wurden Proben von 28 Patienten beider Geschlechter entnommen und pseudonymisiert in zwei Gruppen, bestehend aus je 14 Proben, eingeteilt. Proben aus der Mundschleimhaut (oraler Mukosa; OM) bildeten die Gruppe 1, Proben aus der extraoralen Haut (extraorales Epithel; EE) die Gruppe 2. Die statistische Aussagekraft dieser Studie wurde durch „power calculations“ bestätigt (nQuery 7.0; Statistical Solutions, Saugus, USA). Die Proben für Gruppe 1 (OM) wurden bei operativer Entfernung von Weisheitszähnen aus Schleimhaut, die normalerweise beim plastischen Verschluss der Extraktionsalveole verworfen worden wäre, gewonnen. Die angrenzende Schleimhaut wies keine klinischen Anzeichen eines Entzündungsgeschehens auf. Die Proben für Gruppe 2 (EE) wurden im Rahmen plastisch-reduktiver Eingriffe ästhetischer Indikation aus überschüssigem Gewebe der Gesichtshaut oder des Halses entnommen.

Direkt nach ihrer operativer Gewinnung wurde in den Proben enthaltenes subkutanes Gewebe entfernt und die Proben - abhängig von der Untersuchungsmethode - konserviert.

Für die qRT-PCR wurden die Proben mit RNAlater<sup>®</sup> RNA Stabilization Reagent (aus einem RNeasy<sup>®</sup> Protect Mini Kit; Qiagen, Hilden, Deutschland) einzeln in Eppendorf Reaktionsgefäße des Typs 3810X (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) gelagert und bei -80° Celsius aufbewahrt. Die Proben für den Western blot wurden in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß 3810X, mit Allprotect<sup>®</sup> Tissue Reagent (Qiagen, Hilden, Deutschland) bedeckt, bei -25°C aufbewahrt. Das Gewebe, das immunhistologisch untersucht werden sollte, wurde in Formaldehyd-Lösung 3,5-3,7% (Fischar GmbH & Co. KG, Saarbrücken, Deutschland) fixiert.

Für die qRT-PCR wurden aus Gruppe 1 (OM) Proben von vier weiblichen und drei männlichen Patienten verwendet. Das Durchschnittsalter lag bei 53,1 Jahren mit einer Altersvarianz von 12 bis 76 Jahren. Für die Gruppe 2 (EE) wurden Proben von drei weiblichen und vier männlichen Patienten verwendet. Das Durchschnittsalter der Gruppe 2 lag bei 44,7 Jahren, der jüngste Patient war zum Operationszeitpunkt 18 Jahre alt und der älteste 65 Jahre. Die Gewebeproben für den Western blot enthielten vier Proben für jede Gruppe. Aus Gruppe 1 (OM) wurden drei männliche und eine weibliche Gewebeprobe benutzt. Das Durchschnittsalter lag bei 26,5 Jahren, mit einer Altersspanne von 22 bis 34 Jahren. Vier männliche Proben mit einem Altersdurchschnitt von 46,5 Jahren und einer Varianz von 35 bis 55 Jahren wurden aus Gruppe 2 (EE) verwendet.

### **3.2. Quantitative Echtzeit-Polymerase Kettenreaktion**

Im Rahmen der Experimente wurden verschiedene Geräte und Verbrauchsmaterialien verwendet. Im Anhang A sind sowohl die verwendeten Geräte und Software (Tabelle A.1.), als auch die verwendeten Verbrauchsmaterialien (Tabelle A.2.) aufgelistet.

### 3.2.1. Herstellung von Standards für die quantitative Echtzeit-Polymerase Kettenreaktion

Zur Normierung der Messungen wurde das „housekeeping gene“ 18S ribosomale Ribonukleinsäure (18S rRNA) mitbestimmt. Für die 18S rRNA sowie für alle vier zu untersuchenden AMP wurden Standard „Deoxyribonucleic acid“ (DNA) Verdünnungsreihen hergestellt. Für die Verdünnungsreihen von hBD-1 und 18S rRNA wurde die benötigte DNA gemäß den Herstellerangaben aus den Gewebeproben extrahiert. Dies geschah mit Hilfe eines Extraktionskit RNeasy® Protect Mini Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland), einem RNase-free DNase Set (Qiagen, Hilden, Deutschland), Proteinase K (Dako Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland) und einem SuperScript™ First Strand Synthesis System für RT-PCR (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland). Für die Verdünnungsreihen von hBD-2, hBD-3 und Psoriasin wurden klonierte DNA-Segmente aus Plasmiden verwendet. Prof. Dr. Lars Steinsträßer, Klinikum der Ruhr Universität Bochum, stellte die Plasmide freundlicherweise zur Verfügung. Die ringförmigen Plasmide wurden in Fragmente zerteilt und linearisiert. Hierfür wurden für hBD-2 und hBD-3 jeweils 1µg der Plasmid DNA, für Psoriasin 5µg Plasmid DNA in einem Ansatz mit 2µl Gesamtvolumen verwendet (Tabelle 3.1.). Die photometrische Intensität der Plasmide wurde mit einem BioPhotometer Plus (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) gemessen. Mit diesem Wert wurde die benötigte Menge für 1µg DNA berechnet, und mit H<sub>2</sub>O auf ein Gesamtvolumen von 2µl gebracht. Der Ansatz wurde mit 18µl Reaktionsansatz (Tabelle 3.2.) vermischt und bei 37°C für 90min in einem Wärmeblock (ThermoStat plus; Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) inkubiert. In dieser Zeit fand Verdau und die Linearisierung der DNA statt.

Anschließend wurde die Plasmid-DNA nach Herstellerangaben isoliert und gereinigt. Hierzu wurden 10µl PB Puffer (aus einem QIAquick Nucleotide Removal Kit; Qiagen, Hilden, Deutschland) und 1µl des hergestellten Reaktionsansatzes vermischt. Eine QIAquick Spin Column (aus dem QIAquick Nucleotide Removal Kit) wurde in eine 2ml collection tube (aus dem QIAquick Nucleotide Removal Kit) platziert. In diese wurde der Reaktionsansatz pipettiert, bei 6000rpm an einer Tischzentrifuge Eppendorf MiniSpin® plus (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) für 60s zentrifugiert und das Eluat anschließend verworfen. Als nächster Schritt

wurde die Säule gereinigt. Hierfür wurden 750µl PE Puffer (aus dem QIAquick Nucleotide Removal Kit) auf die Säule gegeben und für 60s bei 6000rpm zentrifugiert. Das Eluat wurde verworfen und bei 13000rpm ein weiteres Mal 60s lang zentrifugiert. Anschließend wurde die DNA mit 50µl EB Puffer versehen (aus dem QIAquick Nucleotide Removal Kit) und für 60s bei 13000rpm eluiert. Die Konzentration der gewonnenen DNA wurde photometrisch bestimmt. Hiermit wurden die Standardkurven für die reverse Transkription und der qRT-PCR bestimmt. Für jedes der 5 Gene wurde eine Standardkurve aus den Verdünnungsreihen von 1:10 bis 1:100.000 erstellt.

**Tabelle 3.1.****Plasmid DNA-Konzentration für Verdau und Linearisierung**

	Photometerwert [µg/µl]	Plasmid-DNA	H <sub>2</sub> O	DNA + H <sub>2</sub> O
hBD-2	2,94	1µg $\triangleq$ 0,34µl	1,66µl	2µl
hBD-3	0,97	1µg $\triangleq$ 1,03µl	0,97µl	2µl
Psoriasis	1,20	5µg $\triangleq$ 1,7µl	0,30µl	2µl

**Tabelle 3.2.****Reaktionsansatz für Verdau und Linearisierung der Plasmide**

Enzym	BamHI	EcoRV	HindIII
	(hBD-2)	(hBD-3)	(Psoriasis)
10x Puffer	2µl	2µl	2µl
BSA	0,2µl	0,2µl	/
Enzym	1µl	1µl	1µl
H <sub>2</sub> O	14,8µl	14,8µl	15µl
Volumen	18µl	18µl	18µl

### 3.2.2. Primer

Die Primersequenzen wurden anhand der „Universal Probe Library“ der Firma Roche (Basel, Schweiz) ermittelt (Tabelle 3.3.), und bei der Firma TIB MOLBIOL Syntheselabor GmbH (Berlin, Deutschland) bestellt.

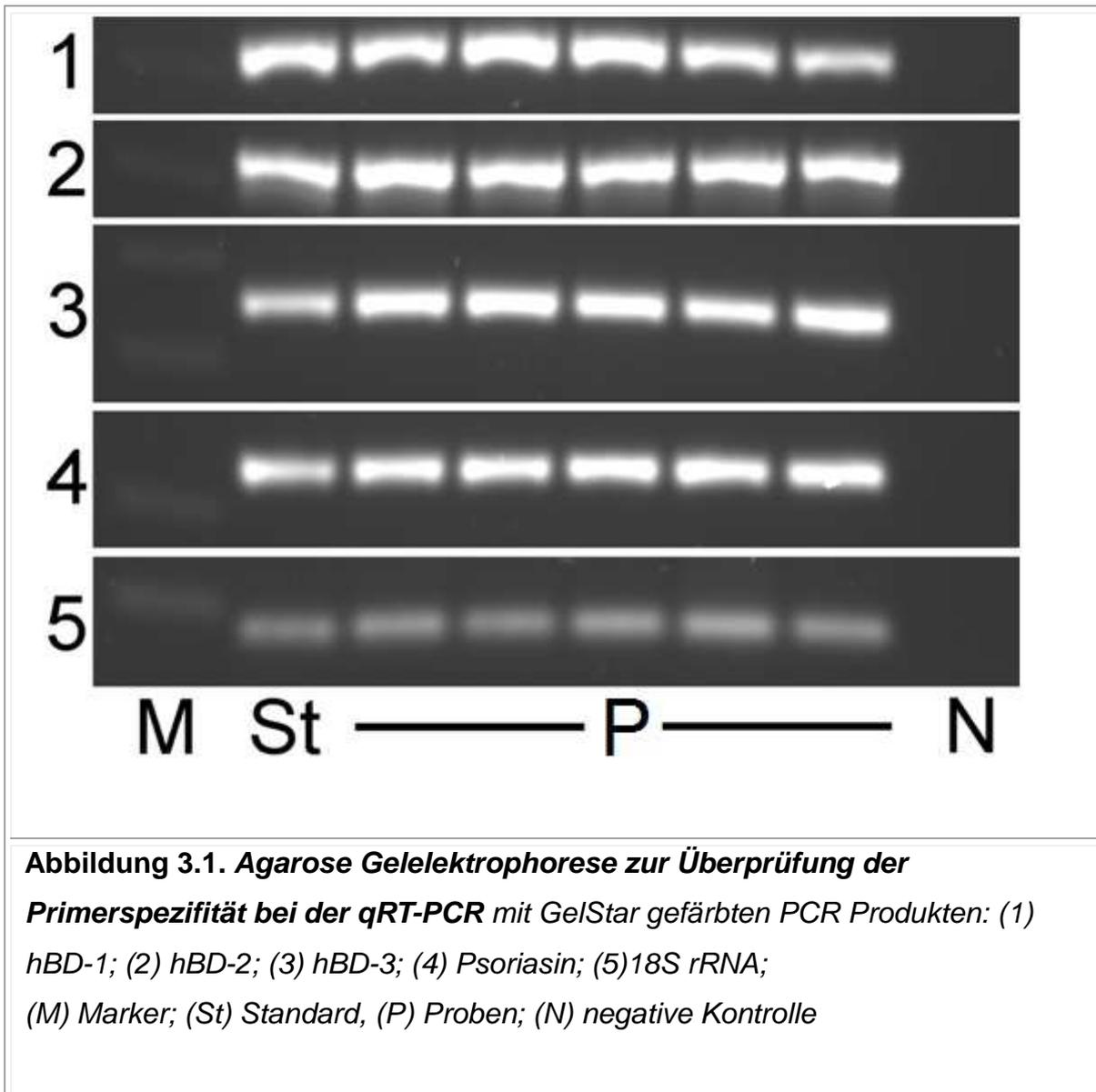
<b>Tabelle 3.3.</b>		
<b>Primersequenzen aus der „Universal Probe Library“, Roche</b>		
<b>Gen:</b>	<b>GenBank<sup>®</sup> Accession Number</b>	<b>Primersequenz (5' zu 3')</b> Adenin (A), Cytosin (C), Guanin (G), Thymin (T)
hBD-1	NM_005218.3	Vorwärts: TTGTCTGAGATGGCCTCAGGTGGTAAC
		Rückwärts: ATACTTCAAAGCAATTTTCCTTTAT
hBD-2	NM_004942.2	Vorwärts: CCAGCCATCAGCCATGAGGGT
		Rückwärts: GGAGCCCTTTCTGAATCCGCA
hBD-3	NM_018661.3	Vorwärts: CTGTTTTTGGTGCCTGTTCC
		Rückwärts: CTTTCTTCGGCAGCATTTC
Psoriasis	NM_002963.3	Vorwärts: TGCTGACGATGATGAAGGAG
		Rückwärts: ATGTCTCCAGCAAGGACAG
18S rRNA	NM_003286.2	Vorwärts: GAAACTGCGAATGGCTCATTA
		Rückwärts: CACAGTTATCCAAGTAGGAGAGG

### 3.2.3. Gelelektrophorese

Die Spezifität der gelieferten Primer wurde anhand einer Gelelektrophorese überprüft. Die Banden wurden mit GelStar (Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland) angefärbt und hinsichtlich ihrer Größe mit den zu erwarteten Werten verglichen (Abbildung 3.1.).

Die Herstellung des Agarosegels erfolgte mit einem selbst hergestellten 50x Tris-Acetat-Ethylendiamintetraessigsäure-Puffer (TAE-Puffer). Hierfür wurden 14,6g

Ethylendiamintetraacetat (EDTA; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland) mit einer Präzisionswaage vom Typ Fischer FI3100 Elektronische Halbmikro-, Analysen und Präzisionswaage (Willi Fischer oHG, Frankfurt, Deutschland) abgewogen, in 60ml H<sub>2</sub>O gelöst und mit Natriumhydroxid (NaOH; Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) und einem inoLab<sup>®</sup> pH 720 Labor-pH-Meter (Wissenschaftlich-Technische Werkstätten GmbH, Weilheim, Deutschland) auf einen pH Wert von 8,0 eingestellt. Anschließend wurden 1000ml H<sub>2</sub>O hinzugefügt, um 0,5M EDTA pH 8,0 zu erhalten. 242g 2M Tris-hydroxymethyl-aminomethan (TRIS; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland) wurden mit 57,1ml Essigsäure (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland), 100ml 0,5M EDTA pH8,0 und 100ml H<sub>2</sub>O zu einem 50x TAE-Puffer gemischt. Je 1ml 50x TAE-Puffer wurde mit 49ml H<sub>2</sub>O vermischt. 0,5g Agarose (Eurobio, Les Ulis, Frankreich) und 50ml 1x TAE-Puffer wurden in einer Mikrowelle (LG Electronics Deutschland GmbH, Ratingen, Deutschland) erhitzt. Die durch die Mikrowellenbehandlung verflüssigte Agarose wurde in die Lösung eingebracht und 5µl Gelstar hinzugefügt. Das Gel wurde blasenfrei mit einer Schichtstärke von 5mm in die dafür vorgesehene Ablage eines Sub-Cell<sup>®</sup> GT Agarose Gel Electrophoresis System (Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland) gegeben und für 30min auspolymerisiert und anschließend mit 1x TAE-Puffer vollständig bedeckt. Um die Proben zu laden, wurde ein Gelladepuffer mit folgenden Chemikalien gemischt: 0,25% Bromphenolblau (AppliChem, Darmstadt, Deutschland), 0,25% Xylenblau (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) und 30% Glycerin ROTIPURAN<sup>®</sup> (Roth, Karlsruhe, Deutschland). 10µl Probe wurden mit 2µl Gelladepuffer gemischt. Als DNA-Marker wurden 5µl 1kb Plus DNA Ladder (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) verwendet. Proben und Marker wurden auf das Gel geladen und die Gelelektrophorese bei 110V für 60min durchgeführt.



### 3.2.4. Isolation der Ribonukleinsäure

Die Gewebeproben von Gruppe 1 (OM) und Gruppe 2 (EE) wurden aufgetaut und auf Eis gelagert. Die gesamte Ribonukleinsäure (RNA) wurde mit Hilfe des RNeasy<sup>®</sup> Protect Mini Kit nach Herstellerangaben isoliert. Wie vom Hersteller empfohlen, wurden von jeder Probe 10mg verwendet. Nach manueller Zerkleinerung mit einem Skalpell (Feather Safety Razer Co., Osaka, Japan) wurden die Proben mit 300µl RLT Puffer (aus dem RNeasy<sup>®</sup> Protect Mini Kit) vermengt. Vor dem erstem Gebrauch wurden zu je 1ml des RLT-Puffers 10µl 2-Mercaptoethanol (Roth, Karlsruhe, Deutschland) pipettiert. Die Homogenisierung der Proben wurde in einem Rotor-

Stator System Micra D-9 (ART Prozess- und Labortechnik GmbH & Co. KG, Müllheim, Deutschland) durchgeführt. Dem Homogenisat wurden 590µl H<sub>2</sub>O beigemischt. 10µl Proteinase K wurden hinzugefügt und durchmischt. Anschließend wurden die Proben bei 55°C für 10min in dem Wärmeblock ThermoStat plus inkubiert und danach für 3min bei 12,5rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß 3810X überführt und mit dem 0,5-fachen an Volumen mit Ethanol (EtOH; Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) vermengt. 700µl der homogenisierten Probe wurden in einem 2ml collection Tube (aus dem RNeasy<sup>®</sup> Protect Mini Kit) auf die RNeasy<sup>®</sup> mini spin column (aus dem RNeasy<sup>®</sup> Protect mini Kit) überführt und für 15s bei 10rpm zentrifugiert. Das Eluat wurde verworfen und der Vorgang mit dem restlichen Volumen wiederholt und anschließend das Eluat nochmals verworfen. Nun wurden 350µl RW1 Puffer (aus dem RNeasy<sup>®</sup> Protect Mini Kit) auf die RNeasy<sup>®</sup> mini spin column pipettiert, für 15s bei 10rpm zentrifugiert und das Eluat wiederum verworfen. In einem Ribonuklease (RNase) freien Eppendorf-Reaktionsgefäß wurden 10µl DNaseI Lösung (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland) mit 70µl RDD Puffer (aus einem RNase free dnase set) vermengt und durch sanftes Wenden des Gefäßes vermischt. Die Lösung wurde direkt auf die RNeasy<sup>®</sup> Silica-Gel Membran pipettiert und bei 25°C für 15min inkubiert. Nach Ablauf dieser 15 Minuten wurden erneut 350µl RW 1 Puffer auf die Säule pipettiert, bei 10rpm 15s lang zentrifugiert, und das Eluat verworfen. Die Säule wurde in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. 500µl RPE Puffer (aus dem RNeasy<sup>®</sup> Protect Mini Kit) wurden auf die Säule pipettiert, für 15s bei 10rpm zentrifugiert und das Eluat verworfen. Vor erstem Gebrauch des RPE Puffers wurde der Puffer mit 100% EtOH entsprechend den Herstellerangaben aufgefüllt. Nun wurden abermals 500µl RPE Puffer auf die Säule gegeben, 15s bei 10rpm zentrifugiert und das Eluat verworfen. Anschließend wurde die Säule 120s bei 14,5rpm zentrifugiert, um sie zu trocknen. Zum Eluieren der RNA wurde die Säule in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt, 30µl RNase freies Wasser (aus dem RNeasy<sup>®</sup> Protect Mini Kit) auf die Silica-Gel Membran pipettiert, für 120s bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend 60s bei 14,5rpm zentrifugiert. Das Eluat wurde noch einmal auf die Membran pipettiert und der Vorgang wiederholt. Hierbei wurde die gesamte RNA von der Membran gelöst. Für die nachfolgende Photometrie wurden 49µl RNase freies Wasser (aus dem RNase free dnase set) mit 1µl gelöster

RNA vermischt. Die Menge an RNA wurde photometrisch bei 260nm ermittelt. Die RNA wurde anschließend bei -20 °C für die weiteren Untersuchungen aufbewahrt.

