

Diplomarbeit

**Modulation der Entzündungsreaktion parodontaler
Fibroblasten als Antwort auf pharmakologisch simulierte
Hypoxie *in vitro***

Zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Zahnheilkunde

(Dr.med.dent)

an der

Medizinischen Universität Wien

ausgeführt an der

Abteilung für Orale Chirurgie

unter der Anleitung von

Univ. Doz. DI Dr. Reinhard Gruber

DI Dr. Hermann Agis

eingereicht von

Fedja Masic

Mat. Nr. 0642117

Ort, Datum: _____

Unterschrift: _____

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Univ.-Doz. Dipl.-Ing. Dr. Reinhard Gruber für die wissenschaftliche Betreuung der Diplomarbeit und die damit verbundene Einführung in die Grundlagenforschung der Medizin.

Ein großes Dankeschön geht an Dipl.-Ing. Dr. Hermann Agis, welcher mich bei der Erstellung der Diplomarbeit stets in sämtlichen Problemstellungen unterstützt hat.

Weiters möchte ich mich bei Manuela Pensch bedanken, welche mir bei der Laborarbeit sehr geholfen hat und mir immer mit Rat und Tat zur Seite stand.

Darüber hinaus danke ich meinen Eltern, dass sie mir dieses Studium erst ermöglicht haben. Ohne Unterstützung ihrerseits wäre diese Arbeit niemals zustande gekommen.

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--------------------------------------------------------------------|--------|
| 1. Zusammenfassung | - 5 - |
| 2. Abstract | - 6 - |
| 3. Einleitung | - 7 - |
| 3.1. Parodont | - 7 - |
| 3.1.1. Gingiva | - 8 - |
| 3.1.2. Alveolarknochen | - 9 - |
| 3.1.3. Gingivafibroblasten/Parodontale Ligament Fibroblasten | - 9 - |
| 3.2. Entzündung..... | - 11 - |
| 3.2.1. Gingivitis..... | - 11 - |
| 3.2.2. Parodontitis..... | - 12 - |
| 3.2.3. Periimplantitis | - 13 - |
| 3.2.4. Ätiologie und Pathogenese..... | - 14 - |
| 3.3. Zytokine | - 17 - |
| 3.3.1. Interleukin-1 β | - 17 - |
| 3.3.2. Interleukin-6 | - 19 - |
| 3.3.3. Tumornekrosefaktor- α | - 19 - |
| 3.4. Mitogen-aktivierte Proteinkinase | - 20 - |
| 3.4.1. <i>C-Jun amino-terminal kinases (JNK)</i> | - 21 - |
| 3.4.2. p38 Mapk Familie | - 22 - |
| 3.5. Hypoxie | - 23 - |
| 3.6. HIF-1 | - 23 - |
| 3.7. VEGF | - 26 - |
| 3.8. Small Molecules stabilisieren HIF-1 α | - 27 - |
| 3.8.1. Desferrioxamin (DFO) | - 29 - |
| 3.8.2. Kobaltchlorid (CoCl ₂) | - 29 - |
| 3.8.3. Dimethyloxalolylglycin (DMOG)..... | - 30 - |
| 3.8.4. L-Mimosin (L-MIM)..... | - 30 - |
| 3.9. Ziel dieser Arbeit..... | - 31 - |
| 4. Material und Methoden | - 31 - |
| 4.1. Zellkultur..... | - 31 - |
| 4.2. Western Blot..... | - 32 - |
| 4.3. Immunassay für IL-6 , VEGF | - 33 - |
| 4.4. Statistische Analyse..... | - 33 - |

| | | |
|------|-----------------------------------------------------------------------------|--------|
| 5. | Ergebnisse | - 34 - |
| 5.1. | Einfluss der small molecules auf HIF-1 α | - 34 - |
| 5.2. | Einfluss der small molecules auf VEGF | - 35 - |
| 5.3. | Einfluss der small molecules auf VEGF unter entzündlichen Bedingungen | - 36 - |
| 5.4. | Einfluss der small molecules auf IL-6..... | - 37 - |
| 5.5. | Einfluss der small molecules auf IL-6 unter entzündlichen Bedingungen..... | - 38 - |
| 5.6. | Effekte der small molecules auf die Map-Kinasen | - 39 - |
| 5.7. | VEGF Expression unter dem Einfluss der Map-Kinase Inhibitoren..... | - 41 - |
| 6. | Diskussion | - 43 - |
| 6.1. | Zusammenfassung der Daten | - 43 - |
| 6.2. | Aktuelle Studienlage | - 44 - |
| 6.3. | Limitierung der Studie | - 45 - |
| 6.4. | Klinische Relevanz..... | - 45 - |
| 6.5. | Offene Fragen..... | - 46 - |
| 6.6. | Konklusion | - 47 - |
| 7. | Literaturverzeichnis..... | - 48 - |
| 8. | Abkürzungsverzeichnis | - 53 - |

1. Zusammenfassung

Hintergrund: Ein therapeutischer Ansatz zur Förderung der parodontalen und periimplantären Gewebsregeneration ist die Förderung der Angiogenese. Sogenannte „small molecules“ können über pharmakologisch-simulierte Hypoxie die Expression des pro-angiogenetischen Faktors „vascular endothelial growth factor“ (VEGF) bewirken. Unbekannt ist jedoch, ob die vermehrte Expression von VEGF auch unter entzündlichen Prozessen ablaufen kann und ob „small molecules“ in das Entzündungsgeschehen eingreifen.

Methoden: Es wurden Fibroblasten der Gingiva und des parodontalen Ligaments mit den „small molecules“ Desferrioxamin (DFO), Dimethyloxaloylglycin (DMOG), L-Mimosin (L-MIM) und Kobaltchlorid (CoCl₂) - mit und ohne dem inflammatorischen Zytokin IL-1 inkubiert. Der Einfluss von „small molecules“ auf die Bildung von IL-6 und VEGF wurde mittels Immunassays gemessen. Die Frage nach der Beteiligung von intrazellulären Signalwegen wurde mittels Inhibitoren und mittels Western Blot bestimmt.

Resultate: Wir konnten zeigen, dass durch die Stimulation der Fibroblasten mittels Small Molecules, die Expression von VEGF gesteigert werden konnte. Die fördernde Wirkung auf die Expression von VEGF konnte auch in der Gegenwart des inflammatorischen Zytokins IL-1 beobachtet werden. Die „small molecules“ hatten keine Auswirkung auf die inflammatorische Antwort (Freisetzung von IL-6) Fibroblasten auf die Stimulation mit IL-1. Auch die Signalwege der Mitogen-aktivierten Proteinkinasen waren an der Wirkung der „small molecules“ auf die parodontalen Fibroblasten unbeteiligt.

Schlussfolgerung: „Small molecules“ steigern die VEGF-Produktion in Parodontalzellen, ohne dabei selbst die Entzündungsreaktion zu modulieren. Durch diese Substanzen kann die Produktion von körpereigenen angiogenen Signalmolekülen gefördert werden, ohne dabei die Inflammation zu steigern. Um diese Eigenschaften in vivo zu bestätigen, werden weitere Experimente vonnöten sein.

2. Abstract

Background: A therapeutic approach for periodontal and peri-implant tissue regeneration is the stimulation of angiogenesis. So-called "small molecules" can pharmacologically induce hypoxia, leading to the expression of the pro-angiogenic factor vascular endothelial growth factor (VEGF). It is unknown whether the increased expression of VEGF can occur under inflammatory conditions, and whether "small molecules" modulate the inflammatory response.

Methods: Fibroblasts of the gingiva and the periodontal ligament were exposed to the following "small molecules": desferrioxamine (DFO), dimethyloxaloylglycin (DMOG), L-mimosine (L-MIM) and cobalt chloride (CoCl₂) - with and without the inflammatory cytokine IL-1. The influence of "small molecules" on the expression of IL-6 and VEGF were measured by immunoassays. The involvement of intracellular signaling pathways was determined by Western blot.

Results: Small molecules increased the expression of VEGF in periodontal fibroblasts. The expression of VEGF was also increased in the presence of IL-1. However, "small molecules" had no effect on the inflammatory response (release of IL-6) after stimulation with IL-1. The mitogen-activated protein kinases were not involved in the process of increased VEGF expression.

Conclusion: "Small molecules" increase the expression of VEGF in periodontal cells, without causing an inflammatory response. If small molecules can support angiogenesis in periodontal defects requires further studies.

3. Einleitung

Die Förderung der Regeneration des perimplantären Gewebes ist ein entscheidender Faktor für Funktionalität, Ästhetik und damit den Erfolg einer implantologischen Versorgung. Ein therapeutischer Ansatz zur Förderung der parodontalen und periimplantären Gewebsregeneration ist die Förderung der Angiogenese. Sogenannte „small molecules“ können über pharmakologisch-simulierte Hypoxie die Expression des pro-angiogenetischen Faktors „vascular endothelial growth factor“ (VEGF) bewirken. Unbekannt ist jedoch, ob die vermehrte Expression von VEGF auch unter entzündlichen Prozessen ablaufen kann und ob „small molecules“ in das Entzündungsgeschehen eingreifen.

3.1. Parodont

Gingiva, Alveolarknochen, Wurzelzement sowie das Parodontale Ligament (Desmodont) bilden den Zahnhalteapparat (Parodont). Die Gingiva ist der peripherste Teil des Parodonts und bedeckt den Alveolarknochen. Der Alveolarknochen und das Wurzelzement werden über das Parodontale Ligament zusammengehalten. Sowohl die Gingiva als auch das Parodontale Ligament sind durchzogen von Fibroblasten (1).

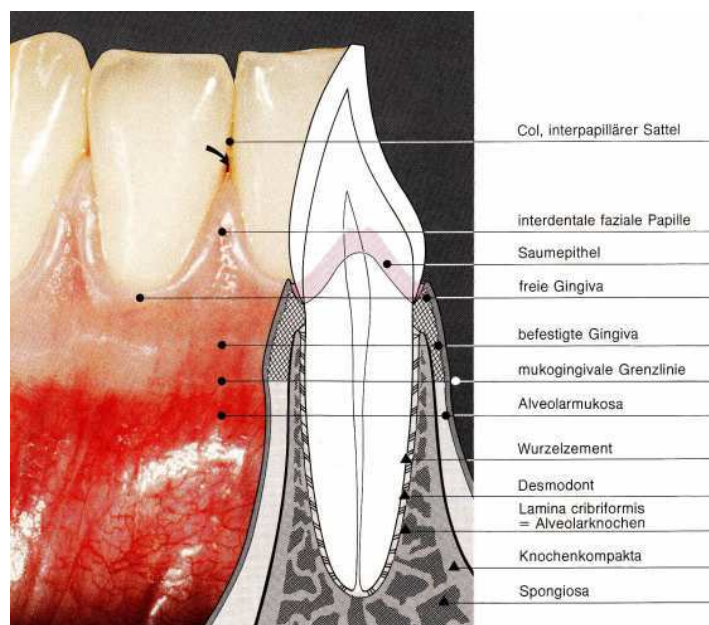


Abbildung 1: Gesundes Parodont. Zu sehen sind alle Anteile eines Parodonts. Die vier Hauptstrukturen sind die Gingiva, der Alveolarknochen, das Wurzelzement sowie das Desmodont (1).

3.1.1. Gingiva

Als Gingiva wird der nichtbewegliche keratinisierte Teil der Mundschleimhaut bezeichnet, welche zugleich den periphersten Teil des Parodonts bildet. Sie bedeckt die koronalen Abschnitte des Alveolarknochens und verläuft bis zum Zahnhals, wo sie das Saumepithel ausbildet. Die Gingiva wird in die ungefähr 1,5 mm breite marginale freie Gingiva, die unterschiedlich breite befestigte (attached) Gingiva und die interdental Gingiva unterteilt.

Es existieren unterschiedliche Phänotypen, die von einer derben, fibrösen Gingiva (=dicker Phänotyp) bis zu einer grazilen, kaum gestippten Gingiva (=dünner Phänotyp) reichen (1). Im gesunden Zustand ist sie blassrosa, organähnlich gestippt, keratinisiert und unterschiedlich stark pigmentiert. Sie bildet ein mehrschichtig unverhorntes Plattenepithel welches mit dem darunterliegenden Bindegewebe verbunden ist. Das Saumepithel liegt der Schmelz-Dentin-Grenze an und sichert damit die Kontinuität der Oberflächenauskleidung der Mundhöhle (1).



Abbildung 2: Gesunde Gingiva. Das Zahnfleisch läuft parallel zur Schmelz-Zement-Grenze. Die Papillen laufen spitz nach koronal aus. Es ist eine leichte Stippelung zu erkennen (1).

3.1.2. Alveolarknochen

Der Alveolarfortsatz lässt sich in den eigentlichen Alveolarknochen, die Spongiosa und die äußere Kompakta unterscheiden. Der Alveolarfortsatz wird von der äußeren Kompakta bedeckt. Am Eingang der Alveole beginnt der eigentliche Alveolarknochen, welcher 0,1-0,4 mm dick und von zahlreichen Gefäßen sowie Nervenfasern durchzogen ist. Die Spongiosa liegt zwischen der Kompakta und dem Alveolarknochen. Der Abstand zwischen der marginalen Gingiva und Alveolarrand (biologische Breite) beträgt 2-2 mm (1). Im Rahmen einer entzündlichen Erkrankung wie der Parodontitis und Periimplantitis werden diese Strukturen Geschädigt. Es kommt zu einem Weichgewebsabbau und irreversiblen Knochenverlust (2, 3).

3.1.3. Gingivafibroblasten/Parodontale Ligament Fibroblasten

Fibroblasten sind bindegewebszellenmesenchymaler Herkunft, die lang gestreckt, abgerundet, abgeflacht und mit membranartigen Fortsätzen versehen sein können. Mit der Bezeichnung Fibroblast bezeichnet man einen Fibrozyten, der sich in einem bestimmten Zellzustand befindet. Fibroblasten sind in jedem Bindegewebe zu finden, stehen häufig in einem netzartigen Zusammenhang und dienen der Bildung von Interzellulärsubstanzen. Darunter zählen Kollagen und Proteoglycane (4). Fibroblasten kommen in unterschiedlichen Geweben vor. Gingivafibroblasten kommen in der Gingiva vor. Dort bilden sie gingivale Faserbündel und sorgen somit für die Struktur und Festigkeit der Gingiva (1).

Parodontale-Ligament-Fibroblasten befinden sich im Desmodont. Sie sind den Gingivafibroblasten sehr ähnlich und genauso für die Bildung und den Abbau von Matrixbestandteilen verantwortlich. Sie bilden azellulärens Fremdfaserzement und sind somit für die Verankerung des Zahnes in der Alveole verantwortlich (1).

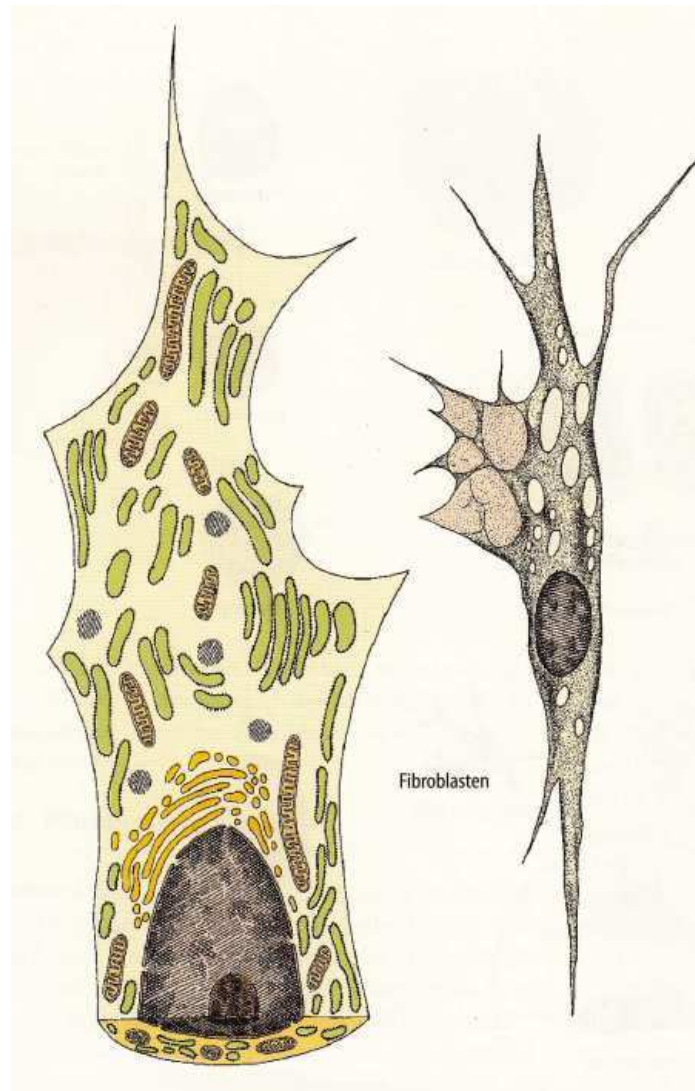


Abbildung 3: Fibroblast. Zu beachten sind die vielen Mitochondrien, die Fetttropfen sowie ein relativ großes, raues endoplasmatisches Retikulum (4).

