

Diplomarbeit

Toll-like Rezeptoren

in der Pathogenese der Parodontitis in vitro

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktorin der Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde
(Dr. med. dent.)

an der

Medizinischen Universität Wien

ausgeführt an der

Abteilung für Parodontologie und Prophylaxe
der Bernhard Gottlieb Universitätszahnklinik

unter der Anleitung von

Univ. Doz. DDr. Xiaohui Rausch-Fan

eingereicht von

Sandra Barbara Ertlschweiger

Mat.Nr.: 9704943

Wiesberggasse 2/22, 1160 Wien

Ort, Datum

.....
(Unterschrift)

Danksagung

Ich möchte mich an dieser Stelle bei den Personen bedanken, die durch ihre fachliche und persönliche Unterstützung zum Gelingen dieser Diplomarbeit beigetragen haben:

Frau Univ. Doz. DDr. Xiaohui Rausch-Fan möchte ich für die Betreuung meiner Diplomarbeit und den zahlreichen wissenschaftlichen Ratschläge, welche stets zur Verbesserung der Arbeit beigetragen haben, herzlich Danke sagen.

Bei Frau Mag. Alexandra Meinel möchte ich mich für die Bereitstellung eines Teiles ihrer Daten bedanken und Herrn Dr. Kambis Sadeghi gebührt großer Dank für die Geduld die er mir bei der Methodenetablierung der Real-Time-PCR entgegenbrachte.

Weiterer Dank gilt Frau Phuong Quynh Nguyen und Herrn Mag. Alexander Franz.

Bedanken möchte ich mich auch bei Herrn Univ. Prof. DDr. Michael Matejka, der es mir ermöglichte, meine Diplomarbeit an seiner Abteilung für Parodontologie und Prophylaxe, an der Bernhard Gottlieb Universitätszahnklinik GmbH, zu verwirklichen.

Besonderer Dank gilt meinem Ehemann Rouven Ertlschweiger der mich in vielfältiger, liebevoller Weise während meines Studiums unterstützte.

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	5
2	Abstract	7
3	Einleitung	9
3.1	Die Pathogenese der Parodontitis	10
3.1.1	Das Keimspektrum der Mundhöhle	11
3.1.2	Parodontitis und Allgemeinerkrankungen	13
3.2	Das Immunsystem	15
3.2.1	Das angeborene und spezifische Immunsystem – ein Überblick	15
3.2.1.1	Pathogen-Associated Molecular Pattern (PAMP)	16
3.2.1.2	Pattern Recognition Receptors (PRR)	16
3.3	Toll-like Rezeptoren	19
3.3.1	Toll in Drosophila	19
3.3.2	Toll-like Rezeptoren (TLR)	20
3.3.3	TLR Signaltransduktion	23
3.3.3.1	MyD88-abhängige Signaltransduktion	23
3.3.3.2	MyD88-unabhängige Signaltransduktion	26
3.3.4	Die Rolle von TLR in der Parodontitis	27
3.3.4.1	Interaktion zwischen LPS und TLR	29
3.3.4.1.1	Cluster of differentiation 14	30
3.3.4.1.2	LPS-bindendes Protein (LBP)	30
3.4	Porphyromonas gingivalis	31
3.4.1	Virulenzfaktoren von Pg	32
3.4.1.1	Lipopolysaccharid (LPS)	32
3.4.1.1.1	Wirkung des LPS	34
3.4.1.2	Fimbrien	35
3.4.1.3	Proteasen	36
3.4.1.4	Hämolysin	37
4	Fragestellung	38
5	Studiendesign	39
6	Material und Methoden	40

6.1	Zellen und Zellkultur	40
6.1.1	Zellstimulation	41
6.2	RNA Isolierung	42
6.2.1	Gelelektrophorese	43
6.3	Reverse Transkription	43
6.4	Real-Time-PCR (RT-PCR)	45
6.4.1	TaqMan®-Sonden	46
6.4.1.1	Probenbearbeitung	47
7	Resultate	48
7.1	Expression von TLR2, TLR4 und CD14 nach Stimulation mit unterschiedlichen Konzentrationen von Pg-LPS und E. coli-LPS	49
7.1.1	Humane Gingivafibroblasten	49
7.1.2	Humane Periodontalligamentzellen	50
7.1.3	PBMCs	51
7.2	Vergleich der Rezeptorenexpression zwischen hGFB, hPDL und PBMCs	52
7.2.1	TLR2	52
7.2.2	TLR4	53
7.2.3	CD14	54
8	Diskussion	55
9	Conclusio	59
10	Abbildungsverzeichnis	61
11	Literaturverzeichnis	62
12	Abkürzungsverzeichnis	75
13	Curriculum Vitae	77

1 Zusammenfassung

Background: Toll-like Rezeptoren spielen eine wichtige Rolle in der natürlichen Immunabwehr. Sie können Pathogene erkennen und Signale ins Zellinnere weiterleiten. Daraufhin erfolgt die Stimulation dieser Zelle, die zur Produktion von Entzündungsmediatoren führt. Parodontitis ist eine chronische Entzündung des Zahnhalteapparates und *Porphyromonas gingivalis* gilt als Leitkeim der chronischen Form dieser Erkrankung. Lipopolysaccharid (LPS) von *Porphyromonas gingivalis* bindet an Toll-like Rezeptor 2 (TLR2), Toll-like Rezeptor 4 (TLR4) und CD14.

Ziele: In einem *in vitro* Zellkulturmodell wurde die lokale Immunantwort mit der systemischen verglichen. Humane Gingivafibroblasten und humane Periodontalligamentzellen wurden stellvertretend für die lokale Immunreaktion ausgewählt, Peripheral Blood Mononuclear Cells für die systemische. Die Expression von TLR2, TLR4 und CD14 wurde nach Stimulation mit LPS von *Porphyromonas gingivalis* (*Pg*) und *Escherichia coli* (*E. coli*) gemessen. Die Ergebnisse sollten Rückschlüsse auf mögliche Unterschiede zwischen lokaler und systemischer Immunantwort aufzeigen. Dazu stellte sich die Frage, ob es eine Korrelation zwischen *Pg*-LPS und *E. coli*-LPS gibt.

Materialien and Methoden: Primärzellen von humanen Gingivafibroblasten (hGFB) und humanen Periodontalligamentzellen (hPDL) wurden kultiviert, ebenso Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMCs) entnommen und mit LPS von *Pg* und *E. coli* in aufsteigender Konzentration stimuliert. Aus den erhaltenen Proben wurde RNA isoliert und diese durch Reverse Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Mittels anschließender Real-Time-PCR wurde die Expression von TLR2, TLR4 und CD14 untersucht.

Resultate: Die lokale Immunantwort in hGFB und hPDL zeigt, dass LPS vor allem über TLR2 gebunden wird. In hGFB werden TLR4 und CD14 annähernd gleich hochreguliert, generell erscheinen die Ergebnisse hier am schwächsten. hPDL zeigen in TLR2 und TLR4 die höchsten Expressionen. Systemisch, in PBMCs, wird LPS vor allem an CD14 gebunden, gefolgt von TLR2 und TLR4.

LPS von *E. coli* kann Zellen des Parodonts, *Pg*-LPS kann PBMCs stimulieren. Das Endotoxin

von *E. coli* zeigt stärkere Wirkung als jenes von *Pg*. In hGFB und PBMCs kommt es mit steigender *E. coli*-LPS Konzentration zu höheren Rezeptorenexpressionen. Im Gegensatz dazu zeigt sich in hPDL eine Regression.

Conclusio: In der hier durchgeführten *in vitro* Studie wurde die lokale Immunantwort in hGFB und hPDL *via* TLR2 aktiviert. hPDL reagieren am stärksten auf die Stimulierung mit LPS von *Pg* und *E. coli*. CD14 wird vor allem von PBMCs hochreguliert und spielt somit für die systemische Immunantwort eine wichtige Rolle. LPS von *E. coli* verursacht höhere Expressionswerte als LPS von *Pg*.

2 Abstract

Background: Toll-like receptors play an important role in the natural immune response. They are able to recognize pathogens and transmit signals to the inner cell. This causes the stimulation of the cell, which further leads to the production of pro-inflammatory mediators. Periodontitis is a chronic infection of the tissues that surround and support the teeth. *Porphyromonas gingivalis* is considered the main pathogenic organism in the chronic course of this disease. The lipopolysaccharides (LPS) of *Porphyromonas gingivalis* bind to the toll-like receptor 2, toll-like receptor 4 and CD14.

Aims: In an *in vitro* cell culture, the local immune response was compared to the systemic response. Human gingival fibroblasts and human periodontal ligament cells were chosen to represent the local response, whereas for the systemic response, peripheral blood mononuclear cells were selected. After stimulation with LPS of *Porphyromonas gingivalis* (*Pg*) and *Escherichia coli* (*E. coli*), the expression of TLR2, TLR4 and CD14 was measured. The results should point out possible differences between the local and systemic immune response. Further, a correlation between *Pg*-LPS and *E. coli*-LPS was researched.

Materials and methods: Primary cells of human gingival fibroblasts (hGFB) and human periodontal ligament cells (hPDL) were cultivated and peripheral blood nuclear cells (PBMCs) drawn and subsequently stimulated with increasing concentrations of LPS of *Pg* and *E. coli*. RNA was isolated from the resulting samples and transcribed to cDNA by reverse transcriptase. The expression of TLR2, TLR4 and CD14 was then researched by real-time-PCR.

Results: The local immune response in hGFB and hPDL shows that LPS is primarily bound to TLR2. In hGFB, TLR4 and CD14 are expressed almost equally and generally provide the lowest results. hPDL shows the strongest expression of TLR2 and TLR4. As for the systemic response, LPS is primarily bound to CD14 in PMBCs, followed by TLR2 and TLR4. LPS of *E. coli* is able to stimulate periodontal cells - LPS of *Pg* is able to stimulate PBMCs. *E. coli*'s endotoxin is more potent than that of *Pg*. In hGFBs and PBMCs, the receptor expression is increased by higher LPS concentrations. In contrast, hPDLs show a regression.

Conclusion: In this *in vitro* experiment a local immune response in hGFB and hPDL was triggered *via* TLR2. hPDL showed the strongest response to the stimulation with LPS of *Pg* and *E. coli*. CD14 is primarily expressed in PBMCs and plays an important part in the systemic immune response. LPS of *E. coli* causes increased expressions when compared to LPS of *Pg*.

3 Einleitung

Parodontitis bezeichnet eine chronische Infektion des Zahnhalteapparates, die mit einer Entzündung der Gingiva und Zerstörung des parodontalen Gewebes, in schwerwiegenden Fällen begleitet von Alveolarknochenabbau mit eventuellem Zahnverlust, einhergeht (Haffajee and Sokransky, 1994). Weiters ist sie durch erhöhte Sondierungstiefen mit einhergehender Blutung und Eiterung aus Zahntaschen charakterisiert. Ungefähr 15% der Bevölkerung ist von einer schweren Form der Erkrankung betroffen, die unbehandelt zum Verlust der Zähne und zu systemischen Komplikationen führen kann (American Academy of Periodontology, 1996).

Ein Risikofaktor für die Entstehung von Parodontitis ist das Lipopolysaccharid (LPS) Gram-negativer paropathogener Bakterien, jenes von *Porphyromonas gingivalis* (*Pg*). Isoliertes LPS gilt als potentes Molekül in Bezug auf die Aktivierung des Immunsystems. LPS von *Escherichia coli* (*E. coli*) gilt als das wirksamste Endotoxin.

Lange Zeit wurde über den genauen molekularen Mechanismus der zellulären LPS-Erkennung und anschließender Signalweiterleitung gerätselt.

Die Entdeckung der Toll-like Rezeptoren (TLR), Homologe zu Toll in der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* (dToll), brachte viele neue Erkenntnisse.

TLR befinden sich vorwiegend auf Effektorzellen des natürlichen Immunsystems und besitzen eine intrazelluläre Domäne, die die Signalweiterleitung ins Zellinnere ermöglicht. Für die LPS-Bindung sind vorwiegend TLR2 und TLR4 verantwortlich.

Immunzellen werden durch LPS, das an einen Rezeptor-Komplex von CD14 und TLR bindet, aktiviert und zur Ausschüttung von Zytokinen angeregt. CD14 ist ein Glykoprotein, das LPS bindet, aber nicht die Fähigkeit besitzt, Signale ins Zellinnere weiterzuleiten.

Die hier durchgeführte *in vitro* Studie hat sich zur Aufgabe gemacht systemische und lokale Reaktionen nach Stimulierung mit LPS von *Pg* und *E. coli* miteinander zu vergleichen und das Entzündungsgeschehen bei Parodontitis besser zu erforschen. Dafür wurden einerseits Zellen des Parodonts, hGFB und hPDL, stellvertretend für die lokale Reaktion und andererseits PMBCs für die systemische Überprüfung verwendet. Nach Stimulation dieser Zellen mit LPS wurde die Expression von TLR2, TLR4 und CD14 mittels Real-Time-PCR ermittelt.

3.1 Die Pathogenese der Parodontitis

Die Pathogenese der Parodontitis basiert auf einer Reaktion des Makroorganismus auf spezielle Gram-positive und Gram-negative Mikroorganismen der supra- und subgingivalen Plaque. Der primär ätiologische Faktor der parodontalen Erkrankung ist der bakterielle Biofilm. Bereits 1683 hat der Niederländer Antonie van Leeuwenhoek erstmals verschiedene Formen von Bakterien im Zahnbelag beschrieben.

Während eine Gingivitis jahrelang bestehen kann, und bei guter Mundhygiene und professioneller Plaque- und Zahnsteinentfernung reversibel ist, ist eine Parodontitis nur beschränkt reversibel. Sie entwickelt sich aus einer mehr oder weniger stark ausgeprägten Gingivitis (Rateitschak, 2004).

Die Resorption von Alveolarknochen gefolgt von Zahnverlust ist klinisch die entscheidende Abfolge bei Parodontitis. Die pathogenen Erreger stimulieren Wirtszellen und das umgebende Gewebe dahingehend, dass sie verschiedene Zytokine wie Interleukin-1 (IL-1), Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) oder den Rezeptoraktivator von Nuclear-factor κ B Ligand (RANKL) (Gemmell et al, 1997), sowie IL-6 und IL-8 freisetzen (Okada und Murakami, 1998, Takada et al., 1991) und die adaptierte Immunantwort einleiten. Wang et al. (1991) zeigte, dass besonders Interleukin-6 (IL-6) Osteoklasten *in vitro* aktiviert und somit die Knochenresorption beeinflusst. Auch die Freisetzung von Prostaglandinen und Matrix-Metall-Proteinasen sind am Abbau des alveolären Knochens und der interstitiellen Matrix mitbeteiligt (Page und Kornman, 1997). Ebenso führt die Freigabe von intrazellulärem Calcium zu verstärktem Knochenabbau des entzündeten Alveolarknochens (Bockman & Repo, 1981; Chen & Yan, 2001).

3.1.1 Das Keimspektrum der Mundhöhle

Die Mundhöhle stellt mit bis zu 10⁹ Millionen Keimen/ml Speichel das mikrobiell am dichtesten besiedelte menschliche Organ dar (Brandis et al., 1994). Bisher konnten über 500 verschiedene Bakterienarten aus der subgingivalen Plaque isoliert werden. Da viele Arten unter extremen Milieubedingungen leben und aufgrund dessen nicht kultivierbar sind, wird die tatsächliche Artenvielfalt jedoch auf ungefähr 1000 Spezies geschätzt (Paster et al., 2001). Die Menge und Zusammensetzung der oralen Keimflora wird durch den pH-Wert, Temperatur und Feuchtigkeit der Mundhöhle, Speichel, Schleimhaut- und Gebisszustand, Ernährungsgewohnheiten, Mundhygiene und zahnärztliche Versorgung beeinflusst (Berger, 1965; Lehnert et al., 1968). Wenn sich die Virulenz der vorhandenen Mikroorganismen und die Widerstandsfähigkeit des Organismus die Waage halten spricht man von einer „normalen“ Mundflora.

Unter der artenreichen Flora können sowohl für den Menschen harmlose oder fakultativ-pathogene, als auch pathogene Keime nachgewiesen werden, die zu einer Gingivitis und in weiterer Folge zur Parodontitis führen können. Prinzipiell kann man die Standortflora „resident flora“ von der Durchgangsflora „transient flora“ unterscheiden (Berger, 1955; Nauman, et al., 1983). Zu Letzteren zählt man Darmbakterien und andere pathogene und apathogene Mikroorganismen der Außenwelt.

Die Residentflora steht zu ihrem Wirt nicht nur in einem passiven Verhältnis. Sie trägt direkt und indirekt zur normalen Entwicklung der Physiologie, der Ernährung sowie der Abwehrsysteme eines Organismus bei (Marsh, 2003).

Leitkeime der Standortflora in der Mundhöhle eines gesunden Erwachsenen sind orale *Streptokokken* (60-90%) und *Neisserien*. In geringen Zahlen finden sich *Hämophilusarten*, *Staphylokokken*, *Korynebakterien*, *Enterokokken* sowie vereinzelt *Enterobakterien* und *Pseudomonaden*. Zu den Gram-negativen anaeroben Bakterien zählen *Porphyromonas sp.*, *Prevotellen*, *Veillonellen*, *Fusobakterien*, *Leptotrichien*, zu den Gram-positiven Arten gehören z. B. *Laktobazillen*, *Actinomyces sp.* und *Propionibakterien* (Brandis, 1994; Berger, 1955 und 1965).

Zudem wurde eine Gruppe von Bakterien identifiziert, die mit der Progression der Parodontitis stark assoziiert ist. Diese Keime sind vorwiegend Gram-negative anaerobe Bakterien, deren Zellwand aus einem LPS besteht. Nur sehr wenige Gram-negative Bakterienarten wie *Pg*, *A. actinomycetemcomitans* (*Aac*), *Tannerella forsythensis* (*Tf*, früher *Bacteroides forsythus*), *Prevotella intermedia* (*Pi*), *Fusobacterium nucleatum* (*Fn*), *Eikenella corrodens*, *Campylobacter rectus* und *Treponema denticola* (*Td*) werden der paropathogenen Mikroflora zugerechnet, wenn sie eine kritische Konzentration erreicht haben (Potempa et al., 2000). *Pg* zählt gemeinsam mit *Tf* und *Td* zum „red complex“ (Rateitschak, 2004) und ist als Leitkeim der chronischen Verlaufsform von Parodontitis bekannt.

3.1.2 Parodontitis und Allgemeinerkrankungen

Nach heutigem Wissensstand kann man behaupten, dass Parodontitis die Allgemeingesundheit beeinträchtigt, die Anfälligkeit für bestimmte systemische Erkrankungen erhöht und deren Verlauf ungünstig beeinflussen kann.

Studien belegen, dass paropathogene Bakterien und deren Toxine in die Blutzirkulation gelangen können und dort das Immunsystem aktivieren. *Pg* konnte z. B. sowohl in atherosklerotischen Plaques als auch bei der Invasion in aortale- und Herzendothelialzellen *in vitro* nachgewiesen werden (Deshpande et al., 1998; Progulsk-Fox et al., 1999; Dorn et al., 1999, 2000).

Die systemische Einschwemmung dieser Keime kann dazu führen, dass sich Erkrankungen wie Diabetes mellitus, Osteoporose, kardiovaskuläre und respiratorische Erkrankungen verstärken, das Schlaganfallrisiko zunimmt und es in der Schwangerschaft vorzeitig zu Wehen und/oder zu verminderten Geburtsgewicht kommen kann (Fowler et al., 2001, Paquette, 2002, Madianos et al., 2002). Eine stark überschießende Produktion kann im schlimmsten Fall zur Sepsis bzw. zum septischen Schock führen (Ulevitch & Tobias, 1999; Gutierrez-Ramos & Bluethmann, 1997).

a) Parodontitis und Diabetes mellitus

Gingivitis, Parodontitis und Alveolarknochenabbau zeigen einen deutlichen Zusammenhang mit dem Krankheitsbild von Diabetes mellitus und das v. a. bei unzureichend kontrollierten Patienten (Taylor et al., 1998; Grossi 2001, Ureles et al., 1983). Ein möglicher Grund dafür ist die schlechte Wundheilung.

b) Parodontitis und Schwangerschaft

Durch die hormonelle Umstellung des Körpers kann es leichter zur sogenannten Schwangerschaftsgingivitis kommen. Extrem gute Mundhygiene ist die einzige Möglichkeit dauerhafte Zahnfleischschäden zu vermeiden. Untersuchungen haben ergeben, dass Frauen mit Gingivitis häufiger vorzeitige Wehen haben oder Kinder mit vermindertem Geburtsgewicht zur Welt bringen als Frauen mit gesundem Zahnfleisch. Mit speziellen Messmethoden konnte in diesen Fällen ein durch den Entzündungsreiz freigesetzter

Botenstoff identifiziert werden, der dem Geburt auslösenden Hormon sehr ähnlich ist und damit auch die gleiche Wirkung hat (Buduneli et al., 2005).

c) Parodontitis und kardiovaskuläre Erkrankungen

Systemische Belastungen durch gramnegative Bakterien oder die assoziierten Lipopolysaccharide (LPS) konnten in Tierversuchen eine Infiltration von Entzündungszellen in grössere Blutgefäße, Proliferation der glatten Gefäßmuskulatur, fettbedingte Gefäßdegeneration und intravasale Gerinnung verursachen (Syrajanen et al., 1989, Marcus, 1993). Eine ganze Anzahl von Studien stützt die Hypothese, dass außer den bekannten Risikofaktoren auch Infektionen mit Atherogenese und thromboembolischen Ereignissen verbunden sein könnten. Zum Beispiel waren Infektionen im Zahnbereich bei Hirnschlagpatienten weiter verbreitet als in einer nach Alter und Geschlecht gleich zusammengesetzten Kontrollgruppe (Syrajanen et al., 1989, Mackenzie et al., 1963, Nery et al., 1987). Der Gingiva-Index stand in signifikantem Zusammenhang mit Fibrinogen und der Anzahl weißer Blutkörperchen bei Parodontitispatienten und einer nach Alter, Rauchgewohnheiten und sozialer Schicht gleich zusammengesetzten Kontrollgruppe (Kweider et al., 1993).

d) Parodontitis und Rauchen

Bei der Entwicklung und Progression parodontaler Erkrankungen wird Tabakkonsum als wichtigster Risikofaktor angesehen (Hellwig et al., 1999). Nikotin nimmt starken Einfluss auf die Immunabwehr, indem Immunzellen supprimiert werden und die Stimulierung von Zytokinen und anderer Entzündungsmediatoren angekurbelt wird (Müller, 2001).

