

Aus dem

Zentrum für Hygiene und Infektionsbiologie

Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. Hans-Dieter Klenk

Institut für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene

Komm. Direktor: Prof. Dr. Michael Lohoff

des Fachbereiches Medizin der Philipps-Universität Marburg

in Zusammenarbeit mit dem

Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH, Standort Marburg

Periodontopathogene Bakterien:

**Freisetzungsmuster von Zytokinen im humanen Vollblut-Testsystem
und Unterschiede in der Aktivierung des angeborenen Immunsystems
durch Toll-like Rezeptor-Stimulation.**

Inauguraldissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin (Dr. med.)

dem Fachbereich Humanmedizin der Philipps-Universität Marburg vorgelegt von

Konrad Tietze

aus

Wernigerode

Marburg 2008

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg
am 17. April 2008.

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs

Dekan: Prof. Dr. M. Rothmund

Referent: Prof. Dr. R. Mutters

Korreferent: Prof. Dr. S. Bauer

1. ZUSAMMENFASSUNG	6
1. SUMMARY	7
2. EINLEITUNG	8
2.1. Polymikrobielle Infektionen	8
2.1.1. Allgemeines	8
2.1.2. Peritonitis	9
2.1.3. Parodontitis	9
2.2. Grundlagen des menschlichen Immunsystems	11
2.2.1. Angeborene Immunität	11
2.2.2. Erworbene Immunität	12
2.2.3. Toll-like Rezeptoren	14
2.2.3.1. Entdeckung von Toll	14
2.2.3.2. Toll-like Rezeptoren und ihre Liganden	15
2.2.3.3. Aktivierung von Toll-like Rezeptoren	15
2.2.3.4. Signalwege der Toll-like Rezeptoren	16
2.2.3.4.1. MyD88-abhängiger Signalweg der TLR-Aktivierung	16
2.2.3.4.2. MyD88-unabhängiger-/TRIF-abhängiger Signalweg der TLR-Aktivierung	17
2.3. Mukosale Immunität	19
2.4. Die Zellwand Gram-positiver und Gram-negativer Bakterien	21
2.4.1. Aufbau von Bakterienzellwänden	21
2.4.2. Unterschiede bei der Aktivierung des Immunsystems und Zytokinfreisetzung	21
2.5. Anwendungsmöglichkeiten eines humanen Vollblut-Testsystems	23
2.6. Bakterien	24
2.6.1. Periodontopathogene Bakterien	24
2.6.1.1. <i>Actinomyces meyeri</i> , <i>Actinomyces odontolyticus</i>	24
2.6.1.2. <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	24
2.6.1.3. <i>Campylobacter rectus</i>	25
2.6.1.4. <i>Dialister pneumosintes</i>	25
2.6.1.5. <i>Eikenella corrodens</i>	25
2.6.1.6. <i>Enterococcus faecalis</i>	25
2.6.1.7. <i>Fusobacterium nucleatum</i>	26
2.6.1.8. <i>Neisseria flavescens</i> , <i>Neisseria mucosa</i> , <i>Neisseria perflava</i>	26
2.6.1.9. <i>Parvimonas micros</i>	26
2.6.1.10. <i>Peptoniphilus asaccharolyticus</i>	26
2.6.1.11. <i>Porphyromonas gingivalis</i>	27
2.6.1.12. <i>Prevotella intermedia</i>	27
2.6.1.13. <i>Streptococcus mutans</i> , <i>Streptococcus intermedius</i> , <i>Streptococcus sanguis</i>	27
2.6.2. „Referenzkeime“	28
2.6.2.1. <i>Escherichia coli</i>	28
2.6.2.2. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	28
2.6.2.3. <i>Salmonella Minnesota</i>	29
2.6.2.4. <i>Staphylococcus aureus</i>	29
2.7. Wissenschaftliche Fragestellung	31
3. MATERIAL UND METHODEN	32
3.1. Materialien und Geräte	32
3.1.1. Geräte	32
3.1.2. Verbrauchsmaterialien	33

3.1.3.	Reagenzien	33
3.1.4.	Medium für Zellkultivierung	34
3.1.5.	Bakterielle Endotoxine	34
3.1.6.	Zellen	35
3.1.7.	Bakterien	36
3.1.8.	Molekularbiologische Kits	37
3.1.9.	Vektoren und rekombinante Plasmide	37
3.2.	Methoden	38
3.2.1.	Arbeit mit Bakterienkulturen	38
3.2.1.1.	Anzucht von Anaerobiern und Mikroaerophilen	38
3.2.1.2.	Anzucht von Aerobiern	38
3.2.1.3.	Subkultivierung von Bakterien	38
3.2.2.	Aufbereitung von Bakterien zur Konzentrationsbestimmung	38
3.2.3.1.	Messung der optischen Dichte	39
3.2.3.2.	Ermittlung der Bakterienkonzentration	39
3.2.4.	Aliquotierung	39
3.2.5.	Inaktivierung der Bakterienaliquots	39
3.2.5.1.	Hitze-Inaktivierung	39
3.2.5.2.	UV-Inaktivierung	40
3.2.6.	Lagerung der Bakterienaliquots	40
3.2.7.	Blutentnahme	40
3.2.8.	Inkubation der mikrobiellen Stimuli mit Vollblut	40
3.2.8.1.	Durchführung	40
3.2.8.2.	Überstand-Gewinnung	41
3.2.9.	Untersuchung der Kinetik der Zytokinfreisetzung	41
3.2.10.	Zellkultur und Zellstimulation	42
3.2.11.	Zytokinbestimmung	42
3.2.11.1.	Versuchsanordnung der durchgeführten Sandwich-ELISA	42
3.2.11.2.	Durchführung des Sandwich-ELISA	43
3.2.12.	Plasmidpräparation	44
3.2.13.	Transiente Transfektion	45
3.2.13.1.	Reportergenassay	45
3.2.13.2.	Transiente Transfektion von HEK-293 Zellen	45
3.2.13.3.	Stimulation transient transfizierter HEK-293 Zellen	45
3.2.13.4.	Reportergen-Messung	46
3.2.14.	Ergebnisauswertung	46
4.	ERGEBNISSE	47
4.1.	Testsystem	47
4.1.1.	Vergleich verschiedener Bakterieninaktivierungsarten	47
4.1.1.1.	Vergleich der IL-8-Freisetzung nach Stimulation mit hitzeinaktivierten und UV-inaktivierten Bakterien	47
4.1.1.2.	Vergleich der TNF α -Freisetzung nach Stimulation mit hitzeinaktivierten und UV-inaktivierten Bakterien	47
4.1.2.	Variabilität durch Einsatz von Vollblut verschiedener Spender	48
4.1.3.	Kinetik der Zytokinfreisetzung	49
4.1.3.1.	Zeitlicher Verlauf der Freisetzung von TNF α	50
4.1.3.2.	Zeitlicher Verlauf der Freisetzung von IL-8	50
4.1.3.3.	Zusammenfassung des Verlaufs der Zytokinfreisetzung	51
4.2.	Zytokinfreisetzung nach Stimulation von humanem Vollblut mit Bakterien und PAMPs	52
4.3.	Betrachtung der Zytokinfreisetzung in Relation zum Referenzstimulus	54
4.4.	Stimulation von transient mit TLR-Plasmiden transfizierten Zellen	56
4.5.	Stimulation von Mauszellen mit Toll-like Rezeptormutationen	58
4.5.1.	Peritonealmakrophagen TLR2-defizienter Mäuse	58
4.5.2.	Peritonealmakrophagen TLR4-mutierter C3H/HeJ-Zellen	59

4.5.3.	Zusammenfassung	59
5.	DISKUSSION	61
5.1.	Eignung des Vollblutsystems	62
5.2.	Stimulation mit Komponenten der bakteriellen Zellwand (PAMPs)	63
5.3.	Stimulation mit inaktivierten Bakterien	65
5.4.	Periodontopathogene Bakterien	68
6.	SCHLUSSFOLGERUNGEN	70
7.	ANHANG	72
7.1.	Abbildungen	72
7.2.	Grafiken	74
7.3.	Tabellen	84
8.	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	86
9.	LITERATURVERZEICHNIS	89
10.	VERZEICHNIS MEINER AKADEMISCHEN LEHRER	109
11.	EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG	110

1. Zusammenfassung

Das angeborene Immunsystem erkennt Gram-positive und Gram-negative Bakterien mit Rezeptoren, welche bakterielle Muster („pathogen associated molecular patterns“, PAMP) erkennen. Dabei spielen Toll-like Rezeptoren (TLR) eine zentrale Rolle. Verschiedene TLRs benutzen gemeinsame Signalwege, zeigen jedoch ebenso Unterschiede. Parodontalerkrankungen werden durch eine Besiedlung von Zahntaschen in erster Linie durch Gram-negative, aber auch durch Gram-positive Bakterien hervorgerufen und aufrechterhalten. Bislang gibt es nur begrenzte Erkenntnisse darüber, ob Gram-positive und Gram-negative Bakterien Immunantworten im angeborenen Immunsystem auslösen, welche sich qualitativ oder quantitativ unterscheiden.

Um unterschiedliche Effekte der Immunaktivierung zu untersuchen wurde in dieser Arbeit humanes Vollblut *ex vivo* mit hitzeinaktivierten Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien sowie deren Bestandteilen, welche TLRs aktivieren, stimuliert und die Freisetzung proinflammatorischer Zytokine gemessen. In den Stimulationsüberständen wurde mittels ELISA die Freisetzung von TNF α und IL-8 quantifiziert. Zusätzlich wurden TLR-transfizierte HEK-293 Zellen stimuliert und die Immunantwort TLR2- bzw. TLR4-defizienter Mäuse untersucht.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass periodontopathogene Gram-positive und Gram-negative Bakterien unterschiedliche Muster der Zytokinfreisetzung hervorrufen. Gram-negative Erreger bedingten eine höhere Freisetzung von TNF α , während Gram-positive Bakterien eine höhere IL-8 Freisetzung hervorriefen. Versuche an TLR-transfizierten HEK-293 Zellen und TLR-knockout-Mauszellen zeigten die spezifische Rolle von TLR4 bzw. TLR2 bei der Erkennung Gram-negativer bzw. Gram-positiver periodontopathogener Bakterien. Interessanterweise zeigten *F. nucleatum* und *P. gingivalis* ein von den oben genannten Beobachtungen für Gram-negative Bakterien abweichendes Bild.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass periodontopathogene Gram-negative und Gram-positive Bakterien unterschiedliche Muster immunregulatorischer Aktivität hervorrufen. Dies wird interpretiert als die Folge der unterschiedlichen Aktivierung verschiedener TLRs.

Die Ergebnisse wurden in Zusammenhang der Pathogenese von Parodontalerkrankungen und mukosaler Immunität diskutiert.

1. Summary

Recognition of gram-negative and gram-positive bacteria by innate immune system using “pathogen associated molecular patterns” (PAMP) is mediated by Toll-like receptors (TLRs). Different TLRs share common signalling pathways yet exhibit specificity as well. Periodontal disease is initiated and maintained in the first line by gram-negative but also gram-positive bacterial infection of the gingival sulcus. To date only limited information is available on whether gram-positive and gram-negative bacteria induce different host responses (strength or quality).

To elucidate these differential effects this work focused on proinflammatory cytokine releases by assessing ex vivo stimulation of whole blood with heat-killed gram-negative and gram-positive bacteria and thereof derived microbial products associated with distinct TLRs. Tumor necrosis factor- α and interleukin-8 release were measured in the supernatants by enzyme-linked immunosorbent assay. In addition, TLR-transfected HEK-293 cells were stimulated and innate immune responses of peritoneal macrophages from mice lacking TLR2 and TLR4 were tested.

The results showed gram-negative and gram-positive species, involved in parodontal disease, inducing distinct patterns of cytokine production. Gram-negative species produced higher amounts of tumor necrosis factor- α while gram-positive species released higher amounts of the chemokine interleukin-8. Data from TLR knockout mice and TLR-transfected HEK-293 cells revealed a somehow specific role of TLR4 and TLR2 for the recognition of gram-negative and gram-positive bacteria. Interestingly *F. nucleatum* and *P. gingivalis* differed from the observations made for other gram-negative Bacteria.

The revealed data demonstrate that periodontopathogenic gram-negative and gram-positive bacterial species induced different patterns of immunoregulatory activity, which is interpreted as the result of variable activation of different TLRs.

These findings were discussed against the background of parodontal disease and mucosal immunity.

2. Einleitung

Infektionen werden durch obligat oder fakultativ pathogene Erreger verursacht, welche in der Lage sind, die Abwehrfunktionen des Immunsystems in einem Wirtsorganismus zu überwinden. Dabei lassen sich Monoinfektionen, welche durch einen einzigen Erreger verursacht werden, von Mischinfektionen unterscheiden. Letztere kommen vor allem an nicht-sterilen Schleimhäuten vor, an denen eine endogene Bakterienflora existiert (z. B. im Darm, in der Mundhöhle). Daraus ergibt sich in nicht-sterilen Organen ein komplexes Zusammenspiel verschiedener, fakultativ pathogener Erreger.

2.1. Polymikrobielle Infektionen

2.1.1. Allgemeines

Polymikrobielle Infektionen sind nicht durch einen einzelnen Erreger, sondern durch die gleichzeitige Anwesenheit mehrerer Erreger charakterisiert. Dabei kann eine Erregerart eine ökologische Nische für weitere schaffen. Es können Arten mit gleichen Wachstumsansprüchen zeitgleich eine Infektionen verursachen oder mehrere Arten, die für sich allein keine Pathogenität besitzen, verursachen gemeinsam eine Erkrankung (Brodgen et al., 2005). Im Rahmen von polymikrobiellen Infektionen kommt es zu einem komplexen Zusammenspiel von mehreren Erregern und dem Immunsystem. Zur genauen Untersuchung der Mechanismen bedarf es geeigneter Testsysteme, in denen polymikrobielle Situationen nachgestellt werden können (Bakaletz, 2004). Prinzipiell müssen bei der Beschreibung molekulare Effekte echter Syn- bzw. Antagonismen von Effekten ökologischer Konkurrenz unterschieden werden.

Neben synergistischen Effekten, wie z. B. ein dosisabhängiger Synergismus von *Pseudomonas aeruginosa* und *Staphylococcus aureus* bei Wundinfektionen (Hendricks et al., 2001) sind auch Antagonismen beschrieben. So wurde beobachtet, dass Kinder, die Träger von *Streptococcus pneumoniae* sind, seltener einen gleichzeitigen Trägerstatus von *Staphylococcus aureus* aufweisen als Vergleichsgruppen (Regev-Yochay et al., 2004). Dies gilt besonders für Pneumokokkenserotypen, die zu Impfzwecken benutzt werden (Bogaert et al., 2004). Ebenfalls interessant ist die Beobachtung, dass eine Besiedlung mit Viridans-Streptokokken die Wahrscheinlichkeit der Akquirierung von MRSA bei Neugeborenen senkt (Uehara et al., 2001a). Mögliche Ursache hierfür könnte die Produktion von Wasserstoffperoxyd durch Streptokokken

sein (Pericone et al., 2000; Uehara et al., 2001b). Ebenso können Corynebakterien (Uehara et al., 2000) und koagulasenegative Staphylokokken (Poutrel et al., 1980) Infektionen mit *S. aureus* ver- bzw. behindern. Auch auf molekularer Ebene zeigen sich antagonistische Effekte bakterieller Bestandteile. So lässt sich die Wirkung von *E. coli*-LPS am TLR4 durch LPS von *Porphyromonas gingivalis* und *Capnocytophaga ochracea* abschwächen (Yoshimura et al., 2002; Hajishengallis et al., 2002; Coats et al., 2003).

Beispiele für polymikrobielle Infektionen sind Peritonitis und Parodontitis, wobei im Folgenden auf letztere detaillierter eingegangen werden soll.

2.1.2. Peritonitis

Entzündungen des Bauchfells lassen sich in zwei Typen einteilen: Zum einen in die primäre Peritonitis, welche durch eine hämatogene Streuung von Erregern vor allem bei Kindern und Patienten unter Immunsuppression oder mit Leberzirrhose vorkommt (Parsi et al., 2004). Weitaus häufiger kommt die sekundäre Peritonitis vor, zu deren vielfältigen Ursachen iatrogene Keimverschleppung, Leckagen von Anastomosen, Durchwanderungen, Infektionen von Nekrosen, aufsteigende gynäkologische Infektionen und Perforationen gehören. Diese Ätiologie erklärt, warum es sich bei sekundären Peritonitiden immer um polymikrobielle Infektionen handelt. Die häufigsten Isolate bei Patienten mit sekundärer Peritonitis sind *E. coli* und Enterokokken auf der aeroben Seite sowie *Peptoniphilius spp.*, *Clostridium spp.*, *Fusobacterium spp.* und Vertreter der *Bacteroides fragilis*-Gruppe als anaerobe Vertreter (Brook 2000; 2003).

2.1.3. Parodontitis

Parodontale Infektionen sind ebenso polymikrobieller Ätiologie. Sie können fokal oder generalisiert in der Mundhöhle auftreten und führen zu einer Destruktion des Zahnhalteapparates. Dies führt zu einer Destabilisierung des Zahns bis hin zu dessen Verlust. Als Ursachen dieser Destruktionen werden toxische Produkte von Bakterien in subgingivalen Plaques sowie Abwehrreaktionen des Immunsystems angesehen. Für die Kolonisation der Zahntaschen ist die Adhäsion und Biofilmbildung von besonderer Bedeutung. Subgingivale Plaques besitzen alle Charakteristika von Biofilmen (Darveau et al., 1997). Untersuchungsergebnisse deuten darauf hin, dass die Produktion von Biofilmen durch eine bakterielle Interaktion begünstigt sein kann (Cook et al., 1998).

Viele odontopathogene Bakterien besitzen adhäsionsvermittelnde Virulenzfaktoren, wie Pili, Fimbrien und andere zellwandgebundene Moleküle (Jenkinson et al., 1997; Lamont et al., 2000). Obwohl es sich bei Parodontalerkrankungen um die am besten charakterisierte polymikrobielle Infektion beim Menschen handelt, gibt es immer noch große Lücken im Verständnis der Pathomechanismen.

Die Erkrankung verläuft chronisch und persistiert ohne Behandlung (Ranney, 1991). Die Einteilung der Parodontitis erfolgt nach Schweregrad und Alter des Patienten. Die häufigste Form, mit guten Aussichten auf eine erfolgreiche Therapie, ist die „chronisch adulte Parodontitis“ (AP). Eine Variante der AP mit schwerer Verlaufsform aufgrund Therapierefraktivität ist die „refraktäre marginale Parodontitis“. Formen, die sich bereits bei Kindern und Jugendlichen manifestieren sind die „präpubertäre Parodontitis“ (PP), die das Milchgebiss betrifft, und die „lokalisierte juvenile Parodontitis“ (LJP), welche meist Folge einer PP ist und sich in der zweiten Lebensdekade manifestiert. Schwerste Form und häufig Folge einer durchstandenen LJP ist die „rapid progressive Parodontitis“ (RPP), deren Manifestationsgipfel zwischen dem 20. und 35. Lebensjahr liegt und die zu einem massiven Alveolarknochenverlust, Zahnfleischbluten und Gingivitis führt. 20% der an Parodontitis erkrankten Personen leiden unter schweren Formen (Micheelis et al., 1996).

In der Mundhöhle, die als Reservoir für Erreger parodontaler Infektionen gilt, lassen sich über 400 verschiedene Bakterienspezies nachweisen (Moore et al., 1994b). Nur einigen kommt jedoch eine pathogenetisch bedeutsame Rolle zu, viele lassen sich auch bei Menschen ohne Parodontalinfektionen nachweisen. Die Zusammensetzung der Erregerarten aus Zahntaschen parodontal erkrankter Patienten, unterscheidet sich in Abhängigkeit vom Typ der Parodontitis. So lassen sich „Leitkeime“ benennen, die für Diagnose, Prognose und Verlaufskontrolle genutzt werden können: Bei juvenilen Parodontitisformen (PP und LJP) werden folgende Erreger gehäuft isoliert: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Prevotella intermedia*, *Eikenella corrodens*, *Capnocytophaga spp.* (Nonnenmacher et al., 2001; Müller et al., 1985). Bei der AP sind am häufigsten *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Campylobacter rectus*, *Bacteroides spp.*, *Selenomonas spp.* und *Streptococcus intermedius* nachweisbar (Nonnenmacher et al., 2001; Tanner, 1992). Erreger, die sich häufig bei RPP finden lassen sind *P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans*, *P. intermedia* und *Capnocytophaga spp.* (Yang et al., 2004; Nonnenmacher et al., 2001).

2.2. Grundlagen des menschlichen Immunsystems

Das Immunsystem muss im Rahmen der Infektionsabwehr drei grundlegende Aufgaben bewältigen: Es müssen Pathogene erkannt (afferenter Arm), diese unschädlich gemacht (efferenter Arm) und dabei körpereigenes Gewebe geschont werden (Selbsttoleranz).

2.2.1. Angeborene Immunität

Charakteristisch für diesen evolutionär älteren Teil des menschlichen Immunsystems ist, dass sich die Erkennung vor allem gegen weit verbreitete, hochkonservierte mikrobielle Moleküle richtet (Kimbrell & Beutler, 2001). Für solche Molekülmuster wurde in der Vergangenheit der Begriff der „pathogen associated molecular patterns“ (PAMP) geprägt, deren Erkennung durch „pattern recognition receptors“ (PRRs) übernommen wird (Janeway Jr., 1989). Konzeptionell wird dabei vorgeschlagen, dass konservierte molekulare Bestandteile von Erregern, welche in Wirtsorganismen nicht vorkommen, von Keimbahn-kodierten Rezeptoren erkannt werden. Die Feinspezifität solcher konservierter Muster unterscheidet sich dabei zwischen verschiedenen Erregern erheblich, erkannt wird jedoch eine Grundstruktur (Muster). Ein Beispiel hierfür ist die Erkennung des Lipid-A-Teils von LPS (Takeuchi et al., 1999; Poltorak et al., 2000). Damit ist es dem angeborenen Immunsystem möglich, mit einem limitierten Rezeptorrepertoire die Vielfalt potentieller Pathogene zu erkennen.

PRRs lassen sich in zwei Gruppen unterteilen. Eine Gruppe der PRR vermittelt Phagozytose, während eine andere die Produktion inflammatorischer und regulatorischer Zytokine einleitet sowie kostimulatorische Moleküle induziert. Zu dieser zweiten Gruppe gehören Toll-like Rezeptoren (siehe Kapitel 2.2.3.). Als Folge der Erkennung von PAMPs, z. B. LPS, erfolgt eine Aktivierung des Effektorarmes durch die systemische Freisetzung von Zytokinen wie TNF, IL-1 und IL-6 (Beutler, 2001). Die zellbasierten Effektormechanismen beruhen auf einer Aufnahme und anschließenden Zersetzung der Bakterien in Phagolysosomen von neutrophilen Granulozyten und Makrophagen. Hierzu werden dort reaktive Sauerstoffmetabolite gebildet, die Lipide, Proteine und Nukleinsäuren oxidieren und zerstören. Des Weiteren finden sich zahlreiche humorale Mechanismen, die an der Abwehr von Pathogenen durch das angeborene Immunsystem beteiligt sind:

- MBP erkennt terminale Mannosyl-Reste an Bakterienoberflächen (Super et al., 1992) und aktiviert das Komplementsystem (Matsushita et al., 1992).

- Lysozym zerstört enzymatisch die Zellwände von Bakterien.
- Laktoferrin hemmt die Motilität und Biofilmproduktion verschiedener Bakterien, z. B. von *Pseudomonas aeruginosa* (Singh et al., 2002).
- Das Komplementsystem kann über drei Wege aktiviert werden: durch den klassischen Weg, welcher durch Antikörper aktiviert wird, durch den alternativen Weg, dessen Aktivierung vom Plasmaprotein Properidin abhängt, das Bakterien erkennende Kofaktoren besitzt, und über den MASP-Weg, welcher durch MBP aktiviert wird (Wallis, 2002). Alle drei Wege münden in eine gemeinsame Reaktionskette mit folgenden Effekten: 1. Aktivierung von C3b, welches Bakterien opsonisiert, 2. Produktion von C5b, welches chemotaktisch wirkt und 3. die Bildung des „membrane attacking complex“ (MAC) aus C5 bis C9, welcher Bakterien lysieren und Viren inaktivieren kann (Cooper et al., 1976).
- Antimikrobielle Proteine, Defensine und Cathelicidine (Lehrer et al., 2002a/b), sind in neutrophilen Granulozyten und Epithelzellen zu finden. Sie zerstören sehr spezifisch Biomembranen mikrobieller Zellen, jedoch ist der genaue Mechanismus noch unklar.

Neueren Konzepten zufolge sind konservierte molekulare Muster (Patterns) auch auf Nicht-Pathogenen, z. B. bei Kommensalen, zu finden. Diese werden, da sie nicht pathogen-assoziiert sind, als MAMPs (microbial associated molecular patterns) bezeichnet (Sirard et al., 2006). Zusammen mit der Beobachtung, dass TLRs auch auf Epithelzellen exprimiert sind wird klar, dass das ursprüngliche Konzept „PAMP/PRR“ Modifikationen zur Erklärung der Situation an mukosalen, nicht-sterilen Oberflächen bedarf.

2.2.2. Erworbene Immunität

Das adaptive (erworbene) Immunsystem ist evolutionär der jüngere Teil des Immunsystems und stellt einen erweiterten Schutz bei höher entwickelten Lebewesen dar. Im Gegensatz zum angeborenen Immunsystem werden die Erkennungsvorgänge hier nicht durch konservierte, wiederkehrende Muster, sondern durch sehr spezifische Antigene ausgelöst. Dies ermöglicht eine zielgerichtete, sehr spezifische Immunantwort, setzt aber ein enormes Repertoire an Erkennungsmechanismen voraus: Um dieses zu schaffen, werden im Rahmen der Lymphozytenreifung durch somatische Rekombination von Gensegmenten hochspezifische B- und T-Zell-Rezeptoren

generiert. Dies ermöglicht die Entstehung eines enormen Repertoires, wodurch jeder Lymphozyt über einen individuellen, hochspezifischen Rezeptor verfügt. Nach Aktivierung z. B. durch Antigenerkennung bei Infektion muss dann die Anzahl antigenspezifischer Abwehrzellen zunächst durch klonale Expansion vergrößert werden, damit ausreichend Effektorzellen gebildet werden können. Dies bedingt eine zeitliche Latenz von circa einer Woche bei Primärkontakt. Nach diesem ersten Kontakt erfolgt die Ausbildung von Gedächtniszellen, welche bei weiteren Kontakten eine beschleunigte Antwort und Abwehr ermöglichen.

Schlüsselzellen der adaptiven Immunantwort sind Lymphozyten. Die Aktivierung von T-Lymphozyten geschieht durch hochspezialisierte dendritische Zellen, die nach Aufnahme von Antigenen genau diese Aufgabe als Antigen-präsentierende Zellen (APC) erfüllen (Banchereau & Steinman, 1998). Dabei werden Antigene von intrazellulären Pathogenen über MHC-Klasse-I-Moleküle CD8-positiven T-Lymphozyten präsentiert, die sich daraufhin zu zytotoxischen T-Zellen differenzieren. Extrazelluläre Pathogene werden hingegen CD4-positiven T-Lymphozyten via MHC-Klasse-II-Molekülen präsentiert, wodurch eine Differenzierung in T-Helferzellen ausgelöst wird, die die Immunglobulinsynthese von B-Lymphozyten stimuliert. Zytotoxische T-Zellen sind vor allem bei der Abwehr viraler Infektionen beteiligt, indem sie virusinfizierte Zellen abtöten. Nach Erkennung von Fremdpeptiden an MHC-Klasse-I-Molekülen werden von den T-Zellen zwei Arten von reaktiven Proteinen (Granzyme und Perforine) freigesetzt (Kägi et al., 1996). Außerdem werden Botenstoffe, v.a. $\text{IFN}\gamma$, produziert (Callan et al., 2000), welche die virale Replikation hemmen und Makrophagen aktivieren.

Die freigesetzten Perforine sind porenbildende Proteine, die sich in die Zellmembran der infizierten Zelle einlagern und es so den Granzymen ermöglichen in die Zelle zu gelangen. Diese Granzyme, die von zytotoxischen T-Zellen calciumabhängig aus deren Granula freigesetzt werden, sind Serinproteasen, die in der Zielzelle Apoptose induzieren (Edwards et al., 1999).

Eine weitere Art von T-Zellen stellen regulatorische T-Zellen dar, welche eine wichtige supprimierende Wirkung auf die T-Zellproliferation ausüben und somit eine zentrale Rolle für die Verwirklichung peripherer Toleranz einnehmen. So konnten bei Patienten mit einer Mutation des *Foxp3*-Gen (sog. IPEX-Syndrom), welches ein für die Funktion regulatorischer T-Zellen essentielles Molekül kodiert, Autoimmunendokrinopathien (Diabetes mellitus Typ I, Thyreoiditis), Allergien, Ekzeme und schwere Infektionen

beobachtet werden (Wildin & Freitas, 2005; Torgerson et al., 2007). Regulatorische T-Zellen haben eine besondere Rolle im gesamten Immunsystem, da ihre hemmenden Effekte nicht ausschließlich auf das erworbene Immunsystem (B- und T-Zellen) beschränkt sind, sondern ebenso auf Zellen des angeborenen Immunsystems (Makrophagen, Monozyten, dendritische Zellen) wirken (Taams & Akbar, 2005).

B-Zellen benötigen zur Aktivierung zwei Signale: Das erste wird über den Antigenrezeptor an der Oberfläche der B-Zelle vermittelt, während das zweite Signal durch eine T-Helferzelle gegeben wird. Dazu bildet diese nach Erkennen des Antigen-MHC-Komplex membranständige CD40-Liganden und sezerniert IL-4, wodurch die klonale Proliferation der B-Zelle ausgelöst wird (Valle et al., 1989). Im Keimzentrum der Lymphfollikel ist ein Isotypwechsel der Immunglobulinklasse (G, M, A, D oder E) durch die B-Zelle möglich (Li et al., 2004), was als Class switch recombination (CSR) bezeichnet wird.

2.2.3. Toll-like Rezeptoren

Toll-like Rezeptoren stellen wichtige Vertreter der Pattern-Recognition-Rezeptoren des angeborenen Immunsystems dar.

2.2.3.1. Entdeckung von Toll

In der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* wurde 1984 das Protein Toll entdeckt (Anderson et al., 1984), welches eine wesentliche Rolle bei der dorso-ventralen Achsenbildung in der Embryonalentwicklung spielt. Später wurde dieses Protein als Transmembranprotein charakterisiert (Hashimoto et al., 1988) und ein Zusammenhang zwischen Immunabwehr und Toll festgestellt (Lemaitre et al., 1996). So verstarben Toll-defiziente Fliegen an schweren Pilzinfektionen. Toll besteht aus Leucin-reichen, extrazellulären Domänen (Hashimoto et al., 1988) und der intrazellulären TIR-Domäne (Toll/IL-1R homology domain), einer Rezeptordomäne, die dem IL-1R ähnlich ist (Gay & Keith, 1991). Toll wird durch endogene Liganden aktiviert, intrazelluläre Signalproteine wie der Adapter *Tube* oder Kinasen (*Cactus*, *Pelle* und *Dorsal*) bewirken eine Aktivierung von Transkriptionsfaktoren der Rel-Familie (Anderson, 2000; LeMosy et al., 1999). Durch diese Aktivierung werden antimikrobielle Proteine, z. B. Defensin oder Drosomycin, gebildet (Rutschmann et al., 2002).

2.2.3.2. Toll-like Rezeptoren und ihre Liganden

Die bei Säugetieren gefundenen Homologe von Toll nannte man wegen des ähnlichen Aufbaus (Bell et al., 2003) Toll-like Rezeptoren (TLR) (Medzhitov et al., 1997; Rock et al., 1998). Diese sind jedoch im Gegensatz zu Toll bei *Drosophila* direkt durch Fremdstrukturen aktivierbar. TLRs werden vor allem (aber nicht ausschließlich) von verschiedenen Zelltypen des Immunsystems exprimiert (Zarembek et al., 2002), hauptsächlich aber von Zellen des MPS. Bisher konnten 13 Mitglieder der Toll-like Rezeptor-Familie bestimmt werden, darunter 10 humane (TLR1-10) und 12 murine (TLR1-9, TLR11-13) Rezeptoren (Tabeta et al., 2004; Akira & Takeda, 2004). Einen Überblick über die beim Mensch zu findenden Rezeptoren und die wichtigsten zugehörigen Liganden geben Tabelle 1 und Abbildung 1.

2.2.3.3. Aktivierung von Toll-like Rezeptoren

Toll-like Rezeptoren werden durch die Bindung ihrer Liganden aktiviert (siehe Abbildung 1), was im Allgemeinen zur Dimerisierung führt (Aderem et al., 2000). Die Mehrzahl der PAMPs wird durch TLR-Homodimere erkannt, TLR1 und TLR6 scheinen jedoch in Form von Heterodimeren mit TLR2 zu funktionieren (Ozinsky et al., 2000). Während das Heterodimer aus TLR1 und TLR2 auf Triacyllipopeptide reagiert, wird der Komplex aus TLR6 und TLR2 von Diacyllipopeptiden (Takeuchi et al., 1999; Lien et al., 1999), Zymosan (Underhill et al., 1999) und *Mykoplasma*-Lipopeptiden (Aliprantis et al., 1999) aktiviert. Die Aktivierung von TLR4 durch LPS wurde erstmalig 1998 beschrieben (Poltorak et al., 1998). Für die aktivierenden Effekte des LPS ist das Lipid-A verantwortlich, das aus einem Diglucosamin besteht, welches über Amid- und Esterbindungen mit langkettigen Fettsäuren verbunden ist (Poltorak et al., 2000; Lien et al., 2001). Die Bindung dieses Lipid-A Moleküls ist abhängig von MD-2, einem sezernierten und TLR4-assoziierten Protein (Miller et al., 2003). TLR4 wird außerdem durch das Fusion-Protein des respiratory syncytial virus (RSV) (Kurt-Jones et al., 2000) und durch Taxol, das aus *Taxus brevifolia* gewonnen wird, jedoch nur auf murinen TLR4 wirkt, aktiviert (Kawasaki et al., 2000). Endogene Aktivatoren von TLR4 sind Hsp60, Hsp70 (Vabulas et al., 2001; Asea et al., 2002) und Fibronectin (Okamura et al., 2001). Auch DNA kann als PAMP wirken. Dabei sind CpG-Dinukleotide von besonderer Bedeutung; diese sind im menschlichen Genom

unterrepräsentiert und zusätzlich meistens methyliert, während bakterielle oder virale CpG-Motive unmethyliert sind und nach Aufnahme als PAMP von endo-lysosomal exprimiertem TLR9 erkannt werden (Hacker et al., 1998; Hemmi et al., 2000). Die Stimulation von Toll-like Rezeptoren führt zu einer Aktivierung verschiedener Transkriptionsfaktoren, wie NFκB, AP1 und IRF3 (interferon regulatory factor). NFκB und AP1 induzieren immunologisch aktive Zytokine, z. B. TNF, IL-1, IL-6, IL-12, MIP-1β und MIP-2 (macrophage inflammatory protein) sowie das kostimulatorische Protein B7.1 (Medvedev et al., 2000). IL-1 ist Kofaktor der T-Zellaktivierung und verstärkt durch mitogene Effekte die IL-2 Produktion, IL-6 fördert die B-Zell-Differenzierung und aktiviert T-Zellen, während IL-12 die Proliferation mononukleärer Zellen begünstigt. TNF wirkt pro-phagozytotisch, fördert die Proliferation von T-Zellen und steigert die Zytotoxizität von Neutrophilen.