Werden Fibroblasten durch Noxen geschädigt kommt es zu einer Proliferation und zu einer vermehrten Zytokinabgabe, die sich rückwirkend positiv auf das Wachstum auswirkt. Im physiologischen Zustand unterliegt die Extrazellulärmatrix von Bindegewebe und Knochen einem ständigen Umbau. Im Zuge von Umbauprozessen müssen somit Fibroblasten in der Lage sein Kollagen abzubauen. Dies wird durch eine Familie von zinkabhängigen Enzymen den Matrixmetalloproteinasen (MMP) bewerkstelligt. Es existieren über 14 unterschiedliche Matrixmetalloproteinasen. Darunter zählen Gelatinasen, Kollagenasen, Stromalysiene, Matrilysin, Metalloelastase und Membrantypus. Im Falle einer Entzündung können Makrophagen Prostaglandine und Zytokine sezernieren und Fibroblasten zur vermehrten MMP-Synthese anregen (5).

3.2. Entzündung

Entzündung ist eine Reaktion von Geweben (lokal) oder des gesamten Organismus (systemisch) auf einen lokalen Gewebeschaden oder auf die zugrunde liegende Noxe. Das Ziel dabei ist es die schädigende Ursache zu beseitigen oder schon dadurch entstandenen Schaden zu reparieren. Als Noxe bezeichnet man Substanzen oder Umstände die eine Gewebeschädigung hervorrufen können. Physikalische, chemische und biologische Noxen können bei der Entstehung von Entzündungen beteiligt sein. Dauer und Verlauf bestimmen die Art der Entzündung, welche sich in perakute, akute, subakute, chronische, rezidivierende einteilen lassen (6).

3.2.1. Gingivitis

Die Entzündung der Gingiva bezeichnet man als Gingivitis. Die Gingivitis kann unterschiedliche Intensitäten aufweisen, sodass sie in mehrere Stadien eingeteilt werden kann. Diese reichen von einer leichten, mittelschweren, bis hin zu einer schweren Gingivitis. Dieser entzündliche Prozess wird meistens durch vermehrte Plaqueakkumulation im marginalen Gingivabereich und dadurch vermehrten Bakterienaufkommen hervorursacht (7). Bei ungestörter Plaqueakkumulation kommt es innerhalb der zweiten bis dritten Woche bei 100% der Probanden zu einer Gingivitis (66). In weitere Folge kommt es zu Rötung, Blutung nach Sondierung, Schwellungen im schlimmsten Fall zu Ulzerationen. Diese Symptome sind zurückzuführen auf eine zunehmende Vaskularisierung und eine gesteigerte Gefäßpermeabilität mit verstärktem Austritt von Plasmaproteinen (3). Es kommt zu einem Aufbau einer kompetenten Immunreaktion gegen die im Plaque lebenden Mikroorganismen. Diese Reaktion des Wirts kann unterschiedlich stark ausgeprägt sein und ist aufgrund der Abwehrlage und Stresssituation wirtsabhängig (3, 8). Wird die Gingivitis nicht erfolgreich behandelt kann sich diese auf das darunterliegende Parodont ausweiten und es entsteht eine Parodontitis.



Abbildung 4: Schwere Gingivitis mit einer starken Rötung, starken Schwellung, Verlust der natürlichen Stippelung sowie Spontanblutungen.(1).

3.2.2. Parodontitis

Hierbei schreitet sich der entzündliche Prozess weiter fort und betrifft das unter der Gingiva liegende Gewebe. Entzündungszellen infiltrieren tieferliegende Strukturen und gelangen bis zum Zahnhalteapparat vor wo sie Entzündungsmediatoren freisetzen (9). In weiterer Folge werden das Desmodont und der Alveolarknochen irreversibel geschädigt, sodass Taschenbildung und Attachmentverlust folgen. Es kommt zu einer Veränderung der natürlichen Mundflora zugunsten von Gram-Negativer Bakterien und Spirocheten welche sich vorwiegend in tiefen Taschen einnisten. Es sind vor allem *Porphyromonas gingivalis* und *Bacteroides forsythus* für die chronische Parodontitis verantwortlich. Bei den aggressiven Formen wird *Actinobacillus actinomycetemcomitans* für das rasche Voranschreiten des Gewebsabbaus verantwortlich gemacht (10). Werden die Noxen nicht ausgeschaltet, d. h. die Taschen nicht gesäubert, die Bakterienansammlungen nicht reduziert und eine physiologische Mundflora wiederhergestellt, schreitet die Entzündung weiter fort. Dieser Prozess läuft meistens langsam ab und führt unbehandelt letztendlich zum Zahnverlust.

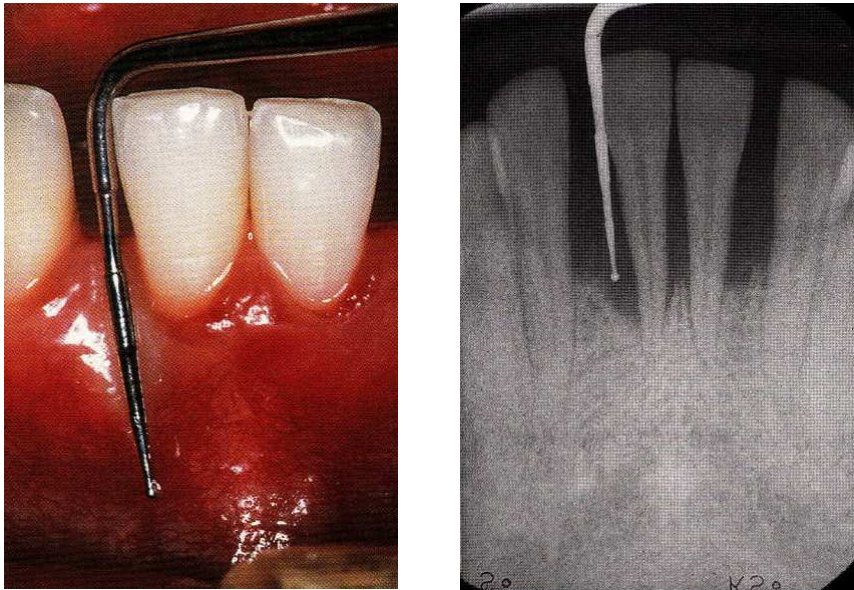


Abbildung 5: Lokalisierte aggressive Parodontitis. Klinischer und radiologischer Befund der Unterkiefer-Schneidezahnregion (11)

3.2.3. Periimplantitis

Kommt es zu einer Entzündung des dem Implantat umliegenden Hart- und/oder Weichgewebes und einem Verlust des umgebenden Knochens, so wird dies als Periimplantitis bezeichnet (12). Die Periimplantitis weist eine ähnliche Pathogenese wie die Parodontitis auf. Hierbei kommt es auch infolge von Plaqueansammlungen und einer Bakteriellen Besiedelung zu einer Entzündung des dem Implantat umliegenden Gewebes (13). Der dem Implantat umgebende Knochen wird aufgrund einer starken Entzündung langsam abgebaut und es entstehen vertikale Defekte, die wiederum die Ansammlung von bakterienreichen Plaque begünstigt. Dies führt zu einer verminderten Osseointegration und einer erhöhten Blutungswahrscheinlichkeit post operativ (14). Letztendlich kann dies zum Implantatverlust führen.



Abbildung 6: Abbau des Zahnhalteapparats bei Periimplantitis. Zu beachten sind die vertikalen Defekte (15).

3.2.4. Ätiologie und Pathogenese

Die Entzündung einer Gingivitis, Parodontitis oder Periimplantitis wird durch pathogene Mikroorganismen, die sich in der Plaque befinden, hervorgerufen. Die Zahnplaque ist ein Biofilm, welche sich innerhalb von Stunden an der Zahnhartsubstanz bildet. Dabei können sich Bakterien durch physikalische Kräfte locker an die Zahnoberfläche anlagern. Es erfolgt später die Adhäsion einiger Bakterien auf die Oberfläche durch spezielle Oberflächenmoleküle (Adhäsine). Diese Erstbesiedler docken später weitere Bakterien an (1). Bei gesunden Verhältnissen besteht ein Gleichgewicht zwischen den Aufbauenden, additiven Mechanismen des Biofilms sowie den abrasiv Abbauenden, die einerseits durch Selbstreinigung wie Zunge und Wange andererseits durch mechanische Mundhygiene erfolgen. Eine reife Plaque kann binnen Stunden bis Tagen entstehen und agiert letztendlich als Gesamtorganismus. So sind die in ihr vorkommenden Bakterien von der körpereigenen Abwehr weitgehend isoliert und geschützt (1).

Es lassen sich bis zu 400 Spezies und Subspezies in einer reifen subgingivalen Plaque, von denen etwa ein gutes Dutzend als parodontalpathogen eingestuft wird, isolieren. In Assoziation mit Parodontitis und Periimplantitis werden überwiegend gramnegative Bakterien gebracht. Einige bekannte Vertreter sind *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Bacteroides forsythus*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Treponema denticola* (16). Zu den ersten Bakterien, die sich an die Zahnoberfläche anlagern gehören in der Regel hauptsächlich grampositive Bakterien, welche nicht primär pathogen sind. Hierzu gehören hauptsächlich Streptokokken, vor allem *Streptococcus mitis*, *S. sanguis*, *S. anginosus* und ein geringerer Anteil an grampositiven Stäbchen (3).

Je reifer, älter die Plaque wird, desto mehr häufen sich gramnegative Stäbchen und Spirochäten an und die damit verbundene Pathogenität steigt. Die Bakterien produzieren eine Vielfalt von Stoffwechselprodukten welche eine verstärkte Exsudation und Migration von Abwehrzellen aus dem Gewebe in den Sulkus fördert. Zu den Stoffwechselprodukten gehören Bakterienwandtoxine (Lipopolysaccharide) und Enzyme (Proteasen, Kollagenasen), die eine Entzündung und einen Gewebsabbau hervorrufen können (1).

Damit die erwähnten Mechanismen eines Gewebsabbaus erst entstehen können, sind die Anwesenheit von pathogenen Organismen und die damit verbundenen Stoffwechselprodukte nicht ausreichend. Es muss ein empfindlicher Wirt vorhanden sein. So setzen die Zellen des Parodonts selbst im Rahmen der Wirtsabwehr Proteasen, Prostaglandine, Zytokine und Enzyme frei, welche einerseits für die Abwehr der Mikroorganismen essentiell sind, andererseits selbst eine gewebsdestruierende Wirkung besitzen. In weiterer Folge ist das

Gleichgewicht zwischen Auf- und Abbau des Parodonts zugunsten gewebssabbauender Prozesse verschoben. Hierbei spielen die Fibroblasten eine wichtige Rolle, da sie am physiologischen Gewebsumbau mitbeteiligt sind. Sie werden von der körpereigenen Abwehr, die wiederum durch bakterielle Metaboliten angeregt wird, zum forcierten überschießenden Gewebssabbau angeregt (16).

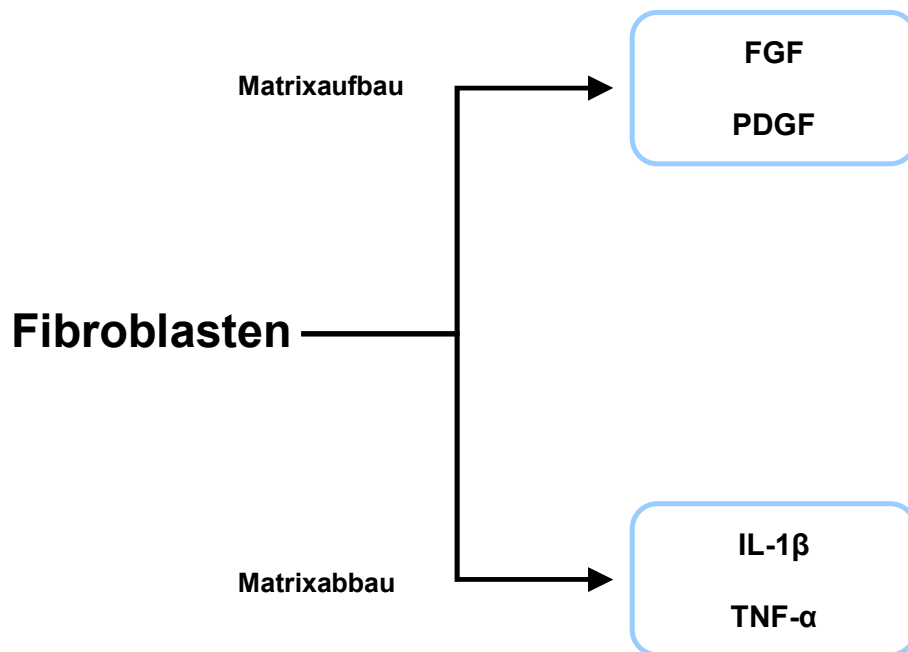


Abbildung 7: An- und Abbau von Extrazellulärmatrix durch Fibroblasten. Wachstumsfaktoren wie der Fibroblastenwachstumsfaktor (FGF), und der Blutplättchenwachstumsfaktor (PDGF) verschieben die Bindegewebshomöostase im Extrazellulärraum zugunsten des Matrixaufbaus. Interleukin-1 β (IL-1 β) und Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) fördern hingegen den Matrixabbau durch Fibroblasten (1).

Vor allem Makrophagen, aktiviert durch Lipopolysacheride, regen Fibroblasten durch IL-1, TNF- α zur Sekretion von abbaufördernden (sekundären) Mediatoren, wie Prostaglandine und MMPs an. Kommt es in Folge von akuten Entzündungen zu hohen Chemokinkonzentrationen, werden die aus den Gefäßen austretenden neutrophilen Granulozyten vor dem Eintreten in den Sulcus bereits im Bindegewebe aktiviert. Es kommt zum sogenannten „respiratory burst“

und bei ihrem Absterben werden Hydrolasen, Elastasen und Proteasen frei, die körpereigenes Bindegewebe zersetzen (1).

Da der Alveolarknochen selbst einem ständigen Umbau ausgesetzt ist, kommt es durch die oben erwähnten Mechanismen zu einem Abbau des Alveolarknochens. Dabei werden durch die genannten Faktoren knochenabbauenden Zellen, sogenannte Osteoklasten, direkt stimuliert oder durch die indirekten Wirkung auf Präosteoklasten die Zahl der Knochenresorbierenden Zellen erhöht (1).