Nikotin vermindert die Durchblutung des Zahnfleisches so stark, dass Raucher Zahnfleischentzündungen nicht bemerken und ihr Zahnfleisch für gesund halten.

Zusammenhänge zwischen Parodontitis und Schlaganfall, Atherosklerose (Valtonen et al., 1991), Myocard-Infarkt (Mattila et al., 1993), koronarer Herzkrankheit (Beck et al., 1996, 1998), Frühgeburten (Offenbacher et al., 1998) und respiratorischen Erkrankungen (Hyypa et al., 1981) scheinen zumindest wahrscheinlich. Eine direkte kausale Wirkung der Parodontitis ist jedoch noch für keine der genannten Erkrankungen eindeutig erwiesen.

3.2 Das Immunsystem

3.2.1 Das angeborene und spezifische Immunsystem – ein Überblick

Das Immunsystem setzt sich aus zwei Komponenten zusammen: dem angeborenen und dem adaptiven Immunsystem. Mit deren Hilfe kann die Abwehr Pathogene als Reize erfassen, auf diese mit einer spezifischen Antwort reagieren und das Ereignis in Erinnerung behalten.

Die wichtigste Funktion des natürlichen Immunsystems liegt in der schnellen Beseitigung der Erreger mit Hilfe von Phagozytose, Aktivierung von proteolytischen Kaskaden und Synthese von potenten antimikrobiellen Peptiden (Medzhitov and Janeway, 2000).

In den Körper eingedrungene Bakterien oder Viren müssen rasch als potenzielle Pathogene erkannt werden. Die Erstantwort auf ein Pathogen erfolgt mit Hilfe humoraler (Komplement, C-reaktives Protein etc.) und zellulärer (Phagozyten, natürliche Killerzellen [NK]) Effektormechanismen. Sie erfolgt über Rezeptoren, die häufig vorkommende Merkmale von Pathogenen erkennen, sog. Molekülerkennungsrezeptoren („pattern recognition receptors“ PRR). Die Aktivierung von Gewebsmakrophagen durch PRR führt zur Phagozytose des Pathogens. Es kommt zur Freisetzung von Zytokinen. Durch die Freisetzung solcher löslichen Mediatoren kommt es zur Vasodilatation, Chemotaxis von Granulozyten, NK und T-Zellen, sowie zur Freisetzung von Akutphaseproteinen. Die lokale Immunreaktion löst eine Entzündung aus.

Der Ablauf der natürlichen Abwehr benötigt keine vorangegangene Exposition mit Antigen (AG) um Effektorzellen zu aktivieren, da diese kontinuierlich gebildet und bereitgestellt werden.

Die adaptive oder „spezifische“ Immunantwort tritt in Kraft, wenn die erste Abwehrlinie durchbrochen wird und zur Verteidigung von Pathogenen nicht ausreicht. Sie wird vom angeborenen Immunsystem kontrolliert und koordiniert (Medzhitov and Janeway, Jr., 1997). Die zelluläre Verteidigungslinie der spezifischen Immunantwort wird von T-Lymphozyten

(zytotoxische T-Zellen, T-Helferzellen), die humorale Linie durch Antikörper (AK)-produzierende B-Lymphozyten (sog. Plasmazellen) gebildet. Durch Entwicklung eines „immunologischen Gedächtnisses“ können erneute Infektionen mit Mikroorganismen verhindert werden.

T-Zellen werden direkt durch den Kontakt mit AG-präsentierenden Zellen (APC) aktiviert. Zu diesen zählen dendritische Zellen, die die Produktion naiver T-Zellen ankurbeln und die Polarisierung in T-Helferzellen (Th1) und T-Supressorzellen (Th2) beeinflussen. Th1 Zellen sind mit stabilen periodontalen Läsionen assoziiert, während Th2 bei progressiver Parodontitis eine wichtige Rolle spielen (Gemell et al., 2002 & 2004). TLR2 und TLR4 sind auf dendritischen Zellen, die AG präsentieren können, exprimiert (Lanzavecchia et al., 2001).

3.2.1.1 Pathogen-Associated Molecular Pattern (PAMP)

Strukturen, die auf bakteriellen Erregern exprimiert werden nennt man PAMP. Sie binden an PRR von Immunzellen und stellen in der Evolution hoch konservierte Strukturen dar, die in einem großen Spektrum von Mikroorganismen vorkommen. PAMP sind für Mikroorganismen einer bestimmten taxonomischen Einheit konstant, was ihre Erkennung durch einen einzelnen Rezeptor ermöglicht und sie sind für das Überleben dieser essentiell.

Zu den PAMP zählen Moleküle wie das LPS Gram-negativer Keime, Lipoteichonsäure Gram-positiver Bakterien, Flagellin, Mannane und Mannoproteine aus Hefen und nicht-methylierte DNA-Sequenzen, die im Zentrum ein CG-Dinukleotid aufweisen(CpG-Motive).

Sie kommen in einer Vielzahl unterschiedlicher Mikroorganismen vor, sind potente Induktoren der angeborenen Immunantwort (Hoffmann et al., 1999; Medzhitov and Janeway, 2000) und führen letztlich zur Induktion der adaptiven Immunität.

3.2.1.2 Pattern Recognition Receptors (PRR)

Rezeptoren des angeborenen und erworbenen Immunsystems sind unterschiedlich. Das natürliche Immunsystem kann über PRR Strukturmerkmale von Pathogenen erkennen. Da viele der erkannten Moleküle ausschließlich von Mikroorganismen und nicht von

multizellulären Organismen gebildet werden, fällt die Differenzierung zwischen „infektiösem Fremd“ und „nicht-infektiösem Selbst“ nicht schwer.

PRR sind auf der Zelloberfläche, im Zellinneren und in Körperflüssigkeiten nachweisbar. Sie dienen der Aktivierung der Komplement- und Koagulationskaskade, der Opsonierung, der Phagozytose bzw. der Aktivierung der Signaltransduktion für die Vorgänge der Entzündung und der Induktion des programmierten Zelltodes (Apoptose). Offensichtlich können jedoch nicht alle Rezeptoren der Phagozyten Signale übertragen. Der bekannteste Reaktionsweg dieser Art wird von einer Familie von Transmembranrezeptoren in Gang gesetzt, die in der Evolution konserviert wurde und offenbar ausschließlich als signalgebende Rezeptoren wirken. Diese bezeichnet man als Toll-like-Rezeptoren. (Janeway & Co, Immunologie).

PRR stimulieren die Aufnahme der Pathogene, die sie erkennen. Sie können chemotaktisch wirken, indem sie die gezielte Migration der Phagozyten an den Ort der Entzündung steuern. Sie kontrollieren aber auch die Expression weiterer Effektormoleküle, die einerseits für die Beseitigung der Mikroorganismen und andererseits für die Kooperation mit T-Zellen der erworbenen Immunität notwendig sind (Holländer, 2005). AK und T-Zellrezeptoren (TCR), Rezeptoren der adaptierten Immunantwort, können detaillierte molekulare Strukturen und Eigenschaften von AG differenzieren (Goldsby et al, 2003).

PRR können funktionell in drei Gruppen unterteilt werden (Janeway, Jr. & Medzhitov, 2002a):

a) Sezernierende PRR

können entweder das Komplementsystem aktivieren, mikrobielle Erreger opsonisieren oder als akzessorische Proteine die Erkennung von PAMP verbessern bzw. ermöglichen. Hierzu zählt man das Mannan-bindende Lektin und die Peptidoglykan-Erkennungsproteine.

b) Endozytierende PRR

können an der Oberfläche von Phagozyten (neutrophile Granulozyten, Makrophagen und dendritische Zellen) die Bindung und anschließende Phagozytose von Mikroorganismen in Lysosomen ermöglichen. Pathogeneigene Proteine werden dann prozessiert und auf MHC-Molekülen der Makrophagenoberfläche präsentiert. Gleichzeitig kommt es zur Freisetzung

verschiedener Effektoren und Zytokine (Medzhitov and Janeway, Jr., 2000). Dazu zählt man den Makrophagen-Mannose Rezeptor, Makrophagen-Rezeptoren mit Kollagenstruktur und Scavenger-Rezeptoren (z. B. CD36 und CD91).

c) Signaltransferierende PRR

können die Information der Pathogenerkennung mit Hilfe von Signaltransduktionskaskaden in die Zelle weiterleiten und dadurch die Expression verschiedener Gene der Immunantwort induzieren. Zu dieser Gruppe gehören die Toll-like Rezeptoren. Sie sind an der Oberfläche oder im Zytoplasma exprimiert und stimulieren die mikrobielle Abwehr bei entsprechender Bindung eines Liganden (Holländer, 2005).

3.3 Toll-like Rezeptoren

3.3.1 Toll in Drosophila

TLR sind die wichtigste Gruppe der PRR. Sie werden durch den Kontakt mit Krankheitserregern stimuliert. Dadurch wird eine Signalkette in der Zelle ausgelöst, die zur Aktivierung von Abwehrmechanismen des Immunsystems, wie beispielsweise der Bereitstellung von Makrophagen, und zur Produktion von Zytokinen führt.

Sie spielen somit eine entscheidende Rolle in der natürlichen Immunantwort und die Expressionslevels dieser Rezeptoren reflektieren vermutlich die Sensibilität der Immunzellen der Infektion (Tamandl et al, 2003).

Das Gen Toll wurde 1984 erstmals von der späteren Nobelpreisträgerin Christiane Nüsslein-Volhard in der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* (dToll) entdeckt (Anderson & Nüsslein-Volhard, 1984), wo es während der Embryogenese bei der Festlegung des dorsoventralen Körpermusters eine Rolle spielt. Später stellte man fest, dass dToll bei adulten Fliegen an der Signalweiterleitung beteiligt ist, die nach einer Infektion durch Gram-positive Bakterien und Pilzen ausgelöst wird.

Außerdem gibt es bei Pflanzen für die Abwehr von Virusinfektionen einen ähnlichen Signalweg. Der Toll-Signalweg ist demnach ein alter Mechanismus, der anscheinend bei der angeborenen Immunität der meisten oder sogar aller vielzelligen Organismen vorkommt (Janeway et al., 2005).

dToll wird im Unterschied zu den TLR im humanen System nicht direkt von Pathogenen stimuliert, sondern über proteolytische Kaskaden gespaltene Proteine (z.B. durch gespaltenes *Spätzle*) induziert. Diese proteolytischen Kaskaden werden von Bestandteilen Gram-positiver Bakterien und Pilze ausgelöst bzw. aktiviert. Das Immunsystem von *Drosophila* ist ebenso in der Lage zwischen verschiedenen Pathogenen zu unterscheiden. Demnach existieren in der

Fruchtfliege auch PRR. Wird dToll über seine Liganden, wie z.B. durch Proteasen gespaltenes *Spätzle* aktiviert, kommt es zur Rekrutierung der Adaptorproteine *Tube*, *Pelle* und *Cactus* und letztendlich zur Stimulierung des *Nukleären Faktors* κB (*NF- κB*) ähnlichen Transkriptionsfaktors *Dorsal*. Dies führt zur Induktion antimikrobieller Proteine wie Drosomycin, Dipterin und Defensin (Rutschmann et al, 2002).

3.3.2 Toll-like Rezeptoren (TLR)

Die TLR wurden 1997 entdeckt. Bislang sind bei Vertebraten 13 verschiedene TLR identifiziert worden, davon scheinen TLR 1-9 in Mensch und Maus homolog zu sein. Das menschliche Genom trägt TLR10, TLR11. TLR12 und TLR13 fehlen. Das Mausgenom hat TLR11, TLR12 und TLR13, dafür fehlt TLR 10 (<http://www.new-science-press.com/content/pdf/nsp-immunity-3-10.pdf>).

TLR umfassen eine Subfamilie innerhalb der größeren Superfamilie der IL-Rezeptoren, aufgrund ihrer Ähnlichkeit in der Zytoplasmadomäne. Der TLR ist ein Typ I Transmembran Rezeptor und wird an der Oberfläche von Immun- und Gewebszellen exprimiert, wie z. B. Epithelzellen, Monozyten/Makrophagen, Fibroblasten und Neutrophilen.

Während der extrazelluläre Teil aus leucinrich repeats (LRR) besteht, enthält der intrazelluläre Teil eine dem IL-1 Rezeptor homologe Domäne, die Toll/IL-1 Rezeptor (TIR-Domäne) (Gay & Keith, 1991). Dazwischen befindet sich eine Transmembrandomäne. Die TIR-Domäne ist für die intrazelluläre Signalübertragung verantwortlich.

Die extrazelluläre Domäne unterscheidet sich wesentlich von der des IL-1 Rezeptors, der aus drei Immunglobulindomänen besteht (Akira, 2003), denn TLR besitzen 18-26 LRR mit je 24-29 Aminosäuren.

Sowohl der humane IL-1 Rezeptor, als auch dToll induzieren Signaltransduktionswege, die zur Aktivierung von Transkriptionsfaktoren der *NF- κB* -Familie führen (Belvin and Anderson, 1996). Sie aktivieren Gene der Immunantwort, die durch die Aktivierung des *Myeloid Differentiation Primary Response Gene 88* (*MyD88*) eingeleitet werden.

TLR werden im Gegensatz zu dToll direkt von Fremdstrukturen aktiviert (Bauer, 2002; Beutler, 2003). Sie werden am häufigsten an der Oberfläche von phagozytierenden Zellen wie Makrophagen, Neutrophilen und dendrischen Zellen exprimiert, jenen Zellen, mit denen ein AG zuerst zusammen trifft. Diese Immunzellen tragen eine Vielzahl an unterschiedlichen TLR. TLR1, TLR2, TLR4 und TLR5 befinden sich vorwiegend an der Zelloberfläche, TLR 7, TLR8, TLR9 und manchmal TLR3 sind in intrazellulären Kompartements enthalten. Die Lokalisation der einzelnen TLR korreliert sozusagen mit den molekularen Strukturen der einzelnen Liganden.

TLR und ihre Liganden

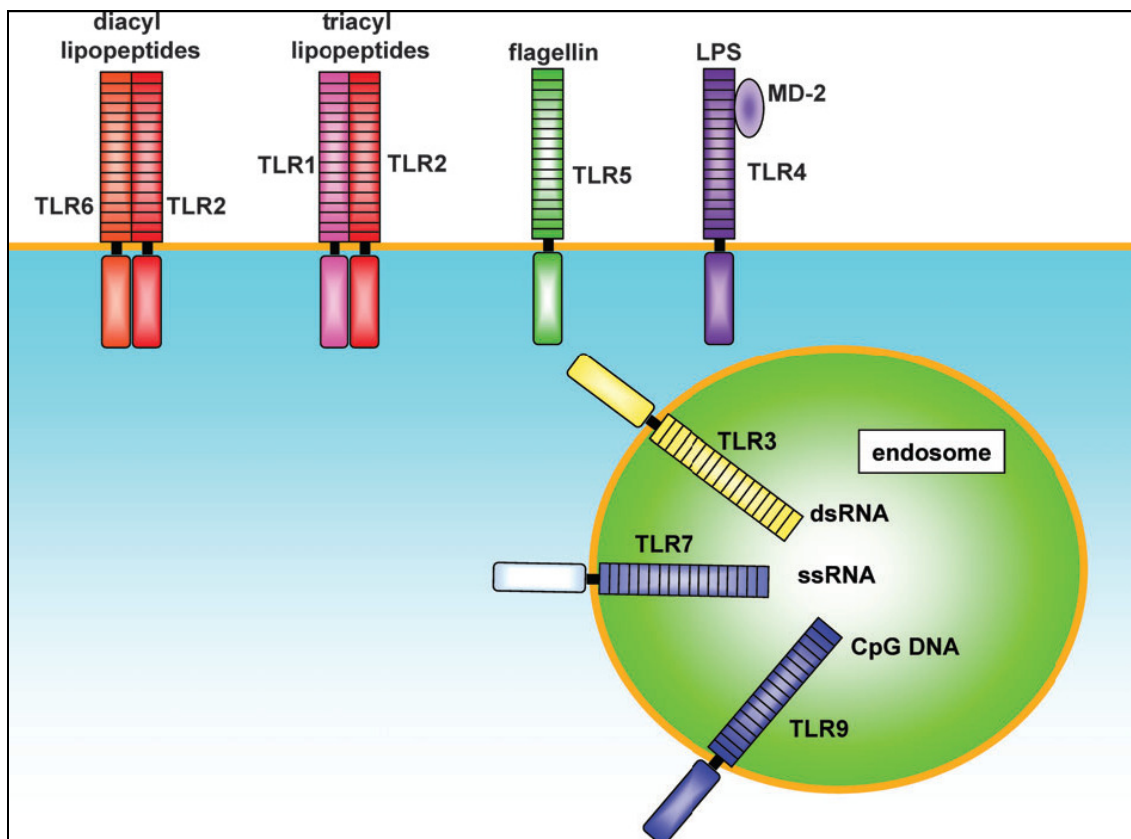


Abb. 1: TLR2 ist essentiell für die Erkennung von mikrobiellen Lipopeptiden und kooperiert mit TLR1 und TLR6, um zwischen diacylierten und triacylierten Lipopeptiden zu unterscheiden. TLR4 ist der Rezeptor für LPS. TLR9 ist für die CpG DNA Erkennung wichtig. Während TLR3 virale dsRNA erkennt, werden TLR7 und TLR8 von viraler ssRNA aktiviert. TLR 5 erkennt Flagellin (Takeda & Akira, 2005).

a) TLR2 (TLR1, TLR6)

Die Aktivierung von TLR2 erfolgt durch Lipoproteine/Lipopeptide diverser Bakterien bzw. Peptidoglycanen und Lipoteichonsäure (LTA) Gram-positiver Erreger. Zusätzlich konnte man die Bindung mit aufbereitetem LPS von Nicht-Enterobakterien wie *Leptospira interrogans*, *Helicobacter pylori* und *Pg* nachweisen (Hirschfeld et al., 2001; Werts et al., 2001; Smith et al., 2003). Dieses LPS unterscheidet sich strukturell in der Anzahl der Acylgruppen im Lipid-A-Teil vom LPS Gram-negativer Bakterien, welches durch TLR4 erkannt wird, man vermutet daher die differenzierte Erkennung (Netea et al., 2002).

TLR2 kann mit TLR1 und TLR6 Heterodimere bilden. Während TLR2 mit TLR6 durch Diacyl-Lipopeptide aktiviert wird, kommt es beim Heterodimer TLR2 mit TLR1 zur Signalübertragung bei Triacyl-Lipopeptiden von Mykoplasmen. TLR2 erkennt auch Pilzspezifische Zuckerstrukturen wie Zymosan oder Mannan (Gantner et al. 2003).

b) TLR3

TLR3 erkennt double-stranded RNA (dsRNA) und Viren.

c) TLR4

TLR4 ist ein essentieller Rezeptor für die LPS-Bindung. Zusätzlich ist er in die Erkennung von endogenen Liganden wie Heat Shock Proteins (HSP60, HSP70), der zusätzlichen A-Domäne von Fibronectin, Oligosacchariden von Hyaluronsäure und Fibrinogen involviert. Diese endogenen Liganden müssen in sehr hoher Konzentration vorliegen, um TLR4 zu aktivieren. Für die Aktivierung mit LPS genügt eine sehr kleine Menge des Endotoxins (Takeda and Akira, 2005).

Wang et al. hat als erster die Expression von TLR4 auf der Oberfläche von hGFB nachgewiesen und die Bindung von *Pg*-LPS an TLR4 mit anschließendem Signaltransduktionsweg beobachtet (Wang et al., 2000).

d) TLR5

TLR5 gilt als Ligand für Flagellin begeißelte Gram-negative Bakterien.

e) TLR7 und TLR8

Menschliche TLR7 und TLR8 werden durch Imidazoquinolinkomponenten aktiviert. Weiters erkennen sie single-stranded RNA (ssRNA) von Viren (z.B. Human Immunodeficiency Virus [HIV], Influenzavirus) (Heil et al., 2004; Diebold et al.; 2004, Lund et al., 2004).

f) TLR9

Für TLR9 ist gezeigt worden, dass er bakterielle unmethylierte CpG-DNA erkennt. TLR9 wurde kürzlich im Endoplasmatischen Retikulum nachgewiesen und wird nach Stimulation mit CpG-enthaltener DNA in die endosomalen/lysosomalen Kompartimente rekrutiert (Latz et al., 2004).

g) TLR11

Kürzlich wurde der erste chemisch identifizierte Ligand für murines TLR11, ein Profilin aus *Toxoplasma gondii*, beschrieben (Yarovinsky et al., 2005).

