

Biomedizinisches Forschungszentrum der Philipps-Universität Marburg

Institut für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene

Direktor: Prof. Dr. Michael Lohoff



Zur Pathogenese polymikrobieller Infektionen am Beispiel der Parodontitis

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Humanmedizin

an der Medizinischen Fakultät

der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Donatha Plag

aus Neuwied

Marburg 2014

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg
am 16.07.2014.

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Prof. Dr. Helmut Schäfer

Referent: Prof. Dr. Reinier Mutters

Korreferent: Prof. Dr. med. dent. Nicole B. Arweiler

Meinen Eltern in Dankbarkeit

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	VIII
1 ZUSAMMENFASSUNG	1
2 SUMMARY	2
3 EINLEITUNG	3
3.1 Polymikrobielle Infektionen	3
3.1.1 Parodontitis	5
3.2 Charakteristika der oralen parodontopathogenen Flora	8
3.2.1 Kriterien zur Definierung der parodontopathogenen Keime	8
3.2.2 <i>Porphyromonas gingivalis</i>	9
3.2.3 <i>Aggregatibacter</i> (ehemals <i>Actinobacillus</i>) <i>actinomycetemcomitans</i>	11
3.3 Das menschliche Immunsystem	13
3.3.1 Das angeborene Immunsystem.....	13
3.3.2 Das erworbene Immunsystem.....	15
3.3.3 Toll-like Rezeptoren	17
3.3.3.1 Die Entdeckung des Toll-Proteins	18
3.3.3.2 Toll-like Rezeptoren – Strukturhomologe des Toll-Proteins	18
3.3.3.3 Verschiedene Toll-like Rezeptoren und ihre Liganden.....	21
3.3.3.4 Die Signalkaskaden der Toll-like Rezeptoren.....	22
3.3.3.4.1 MyD88-abhängige Signalkaskade	23
3.3.3.4.2 MyD88-unabhängige Signalkaskade	24
3.3.3.4.3 Negativ-regulatorische Mechanismen in der TLR-Signalkaskade.....	26
3.3.3.5 Toll-like Rezeptor 9 und die Bedeutung bakterieller DNA als Stimulus für das angeborene Immunsystem	26
3.3.3.6 Suppressive Oligodeoxynukleotide mit inhibitorischer Wirkung auf die CpG-induzierte Immunantwort	28
3.3.3.7 Die Bedeutung von TLR9 im mukosalen Immunsystem	29
3.4 Wissenschaftliche Fragestellung und Ziel dieser Arbeit.....	31
4 MATERIAL UND METHODEN.....	33
4.1 Material	33
4.1.1 Laborgeräte.....	33
4.1.2 Verbrauchsmaterialien	35
4.1.3 Chemikalien und Reagenzien.....	36
4.1.4 Puffer und Lösungen	38
4.1.5 Medien und Medienzusätze für Zellkultur	39

4.1.6	Zelllinien und Primäre Zellen	40
4.1.7	Bakterien.....	40
4.1.8	Synthetische Oligodeoxynukleotide.....	41
4.1.9	Nukleinsäuren	41
4.1.10	ELISA-Kits.....	41
4.1.11	Antikörper.....	42
4.1.12	Software.....	43
4.2	Methoden	44
4.2.1	Arbeit mit Bakterienkulturen.....	44
4.2.1.1	Anzucht von anaeroben und mikroaerophilen Bakterien.....	44
4.2.1.2	Ernte von Bakterienkulturen und Aufbereitung zur Konzentrationsbestimmung.....	44
4.2.1.3	Bestimmung der Bakterienkonzentration.....	45
4.2.1.3.1	Messung der optischen Dichte	45
4.2.1.3.2	Berechnung der Bakterienkonzentration	45
4.2.1.4	Aliquotierung und Lagerung der Bakteriensuspensionen.....	46
4.2.1.5	DNA-Extraktion mittels Phenol-Chloroform und Ethanolpräzipitation	46
4.2.1.5.1	Lyse der Bakterienzellen	46
4.2.1.5.2	Isolierung und Reinigung der DNA	47
4.2.1.5.3	Messung des DNA-Gehaltes und ihrer Reinheit.....	47
4.2.1.5.4	Lagerung der DNA.....	48
4.2.2	Arbeit mit Zellkulturen	48
4.2.2.1	Zelllinien.....	48
4.2.2.1.1	Human embryonic kidney cells (HEK 293)	48
4.2.2.1.2	THP-1.....	49
4.2.2.2	Primäre Zellen	49
4.2.2.2.1	Humane Gingivafibroblasten (HGF-1)	49
4.2.2.2.2	Gewinnung von PBMCs.....	50
4.2.2.3	Kultivieren und Passagieren der Zellen.....	50
4.2.2.4	Bestimmung von Zellvitalität und Zellzahl	52
4.2.2.5	Einfrieren und Lagerung humaner Zellen	52
4.2.2.6	Auftauen gefrorener Zellen	53
4.2.2.7	Zellstimulation „ <i>in vitro</i> “	54
4.2.2.7.1	Stimulation von HEKs	54
4.2.2.7.2	Stimulation von HGFs.....	55
4.2.2.7.3	Differenzierung und Stimulation von THP-1 Zellen	55
4.2.2.7.4	Stimulation von PBMCs.....	55
4.2.2.8	Gewinnung und Lagerung zellfreier Stimulationsüberstände.....	56
4.2.3	Proteinbiochemische Methoden	56
4.2.3.1	Zytokindetektion mittels ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay).....	56
4.2.3.2	Luziferase Reporter-Gen-Assay	58
4.2.4	Durchflusszytometrische Analyse (FACS).....	59
4.2.4.1	Das Durchflusszytometer.....	59

4.2.4.2	Detektion humaner pDCs durch den Nachweis von CD123 und CD303 auf der Zelloberfläche	60
4.2.5	Immunhistochemische Färbung und Fluoreszenzmikroskopie	61
4.2.5.1	Extrazelluläre Färbung.....	62
4.2.5.2	Intrazelluläre Färbung.....	63
5	ERGEBNISSE.....	64
5.1	Stimulationsvergleich verschiedener Zelllinien mit unterschiedlichen TLR9-Liganden	64
5.1.1	Stimulation von mit murinem TLR9 transfizierten HEK-293 mit verschiedenen ODN.	64
5.1.2	Stimulation von mit humanem TLR9 transfizierten HEK-293 mit ODN 2006	66
5.1.3	Versuche mit humanen PBMCs.....	68
5.1.3.1	Stimulation humaner PBMCs mit ODN 2006.....	68
5.1.3.2	Stimulation humaner PBMCs mit bDNA von <i>E. coli</i> K12	69
5.1.4	Stimulationsergebnisse der verschiedenen Referenzzelllinien	71
5.1.5	Versuche mit humanen Gingiva-Fibroblasten (HGFs)	72
5.1.5.1	Stimulation von HGF-1 mit ODN 2006	72
5.1.5.2	Stimulation von HGF-1 mit bDNA von <i>E. coli</i> K12.....	73
5.2	Suppressionsvergleich verschiedener Zelllinien mit G-ODN	77
5.2.1	Versuche mit murinen TLR9 - HEK 293	77
5.2.1.1	Suppression der NFκB-Induktion durch ODN 1668 mit G-ODN.....	77
5.2.2	Versuche mit humanen TLR9 HEK 293	80
5.2.2.1	Suppression der NFκB-Induktion durch ODN 2006 mit G-ODN.....	80
5.2.3	Versuche mit humanen PBMCs.....	83
5.2.3.1	Vergleich der Effekte von ODN 2006 und G-ODN auf humane PBMCs.....	83
5.2.3.2	Suppression der ODN 2006-induzierten Zytokinsekretion	84
5.2.3.3	Suppression der <i>E. coli</i> -DNA-induzierten Zytokinsekretion.....	87
5.2.4	Inhibitionsergebnisse der verschiedenen Referenzzelllinien.....	89
5.2.5	Versuche mit humanen Gingiva-Fibroblasten (HGFs)	90
5.2.5.1	Suppression der ODN 2006-induzierten Zytokinsekretion	90
5.2.5.2	Suppression der <i>E.coli</i> -DNA-induzierten Zytokinsekretion.....	91
5.3	Detektion humaner plasmocytoider DCs durch den Nachweis der Oberflächenexpression von CD123 und CD303 mittels FACS.....	93
5.4	Detektion einer intrazellulären TLR9-Expression in humanen Gingivafibroblasten	96
6	DISKUSSION	98

6.1	Auswahl eines optimalen synthetischen Oligodeoxynukleotids als Referenzstimulus	100
6.2	Auswahl einer optimalen bakteriellen ssDNA als TLR9-Ligand	101
6.3	Stimulationsvergleich mTLR9 vs. hTLR9-HEK	102
6.4	Humane PBMCs vs. THP-1	104
6.5	Eignung humaner PBMCs als Referenzmodell	106
6.6	Bedeutung der inhibitorischen Wirkung von G-ODN auf die stimulatorischen Effekte bDNA via TLR9	108
6.6.1	PBMCs	109
6.6.2	HGFs	111
6.7	Expression und Lokalisation von TLR9 in HGFs	114
7	LITERATURVERZEICHNIS	118
7.1	Wissenschaftliche Publikationen	118
7.2	Dissertationen	131
7.3	Bücher	131
8	VERZEICHNIS DER AKADEMISCHEN LEHRER	133
9	DANKSAGUNG	134
10	EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG	135

Abkürzungsverzeichnis

A) Allgemeine Abkürzungen

A. actinomycetemc.	Aggregatibacter actinomycetemcomitans
AK	Antikörper
AMP	Adenosinmonophosphat
APC	Allophycocyanin
Aqua dest.	Aqua destillata
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosintriphosphat
BCR	B-cell-receptor
BDCA-2	Blood Dendritic Cell Antigen
bDNA	bakterielle Desoxyribonukleinsäure
BMDCs	Bone-marrow-derived dendritic cells
BSA	Bovines Serum-Albumin
C	Cytosin
C. albicans	Candida albicans
CD	Cluster of differentiation
CMV	Cytomegalievirus
CO₂	Kohlenstoffdioxid
CP	Chronische Parodontitis
DCs	Dendritic cells
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	Epithelial growth factor
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FACS	Fluorescence-activated cell sorting
Fc	Fragment crystallizable region
FCS	Fetal calf serum
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FSC	Forward scatter
G	Guanin
HEK	Human Embryonic Kidney
HGF-1	Humane Gingivafibroblasten

HSP	Hitzeschockprotein
HSV	Herpes-simplex Virus
I.E.	Internationale Einheit
IEC	Intestinal epithelial cell
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IRAK	Interleukin-1 receptor associated kinase
IRF	Interferon regulatory factor
LAL-Assay	Limulus amebocyte lysate assay
LBP	LPS-binding protein
LPS	Lipopolysaccharid
LTA	Lipoteichoic acid
M. tuberculosis	Mycobacterium tuberculosis
MAP	Mitogen-activated protein
Mg²⁺	Magnesium
MHC	Major histocompatibility complex
MMP	Matrix-Metalloprotease
MW	Mittelwert
MyD88	Myeloid differentiation primary response gene 88
N. meningitidis	Neisseria meningitidis
NFκB	Nuclear factor κB
O₂	Sauerstoff
OD	Optische Dichte
ODN	Oligodeoxynukleotid
OPD	o-Phenylenediamindihydrochlorid
OPG	Osteoprotegrin
P. gingivalis	Porphyromonas gingivalis
PAMP	Pathogen-associated molecular pattern
PBMCs	Peripheral blood mononuclear cells
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase chain reaction
PD	Phosphodiesteren
pDCs	plasmacytoid dendritic cells
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridin Chlorophyll Protein
PGE₂	Prostaglandin E ₂
PMA	Phorbol-12-Myristate-13-Acetat
PRR	Pattern-recognition receptors
PTO	Phosphorothioate
RANKL	Receptor-activator of nuclear factor-κB ligand