Abbau von Bindegewebe und Knochen infolge von aktivierten Makrophagen

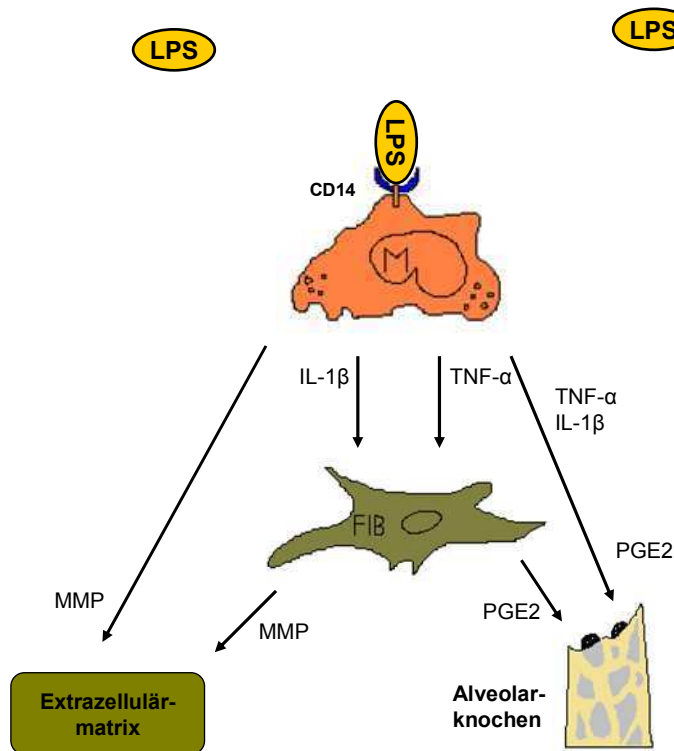


Abbildung 8: Abbau von Bindegewebsmatrix und Knochen. Lipopolysaccharid aktiviert Makrophagen, welcher Entzündungsmediatoren freisetzt. Diese regen Fibroblasten zur vermehrten Produktion von MMPs und Prostaglandinen. Es kommt zum Gewebsabbau.

3.3. Zytokine

Zytokine sind Proteine, die durch verschiedene Zellarten, teils hämatopoetischer, teils nicht-hämatopoetischer Abstammung produziert und sezerniert werden. Dabei handelt es sich um eine Gruppe von kleineren Proteinen oder Peptiden, die als Signalmoleküle die Proliferation, Differenzierung, Aktivierung von entzündlichen Antworten, von Zielzellen einleiten und regulieren. Im Allgemeinen wirken Zytokine an verschiedenen Zielzellen, man bezeichnet dieses Verhalten als Pleiotropie. Zytokine können autokrin, parakrin und endokrin wirken (17-19). Die Wirkung eines Zytokins kann durch die Bindung an seinen spezifischen Rezeptor und an die anschließende intrazelluläre Wirkung, Signaltransduktion mit Aktivierung von Transkriptionsfaktoren, erklärt werden. Oft induzieren Zytokine die Produktion anderer Zytokine und es entstehen dadurch Zytokinkaskaden.

Eine Unterteilung der Zytokine ist schwer, da viele von ihnen nicht nur von einer einzigen Zellart gebildet werden und verschiedene Zytokine Teilweise dieselbe Wirkung haben (Redundanz) (17). So spielen Interleukine eine entscheidende Rolle bei der Entstehung von Parodontitis. Im Zuge einer bakteriellen Besiedelung kommt es zu Aktivierung von Makrophagen, Lymphozyten und Fibroblasten, welche die Zytokinproduktion erhöhen und damit eine Parodontitis fördern (20).

3.3.1. Interleukin-1 β

Ein Großteil der Zytokine kann man als Interleukine bezeichnen, da diese Mediatoren hauptsächlich ihre Wirkung zwischen Leukozyten entfalten. Es existieren zwei Formen des Polypeptids IL-1, IL- α und IL-1 β , welche obwohl sie nur in 27% ihrer Aminosäuresequenz übereinstimmen, beide ähnliche funktionelle Eigenschaften besitzen (21). Diese können an zwei unterschiedliche Rezeptoren, den IL-1 Rezeptor Typ I (IL-1 RI) und den IL-1 Rezeptor Typ II (IL-1RII) binden. Des Weiteren existiert ein IL-1 Rezeptor-Antagonist (IL-1 Ra), welcher die Fähigkeit besitzt an die zwei IL-1 Rezeptoren zu binden, jedoch selbst keine intrinsische Aktivität besitzt (22). IL-1 α liegt überwiegend Membrangebunden vor, hingegen wird IL- β freigesetzt (23). IL-1 β wird im Zytosol als eine inaktive 31 kDa große Vorstufe gebildet. Durch das IL-1 β converting enzyme (ICE) wird es durch Proteolyse in die aktive extrazelluläre Form umgewandelt. Die aktive Form von IL-1 β hat ein Molekulargewicht von 17,5 kDa (21). IL- β kann von Monocyten, Macrophagen, B-Zellen, unterschiedlichen Epithelzellen, Endothelzellen sowie Fibroblasten produziert werden (17).

IL-1 gehört zu den wichtigsten Interleukinen, welche für Abwehr und Entzündung zuständig sind. Es wird als Antwort auf pathogene Mikroorganismen, bakterielle Toxine (LPS), Gewebsverletzungen und in Folge der Compliment Aktivierung Produziert. Eine der wichtigsten Funktionen von IL-1 ist die Induktion von weiteren Zytokinen. Es hat eine wichtige Rolle in der Eigenregulierung von Zytokin-Netzwerken (24). Weiters ist es ein proinflammatorisches Zytokin, welches Monozyten und Fibroblasten zur Prostaglandin (PGE₂) und Matrixmetalloproteinase Produktion anregt. Letztere, vor allem die Extrazellulärmatrix von Bindegewebe abbaut. Der überwiegende Anteil von IL-1 ist die IL- β Form, welche für die Gewebsschädigende Wirkung des Parodonts verantwortlich ist. In diesen Fällen wird es hauptsächlich von Makrophagen produziert (20). In Endothelzellen erhöht es die Expression von Adhäsionsmolekülen, aktiviert selbst weitere Makrophagen und regt diese zur vermehrten Synthese von proinflammatorischen Zytokinen an. Als Folge der Expression von Adhäsionsmolekülen kommt es zur Adhärenz und Transmigration von polymorphkernigen Granulozyten aus den Gefäßen in das irritierte Gewebe. Diese wiederum setzen weitere Zytokine frei die proinflammatorisch wirken (1, 25).

Es konnte gezeigt werden, dass IL- β in der Gingiva bei parodontalen Erkrankungen im Gegensatz zu gesunden Probanden erhöht ist. Durch bakterielle Toxine aktivierte Makrophagen produzieren IL- β und fördern somit Gewebsabbau und Knochenresorption. Fibroblasten werden zur vermehrten Produktion von Enzymen wie Elastasen Kollagenasen sowie zur Steigerung von MMPs angeregt, welche wiederum Kollagen abbauen und Gewebe zersetzen. IL- β induziert die Demineralization von Knochen, indem es die Proliferation von Osteoklasten fördert. Des weiteren fördert es das Entzündungsgeschehen über die Steigerung der Prostaglandinsynthese (1, 24).

Die Produktion von IL- β in Fibroblasten und Makrophagen kann auch durch parodontalpathogene Organismen, die auch im Zuge einer Parodontitis und Periimplantitis aktiv sind, angeregt werden. Hierzu zählen *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* und *Fusobacterium nucleatum*. Gram-negative Bakterien induzieren hauptsächlich durch Lipopolysaccharide, welche in der Äußeren Membran vorkommen, Gram-positive wie *Staphylococcus aureus* durch Lipoteichonsäuren, welche Bestandteile der Zellwand sind, die Produktion von IL- β in Abwehrzellen. Dies führt wiederum im Rahmen einer Parodontitis und Periimplantitis zu einer Progression der Erkrankung (21).

3.3.2. Interleukin-6

IL-6 hat eine ähnliche Wirkung wie IL-1. Jedoch entfaltet es seine Wirkung an weniger Zellen als IL-1. Dazu gehören T-Zellen, B-Zellen, Endothelzellen, Hepatozyten und Monozyten/Makrophagen. Es induziert die Produktion von Akutphase Proteinen, fördert die Differenzierung T-Zellen und aktiviert Osteoklasten. IL-6 induziert die Immunoglobulin Sekretion in aktivierten B-Zellen und fördert daher auch ihre Reifung zu Antikörperproduzierenden Plasmazellen (24, 26, 27). Wie IL-1 hat IL-6 eine wichtige Rolle in der Antwort auf Entzündungsreaktion, in immunologischen Prozessen und wird daher bei Infektionen und Gewebsverletzungen sezerniert. Es konnte gezeigt werden, dass IL-6 in der Gingiva bei Patienten mit Parodontitis erhöht war (24).

3.3.3. Tumornekrosefaktor- α

Tumornekrosefaktor- α ist ein multipotentes Zytokin welches eine große Vielfalt an biologischen Effekten aufweist. Es wird vor allem von Makrophagen als Antwort auf Lipopolysaccherid produziert. Die Expression von Adhensionsmolekülen auf Endothelzellen, wie bei IL-1, welches zu einer vermehrten Migration von neutrophilen Granulozyten und Monozyten aus den Gefäßen in das Parodontalgewebe führt, fördert die Progression einer Parodontalerkrankung. Des weitern fördert es die Knochenresorption indem es auf Osteoklasten Proliferation und Differenzierung wirkt (24).

Makrophagen aktivierte Leukozyten-migration

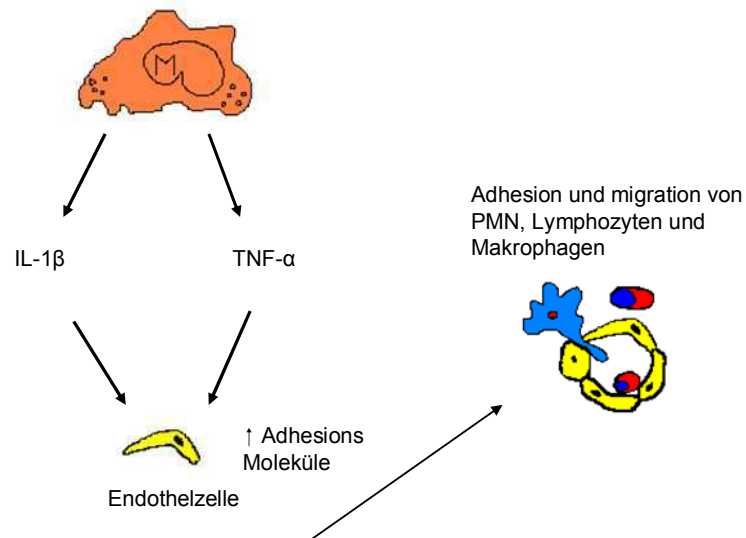


Abbildung 9: Makrophagen aktivierte Leukozyten-Migration. IL-1 und TNF- α fördern die Bildung von Adhäsionsmolekülen im Lumen der Endothelzellen. Es folgt eine Adhärenz und Transmigration von weiteren Makrophagen, Monozyten, Neutrophilen Granulozyten und Lymphozyten (24).

3.4. Mitogen-aktivierte Proteinkinase

Eine große Anzahl von Oberflächenrezeptoren, wie G-Protein vermittelte Rezeptoren, Tyrosinkinase-Rezeptoren und Zytokin-Rezeptoren aktivieren Mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAPK), welche als Schlüsselenzym für die intrazelluläre Informationsübertragung dienen. Diese Enzyme sind entwicklungs-mäßig in verschiedensten Lebewesen von Säugetieren bis Hefezellen hochkonserviert und haben sich im Laufe der Zeit kaum verändert. Mitogen-aktivierte Proteinkinasen sind eine Familie Serin/threonin-Kinasen, welche mit Hilfe von kaskadenartigen Signaltransduktions Wegen, Zellwachstum, Zelldifferenzierung und programmierten Zelltod steuern. Die Kaskaden enthalten zumindest

drei Protein-Kinasen , die sich nach einer bestimmten Hierarchie phosphorylieren und dadurch ein komplexes verzweigtes Netz ausbilden (28). Es existieren unterschiedlichste Klassen von MAPK. Die Wichtigsten sind *extracellular signal-related kinases* (ERK) -1/2, *c-Jun amino-terminal kinases* (JNK), *p38 protein* (p38). Diese werden von folgenden ihnen übergeordneten MAPKK aktiviert: MEK1/2 aktiviert ERK 1/2, MKK3/6 aktiviert p38 , MKK4/7 aktiviert JNK . Jede dieser MAPKK kann durch weitere unterschiedliche MAPKKK phosphoryliert werden und somit ein komplexes und kompliziertes System ausbilden (29).

Mitogen-Activated Protein Kinase Cascades

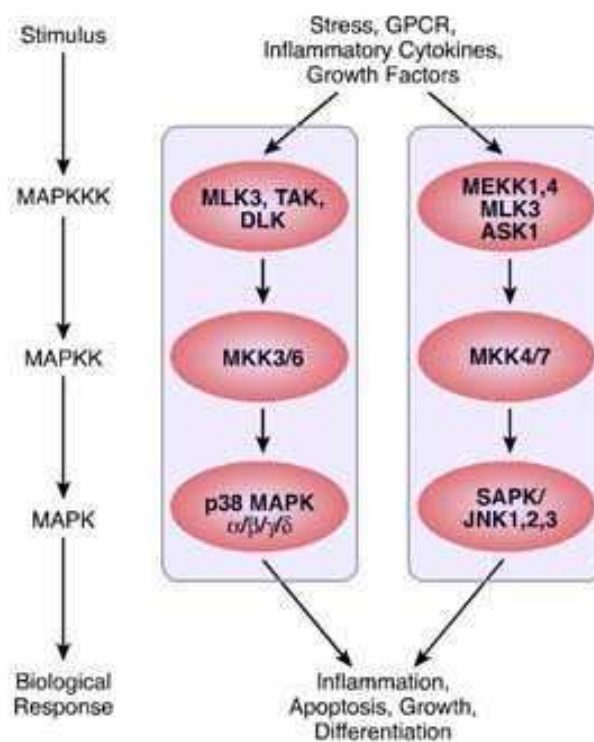


Abbildung 10: Kaskadenartiger Aufbau der Mitogen-aktivierten Proteinkinase. Zu sehen sind drei Map-Kinasen, die sich hierarchisch phosphorylieren (30).

3.4.1. C-Jun amino-terminal kinases (JNK)

Die C-Jun N-terminalen Kinasen werden auch *stress-activated phospho-kinases* genannt und aufgrund der Fähigkeit Stresssignale weiterzuleiten entdeckt. Es wurde erkannt, dass sie N-terminale Aminosäurereste von c-Jun phosphorylieren können und damit die Transkriptionsaktivität steigern. C-Jun ist ein Teil von *activator protein 1 (AP-1)* , einem

Transkriptionsfaktor Komplex, der Gene von Zytokinen steuert und als Antwort auf Stress, Wachstumsfaktoren und Strahlung aktiviert wird. Es ist bekannt, dass JNK wichtig für den programmierten Zelltod (Apoptose) ist (31). Die JNK Familie umfasst drei verschiedene Isoformen auf drei unterschiedlichen Chromosomen: JNK1, JNK2 und JNK3. Die ersten zwei sind in Säugern allgegenwärtig, die dritte ist nur im Gehirn, Herz und Hoden vorhanden. Es existieren unterschiedliche Spliceformen, sodass mindestens 10 Varianten unterschiedlicher Größe (46-55kDa) vorkommen (32). Die Entdeckung von Inhibitoren des JNK, wie dem Stoff SP600125 ermöglicht eine genauere Erforschung der Signalwege. SP600125 ist, wie viele dieser Art, ein Kinase Inhibitor der die JNK ATP-Bindungsstelle kompetitiv besetzt und so die Aktivierung verhindert. Da dieser Stoff ziemlich spezifisch an die drei Isoformen von JNK bindet, wird eine Hemmung übergeordneter MAPK verhindert. Weiters ist er in der Lage den Zelltod unter apoptotischen Bedingungen zu Unterdrücken (33).

3.4.2. p38 Mapk Familie

P38 ist ein 38-kDa großes Protein und es existieren vier Isoformen, die alle durch verschiedenen Gene exprimiert werden (34). Die α - und β -Isoform sind zu 74% ident und im Gegensatz zur γ Variante, welche vor allem in Muskelzellen vorkommt, weit verbreitet. Die δ ist zu 61% mit der α -Isoform ident und kommt vorwiegend im Hoden, Dünndarm, Pankreas und CD4+ T-Zellen vor (35). Untersuchungen mit dem p38 Protein zeigten, dass es eine wesentliche Rolle in Immun und Entzündungsprozessen spielt. So ist SB203580, ein Imidazol, in der Lage die Phosphorylierung von p38 zu hemmen und es damit zu inaktivieren. SB203580 hemmt die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen wie IL-1, IL-6 und TNF- α (36). Die Produktion von Cyclooxygenase-2, welches die allgemeine Funktion hat, Prostaglandin-E2 herzustellen wird ebenfalls unter anderem von p38 reguliert (34). Die p38 Familie wird überwiegend in Stress Situation und in Zellteilungsvorgängen aktiviert. Sie steuert direkt und indirekt die Transkription und Translation von Proteinen und ist in der Lage andere Kinasen zu aktivieren, die an interzellulären Antworten beteiligt sind.