2.2.3.4. Signalwege der Toll-like Rezeptoren

Für die Signalkaskade nach TLR-Aktivierung sind Adapterproteine essentiell, die ihrerseits eine TIR-Domäne besitzen, die an die TIR-Domäne des TLR binden kann.

Bisher sind fünf verschiedene Adaptermoleküle beschrieben: MyD88 (Medzhitov et al., 1998), TIRAP (Horng et al., 2001), auch als MAL bezeichnet (Fitzgerald et al., 2001), TRIF (Yamaoto et al., 2002), entspricht TICAM-1 (Oshiumi et al., 2003a) und TRAM (Bin et al., 2003), welches auch als TICAM-2 (Oshiumi et al., 2003b) bezeichnet wird. Das Protein SARM, welches das jüngste Mitglied der Familie der Adaptermoleküle darstellt, hat vermutlich negativ regulatorische Funktionen (Carty et al., 2006; O'Neill et al., 2007). Bei den Signalwegen lassen sich ein MyD88-abhängiger und ein MyD88-unabhängiger, TRIF-abhängiger Weg unterscheiden. Eine graphische Übersicht der im folgenden Text erläuterten Signalwege bietet Abbildung 2.

2.2.3.4.1. MyD88-abhängiger Signalweg der TLR-Aktivierung

Der MyD88-abhängige Weg der Signalübertragung ist dem durch IL-1R analog. MyD88 besitzt eine N-terminale „Death“-Domäne und eine C-terminale TIR-Domäne, mit der es sich an die TIR-Domäne des TLR lagert. Durch Stimulation des Rezeptors rekrutiert MyD88 IRAK-4, dessen „Death“-Domäne mit der „Death“-Domäne des MyD88 interagiert, und die Aktivierung und Phosphorylierung von IRAK-1 bedingt. Aktiviertes IRAK-1 assoziiert mit TRAF6, was zur Aktivierung zweier verschiedener

Wege führt: Zum einen werden MAP-Kinasen aktiviert, die wiederum die Aktivierung von AP1 Transkriptionsfaktoren bewirken, zum anderen kommt es zu einer Aktivierung des TAK1/TAB Komplex, der die Aktivität der I κ B-Kinase (IKK) erhöht. IKK phosphoryliert I κ B, woraus eine nukleäre Translokation von NF κ B resultiert, das dort die Expression inflammatorischer Zytokine induziert. Für den MyD88-abhängigen Signalübertragungsweg spielt MyD88 eine Schlüsselrolle: Versuche an Mäusen, die über kein (funktionsfähiges) MyD88 verfügen, haben gezeigt, dass nach Stimulation mit LPS (Kawai et al., 1999), atypischem LPS, Peptidoglykan, Zellysaten von Mykobakterien (Takeuchi et al., 2000), CpG DNA (Schnare et al., 2000; Hacker et al., 2000), Flagellin (Hayashi et al., 2001) oder antiviralen Wirkstoffen (Hemmi et al., 2002) keine Produktion inflammatorischer Zytokine induzierbar war. Daraus kann gefolgert werden, dass MyD88 bei allen TLRs essentiell ist, um eine Produktion inflammatorischer Zytokine auszulösen. Bei der Suche nach strukturellen Verwandten von MyD88 wurde ein weiteres Molekül entdeckt, das eine TIR-Domäne besitzt und als Adaptermolekül fungiert: TIRAP (Horng et al., 2001) bzw. MAL (Fitzgerald et al., 2001). Makrophagen mit TIRAP/MAL-Defizienz zeigen eine verminderte Zytokinproduktion bei Stimulation mit Liganden der Toll-like Rezeptoren 2 und 4, während bei Stimulation mit Liganden von TLR3, TLR5, TLR7 und TLR9 kein Effekt zu beobachten war (Horng et al., 2002; Yamamoto et al., 2002a).

2.2.3.4.2. MyD88-unabhängiger-/TRIF-abhängiger Signalweg der TLR-Aktivierung

Obwohl in Makrophagen von MyD88-knockout Mutanten keine Induktion proinflammatorischer Zytokine nach TLR4 Stimulation zu beobachten ist, tritt doch eine allerdings verzögerte Aktivierung von NF κ B (Kawai et al., 1999) ein. Dies zeigt zum einen, dass die Zytokinproduktion durch TLR4 Stimulation komplett MyD88 abhängig ist, zum anderen, dass ein MyD88-unabhängiger Weg zur Aktivierung von NF κ B vorhanden sein muss. Studien konnten zeigen, dass nach TLR4 Stimulation eine Aktivierung von IRF-3 und eine MyD88-unabhängige NF κ B Aktivierung erfolgte (Kawai et al., 2001). Die Aktivierung von IRF-3 bewirkt eine Produktion von IFN- β , welches STAT1 aktiviert und eine Reihe von IFN-induzierbaren Genen induziert (Toshchakov et al., 2002; Hoshino et al., 2002; Doyle et al., 2002). Eine IRF-3 Aktivierung ließ sich auch bei viralen Infektionen und bei Stimulation mit ds-RNA beobachten (Yoneyama et al., 1998). TLR3 aktiviert ebenso MyD88-unabhängig IRF-3

und induziert IFN- β . Somit nutzen sowohl TLR3 als auch TLR4 einen MyD88-unabhängigen Weg zur Induktion von IFN- β . Auf der Suche nach einem Adaptermolekül, welches diese Effekte vermitteln könnte, stieß man auf ein TLR3-assoziiertes Molekül, das TRIF (Yamamoto et al., 2002b) bzw. TICAM-1 (Oshiumi et al., 2003) genannt wurde. TRIF-knockout Mäuse zeigten weder nach TLR3 noch nach TLR4 Stimulation eine Aktivierung von IRF-3 und nur eine verminderte Expression von IFN- β bzw. IFN-induzierbaren Genen (Diebold et al., 2003; Hoebe et al., 2003). Es wurde ein weiteres Adaptermolekül, TRAM (Bin et al., 2003) / TICAM-2 (Oshiumi et al., 2003), gefunden. Bei Mäusen, die einen Defekt in diesem Gen besaßen, ließ sich beobachten, dass TRAM bei TLR4-vermittelter, nicht aber bei TLR3-vermittelter Induktion von IFN- β und IFN- β induzierbaren Genen beteiligt ist (Fitzgerald et al., 2003b; Oshiumi et al. 2003, Yamamoto et al., 2003). TRAM ist demnach für den MyD88-unabhängigen/TRIF-abhängigen Signalweg bei TLR4-Aktivierung essentiell.

Studien an Doppelmutanten, die sowohl einen TRIF- als auch einen TRAM-knockout besaßen, zeigten eine Induktion proinflammatorischer Zytokine nach TLR2, TLR7 und TLR9 Stimulation, sowie eine Phosphorylierung von IRAK-1 nach TLR4 Stimulation (Diebold et al., 2003; Yamamoto et al., 2003), was zeigt, dass der MyD88-abhängige Weg der Signalübertragung TRIF und TRAM unabhängig ist. Da jedoch eine Induktion proinflammatorischer Zytokine in TRIF-/TRAM-knockout Mäusen durch TLR4-Liganden nicht möglich ist, müssen hierfür Teile sowohl des MyD88-abhängigen als auch des MyD88-unabhängigen Weges notwendig sein. Die Mechanismen dieser Interaktion sind jedoch unklar.

TRIF und TRAM verwenden sehr ähnliche Mechanismen der Signalübertragung. TRIF besitzt eine zentrale TIR-Domäne, die an den TLR bindet. Seine zwei terminalen Domänen vermitteln im Weiteren eine Aktivierung von NF κ B-abhängigen Promotoren, wobei die C-terminale Domäne mit RIP-1 (Meylan et al., 2004), die N-terminale mit TRAF6 (Sato et al., 2003; Jiang et al., 2004) assoziiert. Die N-terminale Domäne ist zusätzlich (im Gegensatz zur C-terminalen Domäne) an der weiteren Aktivierung des IFN- β -Promotors beteiligt (Yamamoto et al., 2002). Sie kann zudem noch mit einem Komplex aus IKK α /IKK ϵ und TBK1 assoziieren, der dann die Phosphorylierung und den nukleären Transport von IRF-3 bewirkt, was wiederum die Bildung von IFN- β und die Induktion IFN- β -induzierbarer Gene bewirkt (Fitzgerald et al., 2003a; Sato et al., 2003).

2.3. Mukosale Immunität

Menschliche Schleimhäute (Mundhöhle, Darm, Respirationstrakt, Vagina) bilden im Vergleich zur Körperoberfläche (rund 2 m²) eine enorm große Ober- und somit Kontaktfläche (ca. 300m²). An allen Schleimhäuten lassen sich Bakterien finden, ohne dass es sich um ein entzündliches Geschehen handelt. Diese residente Flora hat für den Wirt positive Effekte (Kommensalismus), stellt jedoch eine potentielle Bedrohung dar, da auch kommensale Bakterien unter gewissen Umständen pathogene Effekte bewirken können (z. B. in opportunistischen Infektionen). Ebenso wie pathogene Bakterien enthalten auch die residenten Erreger viele (potentielle) Aktivatoren des Immunsystems. Eine unkontrollierte, überschießende Aktivierung des Immunsystems durch diese natürliche Mikroflora, deren Zahl (rund 10¹⁴ Mikroben) die Anzahl von Zellen im menschlichen Organismus (rund 10¹³ Zellen) übertrifft, würde jedoch eine Schädigung des Wirtes bedingen. Es ist daher eine „Toleranz“ des Wirtes gegenüber diesen Bakterien erforderlich. Da jedoch auch diese Bakterien potentiell pathogen sind, muss diese Toleranz auch begrenzt sein.

Eine unselektive, jedoch erfolgreiche Möglichkeit des Schutzes vor Invasion und Infektion durch Bakterien bieten physikalische Abwehrmechanismen. Dabei erfolgt keine Diskrimination zwischen pathogenen und kommensalen Bakterien. Epithelzellen sind durch „tight junctions“, welche durch Zytokine reguliert werden können (Fasano, 2001; Rossi et al., 2002), miteinander verbunden und verhindern so die Ausbreitung von Bakterien ins Gewebe. Exokrine Zellen produzieren Schleim, der ebenfalls eine Invasionsbarriere darstellt und vom Flimmerepithel im Respirationstrakt transportiert werden kann.

Weitaus komplexer sind die Abwehrmechanismen, welche eine Erkennung des (potentiellen) Pathogens voraussetzen. Es muss ein Gleichgewicht zwischen Toleranz von kommensalen und Abwehr von pathogenen Bakterien, sowie eine Abwehr von Kommensalen, welche die epitheliale Barriere überwunden haben, bestehen.

Eine These zur Erklärung dieser Toleranz ist, dass Epithelzellen, welchen den ersten Kontakt mit kommensalen Bakterien haben, ein vergleichsweise geringes Reaktionspotential besitzen, indem proinflammatorische Zytokine generell herunterreguliert bzw. bestimmte PRRs (z. B. TLR4) unterrepräsentiert sind (Abreu et al, 2001; Steidler et al. 2000). Dabei gibt es Hinweise, dass diese fehlende oder geringe Expression von PRRs durch proinflammatorische Bedingungen verändert werden kann:

So konnte gezeigt werden, dass Makrophagen im Intestinum keine Expression von CD14 zeigen, in Entzündungssituationen jedoch konnte CD14 nachgewiesen werden (Smith et al., 2001).

Weiterhin kann eine relative Toleranz des Wirtes gegenüber bestimmten Bakterien auch durch Inhibition von Abwehrprozessen durch bakterielle Bestandteile verursacht sein. Hier sind vielerlei mögliche Ansatzpunkte denkbar: Unter anderem konnte eine Inhibition von I κ B durch Kommensale gezeigt werden (Neish, 2002). Ebenso konnten Studien für Kommensalen im Darm, z. B. Bifidobakterien, eine Inhibition der NF κ B-Aktivierung durch LPS zeigen (Riedel et al., 2007). Weiterhin konnte auch im Respirationstrakt eine Abschwächung proinflammatorischer Effekte nach Stimulation mit *S. typhimurium* durch *Bifidobacterium infantis* und *Lactobacillus salivarius* beobachtet werden (O'Hara et al., 2006).

Es ist anzunehmen, dass für mukosale Immunität gegenüber bestimmten Erregern ein fein abgestimmtes Gleichgewicht zwischen pro- und antiinflammatorischen Prozessen notwendig ist. Die Mechanismen auf denen dieses Gleichgewicht beruht sind größtenteils noch unverstanden, insbesondere im Bezug auf die polymikrobielle Situation an humanen Schleimhäuten und die vielfältigen Möglichkeiten der Interaktionen zwischen kommensalen, fakultativ pathogenen sowie pathogenen Bakterien.

2.4. Die Zellwand Gram-positiver und Gram-negativer Bakterien

2.4.1. Aufbau von Bakterienzellwänden

Bakterien verfügen, bis auf wenige Ausnahmen, über eine Zellwand, die der Zytoplasmamembran aufliegt. Bei Gram-positiven Bakterien besteht diese Zellwand aus einer 15 bis 80 nm dicken Schicht Peptidoglykan, welches eine netzartige Struktur aus Polysaccharidketten, sog. Glykanen, ist, die über kurze Peptidketten untereinander quervernetzt sind. Die langen Polysaccharidfäden bestehen aus repetitiven Teilstücken, aus N-Acetylmuraminsäure und N-Acetylglucosamin. Die Zellwand Gram-positiver Bakterien enthält des weiteren Teichonsäuren, die mit dem Peptidoglykangerüst verknüpft sind, sowie Lipoteichonsäuren (LTA), die mit ihrem Lipidanteil in der Zellmembran verankert sind.

Gram-negative Bakterien verfügen nur über eine vergleichsweise dünne Peptidoglykanschicht (10 bis 20 nm). Dieser lagert sich eine zweite, äußere Membran auf, die über Lipoproteine mit der Peptidoglykanschicht verbunden ist. Zwischen diesen beiden Schichten befindet sich ein periplasmatischer Raum. An der Oberfläche der äußeren Membran finden sich Lipopolysaccharide (LPS) und Proteine. Der nach außen gerichtete Teil des LPS-Moleküls wird als O-Antigen bezeichnet, es ist für die Virulenz vieler Bakterienarten bedeutsam und wird häufig zur (Sub-)Typisierung von Bakterien genutzt.

2.4.2. Unterschiede bei der Aktivierung des Immunsystems und Zytokinfreisetzung

Das angeborene Immunsystem wird durch unterschiedliche Bestandteile von Bakterien aktiviert. Einige Stimuli kommen sowohl in Gram-positiven als auch in Gram-negativen Bakterien vor. Beispielhaft ist bakterielle DNA (CpG-DNA) vom Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien zu nennen, welche TLR9 stimuliert (Hemmi et al., 2000). Die immunstimulatorische Aktivität von Molekülen der Zellwand unterscheidet sich bei Gram-positiven und Gram-negativen im Hinblick auf den Typ des aktivierten Rezeptors, sowie in der Art und Menge der Zytokine, welche nach Stimulation freigesetzt werden: LTA Gram-positiver Bakterien aktiviert TLR2 und TLR6, Peptidoglykan aktiviert TLR2 (Schwandner et al., 1999) und Nod1/2 (Inohara et al., 2005). Nach *in vivo* und *in vitro* Stimulation mit LTA und/oder Peptidoglykan ließ sich

eine Sekretion inflammatorischer Zytokine (z. B. TNF α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12) beobachten (Ellingsen et al., 2002; Lawrence et al., 1998; Mattsson et al., 1993). Im Gegensatz dazu aktiviert LPS Gram-negativer Bakterien TLR4 (Poltorak et al., 1998). Interessanterweise bewirkt das LPS der Gram-negativen Bakterien *Porphyromonas gingivalis* (Kirikae et al., 1999; Hirschfeld et al., 2001), *Prevotella intermedia* (Kirikae et al., 1999) *Leptospira interrogans* (Werts et al., 2001) und *Helicobacter pylori* (Smith et al., 2003) jedoch auch eine Aktivierung des TLR2. Der Vergleich der gemessenen Zytokin-Mengen nach Stimulation mit Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien, zeigt klare Unterschiede, wobei die gebildeten Mengen von IL-6 und TNF α nach Stimulation mit Gram-negativen Bakterien deutlich größer waren, als nach Stimulation mit Gram-positiven Erregern (Kragstjerg et al., 1998). Weitere Untersuchungsergebnisse geben Hinweise, dass auch das Muster der induzierten Zytokine für Gram-positive und Gram-negative Bakterien unterschiedlich ist (Feezor et al., 2003; Hesse et al., 2000).

2.5. Anwendungsmöglichkeiten eines humanen Vollblut-Testsystems

Blut besteht aus zellulären Bestandteilen (z. B. Erythrozyten, Leukozyten, Thrombozyten) und Plasma. Das Plasma enthält Proteine unterschiedlichster Gruppen, die für zahlreiche Funktionen des Blutes verantwortlich sind. Somit ist ein Versuchssystem, das als Grundlage Vollblut nutzt ein äußerst komplexes Testsystem. Aufgrund der unterschiedlichen Komponenten im Testsystem und deren Interaktion sind nur bedingt Rückschlüsse auf genaue molekulare Mechanismen möglich. Trotz aller Einschränkungen hat ein Vollblutsystem den entscheidenden Vorteil, dass es als *in vitro*-System Bedingungen bietet, die der *in vivo*-Situation deutlich ähnlicher sind als Experimente an isolierten Zelltypen bzw. Geweben. Bereits 1982 führten Kirchner et al. (1982) Untersuchungen zur Produktion von Interferon mit verschiedenen Stimuli in einem Vollblutsystem durch. Eine Reihe von weiteren Untersuchungen beschäftigte sich mit der Induktion der Zytokinproduktion nach Stimulation von Vollblut mit Endotoxin Gram-negativer Bakterien (z. B. De Forge et al., 1991) und LTA Gram-positiver Erreger (Morath et al., 2001; Hermann et al., 2002). Vollblutsysteme wurden ebenfalls benutzt, um die Besonderheiten der Zytokinproduktion bei Patienten mit bestimmten Erkrankungen, wie z. B. Multiple Sklerose (Chofflon et al., 1991,1992), Leishmaniose (Frankenburg & Klaus, 1991), rheumatoide Arthritis (Zangerle et al., 1992), Sepsis (Ertel et al., 1993, 1994) und Borelliose (Diterich et al., 2001) zu charakterisieren. Ebenso eignet sich ein Vollblutsystem mit Erfassung der Zytokinproduktion zum Monitoring immunmodulatorischer Behandlungen mit z. B. G-CSF (Hartung et al., 1995, 1999) oder GM-CSF (Hartung et al., 2000). Darüber hinaus kann auch die Lymphokinproduktion mithilfe eines Vollblut-Testsystems beurteilt werden (Hermann et al., 2002) sowie die Kontamination von Substanzen mit Pyrogenen erfasst werden (Hartung et al., 1998; Fennrich et al., 1999).

2.6. Bakterien

Im Folgenden werden die Bakterienspezies vorgestellt, welche in den Versuchen zu dieser Arbeit eingesetzt wurden.

2.6.1. Periodontopathogene Bakterien

Die Auswahl der „Versuchskeime“ orientierte sich an der beschriebenen oder vermuteten Bedeutung im Rahmen polymikrobieller Infektionen, insbesondere der Parodontalerkrankungen.

2.6.1.1. *Actinomyces meyeri*, *Actinomyces odontolyticus*

Das Gram-positive, nichtsporenbildende, anaerobe Stäbchenbakterium *A. meyeri* wächst in frischen Kulturen fadenförmig und bildet verzweigte Filamente. Actinomyceten gehören teilweise zur residenten Mundflora, sie entwickeln sich saprophytär in kariösen Zähnen und deren Umgebung. Pathogenetisch sind sie als Abszessbildner bei Menschenbissverletzungen und bei parodontalen Entzündungen (Chavez de Paz et al., 2004) nachweisbar.

A. odontolyticus, eine weitere Spezies der Gattung *Actinomyces* zeigt kulturmorphologisch ein ähnliches Bild wie *A. meyeri*. Eine rote Pigmentierung beim Wachstum auf Brain-Heart-Blutagar kann makroskopisch die Diagnose als *A. odontolyticus* ermöglichen (Kaetzke et al., 2003). *A. odontolyticus* ist an lokalen Mischinfektionen (Actinomykosen) mit *A. actinomycetemcomitans*, *Enterobacteriaceae*, *Bacteroides*- und Fusobakterienarten, Staphylokokken und Streptokokken beteiligt. Diese zeigen eine lokale Eiterung, die auf das umliegende Gewebe übergreifen kann und zu Fistelbildung und schließlich zu tumorartigen, später nekrotisierenden Wucherungen führen kann.

2.6.1.2. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

A. actinomycetemcomitans ist ein kleines, mikroaerophiles, Gram-negatives Stäbchen mit abgerundeten Enden. Beim Wachstum auf Blutagar imponieren sternförmige, kleine Kolonien, die aber nicht von allen Varianten gebildet werden. *A. actinomycetemcomitans* zeigt eine deutlich Beziehung zu schweren parodontalen Erkrankungen (Kamma et al., 1995). Dabei kann *A. actinomycetemcomitans*

signifikant häufiger bei aggressiven als bei chronischen Parodontitiserkrankungen nachgewiesen werden (Schacher et al., 2007). Ebenso lässt sich der Erreger auch bei Wundinfektionen, Bakteriämien und Endokarditiden isolieren, wobei sich diese Fälle durch eine hohe Letalität (bis 30%) auszeichnen.

2.6.1.3. *Campylobacter rectus*

C. rectus (vormals *Wolinella recta*) ist ein schlankes, spiralig gekrümmtes, bewegliches, Gram-negatives Stäbchen, das in mikroaerophiler Atmosphäre wächst und keine Sporen bildet. Der Erreger zeigt eine deutliche Assoziation zu Parodontitis: In subgingivalen Plaques von Patienten mit unbehandelter Parodontitis lässt sich *C. rectus* viermal häufiger nachweisen als in gesunden Kontrollgruppen (Lippke et al., 1991).

2.6.1.4. *Dialister pneumosintes*

Der früher der Gattung *Bacteroides* (Moore et al., 1994a) zugeordnete *Dialister pneumosintes* ist ein Gram-negatives, anaerobes, unbewegliches, nicht-sporenbildendes Stäbchen. *D. pneumosintes* wird als ein potentieller Mitverursacher parodontaler Erkrankungen angesehen (Siqueira & Rocas, 2002).

2.6.1.5. *Eikenella corrodens*

Eikenella corrodens ist ein fakultativ anaerobes, Gram-negatives Stäbchen, das vor allem die Mundhöhle besiedelt. Es wurde eine Assoziation zur Parodontitis bei unter zwanzigjährigen Patienten (LJP) (Suda et al., 2002) nachgewiesen. Darüber hinaus ließen sich im Rahmen einer sechsjährigen Untersuchung an 43 Patienten mit invasiven *E. corrodens*-Infektionen als häufigste Lokalisationen der Kopf-Hals Bereich (56%), die Lunge (23%) und intraabdominelle Areale (14%) beobachten. Seltener waren Infektionen der Haut, des Skeletts und des Endokards. In 65% der Fälle wurde *E. corrodens* im Rahmen einer polymikrobiellen Infektion isoliert, wobei sich als Begleitflora besonders häufig Streptokokken finden ließen (Sheng et al., 2001).

2.6.1.6. *Enterococcus faecalis*

Der Gram-positive, im mikroskopischen Bild meist paarweise angeordnete *E. faecalis* gehört zur Lancefield-Serogruppe D der Streptokokken. Enterokokken gehören zur

physiologischen Darmflora des Menschen und kommen ebenso in der Mundhöhle vor. Sie verursachen neben Lokalinfektionen vor allem auch Harnwegsinfekte (Toledo et al., 2004). Von zunehmender Bedeutung bei nosokomial erworbenen Infektionen ist die Ausbreitung vancomycinresistenter Enterokokken (VRE) (Bouchillon et al., 2004).

2.6.1.7. *Fusobacterium nucleatum*

Das zu den Gram-negativen Anaerobiern zählende spindelförmige Stäbchen lässt sich gehäuft aus den Zahntaschen von Patienten mit parodontalen Erkrankungen isolieren (Dzink et al., 1988, Siqueira et al., 2004). Bei Patienten mit Hirnabszeß durch anaerobe Erreger stellt *F. nucleatum* den am häufigsten isolierten Erreger dar (Le Moal, 2003).

2.6.1.8. *Neisseria flavescens*, *Neisseria mucosa*, *Neisseria perflava*

Die Gattung *Neisseria* umfasst eine Gruppe Gram-negativer Kokken aus der Familie der *Neisseriaceae*. *Neisseria*-Arten kommen als Paare kugeliger Bakterienzellen, sog. Diplokokken, vor. *N. flavescens* besiedelt vor allem die Schleimhäute der oberen Atemwege. Die Rolle als Krankheitserreger ist nicht eindeutig geklärt, obgleich Isolate aus polymikrobiellen Infektionen bekannt sind. Als neue Art publizierte Veron *N. mucosa* (Veron et al., 1959), welches zur normalen Bakterienflora der menschlichen Schleimhäute gehört. *N. perflava* gehört ebenfalls zur physiologischen Flora menschlicher Schleimhäute.

2.6.1.9. *Parvimonas micros*

Für den Gram-positiven Anaerobier *P. micros*, der früher als *Micromonas* und vorher als *Peptostreptococcus* klassifiziert war, zeigen Studien eine sehr deutliche Assoziation zur Parodontitis (Kamma et al., 2004), insbesondere zur Erwachsenen-Parodontitis (AP) und zur schnell fortschreitenden Parodontitis (RPP) (Nonnenmacher et al., 2001).

2.6.1.10. *Peptoniphilius asaccharolyticus*

Diese obligat anaeroben, Gram-positiven Streptokokken, die in der Mundhöhle, im Darm und Genitalbereich vorkommen, können nach Verletzungen oder postoperativ Ursache von Wundinfektionen sein. Diese sind besonders häufig polymikrobieller Natur und enthalten sowohl Anaerobier als auch Aerobier (Brook, 1994; Civen et al., 1993).

2.6.1.11. *Porphyromonas gingivalis*

P. gingivalis ist ein Gram-negatives kokkoides Kurzstäbchen. Es wächst strikt anaerob, ist unbeweglich und nicht zur Sporenbildung befähigt. Als Mitglied der „dunkel-pigmentierten“ *Bacteroides*-Gruppe bildet es bei Wachstum auf Blutagar charakteristische schwarzbraune bis schwarzgrüne, schleimige Kolonien. Die größte pathogenetische Rolle spielt die Besiedlung des Mund-Nasen-Rachen-Raumes durch *P. gingivalis*, der als Verursacher von Mundgeruch, aber auch als Mitbeteiligter an parodontalen Erkrankungen angesehen wird. Regelmäßig lässt sich bei Patienten mit aggressiver Parodontitis neben anderen Anaerobiern *P. gingivalis* nachweisen (Kamma et al., 2004). *P. gingivalis* LPS zieht besonderes Interesse auf sich, da es sich strukturell stark von Lipopolysacchariden anderer Bakterien (z. B. Salmonella-LPS) unterscheidet (Kirikae et al., 1999) und vermutlich Effekte andere bakterieller Endotoxine beeinflussen kann (Bostanci et al., 2007). Fimbrien ermöglichen *P. gingivalis* u.a. die Adhäsion an extrazelluläre Matrixproteine, $\alpha 5\beta 1$ -Integrin und Strukturen kommensaler Bakterien. Nach Bindung an $\alpha 5\beta 1$ -Integrin kann *P. gingivalis* über einen Aktin-vermittelten Weg invaginiert werden (Amano, 2007).

2.6.1.12. *Prevotella intermedia*

Prevotella (früher zur anaeroben Gattung *Bacteroides* gezählt) kommt natürlich in Mund, Darm und Vagina vor und ist an endogenen Infektionen beteiligt. Da *P. intermedia* bei manchen, nicht aber allen parodontalen Erkrankungen gefunden werden kann, wird folgende Hypothese diskutiert: *P. intermedia* trägt durch die Verstoffwechselung von Zucker in der Zahntasche und dem damit verbundenen erhöhten Sauerstoffverbrauch zum anaeroben Milieu bei und verbessert somit die Wachstumsbedingungen für Erreger von Parodontiden. Bereits makroskopisch fällt die dunkle Farbe der Kolonien auf.

2.6.1.13. *Streptococcus mutans*, *Streptococcus intermedius*, *Streptococcus sanguis*

Streptokokken sind kugelige Gram-positive Kokken, die sich in gewundenen Ketten anordnen. Sie sind unbeweglich und nicht sporenbildend. Zur Unterteilung der Streptokokken dienen Hämolyseverhalten, Antigenstruktur (Serotypen nach Lancefield) und Sauerstoffbedürfnis. *S. mutans*, *S. intermedius* und *S. sanguis* sind orale

Streptokokken der Viridans-Gruppe, deren charakteristisches Merkmal eine vergrünende α -Hämolyse bei Wachstum auf Blutagar ist. Orale Streptokokken sind ein wichtiger Faktor bei der Kariesentstehung, wobei besonders die frühe Akquirierung von *S. mutans* von Bedeutung ist (Harris et al., 2004). Bei Verschleppung in die Blutbahn, z. B. bei Zahnextraktionen, und bestehender Vorschädigung der Herzklappen können sich Streptokokken auf diesen ansiedeln und zu einer Endokarditis lenta führen.

2.6.2. „Referenzkeime“

Zur Kontrolle der Versuche wurden die im folgenden Teil beschriebenen „Referenzkeime“ ausgewählt, da hierfür die LPS- bzw. LTA-Strukturen und das immunologische Wirkprofil bereits umfangreich untersucht und beschrieben wurde.

2.6.2.1. *Escherichia coli*

E. coli ist ein Gram-negatives, sporenloses, peritrich begeißeltes und somit bewegliches Stäbchen. Es kann Glukose, Laktose und Mannitol unter Gasbildung vergären und bildet Indol. *E. coli* kommt regelmäßig im Darm von Warmblütern vor und wird deshalb als Fäkalindikator, z. B. bei der Trinkwasserkontrolle, genutzt. Er ist einer der häufigsten Erreger nosokomialer Infektionen (Geffers et al., 2004). Durch Schmierinfektionen sind besonders die Harnwege häufig betroffen. Dabei reicht das Spektrum von Urethritis, Zystitis und Urethrozystitis bis zu Zystopyelitis und Pyelonephritis. Eine besondere pathogenetische Rolle spielen hierbei die P-Fimbrien (Pyelonephritis-assoziierte Fimbrien), die als wichtigster Virulenzfaktor von *E. coli* bei Harnwegsinfektionen gelten, da sie die Adhäsion an das Urothel vermitteln (Ishikawa, 1991). Als Komplikation einer solchen Infektion kann eine Urosepsis entstehen. Häufig ist *E. coli* auch an Infektionen des Bauchraumes, z. B. Peritonitiden, Appendizitiden, beteiligt. Bedeutung als Verursacher von Diarrhöen haben bestimmte *E. coli* Stämme, die sich durch das Vorliegen weiterer Pathogenitätsfaktoren, z. B. Enterotoxine, charakterisieren lassen.

2.6.2.2. *Pseudomonas aeruginosa*

P. aeruginosa ist ein strikt aerob wachsender, nicht sporenbildender, polar begeißelter, beweglicher, stäbchenförmiger Nonfermenter. Makroskopisch besonders eindrücklich ist die Bildung eines blaugrünen Wundeiters. Neben dieser Färbung kann zur

vorläufigen Identifikation in Flüssigkeitskultur das „Kahnhautphänomen“ genutzt werden. Ebenso kann die Bildung von Aminoacetophenon diagnostisch eingesetzt werden. Im Labor lässt sich der speziesspezifische Farbstoff Pyocyanin mit Chloroform ausschütteln. Auf bluthaltigem Agar zeigt sich in der Regel eine β -Hämolyse. Wegen seiner geringen Umweltansprüche überlebt der typische „Feuchtkeim“ *P. aeruginosa* auch in entionisiertem Wasser und in zu niedrig konzentrierten Desinfektionsmittellösungen. Dies erklärt seine besondere Bedeutung als Erreger nosokomialer Infektionen (Geffers et al., 2004). Klinisch sind besonders Infektionen von Brandwunden und postoperative Wundinfektionen von Bedeutung. Des Weiteren können Otitis externa, hartnäckige, rezidivierende Harnwegsinfekte, Infektionen des Respirationstraktes infolge kontaminierter Beatmungs- oder Luftbefeuchtungsanlagen, sowie Endokarditiden und Septikämien bei Drogenabhängigen durch *P. aeruginosa* verursacht sein.

2.6.2.3. *Salmonella Minnesota*

Das peritrich begeißelte und bewegliche, fakultativ anaerobe, Gram-negative Bakterium stellt sich lichtmikroskopisch als Stäbchen mit abgerundeten Enden dar. Das sehr potente LPS aus der Zellwand von *Salmonella Minnesota* wird als Stimulans zu Forschungszwecken verwendet, ein detoxifiziertes Derivat des Lipid-A wird als Impfadjuvans, z. B. für Hepatitis-B-Impfungen, benutzt (Ambrosch et al., 2000).