3.3.3 TLR Signaltransduktion

3.3.3.1 MyD88-abhängige Signaltransduktion

Die Stimulierung von TLR durch PAMP initiiert eine Signalkaskade, an der eine große Anzahl an Proteinen beteiligt ist. Sie führt zur Aktivierung von *NF-κB*. Dieser ist für die Sekretion proinflammatorischer Zytokine und Chemokine verantwortlich, die die erworbene Immunität einleiten.

Der zunächst entdeckte TLR-Signalweg (dieser trifft für alle TLR außer TLR3 zu) verläuft über das Adaptormolekül *MyD88*, das über seine TIR-Domäne mit den verschiedenen TLR assoziiert. Speziell in die Signaltransduktion über TLR2 und TLR4 ist noch ein anderer Adaptor mit TIR-Domäne, *TIR domain containing adaptor protein (TIRAP)*, involviert (Fitzgerald et al, 2001; Horng et al, 2001).

Der *MyD88*-abhängige Signalweg verläuft analog zum IL-1 Rezeptor Reaktionsweg. *MyD88* besitzt eine N-terminale death domain (DD), die mit der TIR Domäne der TLR assoziiert. Die C-terminale TIR Domäne bindet an die DD von *IL-1R associated kinase 4 (IRAK-4)*, eine Serine-Threonin Kinase. *IRAK-1* wird unabhängig von *MyD88* zum Rezeptor rekrutiert und durch *IRAK-4* phosphoryliert. Aktiviertes *IRAK-1* assoziiert dann mit *Tumor necrosis factor receptor-associated factor 6 (TRAF-6)*. Diese Verbindung führt zur Aktivierung zweier unterschiedlicher Signalwege (Takeda et al, 2005):

1. Als erste Möglichkeit assoziiert *TRAF-6* mit *TAK1 binding protein-2 (TAB-2)*. Dieser Komplex aktiviert *TGF β activated kinase-1 (TAK-1)* und *I κ B Kinasen (IKK)*. *IKK* phosphoryliert *I κ B*, dies führt zur Translokation von *NF- κ B* und induziert somit die Produktion von proinflammatorischen Genen. *NF- κ B* reguliert die Transkription vieler, insbesondere für die Entzündung und Immunantwort wichtiger Gene, wie z. B. IL-1 β , IL-6 und IL-8.

NF- κ B ist ein wichtiger Transkriptionsfaktor vieler immunrelevanter Gene und ist ein aus zwei Untereinheiten zusammengesetzter Proteinkomplex. Im Zytoplasma ist dieses Dimer mit einem inhibitorischen Protein, dem *I κ B* assoziiert, das *NF- κ B* in seiner inaktiven Form hält. Die Phosphorylierung von *I κ B* durch *IKK* führt zu dessen Degradation und zur Freisetzung von *NF- κ B*. Dieses transloziert in den Zellkern und wirkt dort als Transkriptionsfaktor.

Verschiedene neurodegenerative Erkrankungen, einschließlich der Alzheimer'schen Erkrankung, werden mit der Bildung freier Sauerstoffradikale und oxidativem Stress ursächlich in Verbindung gebracht.

2. Die Signaltransduktion unterhalb von *TRAF-6* kann auch in eine andere Richtung laufen. Neben der Aktivierung von *IKK* kann auch *mitogen-activated protein kinase (MAPK)*, wie beispielsweise *c-Jun NH2-terminal kinase (JNK)* induziert werden (Jones et al., 2001). Kürzlich konnten zwei Gruppen zeigen, dass auch die Transkriptionsfaktoren *IFN regulatory factor (IRF)-5* und *IRF-7* auf dem *MyD88*-abhängigen Weg aktiviert werden (Honda et al., 2005; Takaoka et al., 2005).

Der TLR-Signalweg

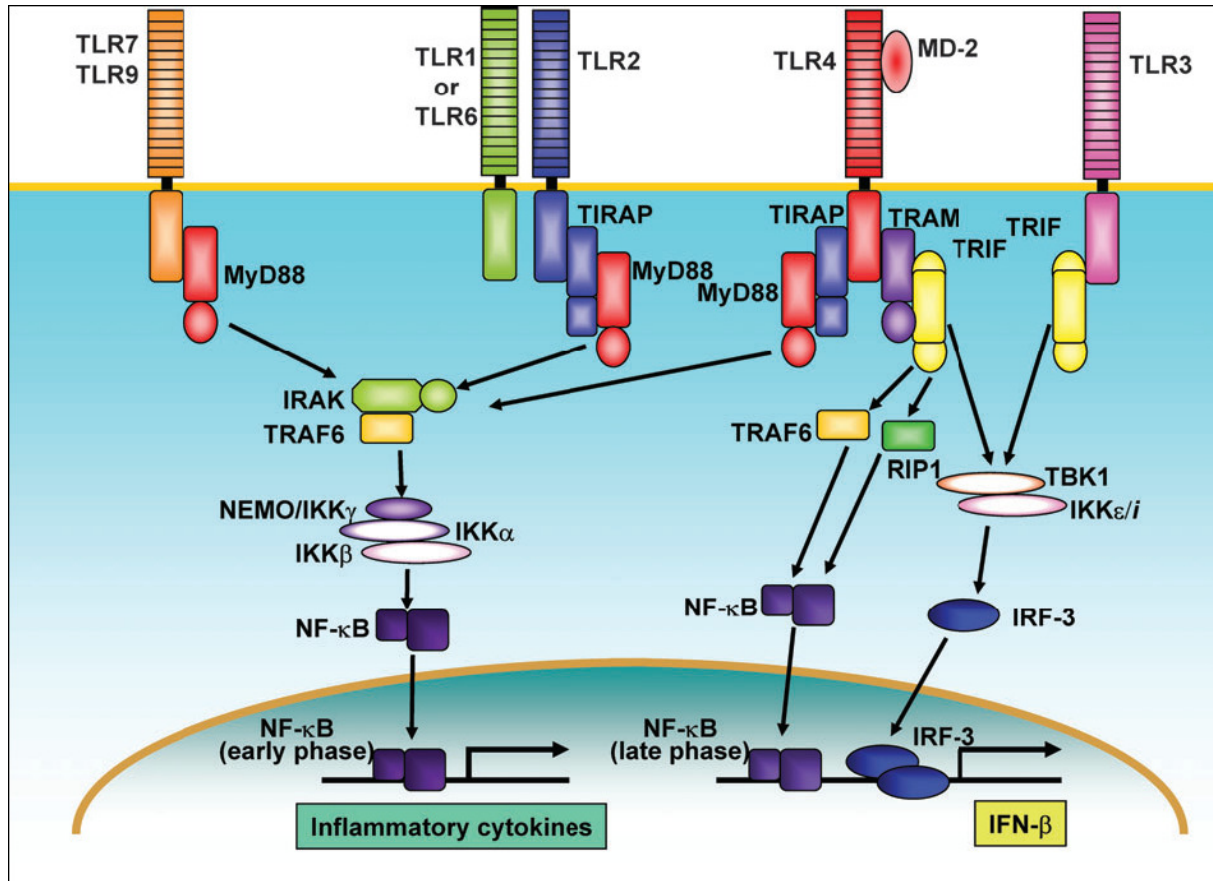


Abb. 2: Der in der TIR Domäne enthaltene Adaptor MyD88 assoziiert mit der zyttoplasmatischen TIR Domäne der TLR und rekrutiert IRAK. IRAK aktiviert TRAF6 und dieser wiederum aktiviert den IκB Kinasen Komplex (IKK), bestehend aus IKKα, IKKβ und NEMO/IKKγ. Der IKK Komplex phosphoryliert IκB, dies führt zur nuklearen Translokation von NF-κB und zur Expression von inflammatorischen Zytokinen. TIRAP, ein zweiter TIR Domäne enthaltender Adaptor, ist im MyD88-abhängigen Signalweg via TLR2 und TLR4 involviert. In von TLR3 und TLR4 vermittelten Signalwegen wurden die Aktivierung von IRF-3 und die Induzierung von IFN-β in einem MyD88 unabhängigen Signalweg beobachtet. Ein dritter TIR Domäne enthaltender Adaptor TRIF ist essentiell für den MyD88-unabhängigen Signalweg. Untypische IKKs, IKKε/IKKι und TBK1, vermitteln die Aktivierung von IRF-3 abwärts von TRIF. Ein vierter TIR Domäne enthaltender Adaptor TRAM ist spezifisch für den TLR4 vermittelten MyD88-unabhängigen/TRIF-abhängigen Signalweg (Takeda & Akira, 2005).

3.3.3.2 *MyD88-unabhängige Signaltransduktion*

TLR3 induziert

Yoneyama et al. (1998) beschrieb, dass virale Infektionen oder dsRNA *IRF-3* aktivieren. Dies führte zur Vermutung, dass es für TLR3 und TLR4 einen *MyD88*-unabhängigen Signalweg gibt. In der Signaltransduktion über TLR3 und TLR4 kommt es zur Induktion IFN- β -abhängiger Gene über die *MyD88*-unabhängige Aktivierung von *IRF-3*.

TLR4 induziert

TLR4 bindet normalerweise an *MyD88* und die Signalkaskade führt letztlich zur Sekretion von Zytokinen. In *MyD88* defizienten Makrophagen konnte die TLR4 vermittelte Produktion inflammatorischer Zytokine nicht beobachtet werden. Dennoch kam es zu einer verzögerten Aktivierung von *NF- κ B* (Kawai et al., 1999). Das zeigt, dass obwohl die TLR4 vermittelte Produktion von inflammatorischen Zytokinen vom *MyD88*-abhängigen Signalweg abhängig ist, noch eine andere Komponente existiert, die TLR4 aktiviert.

Nachfolgende Studien ergaben, dass die Stimulierung von TLR4 zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors *IRF-3* und zudem zu einer späten Phase der *NF- κ B*-Aktivierung, die *MyD88* unabhängig ist, führt (Kawai et al. 2001):

Die TLR4 induzierte Aktivierung von *IRF-3* führt zur Produktion von IFN- β . Dieses wiederum aktiviert *STAT1* und induziert verschiedene IFN-abhängige Gene (Toshchakav et al., 2002; Hoshino et al., 2002; Doyle et al., 2002; Takeda et al., 2005). Dieser Signalweg wird durch eine Interaktion von *TRIF* mit *TRAF-6* ausgelöst. Unterhalb von *TRAF-6* scheint die Signalkaskade ähnlich der oben beschriebenen *MyD88*-abhängigen Kaskade abzulaufen. Die *MyD88*-unabhängige späte Produktion *NF- κ B* abhängiger Gene scheint bis jetzt spezifisch für TLR4 zu sein (Akira & Hoshino, 2003).

Für die *MyD88*-unabhängige Signaltransduktion ist ein dritter Adaptor mit TIR Domäne, *TRIF*, essentiell. Untypische *IKK* führen zur Aktivierung von *IRF-3* unterhalb von *TRIF*. Ein viertes Adaptormolekül mit TIR Domäne, *TRAM*, ist nur bei der *MyD88*-unabhängigen bzw. *TRIF*-abhängigen Signaltransduktion über TLR4 beteiligt (modifiziert nach Takeda & Akira, 2005). *TRIF* scheint essentiell für die *MyD88*- unabhängige Signaltransduktion über TLR3

und TLR4 zu sein und ist der bislang einzig identifizierte Adaptor für TLR3. Wegen der relativ schlechten Interaktion zwischen *TRIF* und TLR4 wurde nach einem weiteren Adaptor gesucht, der die Verbindung zwischen diesen beiden herstellt. Wiederum wurde von zwei Gruppen gleichzeitig der Adaptor *TRIF related adaptor molecule (TRAM)* bzw. *TIR domain containing adaptor molecule 2 (TICAM-2)* identifiziert (Oshiumi et al., 2003b; Yamamoto et al., 2003). Dieser ist spezifisch für die MyD88-unabhängige Signaltransduktion über TLR4 und wird weder von TLR3 noch von einem anderen TLR benutzt. *TRAM* assoziiert mit *IRF-3* und führt zusammen mit *TRIF* zur Translokation von *IRF-3* in den Nukleus. *IRF-3* ist ein IRF Transkriptionsfaktor, welcher das *interferon stimulated response element (ISRE)* bindet und Typ-I Interferone induziert (Au et al., 1995).

3.3.4 Die Rolle von TLR in der Parodontitis

Zum Parodont, dem Zahnhalteapparat, zählen Gingiva, Zement, periodontales Ligament und Alveolarknochen. Gesundes Parodontalgewebe enthält histologisch eine niedrigere Anzahl an Makrophagen, Langerhanszellen, dendritischen Zellen sowie die Epithelzellschicht.

Zunehmende Plaquebesiedelung führt zur Gingivitis mit erhöhten Zellinfiltraten. T-Zellen sind die dominante Zelllinie in dieser Phase der Läsion. Bei fortschreitender Entzündung sind T- und B- Zellen vorherrschend, sowie verstärkt Entzündungsmediatoren wie IL-1 β , TNF- α , Prostaglandin E₂ und Interferon γ (IF γ) im Sulkusfluid nachweisbar (Page et al., 1997).

B-Zellen und Plasmazellen sowie eine erhöhte Anzahl an Gram negativen Anaerobier können bei Parodontitis beobachtet werden (Seymour, 1991).

Immunzellen des parodontalen Gewebes exprimieren TLR. Chronische TLR-Stimulation im parodontalen Gewebe durch bakterielle PAMP kann zur exzessiven Produktion proinflammatorischer Zytokine führen, die in einer Gewebszerstörung resultieren (Mahanonda, 2007).

Expression von mRNA in Toll-like receptors (TLR) in verschiedenen Zelltypen des Parodonts

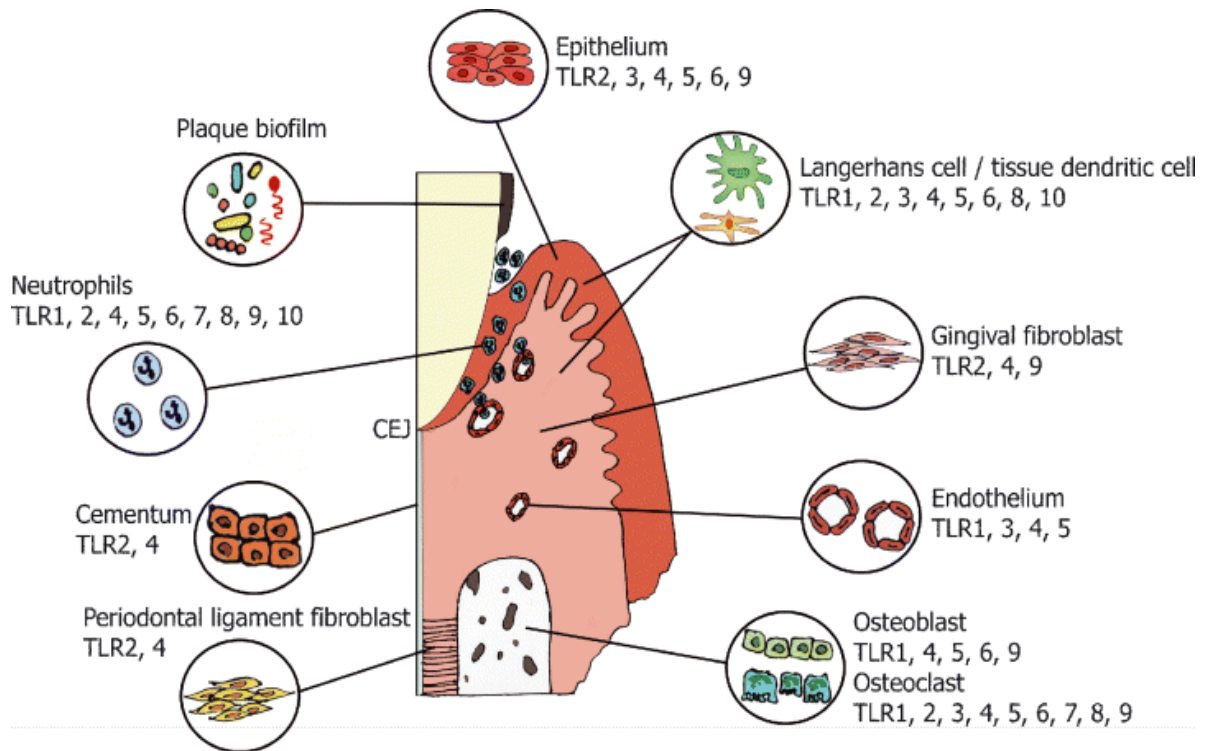


Abb. 3: Zellen des Parodonts und TLR (Mahanonda et al, 2007).

3.3.4.1 Interaktion zwischen LPS und TLR

Wesentliche Fortschritte für das Verständnis von LPS-Effekten brachte die Entdeckung des LPS-bindenden Proteins (LBP) und des Zelloberflächen Glykoproteins *CD14* (Wright et al., 1990; Schuhmann et al., 1990). Allerdings waren weder das intrazelluläre und transmembranäre Domänen vermissende Glycophosphatidylinositol-verankerte *CD14*, noch das Akute-Phase-Protein LBP Kandidaten für einen LPS-Signalling-Rezeptor.

Die Bindung von LPS paropathogener Bakterien an *TLR4* hängt von *CD14* ab, einem Oberflächenmolekül von Makrophagen, das den Korezeptor für LPS darstellt, und vom LPS-bindenden Protein (LBP), einem Serumprotein das LPS aus der Lösung bindet und auf *CD14* überträgt (Male, 2005).

Die Signaltransduktion für LPS wird durch *TLR4* ausgelöst, nachdem das LPS-Binding-Protein LBP an den *CD14* Rezeptor gebunden hat und somit eine funktionelle Einheit zwischen dem *CD14* Rezeptor und dem *TLR4* vermittelt.

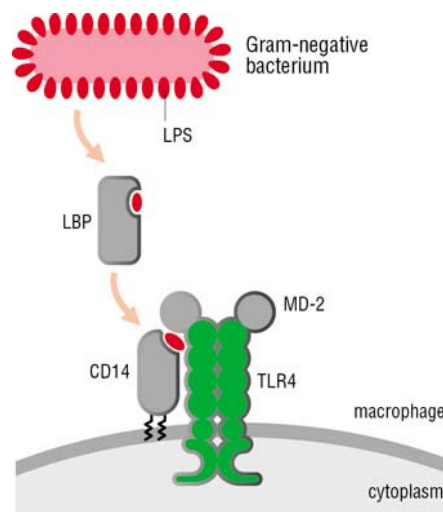


Abb. 4: Erkennung von LPS durch Immunzellen: LPS-Monomere werden durch LBP aus der Bakterienmembran gelöst und zur Lipidbindungsstelle auf CD14 transferiert, welches in der Membran von Phagozyten zu finden ist. CD14 unterstützt die Bindung von LPS an den TLR4-MD-2 Komplex, der Signale ins Zellinnere weiterleiten kann. Wenn CD14 fehlt, kann der Reaktionsweg dennoch mit einigen LPS-Formen bzw. mit höheren LPS-Dosen funktionieren (<http://www.new-science-press.com/browse/immunity/3/10/>).

3.3.4.1.1 Cluster of differentiation 14

CD14 ist ein 55-kDa großes Glykoprotein, das LPS mit hoher Affinität bindet. *CD14* ist über Glycosylphosphatidylinositol in der Zellmembran von Immunzellen verankert (*mCD14*), besitzt jedoch in Ermangelung eines zytoplasmatischen Anteils nicht die Fähigkeit Signale ins Zellinnere weiterzuleiten (Ulevitch & Tobias, 1995). Es kann auch enzymatisch abgespalten als gelöstes, soluble *CD14* (*sCD14*) vorkommen.

Nach der Bindung des LPS-*CD14*-Komplexes an TLR-4/MD2 wird eine Enzymkaskade in Gang gesetzt. Es kommt zur Ausschüttung von Zytokinen und zur Expression verschiedener Oberflächenmoleküle, u. a. Adhäsionsmoleküle. Weiters ist *CD14* für die Differenzierung apoptotischer und nekrotischer Zellen von Bedeutung (Schlegel et al., 1999).

3.3.4.1.2 LPS-bindendes Protein (LBP)

LBP ist ein Akute-Phase Protein der Leber, dessen Konzentration während systemischer Infektionen und der Akute-Phase Antwort dramatisch steigt. Es ist für die Monomerisierung von LPS-Vesikeln und dem anschließenden Transport zu den membranständigen *CD14*-Rezeptoren zuständig (Schumann et al., 1996, Lamping et al., 1998).

3.4 Porphyromonas gingivalis



Abb. 5: Elektronenmikroskopische Aufnahme von *Pg*
(<http://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Porphyromonas>)

Pg gehört zur Familie der Bacteroidaceae und ist ein Gram-negatives schwarz-pigmentiertes, nicht sporenbildendes, assacharolytisches, unbewegliches, strikt anaerobes Stäbchen und gilt als bedeutender Krankheitserreger bei der Entstehung einer Parodontitis, insbesondere der chronischen Form (Lamont and Jenkinson, 1998; Holt et al., 1999; Socransky and Haffajee, 1992).