3.5. Hypoxie

In der Fachliteratur ist die simulierte Hypoxie eine bekannte Methode um Gewebsregeneration zu fördern (37). Dabei macht man sich die Eigenschaft zu nutze, dass der menschliche Körper abhängig von Sauerstoff ist. Die Sauerstoffversorgung im Körper ist in den einzelnen Regionen unterschiedlich. So beträgt der interstitielle Sauerstoffpartialdruck zwischen 4-8% (38). Sinkt der Sauerstoffpartialdruck unter Normwerte, so ist dies ein starke Stimulus für die Angiogenese. Die Angiogenese ist Voraussetzung für eine gute Vaskularisation und somit für die Wiederherstellung einer physiologischen Sauerstoffversorgung. Es konnte gezeigt werden, dass durch Hypoxie die Proliferation von Endothelzellen und somit in weiterer Folge eine erhöhte Regeneration oraler Mukosa gefördert werden konnte (39). Auf der zellulären Ebene werden eine Vielzahl von Genen aktiviert, welche hauptsächlich Hypoxia inducibel factor (HIF-1) gesteuert werden.

3.6. HIF-1

HIF-1 ist ein Schlüsselenzym für die Erhaltung der Sauerstoff Homöostase in vielen Lebewesen. Als Transkriptionsfaktor steuert es Gene, die für Angiogenese, Erythropoese, Apoptose und Proliferation zuständig sind (40). HIF-1 ist ein Heterodimer bestehend aus einer HIF-1 α und einer HIF-1 β Untereinheit. Die HIF-1 β Untereinheit ist durchgehend stabil, wobei die α -Untereinheit jene ist, die auf verminderte Sauerstoffpartialdrücke reagiert und somit einem stetigen Abbau durch das Proteasom ausgesetzt ist. Unter Hypoxie bleibt die α -Untereinheit stabil, verlagert sich in den Nukleus um dort mit der β -Untereinheit zu dimerisieren. Dadurch kann der HIF-1 Komplex die Transkription von spezifischen Genen starten (41). Eine andere Art HIF-1 stabil zu halten ist durch den Factor inhibiting HIF-1 (FIH) gewährleistet. Dieser Factor (FIH) hydroxyliert unter Normoxie an Asparagin-Reste des HIF-1 Proteins und verhindert damit die Bindung der Co-Aktivatoren p300 und CBP (CREB bindendes Protein). Damit existiert ein weiterer Weg für die Regulierung des HIF-1 Komplexes als Transkriptionsfaktor (42).

HIF-1 α unter Normoxie

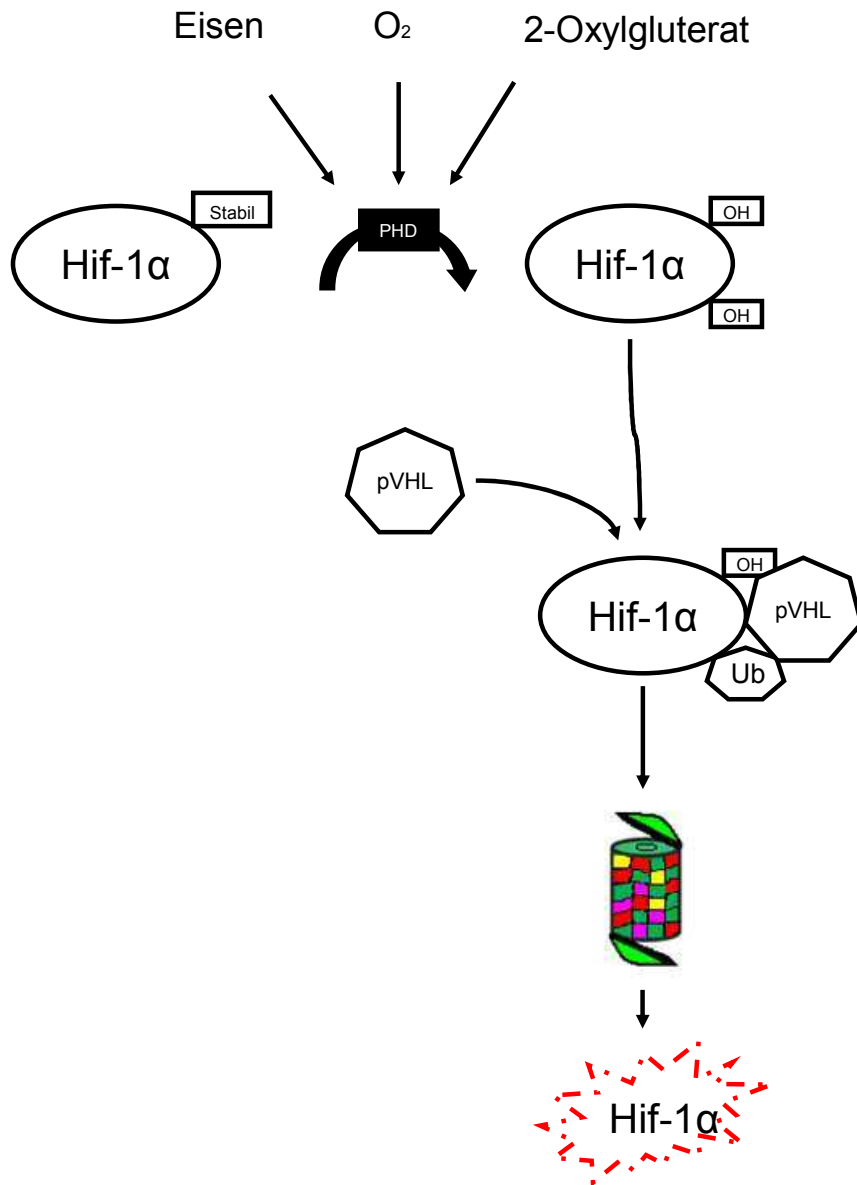


Abbildung 11: HIF- α Stoffwechsel. Sauerstoff, Eisen und 2-Oxylgluterat dienen den Prolylhydroxylasen als Cosubstrate. Die Prolylhydroxylasen hydroxylieren HIF-1 α welches dann vom von Hippel Lindau Protein (pVHL) Ubiquitiniert und für den Abbau im Proteasom freigegeben wird (43) (44).

HIF-1 α unter Hypoxie

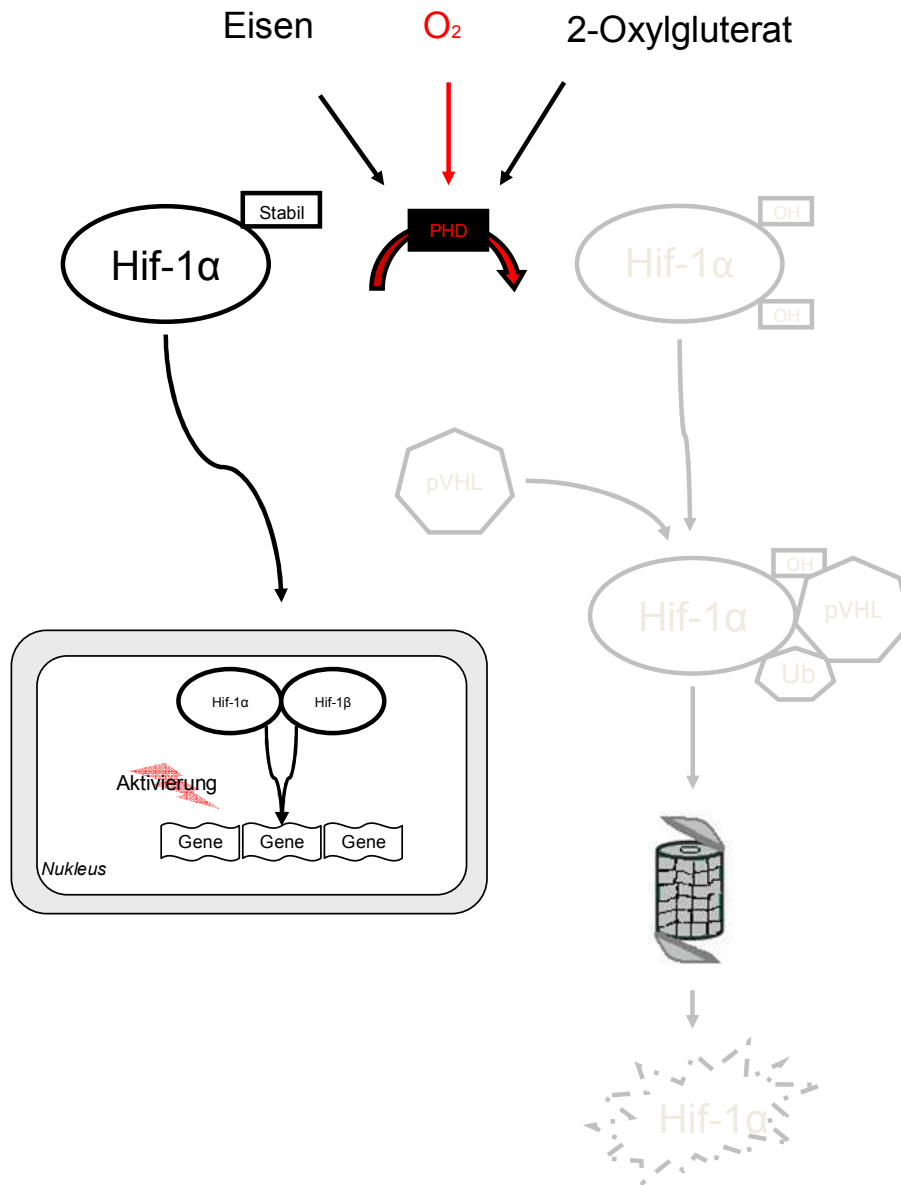


Abbildung 12: HIF-1 α unter Hypoxie. Die Aktivität der Prolylhydroxylasen ist unter Hypoxie vermindert, da ihnen Sauerstoff als Cosubstrat fehlt. Dadurch bleibt HIF-1 α stabil, wandert in den Nucleus, dimerisiert mit der β -Untereinheit und aktiviert HIF-1 α spezifische Gene (43, 44).

HIF-1 α wird unter Normoxie an einer spezifischen Stelle der Aminosäuresequenz, an Prolin Resten, durch eine sauerstoffabhängige Prolyl-Hydroxylase hydroxyliert. Für diesen Prozess benötigen diese Sauerstoff, Eisen und 2-Oxylglutarat als Co-Faktoren (43). Der E3 Ubiquitin Ligase Komplex der das von Hippel Lindau- Tumor Supressor Protein (pVHL) beinhaltet, bindet an das hydroxylierte HIF-1 α und markiert es somit für den Abbau im Proteasom. Daher führt Normoxie zu einer stetigen Degradation von HIF-1 und dem damit verbundenen Ausbleiben der Transkription von Genen die für eine Expression vom VEGF verantwortlich sind (44).

3.7. VEGF

VEGF ist ein homodimeres , 46 bis 48 kDa großes Protein, welches in mehreren Splice Varianten vorkommt. Es existieren mehrere Isoformen VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, und der „plcental growth factor“ die durch alternatives Splicen eine Länge von 121 bis 206 Aminosäuren erreichen können. Drei Tyrosin-Kinase-Rezeptoren binden verschiedenen Untereinheiten von VEGF: VEGFR-1, VEGFR-2 , VEGFR-3. (45)

VEGF spielt eine zentrale Rolle in der Angiogenese. Als Angiogenese bezeichnet man die Bildung von neuen kleinen Blutgefäßen (Kapillaren), hauptsächlich durch die Aussprossung aus einem bereits vorhandenen Gefäßsystem. Es wird von den Endothelzellen der Blutgefäße als Antwort auf Hypoxie gebildet. Dabei wirkt es auf die Endothelzellen selbst und fördert Proliferation und Migration und behindert die Apoptose. Damit ist VEGF ein bedeutender Faktor für die Gewebsregeneration (46). Die Transkription von VEGF mRNA wird durch den Transkriptionsfaktor HIF-1 gesteuert, welcher wiederum auf den Sauerstoffpartialdruck im Gewebe reagiert. Kommt es in Folge von physiologischem Gewebswachstum (Muskelwachstum) oder durch Verletzungen (Abriss von Blutgefäßen) zu einer Sauerstoffunterversorgung, bindet der HIF-1 Komplex intrazellulär im betroffenen Gewebsabschnitt an die VEGF Codierenden Genabschnitte und sorgt als Promotor für die VEGF Expression. Sobald die Neovaskularisation des betroffenen Gebietes und damit eine Normalisierung des Sauerstoffpartialdrucks erreicht ist, wird die VEGF-Produktion gedrosselt. (47)

VEGF fördert nicht nur die Neovascularisation, sondern unterdrückt auch die Apoptose. Dadurch wird der Bedarf an Gefäßversorgung genau an die metabolischen Bedürfnisse angepasst. Durch ein Sauerstoffüberangebot wird die VEGF Produktion unterdrückt und damit

auch die Apoptose eingeleitet. Gefäße welche vom Körper als nicht notwendig angesehen werden, können somit durch Apoptose kontrolliert zurückgebildet werden. (47)

Die Rolle von VEGF in der Tumorgenese ist von Interesse. So hängt ein schnelles Tumorstadium von seiner Sauerstoff und Nährstoffversorgung ab. Erreicht ein Tumor eine Größe bei der er nicht mehr durch einfache Diffusion versorgt werden kann, entsteht in dem betroffenen Areal eine Hypoxie. Es folgt eine Gefäßneubildung durch die oben genannten Mechanismen. Es kommt zu einem Wachstum des Tumors. So konnte gezeigt werden, dass eine Blockade von VEGF mit dem monoklonalen Antikörper Bevacizumab eine Reduzierung von Tumorgefäßen und damit Tumorstadium im Mäusemodell bewerkstelligen konnte (45, 48). Seit dem wurde Bevacizumab erfolgreich an menschlichen Tumorzellen durch subcutane Verabreichung getestet (49). Dies zeigt, inwiefern VEGF für Gewebe und Organismen ein essentieller Mechanismus um auf Hypoxie zu Antworten ist.

3.8. *Small Molecules stabilisieren HIF-1 α*

Die Substanzen Desferrioxamin (DFO), Dimethylalloylglycine (DMOG), L-Mimosin (L-MIM) und Kobaltchlorid haben eine geringe molekulare Masse und werden deshalb als „small molecules“ bezeichnet. Sie zählen zur Gruppe der Prolylhydroxylase-Inhibitoren, d. h. sie entziehen den Prolylhydroxylasen ihr notwendiges Substrat Eisen und vermindern dadurch ihre Aktivität. In weiterer Folge kann der Ubiquitin Ligase Komplex, der das von Hippel Lindau- Tumor Suppressor Protein (pVHL) beinhaltet, HIF-1 nicht mehr markieren und für den Abbau im Proteasom freigeben (43). Daher besitzen sie die Eigenschaft den Abbau von HIF-1 zu unterbinden und somit die Produktion von VEGF zu fördern (50). Deshalb war es unsere Idee, diese Eigenschaft der HIF-1 Stabilisierung auszunutzen und damit die Gewebsregeneration zu fördern. Es konnte bereits gezeigt werden, dass die Stabilisierung von HIF-1 in diabetischen Mäusen die Gewebsregeneration fördert (51).