### 3.2.5. Reverse Transkription

Die gewonnene RNA wurde durch reverse Transkription in „complementary deoxyribonucleic acid“ (cDNA) umgeschrieben. Hierfür wurde das SuperScript™ First Strand Synthesis System für RT-PCR nach Angaben des Herstellers benutzt. Anhand der photometrischen Auswertung wurde die Menge an benötigter RNA Lösung für 1µg RNA berechnet. In sterilen Reaktionsgefäßen wurde für jede Probe die RNA/Primer Mischungen gemäß den Herstellerangaben erstellt (Tabelle 3.4.). Vor Gebrauch wurde jede Komponente anzentrifugiert. 1µg RNA jeder Probe wurde mit 1µl 10mM Deoxyribonucleotide triphosphat (dNTP-Mix; aus dem SuperScript™ First Strand Synthesis System für RT-PCR) und den Primern „1µl random Hexamers“ [50ng/µl] (aus dem SuperScript™ First Strand Synthesis System für RT-PCR) gemischt und mit Diethylpyrocarbonat behandeltem Wasser (DEPC-treated water; aus dem SuperScript™ First Strand Synthesis System für RT-PCR) auf 10µl aufgefüllt. Die Proben wurden bei 65°C für 5min inkubiert und anschließend 60min auf Eis gekühlt.

Es wurden für jeden Ansatz 2µl 10xRT Puffer, 4µl 25 mM Magnesiumchlorid ( $MgCl_2$ ), 2µl 0,1M 1,4-Dithiothreitol (DTT) und 1µl RNaseOUT™ (alle aus dem SuperScript™ First Strand Synthesis System für RT-PCR) zu einer Reaktionsmischung pipettiert. Diese wurde dem Gemisch aus RNA und Primer zugefügt und für 120s bei 25°C inkubiert. Dann wurde jedem Reaktionsgefäß 1µl SuperScript II RT (aus dem SuperScript™ First Strand Synthesis System für RT-PCR) beigemischt und zuerst 10min bei 25°C inkubiert, danach 50min bei 42°C und weitere 15min bei 70°C inkubiert. Die Proben wurden auf Eis gekühlt und bei -20°C aufbewahrt. Die gewonnene cDNA wurde im nächsten Schritt in der qRT-PCR untersucht.

<b>Tabelle 3.4.</b>			
<b>RNA/Primer Mischungsverhältnisse nach Herstellerangaben (SuperScript™ First Strand Synthesis System; Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland)</b>			
<b>Komponente</b>	<b>Probe</b>	<b>No RT Kontrolle</b>	<b>RNA Kontrolle</b>
RNA (1µg)	X µl	X µl	-
Control RNA	-	-	1 µl
10mM dNTP Mix	1 µl	1 µl	1 µl
Random hexamers (Primer)	1 µl	1-5 µl	1-5 µl
DEPC-treated water	ad 10µl		

### 3.2.6. Quantitative Echtzeit-Polymerase Kettenreaktion

Für die Durchführung der qRT-PCR wurde ein LightCycler® 1.0 Real-time Detection System (Roche, Mannheim, Deutschland) verwendet. Für ein jedes Gen und die 18S rRNA wurden 2µl LightCycler® FastStart DNA Master SYBR Green I reaction mix (Roche, Mannheim, Deutschland), jeweils 1µl Forward und Reverse Primer (0,5mM) (TIB MOLBIOL Syntheselabor GmbH, Berlin, Deutschland), sowie 1,6µl MgCl<sub>2</sub> und 12,4µl RNase freies Wasser zu einem Gesamtvolumen von 18µl vermischt. Die benötigte Anzahl Kapillaren für den LightCycler Vorgang wurden bereitgelegt und in jede Kapillare 18µl des Ansatzes pipettiert. Die jeweilige cDNA der Proben wurde aufgetaut. Für die negativen Kontrollen wurden 2µl H<sub>2</sub>O, für die Proben 2µl cDNA in die dazugehörigen Kapillaren pipettiert und diese verschlossen. Die Kapillaren wurden 15s bei 2000rpm anzentrifugiert, anschließend wurde die qRT-PCR gestartet. Der Algorithmus der qRT-PCR ist in Tabelle 3.5. dargestellt.

Nach der Amplifikation wurden Schmelzkurven (95°C für 0s bei einer ramp speed von 20°C/s, 65°C für 15s bei einer ramp speed von 20°C/s, 95°C für 0s bei einer ramp speed von 0,1°C/s, gefolgt von einer Abkühlungsphase bei 40°C für 30s bei einer ramp speed von 20°C/s) aufgezeichnet, um die Homogenität der cDNA Fragmente zu kontrollieren. Die Fluoreszenz wurde am Ende jeder Annealing Phase gemessen und die gemessenen Zykluswerte mit einer Referenzkurve verglichen. Die

in den Proben enthaltene Menge RNA wurde durch Vergleich der gemessenen Zykluswerte mit einer externen Referenzkurve berechnet. Die Referenzkurve wurde im Vorfeld mit einer Verdünnungsreihe aus bekannten Konzentrationen kalibriert. Mit Hilfe des „housekeeping gene“ 18S rRNA wurden die Daten normiert. Die relative Quantifizierung erfolgte anhand der  $\Delta\Delta C_t$ -Methode. Eine cDNA aus der Standardkurve (1:1000) wurde als weitere Probe mitgeführt. Um mögliche Verunreinigungen in dem qRT-PCR-Ansatz zu detektieren, wurde als Negativkontrolle ein Reaktionsansatzes ohne cDNA (= „no template control“, NTC) durchgeführt. Jede Probe wurde als Triplicat gemessen.

**Tabelle 3.5.****Algorithmus der qRT-PCR**

Schritt	Vorgang	Zeit [s]	Temperatur [°C]	+Temperatur Wiederholung [°C/S]	Zyklen [n]
1	Enzymaktivierung	600	95	20	1
2	Denaturierung	15	94	20	40
	Primerhybridisierung (Annealing)	10	60 (Psoriasisin 58)	20	
	Elongation (Amplifikation)	10	72	20	
3	Schmelzkurvenanalyse	15	65	20	1
4	Abkühlungsphase	30	40	20	1

**3.2.7. Statistische Auswertung**

Für die statistische Auswertung wurde die Software SPSS 16.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) benutzt. Die Daten wurden für die wissenschaftliche Notation in Exponentialschreibweise normalisiert, wobei für die Mantisse nur eine Dezimalstelle

vor dem Komma zulässig war. Alle Daten wurden als nicht parametrisch angesehen. Die Unterschiede in der Expression der „Messenger ribonucleic acid“ (mRNA) Mengen von hBD-1, hBD-2, hBD-3 und Psoriasin zwischen beiden Gruppen wurden mit dem Mann-Whitney U-Test für unabhängige Gruppen bestimmt. Für jede Gruppe wurden der Median, das 25. und das 75. Quartil (Viertelwert), das Minimum und das Maximum berechnet. Alle p-Werte sind zweiseitig. Den Tests wurde ein lokales Signifikanzniveau von 5% zugrunde gelegt.

### **3.3. Western blot**

Unterschiedliche Geräte und Materialien wurden für die Western blot Experimente verwendet. Im Anhang B sind die verwendeten Geräte und die verwendete Software (Tabelle B.1.), das verwendete Verbrauchsmaterial (Tabelle B.2.), die verwendeten Antikörper (Tabelle B.3.) und die verwendeten Puffer und Lösungen (Tabelle B.4.) aufgelistet. Zur Herstellung der Puffer und Lösungen wurden die in Tabelle B.1. und B.2. genannten Geräte und Chemikalien benutzt.

#### **3.3.1. Probenaufarbeitung**

Die Proben wurden aufgetaut und auf Eis gelagert. Nach manuellem Zerkleinern mit einem Skalpell (Disposable scalpel standard; Feather Safety Razer Co., Osaka, Japan) wurden die Proben auf einer Mikrowaage (Fischer FI3100 Elektronische Halbmikro-, Analysen und Präzisionswaage; Willi Fischer oHG, Frankfurt, Deutschland) gewogen. Zu einem Volumen des Gewebes wurde die dreifache Menge Homogenisierungspuffer (Complete Lysis-M; Roche, Mannheim, Deutschland) in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß 3810X gegeben. Mit Hilfe eines Rotorhomogenisators (Micra D-9; ART Prozess und Labortechnik GmbH & Co. KG, Müllheim, Deutschland) und eines Ultraschallhomogenisators (SONOPULS Ultraschall-Homogenisator HD 2070; Bandelin, Berlin, Deutschland) wurden die Proben homogenisiert. Hierbei wurde eine starke Erwärmung durch regelmäßiges Abkühlen des Gewebes, mit Hilfe von Lagerung des Probengefäßes auf Eis, vermieden. Anschließend wurden die Proben für 35min auf Eis gelagert und für

weitere 30min bei 3800rpm und +4°C in einer Kühlzentrifuge (HERAEUS®BIOFUGE® PRIMO R; Heraeus, Buckinghamshire, England) zentrifugiert. Die Überstände wurden sofort in sterile Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt und für die Western blot Untersuchungen eingefroren.

### 3.3.2. Proteinbestimmung

Für die Proteinbestimmung wurden 3 Proteinstandards hergestellt. Die Herstellung dieser Proteinstandards erfolgte mit bovinem Serum Albumin (BSA; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland). Das BSA wurde in definierten Konzentrationen in H<sub>2</sub>O gelöst (Tabelle 3.6.).

Die Standards wurden in Doppelbestimmung gemessen. Hierfür wurden je 100µl des entsprechenden Standards in insgesamt sechs 1,5ml halbmikro Einmal Küvetten PMMA (Brand GmbH & Co. KG, Wertheim, Deutschland) pipettiert. 1ml Bradfordösung (Tabelle B.4.) wurde hinzugegeben und mit einer Pipettenspitze (P 10 UVpette; Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland) durchmischt. Ein BioPhotometer plus (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) wurde bei 595nm mit einem Leerwert (100µl H<sub>2</sub>O + 1ml Bradfordlösung) geeicht und die optische Dichte jeden Standards zweifach bestimmt. Aus dem Mittelwert beider Bestimmungen wurde eine Standardkurve erstellt, anhand derer die aufzutragende Menge der Proben berechnet wurde (Abbildung 3.2.).

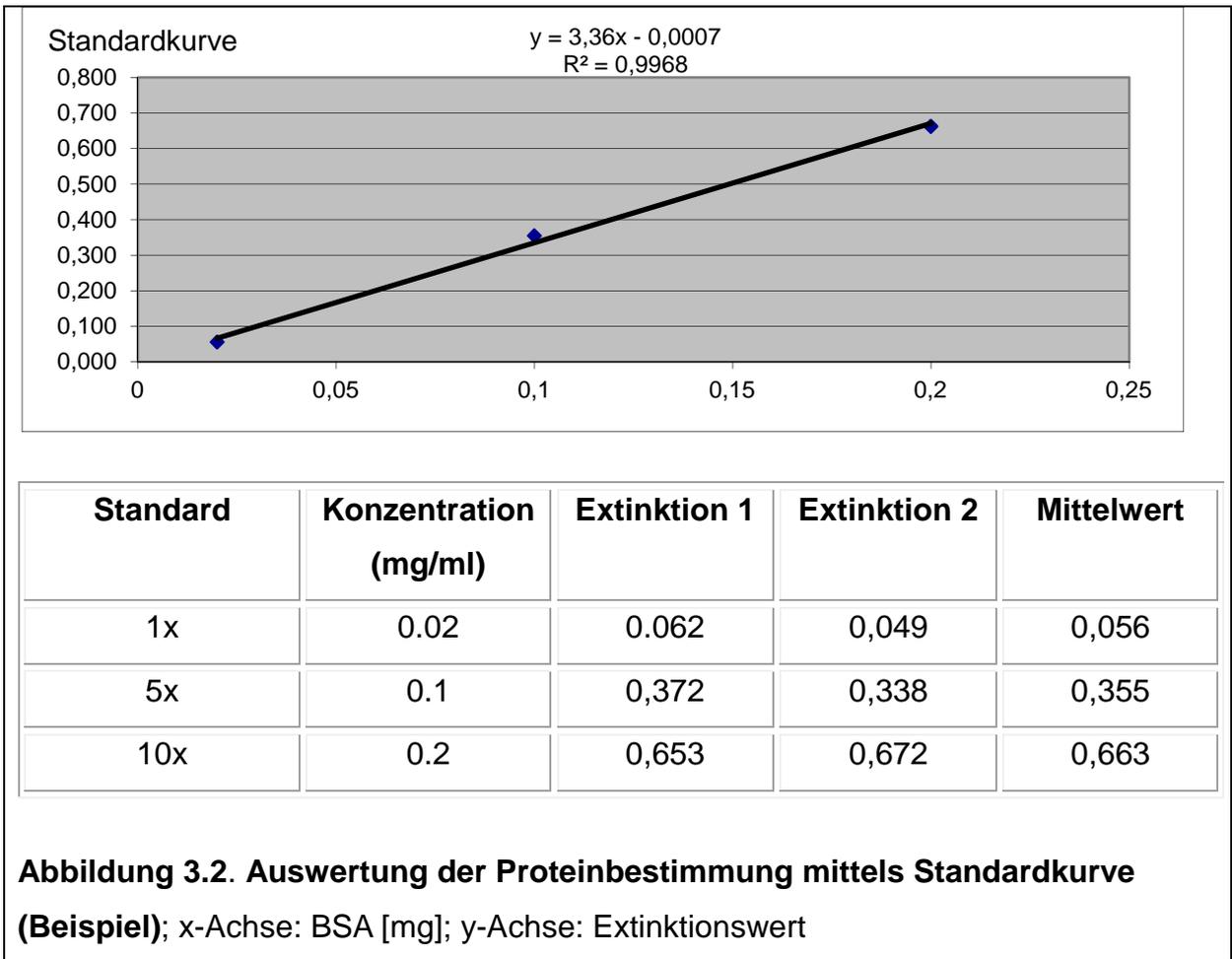
Anschließend wurden die Patientenproben photometrisch ausgewertet. Die Proben wurden aufgetaut und auf Eis gelagert. Jede Probe wurde mit einem Vortexmischer (Vortex Genie 2T Timed Mixer SI-T256; Scientific Industrie Inc., Bohemia, USA) für 10s gemischt und anschließend 15s in einer Tischzentrifuge (Eppendorf MiniSpin® plus; Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) bei 1000rpm anzentrifugiert. Von jeder Probe wurden 3µl in ein steriles Reaktionsgefäß gegeben und mit 6µl H<sub>2</sub>O verdünnt. Die Proben wurden für die späteren Western blot Analysen auf Eis gelagert. Die verdünnten Proben wurden wiederum gevortext und für circa 15s mit Hilfe der Tischzentrifuge anzentrifugiert. Für jede der verdünnten Proben wurden zwei Küvetten vorbereitet und in diese jeweils 100µl H<sub>2</sub>O pipettiert. Zu den 100µl H<sub>2</sub>O wurden 2µl der jeweiligen verdünnten Proben zugefügt. In jede Küvette wurde dann 1ml Bradfordlösung pipettiert und mit einer Pipettenspitze vermischt.

Die Proben wurden bei 595nm am Photometer gemessen, die Werte mit der Standardkurve verglichen und die benötigte Probenmenge für den Western blot berechnet. Für hBD-1, hBD-2 und Psorisain wurde eine Gesamtproteinmenge von 90µg und für hBD-3 von 120µg berechnet.

Die Werte der Proteinbestimmung wurden mit einem Aktin Western blot verifiziert (Abbildung 3.3.). Aktin eignet sich aufgrund seines gleichmäßigen Vorkommens als Strukturprotein in allen eukaryotischen Zellen zur Bestimmung aufgetragener Proteinmengen. Der Aktin Western blot zeigte gleich intensive Banden auf der erwarteten Höhe (~42kDa). Somit konnte sichergestellt werden, dass für die Western blot Versuche von jeder Probe die gleiche Menge Gesamtprotein aufgetragen wurde.

**Tabelle 3.6.****Konzentration der Proteinstandards**

<b>Standard</b>	<b>BSA [mg]</b>	<b>H<sub>2</sub>O [ml]</b>
1x	0,02	1
5x	0,10	1
10x	0,20	1



### 3.3.3. Gelelektrophorese

#### 3.3.3.1. Herstellung des Polyacrylamidgels

Das Polyacrylamidgel wurde zweizeitig hergestellt. Das Sammelgel enthielt einen Polyacrylamidanteil von 6%, das Trenngel einen Anteil von 15%. Im Vorfeld wurden 25mg Ammoniumperoxodisulfat (APS; Roth, Karlsruhe, Deutschland) auf einer Mikrowaage abgemessen (Sartorius Extend Elektronische Analysen-, Präzisions-, und Edelmetallwaage; Sartorius, Göttingen, Deutschland) und mit 250µl H<sub>2</sub>O vermischt. Die Lösung wurde gevortext und für den späteren Gebrauch (10% APS) bereitgestellt. Das Trenngel wurde, wie in Tabelle B.4. beschrieben, hergestellt und in eine Gelgießstand vom Typ Cast-It™ S (Peqlab, Erlangen, Deutschland) gegossen, bis das Gelsystem zu circa 4/5 gefüllt war. Das Trenngel wurde mit 1ml H<sub>2</sub>O überschichtet, um die Oberfläche zu glätten und für 35min auspolymerisiert. In dieser Zeit wurde das Sammelgel, wie in Tabelle B.4. beschrieben, hergestellt. Nach Ende der Polymerisationszeit wurde das H<sub>2</sub>O verworfen und das 6% Sammelgel auf das Trenngel gegossen, bis die Kammern des Gelgießstands gefüllt waren. Um Taschen für das spätere Auftragen der Proteine zu erstellen, wurde ein Kamm (aus einem PerfectBlue™ Vertikales Doppelsystem Twin S; Peqlab, Erlangen, Deutschland) eingesteckt, und das Gel wiederum für 35min auspolymerisiert.