RLU	Relative light units
RPP	Rapid progressive Parodontitis
S. pneumoniae	Streptococcus pneumoniae
SARM	sterile α - and armadillo-motif containing protein
SIGIRR	Single immunoglobulin IL-1 receptor-related molecule
SLE	Systemischer Lupus Erythematodes
SOCS	Suppressor of cytokine signalling
SSC	Sideward scatter
ssDNA	Doppelstrang- Desoxyribonukleinsäure
STAT	Signal transducer and activator of transcription
T. cruzi	Trypanosoma cruzi
T. denticola	Treponem. denticola
TAK	Transforming growth factor β -activated kinase
T_H	T-Helferzelle
THP-1	Humane akute Monozyten-Leukämie-Zelllinie
TICAM	TIR domain containing adaptor molecule
TIR domain	Toll/Interleukin-1 receptor domain
TIRAP	TIR domain containing adaptor protein
TLR	Toll-like Rezeptor
TNF	Tumor necrosis factor
TRAF	TNF receptor associated factor
TRAM	TRIF-related adaptor molecule
T_{reg}	Regulatorische T-Zellen
TRIF	TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β
TRITC	Tetramethyl Rhodamine Isothiocyanat
ü. N.	Über Nacht

B) Physikalische Einheiten

g	Gramm
g	units of gravity
h	Stunde
l	Liter
m	Meter
M	Molar (mol/l)
min	Minute
rpm	rotations per minute
RT	Raumtemperatur
sec	Sekunde

C) Präfixe physikalischer Einheiten

μ	Mikro (10^{-6})
c	Zenti (10^{-2})
m	Milli (10^{-3})
n	Nano (10^{-9})
p	Pico (10^{-12})

1 Zusammenfassung

Mit Hilfe sogenannter *pattern recognition receptors* kann das angeborene Immunsystem bakterielle Molekülmuster (*pathogen associated molecular patterns*) gramnegativer und grampositiver Bakterien erkennen und bestimmte Abwehrmechanismen einleiten. Von entscheidender Bedeutung sind dabei Toll-like Rezeptoren, die von verschiedensten Zelltypen, darunter auch Epithelzellen und Fibroblasten, exprimiert werden. Im Rahmen parodontaler Erkrankungen wird TLR9 eine wichtige Rolle bei der Erkennung doppelsträngiger bakterieller DNA periodontopathogener Keime zugesprochen, die als PAMP zu einer Produktion proinflammatorischer Zytokine und, bei verspäteter oder ausbleibender Therapie, zu einer chronisch progredienten Inflammation und Destruktion des Zahnhalteapparats führen kann.

Um die immunologischen Effekte im Rahmen der Parodontitis zu untersuchen, wurde in der vorliegenden Arbeit eine *in vitro*-Kultur primärer humaner Gingiva-Fibroblasten (HGFs) mit unterschiedlichen TLR9-Liganden stimuliert, um eine Sekretion proinflammatorischer Zytokine auszulösen und mittels ELISA zu quantifizieren. Als Referenzsystem dienten hierbei neben TLR9-transfizierten HEK-293 Zellen auch humane PBMCs. Das Hauptziel dieser Arbeit sollte die Inhibition einer durch bDNA induzierten TLR9-Aktivierung in HGFs *in vitro* durch den Einsatz spezifischer suppressiver Oligodeoxynukleotide sein.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass die verschiedenen verwendeten Zellsysteme unterschiedliche Stimulationsverhalten aufwiesen, die allesamt durch das inhibitorische Oligodeoxynukleotid G-ODN signifikant inhibiert werden konnten.

Die Ergebnisse wurden in Zusammenhang mit mukosaler Immunität gestellt und der therapeutische Einsatz von G-ODN in bDNA-induzierter Parodontitis diskutiert.

2 Summary

The innate immune system recognizes microbial components (pathogen associated molecular patterns) of Gram-positive and Gram-negative bacteria by means of pattern recognition receptors which lead to the activation of certain defence mechanisms. The family of Toll-like receptors have a crucial role in immune defence and are expressed on different cell types like epithelial cells and fibroblasts. TLR9 seems to play a pivotal role in periodontal diseases by recognizing double-stranded bacterial DNA of periodontopathogenic bacteria, which as PAMP can cause production of proinflammatory cytokines and in case of delayed or missing therapy can lead to chronic inflammation and destruction of the supporting structures of teeth.

In order to examine the immunological effects in the context of periodontitis, this work focused on analyzing *in vitro* proinflammatory cytokine secretion by human gingival fibroblasts upon stimulation with different TLR9-ligands. HEK 293 cells transfected with TLR9 and human PBMCs were used as reference cell cultures. This work mainly aimed to investigate whether suppressive oligodeoxynucleotides like G-ODN can inhibit TLR9-mediated activation of innate immunity by bDNA.

In summary, the results reveal different stimulatory patterns of the diverse cell systems used, wherein all stimulations could significantly be inhibited by means of suppressive oligodeoxynucleotides.

The findings were put in context with mucosal immunity and the therapeutical application of G-ODN in bDNA-mediated periodontitis was discussed.

3 Einleitung

Eine Infektion entsteht, wenn es Mikroorganismen wie Bakterien, Viren oder Pilzen gelingt, in einen Wirtsorganismus einzudringen, sich in diesem zu vermehren und eine entzündliche Reaktion der körpereigenen Abwehr hervorzurufen. Nur ein Bruchteil der Mikroorganismen kann als Pathogen eine Krankheit direkt verursachen. Die Mehrheit ist für den Menschen primär apathogen und harmlos, ja, als Kommensale sogar nützlich, wie von Funktionen der natürlichen Flora in der Mundhöhle oder im Magen-Darm-Trakt bekannt ist. Sowohl bei obligat als auch bei fakultativ pathogenen Krankheitserregern hängt das Ausmaß der Infektion maßgeblich von der Aggressivität der Erreger als auch der Abwehrlage des Wirtsorganismus ab. Es lassen sich Monoinfektionen, bei denen eine einzige Keimart krankheitsursächlich ist, von Mischinfektionen abgrenzen. Bei letzteren führen komplexe Interaktionen zwischen zwei oder mehr fakultativ pathogenen Keimen an nicht-sterilen Körperoberflächen wie Haut oder Mundschleimhaut zu Infektionen.

3.1 Polymikrobielle Infektionen

Polymikrobielle Infektionen werden durch das zeitgleiche Vorhandensein mehrerer Erreger verursacht. Generell kommt es dabei zu dynamischen Wechselwirkungen sowohl zwischen grampositiven und –negativen als auch aeroben und anaeroben Keimen. Es können verschiedene Mechanismen in der Entstehung akuter oder chronischer polymikrobieller Erkrankungen unterschieden werden, wobei neben synergistischen Phänomenen auch antagonistische beschrieben werden (Brogden et al., 2005).

Bei synergistischen polymikrobiellen Infektionen schafft ein Mikroorganismus eine Nische, welche wiederum von weiteren Erregern besiedelt werden kann. So finden sich bei HIV-positiven Patienten in Afrika häufig Koinfektionen mit *Plasmodium falciparum*, dem Erreger der Malaria, oder mit *Mycobacterium tuberculosis* (Lawn

et al., 2004). Weiterhin wurde gezeigt, dass Virusinfektionen der oberen Atemwege durch Zerstörung des respiratorischen Epithels und Immunsuppression bakterielle Superinfektionen begünstigen können (Peltola et al., 2004).

Von additiven polymikrobiellen Infektionen spricht man, wenn zwei oder mehr per se apathogene Keime gemeinsam Erkrankungen wie Peritonitis, Otitis media, Faszitis und generelle Bakteriämie verursachen (Bakaletz, 2004).

Die mikrobielle Interferenz verhält sich gegenteilig zu den beiden erstgenannten Phänomenen. Hier kann ein Mikroorganismus eine Nische im Wirt besetzen, sodass eine Kolonisation mit weiteren Erregern verhindert wird. So wurde bei Kindern festgestellt, dass ein positiver Trägerstatus von *Streptococcus pneumoniae* seltener für Infektionen mit *Staphylococcus aureus* prädisponiert und dieses Phänomen durch Impfung gegen Pneumokokken gestört werden kann (Bogaert et al.; Regev-Yochay et al., 2004).

Eine entscheidende Rolle in der Entstehung persistierender Infektionen spielt die Bildung von Biofilmen. Dabei handelt es sich um oberflächenassoziierte Gemeinschaften einer oder verschiedener Bakterienspezies, die in eine Polysaccharidmatrix eingebettet sind. Strukturelle und funktionelle Heterogenität verleiht Biofilmen enorme phänotypische und metabolische Flexibilität, was nicht selten von Vorteil ist im Hinblick auf Adhäsionsfähigkeit und metabolische Kooperation. Außerdem verfügen Biofilm-assoziierte Bakterien über verschiedene Mechanismen, die sie resistenter gegenüber antimikrobiell wirksamen Substanzen machen. Zu diesen Mechanismen zählen physikalische und chemische Diffusionsbarrieren für Antibiotika, langsames Wachstum und damit verbundene niedrigere Suszeptibilität gegenüber Antibiotika sowie generelle Stressantwort (Mah & O'Toole, 2001; Berezow & Darveau, 2011). Neben den genannten Erkrankungen stellt die Parodontitis ein Beispiel für eine polymikrobielle Infektion dar. Im Hinblick auf den Fokus dieser Arbeit soll darauf näher eingegangen werden.

3.1.1 Parodontitis

Die Parodontitis ist eine polymikrobiell verursachte, Biofilm-assoziierte chronische Entzündung des Parodontium. Der Zahnhalteapparat, bestehend aus Kieferknochen mit Zahntasche (Alveole), Zahnzement und Zahnfleisch (Gingiva), kann durch den chronischen Entzündungsprozess so angegriffen und zerstört werden, dass bei ausbleibender Therapie der Verlust von Zähnen die Folge sein kann (Darveau, 2010). Die Ätiologie hierbei ist sowohl mikrobieller als auch genetischer und immunologischer Natur. So liegen die Ursachen nicht nur in der Vielfalt der bei der Parodontitis beteiligten Bakterienspezies und ihren toxischen Stoffwechselprodukten. Vielmehr scheinen sie als ätiologische Basis das immunologische Gleichgewicht des Wirtes so zu stören, dass gesteigerte und inadäquate Abwehrreaktionen der angeborenen Immunität entscheidend zu einer Destruktion des Zahnhalteapparates beitragen (Van Dyke, 2008). Untersuchungsergebnisse haben gezeigt, dass ein Missverhältnis zwischen proinflammatorischem RANKL (*receptor-activator of nuclear factor- κ B ligand*) und antiinflammatorischem OPG (*osteoprotegerin*) die Aktivierung von Makrophagen und Osteoklasten bedingt, was zu einer Störung des Alveolarknochenstoffwechsels und folglich dessen Abbau als wichtigem Kennzeichen der Parodontitis führt (Cochran, 2008). Auch die Sekretion proinflammatorischer Zytokine wie IL-1 β , TNF- α und IL-17 aus Gingivafibroblasten stimulieren gewebsschädliche Proteinase (MMPs), die eine verminderte Zahnhaftung bewirken (Beklen et al., 2007). Als weitere Risikofaktoren für die Entstehung parodontaler Erkrankungen spielen nicht-beeinflussbare Aspekte wie Alter oder Geschlecht, bestimmte Verhaltensweisen wie schlechte Mundhygiene oder Zigaretten rauchen sowie gewisse den Gesundheitszustand des Wirtes beeinflussende Faktoren wie Diabetes oder Schwangerschaft eine Rolle (Lindhe, 2008).