Small molecules stabilisieren HIF-1 α

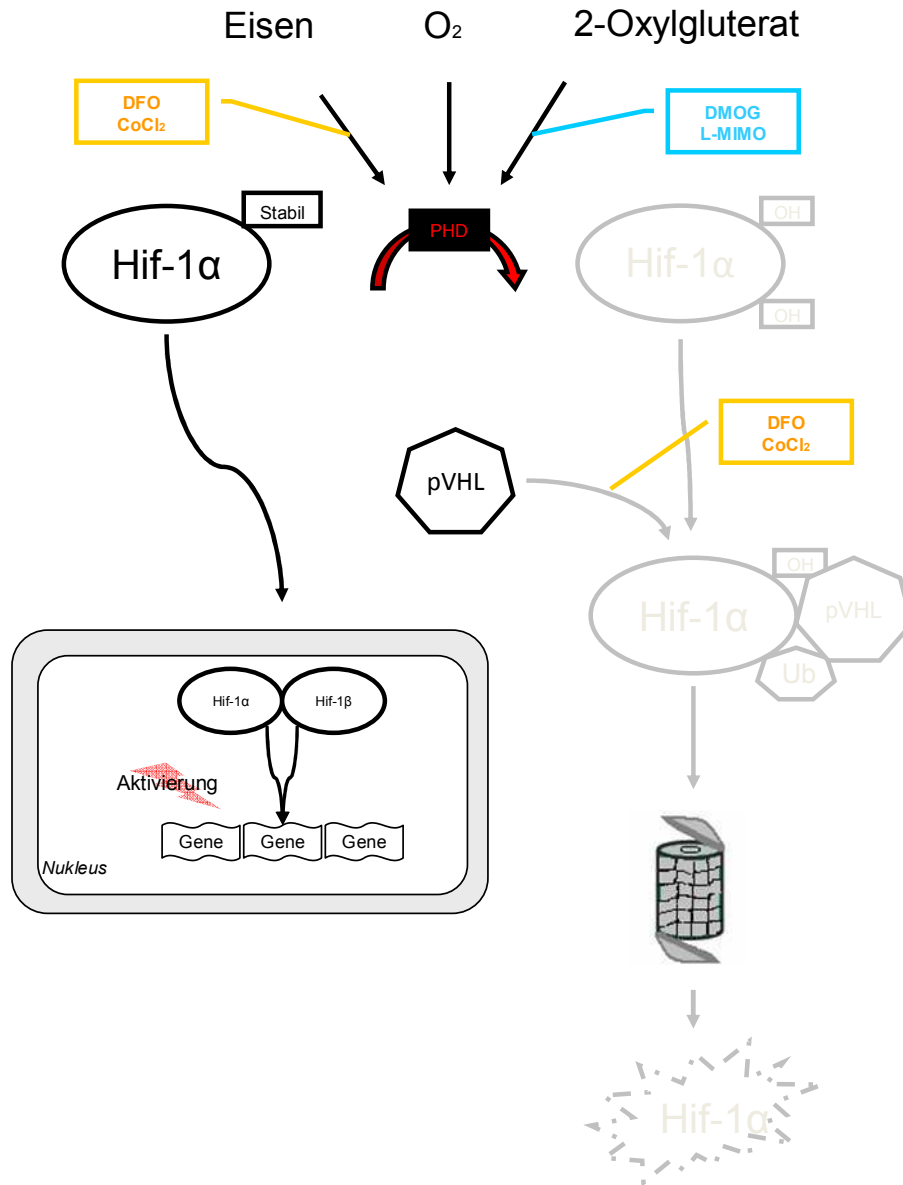


Abbildung 13: Wirkung der „small molecules“ im Hif-1 α Abbauprozess. Die Substanzen DFO und $CoCl_2$ wirken als Eisenchelatoren und hemmen die Interaktion zwischen von Hippel Lindau Protein (pVHL) und Hif-1 α . DMOG und L-MIM fungieren als 2-Oxyglutarat Substratanaloga. Damit wird der Hif-1 α Abbauprozess unterdrückt (43, 44, 52-54).

3.8.1. Desferrioxamin (DFO)

Desferrioxamin hat ein Molekulargewicht von 656,8g/mol. Die Summenformel lautet $C_{25}H_{48}N_6O_8$. DFO ist ein vom Bakterium *actinobacter Streptomyces pilosus* abgeleiteter Eisen Chelat Bildner (55). In der Klinik wird es bei akuter Eisenvergiftung sowie bei aplatischen Anämien, Hämochromatose und Thalassemien eingesetzt. Es konnte gezeigt werden, dass Eisenchelator auf zellulärer Ebene in der Lage sind VEGF zu erhöhen. (56) Dabei ist dies auf die einerseits auf die Eisenabhängige Funktion der Prolylhydroxylasen zurückzuführen (52). Andererseits greift es direkt am von Hippel Lindau- Tumor Supressor Protein an, sodass dieses nicht mit HIF-1 α Untereinheit einen Komplex bilden kann und dadurch für den Abbau im Proteasom markiert wird. (52)

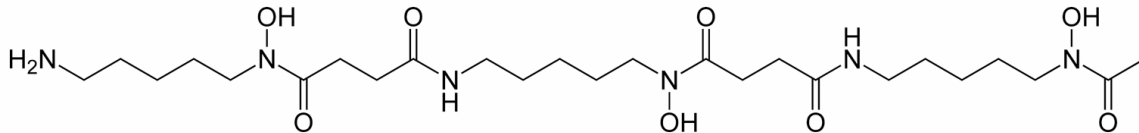


Abbildung 14: Chemische Strukturformel von Desferrioxamin (DFO) (57)

3.8.2. Kobaltchlorid (CoCl₂)

Kobaltchlorid hat ein Molekulargewicht von 129,84 g/mol. Es ist eine chemische Verbindung aus Kobalt und Chlor. Im Wasserfreien Zustand ist es ein blaues und als Hexahydrat als rosafarbenes Salz. Kobaltchlorid besitzt dieselben zwei Angriffspunkte im HIF1-Abbausystem wie Desferrioxamin (53, 54). Des weiteren kann Kobaltchlorid in akut myeloischen Zellreihen über Mitochondrale Pfade in vitro Apoptose induzieren (58).

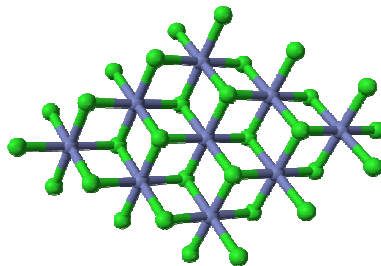


Abbildung 15: Chemische Strukturformel von Kobaltchlorid (CoCl₂) (57)

3.8.3. Dimethyloxalolyglycin (DMOG)

Dimethyloxalolyglycin hat ein Molekulargewicht von 175.14g/mol. Die Summenformel lautet $C_6H_9NO_5$. Dimethyloxalolyglycine interagiert mit Prolylhydroxylasen indem es sie als 2-Oxylgluterat Analogon bindet ohne aber dabei eine intrinsische Aktivität aufzuweisen. Dadurch unterbindet es ihre Funktion, sodass HIF-1 nicht Hydroxyliert wird und vom Proteasom nicht abgebaut wird (52).

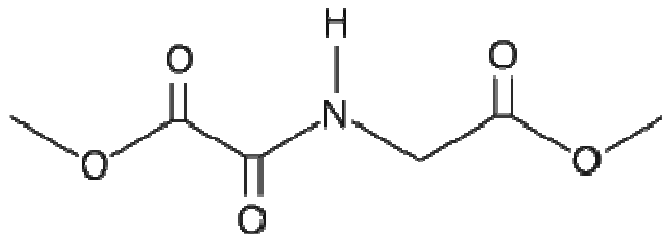


Abbildung 16: Chemische Strukturformel von Dimethyloxalolyglycine (DMOG) (59)

3.8.4. L-Mimosin (L-MIM)

L-Mimosin besitzt ein Molekulargewicht von 198.18g/mol. Die Summenformel lautet $C_8H_{10}N_2O_4$. Es ist wie DMOG ein 2-Oxylgluterat Analogon und hemmt die Prolylhydroxylasen beim HIF-1 Abbau (52).

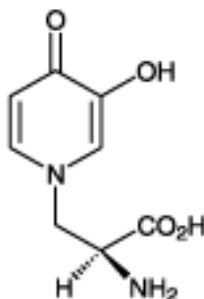


Abbildung 17: Chemische Strukturformel von L-mimosin (L-MIM) (60)

3.9. Ziel dieser Arbeit

Ziel dieser Arbeit ist es den Einfluss von „small molecules“ auf die Bildung von VEGF unter entzündlichen Bedingungen zu erforschen. Wir testeten die Hypothese, dass „small molecules“ bei der Expression von VEGF nicht an der Erhöhung der inflammatorischen Antwort beteiligt sind. Zusätzlich testeten wir, dass in parodontalen Fibroblasten „Mitogen-activated-protein“-Kinasen und „Phosphoinositide-3 Kinases“ an der Erhöhung des VEGF beteiligt sind.

4. Material und Methoden

Es wurden Fibroblasten der Gingiva und des parodontalen Ligaments mit den „small molecules“ Desferrioxamin (DFO), Dimethylalloylglycin (DMOG), L-Mimosin (L-MIM) und Kobaltchlorid (CoCl_2) - mit und ohne dem inflammatorischen Zytokin IL-1 inkubiert. Der Einfluss von „small molecules“ auf die Bildung von IL-6 und VEGF wurde mittels Immunassays gemessen. Die Frage nach der Beteiligung von intrazellulären Signalwegen wurde mittels Western Blot bestimmt.

4.1. Zellkultur

Fibroblasten des parodontalen Ligaments (PDLF) und der Gingiva (GF) wurden von extrahierten retinierten dritten Molaren gewonnen. Für jedes Experiment wurden Zellen von jeweils zumindest drei verschiedenen Spendern nach deren Zustimmung abpräpariert (Ethik Kommission NR 631/2007). Zur Zeit der Extraktion lagen bei den Spendern keine entzündlichen Prozesse in der Molarenregion vor. Weichgewebsteile der Gingiva wurden von der Zervikalregion, der des parodontalen Ligaments von der Zahnwurzel abgeschabt und kultiviert. Das Wachstum der Zellen erfolgte im Brutschrank bei 37° Celsius, 95% Luftfeuchtigkeit und 5% CO_2 gehalt.

Für die einzelnen Experimente wurden GF und PDLF in Zellkulturplatten unterschiedlicher Größe mit einer Dichte von 5×10^4 Zellen pro cm^2 angesetzt. Das Nährmedium setzte sich zusammen aus α -minimal essential medium (α - MEM), welchem 10% „fetal calf serum“

(FCS) ,100 U/mL Penicillin G, 100 Ig/mL Streptomycin und Amphotericin beigemischt wurden.

4.2. Western Blot

Für die Western Blot Analyse wurden GF und PDLF in 6-well-Platten mit den Small Molecules Desferrioxamin (300 μ M), Dimethyloxaloylglycin (100 μ M), L-Mimosin (1000 μ M), Kobaltchlorid (100 μ M) und weiters mit und ohne IL-1 (10ng/ml) in 10% „fetal calf serum“ (FCS) stimuliert. Nach 24 Stunden wurden die Überstände abgeworfen und die einzelnen „wells“ mit 1 mL PBS gewaschen. Die weitere Präparation wurde ab diesem Zeitpunkt unter kühlen Bedingungen auf Eis fortgesetzt. Es wurde SDS-Puffer mit Phosphatase Inhibitor, PMSF und Aprotinin hergestellt und pro „well“ wurden 150 μ l einpipettiert. Die Zellen wurden von den Platten abgeschabt und in Reagenzgefäße überführt. Danach wurden die Proben mittels Ultraschall für jeweils 15 Sekunden sonifiziert, anschließend für 5 Minuten auf über 95° Celsius erhitzt und bei 10 000 rpm zentrifugiert.

Für die Gel-Elektrophorese wurde die Proben mittels einer „SDS-Page“ aufgetrennt und auf eine Nitrocellulose Membran transferiert (Amersham). Die Membranen wurden mit einer Lösung, welche aus Tris Buffered Saline (TBS), 0,1% Tween-20 und 5% fettfreiem Milchpulver bestand, gesättigt. Anti-Hif-1 Antikörper , pJNK , pp38 (santa Cruz Biotechnology) wurden in einem Verhältnis 1:1000 in Tris Buffered Saline, 0,1% Tween-20 mit 5% BSA, über Nacht bei 4° Celsius verdünnt. Das Waschen der Membranen erfolgte mit TBS-Tween-20. Der primäre Antikörper wurde mit einem passenden sekundären Antikörper (Dako, Glostrup, Denmark), welcher eine „horse raddish peroxidase“ (HRP) enthielt, gebunden. Das Protein wurde mittels der „enhanced chemuluminiscence“ (ECL) Methode sichtbar gemacht. Dabei wurde die Membran mit der ECL Lösung benetzt, welche durch die HRP oxidiert wurde. Dieser Vorgang emittierte Licht, welches durch einen lichtempfindlichen Film sichtbar gemacht wurde.

4.3. Immunassay für IL-6 , VEGF

Für den Enzyme-Linked Immunosorbant Assay wurden 2 Versuchsanordnungen durchgeführt: Bei der ersten Versuchsanordnung wurden GF und PDLF in 96er-Platten angesetzt. Am darauffolgenden Tag wurden die Zellen mit Desferrioxamin (300µM), Dimethyloxaloylglycin (100µM), L-Mimosin (1000µM), Kobaltchlorid (100µM) und mit und ohne IL-1 (10ng/ml), TNF-alpha (5ng/ml), LPS (100ng/ml) in 10% „fetal calf serum“ (FCS) stimuliert. Um die Expression von IL-6 und VEGF zu messen wurden ELISA Kits (PeproTech, NJ, USA) laut Herstellerangaben angewandt. Bei der Zweiten Versuchsanordnung wurden GF und PDLF in 96er-Platten angesetzt. Am darauffolgenden Tag wurden die Zellen mit den Desferrioxamin (300µM), Dimethyloxaloylglycin (100µM), L-Mimosin (1000µM), Kobaltchlorid (100µM) und jeweils mit und ohne den MAP-K Inhibitoren SP00125 (10µM), SB00350 (10µM), in 10% „fetal calf serum“ (FCS) stimuliert. Die Überstände wurden am darauffolgenden Tag in unbeschichtete Platten transferiert und bis zu ihrer weiteren Verwendung bei -30° Celsius gelagert.

4.4. Statistische Analyse

Die Daten wurden anhand Mittelwert und Standardabweichung beschrieben. Die Daten wurden mittels Kruskal-Wallis-Test und post hoc Mann-Whitney-U-Test verglichen. Ein $p < 0.05$ wurde als statistisch signifikant akzeptiert.

5. Ergebnisse

5.1. Einfluss der small molecules auf HIF-1 α

Um den Einfluss von „small molecules“ auf Hif-1 α zu untersuchen, stimulierten wir GF und PDLF für 24 Stunden mit den „small molecules“ Desferrioxamin, Dimethyloxaloylglycin, L-Mimosin und Kobaltchlorid. Wir stellten fest, dass unter Einfluss von „small molecules“ das Vorhandensein von Hif-1 α im Zytosol mittels Immunblot nachgewiesen werden konnte. Unsere Resultate lassen darauf schließen, dass „small molecules“ Hif-1 α stabilisieren.



Abbildung 18: Immunblot für Hif- α . Die Hif-1 α Stabilisierung wurde mittels Immunblot nachgewiesen. Im Gegensatz zur unstimulierten Kontrolle, sind bei DMOG, DFO und CoCl₂ leichte „Blots“ und bei L-MIM starke „Blots“ sichtbar.



Abbildung 19: Immunblot für Hif- α . Die Hif-1 α Stabilisierung wurde mittels Immunblot nachgewiesen. Im Gegensatz zur unstimulierten Kontrolle, sind bei DMOG und CoCl₂ leichte „Blots“ und bei DFO und L-MIM starke „Blots“ sichtbar.

5.2. Einfluss der small molecules auf VEGF

Um den Einfluss der SM auf die VEGF Produktion zu untersuchen, stimulierten wir GF und PDLF mit den „small molecules“ Desferrioxamin, Dimethyloxaloylglycin, L-Mimosin und Kobaltchlorid für 24 Stunden. Die Konzentration von VEGF wurde mittels ELISA gemessen. Wir konnten zeigen, dass durch die Stimulation der Fibroblasten mittels „small molecules“, die Expression von VEGF gesteigert wurde.