#### 3.3.3.2. Probenvorbereitung

Während der Polymerisation des Gels wurden die Proben für die Gelelektrophorese vorbereitet. 15µl Dissoziationspuffer (Tabelle B.4.) wurden mit der in der Proteinbestimmung ermittelten Probenmenge in ein Reaktionsgefäß pipettiert. Das Reaktionsgefäß wurde für 5s gevortext und für 10s anzentrifugiert. Anschließend wurden die Proben 10min bei 95°C in einem Wärmeblock (ThermoStat plus; Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) inkubiert. Nach der Polymerisation des Acrylamidgels wurde es aus dem Gelgießstand genommen und der Kamm entfernt. Das Gel wurde in das PerfectBlue™ Vertikales Doppelsystem eingespannt. Die Proben wurden erneut für 10s gevortext und mit einer Hamiltonspritze (701 NR 10ml;

Hamilton, Reno, USA) vollständig in die Kammern des Acrylamidgels geladen. Die Gelkammer besitzt 10 Taschen. Diese wurden für alle Untersuchungen nach dem gleichen Schema mit der Hamiltonspritze beladen. Die beiden äußersten Taschen wurden mit 4µl eines vorgefärbten Markers (peqGold Protein Marker IV; PeqLab, Erlangen, Deutschland) geladen. Dieser wurde zuvor aufgetaut und ebenfalls 10s gevortext und für 10s anzentrifugiert. Die für die Gelelektrophorese vorbereiteten Proben wurden vollständig in die inneren 8 Taschen der Gelkammer geladen. Dies geschah für alle Versuchsreihen in folgender Reihenfolge von links nach rechts mittels folgender Codierung: Gruppe 1 (OM): S1, S2, S3, S4 Gruppe 2 (EE): H1, H2, H3, H4. Hierbei stand das Kürzel „S“ jeweils für „Schleimhaut“ und das Kürzel „H“ jeweils für „Haut“, entsprechend der Probenherkunft. Die Hamiltonspritze wurde nach dem Laden jeder Probe gründlich mit H<sub>2</sub>O durchgespült und gereinigt.

### **3.3.3.3. Gelelektrophorese**

Um ein Austrocknen des Polyacrylamidgels zu verhindern, wurde die Elektrophorese innerhalb einer halben Stunde nach Ende der Polymerisation des Sammelgels gestartet. 260ml Gelelektrophoresepuffer wurden aus einem vorbereiteten Elektrophoresepuffer 10x Konzentrat (Tabelle B.4.) hergestellt. Dafür wurden 26ml Elektrophoresepuffer 10x Konzentrat ad 260ml mit H<sub>2</sub>O aufgefüllt. Der Puffer wurde in beide Kammern des Doppelgelsystems gefüllt. Nach Schließen der Gelkammern wurde das Elektrophoresegerät an ein Netzgerät (PEQLAB Power Supply EV231; Peqlab, Erlangen, Deutschland) und die Wasserkühlung angeschlossen. Die Gelelektrophorese wurde bei 250V und 20mA im Bereich des Sammelgels und 30mA im Bereich des Trenngels für insgesamt 70min durchgeführt.

### 3.3.4. Blotten der Proteine

Vier Rotilabo<sup>®</sup>-Blottingpapiere (Roth, Karlsruhe, Deutschland) mit einer Dicke von 1,5mm und 1 Transfermembran Roti Rimkreis-NC (Roth, Karlsruhe, Deutschland) wurden auf eine Größe von 9x5cm mittels einer vorbereiteten Papierschablone zugeschnitten. Die Blottingpapiere und die Transfermembran wurden für 10min in Blotpuffer getränkt (Tabelle B.4.). Nach Ende der Gelelektrophorese wurde das Gel aus der Gelelektrophoresekammer entnommen und in den Blotpuffer getaucht. Dort wurde der relevante Bereich des Acrylamidgels ebenfalls auf die Größe von 9x5cm zugeschnitten. Eine Blotkammer (Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer cell; Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland) wurde mit Blotpuffer befeuchtet und 2 Blottingpapiere wurden darauf geschichtet. Hierauf wurde die Membran, gefolgt vom Gel und weiteren 2 Filterpapieren geschichtet. Die gestapelten Papiere wurden glatt gerollt, um eingeschlossene Luftblasen zu beseitigen. Das Blotten der Proteine erfolgte für 40min mit 25V und 135mA.

#### *Ponceau S Färbung*

Der Transfer der Proteine vom Gel auf die Membran wurde mit Ponceau S (Roth, Karlsruhe, Deutschland) kontrolliert. Nach dem Blotvorgang wurde die Membran kurz mit H<sub>2</sub>O abgewaschen und anschließend für 1min in Ponceau S getaucht. Mit H<sub>2</sub>O wurde die Membran solange entfärbt bis die Proteinbanden deutlich sichtbar waren. Nach visueller Kontrolle der Banden (Verlauf und Auftrennung), wurde die Membran mit Tris buffered saline (TBS; Tabelle B.4.) auf einem Taumelschüttler (Bio Shaker 3D; G.Kisker GbR Products for Biotechnology, Steinfurt, Deutschland) zur Gänze entfärbt.

### 3.3.5. Antikörperreaktion

In Tabelle B.3. sind die verwendeten Primär- und Sekundärantikörper verzeichnet.

#### 3.3.5.1. Blocken

Um unspezifische Bindungen der Primärantikörper zu verhindern, wurde die Membran 90min unter Raumtemperatur mit Blockpuffer (Tabelle B.4.) unter leichtem Schwenken auf dem Schüttler geblockt. Im Anschluss wurde die Membran 2x5min mit TBS-T (Tabelle B.4.) und 2x5min mit TBS gewaschen, um Rückstände zu beseitigen.

#### 3.3.5.2. Primärantikörper

Die verdünnten Primärantikörperlösungen (Tabelle 3.7.) wurden für 90 min bei Raumtemperatur auf dem Schüttler unter leichtem Schwenken inkubiert. Anschließend wurde die Membran 2x5min mit TBS-T und 2x5min mit TBS gewaschen.

<b>Antikörper (Wirt)</b>	<b>Menge AK [<math>\mu</math>l]</b>	<b>Denaturierungspuffer[ml]</b>
Aktin (rabbit)	200	20
hBD-1 (mouse)	200	40
hBD-2 (mouse)	200	40
hBD-3 (rabbit)	100	50
Psoriasin (mouse)	100	50

### 3.3.5.3. Sekundärantikörper

Die Sekundärantikörper wurden in einem für den Wirt (rabbit oder mouse) des Primärantikörpers abgestimmten Verhältnis in 1% Phosphat based saline-Puffer-Milchpulverlösung (40ml PBS, 0,4g Milchpulver; Tabelle B.4.) für 90 min inkubiert (Tabelle 3.8.). Nach erfolgter Inkubation der Sekundärantikörper wurde die Membran erneut auf dem Schüttler 2x5min mit TBS-T und anschließend 2x5min mit TBS gewaschen.

<b>Antigen</b>	<b>Verhältnis</b>
mouse	1,5µl auf 40ml 1% Milchpulverlösung
rabbit	2,5µl auf 40ml 1% Milchpulverlösung

### 3.3.6. Enhanced Chemiluminescence Reaktion

Die verwendete Enhanced Chemiluminescence Lösung (ECL-Lösung) wurde wie in Tabelle B.4. beschrieben hergestellt und lichtgeschützt gelagert. Für die Lumineszenzreaktion wurden 20ml der ECL-Lösung mit 6,5µl Wasserstoffperoxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) durchmischt. Die Membran wurde in dieser Lösung für 1min inkubiert, wobei beachtet wurde, dass alle Anteile der Membran mit der durch das H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> aktivierten ECL-Lösung bedeckt waren. Beim Entnehmen der Membran wurde überschüssige ECL-Lösung durch leichtes Schwenken der Membran entfernt. Die Membran wurde in einer Röntgenfilmkassette (PL-BW; Konica Minolta Medical & Graphic Imaging Europe GmbH, München, Deutschland) positioniert und mit einer Klarsichtfolie abgedeckt. Röntgenfilme (Curix HT1.000G Plus; AGFA HealthCare GmbH, Bonn, Deutschland) wurden in der Röntgenkassette der Membran ausgesetzt. Bis zu ihrer Verwendung wurden die Röntgenfilme in einer lichtundurchlässigen Aufbewahrungskammer (Dukasafe; Kindermann, Ochsenfurt, Deutschland) aufbewahrt. In jedem der 4 Western blot Versuche (entsprechend der 4 untersuchten Gene) wurden 15 Röntgenbilder

unterschiedlicher Belichtungszeit analog entwickelt. Hierfür wurden die Röntgenbilder in Amaloco Entwicklerlösung (Universal Feinkorn Entwickler AM74; Phototec GmbH, Norderstedt, Deutschland) getaucht. Dem folgte nach einem kurzen Bad in Unterbrecherlösung (Amaloco S 10 geruchloses Stopppad; Phototec GmbH, Norderstedt, Deutschland), die Fixierlösung (Amaloco X 89 ExtraFix geruchloser Schnellfixierer; Phototec GmbH, Norderstedt, Deutschland). Abschließend wurden die Röntgenbilder in klarem Leitungswasser von der restlichen Fixierlösung befreit und auf einer Wäscheleine mit Wäscheklammern zum Trocknen über Nacht aufgehängt. Die getrockneten Filme wurden anschließend mit einem Flachbettscanner (ScanJet-G4050; Hewlett-Packard, Palo Alto, USA) digitalisiert.

### **3.3.7. Statistische Auswertung**

Die optische Dichte der einzelnen Proteinbanden wurde mit der Software Imagepro-Plus 7.0 (MediaCybernetics, Bethesda, USA) bestimmt. Die optische Dichte von 100% wurde mit der Farbe Schwarz kalibriert. Für die statistischen Berechnungen wurde die Software SPSS 16.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) verwendet. Unterschiede in Patientenalter, RNA-Genexpressionslevel und Western blot Proteinlevel wurden unter Verwendung des Mann-Whitney U-Test analysiert (lokales Signifikanzniveau: 5%).

### **3.4. Immunhistologie**

Im Rahmen der immunhistologischen Untersuchungen wurden verschiedene Materialien benutzt. Im Anhang C sind Geräte (Tabelle C.1.), Verbrauchsmaterial (Tabelle C.2.), Antikörper (Tabelle C.3.), sowie die verwendeten Puffer und Lösungen (Tabelle C.4.) gelistet. Zur Herstellung der Puffer und Lösungen wurden die in Tabelle C.1. und C.2. genannten Geräte und Chemikalien benutzt.

### 3.4.1. Fixierung und Einbettung

Mit Hilfe eines Einbettautomaten (TES-1; Wendt GmbH & Co. KG, Georgsmarienhütte, Deutschland) wurden die Proben in Paraffin (Tissue Embedding Medium (Paraplast® Regular); Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland) eingebettet. Das verwendete Programm des Einbettautomaten ist in Tabelle 3.9. ersichtlich. Durch Behandlung in einer aufsteigenden Ethanolreihe (EtOH; Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) und Xylol (Aug. Hedinger GmbH & Co. KG, Stuttgart, Deutschland) wurden die Proben entwässert. Bevor die Proben mit flüssigem Paraffin überschichtet wurden, wurden sie entlang der geplanten Schnittrichtung in Einbettkassetten (Sanowa Laborprodukte GmbH, Leimen, Deutschland) positioniert.

**Tabelle 3.9.**

**Einbettprotokoll des TES-1 bei der Paraffinblockherstellung**

Station	Lösung	Zeit [h]
1	50% Ethanol	4
2	70% Ethanol	4
3	70% Ethanol	4
4	80% Ethanol	4
5	96% Ethanol	4
6	100% Ethanol	4
7	100% Ethanol	4
8	Xylol	4
9	Xylol	4
10	Paraffin	4
11	Paraffin	4
12	Paraffin	4

### 3.4.2. Paraffinschnitte

Aus den Paraffinblöcken wurden mit Hilfe eines Rotationsmikrotoms (pfm Rotary 3002; pfm Produkte für die Medizin AG, Köln, Deutschland) Schnitte mit einer Dicke von 4µm erstellt. Die einzelnen Schnitte wurden auf Superfrost® Plus Objektträger (Menzel GmbH, Braunschweig, Deutschland) aufgebracht und über Nacht in einem Heraeus Function Line Wärmeschrank (Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland) bei 48°C getrocknet.

### 3.4.3. Immunhistologische Färbung

Die immunhistologische Färbung wurde mit einem polyklonalen Primärantikörper gemäß der Avidin-Biotin Komplex Methode (ABC-Methode) mit Hilfe eines Vectastain® ABC Kit (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) vollzogen.

#### 3.4.3.1. Färbeprotokoll Avidin-Biotin Komplex Methode

Die Gewebeschnitte wurden deparaffinisiert. Hierfür wurden die Schnitte 2x5min in 100% Xylol und 5min in ein 50% Xylol-50% EtOH-Gemisch getaucht, bevor sie in einer absteigenden EtOH-Konzentrationsreihe (2x2min 100%, 2min. 96%, 2min 80%, 2min 70%, 2min 50% EtOH) hydriert wurden. Nach einem Spülvorgang mit H<sub>2</sub>O für 60s erfolgte eine Mikrowellenbehandlung (LG Electronics Deutschland GmbH, Ratingen, Deutschland) für 3x5min bei 600 Watt in Citratpuffer (pH 6,0) (Tabelle C.4.). Durch Bestrahlung mit Mikrowellen werden Bindungsstellen der Antigene freigelegt, die während der Fixierung mit Formalin durch Aldehydvernetzungen besetzt wurden. Anschließend wurden die Schnitte 20min in Citratpuffer abgekühlt und 1min mit Phosphat based saline-Puffer (PBS-Puffer; Tabelle C.4.) gespült. Um die endogenen Peroxidasen zu blockieren, wurden die Schnitte mit Wasserstoffperoxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) behandelt. Die endogene Peroxidase im Gewebe könnte beim Färbeporgang zu unspezifischer Hintergrundfärbung führen. Für hBD-1, hBD-2 und hBD-3 wurden die Schnitte 30min in 1% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> eingelegt (6,7ml 30%H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 193,3ml H<sub>2</sub>O), für Psoriasis 10min in 3%

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (20ml H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 180ml H<sub>2</sub>O). Die Schnitte wurden mit H<sub>2</sub>O gespült, in PBS-Puffer gelegt, abgetupft und in einer Inkubationskammer (Weckert Labortechnik, Kitzingen, Deutschland) für 60min mit Normal Goat Serum (Vector Laboratories, Burlingame, Ca, USA) geblockt. Hierfür wurden 30µl Goat Serum mit 1ml PBS-Puffer gemischt. Das Blocken vermindert die Bildung unspezifischer Bindungen der Primärantikörper, indem stark geladene Kollagen und Bindegewebsbestandteile besetzt werden. Das Goat Serum wurde verworfen und die Primärantikörper aufgetragen. Die Primärantikörper gegen hBD-1 und hBD-2 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) sowie gegen hBD-3 (Novus Biologicals, Littleton, CO, USA) wurden im Verhältnis 1:100, die Antikörperlösung gegen Psoriasis (Imgenex, San Diego, CA, USA) im Verhältnis 1:50 mit PBS-Puffer verdünnt (Tabelle C.3.). Die Negativkontrollen wurden nur mit PBS-Puffer behandelt. Die Inkubation aller 4 Primärantikörper erfolgte 60min bei Zimmertemperatur und anschließend über Nacht bei +4°C. Nach Inkubation wurden die Schnitte innerhalb einer Stunde auf Raumtemperatur gebracht, aus der Primärantikörperlösung entfernt und 3x5min mit PBS-Puffer gespült. Nun wurde der biotinylierte Sekundärantikörper aufgetragen (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA). Für hBD-1, hBD-2 und hBD-3 wurde Anti-Rabbit, für Psoriasis Anti-Mouse verwendet (Tabelle C.3.). Beide Antikörperlösungen wurden gemäß den Herstellerangaben im Verhältnis 1:200 mit PBS-Puffer verdünnt. Die Inkubationszeit betrug für beide Sekundärantikörper 60min.

Während der Inkubation wurde die Avidin-Peroxidase Lösung erstellt. Hierfür wurde das Vectastain<sup>®</sup> ABC Kit benutzt, wobei jeweils 10µl Avidin (aus dem Vectastain<sup>®</sup> ABC Kit) und biotinylierte Meerrettichperoxidase (aus dem Vectastain<sup>®</sup> ABC Kit) mit 1ml PBS-Puffer gemischt wurde. Die Sekundärantikörperlösung wurde verworfen und die Schnitte 3x5min mit PBS-Puffer gespült. Die Avidin-Peroxidaselösung wurde für 45min aufgetragen. Danach wurden die Schnitte wieder für 3x5min mit PBS-Puffer gespült. Die Schnitte wurden mit Peroxidase konjugiertem Streptavidin (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) 45min inkubiert. Als Chromogen wurde Diaminobenzidin (DAB) benutzt. 500µl DAB-Lösung (Tabelle C.4.) wurde mit 1µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> gemischt und anschließend auf die Schnitte bis zum Eintritt der Färbung appliziert. Dies dauerte bei Psoriasis circa 15min, bei hBD-1, hBD-2 und hBD-3 circa 5min. Das DAB wurde mit H<sub>2</sub>O abgespült. Die Schnitte wurden für 3s mit Hämalaun (Mayer hematoxylin; Bio Optica, Mailand, Italien) gegengefärbt, für 10min unter Leitungswasser gestellt und anschließend kurz mit H<sub>2</sub>O gespült. Nach

Behandlung in einer aufsteigenden Alkoholreihe zur Dehydrierung, einem Xylol-Ethanol Gemisch und 2x in Xylol, wurden sie mit DPX Mountant for histology (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland) gedeckelt.

#### **3.4.3.2. Positiv- und Negativkontrolle**

Von jeder Probe wurden zwei Schnitte untersucht. Außerdem wurden sowohl Positiv- wie auch Negativkontrollen durchgeführt. Als Positivkontrollen wurde Gewebe immunhistologisch untersucht, von dem aus vorherigen Experimenten bekannt war, dass das entsprechende Gen in großer Menge exprimiert wird. Für hBD-1, hBD-2 und hBD-3 wurde eine Gewebeprobe einer menschlichen Speicheldrüse, für Psoriasin eine Gewebeprobe einer menschlichen Lippe untersucht. Als Negativkontrolle wurde bei jeder immunhistologischen Untersuchung ein Schnitt derselben Probe mitgeführt. Dieser wurde jedoch nicht mit dem Primärantikörper inkubiert, sondern stattdessen mit PBS-Puffer. Dies war die einzige Abweichung vom bereits beschriebenen Protokoll. Negativkontrollen zeigen trotz Blocken vorhandenes Hintergrundrauschen. Dieses entsteht vor allem durch endogene Enzymaktivität im Gewebe, wie zum Beispiel durch die endogene Peroxidase. Die endogene Peroxidase kommt unter anderem im Hämoglobin der Erythrozyten, im Myoglobin der Muskelzellen oder in den Granula der Granulozyten und Makrophagen vor.