Die Vielfalt der oralen Mikroflora beläuft sich auf mehr als 700 Bakterienspezies (Aas et al., 2005) und weist inter- und intraindividuelle Unterschiede auf (Nasidze et al., 2009), wobei sich die Zusammensetzung der oralen Flora nicht nur durch

Ernährungsumstellung, sondern auch mit zunehmendem Alter zu verändern scheint (Kang et al., 2006; Al-Ahmad et al., 2010). Jedoch haben nur manche der 700 verschiedenen Bakterienarten pathogenetische Bedeutung. Interessant ist dabei die Tatsache, dass sich einige dieser Keime auch aus einem gesunden Parodontalstatus isolieren lassen (Haffajee & Socransky, 1994). Dies legt die Vermutung nahe, dass verschiedene Subtypen derselben Bakterienspezies unterschiedliche Pathogenität besitzen und erst durch die Interaktion mit anderen parodontopathogenen Keimen eine Entzündung verursachen (Guthmiller & Novak, 2002).

Nach Schweregrad des Verlaufs lassen sich verschiedene Formen der Parodontitis einteilen, die lokalisiert oder generalisiert auftreten können. Die „chronische Parodontitis“ (CP), wie sie meist bei Erwachsenen ab der 4. Lebensdekade auftritt, stellt die häufigste Form mit langsamer Progression und guter Therapieoption dar. Unter der Bezeichnung „aggressive Parodontitis“ werden aufgrund ihres hochakuten Verlaufs die ehemals als eigenständige Krankheitsbilder angesehene präpubertäre Parodontitis und juvenile Parodontitis zusammengefasst. Bei schwerem und häufig therapierefraktärem Verlauf spricht man von „rapid progressiver Parodontitis“ (RPP). Bei den aggressiven Parodontitisformen werden gehäuft *Actinobacillus actinomycetemcomitans* und *Eikenella corrodens* isoliert, während die „Hauptkeime“ der chronischen Parodontitis *Porphyromonas gingivalis*, *Peptostreptococcus micros* und *Tannerella forsythensis* sind (Nonnenmacher et al., 2001; Bakaletz, 2004). Socransky und Kollegen (1998) konnten in Studien bestimmte parodontopathogene Keime vermehrt gemeinsam isolieren und ordneten diese sechs mikrobiellen, farblich gekennzeichneten Komplexen zu, von denen manche eher zu den Früh-, andere zu den Spätbesiedlern gingivaler Plaque zählen. Dabei wird der rote Komplex, bestehend aus *P. gingivalis*, *T. forsythensis* und *T. denticola*, als einer der Hauptverursacher parodontaler Erkrankungen angesehen. Aber auch die Rolle von *A. actinomycetemcomitans* darf in diesem Zusammenhang nicht unterschätzt werden. Die Bakterien stehen durch Zell-Zell-Interaktionen und Koaggregation untereinander in Kontakt.

Von entscheidender Bedeutung in der Pathogenese der Parodontitis ist die Bildung von Biofilmen. Sie beginnt als Bildung supragingivaler Plaque durch Anhaftung von Keimen an die Zahnoberfläche, was in vier Phasen erfolgt und einige Stunden bis Tage in Anspruch nimmt. Als Reaktion darauf kommt es zu einer entzündlichen Schwellung der Gingiva (Gingivitis) und Vertiefung des Sulcus gingivae, der wiederum von überwiegend gramnegativen und anaeroben Bakterien als subgingivaler Plaque besiedelt wird. Günstige Voraussetzungen dafür sind ein generell niedriger Sauerstoffgehalt in Parodontaltaschen, Schutz vor der Spülwirkung des Speichels und die Bereitstellung wichtiger Nährstoffe aus entzündlichem Gingivaexsudat (Müller, 2006). Die vielzähligen Vorteile, die Biofilme gegenüber planktonisch lebenden Bakterien besitzen, stellen eine große Herausforderung für eine effiziente Parodontitistherapie dar. Die Sekretion viskös-klebriger Substanzen und Pellikelbildung erleichtern Biofilm-assoziierten Keimen die Anhaftung an Oberflächen und verleihen ihnen eine höhere Widerstandsfähigkeit (Berezow & Darveau, 2011). Laut der Hypothese des „*microbial shift*“, auch Dysbiose genannt, tragen auch eine Abnahme von nützlichen Symbionten und eine Zunahme an Pathogenen zur Plaquebildung bei (Darveau, 2010), wobei es im Falle der Parodontitis zu einer Verlagerung von grampositiven Aerobiern zu gramnegativen Anaerobiern kommt (Berezow & Darveau, 2011). Viele pathogene Keime nutzen Virulenzfaktoren wie Kollagenasen, Proteasen, Leukotoxine, Trypsin-ähnliche Substanzen und Degradation von Immunglobulinen, die zu einer Überwindung von Abwehrmechanismen, Gewebsinvasion und letztlich –destruktion führen (Lindhe et al., 2008).

Orale Biofilmbildung ist nicht nur relevant für Erkrankungen der Mundhöhle, sondern muss auch als Risikofaktor für die sekundäre Entstehung systemischer Krankheitsbilder wie kardiovaskuläre Erkrankungen, Diabetes mellitus, Atemwegserkrankungen und Geburtskomplikationen wie Präeklampsie und Frühgeburten angesehen werden (Li et al., 2000), weswegen die Etablierung einer erfolgreichen und nachhaltigen Parodontitis-Therapie eine wichtige Rolle spielt.

3.2 Charakteristika der oralen parodontopathogenen Flora

3.2.1 Kriterien zur Definierung der parodontopathogenen Keime

Bereits seit mehreren Jahrzehnten dienen die klassischen Henle-Koch-Postulate dazu, den kausalen Zusammenhang zwischen einem Mikroorganismus als Pathogen und einer Infektionskrankheit zu erfassen. Diese Leitlinien, die bei Arbeiten über Infektionskrankheiten wie Diphtherie, Tuberkulose und Anthrax entwickelt wurden, gehen ursprünglich zurück auf einen Schüler Robert Kochs, Friedrich Loeffler. Koch selbst veröffentlichte seine Version der Postulate 1890 vor dem Zehnten Internationalen Medizinischen Kongress in Berlin und wollte so einen Standard zum Beweis der Verursachung von Infektionskrankheiten durch Mikroorganismen etablieren. Die drei Postulate besagen, dass (1) der Erreger aus jedem Falle einer Erkrankung isolierbar ist, (2) er bei keiner anderen Krankheit vorkommt und (3) nach Isolierung, wiederholter Reinkultur und Reinokulation die Krankheit erneut erzeugen kann (Fredricks & Relman, 1996). Das heutige medizinische Wissen und die naturwissenschaftlichen Technologien weisen die Grenzen der teilweise rigiden Henle-Koch-Postulate auf, zumal die Komplexität in der Beziehung zwischen Erreger und Wirt eine andere Herangehensweise an mikrobielle Kausalzusammenhänge erfordert. So weiß man heute, dass es auch asymptomatische Krankheitsverläufe gibt und nicht alle Erreger *in vitro* kultivierbar sind (beispielsweise Viren oder viele Keime der oralen Mikroflora). Dementsprechend können die Postulate zwar als Grundlage zur Definierung parodontopathogener Keime herangezogen werden, bedürfen jedoch einiger Änderungen und Ergänzungen hinsichtlich Kriterien wie Assoziation, Virulenzfaktoren, Immunabwehr des Wirtes und Erregerbeseitigung sowie Tierversuchen und Risikoabschätzung. So sollen die Spezies in klinisch sichtbaren parodontalen entzündlichen Läsionen in höherer Anzahl im Vergleich zu Kontrollgruppen vorkommen und über bestimmte virulente Eigenschaften verfügen. Diese können eine Immunantwort des Wirtes auslösen, die zur Eliminierung des Erregers beiträgt, was sich in der Remission klinischer

Symptome ausdrücken sollte. Sowohl Tierversuche zu parodontalen Infektionen als auch moderne technische Methoden wie ELISA, PCR oder DNA-Hybridisierung ermöglichen eine Einschätzung bestimmter Spezies und ihres pathogenen Potentials (Haffajee & Socransky, 1994). Eine andere Herangehensweise an die Ätiologie der Parodontitis könnten die Hill-Kriterien für Kausalität in der Medizin bieten. Zur Prüfung eines Kausalzusammenhangs erfordern die von Sir Austin Bradford Hill im Jahre 1965 formulierten Kriterien die Beachtung einiger Aspekte wie biologische Plausibilität, Spezifität der assoziierten Mikroorganismen, Kontinuität und Kohärenz experimenteller Beweise (Rothmann & Greenland, 2005). Berezow und Darveau (2011) stellen beispielhaft eine Anwendung dieser Kriterien auf das Krankheitsbild der Parodontitis dar.

3.2.2 *Porphyromonas gingivalis*

P. gingivalis ist ein gramnegatives, kokkoides Stäbchenbakterium aus der Familie der *Bacteroidaceae*. Charakteristisch sind neben einem asaccharolytischen Stoffwechsel ein obligat anaerobes Wachstum und die Bildung schwarzgrüner bis schwarzgrauer, schleimiger Kolonien, die einen strengen Geruch aufweisen. Seine pathogenetische Bedeutung liegt in der Kolonisierung der Mundhöhle und damit in der Beteiligung an adulter Parodontitis.

P. gingivalis gehört nicht zur normalen oralen Flora. Er besiedelt die Mundhöhle erst im Erwachsenenalter, und dann bevorzugt subgingivale Areale, vor allem bei bereits bestehenden entzündlichen Veränderungen wie Gingivitis. Diese bieten ideale Wachstumsbedingungen in Form von niedrigem Sauerstoffgehalt sowie protein- und stickstoffreichem Sulkusexsudat zum Energiegewinn.