2.6.2.4. *Staphylococcus aureus*

S. aureus ist ein aerobes, Gram-positives, unbewegliches, nicht-sporenbildendes Bakterium, welches das extrazelluläre Enzym Koagulase, das im Serum Prothrombin bindet und die Entstehung von Fibrin aus Fibrinogen bewirkt, produzieren kann. Zellwandassoziierte Virulenzfaktoren sind die Polysaccharidkapsel und Protein A, das an F_c-Fragmente von Immunglobulinen bindet und das Bakterium dadurch vor Phagozytose durch Makrophagen schützt. Extrazelluläre Virulenzfaktoren sind Hyaluronidase, die die Ausbreitung des Erregers im Gewebe ermöglicht, Hämolsine und Leukocidin, welche Erythrozyten, Makrophagen und Granulozyten schädigen, und bei manchen Stämmen Exfoliatine und/oder Enterotoxine. Kulturmorphologisch präsentiert *S. aureus* charakteristische elfenbeinfarbige Kolonien, um die sich bei Wachstum auf Blutagar ein Beta-Hämolyse-Hof zeigt. *S. aureus* kann sowohl lokale, als

auch invasive und systemische Infektionen hervorrufen. Neben Wundinfektionen, Infektionen der Hautanhangsgebilde mit typischer Abszedierung, Mastitis, Osteomyelitis können auch sogenannte Plastikinfektionen (z. B. bei Katheterisierung, Implantation von Gefäßprothesen etc.) Auslöser von lebensbedrohlichen Septikopyämien sein. Durch Toxine bedingt treten auch die *Dermatitis exfoliativa*, das Lyell-Syndrom, das toxische Schocksyndrom oder Enteritiden auf. Besondere Bedeutung besitzt *S. aureus* als häufiger Verursacher nosokomial erworbener Erkrankungen (Geffers et al., 2004) und wegen zunehmender Resistenzentwicklung gegenüber einer Vielzahl von antibiotischen Wirkstoffen (multiresistente MRSA) (Witte, 2004; Tiemersma et al., 2004).

2.7. Wissenschaftliche Fragestellung

In der vorliegenden Arbeit sollte die Aktivierung des angeborenen Immunsystems durch Bakterien der oralen Flora, welche eine Assoziation mit parodontalen Erkrankungen aufweisen, untersucht werden.

Es sollte ein Testsystem auf der Basis von humanem Vollblut zur Stimulation mit hitzeinaktivierten, odontopathogenen Bakterien genutzt werden, um die Freisetzung proinflammatorischer Zytokine *in vitro* auszulösen und zu erfassen. Die Ergebnisse dieser Stimulation sollten untereinander verglichen und in Bezug zu „Referenzkeimen“ gesetzt werden, um eine Gruppierung nach Stimulationsverhalten zu ermöglichen.

Des Weiteren sollte in dieser Arbeit untersucht werden, ob Unterschiede im Stimulationsverhalten, messbar anhand der freigesetzten Zytokinmengen, beobachtbar sind. Außerdem sollte untersucht werden, inwiefern sich Unterschiede im Stimulationsverhalten in der selektiven Nutzung von Toll-like Rezeptoren widerspiegeln.

Durch Stimulation von transfizierten HEK-293 Zellen und TLR-knockout-Zellen mit *P. gingivalis* als Ganzkeim sollte untersucht werden, ob sich die Besonderheiten, welche zum TLR-Stimulationsverhalten von *P. gingivalis* LPS beschrieben sind, ebenfalls beim Einsatz ganzer Bakterienzellen beobachten lassen. Weiterhin sollte durch die Stimulation von humanem Vollblut mit *P. gingivalis* und Pg-LPS die Zytokinfreisetzung im Vergleich zu anderen Gram-negativen Erregern untersucht werden.

Zusammenfassend sollten zur Untersuchung der immunstimulatorischen Effekte von odontopathogenen Bakterien in dieser Arbeit folgende Hypothesen geprüft werden:

1. Gram-positive und Gram-negative Vertreter Parodontitis-assoziiierter Erreger unterscheiden sich im Muster der Zytokinfreisetzung im Vollblutsystem.
2. Bestimmte odontopathogene Bakterienspezies zeigen differenzielle Aktivierungsmuster bei Zytokininduktion und Rezeptorstimulationsverhalten.
3. Besonderheiten bei Stimulation von Toll-like Rezeptoren zeigen sich auch beim Einsatz von *P. gingivalis* als Ganzkeim.

3. Material und Methoden

3.1. Materialien und Geräte

3.1.1. Geräte

Anaerobiertopf	Merck Anaerocult	Merck, Darmstadt
Brutschränke	B5050	Heraeus, Osterode
	B5060	Heraeus, Osterode
	B5060E	Heraeus, Osterode
	B6	Heraeus, Osterode
	BB6220	Heraeus, Osterode
ELISA-Reader	CRX Microplate Reader	Dynatech, Guernsey, GB
ELISA-Washer	Ultrawash Plus	Dynex, Chantilly, USA
	Eppendorf research	Eppendorf, Hamburg
Fluoreszenzmikroskop	Axiovert 25	Zeiss, Göttingen
Heizblock	Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
	DRI-Block DB2A	Techne, Cambridge, GB
Luminiszenz-Counter	TopCount NXT	Packard, Dreieich
Mikroskop	Leica DMIL	Leica, Wetzlar
Mixer	MS1 Minishaker	IKA Works, Wilmington, USA
Mehrkanalpipetten	Finnpipette	Thermo Labsystems, Egelsbach
	Pipettman	Gilson, Middleton, USA
Photometer	BioPhotometer	Eppendorf, Hamburg
Pipetten	Eppendorf reference	Eppendorf, Hamburg
	Pipettman	Gilson, Middleton, USA
Pipettierhilfe	Pipetboy acu	IBS, Chur, Schweiz
Sterilbank	HeraSafe	Heraeus, Osterode
UV-Gerät	UV-Stratalinker 1800	Stratagene, La Jolla, USA
Zählkammer	Neubauer 0,0026mm ² /0,1 mM	Brand GmbH, Schwerin
Zentrifugen	Megafuge 1.0R	Heraeus, Osterode
	Biofuge fresco	Heraeus, Osterode
	Biofuge pico	Heraeus, Osterode

3.1.2. Verbrauchsmaterialien

Agarplatten (Schaedler, Columbia)	Becton Dickinson, Sparks, USA
BBL Enriched Thioglycollate Medium	Becton Dickinson, Sparks, USA
BD BBL CampyPak Plus Microaerophilic System	Becton Dickinson, Sparks, USA
BD BBL GasPak Plus Anaerobic System	Becton Dickinson, Sparks, USA
Einmalspritze „Braun Injekt“, 10 ml	Braun, Melsungen
ELISA-Platten „Nunc Maxisorp“	Nunc, Wiesbaden
Halbmicro-Küvetten	Greiner bio-one, Frickenhausen
Aqua dest.	Braun, Melsungen
Injektionsnadel „Microlance“, 20G	Becton Dickinson, Sparks, USA
Lumineszenz-Platten Culture™	Packard, Niederlande
Physiologische Kochsalzlösung	Braun, Melsungen
Pipettenspitzen 10µl, 100µl, 1000µl	Gilson, Middleton, USA
Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg
Softasept Hautdesinfektion	Braun, Melsungen
Thiobouillon	Becton Dickinson, Heidelberg
Venenpunktionsbesteck „Venofix“, 21G	Braun, Melsungen
Zellkulturflaschen „Cellstar“ 20 ml	Greiner bio-one, Frickenhausen
Zellkulturplatten „Cellstar“, 6/12/24 well	Greiner bio-one, Frickenhausen
Zellkulturplatten „Cellstar“, 96 well, U-/F-Shape	Greiner bio-one, Frickenhausen
Zellkulturplatten „CulturePlate“, 96 well	Packard, Dreieich

3.1.3. Reagenzien

Agar-Agar	Merck, Darmstadt
Ampicillin (Natriumsalz)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
FCS	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
LB-Broth-Pulver	Gibco™/Invitrogen, Karlsruhe
Liquemin N 5000	Roche, Grenzach-Whylen
o-Phenylendiamindihydrochlorid (OPD)- Peroxidase Substrat (Sigma Fast™)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
PBS instamed ¹ 9,55 g/l	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Schwefelsäure 1M	Merck, Darmstadt

¹ Nach Herstellerangaben in 10,16 l Aqua dest. gelöst, pH-Wert auf 7,2 eingestellt und nach Sterilfiltration (0,2 µm) bei 4°C in heißluft-sterilisierten Glasflaschen gelagert.

TE-Puffer	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Trypanblau	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Tween 20	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

Alle weiteren Biochemikalien wurden von den Firmen Merck, Darmstadt oder Sigma-Aldrich, Taufkirchen in der Reinheit „reinst“ oder „pro analysi“ bezogen.

3.1.4. Medium für Zellkultivierung

„Vollblut-Medium“	Click/RPMI 1640 ²	Biochrom AG, Berlin
supplementiert mit	100 IU/ml Penicillin	Gibco™, Karlsruhe
	100 µg/ml Streptomycin	Gibco™, Karlsruhe
„Zellkulturmedium“	Click/RPMI 1640 ²	Biochrom AG, Berlin
supplementiert mit	5% FCS	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
	50µM β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
	2mM L-Glutamin	Biochrom AG, Berlin
	100 IU/ml Penicillin	Gibco™, Karlsruhe
	100 µg/ml Streptomycin	Gibco™, Karlsruhe

3.1.5. Bakterielle Endotoxine

LTA

Lipoteichonsäure wurde freundlicherweise von S. Morath, Konstanz, zur Verfügung gestellt. Sie wurde aus *Staphylococcus aureus* isoliert, massenspektroskopisch auf Reinheit überprüft sowie auf Endotoxinfreiheit getestet (Morath et al., 2001). LTA wurde in Lösung von 10 mg/ml in Aqua dest. angesetzt und aliquotiert bei -20°C gelagert.

S-LPS

Hochreines LPS, welches aus *Salmonella Minnesota* (HL63, smooth-Form) gewonnen wurde, wurde freundlicherweise überlassen von U. Seydel, Forschungszentrum Borstel. Es wurde in Lösung mit Aqua dest. in einer Konzentration von 100 µg/ml aliquotiert bei -20°C gelagert.

² Trockenpulver, nach Herstellerangabe gelöst in A. dest (Braun, Melsungen) und sterilfiltriert (Whatman 0,2µm). Lagerung bei 4°C in heißluft-sterilisierten Glasflaschen.

Pg-LPS

Lipopolysaccharid des Bakteriums *P. gingivalis* wurde von S. Morath freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Die Präparation erfolgte wie unter Tietze et al., 2006 beschrieben. Es wurde in Lösung mit Aqua dest. in einer Konzentration von 10 mg/ml aliquotiert bei -20°C gelagert.

3.1.6. Zellen

HEK-293

Humane Fibroblasten einer Zelllinie, welche aus embryonalen Nieren gewonnen wurden, wurden freundlicherweise von Stefan Bauer, München überlassen. Die Kultivierung erfolgte in „Zellkulturmedium“.

RAW 264.7

Makrophagen der Tumorzelllinie RAW 264.7 wurden aus Balb/c-Mäusen gewonnen und freundlicherweise von R. Schumann, Berlin zur Verfügung gestellt. Sie wurden in „Zellkulturmedium“ kultiviert.

Mauszellen

Peritonealmakrophagen der Stämme C3H/HeJ und C3H/HeN (Charles River, Sulzfeld) sowie TLR2^{-/-} Mäuse (C. Kirschning, München) in Zellkultur wurden von der Arbeitsgruppe Heeg, Philipps-Universität Marburg, zur Verfügung gestellt. Die Gewinnung erfolgte wie bei Tietze et al., 2006 beschrieben.

3.1.7. Bakterien

Bakterium	Gram-	Stamm	Kulturbedingungen
<i>Actinomyces meyeri</i>	positiv	CCUG 18285	B; D
<i>Actinomyces odontolyticus</i>	positiv	CCUG 32402	B; D
<i>Enterococcus faecalis</i>	positiv	ATCC 29212	A; D
<i>Parvimonas micros</i>	positiv	MCCM 3084	B; D
<i>Peptoniphilius asaccharolyticus</i>	positiv	ATCC 29743	B; D
<i>Staphylococcus aureus</i>	positiv	ATCC 29213	A; D
<i>Streptococcus intermedius</i>	positiv	MCCM 3330	C; D
<i>Streptococcus sanguis</i>	positiv	MCCM 829	A; D
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	negativ	MCCM 2810	C; D
<i>Campylobacter rectus</i>	negativ	MCCM 818	C; D
<i>Dialister pneumosintes</i>	negativ	ATCC 33048	B; D
<i>Eikenella corrodens</i>	negativ	MCCM 2491	C; D
<i>Escherichia coli</i>	negativ	ATCC 25922	A; D
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	negativ	klinisches Isolat	B; D
<i>Neisseria flavescens</i>	negativ	ATCC 13120	A; D
<i>Neisseria mucosa</i>	negativ	MCCM 1427	A; D
<i>Neisseria perflava</i>	negativ	CCUG 7826	A; D
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	negativ	MCCM 3199	B; E
<i>Prevotella intermedia</i>	negativ	ATCC 25611	B; D
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	negativ	ATCC 27853	A; D
<i>Salmonella Minnesota</i>	negativ	klinisches Isolat	A; D

Erklärung zu den Kulturbedingungen:

A - Anzucht in aerober Atmosphäre

B - Anzucht in anaerober Atmosphäre

C - Anzucht in mikroaerophiler Atmosphäre

D - Anzucht auf Columbia-Agarplatten

E - Anzucht auf Schaedler-Agarplatten

Alle Bakterien wurden aus der mikrobiologischen Stammsammlung Marburg bezogen.

3.1.8. Molekularbiologische Kits

BD OptEIA™ Human ELISA Set, div.	Becton Dickinson, Heidelberg
Lipofectamin™ 2000 Transfection Kit	Qiagen, Hilden
Luciferase Reporter Gene Assay (LucLite™ Plus)	Packard BioScience, Niederlande
One Shot™ TOP 10 Kit	Invitrogen, Karlsruhe
High Speed® Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden

3.1.9. Vektoren und rekombinante Plasmide

Plasmid	Basisvektor	Insert	Beschreibung	Herkunft
pGFP-TLR2	pcDNA3 (Invitrogen)	Fusionsprotein aus humanem TLR-2 und GFP	Expressionsplasmid für das TLR-2-GFP Fusionsprotein unter Kontrolle eines CMV-Promotors	Terje Espevik, Trondheim, Norwegen
pYFP-TLR4	pcDNA3 (Invitrogen)	Fusionsprotein aus humanem TLR-4 und YFP	Expressionsplasmid für das TLR-4-YFP Fusionsprotein unter Kontrolle eines CMV-Promotors	Terje Espevik, Trondheim, Norwegen
phMD2	pEF-BOS	Humanes MD2, Kofaktor für TLR4	Synthese von hMD2 unter Kontrolle eines EF1 α -Promotors	Terje Espevik, Trondheim, Norwegen

3.2. Methoden

3.2.1. Arbeit mit Bakterienkulturen

3.2.1.1. Anzucht von Anaerobiern und Mikroaerophilen

Anaerobier und mikroaerophile Spezies wurden initial aus lyophilisierten Kulturen frisch angezüchtet. Dazu wurden die Glasampullen unter sterilen Bedingungen eröffnet und das Lyophilisat in 1 ml Thio-Boullion resuspendiert. Mit einer sterilen Glaspipette wurden 4 Tropfen dieser Suspension auf eine Agarplatte gegeben und mit einem fraktionierten Ausstrich verteilt. Danach wurden die Platten in einen Anaerobier-Gastopf gestellt und entsprechend der Wachstumsansprüche der Bakterien mit einem Anaerob- oder Mikroaerophil-GasPAK bei 37°C für 5 Tage bebrütet.

3.2.1.2. Anzucht von Aerobiern

Nach Resuspension der verwendeten lyophilisierten Kulturen wurde eine Agarplatte unter sterilen Bedingungen wie unter 3.2.1.1. beimpft. Anschließend erfolgte für 24h eine Bebrütung bei 37°C. Nach Überimpfen einer einzelnen Bakterienkolonie und erneuter 24stündiger Bebrütung unter o.g. Bedingungen wurde wie unter 3.2.1.3 beschrieben weiterverfahren.

3.2.1.3. Subkultivierung von Bakterien

Von anaerob, mikroaerophil oder aerob bebrüteten Bakterienkulturen auf Agar wurde unter Verwendung einer sterilen Titanimpföse eine einzelne Kolonie isoliert, die mithilfe eines Dreiösenausstriches auf eine neue Agarplatte überimpft wurde. Um Kontaminationen vorzubeugen, geschah dies unter sterilen Bedingungen (Sterilbank). Anschließend wurden die Platten für 24 Stunden (aerob) bzw. 120 Stunden (anaerob/mikroaerophil) bei 37°C bebrütet.

3.2.2. Aufbereitung von Bakterien zur Konzentrationsbestimmung

Nach 24 Stunden Bebrütung bei Aerobiern und nach 5 Tagen bei Anaerobiern und Mikroaerophilen wurden die Bakterienkulturen unter Verwendung eines sterilen Wattetupfers mit physiologischer Kochsalzlösung abgeschwemmt und die entstandene Suspension in einem sterilen Plastikgefäß gesammelt. Anschließend wurde die

Bakteriensuspension für 10 Minuten bei 1000 RPM (Megafuge) zentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde in 1 bis 2 ml TE-Puffer resuspendiert, um anschließend die Bakterienkonzentration photometrisch zu bestimmen.

3.2.3. Bestimmung der Bakterienkonzentration

3.2.3.1. Messung der optischen Dichte

Die Messung der OD₆₀₀ für die Konzentrationsbestimmung erfolgte mit einem Eppendorf BioPhotometer (Eppendorf, Hamburg) bei einer Wellenlänge von 600 nm. In einer Plastik-Einwegkuvette wurden 10 µl der Bakteriensuspension in 990 µl Aqua dest. suspendiert und gut gemischt. Anschließend wurde die optische Dichte als Mittelwert aus 2 Einzelmessungen ermittelt.

3.2.3.2. Ermittlung der Bakterienkonzentration

Aus der anhand des McFarland-Standards in dem Photometer einmalig erstellten Eichkurve ergab sich zur Berechnung der Konzentration der Bakteriensuspension aus der OD₆₀₀ folgende Gleichung:

$$C_{Susp} = \frac{OD_{600}}{1,0392} * 10^8 * F_{Verd}$$

$$[C_{Susp}] = \frac{Keime}{ml}$$

C_{Susp} – Konzentration der Bakteriensuspension

F_{Verd} – Verdünnungsfaktor (hier 100)

3.2.4. Aliquotierung

In 1,5 ml Eppendorf-Gefäßen wurden 500 µl Aliquots der Bakteriensuspension mit eingestellter Konzentration von 10⁹ KBE/ml portioniert, indem die Bakteriensuspension in TE-Puffer entsprechend einer Dreisatzberechnung weiter verdünnt wurde.

3.2.5. Inaktivierung der Bakterienaliquots

3.2.5.1. Hitze-Inaktivierung

Die Bakteriensuspensionen in einer Konzentration von 10⁹ KBE/ml wurden zur Inaktivierung 10 Minuten bei 65°C auf einem Heizblock inkubiert. Keimpräparationen

einer Charge wurden stets im gleichen Schritt inaktiviert. Zur Kontrolle des Inaktivierungserfolges wurden Proben ausplattiert und bebrütet.

3.2.5.2. UV-Inaktivierung

200 µl Bakterienaliquots mit einer Konzentration von 10^9 KBE/ml wurden zur Inaktivierung für eine Stunde auf Eis mit UV-Licht der Energie 9999 µJ bestrahlt. Anschließend wurden die Aliquots ausplattiert und entsprechend ihrer Wachstumsansprüche bebrütet, um den Erfolg der Inaktivierung zu überprüfen.

3.2.6. Lagerung der Bakterienaliquots

Die nach 3.2.5.1. bzw. 3.2.5.2. inaktivierten, aliquotierten Bakteriensuspensionen wurden bis zur Verwendung bei -20°C gelagert.

3.2.7. Blutentnahme

Zur Gewinnung von menschlichem Vollblut wurde bei den freiwilligen Spendern in üblicher Technik eine Venenpunktion vorgenommen: Dabei wurde zuerst ein Stauschlauch angelegt, dann die Punktionsstelle sorgfältig mit Softasept[®] N (Braun, Melsungen) desinfiziert. In eine sterile Injektionsspritze wurden mit einer sterilen Nadel 5000 IE Heparin verbracht, anschließend wurden nach erfolgreicher Venenpunktion mit einem Venofix[®] Punktionsbesteck (Braun, Melsungen) 10 ml Blut entnommen. Schließlich wurde die Einmalspritze mit einer Injektionsnadel verschlossen und geschwenkt um Heparin und Blut zu vermischen. Die anschließende Verwendung erfolgte, wie in 3.2.8.1. beschrieben.

3.2.8. Inkubation der mikrobiellen Stimuli mit Vollblut

3.2.8.1. Durchführung

Die Stimulation von humanem Vollblut wurde unter sterilen Bedingungen in einer 96-well Mikrotiterplatte mit Bakterien und anderen Stimuli durchgeführt.

Zuerst wurden hierfür in Eppendorf-Gefäßen die Stimulationslösungen vorbereitet, indem die Bakterienaliquots und die anderen Stimuli in Medium (Stimulationsmedium „Vollblut“) entsprechend verdünnt wurden. Die ursprünglich in die wells gegebene Lösung hatte hierbei eine dreifach höhere Konzentration, da es durch Zugabe von

Medium und Vollblut im Anschluss zu einer 1:3 Verdünnung kam. Als Positivkontrolle diente *S. Minnesota* LPS, als Negativkontrolle Medium ohne den Zusatz eines Stimulus. Anschließend wurden entsprechend der Plattenbelegung jeweils 100 µl der dreifach konzentrierten entsprechenden Stimulationslösung pro well pipettiert. Dabei wurden jeweils zwei nebeneinander liegende wells mit dem gleichen Stimulus aus der gleichen Lösung befüllt. Alternativ wurden Verdünnungsreihen wie folgt hergestellt: Für eine 1:10 Verdünnung wurden 110 µl Stimulus (statt der oben angegebenen 100 µl), für eine 1:3 Verdünnung 150 µl Stimulus pro well vorgelegt. In die wells, in denen die Verdünnung stattfinden sollte, wurden 100 µl Medium vorgelegt. Anschließend wurden aus dem mit Stimulus befüllten well 10 bzw. 50 µl entnommen und in das benachbarte well pipettiert. Nach Durchmischen der Lösung durch mehrmaliges Pipettieren wurden anschließend erneut 10 bzw. 50 µl in das nächste well übergehoben. Am Ende der Verdünnungsreihe wurden 10 bzw. 50 µl entnommen und verworfen, sodass in jedem well 100 µl vorhanden waren.

Im Anschluss daran wurden mithilfe einer Mehrkanalpipette jeweils 140 µl Medium pro well hinzu gegeben. Es erfolgte nun die Blutentnahme wie unter 3.2.7. beschrieben. Innerhalb von maximal 15 Minuten nach der Blutentnahme wurden jeweils 60 µl des entnommenen Blutes in jedes well gegeben. Anschließend wurde die Mikrotiterplatte abgedeckt und für 22 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.

3.2.8.2. Überstand-Gewinnung

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden unter sterilen Bedingungen 200 µl der Zellkulturüberstände der Stimulationsansätze entnommen. Die entnommenen Überstände wurden in einer Mikrotiterplatte verschlossen bei -20°C gelagert und zeitnah mittels ELISA (siehe 3.2.11.2) hinsichtlich der Sekretion von Zytokinen untersucht.

3.2.9. Untersuchung der Kinetik der Zytokinfreisetzung

Zur Bestimmung der Kinetik der Zytokinfreisetzung wurden auf zwei 96-well Mikrotiterplatten in horizontalen Reihen identische Stimulationsansätze aufgetragen. Die Stimuli wurden auf eine Konzentration von 10⁶ KBE/ml in 240 µl pro well eingestellt. Als Positivkontrolle diente *S. Minnesota* LPS (100 ng/ml), als Negativkontrolle Medium ohne einen zugesetzten Stimulus. Anschließend wurden pro

well 60 µl humanes, heparinisierendes Vollblut zugegeben und die Platten bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. In Zweistundenintervallen wurden die Überstände jeweils zweier Spalten (Doppelbestimmung) entsprechend der unter 3.2.8.2. beschriebenen Vorgehensweise entnommen und bei -20°C zwischengelagert, während die Stimulationsplatte weiter inkubiert wurde. Es wurden insgesamt zwölf Entnahmen der Überstände über einen Zeitraum von 24 Stunden durchgeführt.

3.2.10. Zellkultur und Zellstimulation

Mausperitonealmakrophagen wurden von der Arbeitsgruppe Prof. Heeg (Marburg) zur Verfügung gestellt. Ihre Gewinnung erfolgte 3 Tage nach Induktion durch Thioglykolat mittels Peritoneallavage mit 10 ml eiskaltem PBS. Zur Kultivierung wurden die Peritonealmakrophagen in Zellkulturmedium suspendiert und bei 37°C und 5% CO₂ in einer 20 ml Zellkulturflasche kultiviert.

Vor der Stimulation wurden die Zellen durch wiederholtes Aufziehen mit einer Pipette mechanisch abgelöst und resuspendiert und in ein Plastikröhrchen übertragen. Nach Zentrifugation (5 min bei 1500RPM, Megafuge) wurde der zellfreie Überstand verworfen und die sedimentierten Zellen in 2 ml Zellkulturmedium resuspendiert. 10 µl dieser Zellsuspension wurden im Verhältnis 1:10 mit Trypanblau gefärbt, um tote Zellen mikroskopisch differenzieren zu können. Anschließend wurde die Zellzahl in einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt. Sofern der Anteil avitaler Zellen kleiner 10% war, wurde die Zellsuspension weiterverwendet und zur Stimulation auf eine Konzentration von $1,5 \cdot 10^6$ Zellen/ml eingestellt. In eine 96-well F-Typ Zellkulturplatte wurden 100µl Stimulationslösung (Stimulus verdünnt in Medium) pro well gegeben bzw. Verdünnungsreihen erstellt. Anschließend wurden zunächst 100 µl der Zellsuspension, dann 100 µl Medium pro well ergänzt. Somit wurden $1,5 \cdot 10^5$ Zellen/well mit dem entsprechenden Stimulus für 22 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Anschließend wurden die zellfreien Überstände gewonnen und die TNFα-Konzentration wie in 3.2.11.2. beschrieben mittels ELISA bestimmt.

3.2.11. Zytokinbestimmung

3.2.11.1. Versuchsanordnung der durchgeführten Sandwich-ELISA

Eine 96-well Polystyrol-Platte wurde zunächst mit einem „Coating“-Antikörper beschichtet, der mit seiner F_c-Region an die Platte band. Mit seiner F_{ab}-Region band er

spezifisch an ein Epitop des zu bestimmenden Antigens. Nichtgebundene Capture-Antikörper wurden mit PBS 0,05% Tween 20 ausgewaschen und die Platte mit PBS + 10% FCS geblockt, um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen. Nach dem Waschen mit PBS 0,05% Tween 20 wurden die Proben bzw. deren Verdünnungen aufgetragen und konnten an den plattengebundenen Antikörper binden. Zur Erstellung einer Standardkurve wurde gleichzeitig eine Verdünnungsreihe mithilfe einer Antigenprobe bekannter Konzentration erstellt. Anschließend wurde ein biotinylierter „Detection“-Antikörper hinzu gegeben, der mit seiner F_{ab}-Region ein anderes Epitop des Antigens spezifisch band. Nach Zugabe des Streptavidin-HRP-Konjugat band dieser an den Biotinrest des „Detection“-Antikörpers und das Substrat (1,2-o-Phenylendiamin-Dihydrochlorid, OPD) der Reaktion wurde hinzu gegeben. Nach einem definierten Zeitintervall wurde die Reaktion mit einmolarer Schwefelsäure durch Denaturierung des Enzyms gestoppt. In einer photometrischen Absorptionsmessung ließen sich nun die Extinktionen messen, die anhand der erstellten Standardkurve bestimmten Konzentrationen zugeordnet werden konnten.

3.2.11.2. Durchführung des Sandwich-ELISA

Für die Bestimmung der Zytokin-Konzentration wurden Testkits OptEIA™ der Firma BD Biosciences, San Diego, USA exakt nach Protokoll des Herstellers verwendet.

A) „Coating“

Der „Coating“-Antikörper wurde entsprechend dem Herstellerprotokoll in dem jeweiligen „Coating“-Puffer verdünnt. In jedes well der Mikrotiterplatte wurden 100 µl der Antikörperlösung pipettiert und abgedeckt bei 4°C über Nacht inkubiert. Nach 24 Stunden wurde die Platte dreimal mit je 200 µl PBS 0,05% Tween 20 gewaschen.

B) „Blocking“

Unmittelbar nach dem Waschen wurden 200 µl PBS + 10% FCS in jedes well gegeben und für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Platte erneut dreimal mit je 200 µl PBS 0,05% Tween 20 gewaschen.

C) Proben- und Standardauftrag

Alle Proben- und Standardaufträge erfolgten als Doppelbestimmung. Der Standard wurde nach Herstellerangabe gelöst und bei -80°C aliquotiert gelagert. Zur Verwendung erfolgte die (zuvor berechnete) Verdünnung in PBS + 10% FCS. Aus dieser

Standardlösung wurde anschließend eine 1:2 Verdünnungsreihe erstellt, wobei sowohl für Proben als auch den Standard jeweils 100 µl pro well aufgetragen wurden.

Der Proben- bzw. Standardauftrag wurde für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend fünfmal mit PBS 0,05% Tween 20 gewaschen.

D) „Detecting“

Der biotinylierte „Detection“-Antikörper mit dem Streptavidin-gekoppelten Enzym wurden entsprechend den Herstellerangaben verdünnt und 100µl dieser Lösung pro well hinzu gegeben. Nach einer einstündigen Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Platte siebenmal mit PBS 0,05% Tween 20 gewaschen.

E) Zugabe des Substrates

Das Substrat in Tablettenform wurde in 11 ml PBS lichtgeschützt gelöst und davon anschließend je 100 µl pro well auf die Platte gegeben. Abgedeckt wurde die Mikrotiterplatte für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Dabei kam es bei positivem Zytokinnachweis zu einer Färbung der Lösung. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden 50 µl 1M Schwefelsäure in jedes well pipettiert, um die Reaktion (durch Denaturation des Enzyms) zu stoppen.

F) Messung und Auswertung

Die Messung erfolgte in einem ELISA-Reader (CRX Microplate Reader, Dynatech, Guernsey, GB) bei einer Wellenlänge von 490 nm gegen 630 nm Referenzwellenlänge. Die anschließende Auswertung, Erstellen der Standardkurve und Berechnung der Zytokinkonzentrationen wurden mit der Software „Dynex Revelation G3.2“ vorgenommen. Die Verdünnungsstufen der Proben wurden in der anschließenden Datenauswertung manuell eingerechnet.

3.2.12. Plasmidpräparation

Mit Hilfe des One Shot™ TOP10 Kit, Invitrogen wurden *E. coli* Bakterien entsprechend den Angaben des Herstellers mit rekombinanten Plasmiden (siehe 3.1.8.) transformiert und anschließend über Nacht bei 37°C auf Ampicillin-Agar inkubiert. Zur Plasmidvermehrung wurden je 2 bis 3 Kolonien der transformierten Bakterien unter Anwesenheit von Ampicillin (100 µg/ml) in LB-Medium angezchtet. Anschließend erfolgte die Zentrifugation für 15min bei 4000 RPM (Megafuge) und die Aufreinigung des Plasmids mithilfe des HiSpeed Maxi-Kits, Qiagen genau nach Herstellerangaben.

Anschließend erfolgte die photometrische Bestimmung der Konzentration und Reinheit der aufgereinigten Plasmid-DNA; die Lagerung erfolgte bei -20°C.

3.2.13. Transiente Transfektion

3.2.13.1. Reportergenassay

Im Reportergenassay wurden die Zellen zusätzlich zu den Rezeptor-Fluoreszenzprotein-Plasmiden mit einem NFκB-Luziferase-Reporterplasmid transfiziert. Dabei war das Luziferase-Gen unter Kontrolle von NFκB-abhängigen Elementen. Erfolgte nach Transfektion und Stimulation eine NFκB-Aktivierung, so wurde das Protein Luziferase gebildet, dessen Aktivität mithilfe des Umsatzes eines Chemilumineszenz-Substrates gemessen und quantifiziert werden konnte.

3.2.13.2. Transiente Transfektion von HEK-293 Zellen

Die Kultivierung von HEK-293 Zellen erfolgte in 24 well Zellkulturplatten bei 37°C und 5% CO₂ bis zur Transfektion. Dazu wurden die Zellen durch Spülen mit Zellkulturmedium mechanisch gelöst und resuspendiert. Die anschließende Zentrifugation erfolgte für 10 Minuten bei 1500 RPM (Megafuge), der zellfreie Überstand wurde verworfen und die Zellen in PBS gewaschen. Es erfolgte die Bestimmung der Zellzahl wie unter 3.2.10 beschrieben. Anschließend wurden in einer 24 well Zellkulturplatte pro well $2,5 \cdot 10^5$ Zellen pro well in 0,5 ml Antibiotika-freiem Zellkulturmedium ausgesät und über Nacht bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert.

Anschließend erfolgte die Transfektion mithilfe des Lipofectamin 2000 Kits entsprechend den Herstellerangaben. Dabei wurden 0,5 µg des Plasmidkonstruktes und 2 µl Lipofectamin eingesetzt. Es erfolgte die Inkubation bei 37°C und 5% CO₂ für 24 Stunden. Anschließend konnte durch Fluoreszenz-Mikroskopie die Transfektionseffizienz abgeschätzt werden.

3.2.13.3. Stimulation transient transfizierter HEK-293 Zellen

Die transfizierten Zellen wurden mit verschiedenen Stimuli (10^6 KBE/ml Bakterien) inkubiert. Dabei wurden in einer 24-well Zellkulturplatte $2,5 \cdot 10^5$ Zellen pro well eingesetzt und für 6 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ stimuliert.

3.2.13.4. Reporteragen-Messung

Nach 6 Stunden Inkubation wurde unter Verwendung des LucLite Kit (Packard) die Chemilumineszenz des NF κ B-Luziferase Reporters entsprechend den Angaben des Herstellers mittels TopCount NXT (Packard) bestimmt.

3.2.14. Ergebnisauswertung

Bei der Auswertung der ELISAs wurden alle Werte als Mittelwert aus 2 Messwerten berechnet.

Um eine übersichtlichere und besser vergleichbare grafische Darstellung der gemessenen Werte zu ermöglichen, sowie um eine Normierung der interindividuellen Spendervarianz zu erreichen, wurde der Messwert, der bei Stimulation mit 100 ng/ml S-LPS erreicht wurde, als Referenz auf 1 bzw. 100% gesetzt. Alle anderen Werte wurden zu diesem Referenzwert ins Verhältnis gesetzt und als Prozentwert wiedergegeben. Die Berechnung erfolgte mit Microsoft Excel.

Für die Darstellung von Streuungen wurden Mittelwert, Standardabweichung (SD) und Standardfehler des Mittelwertes (SEM) mithilfe von Microsoft Excel und Systat SigmaPlot V9.0 berechnet und grafisch aufbereitet.

4. Ergebnisse

4.1. Testsystem

Hitzeinaktivierte Bakterien wurden zur Stimulation mit menschlichem Vollblut inkubiert, anschließend wurden die sezernierten Zytokine in den Überständen bestimmt. Zunächst sollte die thermische Inaktivierungsmethode mit einer anderen, nicht-thermischen verglichen werden, um auszuschließen, dass beobachtete Effekte durch unterschiedliche Thermoresistenz bakterieller Bestandteile bedingt waren.