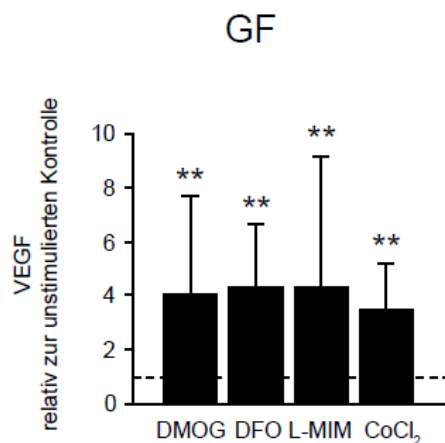


Abbildung 20: VEGF Expression GF.

Der Einfluss der SM auf die Bildung von VEGF wurde gemessen. Es wurden GF mit Desferrioxamin (300µM), Dimethyloxaloylglycin (100µM), L-Mimosin (1000µM) und Kobaltchlorid (100µM) stimuliert und die VEGF Expression mittels ELISA bestimmt.

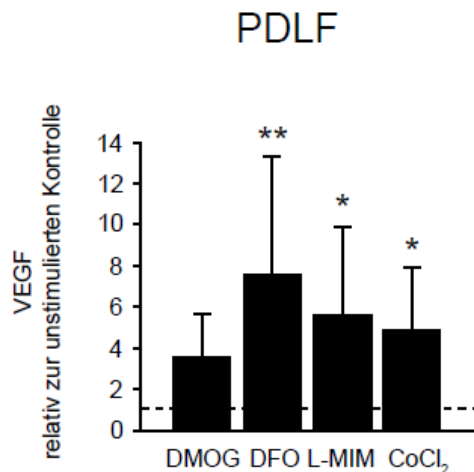


Abbildung 21: VEGF Expression von PDLF.

Der Einfluss der SM auf die Bildung von VEGF wurde gemessen. Es wurden PDLF mit Desferrioxamin (300µM), Dimethyloxaloylglycin (100µM), L-Mimosin (1000µM) und Kobaltchlorid (100µM) stimuliert und die VEGF Expression mittels ELISA bestimmt.

5.3. Einfluss der small molecules auf VEGF unter entzündlichen Bedingungen

Ein Ziel dieser Studie war es, den Einfluss von „small molecules“ auf die Bildung von VEGF auch unter entzündlichen Bedingungen zu erforschen. Daher simulierten wir in weiterer Folge mittels IL-1 einen entzündlichen Prozess. Wir inkubierten unsere GF und PDLF mit den „small molecules“ in An- und Abwesenheit von IL-1 mit einer Konzentration von 10ng/ml. Es zeigte sich, dass die Stimulation nur mit IL-1 mit einer erhöhten Expression von VEGF einherging. Jedoch war die Expression von VEGF mit IL-1 und den „small molecules“ um ein Vielfaches gesteigert. Auffallend war, dass dieser Effekt bei CoCl_2 schwächer als bei DMOG, DFO und L-MIM war. Unsere Resultate lassen darauf schließen, dass die „small molecules“ auch unter entzündlichen Bedingungen in der Lage sind die VEGF Synthese um ein Vielfaches zu steigern.

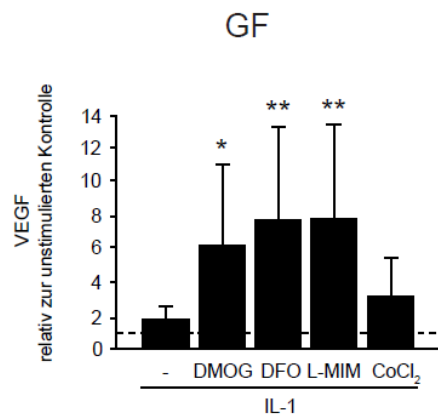


Abbildung 22: VEGF Expression von GF unter entzündlichen Bedingungen .

Die VEGF Expression von GF unter IL-1 Einfluss wurde gemessen. Es wurden PDLF mit Desferrioxamin (300 μM), Dimethyloxaloylglycin (100 μM), L-Mimosin (1000 μM) und Kobaltchlorid (100 μM) und IL-1 (10ng/ml) stimuliert. Die VEGF Expression wurde mittels ELISA bestimmt.

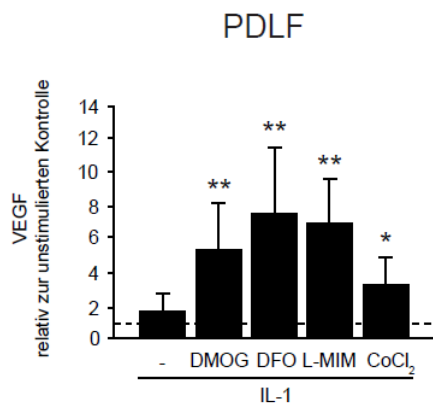


Abbildung 23: VEGF Expression von PDLF unter entzündlichen Bedingungen .

Die VEGF Expression von PDLF unter IL-1 Einfluss wurde gemessen. Es wurden PDLF mit Desferrioxamin (300 μM), Dimethyloxaloylglycin (100 μM), L-Mimosin (1000 μM) und Kobaltchlorid (100 μM) und IL-1 (10ng/ml) stimuliert. Die VEGF Expression wurde mittels ELISA bestimmt.

5.4. Einfluss der small molecules auf IL-6

Wir wollten herausfinden ob „small molecules“ ein antiinflammatorisches Potential besitzen. Daher untersuchten wir, ob die Fibroblasten durch die „small molecules“ die Expression vom inflammatorischen Zytokin IL-6 unterdrückten. Um diese Erkenntnisse über den Einfluss auf die Entzündungsreaktion zu erhalten, stimulierten wir GF und PDLF mit den small molecules und untersuchten die IL-6 Produktion. Wir stellten fest, dass diese die Expression von IL-6 nur leicht erhöhten. Auffallend war, dass unter Zugabe von L-MIM die IL-6 Produktion bei GF und PDLF stärker ausfiel als bei DMOG, DFO und CoCl_2 , was jedoch nicht signifikant war. Unsere Resultate lassen darauf schließen, dass die small molecules die VEGF-Produktion fördern, ohne dabei selbst die inflammatorische Antwort zu modulieren.

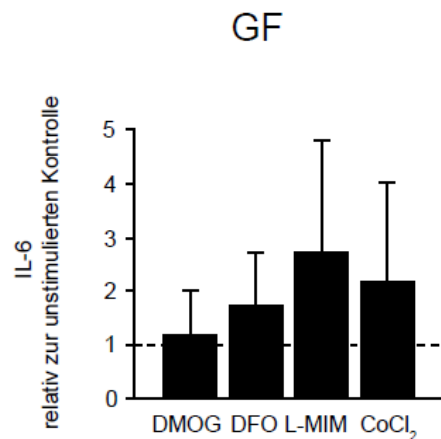


Abbildung 24: IL-6 Expression von GF .

Die IL-6 Expression von GF wurden gemessen. Es wurden GF mit Desferrioxamin ($300\mu\text{M}$), Dimethyloxaloylglycin ($100\mu\text{M}$), L-Mimosin ($1000\mu\text{M}$) und Kobaltchlorid ($100\mu\text{M}$) stimuliert. Die IL-6 Expression wurde mittels ELISA bestimmt.

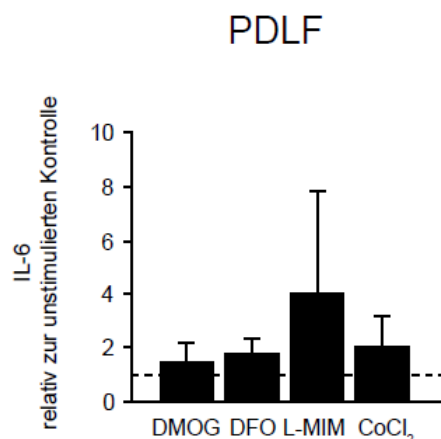


Abbildung 25: IL-6 Expression von PDLF .

Die IL-6 Expression von PDLF wurde gemessen. Es wurden GF mit Desferrioxamin ($300\mu\text{M}$), Dimethyloxaloylglycin ($100\mu\text{M}$), L-Mimosin ($1000\mu\text{M}$) und Kobaltchlorid ($100\mu\text{M}$) stimuliert. Die IL-6 Expression wurde mittels ELISA bestimmt.

5.5. Einfluss der small molecules auf IL-6 unter entzündlichen Bedingungen

Wir gingen einen Schritt weiter und untersuchten inwiefern „small molecules“ die Inflammation in einem bereits entzündlichen Milieu modulieren. Deshalb beschäftigten wir uns mit der IL-6 Produktion unter dem Einfluss von IL-1. Dafür stimulierten wir GF und PDLF mit den small molecules in An- und Abwesenheit von IL-1 mit einer Konzentration von 10ng/ml. Es zeigte sich, dass die small molecules im Gegensatz zur stimulierten Kontrolle mit IL-1 keinen Signifikanten anstieg der IL-6 Produktion hervorriefen. Das bedeutet, dass die small molecules keine Auswirkung auf die Produktion von IL-6 unter dem Einfluss von IL-1 haben. Unsere Resultate lassen darauf schließen, dass die „small molecules“ auch unter entzündlichen Bedingungen, die inflammatorische Antwort nicht modulieren.

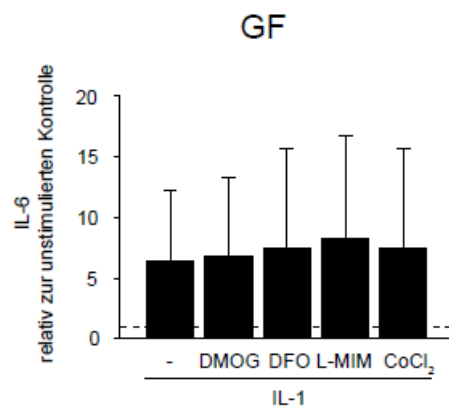


Abbildung 26: IL-6 Expression von GF unter entzündlichen Bedingungen.

Die IL-6 Expression von GF unter IL-1 Einfluss wurde gemessen. Es wurden GF mit Desferrioxamin (300µM), Dimethyloxaloylglycin (100µM), L-Mimosin (1000µM) und Kobaltchlorid (100µM) und IL-1 (10ng/ml) stimuliert. Die IL-6 Expression wurde mittels ELISA bestimmt.

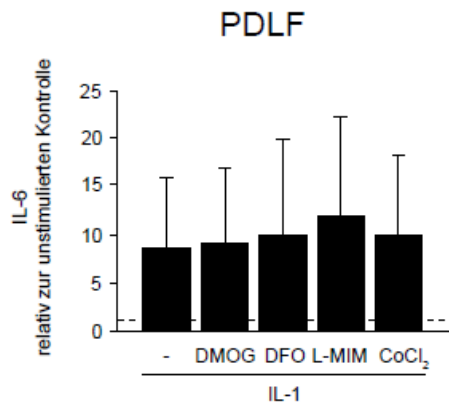


Abbildung 27: IL-6 Expression von PDLF unter entzündlichen Bedingungen.

Die IL-6 Expression von PDLF unter IL-1 Einfluss wurde gemessen. Es wurden PDLF mit Desferrioxamin (300µM), Dimethyloxaloylglycin (100µM), L-Mimosin (1000µM) und Kobaltchlorid (100µM) und IL-1 (10ng/ml) stimuliert. Die IL-6 Expression wurde mittels ELISA bestimmt.

5.6. Effekte der small molecules auf die Map-Kinasen

Um die Frage nach der Beteiligung der intrazellulären Signalwege auszuforschen, führten wir Immunblots durch. Wir stellten uns die Frage ob „small molecules“ den Map-Kinase Signalweg beeinflussen. Wir stimulierten GF und PDLF mit den „small molecules“ und testeten auf pp38, pJNK. Es zeigte sich, dass im Gegensatz zur unstimulierten Kontrolle kein Unterschied in der SDS-PAGE festgestellt werden konnte. Daher lassen unsere Resultate darauf schließen, dass „small molecules“ die Map-Kinasen pp38 und pJNK nicht aktivieren.

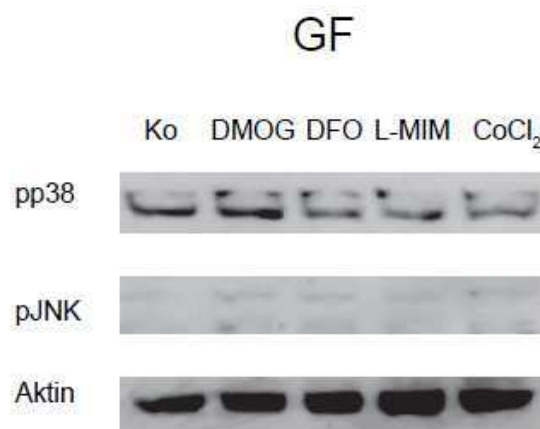


Abbildung 28: Immunblot für pp38 und pJNK bei GF.

Die intrazellulären Signalwege der MAP-Kinasen wurden mittels Western Blots untersucht. Es konnte keine Beteiligung der Signalwege unter dem Einfluss der „small molecules“ festgestellt werden. Als Kontrolle wurde Aktin verwendet.

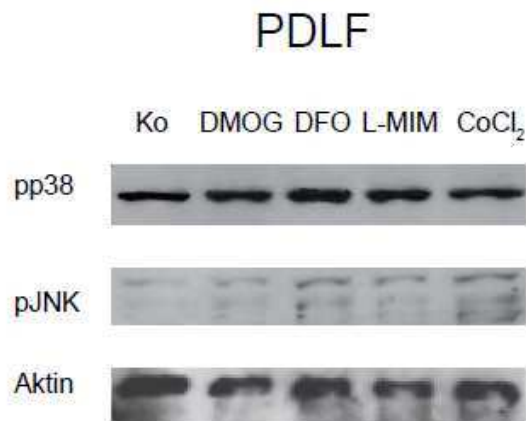


Abbildung 29: Immunblot für pp38 und pJNK bei PDLF.

Die intrazellulären Signalwege der MAP-Kinasen wurden mittels Western Blots untersucht. Es konnte keine Beteiligung der Signalwege unter dem Einfluss der „small molecules“ festgestellt werden. Als Kontrolle wurde Aktin verwendet.

Wir wollten den Einfluss der „small molecules“ auf die intrazellulären Signalwege auch unter entzündlichen Bedingungen untersuchen. Daher wurden die Experimente auch in Gegenwart von IL-1 durchgeführt. Es zeigte sich eine erhöhte Expression der Map-Kinasen, pp38 und pJNK unter Einfluss von IL-1 im Gegensatz zur unstimulierten Kontrolle. Jedoch wiesen pp38 und pJNK unter IL-1 Einfluss dieselbe Aktivität wie die IL-1 Kontrolle in der SDS-Page auf. Daher lassen diese Resultate darauf schließen, dass die „small molecules“ die Map-Kinasen pp38 und pJNK auch unter inflammatorischen Bedingungen nicht aktivieren.

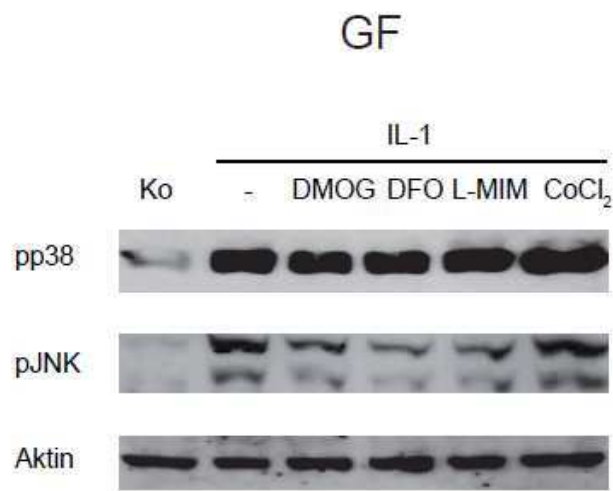


Abbildung 30: Immunblot für pp38 und pJNK bei GF.