P. gingivalis verfügt über eine Reihe von Virulenzfaktoren, die zur Entstehung und Dynamik parodontaler Erkrankungen beitragen (Sanderink et al., 2004). So sind Moleküle wie Fimbrien und bestimmte Proteasen (Gingipain-R) bei der bakteriellen Koaggregation beteiligt und erleichtern die Anhaftung an und Invasion des Keimes in Epithelzellen. Auch das Membranprotein Hämagglutinin, von welchem

mindestens neun Isoformen bekannt sind, ist in diese Prozesse involviert. Zudem besitzen einige *P. gingivalis*-Stämme Polysaccharidkapseln, die das Bakterium resistenter gegenüber einer Phagozytose durch Granulozyten machen. Darüber hinaus gewährleisten Hämolytine und andere hämospaltende Proteasen eine Versorgung des Bakteriums mit Eisen. Zellwandständige Peptidasen und Proteasen spalten nicht nur kurze Peptide als Energiequelle, sondern degradieren auch Effektormoleküle der Immunabwehr, darunter Immunglobuline. Einige Metabolite wie Fettsäuren, Schwefelwasserstoff oder Ammoniak, die im Stoffwechsel von *P. gingivalis* entstehen, wirken toxisch auf Fibroblasten. Des Weiteren inhibiert die Phosphatase SerB die durch andere Plaque-assoziierte Bakterien induzierte IL-8-Sekretion (Hasegawa et al., 2008) und verhindert auf diese Weise eine Migration und Aktivierung neutrophiler Granulozyten zur Erregerabwehr. Als wesentlicher Virulenzfaktor von *P. gingivalis* gilt sein reichhaltiges Repertoire an Proteasen, darunter MMPs wie Kollagenase, Serinproteinasen und Cysteinproteinasen, die unter anderem Fibrinogen, Komplementfaktoren und Zytokine inaktivieren (Sanderink et al., 2004).

Eine besondere Rolle nimmt das LPS von *P. gingivalis* ein. In der Regel ist LPS bekanntlich ein TLR4-Ligand. Im Unterschied zu anderen Bakterien ist das LPS von *P. gingivalis* jedoch sehr heterogen, da es Hämin-abhängig verschiedene Lipid A-Subtypen exprimiert (Darveau et al., 2004), die nicht nur mit TLR2 interagieren, sondern auch als schwache TLR4-Agonisten oder stärkere TLR4-Antagonisten fungieren können. Letztere vermindern die Expression von β -Defensin in gingivalen Fibroblasten und stören so die EGF-vermittelte und über MAP Kinasen gesteuerte parodontale Regeneration (Quinchia-Rios et al., 2008; Lu et al., 2009). Darüber hinaus ist festzuhalten, dass *P. gingivalis*-LPS das Verhältnis zwischen T_H1 - und T_H2 -Lymphozyten im parodontalen Entzündungsinfiltrat kontrollieren kann, wobei hierzu verschiedene gegenteilige Hypothesen existieren. Eine Hypothese besagt, dass sich bei einem Überwiegen von Typ 1-Lymphozyten, die zur Bildung schützender Antikörper beitragen, Gewebeabbau und -regeneration die Waage halten und so stabile parodontale Läsionen ohne großen Attachmentverlust entstehen. LPS von *P. gingivalis* kann

nun die Apoptose eben dieser T_H1-Helferzellen bewirken und so einen Überhang an T_H2-Lymphozyten hervorrufen. Diese scheinen die Reifung von Plasmazellen und Bildung nicht-protektiver Immunglobuline sowie Aktivierung von Osteoklasten und histolytischen Enzymen zu fördern, was zur Progression einer entzündlich verlaufenden Parodontolyse führt (Sanderink et al., 2004). In diesem Zusammenhang spielen PGE₂ und RANKL als Induktoren der Osteoklastogenese eine wichtige Rolle (Choi et al., 2005). Eine andere Hypothese postuliert genau das Gegenteil: Hier scheinen T_H1-Lymphozyten die Produktion proinflammatorischer Zytokine wie IL-1 und TNF- α zu induzieren und so den Knochenabbau zu fördern, während Typ 2-Lymphozyten durch die Sekretion von antiinflammatorisch wirkendem IL-4 und IL-10 eine Remission der parodontalen Entzündungssymptomatik bewirken sollen (Taubmann et al., 2001).

Die Mundhöhle stellt praktisch den einzigen Überlebensraum für *P. gingivalis* dar. Dennoch scheint er vereinzelt bei nicht-oralen Infektionen des Hals-Nasen-Ohren-Bereiches, des Thorax oder der Bauchhöhle beteiligt zu sein.

3.2.3 ***Aggregatibacter* (ehemals *Actinobacillus*) *actinomycetemcomitans***

Bei *A. actinomycetemcomitans* handelt es sich um ein kleines, unbewegliches, gramnegatives kokkoides Stäbchen aus der Familie der *Pasteurellaceae*. Unter capnophilen Bedingungen (Zugabe von 5 bis 10 % CO₂) bilden sich beim Wachstum auf Blutagarplatten konvexe Kolonien mit einem sternförmigen Zentrum. Der Keim gehört zur physiologischen Mundflora und findet sich in supra- und subgingivaler Plaque. *A. actinomycetemcomitans* hat besonderes Interesse auf sich gezogen aufgrund seiner Beteiligung an parodontalen Erkrankungen, wobei eine deutlich häufigere Assoziation zu lokal aggressiven Parodontitisformen besteht (Schacher et al., 2007). Bisher sind sechs Serotypen a-f beschrieben (Nørskov-Lauritsen & Kilian, 2006), deren serologische Spezifität durch sechs strukturell und antigenetisch unterschiedliche O-Polysaccharidkomponenten bestimmt wird (Kaplan et al., 2001). Am häufigsten aus parodontalen Läsionen isoliert wird Serotyp b, während d-f eher selten, bei Patienten bestimmter

Bevölkerungsgruppen gar nicht vorgefunden werden (Yang et al., 2004; Teixeira et al., 2006).

A. actinomycetemcomitans produziert eine Reihe an potentiell gewebsschädlichen Metaboliten, welche die Virulenz des Keimes ausmachen. Darunter fallen Strukturen und Substanzen, die für die Besiedlung der Mundhöhle, Beeinträchtigung der Wirtsabwehr, Gewebsdestruktion und Verzögerung des Heilungsprozesses verantwortlich sind. Das Bakterium hat eine hohe Affinität zu pellicelbedeckter Zahnschmelz und kann mit Hilfe von Adhäsinen wie Aae, ApiA und EmaA an epitheliale Zellen binden (Fine et al., 2006) sowie über seine Fimbrien mit anderen Bakterien koaggregieren. Ähnlich wie bei *P. gingivalis* erlaubt eine Invasion in buccale epitheliale Zellen mittels rezeptor-vermittelter Endozytose sich der Wirtsabwehr zu entziehen und die Überlebenschance in dem eigentlich aeroben Milieu der Mundhöhle zu erhöhen (Rudney et al., 2005). Um die Abwehrmechanismen des Wirtes abzuschwächen verfügt der Keim über einige immunsuppressive Proteine und zytotoxische Toxine wie Leukotoxine. Ein besonderer Klon des Bakteriums, der sogenannte JP2-Klon, findet sich überwiegend bei Personen afrikanischer Herkunft und weist die Deletion eines 530bp-Segments in der Promotorregion auf. Dies führt zu einer stark erhöhten Leukotoxinproduktion und macht Personen mit einem JP2-positiven Trägerstatus anfälliger für aggressive Parodontitiden. So konnten Haubek und Kollegen (2004) in einer 2 Jahre dauernden Follow-up-Studie ein erhöhtes Risiko für klinischen Attachmentverlust bei Anwesenheit eines JP2-Klons nachweisen im Vergleich zu Kontrollgruppen. Des Weiteren sind Virulenzfaktoren wie Kollagenasen, Proteasen, Zytotoxine und das LPS von *A. actinomycetemcomitans* verantwortlich für entzündliche sowie gewebsschädigende und -abbauende Prozesse.

Selten ist der Erreger mit Wundinfektionen, Bakteriämien und als Mitglied der HACEK-Gruppe mit infektiösen Endokarditiden assoziiert (Patrel et al., 2004).

3.3 Das menschliche Immunsystem

Die Funktion des Immunsystems besteht darin, den Körper effektiv vor Krankheitserregern und schädlichen Substanzen aus unserer Umgebung zu schützen. Durch ein komplexes Zusammenspiel aus verschiedenen zellulären Bestandteilen und humoralen Mediatoren werden Pathogene identifiziert und eliminiert, wobei aber gleichzeitig körpereigene Gewebe toleriert werden müssen. Dies setzt voraus, dass ein intaktes Immunsystem zwischen „eigen“ und „fremd“ unterscheidet. Diese Reaktion auf potentielle Krankheitserreger wird als Immunantwort bezeichnet. Grundsätzlich kann man die angeborene (unspezifische) von der adaptiven (spezifischen) Immunantwort abgrenzen, wobei für eine erfolgreiche Erregerabwehr beide Systeme eng miteinander interagieren. Das angeborene Immunsystem reagiert als erstes und sehr schnell und ebnet gewissermaßen den Weg zur Aktivierung der adaptiven Immunantwort. Diese wiederum tritt langsamer und später ein, weil hier durch gezieltes Identifizieren eines Krankheitserregers eine für ein jeweiliges Pathogen optimierte Immunantwort ermöglicht wird.

3.3.1 Das angeborene Immunsystem

Entwicklungsgeschichtlich gesehen stellt die angeborene Immunität den älteren Teil des menschlichen Immunsystems dar. Sie bildet die erste Instanz in der Abwehr von Krankheitserregern und ist ab dem Zeitpunkt der Geburt aktiv. Hierbei werden, unabhängig vom eindringenden Krankheitserreger und ohne genauere Identifizierung desselbigen, eine Reihe von Abwehrmechanismen in Gang gesetzt, weshalb dieser Teil der Immunität auch als unspezifisch bezeichnet wird. Die erste mechanische Barriere, die das Eindringen von Mikroorganismen in den Körper verhindern soll, wird aus intakten Körperepithelien (z. B. die Hornschicht der Haut) und anderen Schutzmaßnahmen (z. B. Magensäure und mukoziliäre Clearance) gebildet. Ein weiteres Hindernis stellen von Epithelzellen gebildete antibakterielle Peptide und Moleküle wie das Lysozym in Tränenflüssigkeit und Speichel, Pepsin, Defensine und Cathelicidine dar. Schafft ein Pathogen es dennoch, die zuvor

genannten Barrieren zu überwinden, übernehmen die Zellen des angeborenen Immunsystems die Erregerabwehr. Dazu zählen neben Monozyten, Gewebsmakrophagen und Mastzellen auch Granulozyten, Dendritische Zellen und Natürliche Killerzellen. Während letztere sich aus einer lymphatischen Vorläuferzelle entwickeln, gehen alle anderen Zellgruppen aus einer myeloischen Vorläuferzelle hervor. Eine charakteristische Eigenschaft dieser Zellen ist, dass sie mit einem definierten Repertoire an bestimmten Keimbahn-kodierten Rezeptoren zur Pathogenerkennung ausgestattet sind, den so genannten PRRs, kurz für *pattern-recognition receptors* (Akira et. al, 2006). Mit diesen Rezeptoren, die auch die Gruppe der Toll-like Rezeptoren umfasst, werden konservierte Molekülmuster auf der Oberfläche eingedrungener Mikroorganismen erkannt und so die Präsenz eines Pathogens signalisiert. Diese Muster, zu welchen beispielsweise das Lipopolysaccharid (LPS) der Zellmembran gramnegativer oder die Lipoteichonsäure (LTA) aus der Zellwand grampositiver Bakterien zählen, werden unter dem Begriff *pathogen associated molecular patterns* (PAMPs) zusammengefasst (Kimbrell und Beutler, 2001) und kommen auf Mikroorganismen vor, nicht aber auf körpereigenen Wirtszellen, was eine Unterscheidung zwischen „eigen“ und „fremd“ erlaubt.