Während ein zweiter, mit der Parodontitis eng im Zusammenhang stehender Keim, *Aac*, sich in einer gingivitisfreien und sauberen Mundhöhle niederlässt, besiedelt *Pg* lieber bereits mit Gingivitis befallene Gebissabschnitte bzw. subgingivale Areale.

Pg wird selten vertikal übertragen, da die dazu nötigen Gegebenheiten wie parodontale Taschen und ausgeprägte Gingivitis im Kindergebiss oft nicht vorhanden sind. Vielmehr wird der Keim, der nicht zur normalen Mundflora gehört, erst im Erwachsenenalter akquiriert und somit horizontal übertragen. Hat *Pg* sich einmal in parodontalen Taschen etabliert, kann sein mengenmäßiger Anteil bis zu 50% anwachsen. Es ist dann nicht mehr möglich den Keim durch lokalmechanische Parodontalbehandlung vollständig zu eliminieren (Sanderik et al., 2004).

Pg ist im Bezug auf seine Nahrung sehr anspruchsvoll. Er ist nicht in der Lage Kohlenhydrate zu verstoffwechseln und benötigt zum Überleben Eisen. Er kommt im Speichel und auf Schleimhäuten wie Zunge und Tonsillen nur als transienter Keim vor und kann sich dort nicht vermehren. Mit Hilfe von DNA-Analysen und Enzym - Elektrophoresen konnten bisher 78 unterschiedliche Genotypen von *Pg* identifiziert werden.

3.4.1 Virulenzfaktoren von *Pg*

Virulenzfaktoren werden von pathogenen Erregern produziert, damit diese auf die Wirtszelle einwirken können und im fremden Organismus überleben können. Sie können sich ansiedeln, wirken invasiv, gleichen sich an die Wirtsverhältnisse an und können mit verschiedenen Mechanismen die Immunantwort des Wirtes umgehen.

Zu den am besten untersuchten Virulenzfaktoren zählen: LPS, Peptidoglykane (PGN), Lipoteichonsäure (LTA), Fimbrien, Proteasen, Heat-Shock-Proteine (HSP), Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanine (fMLP) und Toxine.

Manche der Strukturen sind allen gemein, andere bakterien- bzw. stammspezifisch oder speziell für Gram-negative oder Gram-positive Bakterien (Madianos et. al, 2005).

Pg exprimiert eine Vielzahl von Virulenzfaktoren, wie Adhäsine (Fimbrien), Proteasen, Endotoxine, Cytotoxine und Hämolyse und LPS. Diese sind für die Besiedelung des parodontalen Gewebes, dessen Destruktion sowie für die Beeinflussung der Wirtsabwehr verantwortlich (Holt et al., 1999).

3.4.1.1 Lipopolysaccharid (LPS)

Die Bakterienhülle des *Pg* besteht aus einer inneren cytoplasmatischen Membran, einer dünnen Peptidoglycanschicht und daran angebaut einer asymmetrischen äußeren Membran, die das Lipopolysaccharid enthält. Die äußere Membran ist mit einer Vielzahl an kurzen, dünnen Fimbrien bedeckt, die als Adhäsine dienen (Holt et al., 1999).

LPS besteht aus dem Polysaccharidanteil (O-Antigen, äußere Kernregion, innere Kernregion) und dem Lipid-A. Der hydrophile Polysaccharidanteil ist variabel, während der hydrophobe Lipidanteil streng konserviert ist.

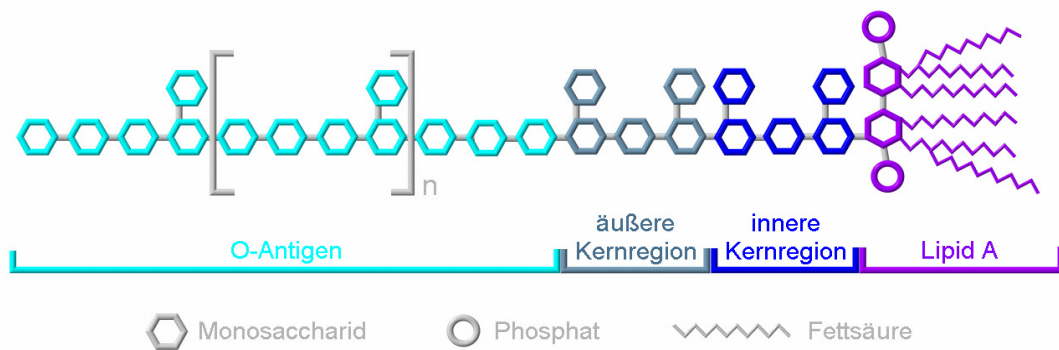


Abb. 6: Chemische Struktur von LPS

(<http://edoc.hu-berlin.de/dissertationen/hallatschek-werner-2004-10-20/HTML/chapter1.htm>)

a) O-Antigen

Das O-Antigen wird aus bis zu 50 (n) Oligosacchariden, die sich aus drei bis acht verschiedenen Einzelzuckern zusammensetzen, gebildet. Die vielseitigen Zusammensetzungsmöglichkeiten der Zuckereinheiten erklären die Vielzahl an Serotypen bei Gram-negativen Bakterien.

Der äußere Kern enthält die häufig vorkommenden Saccharide Glukose, Galaktose, Glukosamin und Galaktosamin, während der innere Kern den in der Natur selten synthetisierten Zucker Ketodesoxyoctonsäure (Kdo) und Heptosereste, die phosphoryliert sein können, beinhaltet. Kdo bietet einen Angriffspunkt für Antibiotika.

Das O-Antigen wird als äußerster Teil des LPS auf Bakterien exprimiert und löst die Immunantwort durch den Wirt aus.

Sechs Serotypen mit Polysaccharidkapsel (K1-K6) können bei *Pg* unterschieden werden (Laine et al., 1996, van Winkelhoff et al., 1993). In klinischen- und Tierversuchen wurde gezeigt, dass bekapselte *Pg* Serotypen virulenter sind als jene ohne Kapsel (Laine et al., 1997 & 1998).

Kikkert et al., 2007 konnte nach Stimulierung von HEK-CD14-TLR2 und Blutkulturen mit nicht bekapselten (K) und bekapselten (K1-K6) *P. gingivalis* Serotypen keinen signifikanten Unterschied der IL-8 Produktion (HEK-CD14-TLR2, Blutkultur) und IL-6, IL-10 und IL-12p40 (Blutkultur) feststellen.

b) Lipid-A

Der für die Virulenz entscheidende Anteil des LPS ist das Lipid-A. Es dient als Verankerung in der Zellwand. Das Grundgerüst des Lipid-A ist ein phosphoryliertes Glukosamindisaccharid, welches vier Fettsäurereste trägt, von denen zwei wiederum sekundär acyliert sind.

Die Aktivität ist dabei wesentlich von der chemischen Struktur, sprich Kettenlänge und Anzahl der Ketten, Position der Acylgruppen und Anzahl der Phosphatgruppen und der Spezies abhängig.

3.4.1.1.1 Wirkung des LPS

Das LPS ist ein Endotoxin, das beim Absterben von Gram-negativen Bakterien freigesetzt wird und stellt den ersten Angriffsort für antibakterielle Substanzen dar. Darüber hinaus ist es, aus der Membran herausgelöst, eines der potentesten Moleküle in Bezug auf die Aktivierung des Immunsystems.

Das *E. coli*-Lipid-A weist die stärkste Immunstimulationsaktivität auf und stimuliert Immunzellen im Blutkreislauf um proinflammatorischen Zytokine wie IL-1 β , TNF- α , IL-6, IFN- γ , IL-12, IFN inducible protein-10 (IP-10) zu produzieren. Außerdem werden eine Reihe chemotaktischer Zytokine produziert:

Monozyten chemotaktisches Protein-5 (MCP-5), IL-8, MIP-1 α und MIP-2, Prostaglandin E₂ (PGE₂) und NO (Medianos et al., 2005).

Pg-LPS ist weniger potent und induziert die Bildung geringerer Mengen an IL-1 β , TNF- α , IL-6, IP-10, MIP-1 und MIP-2. IFN- γ , MCP-5, IL-12 und NO wird noch weniger, wenn überhaupt produziert (Shapira et al., 1998; Hirschfeld et al., 2001). Shapira et al., 1998 konnte in seiner Studie zeigen, dass unterschiedliche *Pg*-Stränge unterschiedlich potent sein können.

LPS von paropathogenen Keimen wie *Pg*, *Aac*, *Pi*, *Fn*, *Bacteroides oralis* etc. stimulieren hGFB und induzieren die Expression von MCP-1, IL-1 β , IL-6, IL-8, MIP-1 und intrazelluläres Adhäsionsmolekül-1 (ICAM-1) (Takada et al., 1991; Tamura et al., 1992;

Hanazawa et al., 1993; Masaka et al., 1999). Das Endotoxin dieser Keime stimulieren die im Parodont vorkommenden Mastzellen und dendritischen Zellen. Es wird über CD14, LBP und MD-2 an TLR4 und TLR2 auf Immunzellen gebunden und stimuliert über eine intrazelluläre Reaktionskaskade deren Aktivierung. Es kommt zur B-Zellproliferation sowie die Produktion von Akut-Phase Proteinen. Weiters konnte beobachtet werden, dass LPS über TLR4 Signalwege ko-stimulierende Moleküle wie CD80/CD86 und MHCII hochexprimiert. Dadurch kommt es zur T-Zellaktivierung und zur Einleitung der adaptiven Immunantwort (Medzhitov 2001). Letztlich aktiviert LPS das Komplementsystem, Leukozyten werden chemotaktisch angelockt und die Phagozytose gesteigert (Medianos, 2005).

3.4.1.2 Fimbrien

Fimbrien findet man vorwiegend an der Oberfläche Gram-negativer Bakterien. Man kann zwei Klassen unterscheiden:

- a) die typ-spezifischen Fimbrien, die zur Interaktion mit anderen Bakterien oder Wirtszellen sowie der Anhaftung an weiche und harte Zelloberflächen dienen, und
- b) die F- oder Sex-Pilli, die länger sind als die typ-spezifischen (3-25µm).

Die Aufteilung und Anzahl variiert, der Spezies entsprechend, von 10-1000 Fimbrien/Zelle (Holt et. al, 1999). Der *Pg*-Strang ATCC 33277 besitzt zwei Typen von Fimbrien: *mfa1* (major fimbriae) mit 67 kDa und *fimA* (minor fimbriae) mit 41 kDa.

Fimbrien ermöglichen die Interaktion mit den Wirtszellen und anderen Bakterien. Die Zahnoberfläche ist mit einem Pellicel überzogen, die enthaltenen Speichelmoleküle fördern die Anhaftung von kommensalen Mikroorganismen. *Pg* kann mit diesen frühen Plaquebakterien koaggregieren, dazu zählen *Streptokokkenspezies* (*S. Gordonii*, *S. sanguis*, *S. oralis*, *S. mitis*, *S. crista*) und *Actinomyces naeslundii* (Goulbourne et al., 1991; Jenkinson et al., 1997; Lamont et al., 1992; 1994, Li et al., 1991; Nagata et al., 1990). *Pg* kann zudem an die Mundschleimhaut adhären, sowie spezifisch prolinreiche Proteine im menschlichen Speichel binden (Holt and Ebersole, 2005). Sie können an verschiedene Zellen des parodontalen Gewebes anhaften und eindringen, wie z. B. Epithelzellen (Sandros et al., 1994; Lamont et al., 1995; Belton et al., 1999; Rudney et al., 2001), Endothelzellen (Deshpande et al., 1998; Dorn et al., 2000) und Fibroblasten (Amornchat et al., 2003).

Fimbrien können die Immunantwort von Wirtszellen *in vitro* durch die Aktivierung von TLR2 und Leucocyte Function-Associated Antigen-1 (LFA-1) verändern (Asai et al., 2001; Ogawa et al., 2002; Hajishengallis et al., 2004). Zudem können sie die Produktion chemotaktischer Zytokine stimulieren sowie die Migration von Monozyten positiv beeinflussen (Ogawa and Hamada, 1994).

3.4.1.3 Proteasen

Viele Bakterien produzieren Proteasen, einerseits zum Zweck der Nahrungbeschaffung, andererseits bieten sie Schutz gegen die Entzündungsreaktion des Wirts (Holt et al., 1999). Diese Enzyme besitzen die Fähigkeit an Fibrinogen, Fibronectin und Laminin zu binden und diese abzubauen (Pike et al., 1996). Im Wirtsorganismus können sie TypI- und TypIV-Kollagen zerstören, die wesentliche Bestandteile des parodontalen Gewebes und der extrazellulären Matrixproteine (Fibrinogen, Laminin) sind (Holt and Ebersole, 2005).

Die beiden wichtigsten Cystinproteasen des *Pg* sind das Arginin-Gingipain (Rgp) und das Lysin-Gingipain (Kgp), die entsprechend Arginin und Lysin spalten können. *Pg* besitzt zwei Gene zur Kodierung Arg-X-spezifischer Proteinase und ein Gen, das eine Lys-X-spezifische Proteinase kodiert. Arg-X-spezifische Proteinase besitzen die Fähigkeit zur Aktivierung des Kinin- und des Komplementsystems (Komplementfaktoren C3 und C5 zu C3a und C5a), zur Störung der Funktion neutrophiler Granulozyten (Jagels et al., 1996; Nakayama et al., 1995), zur Inaktivierung von TNF- α (Calkins et al., 1998) und zur Modifizierung von Elastase. Zudem konnte die Beeinträchtigung von LBP und *CD14* auf humanen Monozyten und Gingivafibroblasten nachgewiesen werden, die zur Herabsetzung der LPS-Reaktion führte (Sugawara et al., 2000; Tada et al., 2002; Deschner et al., 2003; Duncan et al., 2004).

3.4.1.4 Hämolytin

Pg besitzt die Fähigkeit zur Hämagglutination (Duncan et al., 1993) und kann mindestens fünf Hämagglutinine bilden. Durch die Expression dieser Moleküle auf der Bakterienoberfläche soll einerseits der Prozess der Kolonisierung durch Bindung zwischen Bakterienzelle und aus Oligosacchariden bestehenden Rezeptoren auf menschlichen Zellen unterstützt werden (Lamont et al., 1998). Andererseits soll die Bindungsfähigkeit an Erythrozytenoberflächen begünstigt werden, da Hämin ein wesentlicher Nahrungsbestandteil des *Pg* darstellt (Lepine et al., 1996).

Seine hohe Virulenz gegenüber wirtseigenen parodontalen Gewebestrukturen ist voll und ganz auf seine Präferenz für Hämin und Peptide ausgerichtet, die zum Wachstum benötigt werden (Minhas et al., 1993; Genco et al., 1994; Smalley et al., 1996).

Da der Keim selbst keine siderotrophe Aktivität besitzt, exprimiert er häminabhängig verschiedene Außenmembranproteine, die sich auf seiner Oberfläche in Membranvesikel eingeschlossen befinden und zur Häminbindung fähig sind. Die erhöhte Präsenz von Erythrozyten in inflammatorisch verändertem Gingivalgewebe ist daher eine bedeutende Häminquelle (Chu et al., 1991). Dies bestätigt die These, dass die Produktion von Pathogenitätsfaktoren durch einen Mikroorganismus nicht allein vom Erreger selbst, sondern auch von dem ihn umgebenden Milieu abhängt. Zur Sicherung seiner Häminversorgung kann *Pg* auch andere häminbeinhaltende Stoffe wie Hämoglobin, Myoglobin, Katalase, Cytochrom C, Methämoglobin, Oxyhämoglobin, Albumin, Lactoperoxidase, Hämopexin und Haptoglobin verwenden (Bramanti and Holt, 1991; Fujimura et al., 1995; Smalley et al., 1998, 2002).

Die Schwarzpigmentierung des Keims resultiert ebenfalls aus der exogenen Häminakkumulation (Smalley et al., 1998, 2002).

4 Fragestellung

Diese *in vitro* Studie machte sich zur Aufgabe folgenden Fragen nachzugehen:

Wie verändert sich die Expression von TLR2, TLR4 und CD14 nach Stimulation mit aufsteigender Pg-LPS und E. coli-LPS Konzentration und sind die Expressionslevels konzentrationsabhängig?

Können Unterschiede in der Rezeptorenexpression zwischen dem Endotoxin von Pg und E. coli beobachtet werden?

*Inwieweit kann ein Unterschied zwischen der lokalen und der systemischen Entzündungsreaktion im *in vitro* Zellkulturmodell beobachtet werden?*

5 Studiendesign

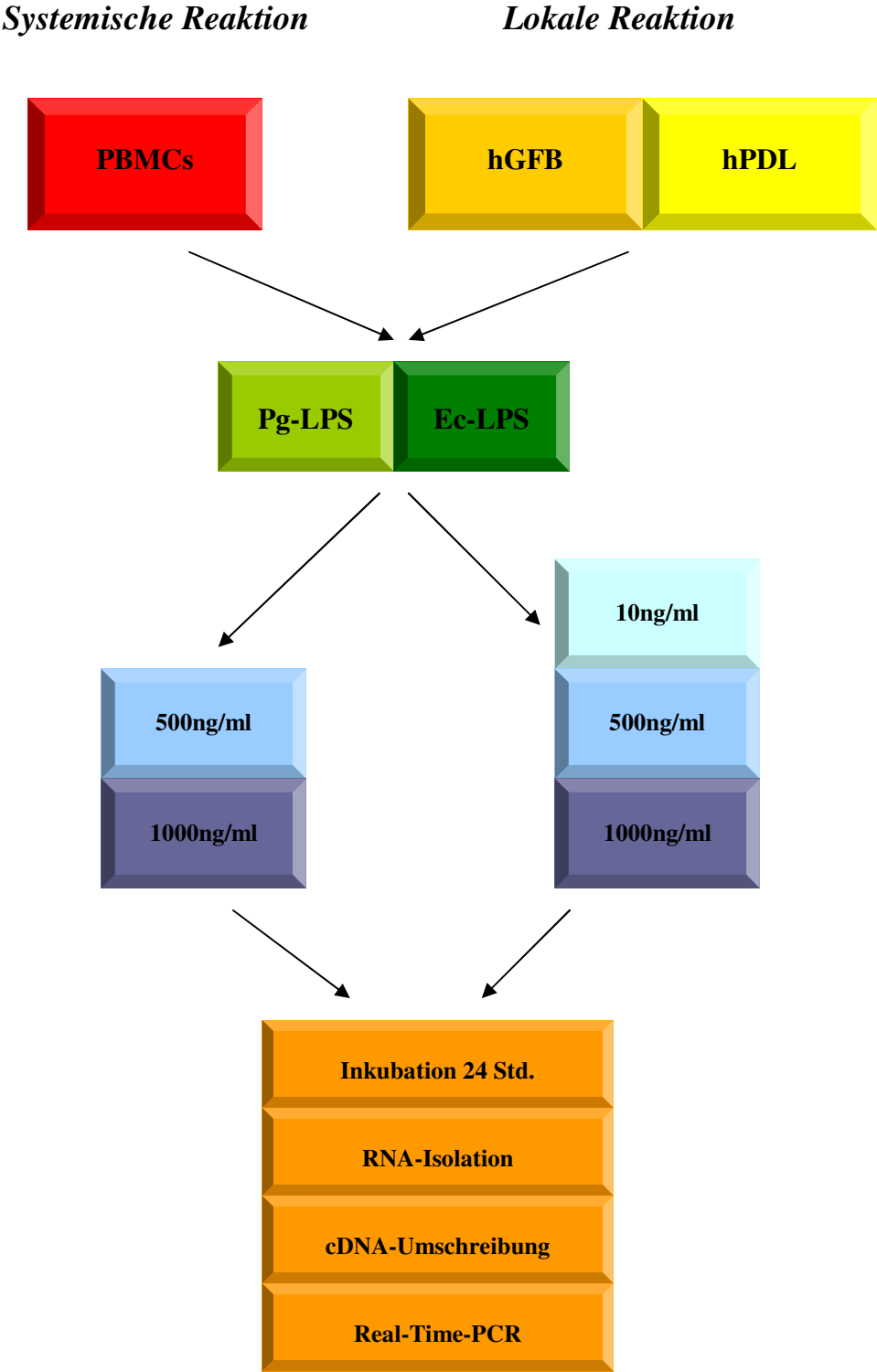


Abb. 7: Studiendesign

6 Material und Methoden

6.1 Zellen und Zellkultur

Für die Studie wurden hGFB und hPDL von extrahierten Weisheitszähnen parodontal gesunder Patienten isoliert. Alle Schritte der Zellgewinnung, Zellkultivierung und Stimulierung der Zellen erfolgte unter sterilen Bedingungen.

a) hGFB

Für die Isolierung hGFB wurden 1 mm² große Stücke aus der angrenzenden Gingiva der extrahierten Zähne gewonnen und in Petrischalen mit Dulbeccos modified Eagle Medium (DMEM) mit Zusatz von 10% fetalem Kälberserum (FCS), sowie Zugabe von je 1% Penicillin, Streptomycin und Glutamin (PSG) überführt und bei 37°C und 5% Kohlendioxid (CO₂)-Gehalt kultiviert.