Die intrazellulären Signalwege der MAP-Kinasen wurden mittels Western Blots untersucht. Es konnte keine Beteiligung der Signalwege unter dem Einfluss der „small molecules“ festgestellt werden. Als Kontrolle wurde Aktin verwendet.

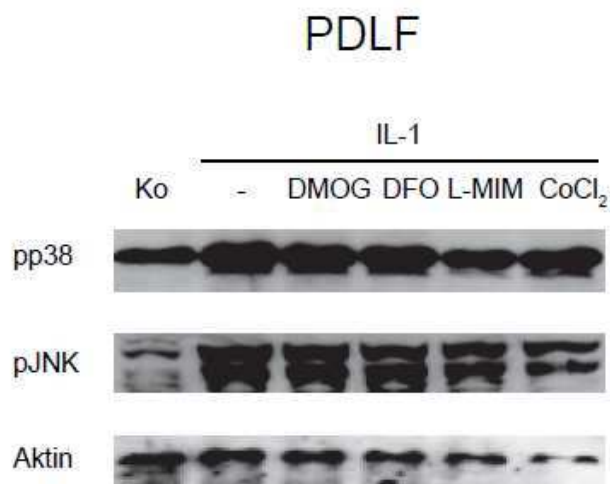


Abbildung 31: Immunblot für pp38 und pJNK bei PDLF.

Die intrazellulären Signalwege der MAP-Kinasen wurden mittels Western Blots untersucht. Es konnte keine Beteiligung der Signalwege unter dem Einfluss der „small molecules“ festgestellt werden. Als Kontrolle wurde Aktin verwendet.

5.7. VEGF Expression unter dem Einfluss der Map-Kinase Inhibitoren

Um diese Erkenntnisse über die Intrazellulären Signalwege zu festigen, fragten wir uns in welchem Zusammenhang die Expression von VEGF mit den Map-Kinasen steht. Da die Map-Kinasen durch die „small molecules“ nicht aktiviert wurden sollte die VEGF Produktion unabhängig von diesen ablaufen. Daher war es unsere Idee, die Map-Kinasen mittels spezifischer Inhibitoren zu blockieren, sodass bei einem Anstieg der VEGF Expression eine Beteiligung dieser ausgeschlossen werden konnte. Dafür inkubierten wir GF und PDLF mit den Inhibitoren von JNK (SP) und p38 (SB). Es zeigte sich, dass die VEGF-Produktion nach einer Stimulation mit den „small molecules“ auch in Gegenwart der Inhibitoren erhöht war. Auffallend war, dass unter L-MIM Zugabe bei GF die Inhibitoren die VEGF Expression signifikant gesenkt war. Hingegen war bei PDLF kein Unterschied in Gegenwart der Inhibitoren im Gegensatz zur Kontrolle feststellbar. Die Resultate lassen darauf schließen, dass die VEGF Produktion unabhängig von den Map-Kinasen p38 und JNK und in weitere Folge unabhängig von der Entzündung abläuft.

GF

| Inhibitoren | Ko | SP | SB |
|-------------------|-----------|------------|------------|
| DMOG | 1.93±0.37 | 1.48±0.28 | 1.71±0.42 |
| DFO | 3.16±0.57 | 2.77±0.49 | 2.46±0.23 |
| L-MIMO | 2.65±0.43 | 1.95±0.38* | 1.95±0.21* |
| CoCl ₂ | 2.57±0.40 | 2.05±0.19 | 2.16±0.38 |

Abbildung 32: VEGF Expression unter Zugabe der Map-Kinase Inhibitoren SP (JNK) und SB (p38) bei GF. Die Inhibitoren haben keine Auswirkung auf die VEGF Produktion unter Zugabe von DMOG , DFO und CoCl₂. Bei L-MIM wird die VEGF Produktion durch die Inhibitoren leicht gesenkt.

PDLF

| Inhibitoren | Ko | SP | SB |
|-------------------|------------|-----------|-----------|
| DMOG | 2.27±2.08 | 2.15±2.94 | 3.11±3.91 |
| DFO | 10.24±6.77 | 9.62±6.84 | 6.80±4.58 |
| L-MIMO | 7.13±4.71 | 7.99±6.47 | 5.53±3.78 |
| CoCl ₂ | 6.25±3.58 | 6.93±5.66 | 4.52±3.07 |

Abbildung 33: VEGF Expression unter Zugabe der Map-Kinase Inhibitoren SP (JNK) und SB (p38) bei PDLF. Die Inhibitoren haben keine Auswirkung auf die VEGF Produktion.

6. Diskussion

6.1. Zusammenfassung der Daten

Um den Einfluss von „small molecules“ auf Hif-1 α zu untersuchen, stimulierten wir GF und PDLF mit den „small molecules“ Desferrioxamin, Dimethyloxaloylglycin, L-Mimosin und Kobaltchlorid. Wir stellten fest, dass unter Einfluss von „small molecules“ das Vorhandensein von Hif-1 α im Zytosol mittels Immunblot nachgewiesen werden konnte. Unsere Resultate lassen darauf schließen, dass „small molecules“ Hif-1 α stabilisieren.

Wir wollten den Effekt der „small molecules“ auf die VEGF-Produktion erforschen. Es zeigte sich, dass die Inkubation der Fibroblasten mit den „small molecules“ die Expression von VEGF steigerte. Wir fragten uns welchen Einfluss die „small molecules“ auf die Bildung von VEGF unter entzündlichen Bedingungen haben. Es zeigte sich, dass auch in Gegenwart des inflammatorischen Zytokins IL-1 die Expression von VEGF gesteigert wurde. Hierbei war dieser Effekt bei DFO und L-MIM am stärksten. Da die Hypothese lautete, dass die „small molecules“ nicht an der Erhöhung der inflammatorischen Antwort beteiligt sind, untersuchten wir die Wirkung der „small molecules“ auf die Expression des inflammatorischen Zytokins IL-6. Es zeigte sich, dass die „small molecules“ keine Erhöhung der inflammatorischen Antwort bewirkten, d. h. die Freisetzung von IL-6 steigerten. Wir wollten in weiterer Folge herausfinden inwiefern „small molecules“ eine inflammatorische Antwort modulieren. Daher mussten wir die Wirkung der „small molecules“ in einem schon vorherrschenden entzündlichen Milieu untersuchen. Wir stimulierten hierfür die Fibroblasten unter Zugabe von IL-1 mit den „small molecules“ und untersuchten die IL-6 Expression. Es zeigte sich, dass unter IL-1 die Expression von IL-6 im Gegensatz zur unstimulierten Kontrolle bei GF und PDLF nicht erhöht war. Das bedeutet, dass die „small molecules“ die VEGF-Produktion fördern, ohne dabei selbst die inflammatorische Antwort zu modulieren.

Uns stellte sich nun die Frage ob die „small molecules“ eine Wirkung auf intrazelluläre Signalwege, wie *C-Jun amino-terminal kinases* (JNK) und p38-Signalweg haben. Dabei stimulierten wir GF und PDLF mit den „small molecules“ und untersuchten mit Hilfe des Immunblot-Verfahrens die phosphorylierten JNK- und p38-Signalwege. Es zeigte sich, dass im Gegensatz zur unstimulierten Kontrolle keine Modulation dieser Signalwege durch die „small molecules“ zu sehen war. Wir wollten dieses Experiment auch unter der Zugabe des proinflammatorischen Zytokins IL-1 durchführen, um festzustellen ob die „small molecules“ unter entzündlichen Bedingungen die Map-Kinasen modulieren. Hier zeigte sich wiederum

kein Unterschied im Gegensatz zur Kontrolle. Daraus lässt sich schließen, dass die mittels „small molecules“ gesteigerte VEGF Produktion nicht über diese entzündungsabhängigen Signalwege ablaufen. Um diese Erkenntnisse zu festigen, blockierten wir die Map-Kinasen mittels spezifischer Inhibitoren und untersuchten die VEGF Expression. Es zeigte sich, dass die Inhibitoren keine Auswirkung auf die VEGF Produktion unter DMOG, DFO und CoCl_2 hatten. Jedoch verringerten die Inhibitoren bei GF die L-MIM induzierte VEGF Expression. Unsere Resultate lassen darauf schließen, dass „small molecules“ ein Potential besitzen die VEGF Expression zu steigern ohne dabei selbst die Produktion von inflammatorischen Zytokinen zu fördern. Die Map-Kinasen (JNK und p38) scheinen nicht an der „small molecules“ abhängigen VEGF Expression beteiligt zu sein.

6.2. Aktuelle Studienlage

Im Vergleich zu anderen Studien stimmen die Ergebnisse unserer Experimente Großteils überein. DMOG, DFO, L-MIM können über HIF-1 die VEGF Expression steigern und damit die Vaskularisation und Callus-Bildung in frakturierten Mäuseknochen erhöhen (52). In einem anderen Mäusemodell konnte DMOG die Regeneration und Vaskularisation von Muskelgewebe in ischämischen Gliedmaßen erhöhen (61). In Epithelzellen des Alveolarfortsatzes simuliert CoCl_2 eine Hypoxie und steigerte die VEGF Produktion (62). Entgegen unseren Ergebnissen, steigert in einer Studie an menschlichen fötalen intestinalen Epithelzellen DFO das Zytokin IL-6 bei einer Konzentration von 1mM. Die VEGF Expression wird als ein JNK und p38 abhängiger Mechanismus angesehen, was jedoch nicht mit unseren Daten in Einklang steht (63). Dies kann einerseits auf die Konzentration von DFO zurückzuführen sein. In unserer Studie führten wir die Experimente mit DFO unter einer Konzentration von 300 μM durch. Es könnte sein das DFO erst unter höheren Konzentrationen ein proinflammatorisches Potential besitzt. Andererseits verwendeten wir Gegensatz zur oben genannten Studie primäre Zellen, welche ein anderes Reaktionsverhalten aufweisen.

In einer Studie über die Auswirkung von CoCl_2 auf Epithelzellen der Zelllinie TR141, steigert CoCl_2 nicht die IL-6 Expression bei einer Konzentration von 100 μM . Erst ab toxischen Konzentrationen von 5mM und höher wird die IL-6 Expression stetig gesteigert (64). Dies steht in Einklang mit unseren Experimenten und bestätigt damit, dass CoCl_2 das proinflammatorische Zytokin IL-6 nicht erhöht. Für L-MIM und DMOG liegen derzeit noch keine Studien bezüglich der IL-6 Expression unter entzündlichen Bedingungen vor. Eine

weiter Studie, die sich ebenfalls mit der Involvierung der Map-Kinasen bei einer durch Hypoxie stimulierten VEGF Expression beschäftigte, konnte zeigen, dass die VEGF Produktion in Chondrozyten durch den p38 Inhibitor vermindert wurde. Jedoch war dies durch den JNK Inhibitor, was wiederum mit unseren Experimenten übereinstimmt, nicht vermindert (65). Bei dieser Studie wurde jedoch die Hypoxie durch Sauerstoffentzug in einem Inkubator simuliert. Eine Beteiligung der „small molecules“ kann daher nicht nachempfunden werden. Unsere Studie bestätigt den bisherigen Stand der Forschung nur teilweise. „Small molecules“ sind in der Lage die VEGF Expression zu erhöhen. Um zu klären inwiefern sie die Entzündungsreaktion modulieren, werden zusätzliche Untersuchungen nötig sein.

6.3. Limitierung der Studie

Diese Studie zeigt die Wirkung der „small molecules“ auf Fibroblasten unter entzündlichen Bedingungen in vitro. Das menschliche Parodont stellt ein komplexes Gefüge dar, welches sich daher nur unzureichend in Laborstudien wiedergeben lässt. IL-1, IL-6 und TNF- α sind wichtige Zytokine die im Rahmen einer Parodontitis und Periimplantitis die Pathogenese stark beeinflussen.(1, 3) Jedoch gibt es weitaus mehr Zytokine die an diesen Erkrankungen beteiligt sind. Die inflammatorischen Bedingungen und Antworten werden in dieser Arbeit durch die Zytokine IL-1 und IL-6 isoliert behandelt. Eine Inflammation besteht jedoch aus einer enorm großen Anzahl an Faktoren und deren Zusammenspiel ist viel komplexer als in der von uns präsentierten Studie (24). So sind Fibroblasten jene Zellen, welche die Aufgabe haben, gewebesaufbauende und gewebesabbauende Prozesse in einer Homöostase zu halten. Diese agieren jedoch in einem heterogenen Organismus, welcher aus vielen anderen Zellpopulationen besteht (4). Es wurde im Rahmen dieser Arbeit auch nicht geklärt wie „small molecules“ auf andere Komponenten des Körpers, wie beispielsweise der Abwehr, wirken. Dadurch lassen sich nur begrenzt Aussagen über das womögliche Verhalten der „small molecules“ auf das parodontale und periimplantäre Gewebe machen.

6.4. Klinische Relevanz

Diese Erkenntnisse zeigen die in vitro Wirkung der „small molecules“ auf die VEGF Produktion. Die Bedeutung der „small molecules“ für den klinischen Alltag ist nach den

aktuellen Standpunkten ungewiss. Die Tatsache, dass die Expression von VEGF auch unter entzündlichen Bedingungen ablaufen kann, ohne dabei selbst die Entzündung zu steigern ist spannend. Die Idee der potentiellen Nutzung der „small molecules“ in der Gewebsregeneration ist interessant. Dadurch könnte die Produktion lokal körpereigener angiogener Signalmoleküle gefördert werden, ohne dabei die Inflammation zu steigern. In weiterer Folge würden angiogene Faktoren direkt und kostengünstig am Gewebsdefekt von den Zellen selbst erzeugt werden. Es wäre interessant ob diese Erkenntnisse eine Relevanz im klinischen Alltag erfahren könnten.

6.5. Offene Fragen

Jedoch bleiben noch einige Fragen nach der Durchführung der Versuche offen. Eine Förderung der Wundheilung kann nicht einfach mit einer Erhöhung der VEGF-Produktion im Gewebe gewährleistet werden. Das Parodont ist ein komplexes Gefüge aus bindegewebsartigen Befestigungsstrukturen, epithelialen Haftstrukturen und Abwehrzellen. Letztere vor allem bei einer Parodontitis durch erhöhte Plaqueakkumulation und damit erhöhter Bakterienzahl um ein Vielfaches im Saumepithel und umliegenden Gewebe aufzufinden sind (1, 3, 11). Da in diesem Falle die Vaskularisation durch einen stark entzündlichen Prozess erhöht ist und die Zahl der Abwehrzellen im Gewebe stark zunimmt ist es fraglich, ob eine weitere Erhöhung des VEGF und damit ein weiteres Einwandern von Abwehrzellen überhaupt die Wundheilung fördert. Die Förderung dieses Prozesses könnte sogar eine Parodontitis beschleunigen und damit mehr Schaden als Nutzen anrichten. Es stellt sich überhaupt die Frage ob und inwiefern im Falle einer Gewebsregeneration, bei der im Allgemeinen die VEGF Produktion erhöht ist, eine weitere Erhöhung dieses Faktors überhaupt möglich und notwendig ist. Um diese Fragen zu beantworten wären weitere präklinische Studien sinnvoll.

Einige „small molecules“ finden bereits im klinischen Alltag systemische therapeutische Anwendung. So werden diese bei akuten Eisenvergiftungen sowie bei aplastischen Anämien, Hämochromatose und Thalassämien als Chelatoren eingesetzt (55). Im Falle einer Parodontitis und Periimplantitis wäre eine lokale Applikation einer systemischen vorzuziehen. Die Erforschung einer Trägermatrix, welche die „small molecules“ kontrolliert und stetig freisetzt wäre sinnvoll. Insbesondere die damit Verbundene Kombination von Wachstumsfaktoren (z.B. PDGF-BB) oder dem Schmelzmatrixprotein-Derivat Emdogain® wäre als eine

therapeutische Strategie in Erwägung zu ziehen. Inwiefern Wechselwirkungen mit anderen Stoffen bzw. Medikamenten bestehen, sollte im Rahmen weiterer Studien geklärt werden.