Nach Pathogenerkennung durch einen PRR werden bestimmte Effektormechanismen aktiviert, darunter auf zellulärer Ebene die Phagozytose und auf humoraler Ebene das Komplementsystem. Bei der Phagozytose werden die Mikroorganismen in einem aktiven Prozess von Makrophagen oder neutrophilen Granulozyten aufgenommen und durch die Produktion toxischer Metabolite lysiert. Außerdem kommt es zu einer Sekretion proinflammatorischer Zytokine, die wiederum essentiell sind für eine Kommunikation der Zellen untereinander. Die Aktivierung des Komplements, einem System aus kaskadenartig hintereinander geschalteten Enzymen, führt neben der Mobilisierung von Effektorzellen und Opsonierung von Pathogenen letztendlich ebenfalls zur Erregereliminierung. Beide Mechanismen äußern sich als akute Entzündungsreaktion, die in der Regel wenige Stunden bis Tage nach der Erregerexposition beginnt. Das angeborene Immunsystem wird somit unmittelbar nach Erregerkontakt aktiviert. Es erkennt

zwar eine Vielzahl an Pathogenen „nur“ unspezifisch anhand von konservierten Molekülmustern und kann auch kein immunologisches Gedächtnis ausbilden, dennoch trägt es entscheidend zur Erregerabwehr bei und stellt eine wichtige Weiche in der Induktion der adaptiven Immunantwort dar (Janeway, 2009; Welsch, 2006).

3.3.2 Das erworbene Immunsystem

Ist das angeborene Immunsystem nicht in der Lage, einen eingedrungenen Krankheitserreger zu eliminieren, so greift das erworbene (adaptive) Immunsystem ein. Entwicklungsgeschichtlich gesehen ist es der jüngere Teil der Immunantwort und findet sich bei höher entwickelten Organismen. Im Gegensatz zum angeborenen Immunsystem wird das erworbene bei Primärkontakt mit einem Pathogen erst nach vier bis sieben Tagen aktiviert. Charakteristisch für die adaptive Immunantwort ist, dass hier das Pathogen nicht anhand von konservierten Molekülmustern, sondern anhand von ganz spezifischen Antigenen erkannt wird. Aufgrund der enormen Vielzahl an Antigenen ist für ihre Erkennung eine entsprechende Vielfalt an verschiedensten Rezeptorstrukturen nötig. Diese Diversität wird durch somatische Rekombination variabler Genfragmente gewährleistet, in deren Folge ein großes Repertoire an spezifischen B- und T-Zell-Rezeptoren gebildet wird. Die Antigenerkennung durch einen einzelnen Lymphozyten führt zu dessen Zellteilung, sodass ein Zellklon entsteht, in dem alle Zellen mit einem identischen Antigenrezeptor gleicher Spezifität ausgestattet sind. Durch diese klonale Expansion wird sichergestellt, dass genügend Effektorzellen zur Verfügung stehen und Krankheitserreger zielgerichtet erkannt und effizient eliminiert werden können. Das erworbene Immunsystem ist außerdem in der Lage, ein immunologisches Gedächtnis auszubilden, welches bei Reexposition mit dem gleichen Mikroorganismus eine schnellere und effizientere Immunantwort ermöglicht.

Die wesentlichen Akteure der erworbenen Immunität sind Lymphozyten, die aus einem gemeinsamen lymphatischen Vorläufer entstehen. Nach ihrem Reifungsort

kann man zwischen B-Zellen (*bone marrow* = Knochenmark) und T-Zellen (*Thymus*) unterscheiden (Janeway, 2009).

T-Lymphozyten sind vor allem für die zelluläre Immunität von Bedeutung und können anhand ihres Korezeptors in $CD4^+$, $CD8^+$ und regulatorische T-Zellen (T_{reg}) unterteilt werden. Ihre Aktivierung erfolgt durch antigenpräsentierende Zellen (APC), zu denen Dendritische Zellen (DCs), Makrophagen und B-Zellen zählen. Ihre Aufgabe ist es, Antigenfragmente an ihrer Oberfläche zu binden, diese über MHC-Moleküle (*major histocompatibility complex*) naiven T-Zellen zu präsentieren und letztere auf diese Weise mit Hilfe kostimulatorischer Signalmoleküle (B7-Moleküle) zu aktivieren. Dabei werden Fragmente von Antigenen intrazellulären Ursprungs, vor allem intrazelluläre Bakterien und Viren, an MHC-I-Moleküle gebunden $CD8^+$ T-Zellen präsentiert, die zu zytotoxischen T-Zellen ausdifferenzieren und eine Zerstörung der virusinfizierten Zelle bewirken. $CD4^+$ T-Zellen hingegen treten über MHC-II-Moleküle mit Antigenfragmenten extrazellulärer Pathogene in Kontakt (Welsch, 2006) und differenzieren unter anderem zu T-Helferzellen, die die Funktion von Makrophagen und B-Zellen unterstützen. So produzieren T_H1 -Zellen Zytokine wie IFN- γ (Wenner et al., 1996) und aktivieren Makrophagen, während T_H2 -Zellen durch IL-4 die Differenzierung von B-Zellen zu Antikörper-produzierenden Plasmazellen induzieren und somit auch zur humoralen Immunantwort beitragen.

Als weitere Subpopulation der T-Zellen sollen die $CD4^+$ - T_H17 -Zellen und die regulatorischen T-Zellen (T_{reg}) Erwähnung finden. T_H17 -Zellen fördern die Aktivierung, Rekrutierung und Migration von neutrophilen Granulozyten zu Entzündungsherden und scheinen außerdem aufgrund ihrer Spezifität für Auto-Antigene ein hohes pathogenes Potential zu besitzen und entscheidend zur Entstehung schwerer Entzündungen und Autoimmunreaktionen beizutragen (Bettelli et al., 2007). Die Funktion der regulatorischen T-Zellen ist gegenteiliger Natur: Sie kontrollieren das Immunsystem, indem sie eine exzessive Immunantwort unterdrücken und so Autoimmunerkrankungen entgegenwirken. Die inhibitorischen Effekte der T_{reg} beschränken sich nicht nur auf das erworbene

Immunsystem (B- und T-Lymphozyten), sondern beeinflussen auch Zellen der angeborenen Immunität wie Dendritische Zellen, Monozyten und Makrophagen (Taams et al., 2005). Auf diese Weise werden immunologische Selbsttoleranz und Homöostase aufrechterhalten (Ohkura & Sakaguchi, 2010).

B-Lymphozyten sind die Träger der spezifischen humoralen Immunität. Zu ihrer Aktivierung tragen ebenfalls im Wesentlichen zwei Signale bei: Zum einen erkennen und binden B-Zellen im Gegensatz zu T-Zellen ihr Antigen direkt über den B-Zell-Rezeptor (BCR), einem Antikörper der Klasse IgD auf ihrer Oberfläche. Des Weiteren wird das Antigen in die Zelle aufgenommen und in Fragmente zerlegt, welche wiederum eine T-Helferzelle zur Produktion B-Zell-stimulatorischer Zytokine wie IL-4 und der Expression des stimulatorischen Effektormoleküls CD40L anregt. Diese beiden Signale bewirken eine Differenzierung und Reifung der B-Zelle zur Plasmazelle, die Immunglobuline bzw. Antikörper (AK) produziert. Alle von einer Plasmazelle sezernierten AK haben eine identische Antigenspezifität und vermitteln als humorale Effektormoleküle bestimmte Mechanismen wie beispielsweise Komplementaktivierung oder Opsonierung zur Eliminierung extrazellulärer Erreger. Alternativ können sich aktivierte B-Zellen auch zu Gedächtniszellen entwickeln und häufig eine lebenslange Immunität gegen ein spezifisches Antigen garantieren (Janeway et al., 2008; Vollmar et al., 2005).

3.3.3 Toll-like Rezeptoren

Neben vielen anderen gehören Toll-like Rezeptoren, eine Gruppe phylogenetisch konservierter Transmembranproteine, zur großen Familie der PRRs (Anderson, 2000). Sie sind von entscheidender Bedeutung für die Erkennung und Abwehr von Mikroben und gehören dem angeborenen Immunsystem an.

3.3.3.1 Die Entdeckung des Toll-Proteins

Ihre Geschichte geht zurück auf die Entdeckung des Proteins *Toll* in der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster*, dessen essentielle Funktion erstmals in der dorso-ventralen Ausrichtung in der Embryonalentwicklung beschrieben wurde (Hashimoto et al., 1988). *Toll* wurde als Transmembranprotein identifiziert und es stellte sich heraus, dass es auch eine entscheidende Rolle in der Abwehr mykotischer Infektionen der adulten Fliege inne hat (Lemaitre et al., 1996). Dies gab Anlass dazu, die Relevanz von *Toll* für die Immunität genauer zu erforschen. Das Protein besteht aus einer großen extrazytoplasmatischen, Leucin-reichen Domäne und einer kleineren zytoplasmatischen Domäne, die in ihrem Aufbau den IL-1 Rezeptoren ähnelt und daher auch Toll/IL-1-Rezeptor- (TIR-) Domäne genannt wird (Akira et al., 2004). Die Aktivierung von Toll erfolgt durch extrazelluläre Liganden, die eine Induktion bestimmter Transkriptionsfaktoren der Rel-Familie bewirken. Über eine Signalkaskade wird schließlich die Produktion antimikrobieller Peptide und Zytokine sowie der Aktivierung makrophagen-ähnlicher Zellen vermittelt (Belvin & Anderson, 1996).

3.3.3.2 Toll-like Rezeptoren – Strukturhomologe des Toll-Proteins

Im Jahr 1997 wurden homologe Strukturen des *Drosophila*-Moleküls bei Säugetieren und somit auch im humanen System entdeckt, die aufgrund ihrer Ähnlichkeit mit Toll als Toll-like Rezeptoren (TLRs) bezeichnet wurden (Medzhitov et al., 1997). Mit der Zeit wurde ihre essentielle Rolle als Mediatoren der angeborenen Immunantwort erkannt. Die erstaunlichen Analogien in der Erregerabwehr bei primitiven Insekten und Säugetieren lassen annehmen, dass die Signalwege phylogenetisch sehr alt sind. Die Tatsache, dass der Abwehrmechanismus bis heute in Säugetieren erhalten ist, legt seine relevante Funktion für das angeborene Immunsystem dar.

Bis heute sind elf Mitglieder der Rezeptor-Familie im humanen System bekannt, wobei nicht von allen die genauen Liganden identifiziert wurden. Die TLRs werden

von einer großen Vielfalt an verschiedenen Zelltypen des Immunsystems exprimiert, unter anderem Epithelzellen, Monozyten/Makrophagen, DCs als auch B- und T-Zellen. Innerhalb einer Zelle sind die TLRs unterschiedlich verteilt: während TLR1, TLR2 und TLR4 bis TLR6 auf der Zelloberfläche exprimiert werden, sind TLR3 und TLR7 bis TLR9 in der Membran intrazellulärer Kompartimente wie z. B. Endosomen lokalisiert (siehe Abbildung 1).