#### **3.4.4. Auswertung**

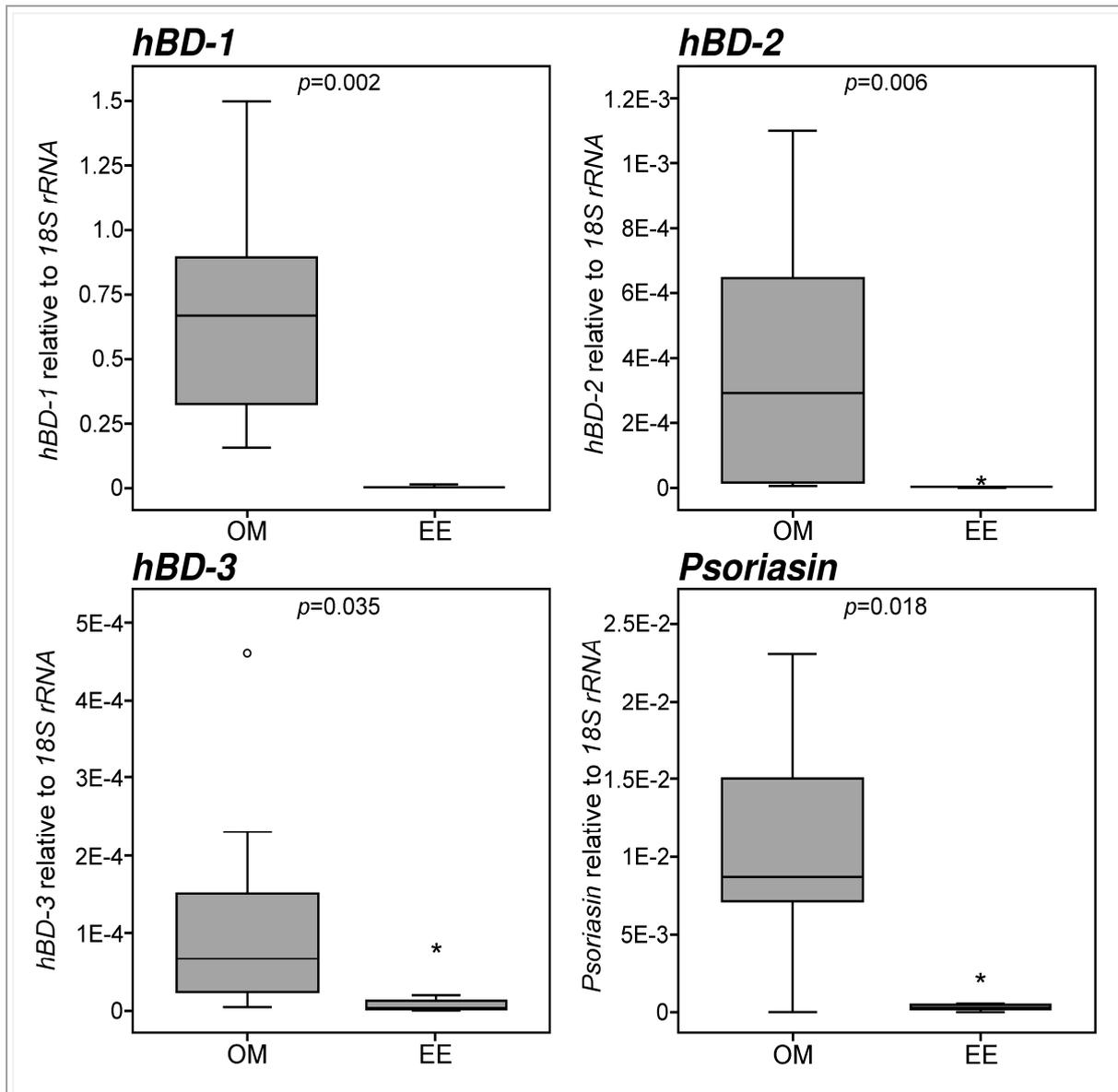
Die Auswertung der immunhistologischen Schnitte erfolgte bei 300-facher Vergrößerung mit einem Nikon Eclipse 80i Mikroskop (Nikon, Düsseldorf, Deutschland). Die Intensität der Färbungen wurde unabhängig voneinander von zwei Untersuchern für die einzelnen Hautschichten bewertet. Die Einteilung war: negative, schwache, moderate oder starke Expression des Zielproteins. Die Ergebnisse wurden durch Positiv- und Negativkontrolle bestätigt.

## 4. Ergebnisse

### 4.1. Ergebnisse der quantitativen Echtzeit-Polymerase Kettenreaktion

In oraler Mucosa (n=7) und extraoraler Haut (n=7) wurde durch qRT-PCR die transkribierte Menge der Gene hBD-1, hBD-2, hBD-3 und Psoriasin bestimmt. Alle vier AMP wurden in jeder Probe beider Gruppen nachgewiesen. Zwischen den Gruppen konnte kein Altersunterschied festgestellt werden (p= 0,23). Jedoch war der Expressionslevel der Proteine unterschiedlich. Dieser war bei allen vier untersuchten AMP in den intraoralen Proben signifikant höher (p<0,05), als im extraoralen Epithel. Das Peptid hBD-1 wurde in der oralen Schleimhaut um das 239,3-fache vermehrt vorgefunden (p=0,002), hBD-2 wurde in der Schleimhaut um das 145,0-fache erhöht gemessen (p=0,006), hBD-3 wurde um das 24,8-fache (p=0,035) und Psoriasin um das 31,1-fache (p=0,018) in der Mundschleimhaut vermehrt nachgewiesen. Der quantitative Vergleich der gemittelten Transkriptionslevel in den Gruppen zeigte eine ausgeprägte Transkription von hBD-1. Psoriasin mRNA war sowohl in den intraoralen, als auch in den extraoralen Proben in niedrigerer Menge vertreten als die hBD-1 mRNA, überstieg aber die Menge an mRNA von hBD-2 und hBD-3. Die Expression von hBD-2 und hBD-3 war in beiden Gruppen vergleichbar. Die genauen Werte sind in Tabelle 4.1. aufgeführt. Abbildung 4.1. zeigt Boxplot Diagramme zur Visualisierung der Expression antimikrobieller Peptide in der oralen Mukosa (OM) und dem extraoralen Epithel (EE). Die Berechnung der Daten erfolgte anhand der Ergebnisse der qRT-PCR.

<b>Tabelle 4.1.</b>				
<b>Ergebnisse der qRT-PCR Auswertung</b>				
<b>Gen</b>	<b>PCR Ergebnisse (Median)</b>		<b>Verhältnis</b>	<b>p-Wert</b>
	<b>Gruppe 1 (OM)</b>	<b>Gruppe 2 (EE)</b>	<b>OM/EE</b>	<b>Signifikanz 0,05</b>
<b>hBD-1</b>	<b><math>6,7 \times 10^{-1}</math></b>	<b><math>2,8 \times 10^{-3}</math></b>	<b>239,3</b>	<b>0,002</b>
<b>hBD-2</b>	<b><math>2,9 \times 10^{-4}</math></b>	<b><math>2,0 \times 10^{-6}</math></b>	<b>145,0</b>	<b>0,006</b>
<b>hBD-3</b>	<b><math>6,7 \times 10^{-5}</math></b>	<b><math>2,7 \times 10^{-6}</math></b>	<b>24,8</b>	<b>0,035</b>
<b>Psoriasin</b>	<b><math>8,7 \times 10^{-3}</math></b>	<b><math>2,8 \times 10^{-4}</math></b>	<b>31,1</b>	<b>0,018</b>



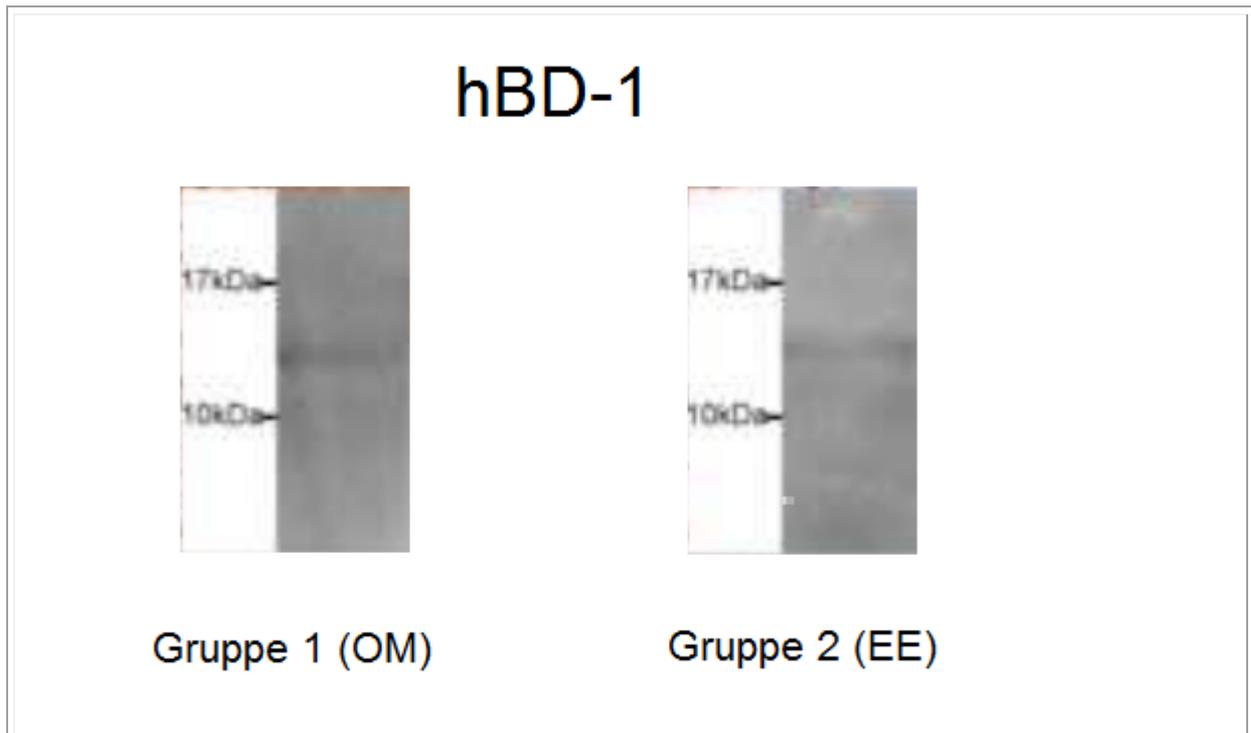
**Abbildung 4.1. Box-Plot Diagramme der qRT-PCR Ergebnisse**

Die Box-Plot-Diagramme zeigen die in der qRT-PCR ermittelten und normalisierten Expressionswerte für die antimikrobiellen Peptide in der oralen Mukosa (OM) und dem extraoralen Epithel (EE) im Verhältnis zu 18S rRNA. Die horizontalen Linien innerhalb der Boxen zeigen die Median Werte. Die grauen Rechtecke reichen vom 75sten Perzentil (Oberkante des Rechtecks) bis zum 25ten Perzentil (Unterkante des Rechtecks). Die Spannweite der Messungen zeigt die vertikale Linie. Sterne stehen für Ausreißer. Extreme Ausreißer werden durch Kreise symbolisiert. Eine verstärkte Expression der Gene hBD-1, hBD-2, hBD-3 und Psoriasin wurde in der oralen Mukosa (OM) festgestellt.

**4.2. Ergebnisse des Western blot**

Die vier untersuchten Gene (hBD-1, hBD-2, hBD-3 und Psoriasin) wurden in allen Proben von Gruppe 1 (OM; n=4) und Gruppe 2 (EE; n=4) nachgewiesen. Für das Gen hBD-1 wurde kein signifikanter Unterschied der Proteinmenge zwischen den beiden Gruppen festgestellt (p=0,083). Die Gene hBD-2 (p=0,021) und hBD-3 (p=0,043) zeigten in Gruppe 1 (OM) eine höhere Intensität als in Gruppe 2 (EE). Bei Psoriasin (p=0,021) wurde ein höherer Wert bei Gruppe 2 (EE) vorgefunden. Die detaillierten Ergebnisse der statistischen Analyse und die gemessenen Werte der optischen Dichte sind in Tabelle 4.2. gelistet.

<b>Tabelle 4.2. Ergebnisse der Western blot Auswertung</b>			
	Mittlere optische Dichte (schwarz = 100%)		Signifikanz: 0,05
<b>Gen</b>	<b>Gruppe 1 (OM)</b>	<b>Gruppe 2 (EE)</b>	<b>p-Werte</b>
hBD-1	5,9	10,9	0,083
hBD-2	13,38	6,65	0,021
hBD-3	20,46	9,98	0,043
Psoriasin	10,67	43,27	0,021



**Abbildung 4.2. Ergebnisse des hBD-1 Western blot**

Abbildung 4.2. zeigt repräsentativ die erhaltenen hBD-1 Banden im Western blot für Orale Mukosa (Gruppe 1; OM) und extraoralem Epithel (Gruppe 2; EE). Zur Orientierung ist die erhaltene 10kDA und 17kDA Bande des verwendeten Markers eingezeichnet. hBD-1 konnte in beiden Gruppen bei circa 13kDA als einzelne Bande detektiert werden. Ein signifikanter Unterschied in der optischen Dichte zwischen den Gruppen konnte nicht festgestellt werden (OM: 5,9; EE 10,9).

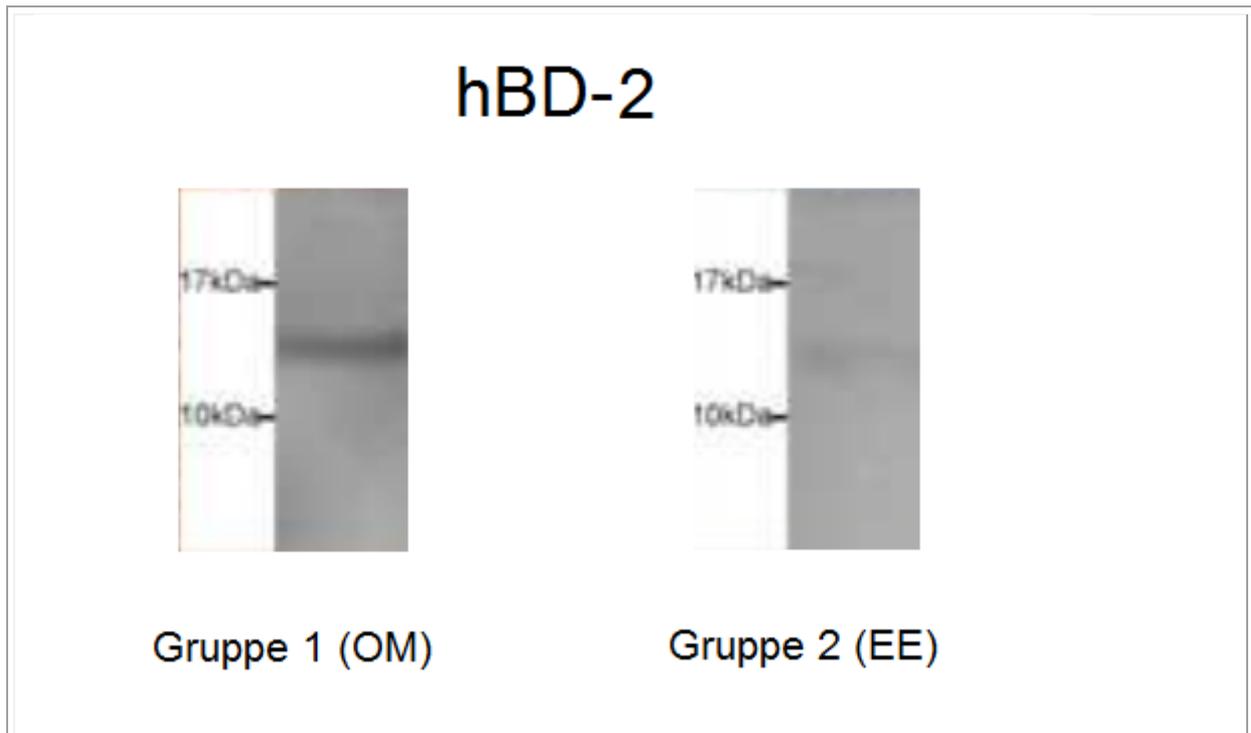
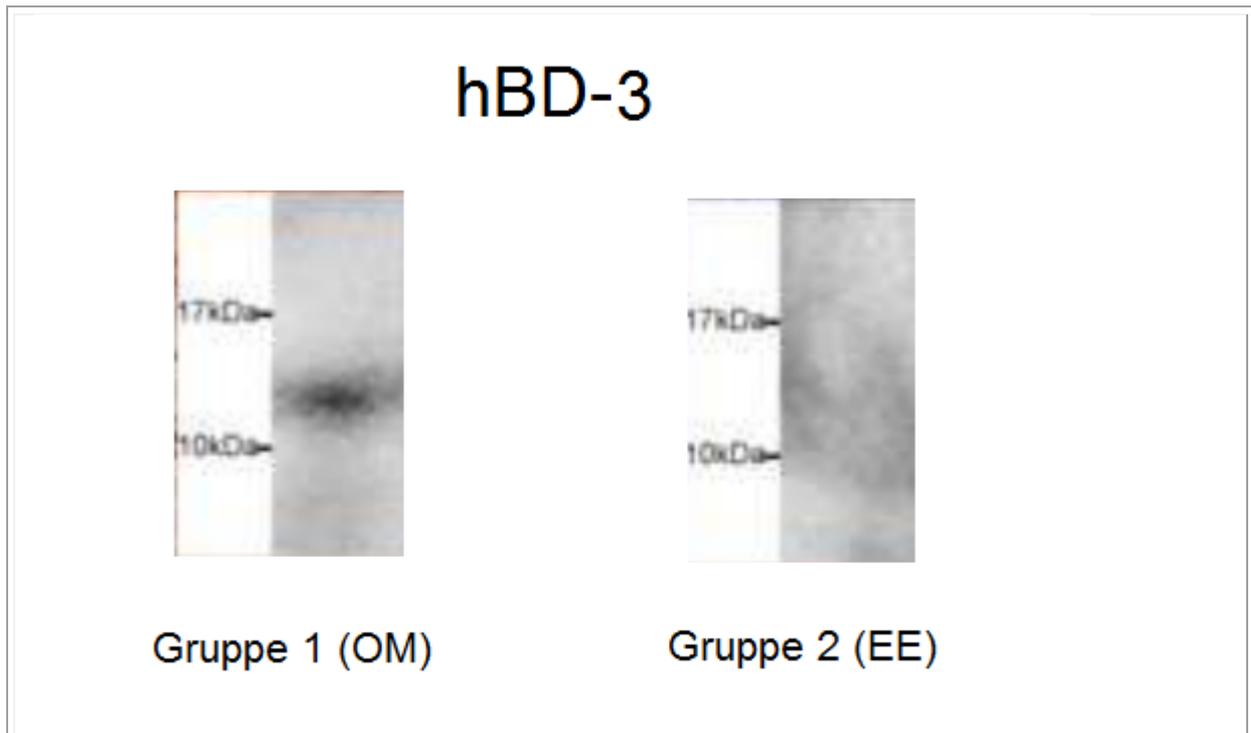
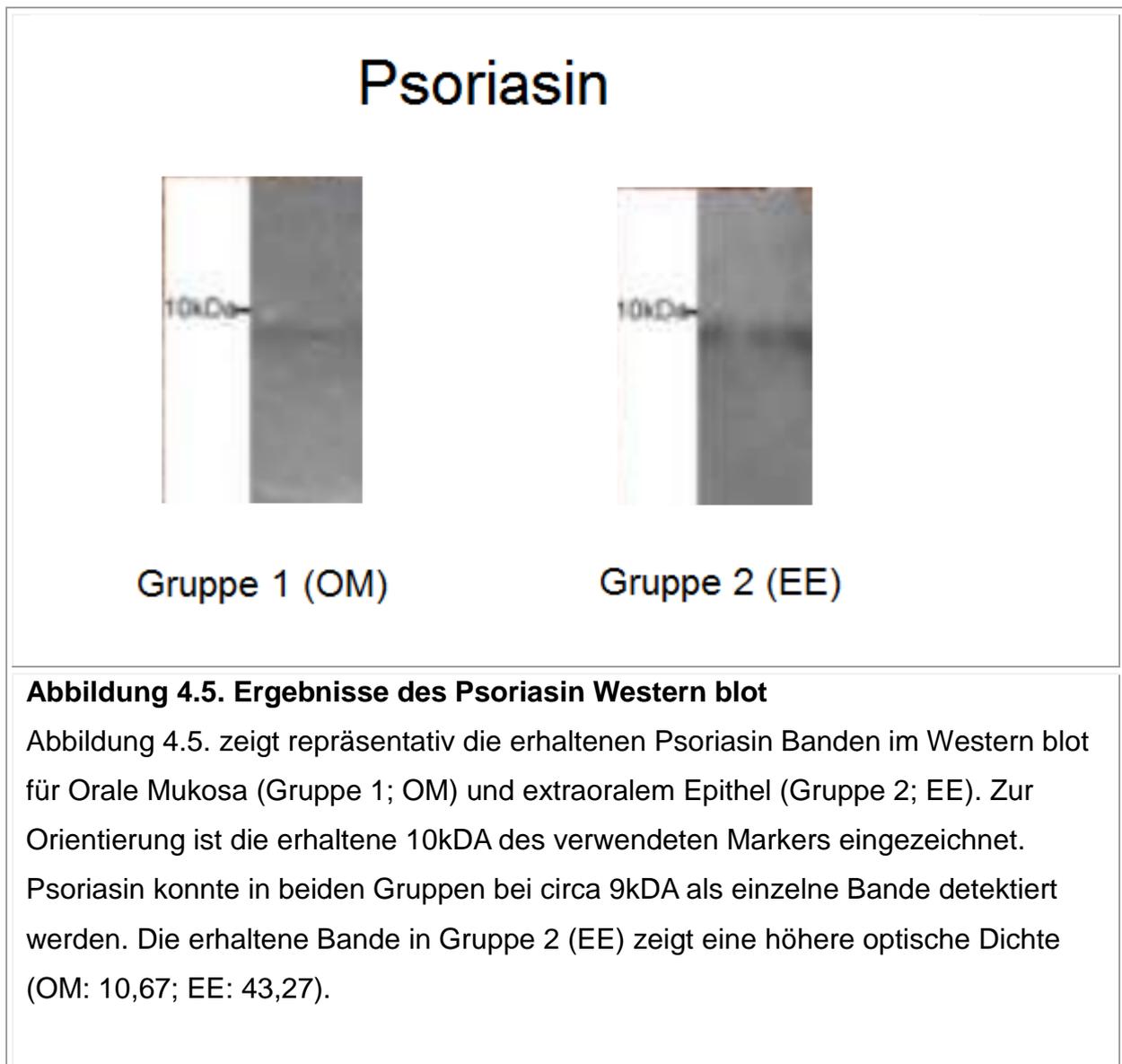
**Abbildung 4.3. Ergebnisse des hBD-2 Western blot**