4.1.1. Vergleich verschiedener Bakterieninaktivierungsarten

4.1.1.1. Vergleich der IL-8-Freisetzung nach Stimulation mit hitzeinaktivierten und UV-inaktivierten Bakterien

In Grafik 1 ist die Produktion von Interleukin 8 vergleichend nach Stimulation mit hitzeinaktivierten oder UV-inaktivierten Bakterien dargestellt. Als Positivkontrolle wurde LPS in der Konzentration 100 ng/ml eingesetzt. Die erreichte Stimulation wurde als 100% gesetzt. Medium ohne Stimulus zeigte eine sehr geringe Stimulation der Zytokinproduktion (Negativ-Kontrolle).

Während sich bei den Gram-positiven Bakterienarten *P. micros* keine Stimulation zeigte, bewirkten *S. aureus* und *S. intermedius* eine schwache Interleukinproduktion, wobei keine deutlichen Unterschiede zwischen den unterschiedlich inaktivierten Stimuli zu erkennen waren. Das Gram-negative Bakterium *N. mucosa* induzierte eine starke Produktion von IL-8. Auch hier war kein relevanter Unterschied zwischen hitzeinaktivierten und UV-inaktivierten Erregern erkennbar.

Es wurde daher davon ausgegangen, dass die Wahl der Inaktivierungsmethode keinen Einfluss auf die Freisetzung von Interleukin 8 durch die eingesetzten Stimuli hatte.

4.1.1.2. Vergleich der TNF α -Freisetzung nach Stimulation mit hitzeinaktivierten und UV-inaktivierten Bakterien

Die Produktion von TNF α nach Stimulation mit hitze- bzw. UV-inaktivierten Bakterienproben ist in Grafik 2 dargestellt. Es zeigte sich für *P. micros* eine Sekretion von TNF α , die etwa einem Drittel der Positivkontrolle entsprach, jedoch nur wenn mit UV-inaktivierten Bakterien stimuliert wurde, während keine Stimulation beim Einsatz

von hitzeinaktivierten Bakterien zu beobachten war. Die TNF α -Produktion nach Zugabe von *S. aureus* lag unabhängig von der Inaktivierungsart bei annähernd 30% der Positivkontrolle. *S. intermedius* induzierte keine TNF α Produktion. Durch den Einsatz von *N. mucosa* ließ sich die Bildung von TNF α gut stimulieren, wobei unabhängig von der Inaktivierungsart Werte von ca. zwei Dritteln der Positivkontrolle erreicht wurden. Aufgrund der ähnlichen Stimulationswirkung kann auch für TNF α von einer Unabhängigkeit der Stimulationswirkung von der Inaktivierungsmethode ausgegangen werden. Lediglich *P. micros* zeigte stark unterschiedliche Werte zwischen beiden Inaktivierungsmethoden, wobei als Ursache hierfür abzuklären bleibt ob es sich um eine Besonderheit dieses Gram-positiven Keims oder um einen Fehler handelt. *P. micros* zeigte jedoch in anderen Versuchen ein schwach stimulatives Potential, das denen anderer Gram-positiver Bakterien entsprach und bei Stimulation TLR-transfizierter HEK-Zellen eine deutliche Stimulation via TLR2, was gegen eine thermische Inaktivierung immunstimulatorischer Bakterienbestandteile sprach. Die übrigen eingesetzten Gram-positiven Bakterien zeigten abhängig von der Inaktivierungsmethode keine Unterschiede

4.1.2. Variabilität durch Einsatz von Vollblut verschiedener Spender

Die Grafiken 3.1 bis 3.3 zeigen die Ergebnisse der Stimulation von Vollblut verschiedener Spender (n=6) mit unterschiedlichen Stimuli. Insgesamt wurden 3 Versuche mit jeweils 4 bzw. 6 Spendern durchgeführt, wovon einer stellvertretend dargestellt ist. Die Streuung der Messwerte ist dargestellt durch Mittelwerte und SEM. Neben einer geringen Streubreite der Ergebnisse ist erkennbar, dass nach Stimulation mit Gram-positiven Bakterien die Freisetzung von IL-8 mehr als fünfmal höher lag als die gemessene Menge an TNF α (Grafik 3.1). Durch den Einsatz von Gram-negativen Bakterien ließ sich eine deutliche Sekretion von TNF α und IL-8 erreichen. Die Produktion von IL-8, die durch den Einsatz von *D. pneumosintes*, *E. coli* und *P. aeruginosa* erreicht wurde, lag deutlich über der Menge an IL-8, welche durch 100 ng/ml LPS freigesetzt wurde und als 100% normiert wurde. Die Menge an TNF α nach Stimulation mit einer dieser drei Bakterienarten entsprach hingegen dem Wert für 100 ng/ml LPS. Im Gegensatz dazu bewirkte die Stimulation mit *P. gingivalis* keine Freisetzung von TNF α und lediglich eine geringe Produktion von IL-8, und zeigte somit ein Verhalten, welches von dem anderer Gram-negativer Bakterien abwich und dem von Gram-positiven entsprach. Die Streuung der Messwerte war gering (siehe Grafik 3.2).

Die Positivkontrolle S-LPS in einer Konzentration von 100 ng/ml wurde 100% gesetzt, in Relation hierzu zeigte LTA eine etwas stärkere Induktion von IL-8, jedoch keine Induktion von TNF α . LPS von *P. gingivalis* führte ebenso nicht zu einer TNF α -Freisetzung und bewirkte eine Induktion von IL-8, die circa der Hälfte der von S-LPS freigesetzten Menge entsprach. Die Negativkontrolle Medium setzte keine relevante Menge TNF α oder IL-8 frei. Die Streubreite der Messwerte für LTA, Pg-LPS und Medium war gering (siehe Grafik 3.3).

Die Grafiken 3.4 und 3.5 zeigen die Streuung der relativen Stimulationsergebnisse der sechs Probanden in Abhängigkeit vom verwendeten Stimulus. Diese Abbildung verdeutlicht, dass der Trend der Antwort auf die eingesetzten Stimuli auch bei Verwendungen von Vollblut unterschiedlicher Spender einheitlich war.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse (vgl. Zusammenfassung 1), dass sich die Freisetzung von TNF α und IL-8 bei Stimulation mit Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien wie folgt unterscheidet: Gram-negative Bakterien bewirken ebenso wie das PAMP LPS eine deutliche Freisetzung von TNF α und IL-8. Hingegen zeigen Gram-positive Bakterien insgesamt eine geringere Zytokinfreisetzung, wobei wie auch bei LTA die Menge an freigesetztem TNF α sehr viel geringer war als die von IL-8. Interessanterweise zeigt das Gram-negative Bakterium *P. gingivalis* und dessen LPS ebenso dieses Verhalten einer deutlich höheren IL-8 Freisetzung, sodass das Stimulationsverhalten dem eines Gram-positiven Bakteriums ähnelt.

Zusammenfassung 1

Bakterium	Gram-	PAMP	Zytokinfreisetzung
Dp, Ec, Pyo	Negativ	LPS	TNF α + IL-8
Am, Sa	Positiv	LTA	TNF α < IL-8
Pg	Negativ	Pg-LPS	TNF α < IL-8

4.1.3. Kinetik der Zytokinfreisetzung

Mithilfe einer Bestimmung des Verlaufes der Zytokinfreisetzung sollte untersucht werden, inwieweit der Zeitpunkt der Überstandentnahme nach 22 Stunden geeignet war, um die Zytokinfreisetzung zu erfassen. Hierzu wurden, wie unter 3.2.9. beschrieben, über 24 Stunden Messwerte einer Stimulation erhoben, indem im Abstand von 2 Stunden Zytokinbestimmungen durchgeführt wurden.

4.1.3.1. Zeitlicher Verlauf der Freisetzung von TNF α

Grafik 4.1 zeigt den Verlauf der Freisetzung von TNF α nach Stimulation mit den Gram-positiven Bakterien *A. meyeri* und *P. micros*. Bei beiden Bakterien ließ sich keine signifikante Freisetzung von TNF α beobachten.

Die in Grafik 4.2 dargestellten Werte für die Stimulation mit Gram-negativen Bakterien zeigen für *D. pneumosintes*, *C. rectus* und *E. coli* ähnliche Ergebnisse: In den ersten 12 bis 14 Stunden der Stimulation wurden die größten Mengen an TNF α produziert, während sich im weiteren Verlauf die Konzentrationszunahme abschwächte und schließlich stagnierte. *D. pneumosintes* induzierte im Vergleich die stärkste Bildung von TNF α mit Werten bis zu 3000 pg/ml, *C. rectus* und *E. coli* zeigten ähnliches Stimulationsverhalten und erreichten Werte bis zu 2000 pg/ml. *P. gingivalis* hingegen zeigte eine konstant niedrige Produktion von TNF α im gesamten Verlauf der Stimulation.

Die durchgeführte Positivkontrolle mit S-LPS 100 ng/ml zeigte, wie in Grafik 4.3 dargestellt, eine starke Induktion von TNF α , wobei die Freisetzung innerhalb der ersten 14 Stunden kontinuierlich bis auf Konzentrationen über 2000 pg/ml anstieg, danach war keine relevante Erhöhung der gebildeten TNF α -Menge mehr zu detektieren. Das als Negativkontrolle eingesetzte Medium ohne Stimulus zeigte keine Stimulation der Freisetzung von TNF α . In Übereinstimmung mit den Ergebnissen hitzeinaktivierter *P. gingivalis* Bakterien ließ sich durch Stimulation mit LPS von *P. gingivalis* keine Freisetzung von TNF α erreichen. LTA bewirkte als Stimulus eine mäßige Freisetzung von TNF α bis zu 700 pg/ml, die ein Maximum nach 8 Stunden erreichte und anschließend relativ konstant blieb.

4.1.3.2. Zeitlicher Verlauf der Freisetzung von IL-8

Die Menge an freigesetztem IL-8 entsprach in allen Versuchen einem Vielfachen der TNF α -Produktion. Grafik 5.1 zeigt, dass nach Stimulation mit *A. meyeri* bis zu 1300 pg/ml IL-8 induziert wurden, wobei das Maximum nach 16 Stunden erreicht wurde. Im Gegensatz dazu konnte durch den Einsatz von *P. micros* über den gesamten Zeitverlauf keine Freisetzung von IL-8 erreicht werden.

In Grafik 5.2 zeigt sich das ähnliche Stimulationspotential von *D. pneumosintes*, *C. rectus* und *E. coli*: In den ersten 14 Stunden wurde eine starke Zunahme der Gesamtmenge an IL-8 gemessen, die sich in der folgenden Zeit reduzierte. Dabei

erreichten alle drei Gram-negativen Werte über 16000 pg/ml. *P. gingivalis* zeigte im Vergleich dazu eine geringere Zunahme der gebildeten Menge an Zytokin sowie eine insgesamt geringere Konzentration von circa 8000 pg/ml Interleukin 8.

Die in Grafik 5.3 dargestellten Kontrollstimuli ergaben für die Negativkontrolle von Medium ohne zusätzlichen Stimulus keine relevante Bildung von IL-8. Die Positivkontrolle S-LPS in einer Konzentration von 100 ng/ml zeigte die stärkste Freisetzung von IL-8 in der ersten Hälfte der Stimulation, wobei letztendlich Konzentrationen von 10000 pg/ml erreicht wurden. Das LPS von *P. gingivalis* stimulierte eine deutlich geringere Produktion des gemessenen Zytokins von maximal 2000 pg/ml. Die insgesamt größten Mengen an Interleukin 8 waren nach Stimulation mit LTA messbar. Hier zeigte sich eine starke Zunahme der Konzentration von IL-8 in der zweiten Hälfte der Stimulation auf den Maximalwert von 19000 pg/ml.

4.1.3.3. Zusammenfassung des Verlaufs der Zytokinfreisetzung

Zusammenfassend zeigte sich sowohl für die Freisetzung von TNF α als auch für die von IL-8, dass eine Zytokinbestimmung nach 22 Stunden geeignet war, um die Stimulationseffekte der eingesetzten Bakterien zu erfassen, denn entweder zeigten die Stimuli konstant keine Zytokinfreisetzung oder sie zeigten bei 22 Stunden eine deutlich nachweisbare Zytokinproduktion.

Durch Stimulation mit Gram-negativen Bakterien wurden größere Mengen an Zytokinen freigesetzt als dies beim Einsatz von Gram-positiven Bakterien der Fall war. Wie in Zusammenfassung 2 dargestellt, zeigten Gram-negative Bakterien und deren Zellwandbestandteil LPS sowohl eine Freisetzung von TNF α als auch von IL-8. Im Gegensatz hierzu zeigten Gram-positive Bakterien und LTA eine Freisetzung von IL-8 bei sehr geringer TNF α -Sekretion. Wiederum zeigte *P. gingivalis* und dessen LPS ein abweichendes Muster der Zytokinfreisetzung, was dem von Gram-positiven Bakterien ähnelte.

Zusammenfassung 2

Bakterium	Gram-	PAMP	Zytokinfreisetzung
Dp, Cr, Ec	Negativ	LPS	TNF α + IL-8
Am	Positiv	LTA	TNF α < IL-8
Pg	Negativ	Pg-LPS	TNF α < IL-8
Pm	Positiv		-/-

4.2. Zytokinfreisetzung nach Stimulation von humanem Vollblut mit Bakterien und PAMPs

Nach Stimulation mit Gram-positiven Bakterien wurden, wie in Grafik 6.1 abgebildet, deutlich geringere Mengen TNF α als IL-8 gebildet. Während *A. odontolyticus*, *A. meyeri*, *P. micros*, *P. asaccharolyticus*, *S. sanguis* und *S. intermedius* keine relevante Produktion von TNF α induzierten, wurden nach Stimulation mit *S. aureus* durchschnittlich 400 pg/ml bzw. bei *E. faecalis* 600 pg/ml TNF α gebildet. Geringe Mengen IL-8 unter 500 pg/ml wurden durch *A. odontolyticus*, *S. sanguis* und *S. intermedius* gebildet. *A. meyeri* induzierte eine durchschnittliche Freisetzung von circa 850pg/ml und *S. aureus* circa 1600 pg/ml. Die höchste Konzentration an freigesetztem IL-8 bewirkten mit jeweils 2100 pg/ml *P. asaccharolyticus* und *E. faecalis*.

Grafik 6.2 zeigt, dass auch bei Stimulation mit Gram-negativen Erregern die gebildete Menge von IL-8 einem Vielfachen der TNF α -Menge entsprach. Die Gruppe der Gram-negativen Anaerobier zeigte ein heterogenes Stimulationsverhalten: *P. gingivalis* induzierte wie auch *F. nucleatum* nur geringe Mengen TNF α . Interleukin 8 war nach Stimulation durch *P. gingivalis* in einer Konzentration von circa 2300 pg/ml nachweisbar, bei *F. nucleatum* waren dies 3400 pg/ml. *D. pneumosintes* konnte mit ca. 7500 pg/ml IL-8 mehr als das Doppelte dieses Wertes induzieren, ebenso war die gemessene Konzentration an TNF α mit 1500 pg/ml vergleichsweise hoch. *P. intermedia* bewirkte hingegen weder eine relevante Freisetzung von TNF α , noch von IL-8. *A. actinomycetemcomitans* beeinflusste die Freisetzung von TNF α und IL-8 deutlich schwächer als die übrigen mikroaerophilen Bakterien *C. rectus* und *E. corrodens*. Letzteres bewirkte eine Freisetzung von rund 1100 pg/ml TNF α und 8000 pg/ml IL-8. *C. rectus* erreichte mit 1000 pg/ml einen ähnlichen Wert, konnte aber nur 60% der Freisetzung von IL-8 durch *E. corrodens* bewirken. In der Gruppe der Neisserien zeigte sich ein homogeneres Bild: *N. mucosa* und *N. perflava* bedingten mit 1000 pg/ml die Bildung äquivalenter Mengen TNF α , *N. flavescens* stimulierte diesbezüglich eine Freisetzung von 1700 pg/ml. Im Bezug auf IL-8 zeigten *N. mucosa* mit 4200 pg/ml und *N. flavescens* mit 4000 pg/ml Ähnlichkeit, wovon sich *N. perflava* mit der 1,5fachen Menge von 6000 pg/ml unterschied. Die *Enterobacteriaceae* *E. coli* und *S. Minnesota* bewirkten die Freisetzung von 1700 bzw. 1800 pg/ml. Die erreichten Mengen an ausgeschüttetem IL-8 waren um den Faktor 4 höher. Die höchste Konzentration an

freigesetztem IL-8 erreichte *P. aeruginosa* mit 8500 pg/ml, wobei die Messung von TNF α eine Konzentration von ungefähr 1000 pg/ml ergab.

Grafik 6.3 zeigt, dass die Negativkontrolle Medium weder eine Ausschüttung von TNF α noch von IL-8 bewirkte. Die Positivkontrolle S-LPS bedingte die Freisetzung von circa 1200 pg/ml TNF α , die gleichzeitig gemessene Konzentration von IL-8 lag bei 5800 pg/ml fast fünffach höher. Stimulation mit *P. gingivalis* LPS zeigte eine Freisetzung von circa 1700 pg/ml IL-8, TNF α war in Gegensatz dazu nur in geringen Mengen nachweisbar. Auch nach Stimulation mit LTA ließ sich keine deutliche Konzentration von TNF α messen, jedoch wurden gleichzeitig mit 6400 pg/ml IL-8 Werte gemessen, die die Positivkontrolle S-LPS übertrafen.

Zusammenfassend konnten folgende Ergebnisse gesammelt werden: Im Allgemeinen war die Freisetzung von IL-8 bei Stimulation von humanem Vollblut größer als diejenige von TNF α . Dabei bewirkten Gram-negative Bakterien im Allgemeinen deutlich stärkere Zytokinfreisetzung als Gram-positive Bakterien. Die eingesetzten Gram-negativen Bakterien und LPS bedingten eine Freisetzung von IL-8 und TNF α , hingegen war nach Stimulation mit Gram-positiven Bakterien TNF α nur in äußerst geringen und IL-8 in um ein Vielfaches höheren Konzentrationen zu messen. *S. aureus* und *E. faecalis* unterschieden sich hierbei von den anderen Gram-positiven Bakterien, da bei ihnen eine relevante TNF α -Freisetzung zu messen war.

Wie bereits in anderen Versuchen beobachtet, zeigt *P. gingivalis* und das dazugehörige LPS ein Zytokinfreisetzungsmuster, das dem von Gram-positiven Bakterien glich. Erstaunlicherweise konnte dies ebenfalls bei *F. nucleatum* beobachtet werden.

Für die Bakterien *P. intermedia* und *A. actinomycetemcomitans* (Gram-positiv) sowie *P. micros*, *S. sanguis*, *S. intermedius* und *A. odontolyticus* (Gram-negativ) ließen sich keine Zytokinfreisetzung beobachten.

Zusammenfassung 3

Bakterium	Gram-	PAMP	Zytokinfreisetzung
Dp, Cr, Ecorr, Nm, Nf, Np, Ec, Sm, Pyo	Negativ	LPS	TNF α + IL-8
Sa, Ef	Positiv	LTA	TNF α + IL-8
Am, Pa	Positiv	LTA	TNF α < IL-8
Pg	Negativ	Pg-LPS	TNF α < IL-8
Fn	Negativ		TNF α < IL-8

4.3. Betrachtung der Zytokinfreisetzung in Relation zum Referenzstimulus

In Relation zu dem Referenzstimulus 100 ng/ml S-LPS stellt sich in Grafik 7.1 und 7.2 dar, dass *A. odontolyticus*, *P. micros*, *S. sanguis* und *S. intermedius* ein sehr geringes Stimulationsverhalten zeigten, welches unter einem Zehntel des S-LPS-Wertes lag. Dabei waren für die ersten drei der genannten Keime keine Unterschiede zwischen der Produktion von TNF α und IL-8 erkennbar. Bei *S. intermedius* zeigte sich eine Produktion von TNF α kleiner 2%, IL-8 wurde mit knapp 10% der S-LPS-Antwort gemessen. Auch *A. meyeri* und *P. asaccharolyticus* bewirkten keine Freisetzung von TNF α , jedoch wurde durch *A. meyeri* ein Fünftel und durch *P. asaccharolyticus* ca. 60% der Menge an IL-8 gebildet, die durch den Referenzstimulus erreicht werden konnte. Im Gegensatz dazu zeigten die beiden Aerobier *S. aureus* und *E. faecalis* sowohl eine messbare Produktion von TNF α als auch von IL-8. Die für TNF α erreichten Werte lagen dabei für beide Bakterien knapp über einem Fünftel, die für IL-8 gemessenen Werte bei circa einem Drittel des Referenzwertes.

Die Stimulation mit dem Gram-negativen Bakterium *P. gingivalis* bewirkte im Vergleich zum Referenzstimulus S-LPS eine Freisetzung von 10% für TNF α und 50% für IL-8. Ein ähnliches Bild zeigte *F. nucleatum*, welches 18% für TNF α und 78% für IL-8 erreichte. *P. intermedia* vermochte weder im Bezug auf TNF α noch auf IL-8 eine relevante Sekretion zu bewirken. Als viertes Bakterium in der Gruppe der Gram-negativen Anaerobier rief *D. pneumosintes* eine IL-8 Produktion hervor, die knapp über dem durch den Einsatz von S-LPS erreichten Wert lag. Die freigesetzte Menge an TNF α nach Stimulation mit diesem Bakterium erreichte sogar das 2,5fache des Wertes für den Standardstimulus. Der mikroaerophile Erreger *A. actinomycetemcomitans* zeigte eine Freisetzung von 17% der TNF- bzw. 11% der IL-8-Menge. Durch *C. rectus* wurde eine Menge an IL-8 freigesetzt, die der Menge nach Stimulation mit dem Standardstimulus entsprach, wohingegen bezogen auf TNF α die 1,4fache Menge freigesetzt wurde. *E. corrodens* erreichte das 1,3fache der IL-8 Konzentration bzw. das 2,2fache der TNF α -Konzentration, welche nach Stimulation mit 100 ng/ml S-LPS gemessen wurde. Die Gruppe der Neisserien zeigte durchweg eine höhere relative IL-8- als TNF α -Produktion. Dabei bildeten *N. mucosa*, *N. flavescens* und *N. perflava* rund 50%, 90% bzw. 100% des durch S-LPS induzierten Vergleichswertes für TNF α , im Vergleich zum IL-8-Ergebnis erreichten sie in der o.g. Reihenfolge 90%, 100% bzw. 120%. *E. coli*, *S. Minnesota* und *P. aeruginosa* konnten eine gegenüber dem

Referenzstimulus leicht höhere Produktion von IL-8 erreichen. TNF α wurde nach Stimulation mit *E. coli* in einer 2,2fach höheren Konzentration gebildet als nach Stimulation mit 100 ng/ml S-LPS, *S. Minnesota* erreichte das Doppelte dieses Wertes, während *P. aeruginosa* die Bildung der 1,5fachen Menge an TNF α bewirkte.

Die gemessene Menge an TNF α bzw. IL-8 nach Stimulation mit 100 ng/ml S-LPS wurde zur besseren Vergleichbarkeit als Referenzwert auf 100% normiert (siehe Grafik 7.5 und 7.6). Die Negativkontrolle Medium ohne zugesetzten Stimulus bedingte keine Zytokinfreisetzung. Auch nach Stimulation mit LTA bzw. mit LPS von *P. gingivalis*, jeweils in einer Konzentration von 10 μ g/ml, war keine relevante Freisetzung von TNF α zu beobachten. Jedoch zeigte LTA eine Stimulationsfähigkeit im Bezug auf die Freisetzung von IL-8, die diejenige durch S-LPS leicht übertraf. Das LPS von *P. gingivalis* erreichte circa 40% des IL-8 Referenzwertes.

Zusammenfassend zeigten verschieden Bakterien sehr große Unterschiede in der Freisetzung von Zytokinen bei Stimulation von humanem Vollblut. Wie in Zusammenfassung 4 dargestellt, zeigte sich bei Normierung auf S-LPS folgendes Bild: Bei Stimulation mit Gram-positiven Bakterien und LTA konnten gleiche oder höhere Freisetzungen von IL-8 als von TNF α beobachtet werden. Ausnahmen hierbei waren *P. micros* und *S. sanguis*, welche insgesamt sehr geringe Stimulation zeigten. Hingegen zeigten Gram-negative Bakterien ein umgekehrtes Bild: Hier übertrafen die gemessenen TNF α -Konzentrationen die von IL-8 (bei Neisserien wurden gleiche Mengen freigesetzt). Auffällig abweichend hiervon zeigten die Gram-negativen Bakterien *P. gingivalis* und *F. nucleatum* ein Muster, das dem von Gram-positiven Bakterien entsprach (TNF α < IL-8).

Zusammenfassung 4

Bakterium	Gram-	PAMP	Zytokinfreisetzung
Ao, Am, Pa, Si, Sa, Ef	Positiv	LTA	TNF α \leq IL-8
Dp, Cr, Ecorr, Ec, Sm, Pyo	Negativ	LPS	TNF α > IL-8
Nm, Nf, Np	Negativ		TNF α \approx IL-8
Pg	Negativ	Pg-LPS	TNF α < IL-8
Fn	Negativ		TNF α < IL-8

4.4. Stimulation von transient mit TLR-Plasmiden transfizierten Zellen

Die bisher dargestellten Befunde zeigen, dass zum einen Gram-positive und Gram-negative Bakterien Unterschiede bei der Sekretion von TNF α und IL-8, insbesondere im Hinblick auf das Verhältnis beider Zytokine, aufweisen. Zum anderen zeigten einige Gram-negative Bakterien (*P. gingivalis*, *F. nucleatum*) einen Stimulationseffekt, wie er bei Gram-positiven Bakterien zu beobachten war. Es wurde postuliert, dass Gram-negative Bakterien durch LPS vor allem TLR4 stimulieren, während das LTA Gram-positiver Bakterien TLR2 stimuliert. Ob dies auch die unterschiedlichen Zytokinmuster bedingte sollte anhand isolierter Rezeptoraktivierung im folgenden Versuch geprüft werden. Dazu wurden HEK-293-Zellen, welche endogen keine TLRs exprimieren jedoch aufgrund der IL-1R-Expression über das notwendige Signaltransduktionssystem verfügen, mit TLR2 bzw. TLR4 (+MD2 Kofaktor) transfiziert. Die Aktivierung wurde über ein gleichzeitig transfiziertes NF κ B-Reporterplasmid getestet. Dieser Ansatz erlaubte die selektive Untersuchung der Kapazität Gram-positiver und Gram-negativer Bakterien hinsichtlich der Stimulation von TLR2 und TLR4.

Grafik 8.1 und 8.2 zeigen vergleichend für TLR2 und TLR4 die Induktion von NF κ B nach Stimulation mit Gram-positiven Bakterien. Dabei zeigte sich allgemein in den TLR2-transfizierten Zellen eine stärkere Erhöhung von NF κ B als in den Zellen, welche mit TLR4 transfiziert worden waren. *A. odontolyticus*, welcher via TLR2 die NF κ B-Freisetzung um den Faktor 8 steigerte, zeigte keine NF κ B-Erhöhung bei Stimulation der TLR4-transfizierten Zellen. Ebenso zeigten *A. meyeri*, *S. intermedius*, *S. aureus* und *E. faecalis* keine Induktion von NF κ B bei Stimulation über TLR4, wobei diese Spezies über TLR2 sehr wohl stimulierten. *S. sanguis* zeigte sowie TLR4- als auch TLR2-vermittelt eine Induktion um den Faktor 2, was für die TLR2-abhängige Stimulation die schwächste, für die TLR4 jedoch die stärkste Aktivierung war.

Im Vergleich der Grafiken 8.3 und 8.4 stellen sich drei verschiedene Muster dar, nach denen sich die Erreger einordnen lassen: Die erste Gruppe, zu der *P. gingivalis* und *A. actinomycetemcomitans* gehören, bewirkte über TLR2 eine sehr starke Induktion des NF κ B um den Faktor 12 bzw. 9, während diese via TLR4-Stimulationsweg nicht zu beobachten war. Die zweite Gruppe zeigte lediglich geringe Unterschiede bezüglich des Induktionsfaktors bei TLR2- bzw. TLR4-abhängiger Stimulation. Zu dieser ließen sich *D. pneumosintes*, *C. rectus*, *E. corrodens* und *E. coli* zuordnen. Die dritte Gruppe, bestehend aus *P. aeruginosa* als einzigem Vertreter, zeigte den deutlich höheren

Induktionsfaktor von 7,5 bei Stimulation über den TLR4-Signalweg, im Vergleich zu 2,4 bei den TLR2-transfizierten Zellen.

Beim Einsatz der Kontrollstimuli zeigte sich, dass mit LPS keine Induktion der NFκB-Freisetzung durch Stimulation der TLR2-transfizierten Zellen möglich war, was zugleich bestätigt, dass das eingesetzte LPS frei von Kontaminationen mit TLR2-Liganden war. In Zellen, welche mit TLR4 transfiziert worden waren, zeigte sich erwartungsgemäß nach LPS-Stimulation eine Erhöhung der NFκB-Aktivierung um den Faktor 3,5. Im Gegensatz dazu zeigte das eingesetzte LTA-Stimulans in TLR4-transfizierten Zellen nur eine sehr schwache Induktion um den Faktor 1,4 in den mit TLR2 transfizierten Zellen jedoch eine starke Erhöhung um den Faktor 5,5. Das LPS von *P. gingivalis* verhielt sich beim Einsatz als Stimulus für die transfizierten HEK-293-Zellen ähnlich der Lipoteichonsäure: In TLR2-transfizierten Zellen erhöhte Pg-LPS die NFκB-Freisetzung deutlich auf das 4,5fache. Hingegen zeigte sich über TLR4 nur eine schwache Induktion um den Faktor 1,5. Die Negativkontrolle zeigte unabhängig von der Art des transfizierten Rezeptors keine Erhöhung der NFκB-Freisetzung.

Wie in Zusammenfassung 5 dargestellt, ließen sich bei der Untersuchung transfizierter HEK-293-Zellen wie in den vorangegangenen Versuchen Unterschiede zwischen Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien beobachten: Gram-positive Bakterien und LTA zeigten großes stimulatives Potential in TLR2- nicht aber in TLR4-transfizierten Zellen. Die Gram-negativen Bakterien ließen sich in 3 Gruppen einteilen: *D. pneumosintes*, *C. rectus*, *E. corrodens* und *E. coli* zeigten Aktivität an beiden Rezeptoren, *P. aeruginosa* stimulierte stärker via TLR4, während *P. gingivalis* und *A. actinomycetemcomitans* deutlich stärker via TLR2 stimulierten. LTA und Pg-LPS verhielten sich gleich, indem sie stark via TLR2, kaum via TLR4 stimulierten.

Zusammenfassung 5

Bakterium / PAMP	Gram-	TLR2-Stimulation	TLR4-Stimulation
Ao, Am, Pm, Pa, Si, Sa, Ef	Positiv	++ bis +++	—
Pg, Aa	Negativ	+++	—
Dp, Cr, Ecorr, Ec	Negativ	+	+
Pyo	Negativ	—	++
LTA	Positiv	++	—
LPS	Negativ	—	+
Pg-LPS	Negativ	++	—

4.5. Stimulation von Mauszellen mit Toll-like Rezeptormutationen

Durch die Stimulation transfizierter HEK-293-Zellen konnten Unterschiede, wie sie auch auf Zytokinebene bei Stimulation von humanem Vollblut zwischen Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien zu beobachten waren, gezeigt werden. Die erhaltenen Ergebnisse sollten nun in einem weiteren System bestätigt werden. Des Weiteren sollte, nachdem die Stimulation an TLR2 und TLR4 untersucht wurde, geprüft werden, inwieweit das stimulative Potential Gram-positiver und Gram-negativer Bakterien von diesen beiden TLRs abhängig ist. Dazu wurden Mauszellen mit Defekten von TLR2 bzw. TLR4 mit den Bakterien stimuliert und anschließend die TNF α -Konzentration im Stimulationsüberstand bestimmt.

4.5.1. Peritonealmakrophagen TLR2-defizienter Mäuse

Nach Stimulation von Mausperitonealmakrophagen mit Bakterien und Kontrollstimuli wurde die TNF α -Sekretion gemessen. Diese lag bei Einsatz Gram-negativer Bakterien für den Großteil der eingesetzten Keime deutlich über der geringen TNF α -Freisetzung, welche nach Stimulation mit Gram-positiven Bakterien messbar war. Im Vergleich des Stimulationsergebnisses von TLR2-knockout-Mauszellen und Wildtypzellen zeigten unter den Gram-positiven Bakterien (Grafiken 9.1 und 9.2) *S. aureus*, *E. faecalis* und *S. intermedius* eine reduzierte Freisetzung von TNF α in Zellen, welche nicht über einen funktionsfähigen TLR2 verfügten. Bei den eingesetzten Gram-negativen Bakterien (Grafiken 9.3 und 9.4) hingegen wurde für die Mehrzahl eine deutliche Konzentration von TNF α im Bereich über 500 pg/ml gemessen. Deutlich geringere Mengen wurden nach Stimulation mit *P. gingivalis*, *P. intermedia* und *A. actinomycetemcomitans* gemessen. *P. gingivalis* und *F. nucleatum* zeigten in Zellen mit Rezeptormutation eine deutliche Verringerung der TNF α -Konzentration, bei den anderen eingesetzten Gram-negativen Bakterien war dies schwächer oder nicht zu beobachten. *P. aeruginosa* bewirkte sogar eine höhere TNF α -Freisetzung in TLR2^{-/-} Zellen. Der Einsatz von PAMPs als Kontrollstimuli (Grafiken 9.5 und 9.6) ergab bei negativer Mediumantwort nach Stimulation mit *S. Minnesota* LPS unabhängig von einer Affektion des TLR2 eine gleichwertige Freisetzung von TNF α . Hingegen war sowohl bei LPS von *P. gingivalis* als auch beim Einsatz von LTA die Konzentration von TNF α im Stimulationsansatz, welcher TLR2^{-/-} Zellen benutzte, deutlich niedriger als jene, welche nach Stimulation von Wildtypzellen messbar war.