Ein weiterer Aspekt betrifft die Hartgewebsregeneration. Es wurde beobachtet, dass „small molecules“ die Vaskularität und Knochendichte im Mäusemodell steigern (52). Da bei einer Parodontitis und Periimplantitis auch das Hartgewebe stark abgebaut wird, könnte man diese Eigenschaft auch für die Gewebsregeneration nützen. Hierfür wären weitere Untersuchungen sinnvoll. Um diese offenen Fragestellungen zu klären und die „small molecules“ als eine erfolgreiche Therapieoption zu etablieren, werden weitere Studien nötig sein.

6.6. Konklusion

Unsere Daten zeigen, dass „small molecules“ die VEGF-Produktion in Fibroblasten des Parodonts steigern können, ohne dabei selbst die Entzündungsreaktion zu fördern. Infolge der Stabilisierung des Hif-1 α Komplexes durch die „small molecules“ könnte die Produktion lokal körpereigener gewebsaufbauender Signalmoleküle gefördert werden. Dies könnte bei einer Parodontitis und Periimplantitis, welche von starkem Gewebsabbau gekennzeichnet sind, von Vorteil sein. Durch die „small molecules“ induzierte Expression des Wachstumsfaktors VEGF und die damit verbundene gesteigerte Angiogenese, könnte gleichzeitig der Gewebsaufbau im Parodont gefördert werden. Um diese Erkenntnisse auch in vivo bestätigen zu können, werden weiterführende präklinische Studien vonnöten sein.

7. Literaturverzeichnis

1. Herbert F. Wolf , Edith M. Rateitschak KHR. Farbatlant der Zahnmedizin, Bd.1, Parodontologie. 3. , vollständig Überarbeitete Auflage ed2004.
2. Müller H-P. Parodontologie: Georg Thieme Verlag, Stuttgart , New York; 2001.
3. Müller H-P. Checklisten der Zahnmedizin - Parodontologie: Georg Thieme Verlag, Stuttgart , New York; 2001.
4. Junqueira L CJ, Gratzl M. Histologie. 6. Auflage ed: Heidelberg: Springer Medizin Verlag; 2004.
5. Sundararaj KP, Samuvel DJ, Li Y, Sanders JJ, Lopes-Virella MF, Huang Y. Interleukin-6 released from fibroblasts is essential for up-regulation of matrix metalloproteinase-1 expression by U937 macrophages in coculture: cross-talking between fibroblasts and U937 macrophages exposed to high glucose. *J Biol Chem.* 2009 May;284(20):13714-24.
6. Werner Böcker HD, Philipp U. Heitz, Holger Moch. Pathologie. 4. Auflage ed: Urban & Fischer Verlag/Elsevier GmbH; 2008.
7. Zhang J, Kashket S, Lingström P. Evidence for the early onset of gingival inflammation following short-term plaque accumulation. *J Clin Periodontol.* 2002 Dec;29(12):1082-5.
8. Deinzer R, Weik U, Kolb-Bachofen V, Herforth A. Comparison of experimental gingivitis with persistent gingivitis: differences in clinical parameters and cytokine concentrations. *J Periodontal Res.* 2007 Aug;42(4):318-24.
9. Wiebe SH, Hafezi M, Sandhu HS, Sims SM, Dixon SJ. Osteoclast activation in inflammatory periodontal diseases. *Oral Dis.* 1996 Jun;2(2):167-80.
10. Van Dyke TE, Serhan CN. Resolution of inflammation: a new paradigm for the pathogenesis of periodontal diseases. *J Dent Res.* 2003 Feb;82(2):82-90.
11. Heidemann D. Parodontologie: Praxis der Zahnheilkunde Band 4. 4. Auflage ed: Urban & Fischer Verlag/Elsevier GmbH; 2005.
12. Berglundh T, Gislason O, Lekholm U, Sennerby L, Lindhe J. Histopathological observations of human periimplantitis lesions. *J Clin Periodontol.* 2004 May;31(5):341-7.
13. Zitzmann NU, Berglundh T, Marinello CP, Lindhe J. Experimental peri-implant mucositis in man. *J Clin Periodontol.* 2001 Jun;28(6):517-23.
14. Zitzmann NU, Berglundh T. Definition and prevalence of peri-implant diseases. *J Clin Periodontol.* 2008 Sep;35(8 Suppl):286-91.
15. Azzeh MM. Er,Cr:YSGG laser-assisted surgical treatment of peri-implantitis with 1-year reentry and 18-month follow-up. *J Periodontol.* 2008 Oct;79(10):2000-5.

16. Kinane DF. Causation and pathogenesis of periodontal disease. *Periodontol* 2000. 2001;25:8-20.
17. Eugene Braunwald DLK, Stephen Hauser, Dan L. Longo , J. Larry Jameson, Joseph Loscalzo. *Harrison's Principles of Internal Medicine*. 17th Edition ed: McGraw-Hill Professional; 2008.
18. Stefan Silbernagl RK, Hans-Christian Pape. *Pysiologie*. 5., komplett überarbeitete Auflage ed: Georg Thieme Verlag, Stuttgart - New York; 2005.
19. Okada H, Murakami S. Cytokine expression in periodontal health and disease. *Crit Rev Oral Biol Med*. 1998;9(3):248-66.
20. Gamonal J, Acevedo A, Bascones A, Jorge O, Silva A. Levels of interleukin-1 beta, -8, and -10 and RANTES in gingival crevicular fluid and cell populations in adult periodontitis patients and the effect of periodontal treatment. *J Periodontol*. 2000 Oct;71(10):1535-45.
21. Havemose-Poulsen A, Holmstrup P. Factors affecting IL-1-mediated collagen metabolism by fibroblasts and the pathogenesis of periodontal disease: a review of the literature. *Crit Rev Oral Biol Med*. 1997;8(2):217-36.
22. Arend WP. The balance between IL-1 and IL-1Ra in disease. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2002 2002 Aug-Oct;13(4-5):323-40.
23. Hazuda DJ, Lee JC, Young PR. The kinetics of interleukin 1 secretion from activated monocytes. Differences between interleukin 1 alpha and interleukin 1 beta. *J Biol Chem*. 1988 Jun;263(17):8473-9.
24. Gemmell E, Marshall RI, Seymour GJ. Cytokines and prostaglandins in immune homeostasis and tissue destruction in periodontal disease. *Periodontol* 2000. 1997 Jun;14:112-43.
25. Tsai CC, Ho YP, Chen CC. Levels of interleukin-1 beta and interleukin-8 in gingival crevicular fluids in adult periodontitis. *J Periodontol*. 1995 Oct;66(10):852-9.
26. Nishimoto N, Kishimoto T. Interleukin 6: from bench to bedside. *Nat Clin Pract Rheumatol*. 2006 Nov;2(11):619-26.
27. Akira S, Kishimoto T. Role of interleukin-6 in macrophage function. *Curr Opin Hematol*. 1996 Jan;3(1):87-93.
28. Kholodenko BN, Birtwistle MR. Four-dimensional dynamics of MAPK information processing systems. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med*. 2009 2009 Jul-Aug;1(1):28-44.
29. Chang L, Karin M. Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature*. 2001 Mar;410(6824):37-40.
30. Pocrnich CE, Liu H, Feng M, Peng T, Feng Q, Hutnik CM. p38 mitogen-activated protein kinase protects human retinal pigment epithelial cells exposed to oxidative stress. *Can J Ophthalmol*. 2009 Aug;44(4):431-6.

31. Johnson GL, Lapadat R. Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. *Science*. 2002 Dec;298(5600):1911-2.
32. Dérillard B, Hibi M, Wu IH, Barrett T, Su B, Deng T, et al. JNK1: a protein kinase stimulated by UV light and Ha-Ras that binds and phosphorylates the c-Jun activation domain. *Cell*. 1994 Mar;76(6):1025-37.
33. Cui J, Zhang M, Zhang YQ, Xu ZH. JNK pathway: diseases and therapeutic potential. *Acta Pharmacol Sin*. 2007 May;28(5):601-8.
34. Ono K, Han J. The p38 signal transduction pathway: activation and function. *Cell Signal*. 2000 Jan;12(1):1-13.
35. Ashwell JD. The many paths to p38 mitogen-activated protein kinase activation in the immune system. *Nat Rev Immunol*. 2006 Jul;6(7):532-40.
36. Kumar S, McDonnell PC, Gum RJ, Hand AT, Lee JC, Young PR. Novel homologues of CSBP/p38 MAP kinase: activation, substrate specificity and sensitivity to inhibition by pyridinyl imidazoles. *Biochem Biophys Res Commun*. 1997 Jun;235(3):533-8.
37. Knowles HJ, Athanasou NA. Hypoxia-inducible factor is expressed in giant cell tumour of bone and mediates paracrine effects of hypoxia on monocyte-osteoclast differentiation via induction of VEGF. *J Pathol*. 2008 May;215(1):56-66.
38. Arnett TR, Gibbons DC, Utting JC, Orriss IR, Hoebertz A, Rosendaal M, et al. Hypoxia is a major stimulator of osteoclast formation and bone resorption. *J Cell Physiol*. 2003 Jul;196(1):2-8.
39. Perez-Amodio S, Tra WM, Rakhorst HA, Hovius SE, van Neck JW. Hypoxia Preconditioning of Tissue-Engineered Mucosa Enhances Its Angiogenic Capacity In Vitro. *Tissue Eng Part A*. 2011 Mar.
40. Jaakkola P, Mole DR, Tian YM, Wilson MI, Gielbert J, Gaskell SJ, et al. Targeting of HIF-alpha to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O2-regulated prolyl hydroxylation. *Science*. 2001 Apr;292(5516):468-72.
41. Araldi E, Schipani E. Hypoxia, HIFs and bone development. *Bone*. 2010 Aug;47(2):190-6.
42. Mahon PC, Hirota K, Semenza GL. FIH-1: a novel protein that interacts with HIF-1alpha and VHL to mediate repression of HIF-1 transcriptional activity. *Genes Dev*. 2001 Oct;15(20):2675-86.
43. Ivan M, Kondo K, Yang H, Kim W, Valiando J, Ohh M, et al. HIFalpha targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O2 sensing. *Science*. 2001 Apr;292(5516):464-8.
44. Cash TP, Pan Y, Simon MC. Reactive oxygen species and cellular oxygen sensing. *Free Radic Biol Med*. 2007 Nov;43(9):1219-25.

45. Kowanetz M, Ferrara N. Vascular endothelial growth factor signaling pathways: therapeutic perspective. *Clin Cancer Res.* 2006 Sep;12(17):5018-22.
46. Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med.* 2003 Jun;9(6):669-76.
47. Dor Y, Porat R, Keshet E. Vascular endothelial growth factor and vascular adjustments to perturbations in oxygen homeostasis. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2001 Jun;280(6):C1367-74.
48. Ferrara N. VEGF-A: a critical regulator of blood vessel growth. *Eur Cytokine Netw.* 2009 Dec;20(4):158-63.
49. Gerber HP, Ferrara N. Pharmacology and pharmacodynamics of bevacizumab as monotherapy or in combination with cytotoxic therapy in preclinical studies. *Cancer Res.* 2005 Feb;65(3):671-80.
50. Templeton DM, Liu Y. Genetic regulation of cell function in response to iron overload or chelation. *Biochim Biophys Acta.* 2003 Jan;1619(2):113-24.
51. Botusan IR, Sunkari VG, Savu O, Catrina AI, Grünler J, Lindberg S, et al. Stabilization of HIF-1alpha is critical to improve wound healing in diabetic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008 Dec;105(49):19426-31.
52. Shen X, Wan C, Ramaswamy G, Mavalli M, Wang Y, Duvall CL, et al. Prolyl hydroxylase inhibitors increase neoangiogenesis and callus formation following femur fracture in mice. *J Orthop Res.* 2009 Oct;27(10):1298-305.
53. Yuan Y, Hilliard G, Ferguson T, Millhorn DE. Cobalt inhibits the interaction between hypoxia-inducible factor-alpha and von Hippel-Lindau protein by direct binding to hypoxia-inducible factor-alpha. *J Biol Chem.* 2003 May;278(18):15911-6.
54. Yuan Y, Beitner-Johnson D, Millhorn DE. Hypoxia-inducible factor 2alpha binds to cobalt in vitro. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001 Nov;288(4):849-54.
55. Cianciulli P, Sorrentino F, Maffei L, Amadori S. Continuous low-dose subcutaneous desferrioxamine (DFO) to prevent allergic manifestations in patients with iron overload. *Ann Hematol.* 1996 Dec;73(6):279-81.
56. Beerepoot LV, Shima DT, Kuroki M, Yeo KT, Voest EE. Up-regulation of vascular endothelial growth factor production by iron chelators. *Cancer Res.* 1996 Aug;56(16):3747-51.
57. Inc. WF. Available from: www.wikipedia.org.
58. Guo M, Song LP, Jiang Y, Liu W, Yu Y, Chen GQ. Hypoxia-mimetic agents desferrioxamine and cobalt chloride induce leukemic cell apoptosis through different hypoxia-inducible factor-1alpha independent mechanisms. *Apoptosis.* 2006 Jan;11(1):67-77.
59. Company CC. Available from: <http://www.caymanchem.com>.

60. Inc. ELS. Available from: <http://www.enzolifesciences.com>.
61. Milkiewicz M, Pugh CW, Egginton S. Inhibition of endogenous HIF inactivation induces angiogenesis in ischaemic skeletal muscles of mice. *J Physiol*. 2004 Oct;560(Pt 1):21-6.
62. Pham I, Uchida T, Planes C, Ware LB, Kaner R, Matthay MA, et al. Hypoxia upregulates VEGF expression in alveolar epithelial cells in vitro and in vivo. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2002 Nov;283(5):L1133-42.
63. Markel TA, Crisostomo PR, Wang M, Herring CM, Lahm T, Meldrum KK, et al. Iron chelation acutely stimulates fetal human intestinal cell production of IL-6 and VEGF while decreasing HGF: the roles of p38, ERK, and JNK MAPK signaling. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2007 Apr;292(4):G958-63.
64. Schmalz G, Schweikl H, Hiller KA. Release of prostaglandin E2, IL-6 and IL-8 from human oral epithelial culture models after exposure to compounds of dental materials. *Eur J Oral Sci*. 2000 Oct;108(5):442-8.
65. Murata M, Yudoh K, Nakamura H, Kato T, Inoue K, Chiba J, et al. Distinct signaling pathways are involved in hypoxia- and IL-1-induced VEGF expression in human articular chondrocytes. *J Orthop Res*. 2006 Jul;24(7):1544-54.
66. Loe H, Theilade E, Jensen SB. Experimental gingivitis in man. *J Periodontol*. 1965 May-Jun;36:177-87.

8. Abkürzungsverzeichnis

CoCl₂ Kobaltchlorid

DFO Desferrioxamin

DMOG Dimethyloxaloylglycin

ELISA Enzyme-linked Immunosorbent Assay

ERK extracellular signal-related kinases

FCS Fetal calf serum, Fötales Kälberserum

FGF Fibroblast Growth Factor, Fibroblasten-Wachstumsfaktor

FIH Factor inhibiting HIF

GF Gingival fibroblasts, Fibroblasten der Gingiva

HIF-1 Hypoxia-inducible factor-1

ICE IL-1- β -converting enzyme

IL-1 β Interleukin-1 β

IL-1 Ra IL-1 Rezeptor-Antagonist

IL-6 Interleukin-6

JNK C-Jun amino-terminal kinases

kDa Kilodalton

L-MIM L-Mimosin

LPS Lipopolysaccharide

M Makrophage

MAPK Mitogenaktivierte Proteinkinase

MMP Matrix-Metalloproteinasen

mRNA messenger Ribonukleinsäure

p38 p38 Kinase

PDL Periodontal ligament, parodontales Ligament

PDLF Periodontal ligament fibroblasts, Fibroblasten des parodontalen Ligaments

PDGF Platled derived growth factor, Blutplättchenwachstumsfaktor

PGE₂ Prostaglandin E₂

PHD Prolyhydroxylase

PNM polymorphnuclear cell , neutrophiler granulozyt

pVHL Von Hippel-Lindau Protein

SM small molecules

TGF β Transforming growth factor β , Transformierender Wachstumsfaktor β

TNF- α Tumornekrosefaktor- α

Ub Ubiquitinierung

VEGF Vascular endothelial growth factor