Abbildung 4.3. zeigt repräsentativ die erhaltenen hBD-2 Banden im Western blot für Orale Mukosa (Gruppe 1; OM) und extraoralem Epithel (Gruppe 2; EE). Zur Orientierung ist die erhaltene 10kDA und 17kDA Bande des verwendeten Markers eingezeichnet. hBD-2 konnte in beiden Gruppen bei circa 14kDA als einzelne Bande detektiert werden. Die erhaltenen Bande in Gruppe 1 (OM) zeigt eine höhere optische Dichte (OM: 13,38; EE: 6,65).



**Abbildung 4.4. Ergebnisse des hBD-3 Western blot**

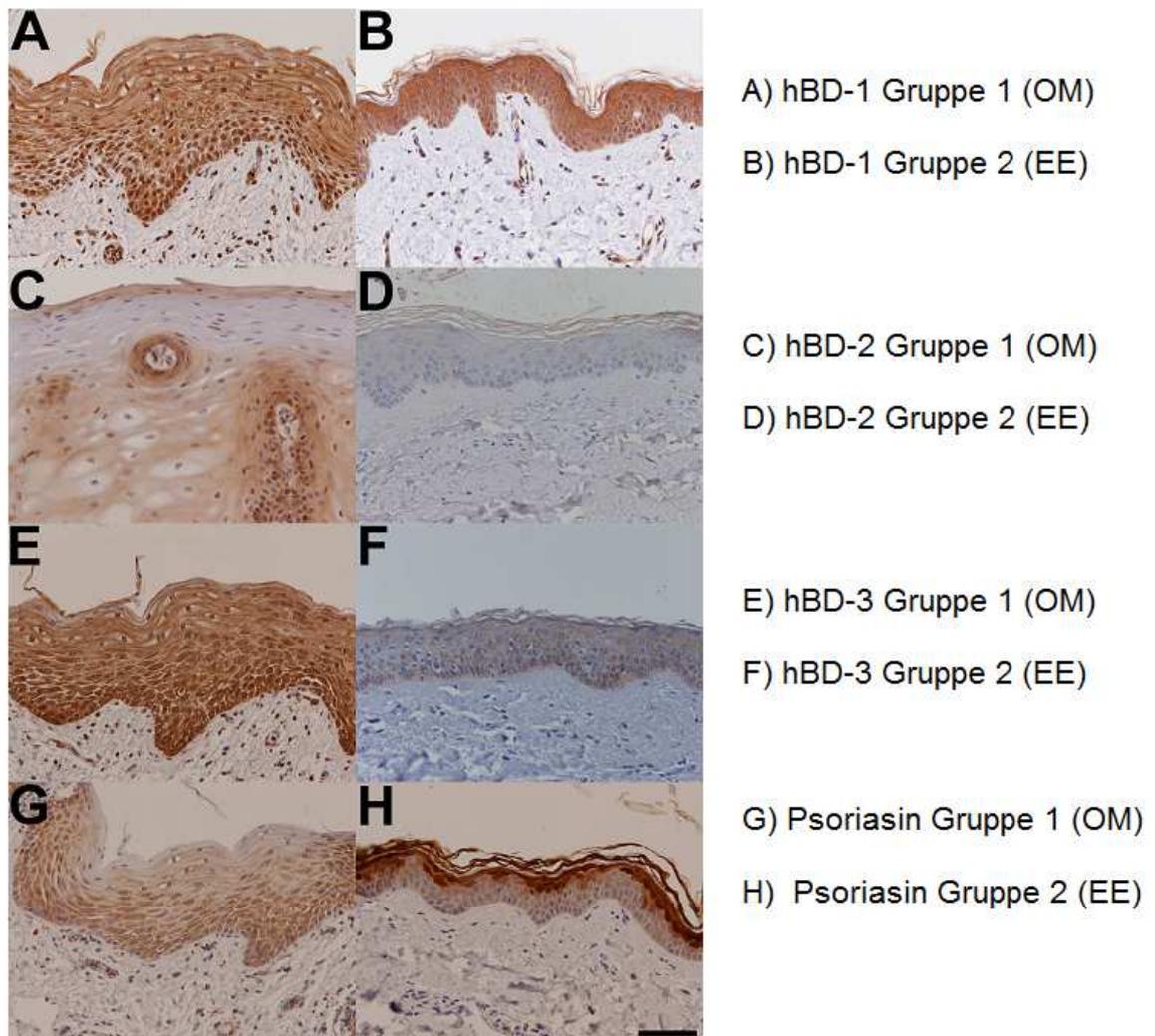
Abbildung 4.4. zeigt repräsentativ die erhaltenen hBD-3 Banden im Western blot für Orale Mukosa (Gruppe 1; OM) und extraoralem Epithel (Gruppe 2; EE). Zur Orientierung ist die erhaltene 10kDA und 17kDA Bande des verwendeten Markers eingezeichnet. hBD-3 konnte in beiden Gruppen bei circa 12kDA als einzelne Bande detektiert werden. Die erhaltene Bande in Gruppe 1 (OM) zeigt eine höhere optische Dichte (OM: 20,46; EE: 9,98)



### 4.3. Ergebnisse der Immunhistologie

Abbildung 4.6. zeigt repräsentativ die angefertigten immunhistologischen Schnitte. Die Auswertung der immunhistologischen Schnitte ergab folgende Ergebnisse:

Für hBD-1 war kein Unterschied im Proteinlevel zwischen den Gruppen ersichtlich. hBD-1 war homogen im stratum basale, stratum spinosum und stratum granulosum des keratinisierten Plattenpithels der Haut in einer schwach bis moderat ausgeprägten Färbung verteilt. Im stratum corneum der Haut war die Färbeintensität von hBD-1 schwächer ausgeprägt. In der oralen Mukosa war hBD-1 schwach bis moderat in allen Schichten (stratum basale, stratum spinosum und stratum superficiale) verteilt. Die Färbeintensität von hBD-2 und hBD-3 waren in Gruppe 1 (OM) stärker ausgeprägt. Die Färbeintensität von hBD-2 in der Epidermis war im stratum basale schwach. Im stratum spinosum, stratum granulosum und stratum corneum moderat. Die orale Mukosa war stärker angefärbt. Für hBD-3 konnte eine moderate Immunreaktivität in allen Schichten der Epidermis und Mukosa gefunden werden. Auch hier zeigte das immunhistologische Präparat der oralen Mukosa erhöhte Intensität. Die Färbung von Psoriasin zeigte einen erhöhten Proteinlevel in der extraoralen Haut, vor allem im stratum corneum. Es zeigten alle Schichten beider Gruppen eine Immunreaktivität. Das Signal war aber bei den Proben der Mukosa in der Basalschicht am meisten ausgeprägt, wohingegen das stärkste Signal bei den Proben von Gruppe 2 (EE) im stratum corneum beobachtet wurde.



#### Abbildung 4.6. Immunhistologische Schnitte

Repräsentative immunhistologische Schnitte von hBD-1 (Schnitte: A, B), hBD-2 (Schnitte: C, D), hBD-3 (Schnitte: E, F) und Psoriasis (Schnitte G, H). Die immunhistologischen Schnitte der oralen Mukosa (Gruppe 1; OM) sind in der linken Spalte angeordnet (Schnitte: A, C, E, G). Die Schnitte des extraoralen Epithels (Gruppe 2; EE) sind in der rechten Spalte abgebildet (Schnitte: B, D, F, H). In der rechten unteren Ecke ist ein Maßstabsbalken abgebildet. Die Länge des Balkens entspricht 0,1mm. Für hBD-1 wurde kein Unterschied in der Proteinkonzentration festgestellt ( $p=0,083$ ). Die Schnitte zeigten für hBD-2 ( $p=0,021$ ) und hBD-3 ( $p=0,043$ ) in Gruppe 1 (OM) eine stärkere Ausprägung. Für Psoriasis wurde eine gesteigerte Proteinkonzentration in Gruppe 2 (EE), und dort vor allem im stratum corneum festgestellt ( $p=0,021$ ).

## 5. Diskussion

Physiologisches Vorkommen, Verteilung und Funktion der AMP wurden bereits sowohl in gesunder, als auch infizierter oraler Mukosa [Bissell, J., 2004, S. 279; Dommisch, H., 2005, S. 187; Gorr, S. U., 2009, S. 157] und extraoraler Haut [Braff, M. H., 2005, S. 9; Steinstraesser, L., 2008, S. 531] untersucht. In der Mundschleimhaut wurden neben Beta-Defensinen – welche ebenfalls in der Zahnpulpa nachgewiesen wurden [Dommisch, H., 2005, S. 165] – auch Alpha-Defensine entdeckt [Devine, D. A., 2003, S. 432]. Insgesamt wurden bis dato in der Mundhöhle 45 AMP detektiert [Gorr, S. U., 2009, S. 154]. Jedoch wurde bis zum gegenwärtigen Zeitpunkt die Genexpression der AMP in beiden Gewebearten nicht zueinander in Relation gesetzt. Im Rahmen dieser Dissertation wurde die Expression der AMP hBD-1, hBD-2, hBD3 und Psoriasin in gesunder Mundschleimhaut und Haut untersucht und quantitativ miteinander verglichen. Ein Altersunterschied in beiden Patientengruppen wurde vermieden, da nach jetzigem Wissensstand eine altersabhängige Expression von AMP nicht auszuschließen ist. So wurde zum Beispiel in der frühen Entwicklungsphase von Hühnern eine altersabhängige Expression von AMP bemerkt [Achanta, M., 2012, S. 5]. Ein möglicher Einfluss des Geschlechts auf die Expression wurde bis dato nicht berichtet und in der Patientenauswahl nicht berücksichtigt.

In den Western blot Untersuchungen wurden nicht alle AMP auf der erwarteten Bandenhöhe lokalisiert (Psoriasin wurde nahe seiner oft berichteten Größe von ~12 kDA detektiert, wohingegen die anderen AMP jeweils zwischen 10-17 kDA detektiert wurden, obwohl sie bei  $\leq 10$  kDA erwartet wurden). Allerdings wurden einzelne Banden detektiert, die sich jeweils deutlich darstellten. Auch weitere durchgeführte Western blot Untersuchungen mit unterschiedlichen Markern sowie denaturierenden und reduzierenden Pufferlösungen führten zu gleichem Ergebnis. Eine mögliche Erklärung für die abweichende Bandengröße wäre eine Kopplung der AMP an Carrier Proteinen, von denen sie bei Bedarf freigesetzt werden könnten. Ebenfalls könnten weitere Faktoren die Wandergeschwindigkeit des Proteins in der Gelelektrophorese und damit die resultierende Bandenhöhe beeinflussen. Hierzu gehören beispielsweise posttranslationale Modifikationen der Proteine wie Phosphorylierung oder Glycosylierung, die die Größe des Proteins nachträglich verändern könnten.

Ebenso bestünde die Möglichkeit, dass Proteine als Pro-Protein synthetisiert und posttranslational in ihre aktive Form gespaltet würden. Auch könnten Splice Varianten, trotz gemeinsamer genetischer Herkunft, eine mögliche Erklärung für die Existenz unterschiedlich großer Proteine sein. Ebenso könnte der Ladungszustand der Proteine oder das Vorhandensein von Dimeren oder Multimeren die Bandenhöhe modifizieren. Dies wird normalerweise durch die Behandlung mit reduzierenden Reagenzien verhindert, es könnten jedoch starke Interaktionen die Auflösung von Dimeren verhindern und zu größeren Proteinbanden führen. Eine Ursache in dem benutzten Western blot Protokoll konnte ausgeschlossen werden, da in durchgeführten Vorversuchen die verwendeten Antikörper spezifisch rekombinante Proteine der untersuchten AMP an der erwarteten Bandgröße detektierten.

Die im Rahmen dieser Dissertationsschrift durchgeführten Untersuchungen haben den momentanen Wissensstand über die Genexpression der untersuchten AMP in der Mundhöhle erweitert. Zum ersten Mal wurde die Expression von hBD-1, hBD-2, hBD-3 und Psoriasin in oraler Mukosa und extraoralem Epithel quantitativ verglichen. Durch die Untersuchungen wurde gezeigt, dass alle vier Gene in beiden Gewebearten exprimiert werden. Nachweis, Verteilung und Intensität der AMP innerhalb der einzelnen Gewebeschichten bestätigen frühere Ergebnisse extraoraler [Kesting, M. R., 2010, S. 123-124] und intraoraler Untersuchungen [Bissell, J., 2004, S. 280]. Innerhalb der Gruppen wurden die untersuchten AMP in gleichem Verhältnis zueinander nachgewiesen. In beiden Gruppen dominierte die Expression von hBD-1. Psoriasin war in einer höheren Anzahl an Transkripten als hBD-2 und hBD-3 vorhanden.

Die erhaltenen Ergebnisse stimmen mit früheren Berichten bezüglich der hBD-1 Expression in menschlicher Haut überein [Fulton, C., 1997, S. 1750]. Jedoch lässt die Diskrepanz der ermittelten hBD-1 Werte vor Transkription (qRT-PCR) und Proteinebene (Western blot und Immunhistologie) die Vermutung nahe liegen, dass die gemessenen hohen Werte in der oralen Mukosa für die hBD-1 Transkription nicht zu einer erhöhten Proteinmenge führen. Dies kann möglicherweise Folge eines vermehrten Verbrauchs der hBD-1 Proteine in der oralen Mukosa sein, die der Organismus durch eine erhöhte RNA-Synthese zu kompensieren versucht. Im Falle von hBD-2 und hBD-3 waren sowohl die Proteinlevel, als auch die Transkriptionsmenge in der oralen Mukosa höher als im extraoralen Epithel. Interessanterweise waren die Proteinlevel von Psoriasin in der extraoralen Haut

höher als in der oralen Mukosa, obwohl die Transkriptionslevel in der Mukosa höher waren. Dies wirkt auf den ersten Blick verwunderlich. Man muss aber bedenken, dass Psoriasin in den verschiedenen Hautschichten unterschiedlich verteilt vorlag (Abbildung 4.6.). Eine große Menge Psoriasin scheint im stratum corneum der Haut gespeichert zu werden, jedoch nicht in den oberen Schichten der Mukosa. Demzufolge ist es möglich, dass Psoriasin in höheren Mengen in der Mukosa synthetisiert wird, anschließend aber zu einem hohen Anteil in die Mundhöhle freigesetzt wird.

Wie in der Alternativhypothese beschrieben, bestehen quantitative Expressionsunterschiede in beiden Epithelien. Die Ergebnisse bekräftigen die Vermutung, dass eine verstärkte Expression einiger AMP ein Grund für die intraoral generell gute Wundheilungstendenz sein könnte.