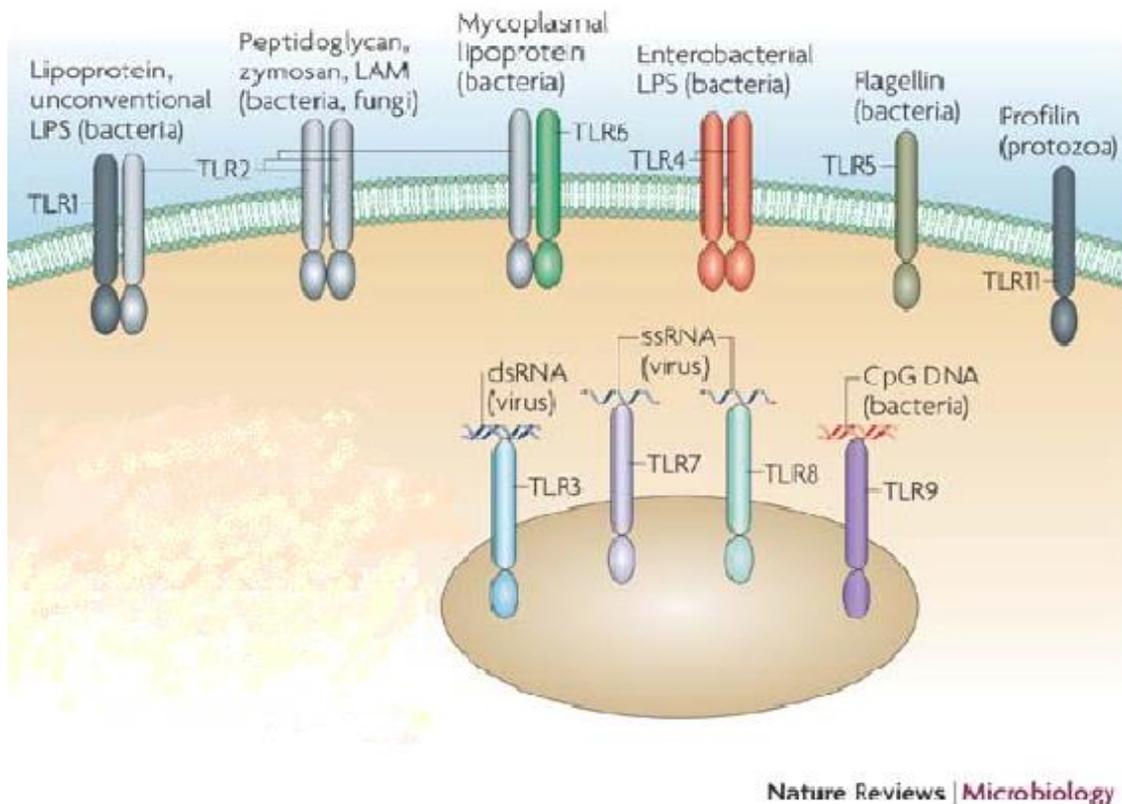


Abbildung 3-1: Struktur, Lokalisation und Liganden der TLRs.

Modifiziert nach Kaufmann, 2007.

Die verschiedenen Toll-like Rezeptoren unterscheiden sich außerdem durch ihre Ligandenspezifität. Die Funktion der Toll-like Rezeptoren liegt in der Signalübertragung und Induktion des angeborenen Immunsystems, was sich nicht selten in einer Entzündungsreaktion ausdrückt.

Die folgende Tabelle gibt einen Überblick über die wichtigsten TLRs und ihre Liganden.

Tabelle 1: Die wichtigsten TLRs und ihre Liganden.

TLR	Lokalisation	Ligand/PAMP	Herkunft	Referenz
TLR1	Zelloberfläche	<i>(kooperiert mit TLR2)</i> Triacyllipopeptid	Bakterien und Mykobakterien	Takeuchi et al. (2002)
		Lösliche Faktoren	<i>N. meningitidis</i>	Wyllie et al. (2002)
TLR2	Zelloberfläche	Lipoteichonsäure (LTA)	Grampositive Bakterien	Schwandner et al. (1999)
		Peptidoglykan	Grampositive Bakterien	Schwandner et al. (1999)
		Lipoarabinomannan (LAM)	Mykobakterien	Means et al. (1999)
		Phenol-soluble modulín	<i>S. epidermidis</i>	Hajjar et al. (2001)
		Atypisches LPS	<i>L. interrogans</i>	Werts et al. (2001)
TLR3	Intrazelluläres Kompartiment	dsDNA	Viren	Alexopoulou et al. (2001)
TLR4	Zelloberfläche	LPS	Gramnegative Bakterien	Poltorak et al. (1998); Hoshino et al. (1999)
		Protein F	Respiratory syntyial virus (RSV)	Kurt-Jones et al. (2000)
		Hitzeschockprotein 70 (HSP70)	Wirtszellen	Vabulas et al. (2002)
		Fibrinogen	Wirtszellen	Smiley et al. (2001)
TLR5	Zelloberfläche	Flagellin	diverse gram-pos./-neg. Bakterien	Hayashi et al. (2001)
TLR6	Zelloberfläche	<i>(kooperiert mit TLR2)</i> MALP2 <i>(Macrophage-activating lipopeptide 2 = Diacyllipopeptid)</i>	Mykoplasmen	Takeuchi et al. (2001)
TLR7	Intrazelluläres Kompartiment	Guanosin- und Uridin-reiche ssRNA	Viren	Diebold et al. (2004); Heil et al. (2004)
TLR8	Intrazelluläres Kompartiment	Guanosin- und Uridin-reiche ssRNA	Viren	Heil et al. (2004)
TLR9	Intrazelluläres Kompartiment	Unmethylierte CpG-DNA	Bakterien und Viren	Hemmi et al. (2000)
TLR10	Intrazell. Komp.	nicht bekannt	nicht bekannt	Takeuchi et al. (2010)
TLR11	Intrazelluläres Kompartiment	Profilin	<i>Toxoplasma gondii</i>	Pifer et al. (2010)

3.3.3.3 Verschiedene Toll-like Rezeptoren und ihre Liganden

Aufgrund der strukturellen Zusammensetzung der Liganden können innerhalb der TLRs Unterklassen unterschieden werden. Von den bisher bekannten TLRs sind TLR2 und TLR4 am besten in ihrer Funktion untersucht.

Als erstes Mitglied der TLR-Familie wurde TLR4 entdeckt, der eine wesentliche Funktion bei der Abwehr von Infektionen mit gram-negativen Bakterien erfüllt. TLR4 erkennt das Lipopolysaccharid (LPS), wobei die immunstimulatorische Wirkung vor allem durch das Lipid A des LPS vermittelt wird (Hoshino et al., 1999). Für die Ligandenbindung ist eine Interaktion des TLR4 mit dem Plasmamembranprotein CD14 und dem LPS-bindenden Protein (LBP) nötig, die wiederum einen Komplex mit dem zusätzlich rekrutierten MD-2 bilden. Des Weiteren wurde gezeigt, dass TLR4 auch in die Erkennung des Respiratory Syncytial Virus (RSV) (Kurt-Jones et al., 2000) und endogener Aktivatoren wie HSP60 und HSP70 (Vabulas et al., 2002) oder Fibrinogen involviert ist.

In der Regel liegen die Toll-like Rezeptoren in aktiver Form als Homodimere vor, während TLR1 und TLR6 Heterodimere mit TLR2 bilden. Diese funktionelle Kooperation ermöglicht TLR2 das Erkennen eines sehr großen Spektrums an mikrobiellen Strukturen. So können die Heterodimere nicht nur zwischen Triacyl- und Diacyllipopeptid als Liganden differenzieren, sondern auch durch Kollaboration mit anderen Rezeptorstrukturen Zymosan aus Hefen erkennen. (Takeuchi et al., 2001 und 2002; Takeda und Akira, 2005).

TLR5 ist ein Vertreter der Rezeptorfamilie, der durch das Protein Flagellin grampositiver als auch gramnegativer Bakterien aktiviert wird (Hayashi et al., 2001).

Auch Nukleinsäure-ähnliche Strukturen können als PAMP fungieren und werden von der TLR9-Subfamilie, bestehend aus TLR7, TLR8 und TLR9, sowie von TLR3 detektiert. Im Gegensatz zu den bisher beschriebenen Rezeptoren finden sich diese TLRs in der zytoplasmatischen Membran intrazellulärer endosomal-lysosomaler Kompartimente und erkennen Nukleinsäuren erst nach der

vollständigen Lyse der phagozytierten Mikroorganismen. Dies stellt sozusagen einen Schutzmechanismus für den Wirt dar und soll gewährleisten, dass körpereigene DNA nicht als fremd erkannt wird. TLR3 spielt eine Rolle bei der Erkennung viraler ssRNA (Alexopoulou et al., 2001), während TLR7 und TLR8 virale Guanodin- und Uridin-reiche ssRNA wie beispielsweise des HI-Virus oder des Influenzavirus detektieren (Diebold et. al, 2004; Heil et al., 2004).

3.3.3.4 Die Signalkaskaden der Toll-like Rezeptoren

Die Bindung eines spezifischen Liganden an einen Toll-like Rezeptor führt zu dessen Dimerisierung und aktiviert eine Reihe nachgeschalteter Signalkaskaden (Aderem & Ulevitch, 2000). Dazu ist wiederum die Rekrutierung bestimmter Adaptermoleküle essentiell, die allesamt eine intrazelluläre TIR-Domäne besitzen, welche mit der TIR-Domäne der TLRs interagieren kann. Bis dato sind vier positiv-regulatorische Adaptermoleküle bekannt: MyD88, TIRAP, TRIF und TRAM (Kawai et al., 2007). Als fünftes Mitglied der TIR-Domäne enthaltenden Adaptermoleküle ist SARM zu erwähnen, das im Gegensatz zu den anderen vier negativ regulatorische Effekte besitzt (O'Neill et al., 2007).

Generell kann man zwischen einer MyD88-abhängigen und einer MyD88-unabhängigen Signalkaskade differenzieren. Zur grafischen Veranschaulichung der nachfolgend näher beschriebenen Signalkaskaden kann Abb. 2 herangezogen werden.