Am nächsten Tag erfolgte ein vorsichtiger Mediumwechsel. Nach 2 bis 4 Tagen wuchsen Gingivafibroblasten aus den Gewebestücken heraus, diese konnten weiter gezüchtet werden. Sie wurden mittels Fibronectin-AK identifiziert.

b) hPDL

Für die Gewinnung von hPDL wurden diese von der Wurzeloberfläche der extrahierten Zähne mit einem Skalpell abgelöst und im Standardmedium DMEM mit 10% FCS sowie Zugabe von je 1% PSG bei 37°C und 5% CO₂-Gehalt in Zellkulturflaschen hochgezüchtet. Die Überprüfung, ob es sich auch wirklich um hPDL handelt, erfolgte mithilfe von AK und in einer anschließenden immunhistochemischen Alkalischen-Phosphatase-Färbung (käuflich erworben, Fa. Chemicon: Alkaline Phosphatase Detection Kit).

Mediumwechsel erfolgte für hGFB und hPDL 2-3-mal wöchentlich. Für den Versuch wurden Zellen der Passage 7 verwendet, nachdem zuvor der Zellrasen in den Zellkulturflaschen dicht angewachsen war. Die Zellanzahl wurde mittels Neubauer Zählkammer ermittelt und es wurden je 1x10⁶ Zellen in 6-well-plates überführt, die dann über Nacht im Brutschrank die Möglichkeit hatten einen Monolayerrasen auszubilden.

c) PBMCs

Für die Gewinnung von PBMCs wurde von vier parodontal gesunden Probanden Blut abgenommen. Die Zellen wurden mittels *Ficoll-Methode* aufbereitet:

Heparinisiertes Blut wurde mit HBSS (Hank's buffered salt solution) Puffer 1:2 verdünnt.

Davon wurden 4 ml im Zentrifugenröhrchen mit 3 ml Ficoll überschichtet und dieses dann bei 1300 rounds per minute (rpm) für 30 Minuten bei 18°C zentrifugiert.

Anschließend wurde der entstandene Ring, indem sich die PBMCs befinden, in HBSS Puffer überführt. Nach einem erneuten Zentrifugationsschritt von 1400 rpm für 10 Minuten, wurde das Pellet resuspendiert und noch einmal zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen in der Neubauer-Kammer gezählt, sofort in RPMI Medium überführt (käuflich erworben, Fa. Gibco: RPMI 1640 ohne Phenolrot) und in einer Zellkonzentration von 1×10^6 in 6-well-plates stimuliert.

6.1.1 Zellstimulation

a) hGFB, hPDL

Die Stimulation der einzelnen 6-well-plates erfolgte mit

- LPS von *Pg* in den Konzentrationen 10ng/ml 500ng/ml 1000ng/ml
(käuflich erworben bei der Fa. Invivogen: Pg-LPS 1mg Ultra Pure Strain 381)

- LPS von *E. coli* in den Konzentrationen 10ng/ml 500ng/ml 1000ng/ml
(käuflich erworben bei der Fa. Invivogen: 5mg Ultra Pure E.coli-LPS O111:B4)

b) PBMCs

Die Stimulation der einzelnen 6-well-plates erfolgte mit

- LPS von *Pg* in den Konzentrationen 500ng/ml 1000ng/ml

- LPS von *E. coli* in den Konzentrationen 500ng/ml 1000ng/ml

Für die Stimulationslösungen wurden die LPS-Konzentrationen genau berechnet in Medium (DMEM mit 10% FCS und 1% PSG für hGFB und hPDL, RPMI für PBMCs) gelöst. Je 3 ml LPS-versetztes Lösung wurde nach Entfernung des alten Mediums in ein 6-well transferiert.

Für die *Negativ-Kontrollen* wurde nur Medium verwendet.

Nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden wurden die Zellen 2-mal mit je 2 ml Phosphate-Buffered-Saline-Buffer (PBS) gewaschen.

Anschließend wurden die stimulierten Zellen mit 1ml Trizol® (siehe Kapitel 6.2) bedeckt. 10 Minuten später wurde der Inhalt jedes einzelnen wells in ein 2ml Eppendorf Röhrchen transferiert.

Um mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion genetisches Material zu vervielfältigen und zu untersuchen, musste RNA aus dem Gewebe gewonnen werden.

6.2 RNA Isolierung

Für die RNA-Isolierung wurde Trizol® (käuflich erworben, Fa. GibcoBRL) verwendet. Trizol® ist eine monophasische Lösung, bestehend aus Phenol und Guanidineisothiocyanat.

- 1.) Die in Trizol® enthaltenen Zellen wurden mit 200 µl Chloroform (CHCl₃) vermengt, bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend bei 11000 rpm für 15 Minuten bei 4°C zentrifugiert.
- 2.) Der hydrophile RNA Überstand wurde in neue Eppendorf Röhrchen überführt und mit 500 µl Isopropanol vermengt. Die beiden Lösungen wurden gut vermischt und anschließend für 10 Minuten auf Eis gelegt.
- 3.) Nach einer 10 minütigen Zentrifugation bei 11000 rpm und 4°C wurde der Überstand verworfen und mit 1 ml eiskaltem 75%igem Ethanol resuspendiert.
- 4.) Nach weiteren Zentrifugationsschritten bei 8000 rpm bzw. 15000 rpm wurde der Überstand komplett verworfen und auf Eis getrocknet.
- 5.) Das erhaltene weißliche RNA-Pellet wurde in 30 µl DEPC- Wasser aufgelöst.
- 6.) Inkubation von 10 Minuten bei 60°C.

Um eine Kontrolle der RNA hinsichtlich ihrer Reinheit zu erhalten wurde anschließend eine Gelkontrolle durchgeführt, die RNA wurde bis zum Gebrauch bei -80°C aufbewahrt:

6.2.1 Gelelektrophorese

Für die elektrophoretische Auftrennung der RNA wurde ein 1%iges Agarose-Formamid-Gel hergestellt und mit den Proben inkl. Gel loading buffer 1:1, bzw. 1:10 verdünntes red-stain (käuflich erworben Fa. Biorad, Radiant Red RNA Gel Stain), in den vorbereiteten Geltaschen beschickt. Als Laufpuffer diente MOPS (1x). Die RNA Proben wurden durch Anlegen einer elektrischen Spannung von 120 Volt aufgetrennt.

Die RNA wurde mittels Photometer (BioPhotometer Fa. Eppendorf) in einer Verdünnung von 1:100 gemessen. Es zeigten sich Banden im Bereich von 18S und 28S. Die Gelelektrophorese stellt eine qualitative Überprüfung dar.

6.3 Reverse Transkription

cDNA kann mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase aus RNA hergestellt werden. Diese RNA-abhängige DNA-Polymerase benötigt wie andere Polymerasen einen Primer (ein kurzer, komplementärer DNA-Abschnitt) zur Synthese, welcher an die RNA bindet. Meist werden als Primer Oligonukleotide oder Random Hexamere eingesetzt. (<http://de.wikipedia.org/wiki/CDNA>). In dem hier durchgeführten Experiment wurden Random Hexamere verwendet.

Für die Umwandlung von RNA in cDNA wurde ein Kit der Fa. Fermentas verwendet (First Strand cDNA Synthesis Kit).

Zusammensetzung des RT-Ansatzes

RNA 2,0 µg	
Random Hexamer Primer (0,2 µg/µl)	1 µl
DEPC-treated water	to 11 µl
Inkubation des Ansatzes bei 70°C für 5 Minuten	
5x reaction buffer	4 µl
RiboLock™ Ribonuclease Inhibitor (20U/µl)	1 µl
10mM dNTP mix	2 µl
Inkubation bei 25°C für 5 Minuten	
M-MuLV reverse transcriptase (20U/µl)	2µl
<hr/>	
Gesamtvolumen	20µl

Reagenzien und Proben wurden in den Zwischenschritten immer auf Eis gelagert.

Temperaturprofil der reversen Transkription

Anlagerung:	25°C 10 min
Synthese:	37°C 60 min
Denaturierung:	70°C 10 min
Lagerung:	4°C

6.4 Real-Time-PCR (RT-PCR)

Unter RT-PCR versteht man eine Vervielfältigungsmethode für Nukleinsäuren, die auf dem Prinzip der herkömmlichen Polymerase-Kettenreaktion (PCR) beruht, und zusätzlich die Möglichkeit der Quantifizierung bietet.

Ablauf einer herkömmlichen PCR:

Der PCR-Prozess besteht aus einer Anzahl von 25-50 Zyklen, die in einem Thermocycler durchgeführt werden. Jeder Zyklus besteht aus drei Schritten:

1. *Denaturierung (Melting, Schmelzen):* Zunächst wird die doppelsträngige DNA auf 94 - 96°C erhitzt, um Stränge zu trennen. Die Wasserstoffbrückenbindungen, die die beiden DNA-Stränge zusammenhalten, werden aufgebrochen. Im ersten Zyklus wird die DNA oft für längere Zeit erhitzt (*Initialisierung*), um sicherzustellen, dass sich sowohl die Ausgangs-DNA als auch die Primer vollständig voneinander getrennt haben und nur noch Einzelstränge vorliegen
2. *Primerhybridisierung (primer annealing):* Die Temperatur wird ca. 30 Sek lang auf 55 - 65°C gehalten, die eine spezifische Anlagerung der Primer an die DNA erlaubt.
3. *Elongation (Polymerisation, Verlängerung, Amplifikation):* Schließlich füllt die DNA - Polymerase die fehlenden Stränge mit freien Nukleotiden auf. Sie beginnt am 3'-Ende des angelagerten Primers und folgt dann dem DNA-Strang. Der Primer bildet den Anfang des neuen Einzelstrangs. Die Temperatur dieses Schrittes liegt zwischen 68 - 72°C je nach Arbeitsoptimum der verwendeten DNA-Polymerase. Nach Vollendung aller Zyklen kühlt der Thermocycler auf 4 - 8°C ab.

(<http://de.wikipedia.org/wiki/Polymerase-Kettenreaktion>)

Im Gegensatz zur klassischen PCR mit Endpunktdetektion wird bei der RT-PCR die Menge an gebildetem Produkt nach jedem Zyklus gemessen. Der Zyklus, bei dem eine bestimmte Produktmenge überschritten wird (Threshold), steht im logarithmischen Verhältnis zur Ausgangsmenge, dem sogenannten CT (Cycle Threshold) Wert.

Die Quantifizierung der RT-PCR wird mit Hilfe von Fluoreszenz-Messungen am Ende bzw. während eines PCR-Zyklus (daher der Name „Real Time“) durchgeführt. Die Fluoreszenz nimmt proportional mit der Menge der PCR-Produkte zu, was eine Quantifizierung möglich macht. Eine gelelektrophoretische Auftrennung der Fragmente ist nicht nötig. Die Daten sind sofort verfügbar und das Kontaminationsrisiko ist gering.

6.4.1 TaqMan®-Sonden

TaqMan®-Sonden sind kurze DNA-Stücke, die mit dem mittleren Bereich der Template-DNA hybridisieren und an ihrem einen Ende mit dem Quencher (Q), an ihrem anderen Ende mit einem Reporter-Fluoreszenzfarbstoff (R, z. B. TAMRA und FAM) markiert sind. Q sind Moleküle, welche die Fluoreszenz von Farbstoffen in ihrer Nähe abfangen.

Wenn die Taq-Polymerase, die zusätzlich eine Exonuclease-Aktivität besitzt, die Sonde während der Synthese des Gegenstranges am 5'-Ende abbaut, entfernen sich dadurch Quencher und Fluorophor voneinander, und eine steigende Reporter-Fluoreszenz kann gemessen werden. Auf diese Weise wird die Fluoreszenz des Farbstoffes nur dann messbar, wenn die Polymerase tatsächlich den gewünschten DNA-Strang kopiert hat. Jedes freigesetzte Molekül an Reporterfarbstoff steht daher für einen gebildeten DNA-Strang.



Abb. 8: Quantifizierung von Nucleinsäuren mit Hilfe der Real-time-PCR und TaqMan®-Sonden. (1) Die Fluoreszenz des Reporter-Fluorophors wird bei intakten TaqMan®-Sonden durch einen Quencher durch strahlungsfreie Energieübertragung unterdrückt. (2) Während eines PCR-Zyklus hybridisiert die Sonde mit dem komplementären DNA-Strang, die Reporter-Fluoreszenz bleibt zunächst unterdrückt. (3) Die Taq-Polymerase baut aufgrund ihrer Exonucleaseaktivität das 5'-Ende der Sonde während der PCR-Zyklen ab. Die Fluoreszenz des Reporters wird nun nicht mehr durch den Quencher gelöscht und kann gemessen werden (http://de.wikipedia.org/wiki/Real_time_quantitative_PCR).

6.4.1.1 Probenbearbeitung

Die Proben wurden in 96-well-plates, passend für das Gerät der Fa. Applied Biosystems, 7000 Sequence Detection System, pipettiert. Zunächst wurde der Reaktionsansatz, der für die drei untersuchten Rezeptoren TLR2, TLR4 und CD14 in der Primerzugabe unterschiedlich war, dann in einem zweiten Schritt die cDNA mit Aqua dest (A.d.) verdünnt, in die wells pipettiert. Dieser Schritt erfolgte unter sterilen Bedingungen auf Eis. Es wurden ausschließlich sterile und gestopfte Pipettenspitzen verwendet, um das Kontaminationsrisiko zu minimieren. Die Proben für die RT-PCR wurden in Triplicates angesetzt. Als Negativkontrolle wurde für jedes Gen ein Reaktionsansatz ohne cDNA, nur mit A.d. mitgeführt. Als Referenzgen diente β -Aktin.

Alle Primer wurden von der Fa. Applied Biosystems käuflich erworben:

- β -Aktin (Hs 99999903_m1)
- TLR2 (Hs 00610101_m1)
- TLR4 (Hs 00152939_m1)
- CD14 (Hs 00169122_g1)

Zusammensetzung des RT-PCR-Ansatzes/well

PCR Puffer	3,0 μ l
MgCl ₂	6,6 μ l
dNTP	6,0 μ l
Oligo dT	1,5 μ l
RNAsin	0,6 μ l
MuLV	0,75 μ l
<hr/>	
	18,45 μ l
+ cDNA + A. d.	11,55 μ l
<hr/>	
pro Ansatz	30,00 μ l

Temperaturprofil der PCR (Universal Thermal Cycling Protocol Applied Biosystems)

Initiation	95°C	10 min	
Hybridisierung	60°C	60 sek	} 40 Zyklen
Elongation	60°C	60 sek	
Denaturierung	95°C	15 sek	
Lagerung	4°C		

7 Resultate

a) Berechnung der Ergebnisse

Die Ergebnisse der RT-PCR wurden mittels $\Delta\Delta\text{CT}$ Methode berechnet und zeigen die relative Genexpression. Als housekeeping-gene wurde β -Aktin verwendet, als Kalibratoren dienten die Negativkontrollen der Zellkultur.

Die Ergebnisse wurden in Diagrammen mittels Microsoft Office Excel 2003 dargestellt. Nachdem der Kalibrator gleichzeitig die Negativkontrolle war, stellen alle Ergebnisse Überexpressionen dar und der 0-Punkt auf der x-Achse entspricht dem Level der Negativkontrolle. Das Experiment wurde zur Replizierbarkeit wiederholt.

b) Statistik

Die statistische Analyse wurde mit Hilfe des SPSS Statistikprogrammes, Version 13.0, durchgeführt und der One-way-ANOVA-Test angewandt. Als Schwellenwert für das Bestehen statistischer Signifikanz wurde *: $p \leq 0.05$ und **: $p \leq 0.01$ gewählt.

Die Diagramme zeigen die Resultate von 3 wiederholten Experimenten unter gleichen Experimentbedingungen. Die Daten werden als Mittelwerte des Standardfehlers präsentiert.

7.1 Expression von TLR2, TLR4 und CD14 nach Stimulation mit unterschiedlichen Konzentrationen von Pg-LPS und E. coli-LPS

7.1.1 Humane Gingivafibroblasten

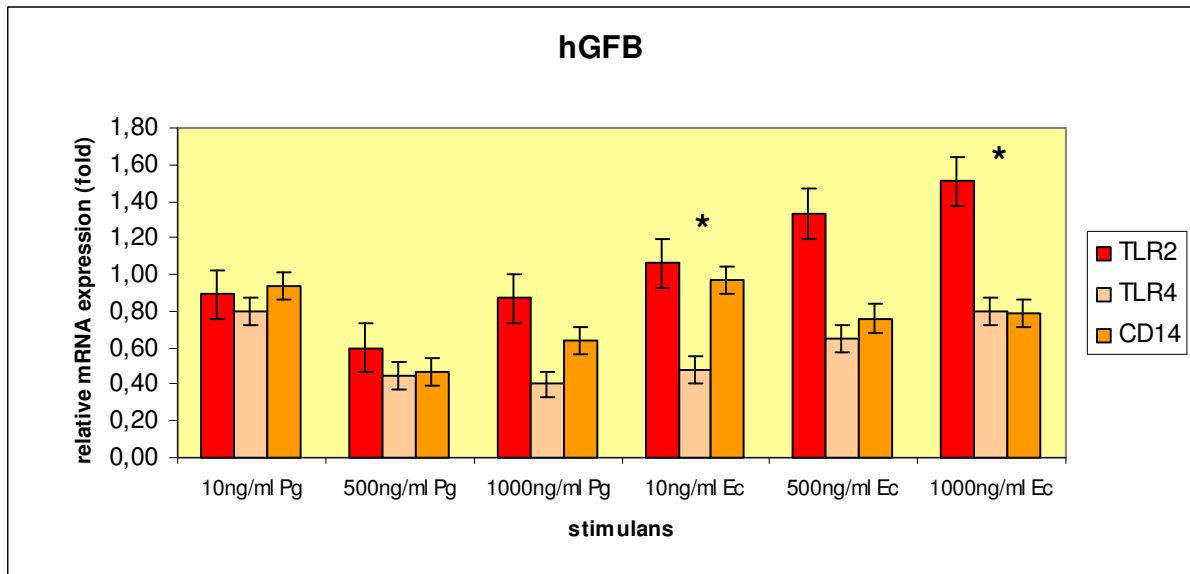


Abb. 9: Expression von TLR in hGFB

Stimulation mit Pg-LPS

Alle drei Rezeptoren zeigen in der niedrigsten Konzentration von 10ng/ml die höchsten Expressionen. Während der TLR4-Spiegel mit größerer Stimulationsmenge sinkt, steigen TLR2 und CD14 nach einem Tief in der Konzentration 500ng/ml bei 1000ng/ml wieder an. TLR2 erreicht wieder sein Ausgangslevel und ist generell der Rezeptor, der mit *Pg*-LPS am stärksten exprimiert wird.

Stimulation mit *E.coli*-LPS

TLR2 wird am stärksten exprimiert und zeigt wie TLR4 mit zunehmender LPS-Konzentration erhöhte Expressionswerte. CD14 zeigt in der niedrigsten Stimulationskonzentration das höchste Resultat. hGFB werden von *E. coli*-LPS stärker stimuliert.

Es zeigen sich signifikante Ergebnisse, *: $p \leq 0,05$, in den Konzentrationen 10ng/ml und 1000ng/ml.

7.1.2 Humane Periodontalligamentzellen

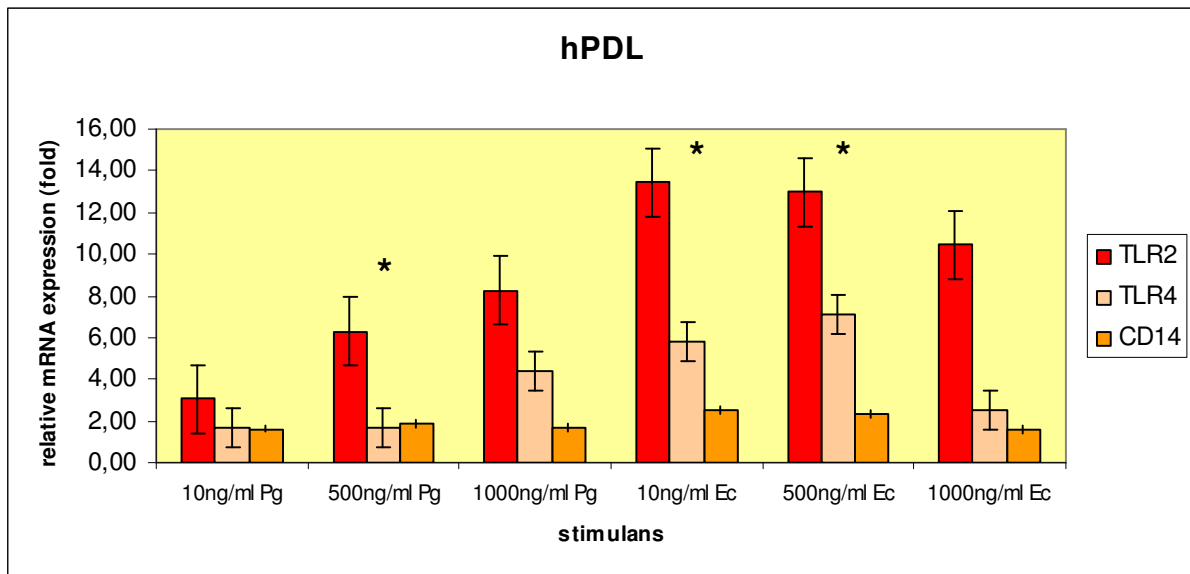


Abb. 10: Expression von TLR in hPDL

Stimulation mit *Pg*-LPS

TLR2 wird mit aufsteigender LPS-Konzentration vermehrt exprimiert, auch TLR4 zeigt einen deutlichen Anstieg bei Stimulierung mit 1000ng/ml. CD14 reagiert in allen drei Stimulationskonzentrationen mit gleichen Expressionslevel. In der Stimulationskonzentration von 500ng/ml *Pg* zeigte sich ein signifikantes Ergebnis *: $p \leq 0.05$.