Interessanterweise war die Expression von hBD-1 in der oralen Mukosa erhöht. In der Literatur ist die Frage aufgekommen, ob ein entzündlicher Stimulus die Expression von hBD-1 beeinflussen könnte, oder diese konstitutiv ist. In einem Vergleich zwischen gesundem und postoperativ entzündetem Epithel stellten Kesting et al. keinen Unterschied in der Expression von hBD-1 fest [Kesting, M. R., 2010, S. 124]. Eine andere Forschungsgruppe kam zu dem Ergebnis, dass die Transkription von hBD-1 konstitutiv sein könnte [Zhao, C., 1996, S. 321]. Ebenso wurde eine konstitutive Expression von hBD-1 mRNA in Gingivaepithelzellen berichtet, da in der hBD-1 mRNA Expression zwischen entzündeten und nicht entzündeten Proben kein signifikanter Unterschied festgestellt wurde [Krisanaprakornkit, S., 1998, S. 4225]. Es ist daher anzunehmen, dass hBD-1 als fester Bestandteil der Immunabwehr konstitutiv exprimiert wird. Dafür spricht auch, dass laut den erhaltenen Ergebnissen hBD-1 in beiden Gewebearten am stärksten exprimiert wird. Jedoch berichteten andere Autoren von einer Hochregulation der hBD-1 Expression in Keratinozyten der menschlichen Haut, nachdem diese mit Lipopolysacchariden, Peptidoglycan von *Staphylococcus aureus* und SpeB, welches ein spezieller Virulenz Faktor von *Streptococcus pyogenes* ist, inkubiert wurde [Sorensen, O. E., 2005, S. 4872].

Unabhängig von einer potentiellen Beeinflussung der hBD-1 Expression durch Entzündungsgeschehen wurde gezeigt, dass sich die Expression von hBD-1 zwischen gesunder Mundschleimhaut und gesundem extraoralem Epithel unterscheidet. In der oralen Mukosa (Gruppe 1; OM) war diese stärker als im extraoralen Epithel (Gruppe 2; EE). Weiterhin lassen die Ergebnisse vermuten, dass

hBD-1 nicht nur konstitutionell, sondern auch in großen Mengen produziert wird, um schnell in großer Anzahl für die Immunabwehr verfügbar zu sein. Jedoch scheint hBD-1 im Vergleich mit anderen Defensinen eine geringere antibiotische Aktivität aufzuweisen [Yadava, P., 2006, S. 134; Zaalouk, T. K., 2004, S. 2778]. Es könnte sein, dass eine große Menge hBD-1 transkribiert wird, um die geringere Wirksamkeit zu kompensieren. In vitro wurde aber gezeigt, dass nach Reduktion von Disulfidbrücken hBD-1 stark antibakteriell gegen Pilze und grampositive Bakterien wirksam ist [Schroeder, B. O., 2011, S. 419] und somit in seiner Aktivität gesteigert werden kann. Ob der menschliche Organismus diese Modifikation nutzt und dieser Sachverhalt auch in vivo Gültigkeit besitzt, sollte Gegenstand zukünftiger Untersuchungen sein.

Im Gegensatz zu den hohen konstitutiven Expressionsraten von hBD-1 scheint hBD-2 im physiologischen Zustand nur in geringem Maße synthetisiert zu werden, aber vermutlich nach Stimuli wie Infektionen und Entzündungen hochreguliert zu werden [Froy, O., 2005, S. 1390; Gallo, R. L., 2002, S. 825; Kanda, N. and Watanabe, S., 2012, S. 436-445]. Dies wird durch weitere Studien gestützt [Kesting, M. R., 2010, S. 124; Krisanaprakornkit, S., 2000, S. 2913; Mathews, M., 1999, S. 2744]. Eine vermehrte Transkription von hBD-2 nach Inkubation mit bakteriellen Pathogenen wurde ebenso in der Epidermis festgestellt [Liu, A. Y., 2002, S. 279]. Bei Wundheilungsstörungen wurde eine 40-fache Hochregulation der hBD-2 Expression gemessen [Kesting, M. R., 2010, S. 125]. Auch chronische Wunden zeigten eine vermehrte hBD-2 Expression [Butmarc, J., 2004, S. 440]. Dies könnte auch auf intraorales Gewebe zutreffen: Eine Forschungsgruppe stimulierte Gingivaepithelzellen in vitro mit Bakterien und bakteriellen Antigenen. Dies führte zu einem reaktiven Anstieg der mRNA Expression von hBD2 [Krisanaprakornkit, S., 2000, S. 2909]. Nach Stimulation könnte die Expression von hBD-2 sogar das Niveau des konstitutiv sezernierten hBD-1 in der oralen Mukosa erreichen, unter Umständen sogar übertreffen. Dommisch et al. stellten fest, dass bei Gingivitis und Periodontitis hBD-2 in größeren Mengen als hBD-1 exprimiert wird, in gesunden Vergleichsproben jedoch vergleichbare Expressionslevel vorhanden waren [Dommisch, H., 2005, S. 187]. Dies spricht für eine wichtige Rolle des hBD-2 bei der Bekämpfung von Infekten.

Wie im Falle von hBD-2 scheinen auch die Expressionsraten des hBD-3 im physiologischen Zustand sehr gering zu sein, aber durch Stimuli hochreguliert

werden zu können [Froy, O., 2005, S. 1390; Gallo, R. L., 2002, S. 825; Kesting, M. R., 2010, S. 124]. Für hBD-3 wird zudem vermutet, dass es unter anderem eine wichtige Rolle bei der Wundheilung spielt, da es bei infizierten Wunden von diabeteserkrankten Tieren die Heilung fördern kann [Hirsch, T., 2009, S. 226]. Es scheint, dass hBD-2 und hBD-3 im Organismus stärker exprimiert werden könnten, wenn konstitutiv exprimierte AMP eine zu geringe Abwehrkraft aufweisen [Nakatsuji, T. and Gallo, R. L., 2011, S. 3].

Die Ergebnisse dieser Dissertationsschrift zeigen, dass die untersuchten AMP in der Mundhöhle stärker exprimiert werden. Dies könnte durch die verminderte mechanische Barriere der Mundschleimhaut erklärt werden. Die Mundhöhle ist im Gegensatz zur Körperhaut im physiologischen Zustand zum Großteil nicht keratinisiert. Zudem ist sie aufgrund ihres feuchten und warmen Milieus Wirt für eine Vielfalt an Mikroorganismen. Als Folge könnte eine höhere Expressionsrate der AMP einen Ausgleich für die reduzierte mechanische Barriere der Mundschleimhaut darstellen, um die orale Gesundheit trotz der ausgeprägten mikrobiellen Besiedlung erhalten zu können.

Welche Rückschlüsse ergeben die vorliegenden Untersuchungsergebnisse im Hinblick auf einen möglichen zukünftigen Einsatz von AMP-Derivaten als mögliches Therapeutikum für orale und extraorale Infektionen? Die Ergebnisse unterstützen das Konzept einer Schlüsselrolle der AMP bei der oralen Immunabwehr und könnten einen Startpunkt für neue Strategien in der Therapie von oralen Infektionen darstellen. Vorstellbar wäre zum Beispiel eine Substitutionstherapie mit AMP-Derivaten. Einige Erkrankungen könnten auf eine zu geringe Synthese von AMP zurückzuführen sein. So hat eine Studie das gehäufte Auftreten von Parodontalerkrankungen bei Morbus Kostmann in Zusammenhang mit einer verringerten AMP-Synthese gebracht [Putsep, K., 2002, S. 1148; Zasloff, M., 2002, S. 1116].

Wie bereits in der Einleitung beschrieben, werden große Hoffnungen in eine zukünftige Applikation synthetischer AMP als Alternative für konventionelle Antibiotika gesetzt [Gilmore, K., 2009, S. 782; Steinstraesser, L., 2009, S. 3961]. Grund hierfür ist ihre Eigenschaft gleichzeitig antimikrobiell aktiv und Immunsystem stimulierend zu sein [Hamill, P., 2008, S. 632; Hancock, R. E. and Sahl, H. G., 2006, S. 1551]. Im Hinblick auf das zunehmende Auftreten multiresistenter Keime sind Alternativen für konventionelle Antibiotika dringend erforderlich. In der Tumorthherapie ist ebenfalls ein

möglicher therapeutischer Einsatz von AMP im Gespräch [Meyer, J. E. and Harder, J., 2007, S. 3125-3130]. Beispielshalber könnte die AMP Expression einen Marker für das Tumorstadium darstellen. So wird beispielsweise vermutet, dass Psoriasin bei der Entstehung von Brustkrebs eine Rolle spielt, und in verschiedenen Tumorstadien in unterschiedlicher Quantität nachgewiesen werden kann [Watson, P. H., 1998, S. 570]. Auch für die Behandlung von Infektionen könnten AMP-Derivate eingesetzt werden. Erste klinische Versuche werden bereits durchgeführt [Lipsky, B. A., 2008, S. 1542]. Diese haben jedoch Problematiken aufgezeigt. Hohe Produktionskosten, ein schneller Abbau synthetischer AMP durch Proteasen und Zytotoxizität führen momentan zu einem engen potentiellen therapeutischen Anwendungsbereich [Vaara, M., 2009, S. 574]. Dies macht es im Besonderen notwendig, die physiologische Verteilung von AMP in den einzelnen Gewebearten zu untersuchen. Da diese Studie eindeutige Unterschiede in der Expression der AMP zwischen Mundschleimhaut und Haut zeigte, sollten diesbezügliche Untersuchungen für alle als Therapeutikum einzusetzenden AMP-Derivate und für alle geplanten Anwendungsareale vor Applikation der Derivate erfolgen. Dadurch könnten vor einer Applikation von AMP-Derivaten die Wirkdosen besser eingeschätzt werden, um nicht einen gegenläufigen Effekt zu erzielen. Jedoch warnen einige Autoren davor zu vermuten, dass immunmodulierende Medikamente die charakteristische Pharmakodynamik konventioneller Medikamente aufweisen [Easton, D. M., 2009, S. 587]. Als Folge ist es unausweichlich, dass vor einem Einsatz eines neu entwickelten AMP-Derivats als Medikament die physiologische Konzentration des AMP sorgfältig untersucht werden muss. Diese Studie zeigte, dass die Transkription der untersuchten AMP intraoral erhöht ist. Jedoch wurden in dieser Studie nur vier AMP untersucht. Daher werden weitere Studien notwendig sein, um zu klären, ob AMP intraoral generell stärker exprimiert werden. Die Verfügbarkeit weiterer Daten könnte neue Einblicke in den Regulationsmechanismus und die Funktionsweise der oralen Immunabwehr ermöglichen. Man sollte in Erwägung ziehen neue Medikamente, die von AMP-Derivaten abstammen, nach Ihrem Verwendungszweck und dem Ort ihrer Verwendung zu dosieren. Die Ergebnisse dieser Dissertation liefern Hinweise, dass bei intraoralem Anwendungsgebiet von AMP-Derivaten diese vermutlich in höheren Dosen appliziert werden müssten, um die gleiche Wirkung wie extraoral zu erhalten. Deshalb sollte ein unterschiedliches physiologisches Vorkommen der AMP in klinischen Versuchen bei der Behandlung intraoraler Infektionen beachtet werden.

Gleichzeitig sollte zudem eine Überdosierung vermieden werden, um potentielle negative Folgen zu vermeiden. Erstes bekanntes Beispiel für eine potentiell schädigende Wirkung von AMP ist ein posttranslational modifiziertes Cathelicidin, welches sich in Hautläsionen von an Rosazea erkrankten Patienten finden lässt, jedoch in gesunder Haut nicht auftritt. Dieses modifizierte AMP provozierte in Experimenten bei Mäusen Entzündungen und Teleangiektasien. Dies ist ein erstes bekanntes Beispiel dafür, dass eine gestörte Expression von AMP eine Verstärkung von Krankheiten hervorrufen könnte [Yamasaki, K. and Gallo, R. L., 2008, S. 7-8]. Unter Umständen könnte eine zu hohe therapeutische Gabe ähnliche unerwünschte Arzneimittelreaktionen hervorrufen.

Vor jedweder intraoralen Applikation eines neu entwickelten AMP-Derivats, sollte die physiologische Menge des AMP, von dem es abstammte, genauestens untersucht werden. Alle AMP, die in dieser Dissertation getestet wurden, waren in großer Menge exprimiert, jedoch wurden nicht alle AMP untersucht. Weiterführende Untersuchungen sind daher notwendig. Die Alternativhypothese, dass die intraorale Expression von AMP sich von der Expression im extraoralen Epithel unterscheidet, wurde für die untersuchten Gene bestätigt. AMP-Derivate könnten eine Alternative zu konventionellen Antibiotika werden, und bei der Behandlung intraoraler Infektionen nützlich sein. Jedoch wurde gezeigt, dass Unterschiede in der physiologisch vorliegenden Menge von AMP zwischen extraoraler Haut und intraoralem Epithel bestehen. In möglichen zukünftigen klinischen Studien von AMP-Derivaten für die Behandlung intraoraler Infektionen sollte dies berücksichtigt werden.

## 6. Zusammenfassung

Antimikrobielle Peptide (AMP) sind Effektormoleküle des angeborenen Immunsystems. Eine große Untergruppe der AMP stellen humane Beta-Defensine (hBD) dar. Sie schützen aufgrund Ihrer Wirkungsweise als „natürliche“ Antibiotika mukosale und epitheliale Oberflächen gegen pathogene Mikroorganismen und spielen eine wichtige Rolle bei der Erhaltung der oralen Gesundheit. Obwohl das Vorkommen der AMP intensiv in verschiedenen Gewebearten erforscht wurde, ist noch kein Vergleich der Quantität Ihrer Expression zwischen der Mundschleimhaut und extraoralem Epithel durchgeführt worden. Seitdem AMP-Derivate eine potentielle Alternative zu Antibiotika darstellen, ist das Wissen um mögliche Unterschiede in Ihrem physiologischen Vorhandensein in Mundschleimhaut und extraoralem Epithel von besonderem Interesse. Möglicherweise stellt dies einen Startpunkt für neue Therapieoptionen bei intraoralen Infektionen dar. Aus diesem Grund wurden die Expressionsprofile der AMP hBD-1, hBD-2, hBD-3 und Psoriasin in der Mundschleimhaut und extraoralem Epithel der Kopf-Hals-Region mittels quantitativer Echtzeit-Polymerase Kettenreaktion (qRT-PCR; n=14), Immunhistologie (n=6) und Western blot (n=8) analysiert.

Die qRT-PCR zeigte, dass alle untersuchten Gene signifikant höher in der Mundschleimhaut exprimiert werden als in der extraoralen Haut (hBD-1:  $p=0,002$ ; hBD-2:  $p=0,006$ ; hBD-3:  $p=0,035$ ; Psoriasin:  $p=0,018$ ). Die Untersuchungen der Immunhistologie und des Western blot zeigten verschiedene Ausprägungen der Proteinlevel: hBD-2 ( $p=0,021$ ) und hBD-3 ( $p=0,043$ ) sind in der Mundschleimhaut in höheren Quantitäten vorhanden als im extraoralen Epithel, wohingegen Psoriasin in höherer Konzentration in der extraoralen Haut auftritt ( $p=0,021$ ). Für hBD-1 konnte kein Unterschied im Proteinlevel festgestellt werden ( $p=0,083$ ).

Die Ergebnisse bekräftigen die Schlüsselrolle der AMP für die orale Immunabwehr. Die beobachteten Unterschiede in der Expression der AMP sind möglicherweise von Bedeutung für neue Therapieoptionen in der Zahnheilkunde. Denkbar wäre beispielsweise eine topische Anwendung von AMP-Derivaten bei oralen Infektionen.

## 7. Literaturverzeichnis

- 1) Aas J. A., Paster, B. J., Stokes, L. N., Olsen, I., Dewhirst, F. E. Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. *J Clin Microbiol.* 2005 Nov;43(11):5721-5732.
- 2) Achanta M., Sunkara, L. T., Dai, G., Bommineni, Y. R., Jiang, W., Zhang, G. Tissue expression and developmental regulation of chicken cathelicidin antimicrobial peptides. *J Anim Sci Biotechnol.* 2012;3(1):15.
- 3) Adeyemo W. L., Ladeinde, A. L., Ogunlewe, M. O. Clinical evaluation of post-extraction site wound healing. *J Contemp Dent Pract.* 2006 Jul 1;7(3):40-49.
- 4) Bensch K. W., Raida, M., Magert, H. J., Schulz-Knappe, P., Forssmann, W. G. hBD-1: a novel beta-defensin from human plasma. *FEBS Lett.* 1995 Jul 17;368(2):331-335.
- 5) Bissell J., Joly, S., Johnson, G. K., Organ, C. C., Dawson, D., McCray, P. B., Jr., et al. Expression of beta-defensins in gingival health and in periodontal disease. *J Oral Pathol Med.* 2004 May;33(5):278-285.
- 6) Braff M. H., Bardan, A., Nizet, V., Gallo, R. L. Cutaneous defense mechanisms by antimicrobial peptides. *J Invest Dermatol.* 2005 Jul;125(1):9-13.
- 7) Butmarc J., Yufit, T., Carson, P., Falanga, V. Human beta-defensin-2 expression is increased in chronic wounds. *Wound Repair Regen.* 2004 Jul-Aug;12(4):439-443.
- 8) Choi S., Isaacs, A., Clements, D., Liu, D., Kim, H., Scott, R. W., et al. De novo design and in vivo activity of conformationally restrained antimicrobial arylamide foldamers. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009 Apr 28;106(17):6968-6973.

- 9) Dale B. A., Fredericks, L. P. Antimicrobial peptides in the oral environment: expression and function in health and disease. *Curr Issues Mol Biol.* 2005 Jul;7(2):119-133.
- 10) Devine D. A. Antimicrobial peptides in defence of the oral and respiratory tracts. *Mol Immunol.* 2003 Nov;40(7):431-443.
- 11) 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 Jun;20(3):186-190.
- 12) 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 Jun;20(3):163-166.
- 13) Easton D. M., Nijnik, A., Mayer, M. L., Hancock, R. E. Potential of immunomodulatory host defense peptides as novel anti-infectives. *Trends Biotechnol.* 2009 Oct;27(10):582-590.
- 14) Froy O. Regulation of mammalian defensin expression by Toll-like receptor-dependent and independent signalling pathways. *Cell Microbiol.* 2005 Oct;7(10):1387-1397.
- 15) Fulton C., Anderson, G. M., Zasloff, M., Bull, R., Quinn, A. G. Expression of natural peptide antibiotics in human skin. *Lancet.* 1997 Dec 13;350(9093):1750-1751.
- 16) Gallo R. L., Murakami, M., Ohtake, T., Zaiou, M. Biology and clinical relevance of naturally occurring antimicrobial peptides. *J Allergy Clin Immunol.* 2002 Dec;110(6):823-831.
- 17) Giacometti A., Ghiselli, R., Cirioni, O., Mocchegiani, F., D'Amato, G., Orlando, F., et al. Therapeutic efficacy of the magainin analogue MSI-78 in different intra-abdominal sepsis rat models. *J Antimicrob Chemother.* 2004 Sep;54(3):654-660.