4.5.2. Peritonealmakrophagen TLR4-mutierter C3H/HeJ-Zellen

Die Stimulation von TLR4-mutierten Mausperitonealmakrophagen mit Gram-positiven Erregern (Grafiken 10.1 und 10.2) zeigte für die meisten Arten keine relevante Produktion von TNF α . Allenfalls zeigte *E. faecalis* eine Freisetzung von TNF α aus C3H/HeJ-Zellen, welche die Menge an freigesetztem TNF α von Zellen ohne Rezeptormutation übertraf. Im Vergleich hierzu waren nach Stimulation mit Gram-negativen Bakterien (Grafiken 10.3 und 10.4) höhere Werte der TNF α -Konzentration messbar: Hierbei zeigte die Stimulation mit *C. rectus* und *D. pneumosintes* bei Wildtypzellen eine Produktion von ca. 1200 pg/ml TNF α , wohingegen bei C3H/HeJ-Zellen kein TNF α messbar war. Ebenso war bei TLR4-Mutation die Freisetzung von TNF α nach Stimulation mit *E. coli*, *E. corrodens* und *P. aeruginosa* deutlich reduziert. Ein abweichendes Stimulationsverhalten zeigten *P. gingivalis* und *F. nucleatum*, bei deren Einsatz sich die Freisetzung von TNF α trotz Rezeptormutation nicht bzw. nur leicht reduzierte. *P. intermedia* und *A. actinomycetemcomitans* erzielten keine TNF α -Freisetzung. Beim Einsatz von aufgereinigtem LPS von *P. gingivalis* zeigte sich eine gleichwertige Freisetzung von TNF α aus Zellen mit TLR4-Mutation, während der Einsatz von *S. Minnesota* LPS kein TNF α im Ansatz mit TLR4-mutierten Zellen messbar war. Lipoteichonsäure zeigte als Stimulus auf C3H/HeJ-Mauszellen eine zweifach höhere TNF α -Freisetzung als auf Wildtypzellen.

4.5.3. Zusammenfassung

Auch bei der Stimulation von Mauszellen mit TLR-Mutationen zeigte sich das bereits in den vorherigen Versuchen beobachtete Bild: Gram-negative Bakterien weisen ein höheres Stimulationspotential auf als Gram-positive Bakterien. Erneut unterschieden sich *P. gingivalis* und *F. nucleatum* vom Muster anderer Gram-negativer Bakterien. Die Auswirkungen der Mutationen von TLR2 oder TLR4 für die TNF α -Freisetzung durch Stimulation sind in Zusammenfassung 6 dargestellt. Daraus ergibt sich, dass *P. gingivalis* und das zugehörige LPS die TNF α -Freisetzung komplett unabhängig vom TLR4 über TLR2 stimulieren. Ebenso scheint auch *F. nucleatum* wenig von TLR4, stärker von TLR2 abhängig zu sein. Die Ergebnisse nach Stimulation mit *D. pneumosintes* und *C. rectus* legen den Verdacht nahe, dass ihre Stimulationsfähigkeit komplett vom TLR4 abzuhängen schien, während *E. corrodens*, *E. coli* und *P. aeruginosa* eine partielle TLR4-Abhängigkeit zeigten.

Zusammenfassung 6

Bakterium / PAMP	Gram-	Mutation TLR2	Mutation TLR4
Ao, Am, Pm, Pa, Ss, Si, Sa, Ef	Positiv	↔	↔
Pg	Negativ	↓	↔
Fn	Negativ	↓	(↓)
Dp, Cr	Negativ	↔	↓↓↓
Ecorr, Ec, Pyo	Negativ	↔	↓
LTA	Positiv	↓	↔
LPS	Negativ	↔	↓↓↓
Pg-LPS	Negativ	↓	↔

Zeichenerklärung: ↔ - keine Reduktion der TNF α -Freisetzung, ↓ - Reduktion der TNF α -Freisetzung, ↓↓↓ - komplette Reduktion der TNF α -Freisetzung

5. Diskussion

Im Verlauf der Evolution haben Gram-positive und Gram-negative Bakterien unterschiedliche Lebensweisen und Strukturmerkmale ausgebildet (Gupta, 1998). Molekular stellen sich diese insbesondere in sogenannten PAMPs, wie Peptidoglykan, Lipoteichonsäuren und Lipopolysaccharide, dar, welche einen wesentlichen Unterschied im Aufbau der Zellwände ausmachen. In verschiedenen *in vivo* und *in vitro* Experimenten ließen sich starke immunstimulatorische Eigenschaften dieser Molekülmuster erkennen (Ellingsen et al., 2002; Lawrence & Nauciel, 1998; Mattsson et al., 1993; Wang et al., 2000).

Bakterielle Infektionen lösen Entzündungsreaktionen beim Wirt aus, welche zusammenwirkend auf die Abwehr des schädigenden Agens zielen. Ein möglicher Erkennungs- und Angriffspunkt hierfür sind PAMPs, Bakterienbestandteile, die unabhängig von der Spezies bei unterschiedlichen Bakterien ein wiederkehrendes, evolutionär konserviertes Muster darstellen. Stimulationsversuche mit PAMPs haben es ermöglicht, viele Signalwege und Abwehrmechanismen des angeborenen Immunsystems zu charakterisieren. Untersuchungen an einzelnen Rezeptoren und mit einzelnen PAMPs haben jedoch das Problem, dass sie die komplexe Situation, wie sie im infizierten Wirtsorganismus existiert, nur ausschnittsweise bzw. unvollständig abbilden können. Zum einen verfügt schon ein einzelnes Bakterium über verschiedene PAMPs, zum anderen sind nicht ausschließlich PAMPs Angriffsziele von Abwehrmechanismen. Sowohl die Wirkung der entsprechenden bakteriellen Moleküle auf Zellen, als auch die Erkennung und Abwehr des schädigenden Agens wird im menschlichen Organismus niemals nur eine einzige Zellart betreffen. Des Weiteren ist gerade im Hinblick auf Infektionen polymikrobieller Genese die Kombination ganz unterschiedlicher immunstimulatorischer Mechanismen denkbar und wahrscheinlich.

Ziel dieser Arbeit war daher, mithilfe eines Testsystems auf Vollblutbasis die Situation im infizierten Organismus zu untersuchen. Dazu sollten hitzeinaktivierte bakterielle Zellen von Arten, welche nachweislich an polymikrobiellen Infektionen der Mundhöhle beteiligt sind, sowie einzelner PAMPs, welche zur Kontrolle dienten, eingesetzt werden. Hierdurch sollten verschiedene, potentiell vorhandene immunstimulatorische Mechanismen und Muster, vermittelt durch die unterschiedlichen Bakterienbestandteile, erfasst werden. Diese Untersuchung und Charakterisierung der Effekte, die sich nach

Stimulation von Vollblut mit einzelnen Bakterienarten beobachten ließen, sollten des weiteren Grundlage für Versuche sein, die die Situation beim Einsatz mehrerer Keime in Kombination untersuchen. Dies soll das Verständnis der Genese von und der Mechanismen in polymikrobiellen Infektionen verbessern.

Um eine Interpretation der Ergebnisse der Stimulation von Vollblut mit hitzeinaktivierten Zellen im Lichte etablierter Erkenntnisse zur Signaltransduktion auf molekularer Ebene zu ermöglichen, wurde die Stimulation parallel auch an TLR-transfizierten HEK-293 Zellen und Zellen mit TLR-Defekten durchgeführt.

5.1. Eignung des Vollblutsystems

Die Entscheidung für die Verwendung eines Vollblutsystems basierte auf der Überlegung, dass bei Infektionen menschlicher Gewebe viele verschiedene Zellen lokal und funktionell an der Vermittlung einer Entzündungsantwort beteiligt sind. Es wurde bereits gezeigt, dass die Messung der Zytokinproduktion in frischem humanen Vollblut prinzipiell geeignet ist, um die stimulatorischen Effekte bakterieller Endotoxine und Bestandteile (De Forge et al., 1991; Morath et al., 2001; Hermann et al., 2002) sowie immunmodulatorischer Behandlungen (Hartung et al., 1995, 1999, 2000) nachzuweisen und zu quantifizieren.

Zur Abschätzung inwieweit die beobachtbaren Stimulationseffekte interindividuell variierten, wurden Stimulationen von Humanblut verschiedener, klinisch gesunder Spender mit identischen Stimuli durchgeführt. Ebenso sollte dieser Versuchsansatz dazu dienen, eventuelle „non-responder“ zu entdecken oder Testunregelmäßigkeiten feststellen zu können (Freudenberg et al., 2003). Dabei zeigte sich, dass bei Betrachtung der absoluten Werte der Stimulation Unterschiede im Bezug auf die freigesetzten Mengen auftraten, wobei jedoch ein einheitlicher Trend feststellbar war. Betrachtete man die Werte relativ, bezogen auf den Standardstimulus 100 ng/ml S-LPS, so zeigte sich lediglich eine geringe bis mäßige Variation der Ergebnisse (siehe Grafiken 3.1, 3.2 und 3.3). Bei keinem der Probanden war eine Mehr- oder Minderantwort auf bestimmte Erreger zu erkennen. Die Untersuchung der Fragestellung durch ein Vollbluttestsystem, welches Blut gesunder Spender nutzt, war aufgrund vergleichbarer, reproduzierbarer Ergebnisse möglich.

In einem weiteren Vorversuch wurde die Kinetik der Freisetzung von Interleukin-8 und TNF α untersucht, um einen optimalen Messzeitpunkt nach Stimulation festzulegen. Es zeigte sich, dass die größten Anstiege der Zytokinkonzentration im Bereich der ersten

12 Stunden zu beobachten waren und sich die gebildete Menge an Zytokin nach 16 bis 22 Stunden auf einem annähernd konstanten Niveau hielt. Es wurde daher entschieden, die Bestimmung der Zytokinkonzentration nach einem 22stündigen Stimulationsintervall vorzunehmen.

Für den gezielten Einsatz ganzer, hitzeinaktivierter Bakterien war zu klären, ob eventuelle Unterschiede zwischen dem Stimulationsverhalten durch die Art der Inaktivierung bedingt sein könnten, in diesem Falle beispielsweise durch eine unterschiedliche thermische Resistenz der Moleküle Lipoteichonsäure und Lipopolysaccharid. Ein Vergleich der freigesetzten Zytokinmengen nach Stimulation mit hitzeinaktivierten Bakterien bzw. mit Bakterien, welche durch ultraviolettes Licht inaktiviert wurden, zeigte jedoch keine relevanten Unterschiede. Eine Affektion der für die Stimulationsfähigkeit bedeutsamen, bakteriellen Oberflächenstrukturen durch die vorgenommene Hitzeinaktivierung wurde somit ausgeschlossen.

5.2. Stimulation mit Komponenten der bakteriellen Zellwand (PAMPs)

Eine schematische Zusammenfassung aller durchgeführten Stimulationsversuche mit PAMPs gibt Tabelle 3.

Bei der Stimulation von Vollblut mit PAMPs war nach Stimulation mit *S. Minnesota* LPS eine deutliche Induktion von TNF α und IL-8 zu erkennen. Durch den Einsatz von Lipoteichonsäure wurde keine relevante Menge TNF α frei, wohl aber eine deutliche Freisetzung von IL-8 induziert. *P. gingivalis* Lipopolysaccharid konnte die Freisetzung von TNF α nicht, die von IL-8 nur schwach induzieren.

Während bei Stimulation von TLR4-transfizierten HEK-293 Zellen mit *S. Minnesota* LPS eine starke Induktion von NF κ B erfolgte, war diese bei Einsatz von *P. gingivalis* LPS gering. Hingegen zeigte sich hierfür eine deutlich höhere Aktivierung bei Stimulation von TLR2-transfizierten Zellen, ebenso war die TNF α Freisetzung aus Mausperitonealmakrophagen deutlich vermindert, sofern diese eine Mutation des TLR2 aufwiesen, wohingegen ein TLR4-Rezeptordefekt zu einer gleichwertigen TNF α Freisetzung führte. Beide Punkte bestätigen die These, dass *P. gingivalis* LPS vor allem TLR2, weniger TLR4 zur Signalübertragung nutzt (Darveau et al., 2004), wobei die Aktivität am TLR2 stärker, am TLR4 schwächer als jene von *Enterobacteriaceae* LPS ist (Coats et al., 2003). Ebenso sind diese Beobachtungen ein weiterer Hinweis dafür, dass nicht ausschließlich freigesetzte Gingipains (Duncan et al., 2004; Potempa et al., 2003; Sugawara et al., 2000) durch Blockade des CD14-Rezeptors zur verminderten

Stimulationsaktivität von *P. gingivalis* LPS beitragen, sondern dass darüber hinaus strukturelle Besonderheiten des LPS von *P. gingivalis* (Paramonov et al., 2001) ein im Vergleich zu *Enterobacteriaceae*-LPS atypisches Bindungs- und Stimulationsverhalten verursachen. Bei Stimulation von TLR2^{-/-}-Zellen mit *S. Minnesota* LPS zeigte sich keine Veränderung der Zytokinfreisetzung gegenüber Wildtypzellen. Bei TLR4-mutierten C3H/HeJ-Mauszellen ließ sich im Gegensatz zu Wildtypzellen jedoch keine Zytokinfreisetzung durch Stimulation mit *S. Minnesota* LPS erreichen. Bei Inkubation von TLR2-transfizierten-HEK-293 Zellen mit Lipoteichonsäure von *S. aureus* zeigte sich, wie bereits beschrieben (Schröder et al., 2003), eine Abhängigkeit vom TLR2, welche sich durch eine reduzierte TNF α Freisetzung aus TLR2^{-/-}-Mauszellen bestätigen ließ. Eine Mutation des TLR4 schränkte die Fähigkeit zur Freisetzung von TNF α nicht ein, vielmehr war eine deutlich erhöhte Freisetzung von TNF α zu beobachten (Tabelle 4 und 5).

Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit den bekannten Befunden, dass die Vermittlung der Stimulationsantwort von *Enterobacteriaceae*-LPS-Stimuli über TLR4 geschieht (Poltorak et al., 1998), während Lipoteichonsäure Gram-positiver Bakterien TLR2-abhängig stimuliert (Schwandner et al. 1999).

Weiterhin konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass *P. gingivalis* LPS eine klare Sonderstellung einnimmt: Unabhängig davon, ob die Stimulation von Vollblut, TLR-transfizierten HEK-293 Zellen oder Peritonealmakrophagen aus TLR-knockout-Mäusen erfolgte, zeigte *P. gingivalis* LPS stets ein Bild, das dem nach LTA-Stimulation sehr ähnlich war, wobei es sich deutlich von den beobachtbaren Effekten nach Stimulation mit *S. Minnesota* LPS unterschied. Hierbei zeigte sich, dass eine mindestens gleichwertige, wenn nicht sogar stärkere Stimulation über TLR2 möglich ist, insbesondere in C3H/HeJ-Mauszellen, die eine TLR4-Mutation aufweisen. Dies bestätigt die Annahme, dass *P. gingivalis* LPS Affinität und Aktivität sowohl am TLR4 als auch am TLR2 besitzen muss (Darveau et al., 2004; Ogawa et al., 2002), wobei die Aktivitäten an beiden Rezeptoren ungleich ausgeprägt sind. Dadurch ließe sich erklären, dass *P. gingivalis* LPS durch Besetzung von TLR4-Rezeptoren bei gleichzeitig geringerer intrinsischer Aktivität eine Abschwächung der Stimulationswirkung von *Enterobacteriaceae*-LPS bewirken kann (Coats et al., 2003). Ebenso wie für *P. gingivalis* LPS wurde auch für LPS anderer Spezies, z. B. *P. intermedia*, *L. interrogans* und *H. pylori*, eine Aktivierung von TLR2-abhängigen Signalwegen beobachtet (Kirikae et al., 1999; Smith et al., 2003; Werts et al., 2001). Diese Unterschiede im

Stimulationsverhalten sind vermutlich auf Unterschiede in der molekularen Struktur des LPS und seiner Lipid-A Anteile zurückzuführen, wobei eine konische Konformation, wie sie bei *Enterobacteriaceae* auftritt, eher TLR4, eine annähernd zylindrische Form, welche z. B. bei *P. gingivalis* zu finden ist, hingegen TLR2 zu aktivieren scheint (Netea et al., 2002). Zusammengefasst bestätigten die Ergebnisse neuere Vermutungen, dass die Gruppe bakterieller Lipopolysaccharide im Bezug auf Rezeptorbindung und –aktivierung weitaus inhomogener ist, als bisher angenommen (Dehus et al., 2006).

Die in dieser Arbeit gemachten Beobachtungen legen weiterhin die Vermutung nahe, dass auch bei *F. nucleatum* ein atypisches LPS vorliegen könnte. Hierfür sind weitere Untersuchungen, insbesondere auch Stimulationen mit aufgereinigtem LPS von *F. nucleatum*, notwendig.

5.3. Stimulation mit inaktivierten Bakterien

In den Experimenten der vorliegenden Arbeit wurden zur Stimulation ganze Bakterienzellen verwendet. Dies geschah unter der Annahme, dass PAMPs komplexe Strukturen sind, die bereits für sich unterschiedliche Stimulationsmuster bedingen können und dabei in Bakterienzellen zusätzlich in unterschiedlicher Menge und Art vorhanden sind. Ziel war es, zu untersuchen, inwiefern sich daher Stimulationsergebnisse mit ganzen Bakterienzellen von denen durch PAMPs unterscheiden.

Zusammenfassend stellt Tabelle 4 eine Übersicht über alle Stimulationsversuche mit Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien dar.

Die Stimulation von Vollblut mit hitzeinaktivierten Gram-positiven Bakterien bewirkte eine Freisetzung von Zytokinen. Die hierbei gemessenen Konzentrationen waren jedoch deutlich geringer als jene nach Einsatz des Referenzstimulus 100 ng/ml *S. Minnesota* LPS oder Gram-negativer Bakterien. Es ließ sich beobachten, dass relativ zur Antwort auf den Stimulus 100 ng/ml *S. Minnesota* LPS bei Stimulation mit Gram-positiven Bakterien die Werte für freigesetztes Interleukin-8 die des produzierten TNF α deutlich übertrafen. Die Stimulationsergebnisse mit Gram-negativen Bakterien auf Vollblut zeigten 3 unterschiedliche Muster der Zytokinfreisetzung: Für *D. pneumosintes*, *C. rectus*, *E. corrodens*, *E. coli*, *S. Minnesota* und *P. aeruginosa* lag die Konzentration von TNF α deutlich höher als jene von IL-8. Die Gram-negativen Bakterien *F. nucleatum* und *P. gingivalis* hingegen zeigten ein Induktionsmuster, welches eher dem von Gram-

positiven Bakterien ähnelte, da die IL-8 Konzentration über der von TNF α lag. Interessanterweise nahmen Bakterien der Gattung *Neisseria* dabei eine Zwischenstellung ein, indem sie ähnliche Mengen an TNF α und IL-8 bildeten. Des Weiteren zeigen *P. intermedia* und *A. actinomycetemcomitans* im Unterschied zu anderen Gram-negativen fast keine Induktion von TNF α oder IL-8. Möglicherweise ist diese Besonderheit der fehlenden Aktivierung der Zytokinfreisetzung und damit der Aktivierung von Immunreaktionen eine Erklärung für die häufige Assoziation mit langwierigen, polymikrobiellen Parodontalinfektionen (Van Dyke et al., 2005).

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass sich Gram-positive und Gram-negative Bakterien im Muster der Zytokinfreisetzung, welche sie bewirken, stark unterscheiden. Auffällig im Rahmen der durchgeführten Untersuchung ist der Befund, dass sich *P. gingivalis* und *F. nucleatum* hierbei kontrovers zu anderen Gram-negativen verhalten und ein Stimulationsmuster ähnlich dem von Gram-positiven zeigen. Mögliche Ursache für das besondere Stimulationsverhalten von *P. gingivalis* und *F. nucleatum* könnten neben strukturellen Besonderheiten des Lipopolysaccharids (Paramonov et al., 2001) extrazelluläre Cysteinproteinasen, sogenannte Gingipains, sein, welche mit den Lipopolysaccharidrezeptor CD14 interagieren und durch Proteolyse zu dessen Verlust führen können, was eine verminderte TNF α -Freisetzung zur Folge haben kann (Duncan et al., 2004; Potempa et al., 2003; Sugawara et al., 2000).

Die Stimulation von Toll-like-Rezeptor-transfizierten HEK-293 Zellen zeigte, dass Gram-positive Bakterien eine NF κ B-Induktion in solchen Zellen bewirkten, die über einen TLR2-Rezeptor verfügten, was im Einklang mit der Zuordnung von LTA als Liganden des TLR2 steht (Schwandner et al. 1999). Hingegen war bei TLR4-transfizierten Zellen keine bedeutende NF κ B-Induktion zu erkennen, was bestätigt, dass Gram-positive Bakterien kaum TLR4-Liganden besitzen, sondern dass vor allem TLR2 aktivierende PAMPs dominieren, welche eher IL-8 als TNF α induzieren. Die meisten Gram-negativen Bakterien hingegen bewirkten sowohl über TLR4 als auch über TLR2 eine Erhöhung des intrazellulären NF κ B, was für TLR4 durch das bakterielle LPS, für TLR2 durch bakterielles Peptidoglykan hervorgerufen sein kann (Schwandner et al. 1999). Abweichend davon konnte hier gezeigt werden, dass *P. gingivalis* eine deutlich verminderte, *A. actinomycetemcomitans* sogar keine messbare NF κ B-Induktion durch Stimulation von TLR4 hervorrufen konnte, wobei beide Bakterien über den TLR2 deutlich höhere NF κ B-Werte als andere Gram-negative Bakterien erzielten. Dies

bestätigt die Besonderheit des LPS von *P. gingivalis*, dass Affinität zu TLR2 und TLR4 aufweist (Darveau et al., 2004; Ogawa et al., 2002). Die besonders hohen Werte bei der Stimulation von TLR2-transfizierten Zellen könnten auf einen additiven Effekt der Stimulationswirkung von *P. gingivalis* LPS und Peptidoglykan zurückzuführen sein. Die Unterschiede im Ausmaß der Stimulation via TLR4 bestätigen die These, dass bakterielle Lipopolysaccharide infolge struktureller Unterschiede auch verschiedene Stimulationsfähigkeiten aufweisen (Dehus et al., 2006).

Mauszellen mit einem Defekt des TLR2 zeigten im Vergleich zu Wildtypzellen eine Verminderung der TNF α -Produktion, wenn sie mit Gram-positiven Bakterien stimuliert wurden. Jedoch zeigte sich, außer für *D. pneumosintes* und *P. aeruginosa*, auch bei Stimulation mit Gram-negativen Bakterien eine Verminderung der TNF α -Freisetzung in Zellen mit Rezeptordefekt im Vergleich zu Zellen ohne Defekt des TLR2. Dies bestätigt, dass sowohl Gram-positive als auch Gram-negative Bakterien Bestandteile enthalten, welche über TLR2 eine Zytokinfreisetzung bewirken. Bei Gram-positiven Bakterien ist LTA als Ligand des TLR2 beschrieben (Schwandner et al. 1999). Als Erklärung für die verminderte TNF α -Freisetzung in TLR2^{-/-}-Zellen nach Stimulation mit Gram-negativen bleibt Peptidoglykan, welches in geringer Menge auch in Gram-negativen Bakterien vorkommt, oder atypische Lipopolysaccharide. Beide sind als Liganden am TLR2 beschrieben worden (Schwandner et al. 1999; Hirschfeld et al., 2001; Werts et al., 2001). Im Gegensatz zu der Beobachtung, dass *P. aeruginosa* LPS TLR2 zur Signalübertragung nutzt (Erridge et al., 2004), zeigte sich beim Einsatz von *P. aeruginosa* als Ganzkeim eine höhere Aktivität in Zellen, die über keinen funktionsfähigen TLR2 verfügten. In Mauszellen, die eine Mutation des TLR4 aufweisen, zeigte sich bei Stimulation mit Gram-negativen Bakterien eine deutlichere Reduktion der TNF α -Freisetzung als dies bei Stimulation mit Gram-positiven der Fall war. *P. gingivalis* zeigte jedoch unabhängig von der Mutation des Rezeptors eine vergleichbare TNF α -Freisetzung. Für *F. nucleatum* ließ sich eine relative Unabhängigkeit vom TLR4 beobachten.

Diese Ergebnisse zeigen, dass bei Stimulation mit ganzen Bakterien aufgrund unterschiedlicher PAMPs auch dann immunstimulatorische Effekte zu beobachten sind, wenn keine funktionsfähigen TLR2 bzw. TLR4 vorliegen. Dies mag daran liegen, dass die hierbei gemessene Antwort eine Summation der Aktivierung verschiedener Toll-like Rezeptoren und der daraus resultierenden Genexpression ist (Nau et al., 2003). Jedoch sind die Aussagemöglichkeiten hierzu begrenzt, da aufgrund des Vorhandenseins

mehrerer funktionsfähiger Rezeptoren und Liganden im Testsystem, keine klare Aussage zur Aktivierung und/oder Blockade von einzelnen Signaltransduktionswegen möglich ist.

5.4. Periodontopathogene Bakterien

In dieser Arbeit wurden vorwiegend Parodontitis-assoziierte Erreger eingesetzt, welche in der Mundhöhle über lange Zeit persistieren können. Die Ergebnisse der durchgeführten Versuche geben Hinweise dafür, dass eine verminderte Aktivierung des Immunsystems Ursache dafür sein kann, dass es zu keiner erfolgreichen Abwehr dieser Erreger kommt. Eine verzögerte oder fehlende Abwehr jedoch, ermöglicht eine lang anhaltende, chronisch fortschreitende Destruktion des Zahnhalteapparats, die bei Parodontitis zu beobachten ist.

Es konnte beobachtet werden, dass *P. gingivalis* und *F. nucleatum* keine Aktivierung des Immunsystems über TLR4 hervorrufen. Damit entziehen sie sich einem der potentesten Erkennungs- und Abwehrmechanismen des angeborenen Immunsystems gegen Gram-negative Erreger. *P. gingivalis* scheint darüber hinaus sogar die Fähigkeit zu besitzen, die IL-1 α Induktion durch andere Bakterien zu antagonisieren. Es wird vermutet, dass dieser Effekt durch das atypische LPS hervorgerufen wird (Bostanci et al., 2007). Ebenso können durch eine verminderte Abwehr von *P. gingivalis* durch geringere Aktivierung des Immunsystems andere Pathogenitätsfaktoren, wie Fimbrien, von *P. gingivalis* zur Geltung kommen und somit die Adhäsion, Invasion und Schädigung gingivaler Zeller ermöglichen (Amano, 2007).

Des Weiteren zeigte sich, dass Gram-positive Bakterien generell eine geringe Aktivierung des Immunsystems durch Zytokinfreisetzung und TLR-Aktivierung hervorrufen. Interessanterweise zeigten auch *P. gingivalis* und *F. nucleatum* ein Zytokininduktionsmuster, das dem von Gram-positiven Bakterien ähnelt: Die relative TNF α Freisetzung ist niedriger als bei Gram-negativen Bakterien, was ebenfalls ein Überleben dieser Bakterien in der Mundhöhle begünstigt.

Die Gram-negativen Bakterien *A. actinomycetemcomitans* und *P. intermedia*, welche ebenfalls eine besondere Bedeutung im Rahmen parodontaler Erkrankungen besitzen, zeigten im Gegensatz zu den übrigen, stark immunstimulatorischen Gram-negativen Bakterien keine Zytokinfreisetzung bei Stimulation von humanem Vollblut.

Die große und heterogene Gruppe der Parodontitis-assoziierten Erreger zeigt große Unterschiede bei der Aktivierung von Toll-like Rezeptoren und Zytokinfreisetzung. Diese Heterogenität ist vermutlich eine wichtige Voraussetzung der Persistenz dieser chronischen, polymikrobiellen Infektion. Insbesondere die Interaktion der Evasionsmethoden dieser Bakteriengruppe erfordert weitergehende Untersuchungen.

6. Schlussfolgerungen

Die Ergebnisse dieser Arbeit konnten zeigen, dass ein System auf Vollblutbasis geeignet ist, die Zytokinproduktion nach Stimulation mit thermisch inaktivierten, oral-pathogenen Bakterien zu messen. Dabei können reproduzierbare Ergebnisse gewonnen werden, welche bei relativer Betrachtung zu einem Referenzstimulus gut vergleichbar sind.

In diesem System haben Gram-negative oral-pathogene Bakterien eine höhere Potenz zur Zytokinfreisetzung (TNF α , IL-8) als Gram-positive Bakterien. Bei relativer Betrachtung bewirken Gram-positive Bakterien eine stärkere Freisetzung von IL-8 als TNF α , dies ist bei Gram-negativen Bakterien umgekehrt. Die Ursache hierfür ist in der mangelnden Fähigkeit des TLR-Liganden LTA zur TNF α -Freisetzung zu vermuten. Die Stimulation der Produktion von IL-8 durch *S. Minnesota* LPS und *S. aureus* LTA ist vergleichbar, wohingegen nur *S. Minnesota* LPS, nicht aber LTA die Freisetzung von TNF α bewirkt.

Die Zuordnung von PAMPs zu den TLR konnte in dieser Arbeit bestätigt werden: Typische LPS-Moleküle wie von *S. Minnesota* bewirken eine prädominante Signaltransduktion über TLR4, nicht aber über TLR2. Lipoteichonsäure nutzt TLR2 und nicht TLR4 zur Signalübertragung. Damit korrelierend zeigte sich, dass Gram-positive Bakterien v.a. über TLR2, nicht aber über TLR4 eine NF κ B-Induktion bewirken, da sie über keinen Liganden für TLR4 verfügen. Gram-negative Bakterien hingegen besitzen Liganden sowohl für TLR2 als auch für TLR4.

Weiterhin konnte beobachtet werden, dass die Gram-negativen Bakterien *P. gingivalis* und *F. nucleatum* eine Sonderstellung einnehmen: Beim Einsatz in Vollblut, zeigte sich relativ eine höhere Freisetzung von IL-8 als TNF α , so wie dies sonst bei Stimulation mit Gram-positiven zu beobachten war. *P. gingivalis* LPS kann sowohl über TLR2 als auch über TLR4 eine NF κ B-Induktion bewirken, wobei diese bei transfizierten HEK-293 Zellen via TLR2 stärker als über TLR4 erfolgte. Damit übereinstimmend zeigte die reduzierte, jedoch nicht komplett aufgehobene Zytokinfreisetzung aus Zellen mit TLR2- bzw. TLR4-Defekt nach Stimulation mit *P. gingivalis* LPS, dass dieses Affinität und Aktivität an beiden TLRs besitzt. Als Ursache für dieses besondere Verhalten ist das atypische Lipopolysaccharid von *P. gingivalis* anzusehen.

Bakterien, welche an einer chronischen Besiedlung der Mundhöhle und Parodontalerkrankungen beteiligt sind, zeigen unterschiedliche Muster der TNF α - und IL-8-Freisetzung sowie unterschiedliche Stimulation von TLRs. Für einige oral-pathogene Bakterien, wie *P. gingivalis*, *F. nucleatum*, *A. actinomycetemcomitans* und *P. intermedia*, wurden Besonderheiten beobachtet, die zu einer reduzierten Aktivierung von Abwehrmechanismen in der Mundhöhle führen können und den genannten Bakterien somit einen Überlebensvorteil sichern können.

7. Anhang

7.1. Abbildungen

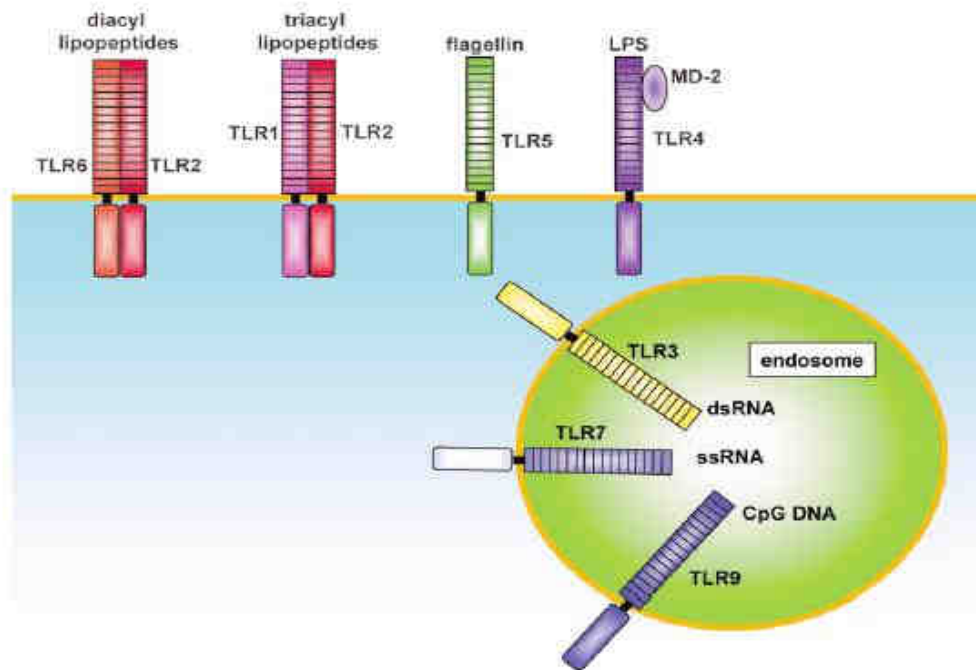


Abb. 1: Multimerisation, Lokalisation und Liganden von Toll-like-Rezeptoren.

Quelle:

Takeda K, Akira S. Toll-like receptors in innate immunity. Int. Immunol. 2005 17(1); 1-14, Fig. 1, p2

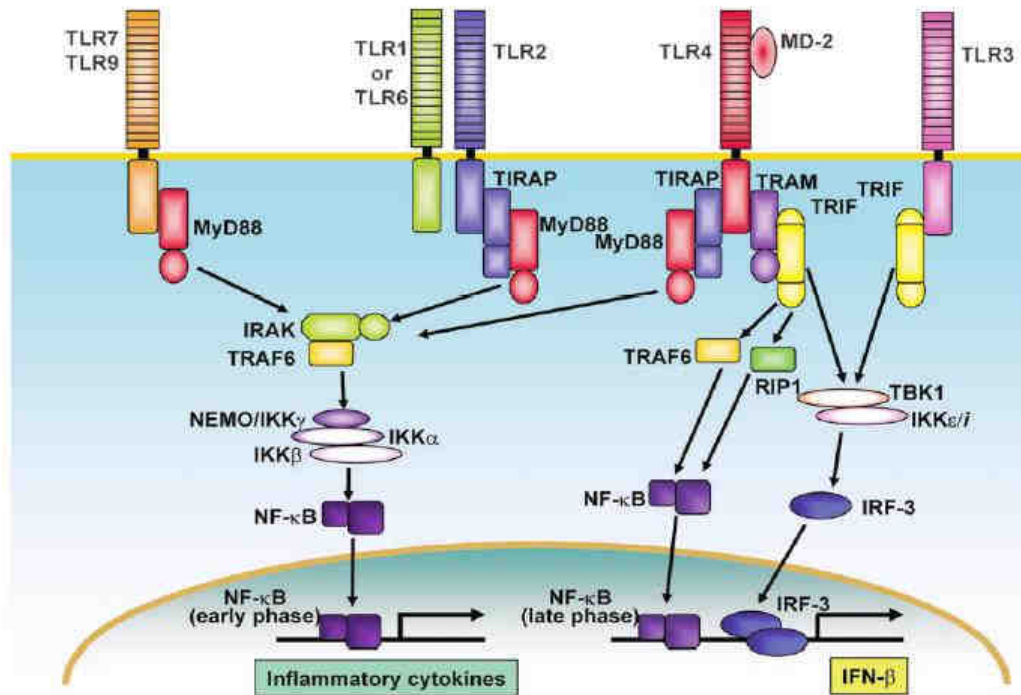
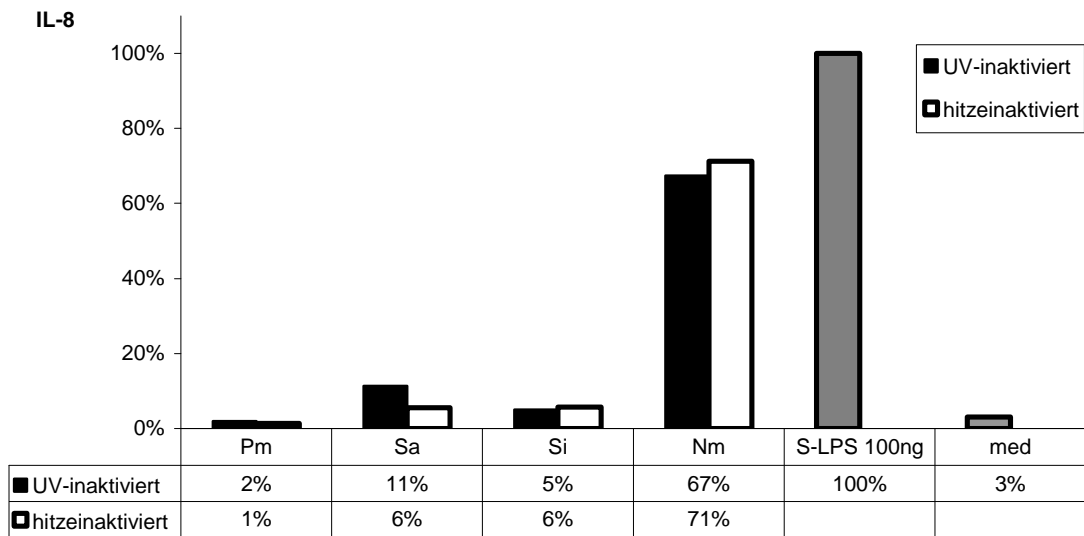


Abb. 2: Signalwege der Toll-like-Rezeptoren.