Stimulation mit *E.coli*-LPS

TLR2 weist die höchsten Expressionslevels auf, wobei man beobachten kann, dass die höchste Expression in der geringsten Stimulierungskonzentration auftritt und das Ergebnis mit steigender LPS-Konzentration abnimmt. Auch TLR4 zeigt bis zur Konzentration von 500ng/ml eine Erhöhung sinkt dann aber auch ab. CD14 ist in allen LPS-Konzentrationen etwa gleich stark exprimiert.

Bei Stimulation mit 10ng/ml und 500ng/ml *E. coli*-LPS konnten signifikante Unterschiede festgestellt werden **: $p \leq 0.05$.

TLR2 ist der Rezeptor, der in hPDL am stärksten exprimiert wird und erreicht durch Stimulation mit *E. coli*-LPS höhere Expressionslevels als durch *Pg*-LPS. CD14 ist zwar exprimiert, der Rezeptor zeigt aber keinerlei Veränderung durch ansteigende Stimulationskonzentration oder veränderten Stimulans.

7.1.3 PBMCs

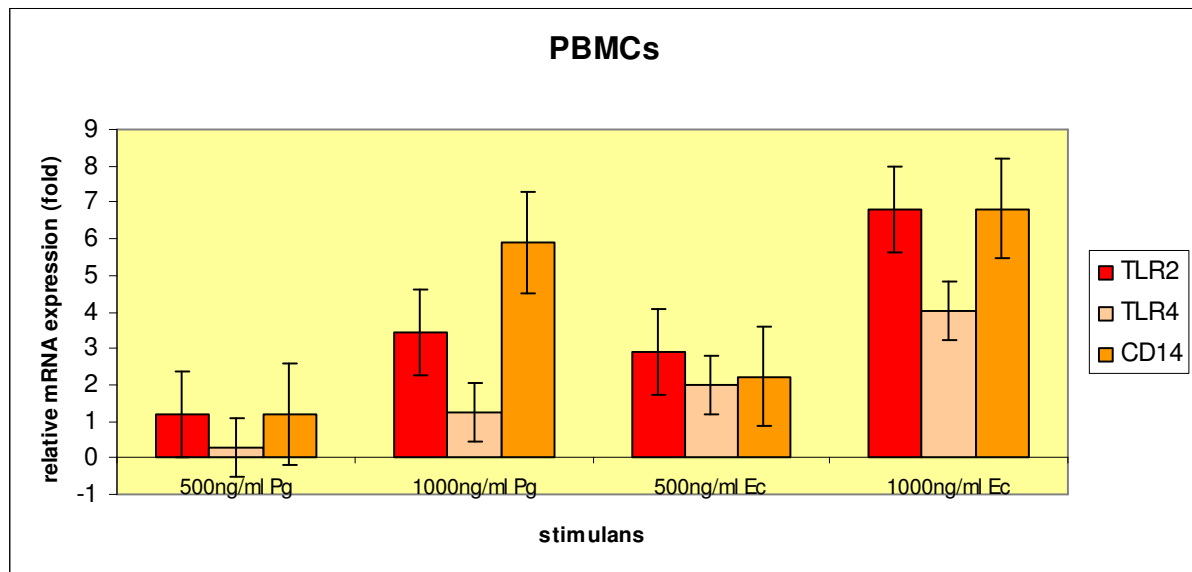


Abb. 11: Expression von TLR in PBMCs

Stimulation mit Pg-LPS

CD14 zeigt den höchsten Anstieg, gefolgt von TLR2. Alle drei Rezeptoren werden mit zunehmender Stimulationskonzentration verstärkt exprimiert.

Stimulation mit E.coli-LPS

TLR2, TLR4 und CD14 zeigen mit steigender Stimulierung erhöhte Level. TLR2 und CD14 sind in etwas gleich stark exprimiert.

E. coli-LPS zeigt auch bei PBMCs in allen drei Rezeptoren höhere Expressionslevels als *Pg*-LPS.

7.2 Vergleich der Rezeptorenexpression zwischen hGFB, hPDL und PBMCs

7.2.1 TLR2

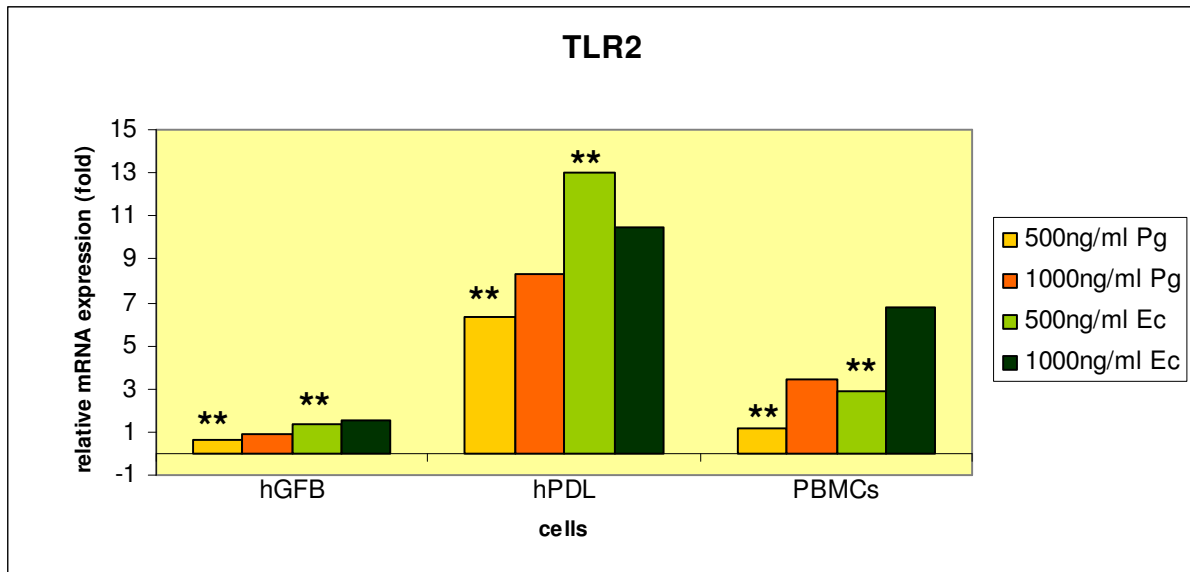


Abb. 12: TLR2 Expression in hGFB, hPDL und PBMCs

hGFB

Diese Zelllinie zeigt die geringste Reaktion nach Stimulation von *Pg*-LPS und *E. coli*-LPS in Bezug auf die TLR2 Expression.

hPDL

TLR2 wird in hPDL von *Pg*-LPS als auch von *E. coli*-LPS in beiden Konzentrationen am stärksten exprimiert.

PBMCs

PBMCs zeigen ebenfalls mit steigender Stimulation höhere Werte.

Bei Stimulation mit 500ng/ml *Pg*-LPS und 500ng/ml *E. coli*-LPS konnten stark signifikante Unterschiede festgestellt werden **: $p \leq 0.01$.

7.2.2 TLR4

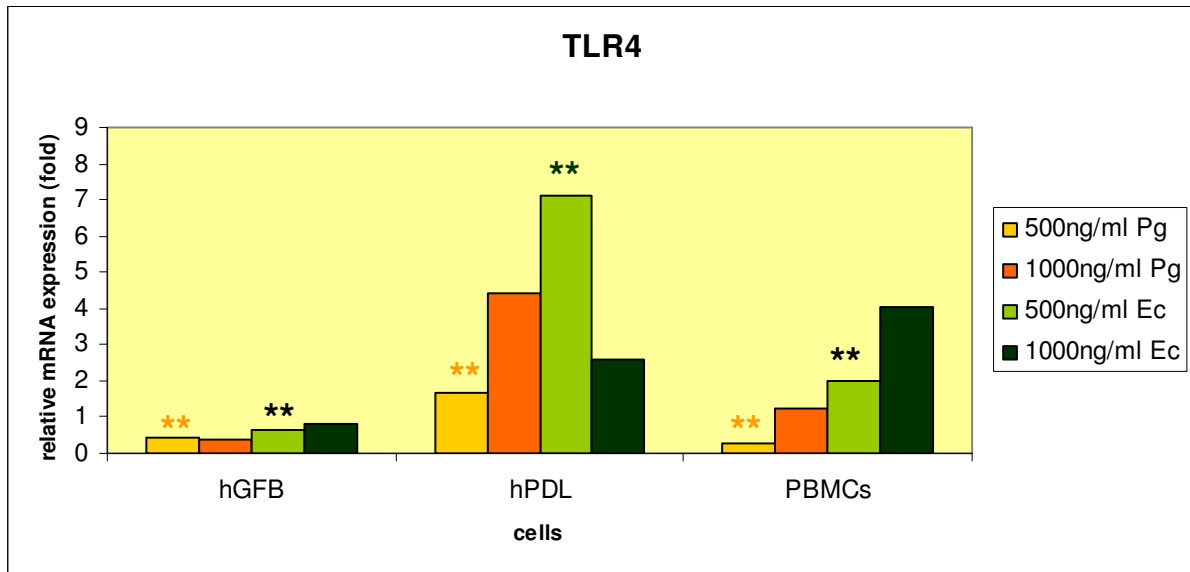


Abb. 13: TLR4 Expression in hGFB, hPDL und PBMCs

hGFB

TLR4 wird in hGFB sehr schwach exprimiert.

hPDL

TLR4 wird in hPDL am stärksten exprimiert. Während *Pg*-LPS mit steigender Konzentration den Rezeptor hochreguliert, kommt es bei Stimulierung mit *E. coli*-LPS zu einem rückläufigen Ergebnis in der höchsten Stimulationskonzentration.

PBMCs

In PBMCs wird TLR4 mit zunehmender LPS-Konzentration sowohl von *Pg*-LPS als auch von *E. coli*-LPS hochreguliert.

Bei Stimulation mit 500ng/ml *Pg*-LPS und 500ng/ml *E. coli*-LPS konnten stark signifikante Unterschiede festgestellt werden **: $p \leq 0.01$.

7.2.3 CD14

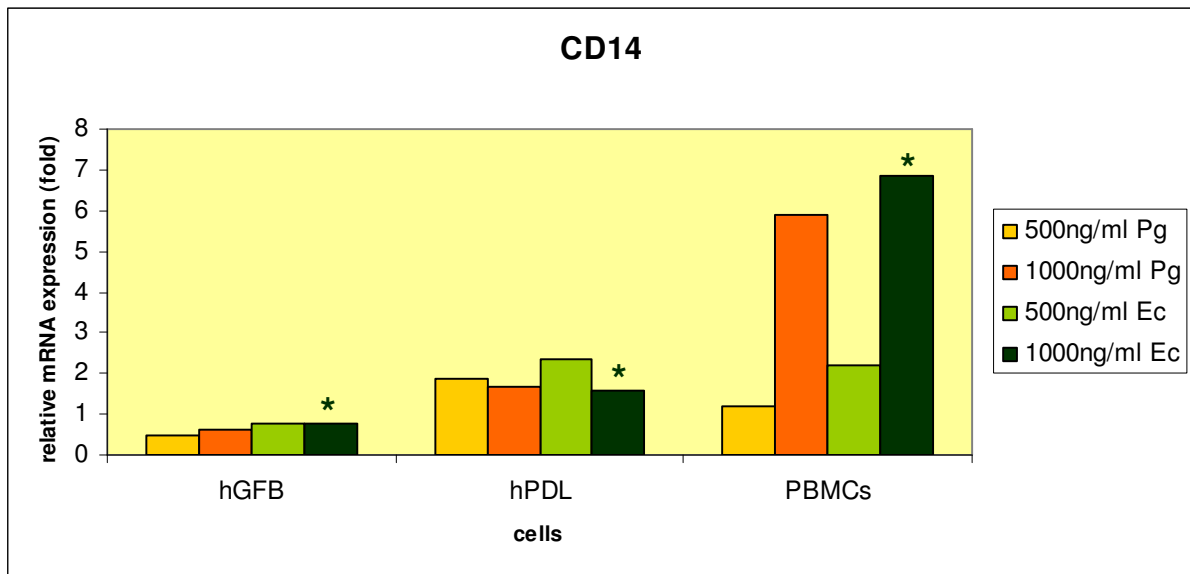


Abb. 14: CD14 Expression in hGFB, hPDL und PBMCs

hGFB

CD14 wird wie schon zuvor TLR2 und TLR4 von hGFB kaum exprimiert.

hPDL

In dieser Zellart kommt es im Gegensatz zu TLR2 und TLR4 zu einer kaum nennenswerten Expression. Höhere LPS-Konzentrationen zeigen sogar geringere Level an Rezeptoren.

PBMCs

In PBMCs zeigt sich ein deutlicher CD14 Anstieg mit zunehmender *Pg*- als auch *E. coli*-LPS Konzentration.

Bei Stimulation mit 1000ng/ml *E. coli*-LPS konnte ein signifikanter Unterschied festgestellt werden *: $p \leq 0.05$.

8 Diskussion

Ziel dieser Studie war die Expression von TLR2, TLR4 und CD14 in hGFB, hPDL und PBMCs nach konzentrationsabhängiger Stimulation mit *Pg*-LPS und *E. coli*-LPS miteinander zu vergleichen. Es sollte eine Aussage getroffen werden, ob die Expressionslevel konzentrationsabhängig sind und/ oder stimulansabhängig (*Pg*-LPS versus *E. coli*-LPS).

Zudem sollten mögliche Unterschiede zwischen der lokalen (hGFB, hPDL) und der systemischen Immunreaktion (PBMCs) aufgezeigt werden.

Unterschiede in der Expression von TLR2, TLR4 und CD14

TLR2 ist in hGFB und hPDL der Hauptrezeptor für die Weiterleitung von Signalen, wobei anzumerken ist, dass TLR2 in hGFB sehr schwach exprimiert wird. Weiters zeigt dort die Stimulation mit *E. coli*-LPS einen konzentrationsabhängigen Expressionsverlauf. Dasselbe Resultat wird nach Stimulation mit *Pg*-LPS in hPDL ersichtlich. In PBMCs wird TLR2 sowohl von *Pg*-LPS als auch von *E. coli*-LPS in höherer Konzentration stärker exprimiert.

Diese Ergebnisse gehen mit denen von Burns et al., 2006 konform: Er zeigte, dass die LPS Erkennung von *Pg* vorwiegend über TLR2 ins Zellinnere weitergeleitet wird und untersuchte wild-type (WT) Mäuse, sowie TLR2- bzw. TLR4 defiziente Mäuse nach Stimulation mit LPS von lebenden *Pg*. Er kam zum Resultat, dass die Zytokinantwort via TLR2 schneller (IL-1 β), variationsreicher (IFN- γ) und stabiler (IL-1 β , IFN- γ , TNF- α , IL-10) ist.

Ebenso demonstrierte Kikkert et al. (2007), dass die Signalübertragung nach Stimulation Gram-negativer Bakterien, darunter *Pg* v. a. über TLR2 abläuft. Er meinte, dass dieser Mechanismus die Th2 orientierte Immunantwort, die bei Parodontitis beobachtet wird, erklären könnte.

TLR4 wird in allen drei Zellarten eindeutig weniger exprimiert als TLR2. In PBMCs zeigt dieser Rezeptor sowohl nach Stimulation mit *Pg*-LPS, als auch mit *E. coli*-LPS eindeutig eine konzentrationsabhängige Zunahme. In hGFB ist die Expression wiederum sehr gering. Es kann aber beobachtet werden, dass der Rezeptor mit steigender *Pg*-LPS Konzentration

herunterreguliert wird. Dieses Resultat beschrieb auch Wang et al, 2001. Er war es auch, der als erster die Expression von TLR4 auf der Oberfläche von hGFB mittels Flowzytometrie und Western Blot nachgewiesen hat.

Mit dem Thema von Unterschieden in der Expression zwischen TLR2 und TLR4 bei Gingivitis und chronischer Parodontitis beschäftigte sich Sarah et al., 2006. Die Resultate zeigten, dass die Expression von TLR2 bei Gingivitis im Vergleich zu TLR4 erhöht, wogegen bei chronischer Parodontitis die TLR4 Expression verglichen mit TLR2 signifikant erhöht waren.

CD14 ist der Hauptrezeptor in PBMCs und wird mit steigender LPS-Konzentration stärker exprimiert. In hGFB tritt er wiederum gering in Erscheinung und zeigt wie CD14 in hPDL nach LPS-Stimulation kaum Veränderung in der Expression.

2003 verglich Hatakeyama et al die Expression von mCD14 und konnte mittels FACS nachweisen, dass dieses beim selben Probanden in hGFB stärker exprimiert wurde als in hPDL. Weiters wurden Unterschiede in der Expression des Zytokins IL-8 untersucht: Beide Zellarten wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen von LPS Gram-negativer Bakterien (*Salmonella enterica*) und Fragmenten von Peptidoglycan (*S. epidermidis*), einem Zellwandbestandteil Gram-positiver Bakterien, die in der Endodontie eine Rolle spielen, stimuliert. Er beobachtete, dass die Freisetzung von IL-8 nach Stimulation mit LPS CD14 und TLR4- abhängig war, in hGFB somit dosisabhängig erhöht, in hPDL entsprechend niedrig war. Man vermutete, dass der geringe Level von CD14 in hPDL ausschlaggebend war, wurden doch andere Moleküle des TLR-Signalweges (TLR4, MD-2, *MyD88*) ungefähr gleich stark in beiden Zelllinien exprimiert. Hingegen konnten erhöhte Expressionlevels von IL-8 in hPDL, im Vergleich zu hGFB, nach Stimulation mit Peptidoglycan nachgewiesen werden. Der Signalweg lief hier über CD14 und TLR2, was durch die erhöhte TLR2-Expression bei hPDL erklärt werden kann.

Unterschiede zwischen hGFB, hPDL, PBMCs

Wenn man die einzelnen Zelltypen für sich betrachtet zeigt sich, dass in **hGFB** TLR2 am stärksten exprimiert wird, gefolgt von CD14 und TLR4. Die Werte fallen allerdings wie bereits erwähnt im Vergleich zu hPDL und PBMCs sehr gering aus. hGFB bilden den

Hauptbestandteil des parodontalen Gewebes. Diese Zellart exprimiert *TLR2*, *TLR4* und *TLR9* (Nonnenmacher et al., 2004; Tabeta et al., 2000; Wang et al., 2000) und Moleküle, die mit TLR in Verbindung stehen wie CD14 und *MyD88* (Hatakeyama et al., 2003; Hiraoka et al., 1998; Tabeta et al., 2000). Wang et al. demonstrierte 2003 mittels DNA Analysen, dass die Expression von TLR2, TLR4 und CD14 in hGFB bei Probanden mit Parodontitis höher ist, als bei parodontal Gesunden.

In **hPDL** wird ebenfalls TLR2 am deutlichsten hochreguliert, dann TLR4 und CD14. Dort zeigt sich die stärkste Expression von TLR2 und TLR4 im Vergleich zu den beiden anderen Zelltypen. Zellen des periodontalen Ligaments exprimieren TLR2, TLR4, CD14, MD-2 und *MyD88*. Hatakeyama et al., 2003 belegte in seiner Studie, dass hGFB verglichen mit hPDL im selben Probanden eine schwächere Expression von CD14, dafür höhere TLR2 Levels zeigten. Die hier verwendeten hGFB und hPDL stammen nicht vom selben Patienten, daher ist ein Vergleich auch nicht angebracht. Es wäre dennoch interessant, das Ergebnis von Hatakeyama zu überprüfen, da die hier erhaltenen Resultate eindeutig zeigen, dass die Rezeptoren in hGFB sehr viel geringer exprimiert werden als in hPDL.

CD14 ist der vorherrschende Rezeptor in **PBMCs**, vor TLR2 und TLR4. Diese Zellart reagiert auch deutlich auf die Stimulierung mit LPS beider Bakterien.

Unterschiede zwischen Pg-LPS und E. coli-LPS

LPS von *E. coli* zeigt höhere Expressionswerte als die entsprechende *Pg*-LPS Konzentration. Interessant erscheint, dass die höchste *E. coli*-Konzentration (1000ng/ml) in hPDL alle drei Rezeptoren herunterreguliert.

Unterschiede zwischen lokaler und systemischer Immunreaktion

hGFB und hPDL vertreten in der hier angeführten *in vitro* Studie die lokale Immunreaktion, PBMCs die systemische.

Folgende Unterschiede wurden festgestellt:

Es zeigte sich, dass die lokale Immunantwort in hGFB und hPDL nach Stimulierung mit LPS

des paropathogenen Leitkeims *Pg* und dem Endotoxin von *E. coli* via TLR2 abläuft.

Die systemische Immunantwort in PBMCs wird vor allem über CD14 aktiviert, gefolgt von TLR2.

In einer kürzlich erschienenen Studie von Kajita et al. (2007) wurde erstmals die Expression von *TLR5*, *TLR7* und *TLR9* zusätzlich zu *TLR2* und *TLR4* untersucht, da auch Viren, wie z. B. Herpesvirus (HSV Typ 1 und 2), EBV und humanes CMV, in der Pathogenese der Parodontitis eine Rolle spielen (Slots, 2005). Es konnte beobachtet werden, dass *TLR2*, *TLR4*, *TLR7* und *TLR9* bei parodontalen Läsionen im Vergleich zur Gingivitis signifikant hochreguliert werden. Es zeigt sich also, dass die Erforschung der TLR im Bereich der Parodontitis noch lange nicht abgeschlossen ist.