- 18) Gilmore K., Chen, P., Leung, K. P. Anti-microbial peptides for plaque control and beyond. *J Calif Dent Assoc.* 2009 Nov;37(11):779-788.
- 19) Glaser R., Harder, J., Lange, H., Bartels, J., Christophers, E., Schroder, J. M. Antimicrobial psoriasin (S100A7) protects human skin from *Escherichia coli* infection. *Nat Immunol.* 2005 Jan;6(1):57-64.
- 20) Gorr S. U. Antimicrobial peptides of the oral cavity. *Periodontol* 2000. 2009;51:152-180.
- 21) Gould I. M. The epidemiology of antibiotic resistance. *Int J Antimicrob Agents.* 2008 Nov;32 Suppl 1:S2-9.
- 22) Gyssens I. C. Antibiotic policy. *Int J Antimicrob Agents.* 2011 Dec;38 Suppl:11-20.
- 23) Hamill P., Brown, K., Jenssen, H., Hancock, R. E. Novel anti-infectives: is host defence the answer? *Curr Opin Biotechnol.* 2008 Dec;19(6):628-636.
- 24) Hancock R. E., Sahl, H. G. Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. *Nat Biotechnol.* 2006 Dec;24(12):1551-1557.
- 25) Harder J., Bartels, J., Christophers, E., Schroder, J. M. A peptide antibiotic from human skin. *Nature.* 1997 Jun 26;387(6636):861.
- 26) Henseler T., Christophers, E. Disease concomitance in psoriasis. *J Am Acad Dermatol.* 1995 Jun;32(6):982-986.
- 27) Hirsch T., Spielmann, M., Zuhaili, B., Fossum, M., Metzsig, M., Koehler, T., et al. Human beta-defensin-3 promotes wound healing in infected diabetic wounds. *J Gene Med.* 2009 Mar;11(3):220-228.

- 28) Jia H. P., Schutte, B. C., Schudy, A., Linzmeier, R., Guthmiller, J. M., Johnson, G. K., et al. Discovery of new human beta-defensins using a genomics-based approach. *Gene*. 2001 Jan 24;263(1-2):211-218.
- 29) Kagan B. L., Selsted, M. E., Ganz, T., Lehrer, R. I. Antimicrobial defensin peptides form voltage-dependent ion-permeable channels in planar lipid bilayer membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990 Jan;87(1):210-214.
- 30) Kanda N., Watanabe, S. Increased serum human beta-defensin-2 levels in atopic dermatitis: relationship to IL-22 and oncostatin M. *Immunobiology*. 2012 Apr;217(4):436-445.
- 31) Kaus A., Jacobsen, F., Sorkin, M., Rittig, A., Voss, B., Daigeler, A., et al. Host defence peptides in human burns. *Burns*. 2008 Feb;34(1):32-40.
- 32) Kesting M. R., Stoeckelhuber, M., Holzle, F., Mucke, T., Neumann, K., Woermann, K., et al. Expression of antimicrobial peptides in cutaneous infections after skin surgery. *Br J Dermatol*. 2010 Jul;163(1):121-127.
- 33) Krisanaprakornkit S., Kimball, J. R., Weinberg, A., Darveau, R. P., Bainbridge, B. W., Dale, B. A. 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 May;68(5):2907-2915.
- 34) Krisanaprakornkit S., Weinberg, A., Perez, C. N., Dale, B. A. Expression of the peptide antibiotic human beta-defensin 1 in cultured gingival epithelial cells and gingival tissue. *Infect Immun*. 1998 Sep;66(9):4222-4228.
- 35) Lehrer R. I., Barton, A., Daher, K. A., Harwig, S. S., Ganz, T., Selsted, M. E. Interaction of human defensins with *Escherichia coli*. Mechanism of bactericidal activity. *J Clin Invest*. 1989 Aug;84(2):553-561.
- 36) Lipsky B. A., Holroyd, K. J., Zasloff, M. Topical versus systemic antimicrobial therapy for treating mildly infected diabetic foot ulcers: a randomized,

- controlled, double-blinded, multicenter trial of pexiganan cream. *Clin Infect Dis.* 2008 Dec 15;47(12):1537-1545.
- 37) Liu A. Y., Destoumieux, D., Wong, A. V., Park, C. H., Valore, E. V., Liu, L., et al. Human beta-defensin-2 production in keratinocytes is regulated by interleukin-1, bacteria, and the state of differentiation. *J Invest Dermatol.* 2002 Feb;118(2):275-281.
- 38) Livermore D. M. The need for new antibiotics. *Clin Microbiol Infect.* 2004 Nov;10 Suppl 4:1-9.
- 39) Lockhart P. B., Brennan, M. T., Sasser, H. C., Fox, P. C., Paster, B. J., Bahrani-Mougeot, F. K. Bacteremia associated with toothbrushing and dental extraction. *Circulation.* 2008 Jun 17;117(24):3118-3125.
- 40) Madsen P., Rasmussen, H. H., Leffers, H., Honore, B., Dejgaard, K., Olsen, E., et al. Molecular cloning, occurrence, and expression of a novel partially secreted protein "psoriasin" that is highly up-regulated in psoriatic skin. *J Invest Dermatol.* 1991 Oct;97(4):701-712.
- 41) Malkawi Z., Al-Omiri, M. K., Khraisat, A. Risk indicators of postoperative complications following surgical extraction of lower third molars. *Med Princ Pract.* 2011;20(4):321-325.
- 42) Mathews M., Jia, H. P., Guthmiller, J. M., Losh, G., Graham, S., Johnson, G. K., et al. Production of beta-defensin antimicrobial peptides by the oral mucosa and salivary glands. *Infect Immun.* 1999 Jun;67(6):2740-2745.
- 43) Mendez-Samperio P. The human cathelicidin hCAP18/LL-37: a multifunctional peptide involved in mycobacterial infections. *Peptides.* 2010 Sep;31(9):1791-1798.
- 44) Meyer J. E., Harder, J. Antimicrobial peptides in oral cancer. *Curr Pharm Des.* 2007;13(30):3119-3130.

- 45) Michalek M., Gelhaus, C., Hecht, O., Podschun, R., Schroder, J. M., Leippe, M., et al. The human antimicrobial protein psoriasin acts by permeabilization of bacterial membranes. *Dev Comp Immunol.* 2009 Jun;33(6):740-746.
- 46) Nakatsuji T., Gallo, R. L. Antimicrobial Peptides: Old Molecules with New Ideas. *J Invest Dermatol.* 2011 Dec 8.
- 47) Nkenke E. Systemische Antibiotikaprophylaxe bei Patienten ohne Systemerkrankungen zur Vermeidung postoperativer Wundinfektionen; Stellungnahme der Deutschen Gesellschaft für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde (DGZMK). *DZZ.* 2008 31.03.2012;63.
- 48) Parahitiyawa N. B., Scully, C., Leung, W. K., Yam, W. C., Jin, L. J., Samaranayake, L. P. Exploring the oral bacterial flora: current status and future directions. *Oral Dis.* 2010 Mar;16(2):136-145.
- 49) Perron G. G., Zasloff, M., Bell, G. Experimental evolution of resistance to an antimicrobial peptide. *Proc Biol Sci.* 2006 Jan 22;273(1583):251-256.
- 50) Putsep K., Carlsson, G., Boman, H. G., Andersson, M. Deficiency of antibacterial peptides in patients with morbus Kostmann: an observation study. *Lancet.* 2002 Oct 12;360(9340):1144-1149.
- 51) Rennie J., Arnt, L., Tang, H., Nusslein, K., Tew, G. N. Simple oligomers as antimicrobial peptide mimics. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 2005 Jul;32(7):296-300.
- 52) Rivera A. M., Boucher, H. W. Current concepts in antimicrobial therapy against select gram-positive organisms: methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, penicillin-resistant pneumococci, and vancomycin-resistant enterococci. *Mayo Clin Proc.* 2011 Dec;86(12):1230-1243.
- 53) Sang Y., Blecha, F. Antimicrobial peptides and bacteriocins: alternatives to traditional antibiotics. *Anim Health Res Rev.* 2008 Dec;9(2):227-235.

- 54) Schittek B., Paulmann, M., Senyurek, I., Steffen, H. The role of antimicrobial peptides in human skin and in skin infectious diseases. *Infect Disord Drug Targets*. 2008 Sep;8(3):135-143.
- 55) Schroder J. M., Harder, J. Antimicrobial skin peptides and proteins. *Cell Mol Life Sci*. 2006 Feb;63(4):469-486.
- 56) Schroeder B. O., Wu, Z., Nuding, S., Groscurth, S., Marcinowski, M., Beisner, J., et al. Reduction of disulphide bonds unmasks potent antimicrobial activity of human beta-defensin 1. *Nature*. 2011 Jan 20;469(7330):419-423.
- 57) Scott R. W., DeGrado, W. F., Tew, G. N. De novo designed synthetic mimics of antimicrobial peptides. *Curr Opin Biotechnol*. 2008 Dec;19(6):620-627.
- 58) Sorensen O. E., Thapa, D. R., Rosenthal, A., Liu, L., Roberts, A. A., Ganz, T. Differential regulation of beta-defensin expression in human skin by microbial stimuli. *J Immunol*. 2005 Apr 15;174(8):4870-4879.
- 59) Stefani S., Varaldo, P. E. Epidemiology of methicillin-resistant staphylococci in Europe. *Clin Microbiol Infect*. 2003 Dec;9(12):1179-1186.
- 60) Steinstraesser L., Koehler, T., Jacobsen, F., Daigeler, A., Goertz, O., Langer, S., et al. Host defense peptides in wound healing. *Mol Med*. 2008 Jul-Aug;14(7-8):528-537.
- 61) Steinstraesser L., Kraneburg, U. M., Hirsch, T., Kesting, M., Steinau, H. U., Jacobsen, F., et al. Host defense peptides as effector molecules of the innate immune response: a sledgehammer for drug resistance? *Int J Mol Sci*. 2009 Sep;10(9):3951-3970.
- 62) Stoeckelhuber M., Matthias, C., Andratschke, M., Stoeckelhuber, B. M., Koehler, C., Herzmann, S., et al. Human ceruminous gland: ultrastructure and histochemical analysis of antimicrobial and cytoskeletal components. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol*. 2006 Aug;288(8):877-884.

- 63) Stoeckelhuber M., Messmer, E. M., Schubert, C., Stoeckelhuber, B. M., Koehler, C., Welsch, U., et al. Immunolocalization of defensins and cathelicidin in human glands of Moll. *Ann Anat.* 2008;190(3):230-237.
- 64) Tew G. N., Scott, R. W., Klein, M. L., Degrado, W. F. De novo design of antimicrobial polymers, foldamers, and small molecules: from discovery to practical applications. *Acc Chem Res.* 2010 Jan 19;43(1):30-39.
- 65) Vaara M. New approaches in peptide antibiotics. *Curr Opin Pharmacol.* 2009 Oct;9(5):571-576.
- 66) Wang G., Li, X., Wang, Z. APD2: the updated antimicrobial peptide database and its application in peptide design. *Nucleic Acids Res.* 2009 Jan;37(Database issue):D933-937.
- 67) Wang Z., Wang, G. APD: the Antimicrobial Peptide Database. *Nucleic Acids Res.* 2004 Jan 1;32(Database issue):D590-592.
- 68) Watson P. H., Leygue, E. R., Murphy, L. C. Psoriasin (S100A7). *Int J Biochem Cell Biol.* 1998 May;30(5):567-571.
- 69) Wehkamp J., Fellermann, K., Herrlinger, K. R., Bevins, C. L., Stange, E. F. Mechanisms of disease: defensins in gastrointestinal diseases. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol.* 2005 Sep;2(9):406-415.
- 70) Wilson M. A. Skin and soft-tissue infections: impact of resistant gram-positive bacteria. *Am J Surg.* 2003 Nov 28;186(5A):35S-41S; discussion 42S-43S, 61S-64S.
- 71) Wise R. The urgent need for new antibacterial agents. *J Antimicrob Chemother.* 2011 Sep;66(9):1939-1940.
- 72) Witte W., Cuny, C., Klare, I., Nubel, U., Strommenger, B., Werner, G. Emergence and spread of antibiotic-resistant Gram-positive bacterial pathogens. *Int J Med Microbiol.* 2008 Jul;298(5-6):365-377.

- 73) Wolf R., Howard, O. M., Dong, H. F., Voscopoulos, C., Boeshans, K., Winston, J., et al. Chemotactic activity of S100A7 (Psoriasin) is mediated by the receptor for advanced glycation end products and potentiates inflammation with highly homologous but functionally distinct S100A15. *J Immunol.* 2008 Jul 15;181(2):1499-1506.
- 74) Yadava P., Zhang, C., Sun, J., Hughes, J. A. Antimicrobial activities of human beta-defensins against *Bacillus* species. *Int J Antimicrob Agents.* 2006 Aug;28(2):132-137.
- 75) Yamasaki K., Gallo, R. L. Antimicrobial peptides in human skin disease. *Eur J Dermatol.* 2008 Jan-Feb;18(1):11-21.
- 76) Yang D., Biragyn, A., Hoover, D. M., Lubkowski, J., Oppenheim, J. J. Multiple roles of antimicrobial defensins, cathelicidins, and eosinophil-derived neurotoxin in host defense. *Annu Rev Immunol.* 2004;22:181-215.
- 77) Yang D., Biragyn, A., Kwak, L. W., Oppenheim, J. J. Mammalian defensins in immunity: more than just microbicidal. *Trends Immunol.* 2002 Jun;23(6):291-296.
- 78) Zaalouk T. K., Bajaj-Elliott, M., George, J. T., McDonald, V. Differential regulation of beta-defensin gene expression during *Cryptosporidium parvum* infection. *Infect Immun.* 2004 May;72(5):2772-2779.
- 79) Zanetti M., Gennaro, R., Romeo, D. Cathelicidins: a novel protein family with a common proregion and a variable C-terminal antimicrobial domain. *FEBS Lett.* 1995 Oct 23;374(1):1-5.
- 80) Zasloff M. Innate immunity, antimicrobial peptides, and protection of the oral cavity. *Lancet.* 2002 Oct 12;360(9340):1116-1117.
- 81) Zasloff M. Magainins, a class of antimicrobial peptides from *Xenopus* skin: isolation, characterization of two active forms, and partial cDNA sequence of a precursor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1987 Aug;84(15):5449-5453.

- 
- 82) Zeya H. I., Spitznagel, J. K. Cationic proteins of polymorphonuclear leukocyte lysosomes. I. Resolution of antibacterial and enzymatic activities. *J Bacteriol.* 1966 Feb;91(2):750-754.
- 83) Zhao C., Wang, I., Lehrer, R. I. Widespread expression of beta-defensin hBD-1 in human secretory glands and epithelial cells. *FEBS Lett.* 1996 Nov 4;396(2-3):319-322.

## Anhang A: Verwendetes Material für die Quantitative Echtzeit-Polymerase Kettenreaktion

### A.1. Verwendete Geräte und Software

<b>Tabelle A.1.</b>	
<b>Verwendete Geräte und Software für die qRT-PCR</b>	
<b>Produkt</b>	<b>Hersteller</b>
BioPhotometer plus	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Disposable scalpel standard	Feather Safety Razer Co., Osaka, Japan
Eppendorf MiniSpin <sup>®</sup> plus	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Fischer FI3100 Elektronische Halbmikro-, Analysen und Präzisionswaage	Willi Fischer oHG, Frankfurt, Deutschland
inoLab <sup>®</sup> pH 720 Labor-pH-Meter	Wissenschaftlich-Technische Werkstätten GmbH, Weilheim, Deutschland
LightCycler <sup>®</sup> 1.0 Real-time Detection System	Roche, Mannheim, Deutschland
Miccra D-9	ART Prozess und Labortechnik GmbH & Co. KG, Müllheim, Deutschland
Mikrowelle	LG Electronics Deutschland GmbH, Ratingen, Deutschland
Milli-Q Integral Water Purification System	Millipore GmbH, Schwalbach, Deutschland
nQuery 7.0	Statistical Solutions, Saugus, USA
Sartorius Extend Elektronische Analysen-, Präzisions-, und Edelmetallwaage	Sartorius, Göttingen, Deutschland
SenTix <sup>®</sup> 41 pH Elektrode	Wissenschaftlich-Technische Werkstätten GmbH, Weilheim, Deutschland
SPSS 16.0 Software	SPSS Inc., Chicago, IL, USA

<b>Produkt</b>	<b>Hersteller</b>
Sub-Cell <sup>®</sup> GT Agarose Gel Electrophoresis System	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
ThermoStat plus	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

## A.2. Verwendetes Verbrauchsmaterial

<b>Tabelle A.2.</b>	
<b>Verwendetes Verbrauchsmaterial für die qRT-PCR</b>	
<b>Produkt</b>	<b>Hersteller</b>
1kb Plus DNA Ladder	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
2-200µl Pipettenspitzen	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
2-Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Agarose	Eurobio, Les Ulis, Frankreich
BamHI	New England BioLabs GmbH, Frankfurt am Main, Deutschland
bovine Serum Albumin; BSA	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Bromphenolblau	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
DNaseI Lösung	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
EcoRV	New England BioLabs GmbH, Frankfurt am Main, Deutschland
Ethylendiamintetraacetat; EDTA	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Eppendorf Reaktionsgefäß 3810X	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Essigsäure 100%	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

<b>Produkt</b>	<b>Hersteller</b>
Ethanol; EtOH	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Gelstar	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland
Glycerin ROTIPURAN <sup>®</sup>	Roth, Karlsruhe, Deutschland
HindIII	New England BioLabs GmbH, Frankfurt am Main, Deutschland
LightCycler <sup>®</sup> FastStart DNA Master SYBR Green I reaction mix	Roche, Mannheim, Deutschland
Natriumhydroxid; NaOH	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Plasmid-DNA	Prof. Dr. Lars Steinsträsser, Klinikum der Ruhr Universität Bochum, Bochum, Deutschland
Forward / Reverse Primer	TIB MOLBIOL Syntheselabor GmbH, Berlin, Deutschland
Proteinase K	Dako Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland
QIAquick Nucleotide Removal Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
RNase free dnase set	Qiagen, Hilden, Deutschland
RNeasy <sup>®</sup> Protect Mini Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
SuperScript <sup>™</sup> First Strand Synthesis System für RT-PCR	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Tris-hydroxymethyl-aminomethan; TRIS	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Xylenblau	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