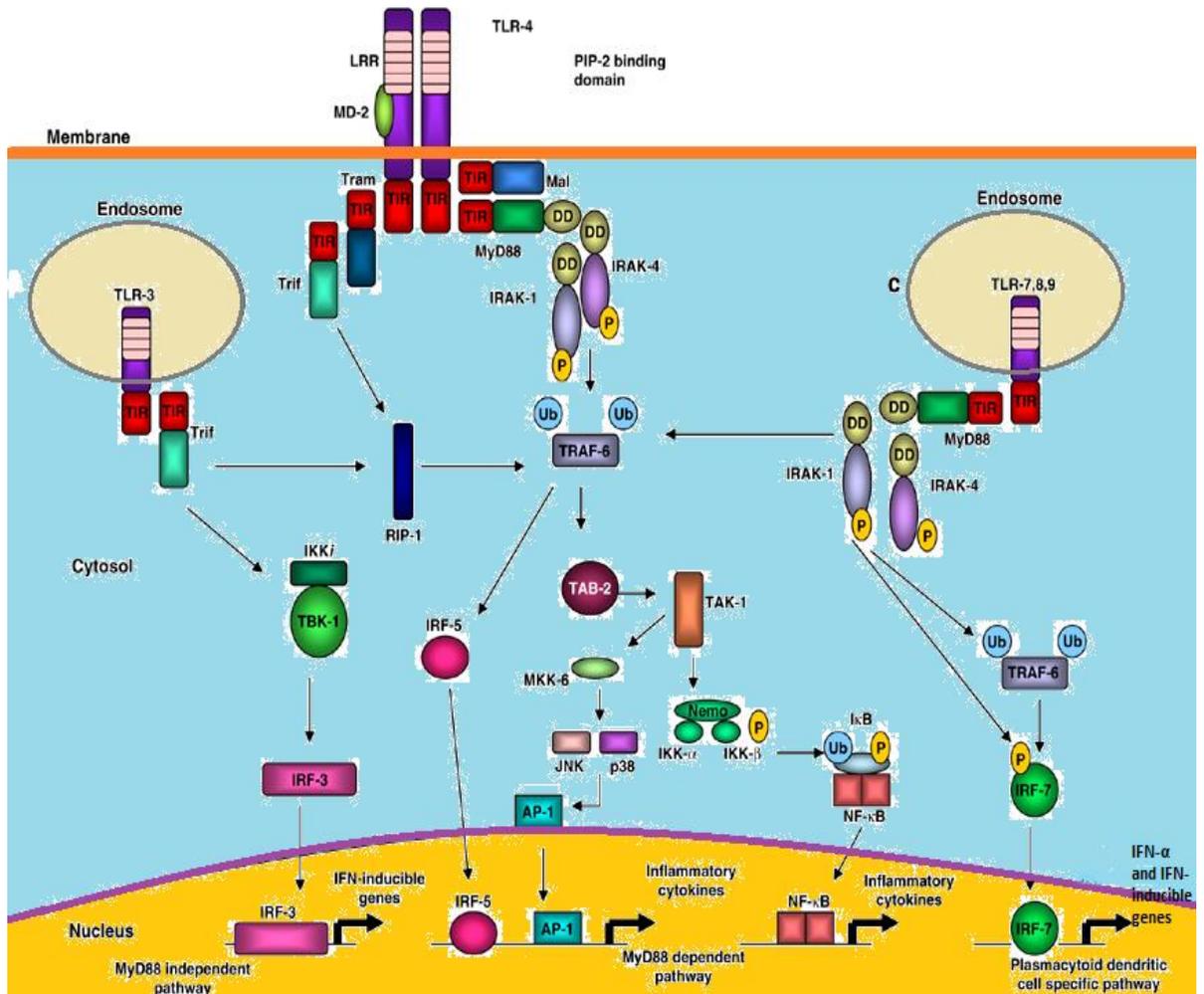


Abbildung 3-2: Die Signalkaskaden der TLRs.

Modifiziert nach Watters et al., 2007.

3.3.3.4.1 MyD88-abhängige Signalkaskade

MyD88 fungiert als Universaladapter. Er wird von allen TLRs mit Ausnahme von TLR3 genutzt und bindet mit seiner C-terminalen TIR-Domäne an die entsprechende Domäne des TLRs. Nach dessen Stimulation wird IRAK4, ein nachgeschaltetes Signalmolekül mit Kinaseaktivität, durch Interaktion der sogenannten „death“-Domänen beider Moleküle, rekrutiert, was wiederum essentiell ist für die Aktivierung einer weiteren Kinase, IRAK1. Nach Phosphorylierung der Kinasen dissoziieren diese von MyD88 ab und treten in Interaktion mit TRAF6, einem Adaptermolekül mit Ligase-Aktivität, das einen Komplex mit Ubc13/TAK bildet. Von hier aus gabelt sich die Signalkaskade in zwei weitere mögliche Zweige auf, die beide eine Induktion von Transkriptionsfaktoren

bedingen. Der eine Weg führt über eine MAP-Kinase zur Aktivierung von Aktivator-Protein 1 (AP1). Über den zweiten, etwas längeren Signalweg wird NFκB aktiviert. Dieser Transkriptionsfaktor liegt normalerweise in inaktivierter Form an seinen Inhibitor IκB gebunden im Zytoplasma vor. Durch den TAK1-Komplex wird die Phosphorylierung von IκB katalysiert, was den Inhibitor in seiner Funktion abschwächt und den Weg für NFκB in den Zellkern frei gibt (Takeda et al., 2005). Dort induzieren die Transkriptionsfaktoren die Produktion inflammatorischer Zytokine. Die zentrale und somit unabkömmliche Funktion von MyD88 in dieser Signalkaskade wurde von verschiedenen Arbeitsgruppen in Versuchen mit MyD88-defizienten Mäusen gezeigt: So konnte beispielsweise weder auf Stimulation mit dem Endotoxin LPS (Kawai et al., 1999) noch mit CpG-DNA (Schnare et al., 2000) eine Produktion inflammatorischer Zytokine wie IL-6 oder TNF-α beobachtet werden.

Bei der Suche nach mit MyD88 strukturell verwandten Molekülen stieß man auf ein weiteres Adaptermolekül mit einer TIR-Domäne: *Mal* (*MyD88-adaptor-like*), auch TIRAP (*TIR domain-containing adaptor protein*) genannt. Es ist entscheidend an der MyD88-abhängigen Signalkaskade ausgehend von TLR2 und TLR4 beteiligt (Fitzgerald et al., 2001; Yamamoto et al., 2002). Auch die zentrale Rolle dieses Adaptermoleküls wurde mit TIRAP knockout-Mäusen enthüllt, wo, ähnlich zu MyD88-defizienten Zellen, keine Zytokinproduktion nach LPS-Stimulation nachzuweisen war.

3.3.3.4.2 MyD88-unabhängige Signalkaskade

Trotz mangelnden Nachweises einer Zytokinproduktion in MyD88-defizienten Mäusen konnte dennoch eine Aktivierung von NFκB beobachtet werden (Kawai et al., 1999), was stark Anlass zur Annahme gab, dass ein MyD88-unabhängiger Signalweg existieren muss. In weiteren Studien konnte gezeigt werden, dass dieser alternative Weg, ausgehend von TLR3 und TLR4, nicht nur zu einer „*late phase*“-NFκB-Induktion führt, sondern auch die Aktivierung eines weiteren Transkriptionsfaktors IRF3 (*interferon-regulatory factor 3*) und damit die

Produktion von IFN- β bedingt. In Folge kommt es über den *signal transducer and activator of transcription* (STAT1) zu einer Expression IFN- β -induzierbarer Gene in Makrophagen (Toshchakov et al., 2002). Bei der Suche nach dem entscheidenden Signalmolekül in diesem Zusammenhang wurde das *TIR domain containing adaptor inducing IFN- β* (TRIF), auch *TIR domain containing adaptor molecule 1* (TICAM-1) bezeichnet, als Adaptermolekül identifiziert. TRIF-defiziente Mäuse zeigten nach Stimulation der TLRs 3 bzw. 4 weder eine Aktivierung von IRF-3 noch eine IFN- β -Induktion. Daraus ließ sich rückschließen, dass TRIF eine zentrale Funktion in der TLR3- und TLR4-Signalkaskade der Immunantwort inne hat (Hoebe et al., 2003; Yamamoto et al., 2003).

Als weiteres Adaptermolekül im MyD88-unabhängigen Weg wurde das *TRIF-related adaptor molecule* (TRAM) oder TICAM-2 entdeckt. Wie TRIF führt auch TRAM zu einer Aktivierung der Transkriptionsfaktoren IRF-3 und NF κ B. Im Gegensatz zu TRIF ist TRAM jedoch nur in die Signalkaskade des TLR 4 involviert, wie Versuche mit TRAM knockout-Mäusen erkennen ließen (Fitzgerald et al., 2003). Demnach ist TRAM unabdingbar in der TLR4-vermittelten MyD88-unabhängigen/TRIF-abhängigen Signalkaskade.

In Versuchen mit Doppel-Knockout-Mäusen konnte man trotz einer Defizienz sowohl des TRIF- als auch des TRAM-Moleküls über Stimulation von TLR2, TLR7 und TLR9 eine Induktion proinflammatorischer Zytokine beziehungsweise eine TLR4-induzierte Phosphorylierung von IRAK-1 nachweisen. Bei letzterem blieb jedoch die Zytokinproduktion aus, was die Überlegung zuließ, dass unabhängig von den beiden Adaptermolekülen TRIF und TRAM über MyD88 eine Entzündungsreaktion ausgelöst werden kann. Jedoch ist für eine TLR4-induzierte proinflammatorische Zytokinproduktion sowohl die Aktivierung der MyD88-abhängigen als auch der -unabhängigen Kaskade erforderlich.

3.3.3.4.3 Negativ-regulatorische Mechanismen in der TLR-Signalkaskade

Werden proinflammatorische Zytokine als Folge einer TLR-Stimulation und NFκB-Aktivierung im Übermaß produziert, kann dies schwere systemische Entzündungsantworten verursachen, die mit hohen Mortalitätsraten assoziiert sind (Liu & Malik, 2006). So kann beispielsweise die systemische Freisetzung von LPS zu einem Endotoxin-Schock führen, in deren Folge es zu einem septischen Krankheitsbild mit hohem Fieber und Störung der Blutgerinnung kommen kann. Um eine derart unkontrollierte Entzündungsantwort einzudämmen, hat der Wirtsorganismus protektive Mechanismen entwickelt, die die Immunantwort entsprechend anpassen und regulieren sollen. Man bezeichnet dies als Endotoxin-Toleranz. Es sind verschiedene Moleküle identifiziert worden, die eine negativ-regulatorische Funktion in der TLR-Signalkaskade zu haben scheinen. So verhindert IRAK-M, ein intrazelluläres Molekül und Mitglied der IRAK Familie ohne Kinaseaktivität, die Dissoziation von IRAK-1/IRAK-4 von MyD88 und unterbindet somit den weiteren Signalweg (Kobayashi et al., 2002). Weiterhin existieren membrangebundene Proteine wie SIGIRR (*single immunoglobulin IL-1 receptor-related molecule*) oder T1/ST2 (Wald et al., 2003; Brint et al., 2004), die eine Endotoxin-Toleranz bewirken. Zytokine können aber auch selbst eine überschießende Immunantwort unterbinden, indem sie über ein negatives Feedback sogenannte SOCS (*suppressor of cytokine signalling*) aktivieren (Alexander 2002). Abschließend sei als negativ-regulatorischer Mechanismus die Ubiquitinierung genannt. Hierbei wird über ein Degradationssignal der proteasomale Abbau bestimmter Proteine herbeigeführt und so Dauer und Intensität eines TLR-induzierten Signals kontrolliert (Chuang et al., 2004).