9 Conclusio

Zellen des Parodonts wie hGFB und hPDL sind an der natürlichen Immunabwehr gegen den bakteriellen Biofilm ebenso beteiligt wie systemisch wirkende Zellen im Blutkreislauf. Sie exprimieren unterschiedlich viele Typen an Rezeptoren, darunter TLR, und haben die schwierige Aufgabe, zwischen kommensalen Erregern und pathogenen bzw. paropathogenen Keimen zu unterscheiden. Endotoxine dieser Bakterien, wie LPS, können eine Signalkaskade *via* TLR aktivieren, die über Second-Messenger Systeme zur Translokation von Transkriptionsfaktoren führen und in weiterer Folge die Produktion von Entzündungsmediatoren und möglicherweise auch die Aktivierung anderer Immunzellen anregen.

Diese *in vitro* Studie machte sich zur Aufgabe, die erste Bindungsstelle von LPS eines Keimes mit nachweislich hohem Toxingehalt, *E. coli*, und dem Leitkeim der chronischen Parodontitis, *Pg*, zu untersuchen. Es sollten Unterschiede in der Expression der untersuchten Rezeptoren TLR2, TLR4 und CD14 nach Stimulation in ansteigender LPS-Konzentration dargestellt werden. Die dafür verwendeten Zellen waren - stellvertretend für die lokale Immunreaktion – hGFB und hPDL und - für die systemische Immunantwort – PBMCs.

Die Ergebnisse zeigen, dass die „lokale“ LPS-Bindung in hGFB und hPDL *via* TLR2 abläuft. Es konnte auch beobachtet werden, dass die Expression der Rezeptoren in hPDL sehr viel höher ausfällt als in hGFB. Möglicherweise sind hPDL aufgrund ihrer anatomischen Funktion und Lage bereits sensibler ausgestattet und reagieren deswegen stärker auf LPS als hGFB. Im Vergleich zeigte die systemische Reaktion von PBMCs, dass Endotoxine hauptsächlich an CD14 binden. Diese Moleküle besitzen keine intrazelluläre Domäne und sind somit nicht allein imstande, Transkriptionsfaktoren zu aktivieren. Auch hier muß es zur Bindung an TLR2 und TLR4 oder anderen, hier nicht untersuchten TLR kommen.

Obwohl insgeheim erwartet wurde, dass LPS von *Pg*, der als Leitkeim für chronische Parodontitis bekannt ist, vor allem lokal TLR verstärkt exprimiert, zeigt diese Studie andere Ergebnisse. Es scheint, dass nicht die Art des Bakteriums, sondern vor allem das Toxin für das Ausmaß der Entzündung verantwortlich ist. Das bedeutet, dass durchaus auch nicht

paropathogene Bakterien, an der Entstehung der Parodontitis mitbeteiligt sind. Diese Möglichkeit der Wechselwirkung könnte auch Zusammenhänge zwischen Allgemeinerkrankungen wie z. B. Morbus Crohn, einer chronisch entzündlichen Darmerkrankung, oder Lupus erythematodes, einer systemischen Autoimmunerkrankung, erklären. Beide Krankheitsbilder weisen orale Manifestationen auf. Umgekehrt kann es bei einer massiven Parodontitis zur Ausschwemmung paropathogener Bakterien kommen, und infolge dessen eine Endokarditis verursacht werden. Beide Systeme – die lokale und die systemische Immunreaktion – dürfen deswegen nicht getrennt voneinander beurteilt werden, weil sie sich ergänzen und voneinander abhängig sind.

10 Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1:* TLR und ihre Liganden. Takeda, K., Akira, S. (2005): Toll-like receptors in innate immunity. *Internat. Immunology*, 17 (1), 1-14.
- Abb. 2:* TLR Signalweg. Takeda, K., Akira, S. (2005): Toll-like receptors in innate immunity. *Internat. Immunology*, 17 (1), 1-14.
- Abb. 3:* Expression von mRNA in Toll-like receptors (TLR) in verschiedenen Zelltypen des Parodonts. Mahanonda, Rangini & Pichyangkul, Sathit: Toll-like receptors and their role in periodontal health and disease. *Periodontology 2000*, 43(1):41-55.
- Abb.4:* Erkennung von LPS durch Immunzellen
<http://www.new-science-press.com/browse/immunity/3/10/>
- Abb. 5:* Elektronenmikroskopische Aufnahme von Pg
<http://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Porphyromonas>
- Abb. 6:* Chemische Struktur von LPS
<http://edoc.hu-berlin.de/dissertationen/hallatschek-werner-2004-10-20/HTML/chapter1.htm>
- Abb. 7:* Studiendesign
- Abb. 8:* Quantifizierung von Nucleinsäuren mit Hilfe der Real-time-PCR und TaqMan[®]-Sonden. http://de.wikipedia.org/wiki/Real_time_quantitative_PCR
- Abb. 9:* Expression von TLR in hGFB
- Abb. 10:* Expression von TLR in hPDL
- Abb. 11:* Expression von TLR in PBMCs
- Abb. 12:* TLR2 Expression in hGFB, hPDL und PBMCs
- Abb. 13:* TLR4 Expression in hGFB, hPDL und PBMCs
- Abb. 14:* CD14 Expression in hGFB, hPDL und PBMCs

11 Literaturverzeichnis

- Akira S** (2003): Toll-like receptor signalling. *J. Biol. Chem.*, 278:38105-38108.
- Amornchat C**, Rassameemasmaung S, Sripairojthikoon W., Swasdison S (2003): Invasion of Porphyromonas gingivalis into human gingival fibroblasts in vitro. *J Int Acad Periodontol*, 5:98-105.
- Anderson KV**, Nüsslein-Volhard C. (1984): Information for the dorsal-ventral pattern of the Drosophila embryo is stored as maternal mRNA. *Nature*, 311:223-227.
- Andrian E**, Grenier D., Rouabhia M. (2006): Porphyromonas gingivalis-epithelial cell interactions in Periodontitis. *J Dent Res*, 85(5):392-403.
- Au WC**, Moore PA, Lowther W, Juang YT, Pitha PM (1995): Identification of a member of the interferon regulatory factor family that binds to the interferon stimulated response element and activates expression of interferon-induced genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 92: 11657-11661.
- Bauer S**, Wagner H (2002): Bacterial CpG-DNA licenses TLR9. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 270: 145-154.
- Beck J**, Garcia R, Heiss G, Vokonas PS, Offenbacher S. (1996): Periodontal disease and cardiovascular disease., *J Periodontol.*, 67(10 Suppl):1123-1137.
- Beck JD**, Offenbacher S, Williams R, Gibbs P, Garcia R (1998): Periodontitis: A risk factor for coronary heart disease. *Ann Periodontol.*, 3(1):127-141.
- Belton CM**, Izutsu KT, Goodwin PC, Park Y, Lamont RJ (1999): Fluorescence image analysis of the association between Porphyromonas gingivalis and gingival epithelial cells. *Cell Microbiol*, 1: 215-223.
- Belvin MP**, Anderson KV (1996): A conserved signaling pathway: The Drosophila toll-dorsal pathway. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 12: 393-416.
- Berger U** (1955): Mikrobiologie der Mundhöhle. Urban & Schwarzenberg, München Berlin.
- Berger U** (1965): Das physiologisch-bakteriologische Milieu der Mundhöhle im Altersablauf aus der Sicht der Bakteriologen. *Dtsch Stomatol*, 15: 27-35.
- Beutler B**, Rietschel ET (2003): Innate immune sensing and its roots: The story of endotoxin. *Nat.Rev.Immunol.*, 3: 169-176.
- Bockman RS**, Repo MA (1981): Lymphokine-mediated bone resorption requires endogenous prostaglandin synthesis., *J Exp Med.*, 154(2):529-534.

- Bramanti TE**, Holt SC (1991): Roles of porphyrins and host iron transport proteins in regulation of growth of *Porphyromonas gingivalis* W50. *J Bacteriol.*, 173(22): 7330–7339.
- Brandis H**, Köhler W, Eggers HJ, Pulverer G (1994): Lehrbuch der Medizinischen Mikrobiologie. 7. Aufl. Gustav Fischer, Stuttgart New York .
- Buduneli N**, Baylas H, Buduneli E, Türkoglu O, Köse T, Dahlen G (2005): Periodontal infections and preterm low birth weight: a case-control study. *J Clin Periodontol* 32 (2): 174-81.
- Burns E**, Bachrach G, Shapira L, Nussbaum G (2006): TLR2 is required for the Innate Response to *Porphyromonas gingivalis*: Activation Leads to Bacterial Persistence and TLR2 Deficiency Attenuates Induce Alveolar Bone Resorption. *Journal of Immunology*, 177: 8296-8300.
- Calkins CC**, Platt K, Potemp J, Travis J (1998): Inactivation of tumor necrosis factor by proteinases (gingipains) from the periodontal pathogen *Porphyromonas gingivalis*. Implications of immune evasion. *J Biol Chem.*, 273: 6611-6614.
- Charles A**, Janeway TP, Walport M, Shlomchik M (2005): *Immunologie*, 5. Auflage. Spektrum, Gustav Fischer.
- Chen LL**, Yan J (2001): *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide activated bone resorption of osteoclasts by inducing IL-1, TNF, and PGE1. *Acta Pharmacol. Sin.*, 22(7): 614-618.
- Chu L**, Bramanti TE, Ebersole JL, Holt SC (1991): Hemolytic activity in the periodontopathogen *Porphyromonas gingivalis*: kinetics of enzyme release and localization. *Infect Immun.*, 59(6): 1932-1940.
- Deschner J**, Singhal A, Long P, Liu CC, Piesco N, Agarwal S (2003): Cleavage of CD14 and LBP by a protease from *Prevotella intermedia*. *Archives of Microbiology*, 179: 430-436.
- Deshpande RG**, Khan MB, Genco CA (1998): Invasion of aortic and heart endothelial cells by *Porphyromonas gingivalis*. *Infect Immun*, 66: 5337-5343.
- Diebold SS**, Kaisho T, Hemmi H, Akira S, Reis e Sousa C. (2004): Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA. *Science*, 303(5663): 1529-1531.
- Dorn BR**, Burks JN, Seifert KN, Progulske-Fox A. (2000): Invasion of endothelial and epithelial cells by strains of *Porphyromonas gingivalis*. *FEMS Microbiol Lett*, 187(2): 139-144.

- Dorn BR**, Dunn WA JR, Progulsk-Fox A. (1999): Invasion of human coronary artery cells by periodontal pathogens., *Infect Immun.*, 67(11): 5792-5798.
- Duncan L**, Yoshioka M, Chandad F, Grenier D. (2004): Loss of lipopolysaccharide receptor CD14 from the surface of human macrophage-like cells mediated by Porphyromonas gingivalis outer membrane vesicles. *Microbial Pathogenesis*, 36: 319-325.
- Duncan MJ**, Nakao S, Skobe Z, Xie H. (1993): Interactions of Porphyromonas gingivalis with Epithelial Cells. *Infect Immun.*, 61: 2260-2265.
- Fitzgerald KA**, Palsson-McDermott EM, Bowie AG, Jefferies CA, Mansell AS, Brady G, Brint E, Dunne A, Gray P, Harte MT, McMurray D, Smith DE, Sims JE, Bird TA, O'Neill LA (2001): Mal (MyD88-adaptor-like) is required for Toll-like receptor-4 signal transduction. *Nature*, 413: 78-83.
- Folwaczny M**, Glas J, Török HP, Limbersky O, Folwaczny C (2004): Toll-like receptors (TLR) 2 and 4 mutations in periodontal disease. *Clin Exp Immunol.*, 135: 330-335.
- Fowler EB**, Breault LG, Cuenin MF (2001): Periodontal disease and its association with systemic disease. *Mil Med* 166: 85-9.
- Fujimura S**, Shibata Y, Hirai K, Nakamura T. (1995): Some binding properties of the envelope of Porphyromonas gingivalis to hemoglobin. *FEMS Immunol Med Microbiol.*, 10(2): 109-14.
- Gantner BN**, Simmons RM, Canavera SJ, Akira S, Underhill DM (2003): Collaborative induction of inflammatory responses by dectin-1 and Toll-like receptor 2. *J. Exp. Med.*, 197(9): 1107-1117.
- Gay NJ**, Keith FJ (1991): Drosophila Toll and IL-1 receptor. *Nature*, 351: 355-356.
- Gemmell E**, Marshall RI, Seymour GJ (1997): Cytokines and prostaglandins in immune homeostasis and tissue destruction in periodontal disease. *Periodontology* 2000, 14: 112-43.
- Gemmell E**, Seymour GJ (2004): Immunoregulatory control of Th1/Th2 cytokine profiles in periodontal disease. *Periodontol* 2000, 35: 21-41.
- Gemmell E**, Yamazaki K, Seymour GJ (2002): Destructive periodontitis lesions are determined by the nature of the lymphocytic response. *Crit Rev Oral Biol Med*, 13: 17-34.
- Genco CA**, Odusanya BM, Brown G (1994): Binding and accumulation of hemin in Porphyromonas gingivalis are induced by hemin. *Infect Immun.*, 62(7): 2885-2892.
- Goldsby RA**, Kindt TJ, Osborne BA, Kuby J (2003): Immunology, 5. Edition. W. H. Freeman and company.

- Goulbourne PA**, Ellen RP (1991): Evidence that Porphyromonas (Bacteroides) gingivalis fimbriae function in adhesion to Actinomyces visosus. *J. Bacteriol.*, 173: 5266-5274.
- Grossi S** (2001): Treatment of periodontal disease and control of diabetes: an assessment of the evidence and need for future research. *Ann Periodontol* 6(1): 138-45.
- Gutierrez-Ramos JC**, Bluethmann H (1997): Molecules and mechanisms operating in septic shock: lessons from knockout mice. *Immunol. Today*, 18: 329-334.
- Haffajee AD**, Socransky SS (1994): Microbial etiological agents of destructive periodontal disease. *Periodontology* 2000, 5: 78-111.
- Hajishengallis G**, Sojar H, Genco RJ, DeNardin E (2004): Intracellular signalling and cytokine induction upon interactions of Pophyromonas gingivalis fimbriae with pattern-recognition receptors. *Immunological Investigations*, 33: 157-172.
- Hamada N**, Watanabe K, Sasakawa C, Yoshikawa M, Yoshimura F, Umemoto T (1994): Contruction and characterization of a fimA mutant of Porphyromonas gingivalis. *Infection and Immunity*, 62: 1696-1704.
- Hanazawa D**, Kawata Y, Takeshita A, Kumada H, Okithu M, Tanaka S, Yamamoto Y, Masuda T, Umemoto T, Kitano S (1993): Expression of monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1) in adult periodontal disease: increased monocyte chemotactic activity in crevicular fluids and induction of MCP-1 expression in gingival tissues. *Infection and Immunity*, 61: 5219-5224.
- Hashimoto M**, Asai Y, Ogawa T. (2004): Separation and structural analysis of lipoprotein in lipopolysaccharide preparation from Porphyromonas gingivalis. *Int. Immunol.*, 16: 1431-1437.
- Hatakeyama J**, Tamai R, Sugiyama A, Akashi S, Sugawara S, Takada H. (2003): Contrasting responses of human gingival and periodontal ligament fibroblasts to bacterial cell-surface components through the CD14/Toll-like receptor system. *Oral Microbiol Immunol*, 18: 14–23.
- Heil F**, Hemmi H, Hochrein H, Ampenberger F, Kirschning C, Akira S, Lipford G, Wagner H, Bauer S (2004): Species-specific recognition of single-stranded RNA via Toll-like receptor 7 and 8. *Science*, 303(5663): 1526-1529.
- Heine H**, Lien E (2003): Toll-like receptors and their function in innate and adaptive immunity. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, 130: 180-192.
- Hentze MW**, Kulozik AE, Bartram CR (1990): Einführung in die Medizinische Molekularbiologie.

- Hiraoka T**, Izumi Y, Sueda T (1998): Immunochemical detection of CD14 on human gingival fibroblasts in vitro. *Oral Microbiol Immunol*, 13: 246–252.
- Hirschfeld M**, Weis JJ, Toshchakov V, Salkowski CA, Cody J, Ward DC, Qureshi N, Michalek SM, Vogel SN (2001): Signaling by Toll-like receptor 2 and 4 agonists results in differential gene expression in murine macrophages. *Infect. Immun.*, 69: 1477-1482.
- Hoffmann JA**, Kafatos FC, Janeway CA, Ezekowits RA (1999): Phylogenetic perspectives in innate immunity. *Science*, 284: 1313-1318.
- Holländer GA** (2005): Immunologie (Grundlagen für Klinik und Praxis). Urban & Fischer.
- Holt SC**, Ebersole JL (2005): Porphyromonas gingivalis, Treponema denticola, and Tannerella forsythia: the „red complex“, a prototype polybacterial pathogenic consortium in periodontitis. *Periodontology 2000*, Vol. 38: 72-122.
- Holt SC**, Kesavalu L, Walker S, Genco CA (1999): Virulence factors of Porphyromonas gingivalis. *Periodontology 2000*, Vol. 20: 168-238.
- Honda K**, Yanai H, Negishi H, Asagiri M, Sato M, Mizutani T, Shimada N, Ohba Y, Takaoka A, Yoshida N, Taniguchi T (2005): IRF-7 is the master regulator of type-I interferon-dependent immune responses. *Nature*, 434: 772-777.
- Horng T**, Barton GM, Medzhitov R (2001): TIRAP: an adapter molecule in the Toll signaling pathway. *Nat. Immunol.*, 2: 835-841.
- Hyypä T** (1981): Studies of immunologic and inflammatory factors in saliva in patients with asthma and in patients with periodontitis. *J Clin Periodontol.*, 8(6): 500-507.
- Jagels MA**, Travis J, Potempa J, Pike R, Hugli TE (1996): Proteolytic inactivation of the leukocyte C5a receptor by proteinases derived from Porphyromonas gingivalis. *Infect Immun.*, 64: 1984-1991.
- Janeway CA**, Travers P, Walport M, Shlomchik M (2005): *Immunologie, 5. Auflage*. Spektrum, Gustav Fischer.
- Jenkinson HF**, Demuth DR (1997): Structure function , and immunogenicity of streptococcal antigen I/II polypeptides. *Mol. Microbiol.*, 23: 183-190.
- Jones BW**, Means TK, Heldwein KA, Keen MA, Hill PJ, Belisle JT, Fenton MJ (2001): Different Toll-like receptor agonists induce distinct macrophage responses. *J.Leukoc.Biol.*, 69: 1036-1044.

- Kajita K**, Honda T, Amanuma R, Domon H, Okui T, Ito H, Qoshie H, Tabeta K, Nakajima T, Yamazaki K (2007): Quantitative messenger RNA expression of Toll-like receptors and interferon- α 1 in gingivitis and periodontitis. *Oral Microbiol Immunol.*, 22: 398-402.
- Kikkert R**, Laine ML, Aarden LA, Van Winkelhoff AJ (2007): Activation of toll-like receptors 2 and 4 by gram-negative periodontal bacteria. *Oral Microbiol Immunol.*, 22: 145-151.
- Kweider M**, Lowe G, Murray G, Kinane D, McGowan D (1993): Dental disease, fibrinogen and white cell count: links with myocardial infarction? *Scot Med J* 38: 73–74.
- Laine ML**, Appelmek BJ, Van Winkelhoff AJ (1996): Novel polysaccharide capsular serotypes in Porphyromonas gingivalis. *J Periodontal Res*, 31: 278-284.
- Laine ML**, Appelmek BJ, Van Winkelhoff AJ (1997): Prevalence and distribution of six capsular serotypes of Porphyromonas gingivalis in periodontitis patients. *J Dent Res*, 76: 1840-1844.
- Laine ML**, Van Winkelhoff AJ (1998): Virulence of six capsular serotypes of Porphyromonas gingivalis in a mouse model. *Oral Microbiol Immunol*, 13: 322-325.
- Lamont RJ**, Chan A, Belton CM, Izutsu KT, Vasel D, Weinberg A (1995): Porphyromonas gingivalis invasion of gingival epithelial cells. *Infection and Immunity*, 63: 3878-3885.
- Lamont RJ**, Gil S, Demuth DR, Malamud D, Rosan B (1994): Molecules of Streptococcus gordonii that bind to Porphyromonas gingivalis. *Microbiology*, 140: 867-872.
- Lamont RJ**, Hersey SG, Rosan B (1992): Characterization of the adherence of Pophyromonas (Bacteroides) gingivalis to oral Streptococci. *Oral Microbio. Immunol.*, 7: 193-197.
- Lamont RJ**, Jenkinson HF (1998): Life below the gum line: pathogenic mechanisms of Porphyromonas gingivalis. *Microbiol Mol Biol Rev*, 62: 1244-1263.
- Lamping N**, Dettmer R., Schröder NWJ, Pfeil D, Hallatschek W, Burger R, Schumann RR (1998): LPS-binding protein protects mice from septic shock caused by LPS or Gram-negative bacteria. *J. Clin. Invest.*, 101 (10): 2065-2071.
- Lanzavecchia A**, Sallusto F (2001): The instructive role of dendritic cells on T cell responses: lineages, plasticity and kinetics. *Curr Opin Immunol*, 13: 291-298.