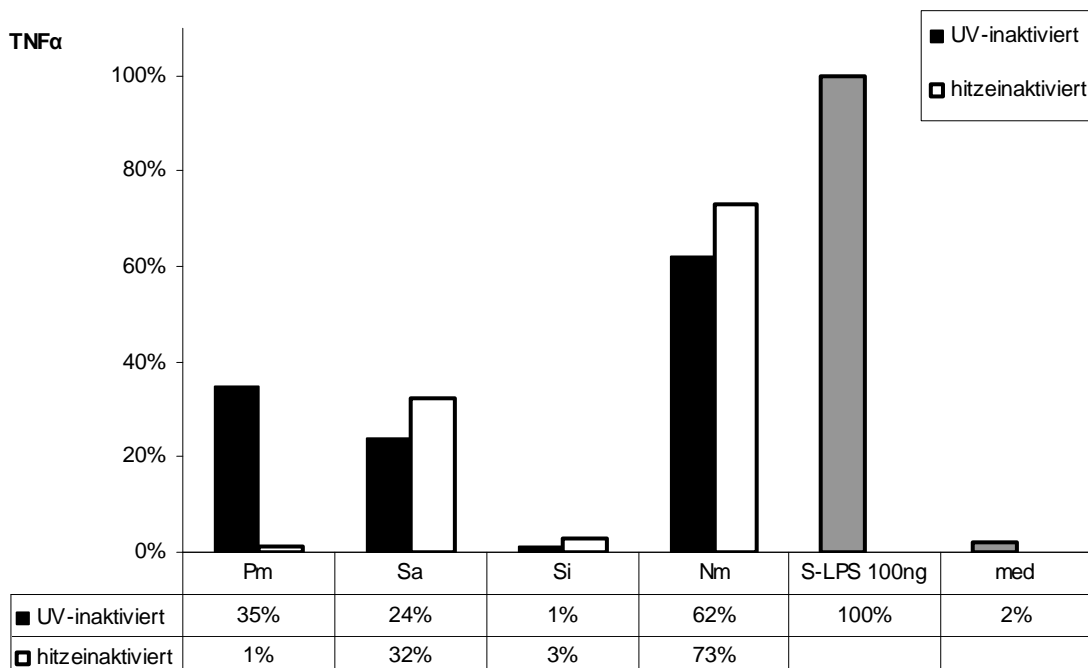
Quelle:

Takeda K, Akira S. Toll-like receptors in innate immunity. *Int. Immunol.* 2005 17(1); 1-14, Fig. 4, p7

7.2. Grafiken



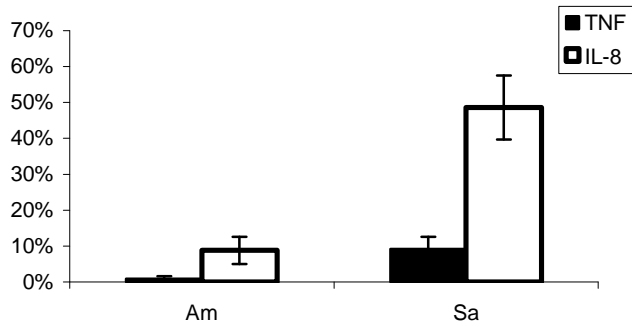
Grafik 1: Die angegebenen Bakterien wurden in einer Konzentration von 10^9 KBE/ml hitze- oder UV-inaktiviert und anschließend einmalig im Vollblutsystem getestet (Stimulation mit 10^6 KBE/ml). Bestimmt wurde IL-8 im Überstand, es erfolgte eine Normierung auf LPS-Stimulation.



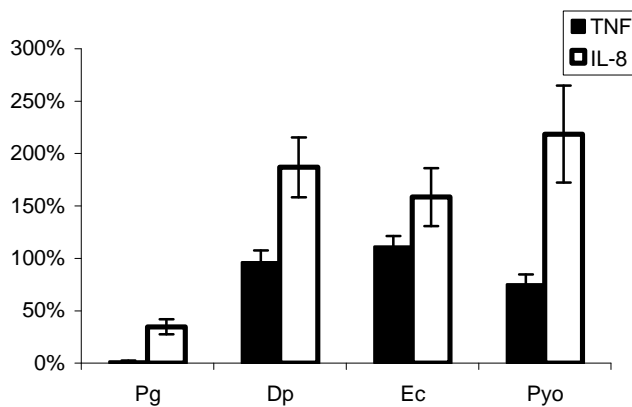
Grafik 2: Die angegebenen Bakterien wurden in einer Konzentration von 10^9 KBE/ml hitze- oder UV-inaktiviert und anschließend einmalig im Vollblutsystem getestet (Stimulation mit 10^6 KBE/ml). Bestimmt wurde TNF α im Überstand, es erfolgte eine Normierung auf LPS-Stimulation.

Grafik 3.1 – 3.3:

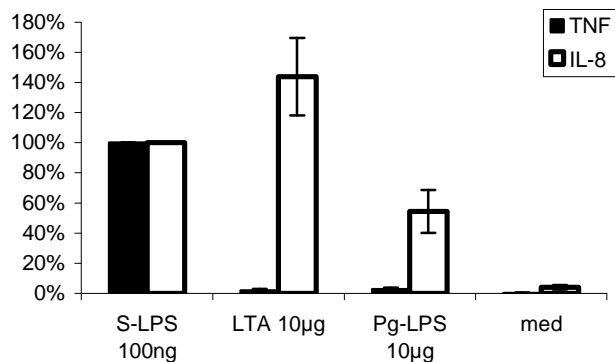
Vollblut von 6 verschiedenen Spendern wurde mit 10^6 KBE/ml der angegebenen Bakterien stimuliert. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardfehler des Mittelwertes (SEM) nach Normierung auf 100 ng/ml LPS. Die Abbildungen zeigen einen von drei Versuchen, die gleichartige Ergebnisse lieferten.



Grafik 3.1: : Stimulation von Vollblut verschiedener Spender (n=6) mit Gram-positiven Bakterien (hitzeinaktiviert).



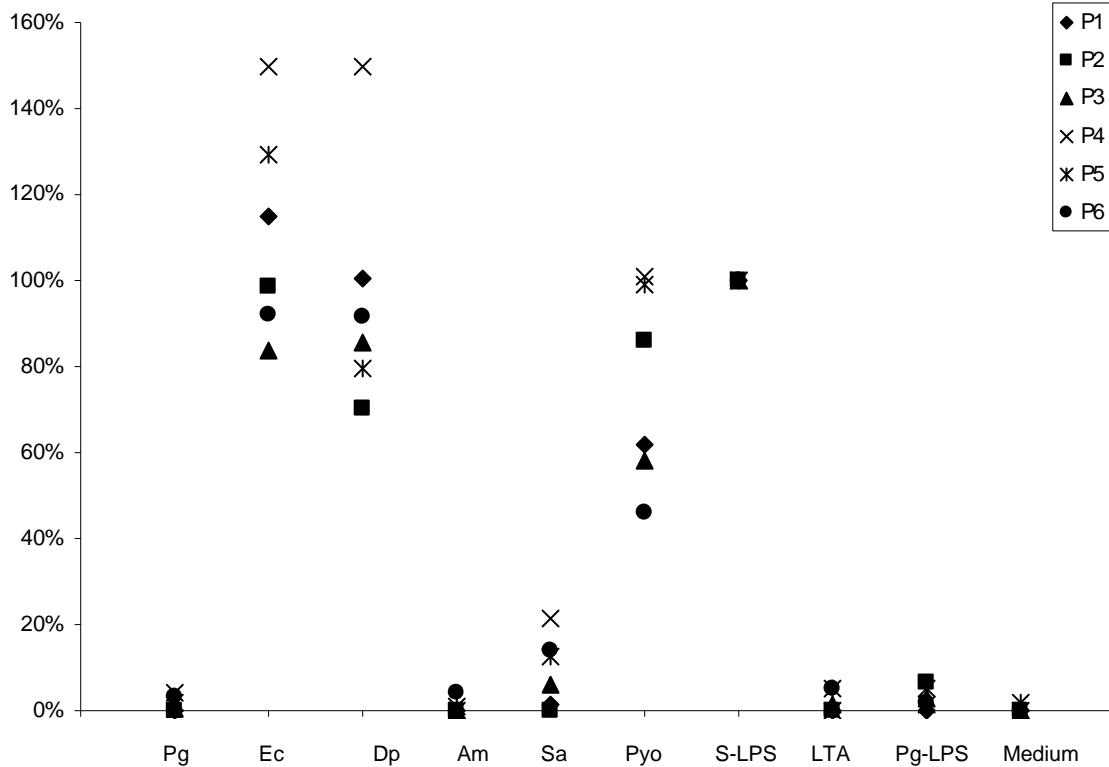
Grafik 3.2: Stimulation von Vollblut verschiedener Spender (n=6) mit Gram-negativen Bakterien (hitzeinaktiviert).



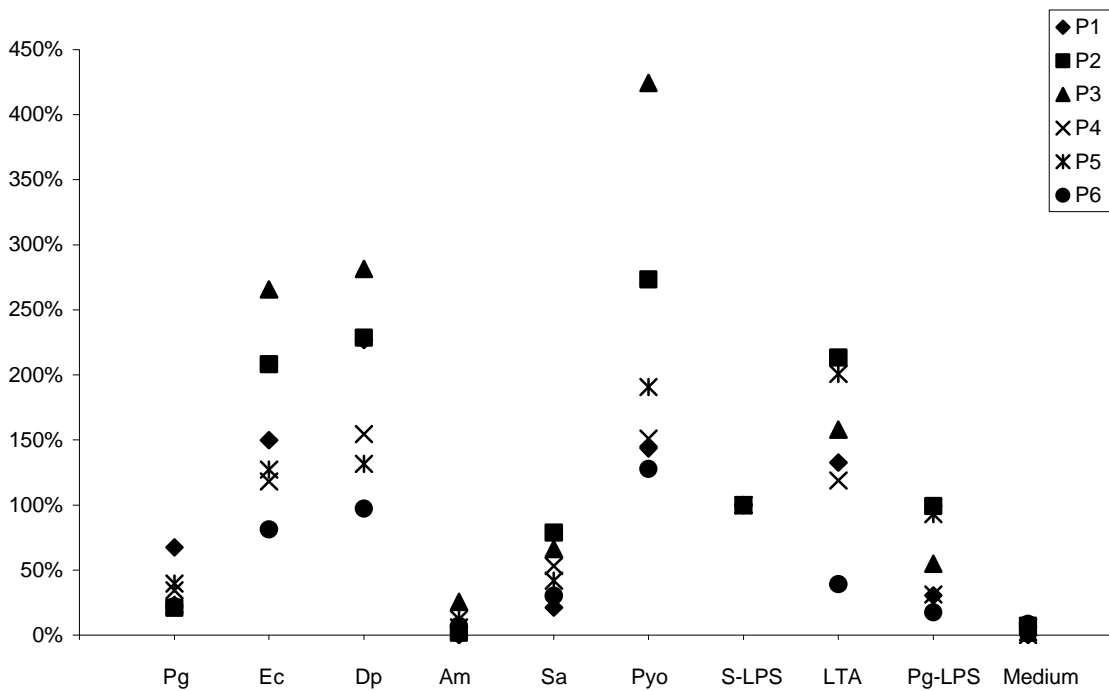
Grafik 3.3: Stimulation von Vollblut verschiedener Spender (n=6) mit Kontrollstimuli.

Grafik 3.4 – 3.5:

Vollblut von 6 verschiedenen Spendern wurde mit 10^6 KBE/ml der angegebenen Bakterien stimuliert. Dargestellt sind die für die Spender (P1-6) gemessenen Einzelwerte nach Normierung auf 100 ng/ml LPS. Gezeigt ist einer von 3 Versuchen, welche gleichartige Ergebnisse lieferten.



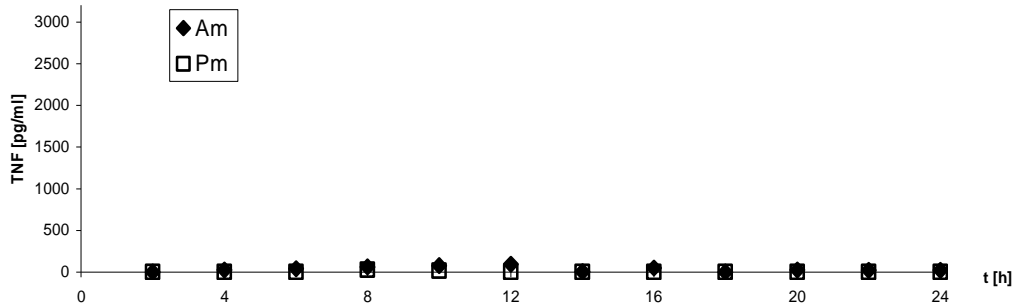
Grafik 3.4: Freisetzung von TNFα nach Stimulation von Vollblut unterschiedlicher Spender (P1-6)



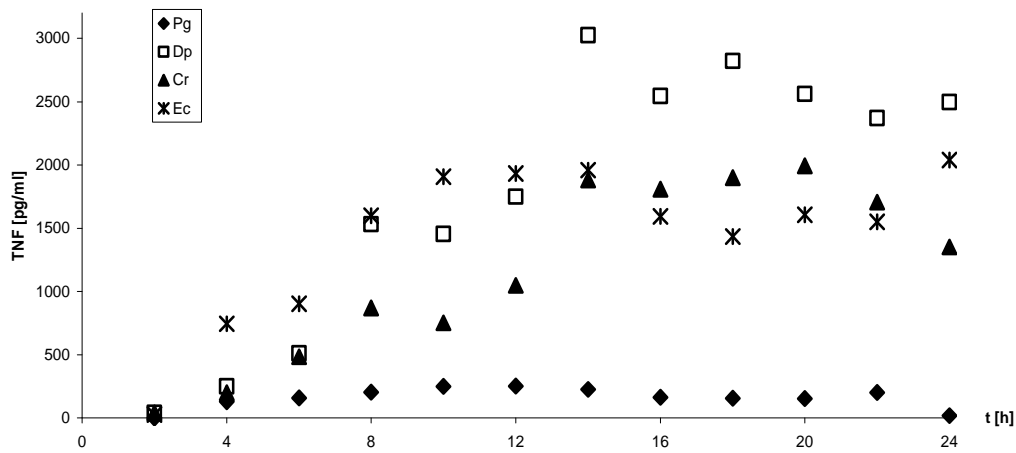
Grafik 3.5: Freisetzung von IL-8 nach Stimulation von Vollblut unterschiedlicher Spender (P1-6)

Grafik 4.1 – 4.3:

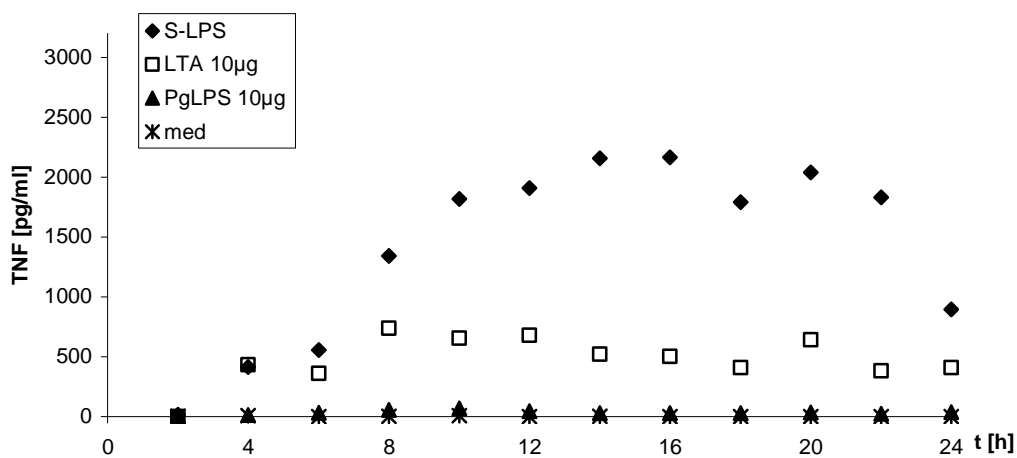
Humanes Vollblut wurde mit 10^6 KBE/ml hitzeinaktivierten Bakterien inkubiert und alle 2 Stunden die Konzentration von TNF α im Stimulationsüberstand bestimmt.



Grafik 4.1: Zeitlicher Verlauf der Freisetzung von TNF α nach Stimulation mit Gram-positiven Bakterien



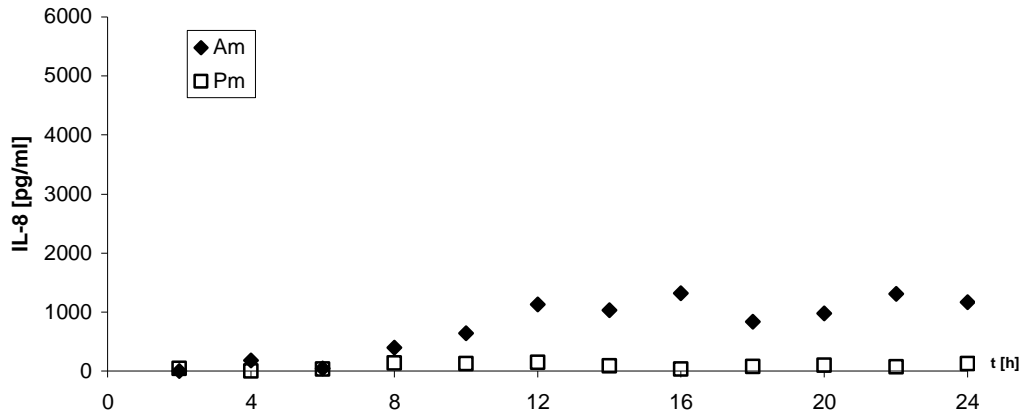
Grafik 4.2: Zeitlicher Verlauf der Freisetzung von TNF α nach Stimulation mit Gram-negativen Bakterien



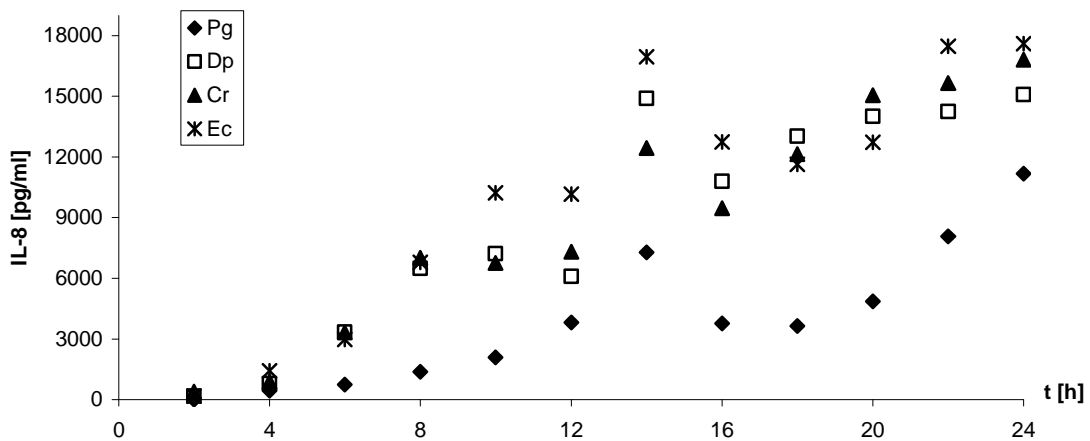
Grafik 4.3: Zeitlicher Verlauf der Freisetzung von TNF α nach Stimulation mit Kontrollstimuli

Grafik 5.1 – 5.3:

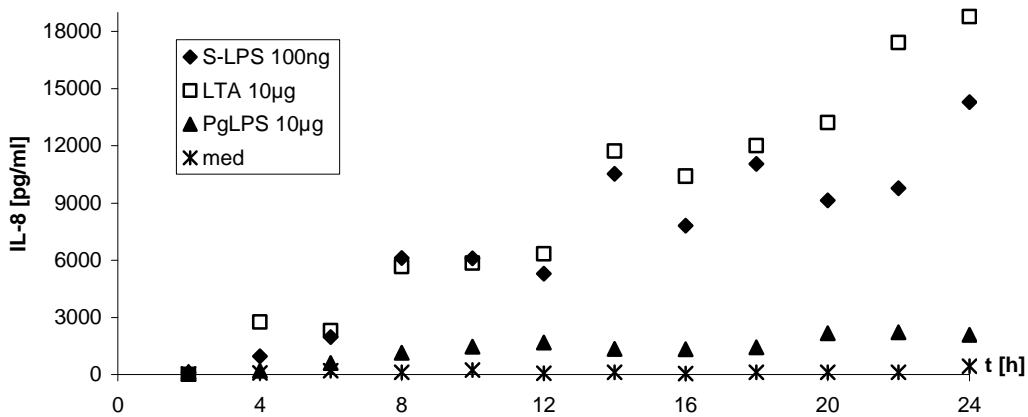
Humanes Vollblut wurde mit 10^6 KBE/ml hitzeinaktivierten Bakterien inkubiert und alle 2 Stunden die Menge von IL-8 im Stimulationsüberstand bestimmt.



Grafik 5.1: Zeitlicher Verlauf der Freisetzung von IL-8 nach Stimulation mit Gram-positiven Bakterien



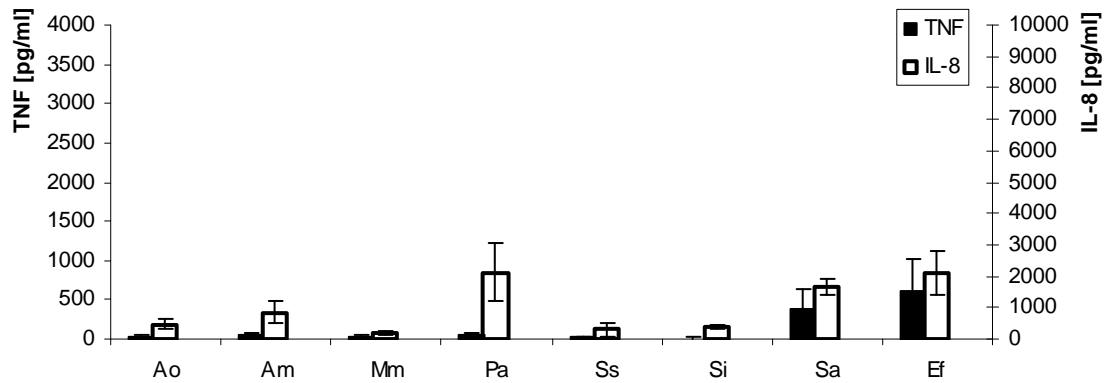
Grafik 5.2: Zeitlicher Verlauf der Freisetzung von IL-8 nach Stimulation mit Gram-negativen Bakterien



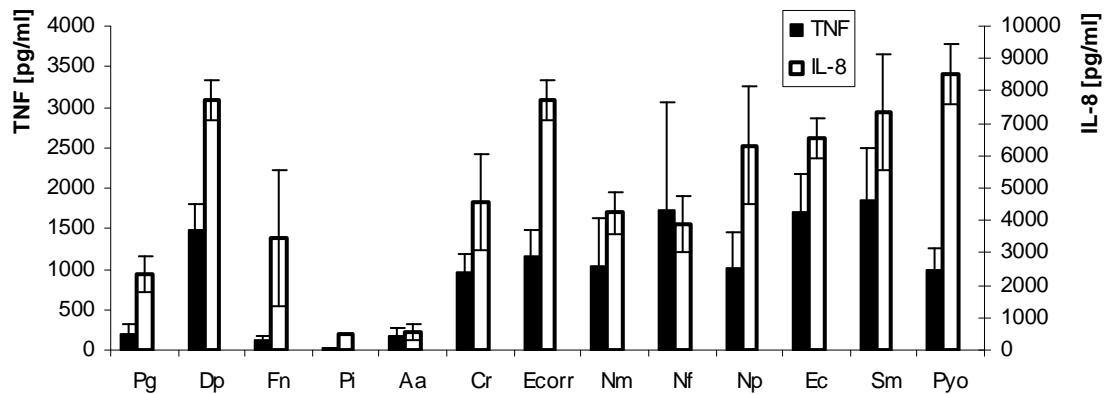
Grafik 5.3: Zeitlicher Verlauf der Freisetzung von IL-8 nach Stimulation mit Kontrollstimuli

Grafik 6.1 – 6.3

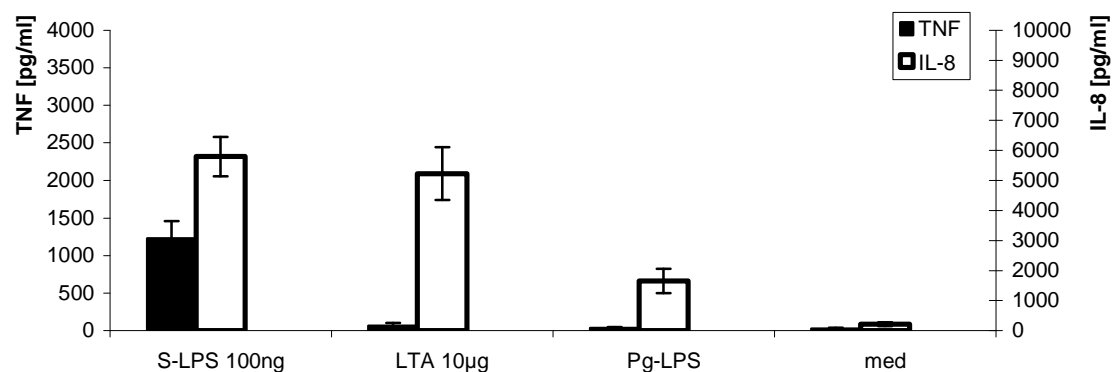
Humanes Vollblut wurde mit 10^6 KBE/ml hitzeinaktivierten Bakterien stimuliert und nach 22stündiger Inkubation die Zytokinkonzentration im Überstand bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardfehler des Mittelwertes (SEM) mehrerer Versuche, die Anzahl der jeweils durchgeführten Versuche ist Tabelle 2 zu entnehmen.



Grafik 6.1 TNF α und IL-8 Freisetzung nach Stimulation mit Gram-positiven Bakterien.



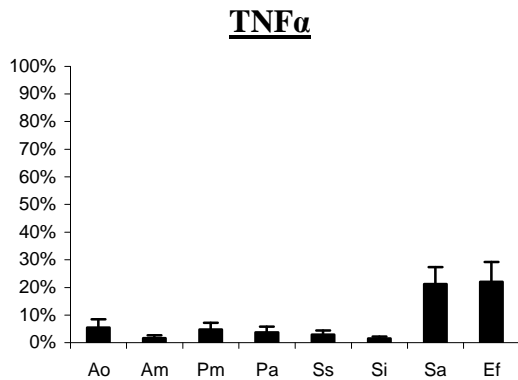
Grafik 6.2: TNF α und IL-8 Freisetzung nach Stimulation mit Gram-negativen Bakterien.



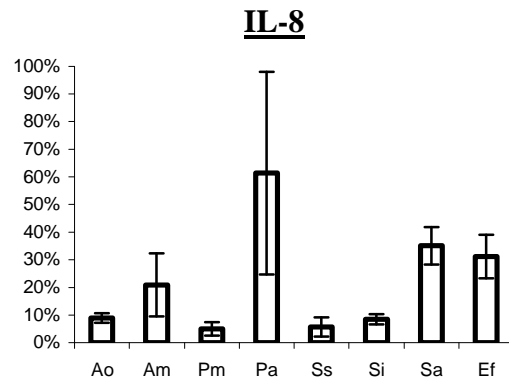
Grafik 6.3: TNF α und IL-8 Freisetzung nach Stimulation mit Kontrollstimuli.

Grafik 7.1 – 7.6

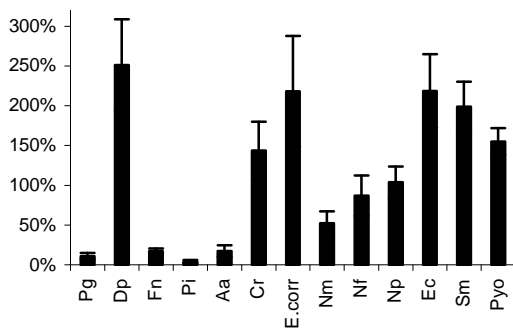
Humanes Vollblut wurde mit 10^6 KBE/ml hitzeinaktivierten Bakterien stimuliert und nach 22stündiger Inkubation wurden die Zytokinkonzentration im Überstand bestimmt. Anschließend erfolgte die Normierung an 100 ng/ml S-LPS. Dargestellt sind die Ergebnisse mehrerer Versuche als Mittelwert und Standardfehler des Mittelwertes (SEM), wobei die Anzahl der jeweils durchgeführten Versuche Tabelle 2 zu entnehmen ist.



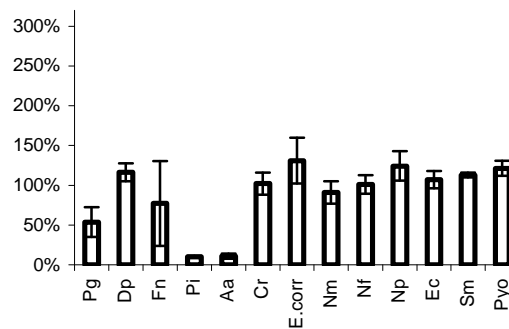
Grafik 7.1: Gram-positive Bakterien



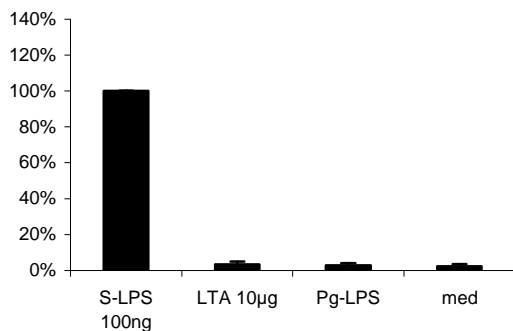
Grafik 7.2: Gram-positive Bakterien



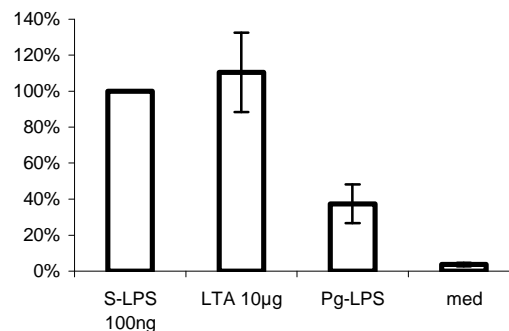
Grafik 7.3: Gram-negative Bakterien



Grafik 7.4: Gram-negative Bakterien



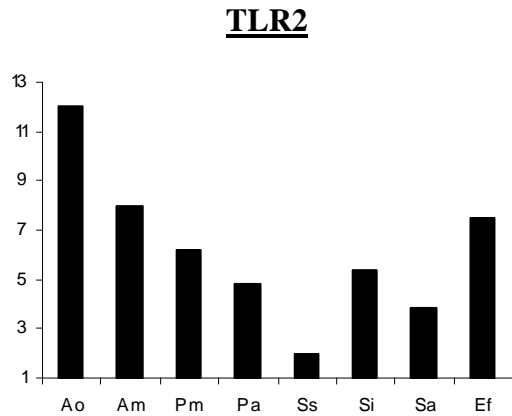
Grafik 7.5: Kontrollstimuli



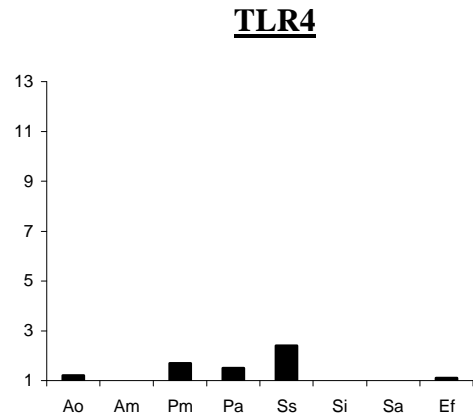
Grafik 7.6: Kontrollstimuli

Grafik 8.1 – 8.6

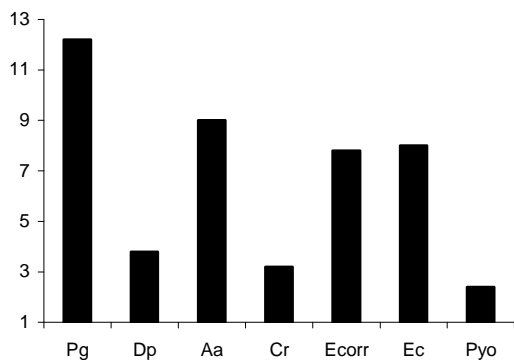
HEK-293 Zellen wurden mit TLR2 bzw. TLR4 (plus Kofaktor MD2) sowie einem NFκB-Reporterplasmid transfiziert. Anschließend wurden $2,5 \cdot 10^5$ Zellen pro well mit 10^6 KBE/ml Bakterien bzw. Kontrollstimuli inkubiert (6 Stunden, 37°C und 5% CO₂). Es erfolgte die Messung der NFκB-Induktion mithilfe eines Reporterassays. Die Abbildungen zeigen den Induktionsfaktor, dargestellt ist einer von 3 unabhängigen Versuchen mit gleichartigen Ergebnissen.