## Anhang B: Verwendetes Material für den Western blot

### B.1. Verwendete Geräte und Software

<b>Tabelle B.1.</b>	
<b>Verwendete Geräte und Software für den Western blot</b>	
<b>Produkt</b>	<b>Hersteller</b>
BioPhotometer plus	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Bio Shaker 3D	G.Kisker GbR Products for Biotechnology, Steinfurt, Deutschland
Disposable scalpel standard	Feather Safety Razer Co., Osaka, Japan
Dukasafe	Kindermann, Ochsenfurt, Deutschland
Eppendorf MiniSpin <sup>®</sup> plus	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Eppendorf Reference <sup>®</sup> Pipetten 0,5-10 µl	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Eppendorf Reference <sup>®</sup> Pipetten 10-100µl	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Eppendorf Reference <sup>®</sup> Pipetten 100- 1000µl	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Fischer F13100 Elektronische Halbmikro-, Analysen und Präzisionswaage	Willi Fischer oHG, Frankfurt, Deutschland
Gelgießstand Cast-It <sup>™</sup> S	Peqlab, Erlangen, Deutschland
Hamiltonspritze 701 NR 10ml	Hamilton, Reno, USA
Heidolph MR 3001 Magnetrührer	Heidolph, Schwabach, Deutschland
HERAEUS <sup>®</sup> BIOFUGE <sup>®</sup> PRIMO R	Heraeus, Buckinghamshire, England
HP Flachbettscanner ScanJet-G4050	Hewlett-Packard, Palo Alto, USA
Image-pro-Plus 7.0	Media Cybernetics, Bethesda, USA
inoLab <sup>®</sup> pH 720 Labor-pH-Meter	Wissenschaftlich-Technische Werkstätten GmbH, Weilheim, Deutschland

<b>Produkt</b>	<b>Hersteller</b>
Micra D-9	ART Prozess und Labortechnik GmbH & Co. KG, Müllheim, Deutschland
Milli-Q Integral Water Purification System	Millipore GmbH, Schwalbach, Deutschland
nQuery 7.0	Statistical Solutions, Saugus, USA
PEQLAB Power Supply EV231	Peqlab, Erlangen, Deutschland
PerfectBlue™ Vertikales Doppelgelsystem Twin S	Peqlab, Erlangen, Deutschland
Röntgenfilmkassette PL-BW	Konica Minolta Medical & Graphic Imaging Europe GmbH, München, Deutschland
Sartorius Extend Elektronische Analysen-, Präzisions-, und Edelmetallwaage	Sartorius, Göttingen, Deutschland
SenTix® 41 pH Elektrode	Wissenschaftlich-Technische Werkstätten GmbH, Weilheim, Deutschland
SONOPULS Ultraschall-Homogenisator HD 2070	Bandelin, Berlin, Deutschland
SPSS 16.0 Software	SPSS Inc., Chicago, IL, USA
ThermoStat plus	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer cell	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Vortex-Genie 2T Timed Mixer SI-T256	Scientific Industrie Inc., Bohemia, USA

**B.2. Verwendetes Verbrauchsmaterial**

<b>Tabelle B.2.</b>	
<b>Verwendetes Verbrauchsmaterial für den Western blot</b>	
<b>Produkt</b>	<b>Hersteller</b>
1,4-Dithiothreit; DTT	Roth, Karlsruhe, Deutschland
1,5ml halbmikro Einmal Küvetten PMMA	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim, Deutschland
2-200µl Pipettenspitzen	Eppendorf AG Hamburg, Deutschland
50-1000µl Pipettenspitzen	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Acrylamide Solution 40%	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Allprotect <sup>®</sup> Tissue Reagent	Qiagen, Hilden, Deutschland
Amaloco S 10 geruchloses Stoppbad	Phototec GmbH, Norderstedt, Deutschland
Amaloco Universal Feinkorn Entwickler AM 74	Phototec GmbH, Norderstedt, Deutschland
Amaloco X 89 ExtraFix geruchloser Schnellfixierer	Phototec GmbH, Norderstedt, Deutschland
Ammoniumperoxiddisulfat; APS	Roth, Karlsruhe, Deutschland
bovine Serum Albumin; BSA	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Brillant Blau G 250	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Bromphenolblau	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Complete Lysis-M	Roche, Mannheim, Deutschland
Dinatriumhydrogenphosphatdihydrat; Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Eppendorf Reaktionsgefäß 3810X	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Ethanol; EtOH	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

<b>Produkt</b>	<b>Hersteller</b>
Glycerin ROTIPURAN®	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Glycin PUFFERAN®	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Kaliumchlorid; KCl	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Kaliumdihydrogenphosphat; KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Luminol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Methanol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Milchpulver	Heirler, Radolfzell, Deutschland
Natriumchlorid; NaCl	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
o-Phosphorsäure 85%	Roth, Karlsruhe, Deutschland
P 10 UVpette Pipettenspitzen	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland
p-Cumarsäure	Roth, Karlsruhe, Deutschland
peqGold Protein Marker IV	PeqLab, Erlangen, Deutschland
Ponceau S	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Röntgenfilme Curix HT1.000G PLUS	AGFA HealthCare GmbH, Bonn, Deutschland
Rotilabo®-Blottingpapiere; Dicke 1,5 mm	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Salzsäure; Chlorwasserstoffsäure; HCL 37%	Roth, Karlsruhe, Deutschland
SDS ultra pure	Roth, Karlsruhe, Deutschland
TEMED	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Transfermembran Roti Rimkreis –NC	Roth, Karlsruhe, Deutschland
TRIS PUFFERAN®	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Triton X 100	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Tween® 20 BioChemica	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Wasserstoffperoxid 30%; H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

**B.3. Verwendete Antikörper**

<b>Tabelle B.3.</b>		
<b>Verwendete Antikörper für den Western blot</b>		
<b>Bezeichnung</b>	<b>Produktnummer</b>	<b>Hersteller</b>
<b>Primärantikörper</b>		
Anti Actin antibody produced in rabbit	A2066	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Anti- $\beta$ -Defensin 1 antibody	ab14425	Abcam, Cambridge, USA
Anti- $\beta$ -Defensin 2 antibody	ab66072	Abcam, Cambridge, USA
Anti- $\beta$ -Defensin 3 antibody produced in rabbit	D2444-100UG	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Monoclonal Antibody to Psoriasin/HIDS/S100A7	IMG-409A	Imgenex, San Diego, CA, USA
<b>Sekundärantikörper</b>		
Goat polyclonal secondary Antibody to Rabbit IgG –H&L(HRP)	ab97051	Abcam, Cambridge, USA
Rabbit polyclonal secondary Antibody to Mouse IgG – H&L(HRP)	ab6728	Abcam, Cambridge, USA

**B.4. Verwendete Puffer und Lösungen**

<b>Tabelle B.4. Verwendete Puffer und Lösungen für den Western blot</b>		
<b>Puffer / Lösung</b>	<b>Verwendungszweck</b>	<b>Zusammensetzung</b>
Blockpuffer	Blocken	2,5g Milchpulver Ad 50ml PBS-Puffer
Blotpuffer	Blotten	2,9g Glycin 200ml Methanol 0,37g SDS 5,8g TRIS ad 1l H <sub>2</sub> O
Bradfordlösung	Proteinbestimmung	100mg Brillant Blau G250 100ml 85% o- Phosphorsäure 46,7ml 95% EtOH Ad 1000ml H <sub>2</sub> O
Denaturierungspuffer	Aufnahme der Primärantikörper	50ml PBS-Puffer 250µl Tween <sup>®</sup> 20 500µl Triton X 1ml 10% SDS
Dissoziationspuffer	Probenaufbereitung	2,5ml Sammelgelpuffer 4ml 10% SDS 2ml Glycerin 2mg Bromphenolblau 620mg DTT Ad 10ml H <sub>2</sub> O

<b>Puffer / Lösung</b>	<b>Verwendungszweck</b>	<b>Zusammensetzung</b>
ECL-Lösung; Enhanced Chemiluminescence Lösung	Chemilumineszenzreaktion	2ml Luminol 890µl p-Cumarsäure 20ml TRIS-HCL pH 8,5 Ad 200ml H <sub>2</sub> O
Elektrophoresepuffer 10x Konzentrat	Gelelektrophorese	30g TRIS 144g Glycin 10g SDS Ad 1l H <sub>2</sub> O
PBS-Puffer 10x Konzentrat; Phosphat based saline-Puffer	Blocken, Antikörperreaktion	80g NaCl 2g KCl 14,4g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O 2g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH 7,4 ad 1l H <sub>2</sub> O
PBS-Puffer	Blocken, Antikörperreaktion	50ml PBS-Puffer 10x Konzentrat Ad 500ml H <sub>2</sub> O
Sammelgel 6%	Gelherstellung für Elektrophorese	30µl Bromphenolblau 2,6ml H <sub>2</sub> O 1,25ml Sammelgelpuffer 1ml 30% Acrylamid 50µl SDS 10% 5µl TEMED 75µl APS 10%
Sammelgelpuffer	Sammelgelherstellung	15,14g TRIS 250ml H <sub>2</sub> O pH 6,8
TBS 10x Konzentrat; Tris buffered saline	Waschvorgang	60g TRIS 85g NaCl pH 7,4 ad 1l H <sub>2</sub> O

<b>Puffer / Lösung</b>	<b>Verwendungszweck</b>	<b>Zusammensetzung</b>
TBS	Waschvorgang	50ml TBS 10x Konzentrat Ad 500ml H <sub>2</sub> O
TBS-T	Waschvorgang	500ml TBS 250µl Tween® 20
Trenngel 15%	Gelherstellung für Elektrophorese	3,25ml H <sub>2</sub> O 3,75ml Trenngelpuffer 7,5ml 30% Acrylamid 150µl 10% SDS 7,5µl TEMED 150µl APS 10%
Trenngelpuffer	Trenngelherstellung	90,86g TRIS 500ml H <sub>2</sub> O pH 7,8

## Anhang C: Verwendetes Material für die Immunhistologie

### C.1. Verwendete Geräte

<b>Tabelle C.1.</b>	
<b>Verwendete Geräte für die Immunhistologie</b>	
<b>Produkt</b>	<b>Hersteller</b>
Cooling Plate mod. PF100	Bio Optica, Mailand, Italien
Einbettautomat TES-1	Wendt GmbH & Co. KG, Georgsmarienhütte, Deutschland
Embedding Unit – Bio Optica Paraffin dispenser – type DP 500	Bio Optica, Mailand, Italien
Embedding Unit – Bio Optica Thermal unit – type UT200L	Bio Optica, Mailand, Italien
Eppendorf Reference <sup>®</sup> Pipetten 0,5-10 µl	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Eppendorf Reference <sup>®</sup> Pipetten 10-100µl	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Eppendorf Reference <sup>®</sup> Pipetten 100- 1000µl	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Feuchte Kammer - Inkubationskammer	Weckert Labortechnik, Kitzingen, Deutschland
Fischer FI3100 Elektronische Halbmikro-, Analysen und Präzisionswaage	Willi Fischer oHG, Frankfurt, Deutschland
Heidolph MR 3001 Magnetrührer	Heidolph, Schwabach, Deutschland
Heraeus Function Line	Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland
inoLab <sup>®</sup> pH 720 Labor-pH-Meter	Wissenschaftlich-Technische Werkstätten GmbH, Weilheim, Deutschland

<b>Produkt</b>	<b>Hersteller</b>
Mikrotom pfm Rotary 3002	pfm Produkte für die Medizin AG, Köln, Deutschland
Mikrowelle Intellowave	LG Electronics Deutschland GmbH, Ratingen, Deutschland
Milli-Q Integral Water Purification System	Millipore GmbH, Schwalbach, Deutschland
Nikon Eclipse 80i Mikroskop	Nikon, Düsseldorf, Deutschland
Paraffin- Streckbad GFL-1052	GFL – Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel, Deutschland
Sartorius Extend Elektronische Analysen-, Präzisions-, und Edelmetallwaage	Sartorius, Göttingen, Deutschland
SenTix <sup>®</sup> 41 pH Elektrode	Wissenschaftlich-Technische Werkstätten GmbH, Weilheim, Deutschland

## C.2. Verwendetes Verbrauchsmaterial

<b>Tabelle C.2.</b>	
<b>Verwendetes Verbrauchsmaterial für die Immunhistologie</b>	
<b>Produkt</b>	<b>Hersteller</b>
2-200µl Pipettenspitzen	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
3,3-Diaminobenzidin tetrahydrochlorid Tabletten; DAB Tablette	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
50-1000µl Pipettenspitzen	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Citronensäuremonohydrat; C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub> x H <sub>2</sub> O	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Dinatriumhydrogenphosphatdihydrat; Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 2H <sub>2</sub> O	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

<b>Produkt</b>	<b>Hersteller</b>
DPX Mountant for histology	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Einbettkassetten	Sanowa Laborprodukte GmbH, Leimen, Deutschland
Ethanol; EtOH	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Formaldehyd-Lösung 3,5-3,7%	Fischar GmbH & Co. KG, Saarbrücken, Deutschland
Mayer hematoxylin	Bio Optica, Mailand, Italien
Natriumchlorid; NaCl	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Natriumdihydrogenphosphatmonohydrat; NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Normal Goat Serum	Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA
P 10 UVpette Pipettenspitzen	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland
Salzsäure; Chlorwasserstoffsäure; HCL 37%	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Streptavidin	Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA
Superfrost <sup>®</sup> Plus Objektträger	Menzel GmbH, Braunschweig, Deutschland
Tissue Embedding Medium (Paraplast <sup>®</sup> Regular)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Trinatriumcitratdihydrat; C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> Na <sub>3</sub> O <sub>7</sub> x 2H <sub>2</sub> O	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Vectastain <sup>®</sup> ABC Kit	Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA
Wasserstoffperoxid 30%; H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

<b>Produkt</b>	<b>Hersteller</b>
Xylol	Aug. Hedinger GmbH & Co. KG, Stuttgart, Deutschland

## C.3. Verwendete Antikörper

<b>Tabelle C.3.</b>				
<b>Verwendete Antikörper für die Immunhistologie</b>				
<b>Primärantikörper</b>	<b>Klonalität</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>Host</b>	<b>Hersteller</b>
β-defensin 1 (FL-68)	polyklonal	1:100	Rabbit	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA
β-defensin 2 (FL-64)	polyklonal	1:100	Rabbit	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA
β-defensin 3	polyklonal	1:100	Rabbit	Novus Biologicals, Littleton, Co, USA
Psoriasisin/HID5/S100A7	Monoclonal 47C1068	1:50	Mouse	Imgenex, San Diego, CA, USA
<b>Sekundärantikörper</b>		<b>Verdünnung</b>		<b>Hersteller</b>
Biotinylated Anti-Mouse IgG		1:200		Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA
Biotinylated Anti-Rabbit IgG		1:200		Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA

## C.4. Verwendete Puffer und Lösungen

<b>Tabelle C.4. Verwendete Puffer und Lösungen für die Immunhistologie</b>		
<b>Puffer / Lösung</b>	<b>Verwendungszweck</b>	<b>Zusammensetzung</b>
Citratpuffer; pH 6,0	Mikrowellenbehandlung	18ml Stammlösung A 82ml Stammlösung B ad 1l H <sub>2</sub> O
Citratpuffer Stammlösung A	Herstellen des Citratpuffers	21,01g C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub> x H <sub>2</sub> O ad 1l H <sub>2</sub> O
Citratpuffer Stammlösung B	Herstellen des Citratpuffers	29,41g C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> Na <sub>3</sub> O <sub>7</sub> x 2 H <sub>2</sub> O ad 1l H <sub>2</sub> O
DAB-Lösung	Färben der Schnitte	1 DAB Tablette  15ml PBS-Puffer Lösung  (Die Lösung wurde 90min im Dunkeln auf einem Magnetrührer (Heidolph MR 3001 Magnetrührer; Heidolph, Schwabach, Deutschland) vermischt, gefiltert und in 500µl Portionen bei -20°C gelagert
Phosphad based saline-Puffer; PBS-Puffer (0,01M, pH 7,4)	Waschvorgang	8,77g NaCl 900ml H <sub>2</sub> O 10ml Stammlösung A 40ml Stammlösung B pH 7,4
PBS-Puffer Stammlösung A	Herstellen des PBS-Puffer	27,6g NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> Ad 1l H <sub>2</sub> O

<b>Puffer / Lösung</b>	<b>Verwendungszweck</b>	<b>Zusammensetzung</b>
PBS-Puffer Stammlösung B	Herstellen des PBS-Puffer	35,6g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O Ad 1l H <sub>2</sub> O

## Dankvermerk

Ich bedanke mich sehr herzlich bei Herrn Priv.-Doz. Dr. Dr. Marco Kesting und Frau Prof. Dr. Mechthild Stöckelhuber für die sehr gute Betreuung während meiner experimentellen Arbeiten, die Grundlage für diese Dissertationsschrift sind. Beide waren bei Rückfragen stets sehr zeitnah verfügbar und halfen mir immer sachverständig weiter. An dieser Stelle möchte ich mich ausdrücklich für das zur Verfügung stellen des Labors mitsamt seinen Geräten, sowie aller Chemikalien bedanken.

Vielen Dank auch dem Operationsteam der Mund- Kiefer- und Gesichtschirurgie der Technischen Universität München, das sich im stressigen OP-Alltag die Mühe machte, die für die Experimente notwendigen Patientenproben zu sammeln.

Mein ganz besonderer Dank richtet sich an Herrn Dr. Dr. Nils Rohleder. Herr Rohleder hat mit seiner fachlichen Kompetenz das Entstehen dieser Dissertationsschrift in entscheidendem Maße geprägt. Durch seine unermüdliche Begeisterung für die Forschung hat Herr Rohleder es geschafft, nach Mißerfolgen mich immer wieder aufs Neue zu motivieren.

Meinen Eltern Anna-Maria und Gerhard Müller möchte ich für meine liebevolle Erziehung und Förderung danken, mit der sie den Grundstein für Alles ermöglichten.

Abschließend bedanke ich mich bei meiner Freundin Annerose Mittermeyer für ihr Verständnis dafür, dass die Erstellung dieser Arbeit viel unserer gemeinsamen Freizeit in Anspruch genommen hat.

---

## Lebenslauf

### Persönliche Informationen

---

*Name:* Christian Müller  
*Nationalität:* Deutsch  
*Geburtsdatum:* 07. März 1985  
*Geburtsort:* Fürstentfeldbruck

### Arbeit

---

*Seit Oktober 2011* Vorbereitungsassistent der Zahnmedizin in der  
Gemeinschaftspraxis Dr. Satzger & Dr. Schwarz-Krieger;  
Landsberg am Lech

### Ausbildung

---

*2005-2011* Studium der Zahnmedizin an der  
Ludwig-Maximilians-Universität München;  
Staatsexamen Zahnmedizin  
*1995-2004* Rhabanus-Maurus-Gymnasium St. Ottilien; Abitur  
*1991-1995* Grundschule Grafrath

### Wissenschaftliche Publikation

---

Kesting M. R., Mueller, C., Wagenpfeil, S., Stoeckelhuber, M., Steiner, T., Bauer, F., et al. Quantitative comparison of the expression of antimicrobial peptides in the oral mucosa and extraoral skin. Br J Oral Maxillofac Surg. 2012 Jul; 50(5): 447-453