- Latz E**, Schoenemeyer A, Visintin A, Fitzgerald KA, Monks BG, Knetter CF, Lien E, Nilsen NJ, Espevik T, Golenbock DT (2004): TLR9 signals after translocating from the ER to CpG DNA in the lysosome. *Nat.Immunol.*, 5: 190-198.
- Lehnert S**, Heuser HS (1968): Zur sogenannten topographischen Bakteriologie der Mundhöhle in Abhängigkeit vom Altersablauf. *Dtsch Zahnärztl Z*, 23: 267-274.
- Lepine G**, Progulske-Fox A (1996): Duplication and differential expression of hemagglutinin genes in *Porphyromonas gingivalis*. *Oral Microb Immun.*, 11: 65-78.
- Li J**, Ellen RP, Hoover CJ, Felton JR (1991): Association of proteases of *Porphyromonas* (Bacteroides) *gingivalis* with its adhesion to *Actinomyces viscosus*. *J. Dent. Res.*, 70: 82-86.
- Lund JM**, Alexopoulou L, Sato A, Karow M, Adams NC, Gale NW, Iwasaki A, Flavell RA (2004): Recognition of single-stranded RNA viruses by Toll-like receptor 7. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 101: 5598-5603.
- Mackenzie RS**, Millard HD (1963): Interrelated effects of diabetes, arteriosclerosis and calculus on alveolar bone loss. *J Am Dent Assoc* 66: 192–198.
- Madianos PN**, Bobetsis GA, Kinane DF(2002): Is periodontitis associated with an increased risk of coronary heart disease and preterm and/or low birth weight births? *J Clin Periodontol* 29(3): 22–36; discussion 37–38.
- Madianos PN**, Bobetsis YA, Kinane DF (2005): Generation of inflammatory stimuli: how bacteria set up inflammatory responses in the gingiva. *J Clin Periodontol*, 32(6): 57-71.
- Madianos PN**, Papapanou PN, Sandros J (1997): *Porphyromonas gingivalis* infection of oral epithelium inhibits neutrophil transepithelial migration. *Infection and Immunity*, 65: 3983-3990.
- Mahanonda R**, Pichyngkul S (2007): Toll-like receptors and their role in periodontal health and disease. *Periodontology* 2000, 43: 41-55.
- Male D** (2005): Immunologie auf einen Blick. Urban & Fischer, 1. dt. Auflage.
- Marcus AJ**, Haijar DP (1993) :Vascular transcellular signalling. *J Lipid Res* 34: 2017–2031.
- Masaka T**, Hayashi J, Ishikawa I (1999): Soluble CD14-dependent intercellular adhesion molecular-1 induction by *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide in human gingival fibroblasts. *Journal of Periodontology*, 70: 772-778.
- Mattila KJ** (1993): Dental infections as a risk factor for acute myocardial infarction. *Eur Heart J.*, 14: 51-53.

- Medzhitov R** (2001): Toll-like receptors and innate immunity. *Nature Reviews Immunology*, 1: 135-145.
- Medzhitov R**, Janeway CA (1997): Innate immunity: impact on the adaptive immune response. *Curr.Opin.Immunol.*, 9: 4-9.
- Medzhitov R**, Janeway CA (2000): Innate immunity. *N. Engl. J Med.*, 343: 338-344.
- Minhas T**, Greenman J, Schaffer AG (1993): The influence of haemin levels on growth and enzyme production by *Porphyromonas gingivalis* in continuous culture. *Microbios.*, 76: 105-14.
- Miyake K** (2004): Innate recognition of lipopolysaccharide by Toll-like receptor 4-MD-2. *Trends Microbiol.*, 12: 186-192.
- Müller HP** (2001): Parodontologie. Checklisten der Zahnmedizin. Thieme;
- Nagata H**, Murakami Y, Inoshita E, Shizukuishi S, Tsunemitsu A (1990): Inhibitory effect of human plasma and saliva on co-aggregation between *Bacteroides gingivalis* and *Streptococcus mitis*. *J. Dent. Res.*, 69: 1476-1479.
- Nakayama K**, Kadowaki T, Okamoto K, Yamamoto K (1995): Construction and characterization of arginine-specific cysteine proteinase (Argingipain)-deficient mutants of *Porphyromonas gingivalis*. Evidence for significant contribution of Arg-gingipain to virulence. *J Biol Chem.*, 270: 23619-23626.
- Nauman G**, Schmidt J, Friemel H (1983): Medizinische Mikrobiologie und *Immunologie für Stomatologen*.
- Nery EB**, Meister F, Ellinger RF, Eslami A, McNamara TJ (1987): Prevalence of medical problems in periodontal patients obtained from three different populations. *J Clin Periodontol* 58: 564–568.
- Netea MG**, Van Deuren M, Kullberg BJ, Cavaillon JM, Van der Maer WM (2002): Does the shape of lipid A determine the interaction of LPS with Toll-like receptors? *Trends Immunol.*, 23: 135-139.
- Nonnenmacher C**, Dalpke A, Zimmermann S, Flores-de-Jacoby L, Mutters R, Heeg K (2003): DNA from Periodontopathogenic Bacteria Is Immunostimulatory for Mouse and Human Immune Cells. *Infection and Immunity*, 71: 850-856.
- Offenbacher S**, Jared HL, O'Reilly PG, Wells SR, Salvi GE, Lawrence HP, Socransky SS, Beck JD (1998): Potential pathogenic mechanisms of periodontitis-associated pregnancy complications. *Ann Periodontol.*, 3(1): 233-250.

- Ogawa T**, Asai Y, Hashimoto M, Uchida H (2002): Bacterial fimbriae activate human peripheral blood monocytes utilizing TLR2, CD14 and CD11a/CD18 as cellular receptors. *European Journal of Immunology*, 32: 2543-2550.
- Ogawa T**, Uchida H, Hmada S (1994): Porphyromonas gingivalis fimbriae and their syntethic peptides induce proinflammatory cytokines in human peripheral blood monocyte cultures. *FEMS Microbiology Letters* 116: 237 – 242.
- Okada H**, Murakami S (1998): Cytokine expression in periodontal health and disease. *Crit Rev Oral Biol Med*, 9: 248-266.
- Oshiumi H**, Matsumoto M, Funami K, Akazawa T, Seya T (2003a): TICAM-1, an adaptor molecule that participates in Toll-like receptor 3-mediated interferon-beta induction. *Nat.Immunol.*, 4: 161-167.
- Oshiumi H**, Sasai M, Shida K, Fujita T, Matsumoto M, Seya T (2003b): TIR containing adapter molecule (TICAM)-2, a bridging adapter recruiting to toll like receptor 4 TICAM-1 that induces interferon-beta. *J.Biol.Chem.*, 278: 49751-49762.
- Page R**, Kornman K (1997): Pathogenesis of human periodontitis: an introduction. *Periodontol 2000*, 14: 9-11.
- Page RC**, Offenbacher S, Schroeder HE, Seymour GJ, Kornman KS (1997): Advances in the pathogenesis of periodontitis: summary of developments, clinical implications and future directions. *Periodontol 2000*, 14: 216–248.
- Paquette DW**(2002): The periodontal infection-systemic disease link: a review of the truth or myth. *J Int Acad Periodontol* 4: 101–9.
- Paster BJ**, Boches SK, Galvin JL, Ericson RE, Lau CN, Levanos VA, Sahasrabudhe A, Dewhirst FE (2001): Bacterial diversity in human subgingival plaque. *J. Bacteriol.*, 183(12): 3770-3783.
- Pike RN**, Potempa J, McGraw W, Coetzer THT, Travis J (1996): Characterization of the binding activities of proteinase-adhesin complexes from Porphyromonas gingivalis. *J Bacteriol.*, 178: 2876-2882.
- Potempa J**, Banbula A, Travis J (2000): Role of bacterial proteinases in matrix destruction and modulation of host response. *Periodontol 2000.*, 24: 153-192.
- Progulske-Fox A**, Kozarov E, Dorn B, Dunn WJR, Burks J, Wu Y (1999): Porphyromonas gingivalis virulence factors and invasion of cells of the cardiovascular system. *J Periodontal Res.*, 34(7): 393-399.
- Rateitschak KH & EM**, Wolf HF (2004): Farbatlanten der Zahnmedizin 1. Parodontologie. 3. Auflage. Thieme.

- Rudney JD**, Chen R, Sedgewick GJ (2001): Intracellular Actinobacillus actinomycetemcomitans and Porphyromonas gingivalis in buccal epithelial cells collected from human subjects. *Infect Immun*, 69: 2700-2707.
- Rutschmann S**, Kilinc A, Ferrandon D (2002): Cutting edge: the toll pathway is required for resistance to gram-positive bacterial infections in Drosophila. *J.Immunol.*, 168: 1542-1546.
- Saito S**, Rosol TJ, Saito M, Ngan PW, Shanfeld J, Davidovitch Z (1990): Bone-resorbing activity and prostaglandin E produced by human periodontal ligament cells in vitro. *J Bone Miner Res.*, 5(10): 1013-1018.
- Sanderink RBA, Bernhardt H, Konke M, Meyer J, Weber J, Weiger R** (2004): Orale Mikrobiologie und Immunologie. Quintessenz Verlag-GmbH.
- Sandros J**, Papapanou PN, Nannmark U, Dahlen G (1994): Porphyromonas gingivalis invades human pocket epithelium in vitro. *J Periodontal Res*, 29: 62-69.
- Sarah SM**, Tamilselvan S, Kamatchiammal S, Suresh R (2006): Expression of Toll-like receptors 2 and 4 in gingivitis and chronic periodontitis. *Ind J Dent Res*, 17(3): 114-116.
- Schlegel RA**, Krahlung S, Callahan MK, Williamson P (1999): CD14 is a component of multiple recognition systems used by macrophages to phagocytose apoptotic lymphocytes. *Cell Death Differt.* 6: 583-592.
- Schumann RR**, Kirschnung C, Unbehaun A, Aberle H, Knopf HP, Ulevitch RJ, Herrmann R (1996): Lipopolysacchride binding protein is a secretory class I acute phase protein requiring binding of the transcription factor STAT-3, C/EBP β , and AP-1. *Mol. Cell Biol.*, 16: 3490.
- Schumann RR**, Leong SR, Fraggis GW, Gray PW, Wright SD, Mathison JC, Tobias PS, Ulevitch RJ (1990): Structure and function of lipopolysaccharide binding protein. *Science*, 249: 1429-31.
- Seymour GJ** (1991): Importance of the host response in the periodontium. *J Clin Periodontol*, 18: 421-426.
- Shapira L**, Champagne C, Van Dyke TE, Amar S (1998): Strain-dependent activation of monocytes and inflammatory macrophages by lipopolysaccharide of Porphyromonas gingivalis. *Infection and Immunity*, 66: 2736-2742.
- Slots J** (2005): Herpesviruses in periodontal diseases. *Periodontol 2000*, 38: 33-62.
- Smalley JW**, Birss AJ, McKee AS, Marsh PD (1998): Hemin regulation of hemoglobin binding by Porphyromonas gingivalis. *Curr Microbiol.*, 36(2): 102-6.

- Smalley JW** (1994): Pathogenic mechanisms in periodontal disease. *Adv Dent Res*, 8(2): 320-328.
- Smalley JW**, Birss AJ, McKee AS, Marsh PD (1996): Haemin binding as a factor in the virulence of *Porphyromonas gingivalis*. *FEMS Microbiol Lett.*, 15;141(1): 65-70.
- Smalley JW**, Birss AJ, Withnall R, Silver J (2002): Interactions of *Porphyromonas gingivalis* with oxyhaemoglobin and deoxyhaemoglobin. *Biochem J.*, 15; 362(1): 239-45.
- Smith MF Jr**, Mitchell A, Li G, Ding S, Fitzmaurice AM, Ryan K, Crowe S, Goldberg JB (2003): Toll-like receptor TLR2 and TLR5, but not TLR4, are required for *Helicobacter pylori*-induced NF- κ B activation and chemokine expression by epithelial cells. *J. Biol. Chem.*, 278: 32552.
- Socransky SS**, Haffajee AD (1992): The bacterial etiology of destructive periodontal disease: current concepts. *J. Periodontology*, 63: 322-331.
- Sugawara S**, Nemoto E, Tada H, Miyake K, Imamura T, Takada H (2000): Proteolysis of human monocyte CD14 by cysteine proteinases (gingipains) from *Porphyromonas gingivalis* leading to lipopolysaccharide hyporesponsiveness. *Journal of Immunology*, 165: 411-418.
- Syrajanen J**, Peltola J, Valtonen V, Iivanainen M, Kaste M, Huttunen J (1989): Dental infections in association with cerebral infarction in young and middle-aged men. *J Internal Med* 225:179–184.
- Tabeta K**, Yamazaki K, Akashi S, Miyake K, Kumada H, Umemoto T, Yoshie H (2000): Toll-like receptors confer responsiveness to lipopolysaccharide from *Porphyromonas gingivalis* in human gingival fibroblasts. *Infect Immun*, 68: 3731-3735.
- Tada H**, Sugawara S, Nemoto E, Takahashi N, Imamura T, Potempa J, Travis J, Shimauchi H, Takada H (2002): Proteolysis of CD14 on human gingival fibroblasts by arginine-specific cysteine proteinases from *Porphyromonas gingivalis* leading to down-regulation of lipopolysaccharide-induced interleukin-8 production. *Infection and Immunity*, 70: 3304-3307.
- Takada H**, Mihara J, Morisaki I, Hamada S (1991): Induction of interleukin-1 and -6 in human gingival fibroblast cultures stimulated with *Bacteroids* lipopolysaccharides. *Infection and Immunity*, 59: 295-301.
- Takada H**, Mihara J, Morisaki I, Hamada S in *Periodontal Disease: Pathogens and Host Immune Responses* (Hamada S, Holt SC, McGhee JR, Eds.), pp. 265-276, Quintessence Publishing, Tokyo.

- Takaoka A**, Yanai H, Kondo S, Duncan G, Negishi H, Mizutani T, Kano S, Honda K, Ohba Y, Mak TW, Taniguchi T (2005): Integral role of IRF-5 in the gene induction programme activated by Toll-like receptors. *Nature*, 434: 243-249.
- Takeda K**, Akira S (2005): Toll-like receptors in innate immunity. *International Immunology*, 17(1): 1-14.
- Takeda K**, Kaisho T, Akira S (2003): Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol.*, 21: 335-76.
- Tamandl D**, Bahrami M, Wessner B, Weigel G, Polder M, Fürst W, Roth E, Boltz-Nitulescu G, Spittler A (2003): Modulation of toll-like receptor 4 expression on human monocytes by TNF and IL-6: TNF evokes lipopolysaccharide hyporesponsiveness, whereas IL-6 enhances LPS activity. *Shock*, 20(3): 224-229.
- Tamura M**, Tokuda M, Nagaoka S, Takada H (1992): Lipopolysaccharides of *Bacteroides intermedius* (*Prevotella intermedia*) and *Bacteroides* (*Porphyromonas*) *gingivalis* induce interleukin-8 gene expression in human gingival fibroblast cultures. *Infection and Immunity*, 60: 4932-4937.
- Taylor GW**, Burt BA, Becker MP, Genco RJ, Shlossman M (1998): Glycemic control and alveolar bone loss progression in type 2 diabetes. *Ann Periodontol* 3(1): 30-9.
- Ulevitch RJ**, Tobias PS (1995): Receptor dependent mechanisms of cell stimulation by bacterial endotoxin. *Annual Review of Immunology*, 13: 437-457.
- Ulevitch RJ**, Tobias PS (1999): Recognition of gram-negative bacteria and endotoxin by the innate immune system. *Curr.Opin.Immunol.*, 11: 19-22.
- Valtonen VV** (1991): Infection as a risk factor for infarction and atherosclerosis. *Ann Med.*, 23(5): 539-543.
- van Winkelhoff AJ**, Appelmelk BJ, Kippuw N, de Graaff J (1993): K-antigens in *Porphyromonas gingivalis* are associated with virulence. *Oral Microbiol Immunol*, 8: 259-265.
- Wang PL**, Ohura K (2002): *Porphyromonas gingivalis* Lipopolysaccharide signaling in gingival fibroblasts – CD14 and Toll-like Receptors. *Crit Rev oral Biol Med*, 13(2): 132-142.
- Wang PL**, Ohura K, Fujii T, Oido-Mori M, Kowashi Y, Kikuchi M, Suetsugu Y, Tanaka J (2003): DNA microarray analysis of human gingival fibroblasts from healthy and inflammatory gingival tissues. *Biochem Biophys Res Commun*, 305(4): 970-973.

- Wang PL**, Oido-Mori M, Fujii T, Kowashi Y, Kikuchi M, Suetsugu Y, Tanaka J, Azuma Y, Shinohara M, Ohura K (2001): Heterogeneous Expression of Toll-like Receptor 4 and Downregulation of Toll-like Receptor 4 Expression on Human Gingival Fibroblasts by *Porphyromonas gingivalis* Lipopolysaccharide. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 288: 863-867.
- Werts C**, Tapping RI, Mathison JC, Chuang TH, Kravchenko V, Saint Girons I, Haake, DA, Godowski PJ, Hayashi F, Ozinsky A, Underhill DM, Kirschnigg CJ, Wagner H, Aderem A, Tobias PS, Ulevitch RJ (2001): Leptospiral lipopolysaccharide activates cells through a TLR2-dependent mechanism. *Nat. Immunol.*, 2: 346-352.
- Wright SD**, Ramos RA, Tobias PS, Ulevitch RJ, Mathison JC (1990): CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *Science*, 249: 1431-3.
- Yamamoto M**, Sato S, Hemmi H, Uematsu S, Hoshino K, Kaisho T, Takeuchi O, Takeda K, Akira S (2003): TRAM is specifically involved in the Toll-like receptor 4-mediated MyD88-independent signaling pathway. *Nat.Immunol.*, 4: 1144-1150.
- Yarovinsky F**, Zhang D, Andersen JF, Bannenberg GL, Serhan CN, Hayden MS, Hieny S, Sutterwala FS, Flavell RA, Ghosh S, Sher A (2005): TLR11 activation of dendritic cells by a protozoan profilin-like protein. *Science*, 308: 1626-1629.

12 Abkürzungsverzeichnis

TLR	Toll-like Rezeptor
LPS	Lipopolysaccharid
CD	Cluster of differentiation
mCD14/ sCD14	membranständig/gelöst
hGFB	humane Gingivafibroblasten
hPDL	humane Periodontalligamentzellen
PBMCs	Peripheral Blood Mononuclear Cells
Pg	Porphyromonas gingivalis
E. coli	Escherichia coli
Aac	Actinobacillus actinomycetemcomitans
Tf	Tannerella forsythensis
Pi	Prevotella intermedia
Fn	Fusobacterium nucleatum
Td	Treponema denticola
NK	Natürliche Killerzellen
PRR	Pattern Recognition Receptors (Molekülerkennungsrezeptoren)
AG	Antigen
AK	Antikörper
APC	AG-präsentierenden Zellen
TCR	T-Zellrezeptor
dToll	Toll in Drosophila melanogaster
RNA	Ribonukleinsäure
cDNA	complementary Desoxynukleinsäure
PCR	Polymerasekettenreaktion
LBP	LPS-bindendes Protein
IL	Interleukin
TNF- α	Tumornekrosefaktor α
NF- κ B	Nukleärer Faktor κ B
PAMP	Pathogen-Associated Molecular Pattern

APC	Antigenpräsentierende Zelle
Ig	Immunglobulin
TCR	T-Zellrezeptor
MHC	Major Histocompatibility Complex
LRR	leucinrich repeats
TIR	Toll/IL-1 Rezeptor
MyD88	Myeloid Differentiation Primary Response Gene 88 (MyD88)
IKK	IκB Kinasen
DMEM	Dulbeccos modified Eagle Medium
FCS	Fetales Kälberserum
PSG	Penicillin, Streptomycin und Glutamin
CO ₂	Kohlendioxid
HBSS	Hank's buffered salt solution
rpm	rounds per minute
PBS	Phosphate-Buffered-Saline-Buffer

13 Curriculum Vitae

Persönliche Daten:

Name: Sandra Barbara Ertlschweiger, geb. Stögerer
Geburtsdaten: 20. August 1975, Voralpe (Steiermark)
Staatsbürgerschaft: Österreich
Wohnadresse: Wiesberggasse 2/22, 1160 Wien
Familienstand: verheiratet mit Rouven Ertlschweiger

Schulbildung

seit WS 2001: Diplomstudium Zahnmedizin, Medizinische Universität Wien
1994 – 1997: Akademie für den med. techn. Laboratoriumsdienst, AKH Wien –
Diplom mit ausgezeichnetem Erfolg abgeschlossen
1989 – 1994: BA für Kindergartenpädagogik, Hartberg –
Matura mit ausgezeichnetem Erfolg abgeschlossen
1981 – 1989: Volksschule und Hauptschule, Pinggau (Steiermark)

Beruflicher Werdegang

März/April 2007: Zahnärzte ohne Grenzen, Nepal
2001 – 2005: Bakteriologisches Labor, Universitätszahnklinik Wien
Schwerpunkt: Molekularbiologische Techniken, Bakteriologie,
Zellkultur
1999 – 2001: Zentrallabor, Wilhelminenspital Wien
Schwerpunkt: Klinische Chemie
1997 – 1999: Klinisches Institut für med. chem. Labordiagnostik – KIMCL, AKH-
Wien
Schwerpunkt: Immunologie