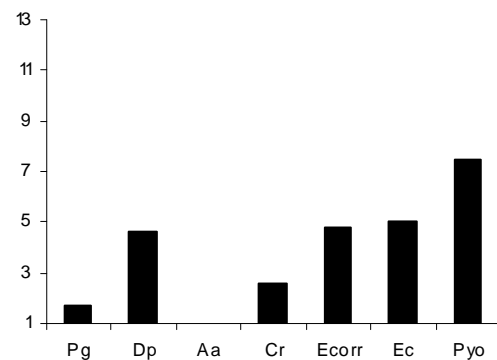
Grafik 8.1: Gram-positive Bakterien



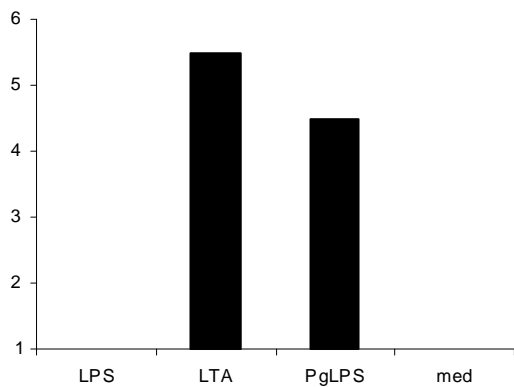
Grafik 8.2: Gram-positive Bakterien



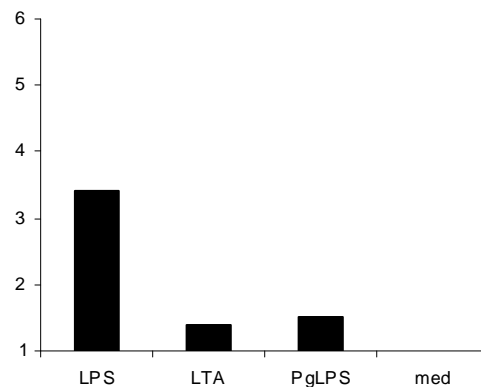
Grafik 8.3: Gram-negative Bakterien



Grafik 8.4: Gram-negative Bakterien



Grafik 8.5: Kontrollstimuli



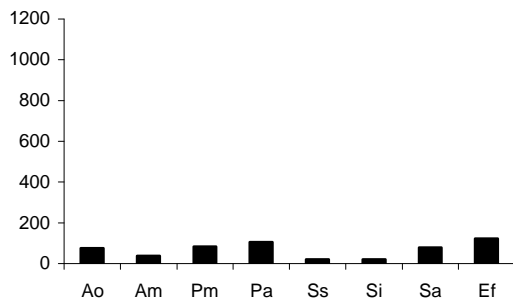
Grafik 8.6: Kontrollstimuli

Grafik 9.1 – 9.6

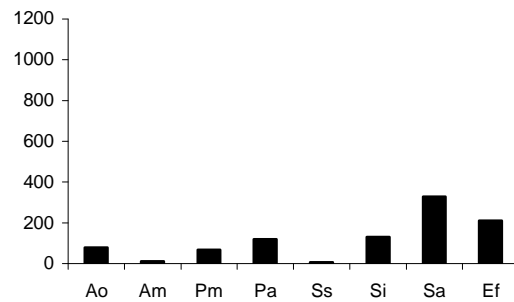
Mausperitonealmakrophagen ($1,5 \cdot 10^5$ Zellen/well) von Mäusen mit TLR2-knockout (TLR2^{-/-}) bzw. von Mäusen mit funktionsfähigem TLR2 (Wildtyp) wurden mit 10^6 KBE/ml hitzeinaktivierten Bakterien und Kontrollstimuli 22h inkubiert (37°C, 5% CO₂). Anschließend wurde mittels ELISA TNFα (pg/ml) im Stimulationsüberstand bestimmt.

TLR2^{-/-}

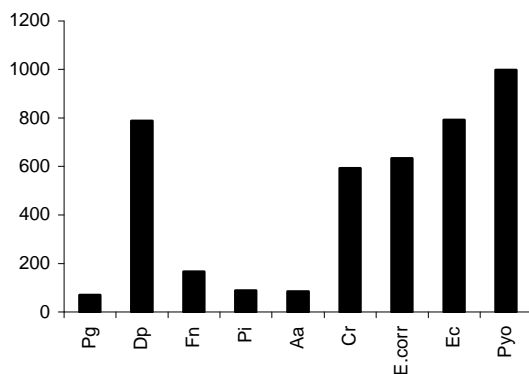
Wildtyp



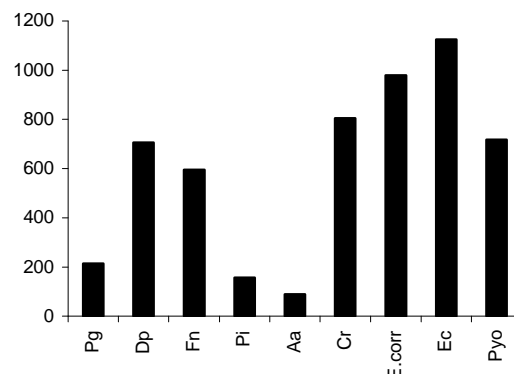
Grafik 9.1: Gram-positive Bakterien



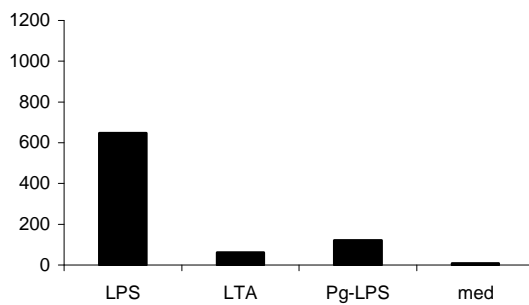
Grafik 9.2: Gram-positive Bakterien



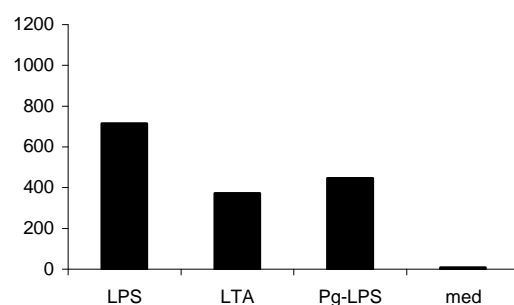
Grafik 9.3: Gram-negative Bakterien



Grafik 9.4: Gram-negative Bakterien



Grafik 9.5: Kontrollstimuli



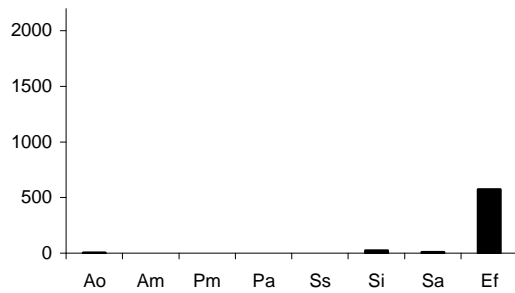
Grafik 9.6: Kontrollstimuli

Grafik 10.1 – 10.6

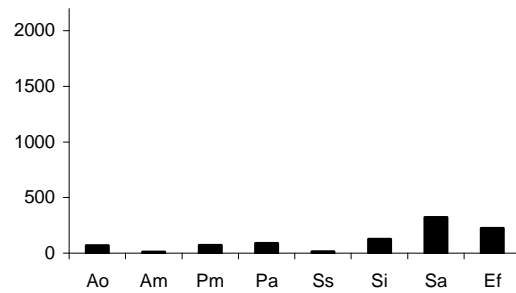
Mausperitonealmakrophagen ($1,5 \cdot 10^5$ Zellen/well) von Mäusen mit einer Mutation in einem TLR4-Allel (C3H/HeJ) bzw. von Mäusen ohne diese Mutation (C3H/HeN) wurden mit 10^6 KBE/ml hitzeinaktivierten Bakterien und Kontrollstimuli 22h inkubiert (37°C, 5% CO₂). Anschließend wurde mittels ELISA TNF α (pg/ml) im Stimulationsüberstand bestimmt.

C3H/HeJ

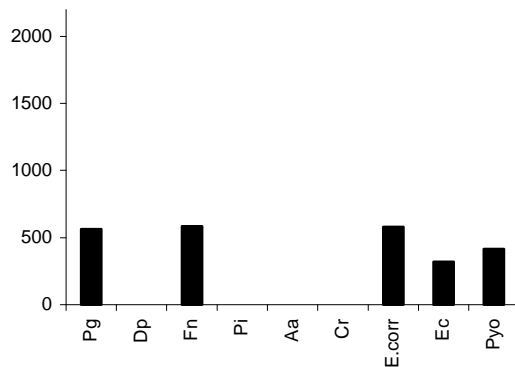
C3H/HeN



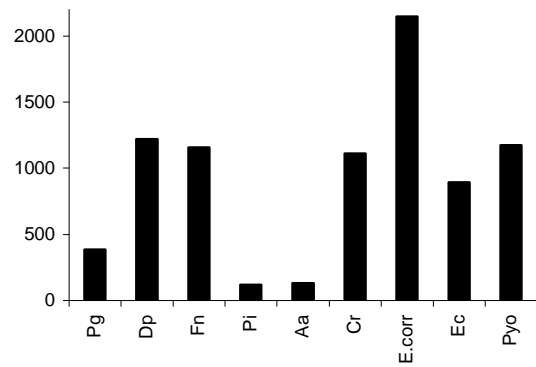
Grafik 10.1: Gram-positive Bakterien



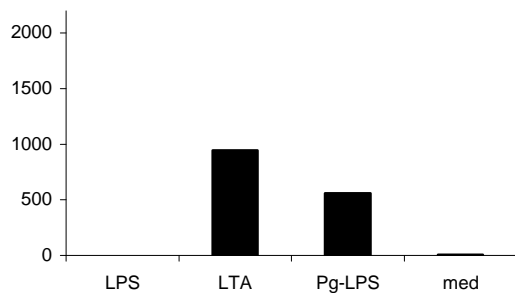
Grafik 10.2: Gram-positive Bakterien



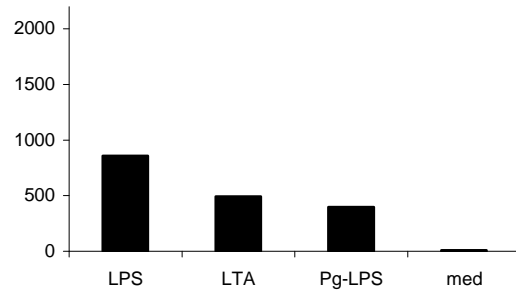
Grafik 10.3: Gram-negative Bakterien



Grafik 10.4: Gram-negative Bakterien



Grafik 10.5: Kontrollstimuli



Grafik 10.6: Kontrollstimuli

7.3. Tabellen

Rezeptor	Ligand	Herkunft des Liganden	Referenz
TLR1	Triacyl-Lipopeptide lösliche Faktoren	Bakterien, Mykobakterien <i>Neisseria meningitidis</i>	Takeuchi et al., 2002 Wyllie et al., 2000
TLR2	LTA atypisches LPS atypisches LPS	Gram-positive Bakterien <i>Leptospira interrogans</i> <i>Porphyromonas gingivalis</i>	Lehner et al. 2001 Werts et al., 2001 Hirschfeld et al., 2001
TLR3	ds-RNA	Viren	Alexopoulou et al., 2001
TLR4	LPS	Gram-negative Bakterien	Poltorak et al., 1998
TLR5	Flagellin	Bakterien	Hayashi et al., 2001
TLR6	Diacyl-Lipopeptide Zymosan	Mykoplasmen Pilze	Takeuchi et al., 2001 Ozinsky et al., 2000
TLR7	ss-RNA	Viren	Heil et al., 2004; Diebold et al., 2004
TLR8	ss-RNA	Viren	Heil et al., 2004
TLR9	CpG-DNA	Bakterien, Viren	Hemmi et al., 2000
TLR10	unklar	unklar	

Tabelle 1: Übersicht über humane TLRs und deren Liganden.

	S-LPS	LTA	Pg-LPS	med
TNF	21	11	10	21
IL-8	14	10	10	14

	Ao	Am	Pm	Pa	Ss	Si	Sa	Ef
TNF	7	10	12	7	8	9	15	4
IL-8	2	11	4	3	3	5	11	3

	Pg	Dp	Fn	Pi	Aa	Cr	Ecorr	Nm	Nf	Np	Ec	Sm	Pyo
TNF	18	10	10	10	11	7	7	5	3	7	8	3	8
IL-8	10	5	2	2	2	3	3	5	3	2	6	3	5

Tabelle 2: Anzahl der Versuche, auf deren Grundlage Mittelwerte und Streumaße für Grafik 6.1, 6.2 und 6.3, sowie 7.1, 7.2, 7.3, 7.4, 7.5 und 7.6 berechnet wurden.

	TNFα aus Vollblut	IL-8 aus Vollblut	Stimulation via TLR2	Stimulation via TLR4	TNFα bei TLR2-ko	TNFα bei TLR4-ko
S-LPS	+++	+++	–	+++	↔	↓↓↓
Pg-LPS	–	+	+++	–	↓	↔
LTA	–	+++	+++	–	↓	↔

Tabelle 3: Ausmaß der Zytokinfreisetzung aus Vollblut, NF κ B-Aktivierung bei Stimulation TLR-transfizierter HEK-293 Zellen, Auswirkungen von Rezeptormutationen auf die TNF α Freisetzung im Vergleich zu Wildtypzellen.

	TNFα aus Vollblut	IL-8 aus Vollblut	Stimulation via TLR2	Stimulation via TLR4	TNFα bei TLR2-ko	TNFα bei TLR4-ko
Gram-negativ	+++	+++	+	+++	↔	↓/↓↓↓
Gram-positiv	–	+	+++	–	↔	↔
<i>P. gingivalis</i>	–	++	+++	–	↓	↔
<i>F. nucleatum</i>	–	++			↓	(↓)

Tabelle 4: Ausmaß der Zytokinfreisetzung aus Vollblut, NF κ B-Aktivierung bei Stimulation TLR-transfizierter HEK-293 Zellen, Auswirkungen von Rezeptormutationen auf die TNF α Freisetzung im Vergleich zu Wildtypzellen.

8. Abkürzungsverzeichnis

Aa	<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>
Am	<i>Actinomyces meyeri</i>
Ao	<i>Actinomyces odontolyticus</i>
AP	Adulte Parodontitis
AP1	Activator protein 1
APC	Antigen presenting cell
Aqua dest.	Aqua destillata
ATCC	American type culture collection
CCUG	Culture Collection, University of Göteborg, Sweden
CD	Clusters of differentiation
Cr	<i>Campylobacter rectus</i>
CSR	Class switch recombination
Dp	<i>Dialister pneumosintes</i>
Ec	<i>Escherichia coli</i>
Ecorr	<i>Eikenella corrodens</i>
Ef	<i>Enterococcus faecalis</i>
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
FCS	Fetales Kälberserum
Fn	<i>Fusobacterium nucleatum</i>
Foxp3	Forkhead box protein 3
G-CSF	Granulocyte colony-stimulating factor
GFP	Green fluorescent protein
GM-CSF	Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
HEK	Human embryonic kidney
HRP	Horse-radish peroxidase, Meerrettichperoxidase
Hsp	Hitzeschockprotein
IFN	Interferon
IKK	IκB-Kinase
IL	Interleukin
IPEX	Immunodysregulation, Polyendocrinopathy, Enteropathy, X-linked
IRAK	IL-1R-associated kinase
IRF	Interferon regulatory factor

KBE	Koloniebildende Einheiten
LJP	Lokalisierte juvenile Parodontitis
LPS	Lipopolysaccharid
LTA	Lipoteichonsäure
MAL	MyD88 adapter like
MAMP	Microbial associated molecular pattern
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MASP	Mannose-binding lectin-associated serine protease
MBP	Mannose binding protein
MCCM	Medical Culture Collection Marburg
med	Medium (Stimulus zur Negativkontrolle)
MHC	Major histocompatibility complex
MIP	Macrophage inflammatory protein
MPS	Mononuclear phagocyte system
MRSA	Methicillin resistenter <i>Staphylococcus aureus</i>
MyD88	Myeloid differentiation primary-response protein 88
Nf	<i>Neisseria flavescens</i>
NFκB	Nuclear factor κB
Nm	<i>Neisseria mucosa</i>
Np	<i>Neisseria perflava</i>
OD	Optische Dichte
Pa	<i>Peptoniphilius asaccharolyticus</i>
PAMP	Pathogen associated molecular pattern
PBS	Phosphate buffered saline
Pg	<i>Porphyromonas gingivalis</i>
Pi	<i>Prevotella intermedia</i>
Pm	<i>Parvimonas micros</i>
PP	Präpubertäre Parodontitis
PRR	Pattern recognition receptor
Pyo	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
RIP-1	Receptor interacting protein
RPM	Rotations per minute
RPP	Rapid progressive Parodontitis
RSV	Respiratory syncytial virus

Sa	<i>Staphylococcus aureus</i>
SARM	Sterile α HEAT-Armadillo motif
SD	Standard deviation
SEM	Standard error of the mean
Si	<i>Streptococcus intermedius</i>
S-LPS	(smooth-form) Lipopolysaccharid von <i>S. Minnesota</i>
Sm	<i>Streptococcus mutans</i>
Smi	<i>Salmonella Minnesota</i>
Ss	<i>Streptococcus sanguis</i>
STAT	Signal transducer and activator of transcription
TAB	TAK-binding protein
TAK-1	TGF-beta activated kinase 1
TANK	TRAF family member-associated NF κ B activator
TBK-1	TANK-binding kinase-1
TGF- β	Transforming growth factor β
TICAM	TIR domain-containing adapter molecule
TIR	Toll/IL-1R
TIRAP	TIR domain-containing adapter protein
TLR	Toll-like Rezeptor
TNF	Tumornekrosefaktor
TRAF	TNF-receptor associated factor
TRAM	TRIF-related adapter molecule
TRIF	TIR domain-containing adapter inducing IFN- β
UV	Ultraviolett
VRE	Vancomycin-resistente Enterokokken
YFP	Yellow fluorescent protein

9. Literaturverzeichnis

Abreu MT, Vora P, Faure E, Thomas LS, Arnold ET, Arditi M

Decreased expression of Toll-like receptor-4 and MD-2 correlates with intestinal epithelial cell protection against dysregulated proinflammatory gene expression in response to bacterial lipopolysaccharide.

J. Immunol. 2001 167(3):1609-1616.

Aderem A, Ulevitch RJ.

Toll-like receptors in the induction of the innate immune response.

Nature. 2000 406(6797):782-787.

Akira S. und Takeda K.

Toll-like receptor signalling.

Nat. Immunol. Rev. 2004, 4: 499-511

Alexopoulou L, Holt AC, Medzhitov R, Flavell RA.

Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3.

Nature. 2001 413(6857):732-738.

Aliprantis AO, Yang RB, Mark MR, Suggett S, Devaux B, Radolf JD, Klimpel GR, Godowski P, Zychlinsky A.

Cell activation and apoptosis by bacterial lipoproteins through toll-like receptor-2.

Science. 1999 285(5428):736-739.

Amano A.

Disruption of epithelial barrier and impairment of cellular function by *Porphyromonas gingivalis*.

Front. Biosci. 2007 12:3965-3974

Ambrosch F, Wiedermann G, Kundi M, Leroux-Roels G, Desombere I, Garcon N, Thiriart C, Slaoui M, Thoelen S.

A hepatitis B vaccine formulated with a novel adjuvant system.

Vaccine. 2000 18(20):2095-2101.

Anderson KV, Nusslein-Volhard C.

Information for the dorsal-ventral pattern of the *Drosophila* embryo is stored as maternal mRNA.

Nature. 1984 311(5983):223-227.

Anderson KV.

Toll signaling pathways in the innate immune response.

Curr. Opin. Immunol. 2000 12(1):13-19.

Asea A, Rehli M, Kabingu E, Boch JA, Bare O, Auron PE, Stevenson MA, Calderwood SK.

Novel signal transduction pathway utilized by extracellular HSP70: role of toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4.

J. Biol. Chem. 2002 277(17):15028-15034.

Bainbridge BW, Darveau RP.

Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide: an unusual pattern recognition receptor ligand for the innate host defense system.

Acta. Odontol. Scand. 2001 59(3):131-138.

Bakaletz LO.

Developing animal models for polymicrobial diseases.

Nat. Rev. Microbiol. 2004 2(7):552-568.

Banchereau J, Steinman RM.

Dendritic cells and the control of immunity.

Nature. 1998 392(6673):245-252.

Bell JK, Mullen GE, Leifer CA, Mazzoni A, Davies DR, Segal DM.

Leucine-rich repeats and pathogen recognition in Toll-like receptors.

Trends Immunol. 2003 24(10):528-533.

Beutler B.

Sepsis begins at the interface of pathogen and host.

Biochem. Soc. Trans. 2001 29(Pt 6):853-859.

Bin LH, Xu LG, Shu HB.

TIRP, a novel Toll/interleukin-1 receptor (TIR) domain-containing adapter protein involved in TIR signaling.

J. Biol. Chem. 2003 278(27):24526-24532.

Bogaert D, van Belkum A, Sluijter M, Luijendijk A, de Groot R, Rumke HC, Verbrugh HA, Hermans PW.

Colonisation by *Streptococcus pneumoniae* and *Staphylococcus aureus* in healthy children.

Lancet. 2004 363(9424):1871-1872.

Bostanci N, Allaker R, Johansson U, Rangarajan M, Curtis MA, Hughes FJ, McKay IJ.

Interleukin-1 α stimulation in monocytes by periodontal bacteria: antagonistic effects of *Porphyromonas gingivalis*.

Oral Microbiol. Immunol. 22(1):52-60.

Bouchillon SK, Johnson BM, Hoban DJ, Johnson JL, Dowzicky MJ, Wu DH, Visalli MA, Bradford PA.

Determining incidence of extended spectrum beta-lactamase producing *Enterobacteriaceae*, vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in 38 centres from 17 countries: the PEARLS study 2001-2002.

Int. J. Antimicrob. Agents. 2004 24(2):119-124.

Brogden KA, Guthmiller JM, Taylor CE.

Human polymicrobial infections.

Lancet. 2005 365(9455):253-255.

Brook I, Frazier EH.

Aerobic and anaerobic microbiology in intra-abdominal infections associated with diverticulitis.
J. Med. Microbiol. 2000 49(9):827-830.

Brook I.

Microbiology and management of intra-abdominal infections in children.
Pediatr. Int. 2003 45(2):123-129.

Brook I.

Microbiology of polymicrobial abscesses and implications for therapy.
J. Antimicrob. Chemother. 2002 50(6):805-810.

Brook I.

Peptostreptococcal infection in children.
Scand. J. Infect. Dis. 1994 26(5):503-510.

Callan MF, Fazou C, Yang H, Rostron T, Poon K, Hatton C, McMichael AJ.

CD8(+) T-cell selection, function, and death in the primary immune response in vivo.
J. Clin. Invest. 2000 106(10):1251-1261.

Carty M, Goodbody R, Schroder M, Stack J, Moynagh PN, Bowie AG.

The human adaptor SARM negatively regulates adaptor protein TRIF-dependent Toll-like receptor signaling.
Nat. Immunol. 2006 7(10):1074-1081.

Chavez de Paz LE, Molander A, Dahlen G.

Gram-positive rods prevailing in teeth with apical periodontitis undergoing root canal treatment.
Int. Endod. J. 2004 37(9):579-587.

Chofflon M, Juillard C, Gauthier G, Grau GE.

Correlation between in vitro cytokine production and clinical evolution of multiple sclerosis patients.
Schweiz. Arch. Neurol. Psychiatr. 1991 142(2):107-112.

Chofflon M, Juillard C, Juillard P, Gauthier G, Grau GE.

Tumor necrosis factor alpha production as a possible predictor of relapse in patients with multiple sclerosis.
Eur. Cytokine Netw. 1992 3(6):523-531.

Civen R, Vaisanen ML, Finegold SM.

Peritonsillar abscess, retropharyngeal abscess, mediastinitis, and nonclostridial anaerobic myonecrosis: a case report.
Clin. Infect. Dis. 1993 16 Suppl 4:299-303.

Coats SR, Reife RA, Bainbridge BW, Pham TT, Darveau RP.

Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide antagonizes *Escherichia coli* lipopolysaccharide at toll-like receptor 4 in human endothelial cells.
Infect. Immun. 2003 71(12):6799-8607.

Cook GS, Costerton JW, Lamont RJ.

Biofilm formation by *Porphyromonas gingivalis* and *Streptococcus gordonii*.

J. Periodontal Res. 1998 33(6):323-327.

Cooper NR, Jensen FC, Welsh RM Jr, Oldstone MB.

Lysis of RNA tumor viruses by human serum: direct antibody-independent triggering of the classical complement pathway.

J. Exp. Med. 1976 144(4):970-984.

Darveau RP, Pham TT, Lemley K, Reife RA, Bainbridge BW, Coats SR, Howald WN, Way SS, Hajjar AM.

Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide contains multiple lipid A species that functionally interact with both toll-like receptors 2 and 4.

Infect. Immun. 2004 72(9):5041-5051.

Darveau RP, Tanner A, Page RC.

The microbial challenge in periodontitis.

Periodontol. 2000. 14:12-32.

DeForge LE, Remick DG.

Kinetics of TNF, IL-6, and IL-8 gene expression in LPS-stimulated human whole blood.

Biochem. Biophys. Res. Commun. 1991 174(1):18-24.

Dehus O, Hartung T, Hermann C.

Endotoxin evaluation of eleven lipopolysaccharides by whole blood assay does not always correlate with Limulus amoebocyte lysate assay.

J. Endotoxin. Res. 2006 12(3):171-180.

Diebold SS, Kaisho T, Hemmi H, Akira S, Reis e Sousa C.

Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA.

Science. 2004 303(5663):1529-1531.

Diebold SS, Montoya M, Unger H, Alexopoulou L, Roy P, Haswell LE, Al-Shamkhani A, Flavell R, Borrow P, Reis e Sousa C.

Viral infection switches non-plasmacytoid dendritic cells into high interferon producers.

Nature. 2003 424(6946):324-328.

Diterich I, Harter L, Hassler D, Wendel A, Hartung T.

Modulation of cytokine release in ex vivo-stimulated blood from borreliosis patients.

Infect. Immun. 2001 69(2):687-694.

Doyle S, Vaidya S, O'Connell R, Dadgostar H, Dempsey P, Wu T, Rao G, Sun R, Haberland M, Modlin R, Cheng G.

IRF3 mediates a TLR3/TLR4-specific antiviral gene program.

Immunity. 2002 17(3):251-263

Duncan L, Yoshioka M, Chandad F, Grenier D.

Loss of lipopolysaccharide receptor CD14 from the surface of human macrophage-like cells mediated by *Porphyromonas gingivalis* outer membrane vesicles.

Microb. Pathog. 2004 36(6):319-325.

Dzink JL, Socransky SS, Haffajee AD.

The predominant cultivable microbiota of active and inactive lesions of destructive periodontal diseases.

J Clin Periodontol. 1988 15(5):316-323.

Edwards KM, Davis JE, Browne KA, Sutton VR, Trapani JA.

Anti-viral strategies of cytotoxic T lymphocytes are manifested through a variety of granule-bound pathways of apoptosis induction.

Immunol. Cell. Biol. 1999 77(1):76-89.

Ellingsen E, Morath S, Flo T, Schromm A, Hartung T, Thiemermann C, Espevik T, Golenbock D, Foster D, Solberg R, Aasen A, Wang J.

Induction of cytokine production in human T cells and monocytes by highly purified lipoteichoic acid: involvement of Toll-like receptors and CD14.

Med. Sci. Monit. 2002 8(5):149-156.

Erridge C, Pridmore A, Eley A, Stewart J, Poxton IR.

Lipopolysaccharides of *Bacteroides fragilis*, *Chlamydia trachomatis* and *Pseudomonas aeruginosa* signal via toll-like receptor 2.

J. Med. Microbiol. 2004 53(Pt 8):735-740.

Ertel W, Jarrar D, Jochum M, Thiele V, Kenney J, Faist E, Schildberg FW.

Enhanced release of elastase is not concomitant with increased secretion of granulocyte-activating cytokines in whole blood from patients with sepsis.

Arch. Surg. 1994 129(1):90-98.

Ertel W, Krombach F, Kremer JP, Jarrar D, Thiele V, Eymann J, Muenzing S, Faist E, Messmer K, Schildberg FW.

Mechanisms of cytokine cascade activation in patients with sepsis: normal cytokine transcription despite reduced CD14 receptor expression.

Surgery. 1993 114(2):243-251.

Fasano A.

Intestinal zonulin: open sesame!

Gut. 2001 49(2):159-162.

Feezor RJ, Oberholzer C, Baker HV, Novick D, Rubinstein M, Moldawer LL, Pribble J, Souza S, Dinarello CA, Ertel W, Oberholzer A.

Molecular characterization of the acute inflammatory response to infections with Gram-negative versus Gram-positive bacteria.

Infect. Immun. 2003 71(10):5803-5813.

Fennrich S, Wendel A, Hartung T.

New Applications of the Human Whole Blood Pyrogen Assay (PyroCheck).

ALTEX. 1999 16(3):146-149.

Fitzgerald KA, McWhirter SM, Faia KL, Rowe DC, Latz E, Golenbock DT, Coyle AJ, Liao SM, Maniatis T.

IKKepsilon and TBK1 are essential components of the IRF3 signaling pathway.

Nat. Immunol. 2003a 4(5):491-496.

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.

Mal (MyD88-adaptor-like) is required for Toll-like receptor-4 signal transduction.

Nature. 2001 413(6851):78-83.

Fitzgerald KA, Rowe DC, Barnes BJ, Caffrey DR, Visintin A, Latz E, Monks B, Pitha PM, Golenbock DT.

LPS-TLR4 signaling to IRF-3/7 and NF-kappaB involves the toll adapters TRAM and TRIF.

J. Exp. Med. 2003b 198(7):1043-1055.

Frankenburg S, Klaus S.

Production of interferon gamma in cultures of whole blood obtained in the course of and after healing of cutaneous leishmaniasis.

Ann. Trop. Med. Parasitol. 1991 85(4):401-405.

Freudenberg MA, Kalis C, Chvatchko Y, Merlin T, Gumenscheimer M, Galanos C.

Role of interferons in LPS hypersensitivity.

J. Endotoxin. Res. 2003 9(5):308-312.

Gay NJ, Keith FJ.

Drosophila Toll and IL-1 receptor.

Nature. 1991 351(6325):355-366.

Geffers C, Zuschneid I, Sohr D, et al.

Microbiological isolates associated with nosocomial infections in intensive care units: data of 274 intensive care units participating in the German Nosocomial Infections Surveillance System (KISS).

Anesthesiol. Intensivmed. Notfallmed. Schmerzther. 2004 39(1) 15-19

Gupta RS.

What are archaeobacteria: life's third domain or monoderm prokaryotes related to Gram-positive bacteria?

A new proposal for the classification of prokaryotic organisms.

Mol. Microbiol. 1998 29(3):695-707.

Hacker H, Mischak H, Miethke T, Liptay S, Schmid R, Sparwasser T, Heeg K, Lipford GB, Wagner H.

CpG-DNA-specific activation of antigen-presenting cells requires stress kinase activity and is preceded by non-specific endocytosis and endosomal maturation.

EMBO J. 1998 17(21):6230-6240.

Hacker H, Vabulas RM, Takeuchi O, Hoshino K, Akira S, Wagner H.

Immune cell activation by bacterial CpG-DNA through myeloid differentiation marker 88 and tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF)6.

J. Exp. Med. 2000 192(4):595-600.

Hajishengallis G, Martin M, Schifferle RE, Genco RJ.

Counteracting interactions between lipopolysaccharide molecules with differential activation of toll-like receptors.

Infect. Immun. 2002 70(12):6658-6664.

Harris R, Nicoll AD, Adair PM, Pine CM.

Risk factors for dental caries in young children: a systematic review of the literature.

Community Dent. Health. 2004 21(1 Suppl):71-85.

Hartung T, Doecke WD, Bundschuh D, Foote MA, Gantner F, Hermann C, Lenz A, Milwee S, Rich B, Simon B, Volk HD, von Aulock S, Wendel A.

Effect of filgrastim treatment on inflammatory cytokines and lymphocyte functions.

Clin. Pharmacol. Ther. 1999 66(4):415-424.

Hartung T, Doecke WD, Gantner F, Krieger G, Sauer A, Stevens P, Volk HD, Wendel A.

Effect of granulocyte colony-stimulating factor treatment on ex vivo blood cytokine response in human volunteers.

Blood. 1995 85(9):2482-2489.

Hartung T, Fennrich S, Fischer M, Montag-Lessing T, Wendel A.

Development and evaluation of a pyrogen test based on human whole blood

ALTEX. 1998 15(5):9-10.

Hartung T, von Aulock S, Freitag M, Hoxtermann S, Stucker M, Hoffmann K, Altmeyer P, Kottke A, Wendel A.

Blood cytokine response of low-dose molgramostim (rhGM-CSF)-treated patients.

Cytokine. 2000 12(10):1570-1574.

Hashimoto C, Hudson KL, Anderson KV.

The Toll gene of *Drosophila*, required for dorsal-ventral embryonic polarity, appears to encode a transmembrane protein.

Cell. 1988 52(2):269-279.

Hayashi F, Smith KD, Ozinsky A, Hawn TR, Yi EC, Goodlett DR, Eng JK, Akira S, Underhill DM, Aderem A.

The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5.

Nature. 2001 410(6832):1099-1103.

Heil F, Hemmi H, Hochrein H, Ampenberger F, Kirschning C, Akira S, Lipford G, Wagner H, Bauer S.

Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8.

Science. 2004 303(5663):1526-1529.

Hemmi H, Kaisho T, Takeuchi O, Sato S, Sanjo H, Hoshino K, Horiuchi T, Tomizawa H, Takeda K, Akira S.

Small anti-viral compounds activate immune cells via the TLR7 MyD88-dependent signaling pathway.
Nat. Immunol. 2002 3(2):196-200.

Hemmi H, Takeuchi O, Kawai T, Kaisho T, Sato S, Sanjo H, Matsumoto M, Hoshino K, Wagner H, Takeda K, Akira S.

A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA.
Nature. 2000 408(6813):740-745.

Hendricks KJ, Burd TA, Anglen JO, Simpson AW, Christensen GD, Gainor BJ.

Synergy between *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* in a rat model of complex orthopaedic wounds.
J. Bone. Joint. Surg. Am. 2001 83-A(6):855-861.

Hermann C, Spreitzer I, Schroder NW, Morath S, Lehner MD, Fischer W, Schutt C, Schumann RR, Hartung T.

Cytokine induction by purified lipoteichoic acids from various bacterial species--role of LBP, sCD14, CD14 and failure to induce IL-12 and subsequent IFN-gamma release.
Eur. J. Immunol. 2002 32(2):541-551.

Hermann C, von Aulock S, Graf K, Hartung T.

A model of human whole blood lymphokine release for in vitro and ex vivo use.
J. Immunol. Methods. 2003 275(1-2):69-79.

Hessle C, Andersson B, Wold AE.

Gram-positive bacteria are potent inducers of monocytic interleukin-12 (IL-12) while Gram-negative bacteria preferentially stimulate IL-10 production.
Infect. Immun. 2000 68(6):3581-3586.

Hirschfeld M, Weis JJ, Toshchakov V, Salkowski CA, Cody MJ, Ward DC, Qureshi N, Michalek SM, Vogel SN.

Signaling by TLR 2 and 4 agonists results in differential gene expression in murine macrophages.
Infect. Immun. 2001 69(3):1477-1482.

Hoebé K, Du X, Georgel P, Janssen E, Tabeta K, Kim SO, Goode J, Lin P, Mann N, Mudd S, Crozat K, Sovath S, Han J, Beutler B.

Identification of Lps2 as a key transducer of MyD88-independent TIR signalling.
Nature. 2003 424(6950):743-748.

Horng T, Barton GM, Flavell RA, Medzhitov R.

The adaptor molecule TIRAP provides signalling specificity for Toll-like receptors.
Nature. 2002 420(6913):329-333

Horng T, Barton GM, Medzhitov R.

TIRAP: an adapter molecule in the Toll signaling pathway.
Nat. Immunol. 2001 2(9):835-841

Hoshino K, Kaisho T, Iwabe T, Takeuchi O, Akira S.

Differential involvement of IFN-beta in Toll-like receptor-stimulated dendritic cell activation.
Int. Immunol. 2002 14(10):1225-1231.

Inohara, Chamaillard, McDonald C, Nunez G.

NOD-LRR proteins: role in host-microbial interactions and inflammatory disease.
Annu. Rev. Biochem. 2005 74:355-383.

Ishikawa S

The role of fimbriae of *Escherichia coli* in urinary tract infections.
Hinyokika. Kyo. 1991 37(9):953-956

Janeway CA Jr.

Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology.
Cold. Spring. Harb. Symp. Quant. Biol. 1989 54 Pt 1:1-13.

Jenkinson HF, Lamont RJ.

Streptococcal adhesion and colonization.
Crit. Rev. Oral Biol. Med. 1997 8(2):175-200.

Jiang Z, Mak TW, Sen G, Li X.

Toll-like receptor 3-mediated activation of NF-kappaB and IRF3 diverges at Toll-IL-1 receptor domain-containing adapter inducing IFN-beta.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2004 101(10):3533-3538.

Kaetzke A, Korner H, Kneist S, Eschrich K.

Oral *Actinomyces* isolates forming red colonies on brain heart blood agar can be unambiguously classified as *A. odontolyticus* by macroscopic examination.
J. Clin. Microbiol. 2003 41(8):3729-3731.

Kägi D, Ledermann B, Bürki K, Zinkernagel RM, Hengartner H.

Molecular mechanisms of lymphocyte-mediated cytotoxicity and their role in immunological protection and pathogenesis in vivo.
Annu. Rev. Immunol. 1996 14:207-232.

Kamma JJ, Nakou M, Gmur R, Baehni PC.

Microbiological profile of early onset/aggressive periodontitis patients.
Oral Microbiol. Immunol. 2004 19(5):314-321.

Kamma JJ, Nakou M, Manti FA

Predominant microflora of severe, moderate and minimal periodontal lesions in young adults with rapidly progressive periodontitis.
J. Periodontal Res. 1995 30(1):66-72

Kawai T, Adachi O, Ogawa T, Takeda K, Akira S.

Unresponsiveness of MyD88-deficient mice to endotoxin.
Immunity. 1999 11(1):115-122.

Kawai T, Takeuchi O, Fujita T, Inoue J, Muhlradt PF, Sato S, Hoshino K, Akira S.

Lipopolysaccharide stimulates the MyD88-independent pathway and results in activation of IFN-regulatory factor 3 and the expression of a subset of lipopolysaccharide-inducible genes.

J. Immunol. 2001 167(10):5887-5894.

Kawasaki K, Akashi S, Shimazu R, Yoshida T, Miyake K, Nishijima M.

Mouse toll-like receptor 4.MD-2 complex mediates lipopolysaccharide-mimetic signal transduction by Taxol.

J. Biol. Chem. 2000 275(4):2251-2254.

Kimbrell DA, Beutler B.

The evolution and genetics of innate immunity.

Nat. Rev. Genet. 2001 2(4):256-267.

Kirchner H, Kleinicke C, Digel W.

A whole-blood technique for testing production of human interferon by leukocytes.

J. Immunol. Methods. 1982 48(2):213-219.

Kirikae T, Nitta T, Kirikae F, Suda Y, Kusumoto S, Qureshi N, Nakano M.

Lipopolysaccharides (LPS) of oral black-pigmented bacteria induce tumor necrosis factor production by LPS-refractory C3H/HeJ macrophages in a way different from that of *Salmonella* LPS.

Infect. Immun. 1999 67(4):1736-1742.

Kragstjerg P, Soderquist B, Holmberg H, Vikerfors T, Danielsson D.

Production of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6 in whole blood stimulated by live Gram-negative and Gram-positive bacteria.

Clin. Microbiol. Infect. 1998 4(3):129-134.

Kurt-Jones EA, Popova L, Kwinn L, Haynes LM, Jones LP, Tripp RA, Walsh EE, Freeman MW, Golenbock DT, Anderson LJ, Finberg RW.

Pattern recognition receptors TLR4 and CD14 mediate response to respiratory syncytial virus.

Nat. Immunol. 2000 1(5):398-401.

Lamont RJ, Jenkinson HF.

Subgingival colonization by *Porphyromonas gingivalis*.

Oral Microbiol. Immunol. 2000 15(6):341-349.

Lawrence C, Nauciel C.

Production of interleukin-12 by murine macrophages in response to bacterial peptidoglycan.

Infect. Immun. 1998 66(10):4947-4949.

Le Moal G, Landron C, Grollier G, Bataille B, Roblot F, Nassans P, Becq-Giraudon B.

Characteristics of brain abscess with isolation of anaerobic bacteria.

Scand. J. Infect. Dis. 2003 35(5):318-321.

Lehner MD, Morath S, Michelsen KS, Schumann RR, Hartung T.

Induction of cross-tolerance by lipopolysaccharide and highly purified lipoteichoic acid via different Toll-like receptors independent of paracrine mediators.

J. Immunol. 2001 166(8):5161-5167.

Lehrer RI, Ganz T.

Cathelicidins: a family of endogenous antimicrobial peptides.

Curr. Opin. Hematol. 2002a 9(1):18-22.

Lehrer RI, Ganz T.

Defensins of vertebrate animals.

Curr. Opin. Immunol. 2002b 14(1):96-102.

Lemaitre B, Nicolas E, Michaut L, Reichhart JM, Hoffmann JA.

The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults.

Cell. 1996 86(6):973-983.

LeMosy EK, Hong CC, Hashimoto C.

Signal transduction by a protease cascade.

Trends. Cell. Biol. 1999 9(3):102-107.

Li Z, Woo CJ, Iglesias-Ussel MD, Ronai D, Scharff MD.

The generation of antibody diversity through somatic hypermutation and class switch recombination.

Genes. Dev. 2004 18(1):1-11.

Lien E, Chow JC, Hawkins LD, McGuinness PD, Miyake K, Espevik T, Gusovsky F, Golenbock DT.

A novel synthetic acyclic lipid A-like agonist activates cells via the lipopolysaccharide/toll-like receptor 4 signaling pathway.

J. Biol. Chem. 2001 276(3):1873-1880.

Lien E, Sellati TJ, Yoshimura A, Flo TH, Rawadi G, Finberg RW, Carroll JD, Espevik T, Ingalls RR, Radolf JD, Golenbock DT.

Toll-like receptor 2 functions as a pattern recognition receptor for diverse bacterial products.

J. Biol. Chem. 1999 274(47):33419-33425.

Lippke JA, Peros WJ, Keville MW, Savitt ED, French CK.

DNA probe detection of *Eikenella corrodens*, *Wolinella recta* and *Fusobacterium nucleatum* in subgingival plaque.

Oral Microbiol. Immunol. 1991 6(2):81-87.

Matsushita M, Fujita T.

Activation of the classical complement pathway by mannose-binding protein in association with a novel C1s-like serine protease.

J. Exp. Med. 1992 176(6):1497-1502.

Mattsson E, Verhage L, Rollof J, Fleer A, Verhoef J, van Dijk H.

Peptidoglycan and teichoic acid from *Staphylococcus epidermidis* stimulate human monocytes to release tumour necrosis factor-alpha, interleukin-1 beta and interleukin-6.

FEMS Immunol. Med. Microbiol. 1993 7(3):281-287.

Medvedev AE, Kopydlowski KM, Vogel SN.

Inhibition of lipopolysaccharide-induced signal transduction in endotoxin-tolerized mouse macrophages: dysregulation of cytokine, chemokine, and toll-like receptor 2 and 4 gene expression.

J. Immunol. 2000 164(11):5564-5574.

Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA Jr.

A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity.

Nature. 1997 388(6640):394-397.

Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Kopp E, Stadlen A, Chen C, Ghosh S, Janeway CA Jr.

MyD88 is an adaptor protein in the hToll/IL-1 receptor family signaling pathways.

Mol. Cell. 1998 2(2):253-258.

Meylan E, Burns K, Hofmann K, Blancheteau V, Martinon F, Kelliher M, Tschopp J.

RIP1 is an essential mediator of Toll-like receptor 3-induced NF-kappa B activation.

Nat. Immunol. 2004 5(5):503-507.

Micheelis W, Bauch J.

Oral health of representative samples of Germans examined in 1989 and 1992.

Community Dent. Oral Epidemiol. 1996 24(1):62-67.

Miller YI, Viriyakosol S, Binder CJ, Feramisco JR, Kirkland TN, Witztum JL.

Minimally modified LDL binds to CD14, induces macrophage spreading via TLR4/MD-2, and inhibits phagocytosis of apoptotic cells.

J. Biol. Chem. 2003 278(3):1561-1568.

Moore LV, Moore WE.

Oribaculum catoniae gen. nov., sp. nov.; *Catonella morbi* gen. nov., sp. nov.; *Hallella seregens* gen. nov., sp. nov.; *Johnsonella ignava* gen. nov., sp. nov.; and *Dialister pneumosintes* gen. nov., comb. nov., nom. rev., Anaerobic Gram-negative bacilli from the human gingival crevice.

Int. J. Syst. Bacteriol. 1994a 44(2):187-192.

Moore WE, Moore LV.

The bacteria of periodontal diseases.

Periodontol. 2000. 1994b 5:66-77.

Morath S, Geyer A, Hartung T.

Structure-function relationship of cytokine induction by lipoteichoic acid from *Staphylococcus aureus*.

J. Exp. Med. 2001 193(3):393-397.

Müller HP, Flores-de-Jacoby L.

The composition of the subgingival microflora of young adults suffering from juvenile periodontitis.
J. Clin. Periodontol. 1985 12(2):113-123.

Nau GJ, Schlesinger A, Richmond JF, Young RA.

Cumulative Toll-like receptor activation in human macrophages treated with whole bacteria.
J. Immunol. 2003 170(10):5203-5209.

Neish AS.

The gut microflora and intestinal epithelial cells: a continuing dialogue.
Microbes. Infect. 2002 4(3):309-317.

Netea MG, van Deuren M, Kullberg BJ, Cavillon JM, Van der Meer JW.

Does the shape of lipid A determine the interaction of LPS with Toll-like receptors?
Trends Immunol. 2002 23(3):135-139.

Nonnenmacher C, Mutters R, de Jacoby LF.

Microbiological characteristics of subgingival microbiota in adult periodontitis, localized juvenile periodontitis and rapidly progressive periodontitis subjects.
Clin. Microbiol. Infect. 2001 7(4):213-217.

Norskov-Lauritsen N, Kilian M.

Reclassification of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Haemophilus aphrophilus*, *Haemophilus paraphrophilus* and *Haemophilus segnis* as *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* gen. nov., comb. nov., *Aggregatibacter aphrophilus* comb. nov. and *Aggregatibacter segnis* comb. nov., and emended description of *Aggregatibacter aphrophilus* to include V factor-dependent and V factor-independent isolates.

Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2006 56: 2135-2146

Ogawa T, Asai Y, Hashimoto M, Takeuchi O, Kurita T, Yoshikai Y, Miyake K, Akira S.

Cell activation by *Porphyromonas gingivalis* lipid A molecule through Toll-like receptor 4- and myeloid differentiation factor 88-dependent signaling pathway.
Int. Immunol. 2002 14(11):1325-1332.

O'Hara AM, O'Regan P, Fanning A, O'Mahony C, Macsharry J, Lyons A, Bienenstock J, O'Mahony L, Shanahan F.

Functional modulation of human intestinal epithelial cell responses by *Bifidobacterium infantis* and *Lactobacillus salivarius*.
Immunology. 2006 118(2):202-215.

Okamura Y, Watari M, Jerud ES, Young DW, Ishizaka ST, Rose J, Chow JC, Strauss JF 3rd

The extra domain A of fibronectin activates Toll-like receptor 4.
J. Biol. Chem. 2001 276(13):10229-10233.

O'Neill LA, Bowie AG.

The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling.
Nat. Rev. Immunol. 2007 7(5):353-364.

Oshiumi H, Matsumoto M, Funami K, Akazawa T, Seya T.

TICAM-1, an adaptor molecule that participates in Toll-like receptor 3-mediated interferon-beta induction.

Nat. Immunol. 2003a 4(2):161-167.

Oshiumi H, Sasai M, Shida K, Fujita T, Matsumoto M, Seya T.

TIR-containing adaptor molecule (TICAM)-2, a bridging adaptor recruiting to toll-like receptor 4 TICAM-1 that induces interferon-beta.

J. Biol. Chem. 2003b 278(50):49751-49762.

Ozinsky A, Underhill DM, Fontenot JD, Hajjar AM, Smith KD, Wilson CB, Schroeder L, Aderem A.

The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between toll-like receptors.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2000 97(25):13766-13771.

Paramonov N, Bailey D, Rangarajan M, Hashim A, Kelly G, Curtis MA, Hounsell EF.

Structural analysis of the polysaccharide from the lipopolysaccharide of *Porphyromonas gingivalis* strain W50.

Eur. J. Biochem. 2001 268(17):4698-4707.

Parsi MA, Atreja A, Zein NN.

Spontaneous bacterial peritonitis: recent data on incidence and treatment.

Cleve. Clin. J. Med. 2004 71(7):569-576.

Pericone CD, Overweg K, Hermans PW, Weiser JN.

Inhibitory and bactericidal effects of hydrogen peroxide production by *Streptococcus pneumoniae* on other inhabitants of the upper respiratory tract.

Infect. Immun. 2000 68(7):3990-3997.

Poltorak A, He X, Smirnova I, Liu MY, Van Huffel C, Du X, Birdwell D, Alejos E, Silva M, Galanos C, Freudenberg M, Ricciardi-Castagnoli P, Layton B, Beutler B.

Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene.

Science. 1998 282(5396):2085-2088.

Poltorak A, Ricciardi-Castagnoli P, Citterio S, Beutler B.

Physical contact between lipopolysaccharide and toll-like receptor 4 revealed by genetic complementation.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2000 97(5):2163-2167.

Potempa J, Sroka A, Imamura T, Travis J.

Gingipains, the major cysteine proteinases and virulence factors of *Porphyromonas gingivalis*: structure, function and assembly of multidomain protein complexes.

Curr. Protein. Pept. Sci. 2003 4(6):397-407.

Poutrel B, Lerondelle C.

Protective effect in the lactating bovine mammary gland induced by coagulase-negative staphylococci against experimental *Staphylococcus aureus* infections.

Ann. Rech. Vet. 1980 11(4):327-332.

Ranney RR.

Immunologic mechanisms of pathogenesis in periodontal diseases: an assessment.

J. Periodontal Res. 1991 26(3 Pt 2):243-254.

Regev-Yochay G, Dagan R, Raz M, Carmeli Y, Shainberg B, Derazne E, Rahav G, Rubinstein E.

Association between carriage of *Streptococcus pneumoniae* and *Staphylococcus aureus* in Children.

JAMA. 2004 292(6):716-720.

Riedel CU, Foata F, Philippe D, Adolfsson O, Eikmanns BJ, Blum S.

Anti-inflammatory effects of bifidobacteria by inhibition of LPS-induced NF-kappaB activation.

World J. Gastroenterol. 2006 12(23):3729-3735.

Rock FL, Hardiman G, Timans JC, Kastelein RA, Bazan JF.

A family of human receptors structurally related to *Drosophila* Toll.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1998 95(2):588-593

Rossi M, Maurano F, Luongo D, Fasano A, Uzzau S, Auricchio S, Troncone R.

Zonula occludens toxin (Zot) interferes with the induction of nasal tolerance to gliadin.

Immunol. Lett. 2002 81(3):217-221.

Rutschmann S, Kilinc A, Ferrandon D.

Cutting edge: the toll pathway is required for resistance to Gram-positive bacterial infections in *Drosophila*.

J. Immunol. 2002 168(4):1542-1546.

Sato S, Sugiyama M, Yamamoto M, Watanabe Y, Kawai T, Takeda K, Akira S.

Toll/IL-1 receptor domain-containing adaptor inducing IFN-beta (TRIF) associates with TNF receptor-associated factor 6 and TANK-binding kinase 1, and activates two distinct transcription factors, NF-kappa B and IFN-regulatory factor-3, in the Toll-like receptor signaling.

J. Immunol. 2003 171(8):4304-4310.

Schacher B, Baron F, Rossberg M, Wohlfeil M, Arndt R, Eickholz P.

Aggregatibacter actinomycetemcomitans as indicator for aggressive periodontitis by two analysing strategies.

J. Clin. Periodontol. 2007 34(7):566-573.

Schnare M, Holt AC, Takeda K, Akira S, Medzhitov R.

Recognition of CpG DNA is mediated by signaling pathways dependent on the adaptor protein MyD88.

Curr. Biol. 2000 10(18):1139-1142.

Schroder NW, Morath S, Alexander C, Hamann L, Hartung T, Zahringer U, Gobel UB, Weber JR, Schumann RR.

Lipoteichoic acid (LTA) of *Streptococcus pneumoniae* and *Staphylococcus aureus* activates immune cells via Toll-like receptor (TLR)-2, lipopolysaccharide-binding protein (LBP), and CD14, whereas TLR-4 and MD-2 are not involved.

J. Biol. Chem. 2003 278(18):15587-15594.

Schwandner R, Dziarski R, Wesche H, Rothe M, Kirschning CJ.

Peptidoglycan- and lipoteichoic acid-induced cell activation is mediated by toll-like receptor 2.

J. Biol. Chem. 1999 274(25):17406-17409.

Sheng WS, Hsueh PR, Hung CC, et al.

Clinical features of patients with invasive *Eikenella corrodens* infections and microbiological characteristics of the causative isolates.

Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 2001 20(4):231-236

Singh PK, Parsek MR, Greenberg EP, Welsh MJ.

A component of innate immunity prevents bacterial biofilm development.

Nature. 2002 417(6888):552-555.

Siqueira JF Jr, Rocas IN, Alves FR, Santos KR.

Selected endodontic pathogens in the apical third of infected root canals: a molecular investigation.

J. Endod. 2004 30(9):638-643.

Siqueira JF Jr, Rocas IN.

Dialister pneumosintes can be a suspected endodontic pathogen.

Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod. 2002 94(4):494-498.

Sirard JC, Bayardo M, Didierlaurent A.

Pathogen-specific TLR signaling in mucosa: mutual contribution of microbial TLR agonists and virulence factors.

Eur. J. Immunol. 2006 36(2):260-263.

Smith MF Jr, Mitchell A, Li G, Ding S, Fitzmaurice AM, Ryan K, Crowe S, Goldberg JB.

Toll-like receptor (TLR) 2 and TLR5, but not TLR4, are required for *Helicobacter pylori*-induced NF-kappa B activation and chemokine expression by epithelial cells.

J. Biol. Chem. 2003 278(35):32552-32560.

Smith PD, Smythies LE, Mosteller-Barnum M, Sibley DA, Russell MW, Merger M, Sellers MT, Orenstein JM, Shimada T, Graham MF, Kubagawa H.

Intestinal macrophages lack CD14 and CD89 and consequently are down-regulated for LPS- and IgA-mediated activities.

J. Immunol. 2001 167(5):2651-2656.

Steidler L, Hans W, Schotte L, Neiryneck S, Obermeier F, Falk W, Fiers W, Remaut E.

Treatment of murine colitis by *Lactococcus lactis* secreting interleukin-10.

Science. 2000 289(5483):1352-1355.

Suda R, Lai CH, Yang HW

Eikenella corrodens in subgingival plaque: relationship to age and periodontal condition.
J. Periodontol. 2002 73(8):886-891

Sugawara S, Nemoto E, Tada H, Miyake K, Imamura T, Takada H.

Proteolysis of human monocyte CD14 by cysteine proteinases (gingipains) from *Porphyromonas gingivalis* leading to lipopolysaccharide hyporesponsiveness.
J. Immunol. 2000 165(1):411-418.

Super M, Ezekowitz RA.

The role of mannose-binding proteins in host defense.
Infect. Agents Dis. 1992 1(4):194-199.

Taams LS, Akbar AN.

Peripheral generation and function of CD4+CD25+ regulatory T cells.
Curr. Top. Microbiol. Immunol. 2005 293:115-31.

**Tabeta K., Georgel P., Janssen E., Du X., Hoebe K., Crozat K., Mudd S., Shamel L.,
Sovath S., Goode J., Alexopoulou L., Flavell R.A. und Beutler B.**

Toll-like receptor 9 and 3 as essential components of innate immune defense against mouse cytomegalovirus infection.
PNAS 2004, 101: 3516-3521

Takeuchi O, Hoshino K, Kawai T, Sanjo H, Takada H, Ogawa T, Takeda K, Akira S.

Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components.
Immunity. 1999 11(4):443-451.

Takeuchi O, Kawai T, Muhlradt PF, Morr M, Radolf JD, Zychlinsky A, Takeda K, Akira S.

Discrimination of bacterial lipoproteins by Toll-like receptor 6.
Int. Immunol. 2001 13(7):933-940.

Takeuchi O, Sato S, Horiuchi T, Hoshino K, Takeda K, Dong Z, Modlin RL, Akira S.

Cutting edge: role of Toll-like receptor 1 in mediating immune response to microbial lipoproteins.
J. Immunol. 2002 169(1):10-14.

Takeuchi O, Takeda K, Hoshino K, Adachi O, Ogawa T, Akira S.

Cellular responses to bacterial cell wall components are mediated through MyD88-dependent signaling cascades.
Int. Immunol. 2000 12(1):113-117.

Tanner A.

Microbial etiology of periodontal diseases. Where are we? Where are we going?
Curr. Opin. Dent. 1992 2:12-24.

Tiemersma EW, Bronzwaer SL, Lyytikainen O, Degener JE, Schrijnemakers P, Bruinsma N, Monen J, Witte W, Grundman H.

European Antimicrobial Resistance Surveillance System Participants. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Europe, 1999-2002.
Emerg. Infect. Dis. 2004 10(9):1627-1634.

Tietze K, Dalpke A, Morath S, Mutters R, Heeg K, Nonnenmacher C.

Differences in innate immune responses upon stimulation with gram-positive and gram-negative bacteria.
J. Periodontal Res. 2006 41(5):447-454.

Toledo C, Perez ME, Rocchi M, Gribaudo G, Mangiaterra S, Monterisi A.

Isolation of enterococci species causative of infections and sensitivity to antimicrobial drugs.
Rev. Argent. Microbiol. 2004 36(1):31-35

Toshchakov V, Jones BW, Perera PY, Thomas K, Cody MJ, Zhang S, Williams BR, Major J, Hamilton TA, Fenton MJ, Vogel SN.

TLR4, but not TLR2, mediates IFN-beta-induced STAT1alpha/beta-dependent gene expression in macrophages.
Nat. Immunol. 2002 3(4):392-398.

Torgerson TR, Linane A, Moes N, Anover S, Mateo V, Rieux-Laucat F, Hermine O, Vijay S, Gambineri E, Cerf-Bensussan N, Fischer A, Ochs HD, Goulet O, Ruemmele FM.

Severe food allergy as a variant of IPEX syndrome caused by a deletion in a noncoding region of the FOXP3 gene.
Gastroenterology. 2007 132(5):1705-1717.

Uehara Y, Kikuchi K, Nakamura T, Nakama H, Agematsu K, Kawakami Y, Maruchi N, Totsuka K.

Inhibition of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* colonization of oral cavities in newborns by viridans group streptococci.
Clin. Infect. Dis. 2001a 32(10):1399-1407.

Uehara Y, Kikuchi K, Nakamura T, Nakama H, Agematsu K, Kawakami Y, Maruchi N, Totsuka K.

H₂O₂ produced by viridans group streptococci may contribute to inhibition of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* colonization of oral cavities in newborns.
Clin. Infect. Dis. 2001b 32(10):1408-1413.

Uehara Y, Nakama H, Agematsu K, Uchida M, Kawakami Y, Abdul Fattah AS, Maruchi N.

Bacterial interference among nasal inhabitants: eradication of *Staphylococcus aureus* from nasal cavities by artificial implantation of *Corynebacterium sp.*
J. Hosp. Infect. 2000 44(2):127-133.

Underhill DM, Ozinsky A, Hajjar AM, Stevens A, Wilson CB, Bassetti M, Aderem A.

The Toll-like receptor 2 is recruited to macrophage phagosomes and discriminates between pathogens.
Nature. 1999 401(6755):811-815.

- Vabulas RM, Ahmad-Nejad P, da Costa C, Miethke T, Kirschning CJ, Hacker H, Wagner H.**
Endocytosed HSP60s use toll-like receptor 2 (TLR2) and TLR4 to activate the toll/interleukin-1 receptor signaling pathway in innate immune cells.
J. Biol. Chem. 2001 276(33):31332-31339.
- Valle A, Zuber CE, Defrance T, Djossou O, De Rie M, Banchereau J.**
Activation of human B lymphocytes through CD40 and interleukin 4.
Eur. J. Immunol. 1989 19(8):1463-1467.
- Van Dyke TE, Sheilesh D.**
Risk factors for periodontitis.
J. Int. Acad. Periodontol. 2005 7(1):3-7.
- Veron M, Thibault P, Ond L.**
Neisseria mucosa (*Diplococcus mucosus* Lingelsheim). I. Bacteriological description and study of its pathogenicity.
Ann. Inst. Pasteur. 1959 97:497-510.
- Wallis R.**
Structural and functional aspects of complement activation by mannose-binding protein.
Immunobiology. 2002 205(4-5):433-445.
- Wang JE, Jorgensen PF, Almløf M, Thiemermann C, Foster SJ, Aasen AO, Solberg R.**
Peptidoglycan and lipoteichoic acid from *Staphylococcus aureus* induce tumor necrosis factor alpha, interleukin 6 (IL-6), and IL-10 production in both T cells and monocytes in a human whole blood model.
Infect. Immun. 2000 68(7):3965-3970.
- Werts C, Tapping RI, Mathison JC, Chuang TH, Kravchenko V, Saint Girons I, Haake DA, Godowski PJ, Hayashi F, Ozinsky A, Underhill DM, Kirschning CJ, Wagner H, Aderem A, Tobias PS, Ulevitch RJ.**
Leptospiral lipopolysaccharide activates cells through a TLR2-dependent mechanism.
Nat. Immunol. 2001 2(4):346-352.
- Wildin RS, Freitas A.**
IPEX and FOXP3: clinical and research perspectives.
J. Autoimmun. 2005 25 Suppl:56-62.
- Witte W.**
Glycopeptide resistant *Staphylococcus*.
J. Vet. Med. B. Infect. Dis. Vet. Public. Health. 2004 51(8-9):370-373.
- Wyllie DH, Kiss-Toth E, Visintin A, Smith SC, Boussouf S, Segal DM, Duff GW, Dower SK.**
Evidence for an accessory protein function for Toll-like receptor 1 in anti-bacterial responses.
J. Immunol. 2000 165(12):7125-7132.

Yamamoto M, Sato S, Hemmi H, Sanjo H, Uematsu S, Kaisho T, Hoshino K, Takeuchi O, Kobayashi M, Fujita T, Takeda K, Akira S.

Essential role for TIRAP in activation of the signalling cascade shared by TLR2 and TLR4.

Nature. 2002a 420(6913):324-329.

Yamamoto M, Sato S, Hemmi H, Uematsu S, Hoshino K, Kaisho T, Takeuchi O, Takeda K, Akira S.

TRAM is specifically involved in the Toll-like receptor 4-mediated MyD88-independent signaling pathway.

Nat. Immunol. 2003 4(11):1144-1150.

Yamamoto M, Sato S, Mori K, Hoshino K, Takeuchi O, Takeda K, Akira S.

Cutting edge: a novel Toll/IL-1 receptor domain-containing adapter that preferentially activates the IFN-beta promoter in the Toll-like receptor signaling.

J. Immunol. 2002b 169(12):6668-6672.

Yang HW, Huang YF, Chou MY.

Occurrence of *Porphyromonas gingivalis* and *Tannerella forsythensis* in periodontally diseased and healthy subjects.

J. Periodontol. 2004 75(8):1077-1083.

Yoneyama M, Suhara W, Fukuhara Y, Fukuda M, Nishida E, Fujita T.

Direct triggering of the type I interferon system by virus infection: activation of a transcription factor complex containing IRF-3 and CBP/p300.

EMBO J. 1998 17(4):1087-1095.

Yoshimura A, Kaneko T, Kato Y, Golenbock DT, Hara Y.

Lipopolysaccharides from periodontopathic bacteria *Porphyromonas gingivalis* and *Capnocytophaga ochracea* are antagonists for human toll-like receptor 4.

Infect. Immun. 2002 70(1):218-225.

Zangerle PF, De Groote D, Lopez M, Meuleman RJ, Vrindts Y, Fauchet F, Dehart I, Jadoul M, Radoux D, Franchimont P.

Direct stimulation of cytokines (IL-1 beta, TNF-alpha, IL-6, IL-2, IFN-gamma and GM-CSF) in whole blood: II. Application to rheumatoid arthritis and osteoarthritis.

Cytokine. 1992 4(6):568-575.

Zarembek KA, Godowski PJ.

Tissue expression of human Toll-like receptors and differential regulation of Toll-like receptor mRNAs in leukocytes in response to microbes, their products, and cytokines.

J. Immunol. 2002 168(2):554-561.

Zhang D, Zhang G, Hayden MS, Greenblatt MB, Bussey C, Flavell RA, Ghosh S.

A toll-like receptor that prevents infection by uropathogenic bacteria.

Science. 2004 303(5663):1522-1526.

10. Verzeichnis meiner akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren die Damen und Herren

In Marburg:

Amon, Arnold, Aumüller, Austermann, Aziz, Back, Barth, Basler, Bauer, Baum, Beato, Becker, Behr, Berendes, Berger, Berndt, Bernhardt, Bertalanffy, Besedovsky, Beyer, Bien, Blankenburg, Braasch, Cetin, Czubayko, Daume, Daut, Dibbets, Dittrich, Dombrowski, Doss, Egbring, Ehrhardt, Eilers, Engel, Engenhardt-Cabillic, Eschenbach, Flores de Jacoby, Feuser, Friederich, Fruhstorfer, Fuhrmann, Garten, Gemsa, Geus, Göke, Görg, Golenhofen, Gotzen, Graul, Gressner, Grimm, Griss, Gröne, Grundner, Grzeschik, Gudermann, Habermehl, Hamer, Happle, Hardewig, Hartmann, Hasilik, Havemann, Hebebrand, Heeg, Heidenreich, Hellinger, Hemmer, Hennis, Hesse, Hering, Herpertz-Dahlmann, Herzum, Heß, Heufelder, Hildebrandt, Hilgermann, Hofmann, Hoffmann, Huffmann, Ihm, Jacob, Janke, Jones, Joseph, Kälble, Kaffarnik, Karlson, Katschinski, Kern, Kleine, Kleinsasser, Klenk, Klötzer, Klose, Knauff, Knoll, Koehler, Koolman, Koransky, Krause, Kretschmer, Krieg, Kroh, Kroll, Kuhn, Kuni, Lang, Lange, Lauer, Lehmann, Legrum, Lennartz, Lill, Lippert, Löffler, Lohoff, Lorenz, Lotzmann, Ludwig, Lührmann, Lütcke, Maisch, Martini, Mannheim, Massarrat, Mennel, Moll, Moosdorf, Mueller, Müller, Mutters, Netter, Neubauer, Neurath, Niemeyer, Niessing, Oepen, Oertel, Peter, Petry, Pfeiffer, Pieper, Pohlen, Portig, Radsak, Rehder, Remschmidt, Renz, Richter, Riedmiller, Riße, Rodeck, Rosemann, Rosenow, Rothmund, Rupec, Schachtschabel, Schäfer, Schäfer, Schepelmann, Schiff, Schleyer, Schmid, Schmidt, Schmitz-Moormann, Schnabel, Schneider, Schumacher, Schüffel, Schulz, Schwarz, Seifart, Seitz, Seyberth, Slenczka, Sommer, Stachniss, Steiniger, Stilletto, Stempel, Sturm, Tampé, Thomas, Vogelmeier, Voigt, Weber, Weihe, Werner, Wesemann, von Wichert, Wiegandt, Wolf, Wulf, Ziegler, Zielke

In Siegen:

Franz, Freudenberg, Gassmann, Hering, Schuster, Willeke

11. Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel

Periodontopathogene Bakterien: Freisetzungsmuster von Zytokinen im humanen Vollblut-Testsystem und Unterschiede in der Aktivierung des angeborenen Immunsystems durch Toll-like Rezeptor-Stimulation.

im Institut für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene des Zentrum für Hygiene und Infektionsbiologie des Fachbereiches Medizin der Philipps-Universität Marburg und des Universitätsklinikums Gießen und Marburg, Standort Marburg, unter Leitung von Prof. Dr. R. Mutters ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe bisher an keinem in- und ausländischen Medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Teile der vorliegenden Arbeit wurden im „Journal of Periodontal Research“ unter dem Titel „Differences in innate immune responses upon stimulation with gram-positive and gram-negative bacteria“ veröffentlicht.

Marburg, den 17. April 2008.