3.3.3.5 Toll-like Rezeptor 9 und die Bedeutung bakterieller DNA als Stimulus für das angeborene Immunsystem

Im humanen System wird TLR9 hauptsächlich auf B-Zellen und pDCs exprimiert, wohingegen murine TLR9 auch auf Monozyten, Makrophagen und DCs gefunden werden (Bauer et al., 2008). Die intrazelluläre Lokalisation des Rezeptors soll einer Aktivierung des Immunsystems durch körpereigene DNA vorbeugen (Peter

et al., 2007). Wie aus obiger Tabelle ersichtlich wird, ist der Hauptligand des TLR9 ein CpG-Dinukleotid aus bakterieller oder auch viraler DNA. Dabei handelt es sich um eine unmethylierte Cytosin (C)- und Guanin (G)-reiche Sequenz in Nukleinsäuren, ein sogenanntes CpG-Motiv. Lange Zeit war man davon ausgegangen, dass prokaryotische DNA immunologisch inert wäre, bis man in den Neunziger Jahren ihre Bedeutung als Aktivator immunologischer Zellen entdeckte (Lipford et al., 1998). Im humanen Genom lassen sich ebenfalls ähnliche CpG-Motive finden. Diese kommen jedoch in einer viel geringeren Anzahl vor und sind zudem methyliert, was die Abgrenzung gegenüber einer bakteriellen Infektion ermöglicht (Hemmi et al., 2000).

Es gibt synthetische Oligodeoxynukleotide (CpG-ODN), die CpG-Motive enthalten und die immunstimulatorischen Effekte bakterieller DNA (bDNA) als PAMP imitieren können (Bauer et al., 2001). Das hexamere Molekül setzt sich zusammen aus einem zentralen CpG-Dinukleotid, das von 5' Purinen und 3' Pyrimidinen flankiert ist (Krieg et al., 1995). Hemmi und Kollegen (2000) konnten zeigen, dass eine Stimulation mit CpG-DNA in TLR9-defizienten Mäusen keine Produktion inflammatorischer Zytokine bewirkt, diese somit immun gegen ein CpG-induziertes Schocksyndrom sind. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass TLR9 eine wichtige Rolle in der Erkennung bDNA einnimmt.

Mittlerweile sind vier Hauptklassen (Klassen A bis C und P) der CpG-ODN beschrieben worden, die sich sowohl in ihrem strukturellen Aufbau als auch ihrer funktionellen Auswirkung unterscheiden (Meng et al., 2011).

Der Ligand wird mittels Endozytose aufgenommen, woraufhin eine endosomal-lysosomale Reifung als Voraussetzung für eine spezies- beziehungsweise sequenzspezifische CpG-Erkennung erfolgt (Wagner, 2004). Diese endosomale Azidifikation ist nicht nur essentiell für eine Aktivierung nachgeschalteter Signalkaskaden durch spezifische Liganden (Häcker et al., 1998), sondern ermöglicht zudem eine Abgrenzung wirtseigener DNA von fremder DNA (Blasius & Beutler, 2010). In ruhenden Immunzellen ist TLR9 im Endoplasmatischen

Retikulum (ER) lokalisiert und transloziert erst nach Stimulation auf bisher noch nicht genauer beschriebenen Wege in das frühe endosomal-lysosomale Kompartiment, wo er unmethylierte CpG-Dinukleotide bakterieller und viraler DNA erkennt und bindet (Latz et al., 2004). Erst nach dieser Translokation kommt es zur Aktivierung der TLR9-Signalkaskade. Diese Hypothese wird durch die Beobachtung unterstützt, dass nach einer CpG-Induktion in TLR9-Wildtyp-Mäusen bestimmte Zytokine wie IL12p40 später detektiert werden können als beispielsweise nach einer Stimulation mit LPS (Hemmi et al., 2000). Generell führt die Stimulation von TLR9 über Induktion des Transkriptionsfaktors NF κ B zur Expression immunmodulatorischer Gene und somit zur Produktion proinflammatorischer Zytokine, wie später näher beschrieben wird. In diesem Zusammenhang zeigten Nonnenmacher und Kollegen (2003), dass die bDNA verschiedener periodontopathogener Keime die IL-6 Produktion in primären humanen Gingivafibroblasten (HGFs) induziert und postulierten damit die Bedeutung des TLR9 in der Pathogenese der Parodontitis. Das pathogene Potential der unterschiedlichen Parodontalkeime für die Rezeptor-Aktivierung ist dabei abhängig vom individuellen CG-Gehalt des jeweiligen Keimes (Dalpke et al., 2006). Darüber hinaus wurde eine erhöhte TLR9-Expression in erkranktem Parodontalgewebe im Vergleich zu gesunden Gewebeproben beobachtet, was die Rolle von TLR9 und seinen Liganden in der Pathogenese der Parodontitis nochmals unterstreicht (Kajita et al., 2007).

3.3.3.6 Suppressive Oligodeoxynukleotide mit inhibitorischer Wirkung auf die CpG-induzierte Immunantwort

Verschiedenen Autoren haben beschrieben, dass TLR9 durch Erkennung Chromatin-assoziiierter Strukturen und Aktivierung autoreaktiver B-Zellen durch körpereigene DNA in die Pathogenese verschiedener Autoimmunerkrankungen wie rheumatoide Arthritis oder SLE involviert zu sein scheint (Viglianti et al., 2003; Boulé et al., 2004). Aufgrund dieser Zusammenhänge hat sich großes Interesse an CpG-DNA-Antagonisten oder TLR9-Inhibitoren entwickelt. Erste Erkenntnisse diesbezüglich wurden von Krieg und Kollegen (1998) gewonnen, die beobachteten, dass ein bestimmter Serotyp adenoviraler DNA die Aktivierung des

Immunsystems durch bDNA verhindern kann. Auch Methylierung der CpG-Motive oder Guanodin-reiche Sequenzen sollen die immunstimulatorischen Effekte bDNA stören (Nonnenmacher et al., 2003). Diese Eigenschaften erfüllt auch ein synthetisches, inhibitorisches Oligodeoxynukleotid, welches seine Wirkung durch Unterbindung der Kollokalisierung von Rezeptor und Ligand im Endosom entfalten soll (Klinman et al., 2003). Dieses sogenannte G-ODN ist charakterisiert durch eine poly-G Sequenz und enthält kein stimulatorisches CpG-Motiv (Peter et al., 2007). Es wurden vier Gruppen suppressiver ODNs beschrieben, die sich hinsichtlich zellulärer Aufnahme, TLR9-Spezifität und Effektivität unterscheiden. Dabei scheint Gruppe I, bestehend aus kurzen Guanodin-reichen ODNs, durch einen direkten kompetitiven Antagonismus die besten Effekte spezifischer TLR9-Inhibition zu besitzen (Trieu et al., 2006). Es konnte gezeigt werden, dass G-ODN alleine keine stimulatorische Wirkung besitzt und nicht nur *in vitro*, sondern auch *in vivo* die CpG-induzierte Produktion inflammatorischer Zytokine wie TNF- α und IL-12p40 in murinen Makrophagen und DCs beziehungsweise IFN- α in humanen pDCs supprimiert (Peter et al., 2007). Diese Beobachtungen legen die Schlussfolgerung nahe, dass G-ODN eingesetzt werden kann, um überschießende TLR9-Aktivität *in vivo* spezifisch zu blockieren, was einen Ansatz in der Therapie CpG-induzierter Autoimmunerkrankungen und Parodontitis darstellen könnte.

3.3.3.7 Die Bedeutung von TLR9 im mukosalen Immunsystem

Tagtäglich ist der Körper verschiedensten Mikroorganismen ausgesetzt, die vor allem an Schleimhäuten der Mundhöhle, des Gastrointestinaltraktes, der oberen und unteren Atemwege sowie des Genitaltraktes eine ideale Kontaktfläche finden. Bei den meisten Bakterien handelt es sich um Kommensale, deren Anwesenheit bis zu einem gewissen Grad keine nachteiligen Effekte für den Wirt birgt. Dennoch kann vor allem im Bereich der Mundhöhle und des Darmes die residente Mikroflora, deren Anzahl 10^{14} Keime aus mehr als 500 verschiedenen Spezies beträgt (Artis 2008; Sonneburg et al., 2004), eine massive antigene Herausforderung für den Wirtsorganismus darstellen und unter bestimmten

Bedingungen (beispielsweise Störung der physiologischen Gewebefunktion im Rahmen einer Antibiotikatherapie oder ein Immundefekt) eine ungewollte Aktivierung des mukosalen Immunsystems bewirken. Damit diese Aktivierung nicht unkontrolliert erfolgt und zu übersteigerten Immunantworten sowie daraus resultierenden Autoimmunerkrankungen führt, ist eine gewisse Hyposensibilität des mukosalen Immunsystems gegenüber der Mikroflora erforderlich. Die Unterscheidung zwischen „eigen“ und „fremd“ ist dabei essentiell, um ein gesundes Gleichgewicht zwischen Toleranz gegenüber harmlosen Kommensalen und Eliminierung von Pathogenen beziehungsweise pathogen gewordenen Kommensalen, die die epitheliale Barriere überwunden haben, zu gewährleisten. Der Wirtsorganismus hat dazu im Laufe der Evolution verschiedene Schutzmechanismen entwickelt. So soll die regulierte intrazelluläre (TLRs 7, 8 und 9) beziehungsweise basolaterale (TLR5) Expression bestimmter Rezeptoren vor einer Aktivierung durch luminale kommensale Bakterien schützen (Artis 2008). Weiterhin können letztere sogar aktiv immunologische Signalkaskaden modulieren, indem beispielsweise durch wiederholte apikale TLR9-Stimulation der NFκB-Signalweg blockiert und so die Produktion proinflammatorischer Zytokine unterbunden wird (Lee et al., 2006).

Die permanente Exposition epithelialer Zellen gegenüber kommensalen und pathogenen Bakterien kann dennoch zu Veränderungen hinsichtlich der Expression und Lokalisation bestimmter Rezeptoren führen. Es wurde festgestellt, dass ein konstanter Antigenreiz (bDNA und LPS) auf Zellen aus humanen Tonsillen und Darmepithelien zu einer erhöhten TLR9-Expression und Translokation des Rezeptors vom intrazellulären Kompartiment an die Zelloberfläche führt (Eaton-Bassiri et al., 2004; Ewaschuk et al., 2007), wobei jedoch die biologische Signifikanz dieser Oberflächenexpression noch nicht in Gänze geklärt ist.

Diese Beobachtungen geben Anlass zur Vermutung, dass sich der Erhalt einer immunologischen Homöostase auch in der Mundhöhle schwierig gestalten kann. Man darf spekulieren, ob in humanen Gingivafibroblasten, die ähnlich wie IECs

eine epitheliale Barriere zur oralen Mikroflora bilden, vergleichbare Prozesse stattfinden könnten. Die (intrazelluläre) TLR9-Expression in HGFs wurde bereits in verschiedenen Studien nachwiesen und ihre funktionelle Bedeutung in der Pathogenese entzündlicher Parodontalerkrankungen diskutiert (Nonnenmacher et al., 2003; Uehara & Takada, 2007). Interessant wäre die Klärung der Fragen, ob in Anlehnung an das intestinale mukosale Immunsystem auch die orale Flora Veränderungen in der Expressionsstärke und Lokalisation von TLR9 in HGFs hervorrufen kann, welche immunologischen Effekte dies mit sich bringen würde und wie gut sich die TLR9-Aktivität mit inhibitorischen Oligodeoxynukleotiden supprimieren ließe.

3.4 Wissenschaftliche Fragestellung und Ziel dieser Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit sollte die Etablierung eines mikrobiellen oralen Infektionsmodells *in vitro* sein, anhand dessen die Komplexität dynamischer Wechselwirkungen zwischen parodontopathogenen Keimen und Wirt sowie deren Folgen und die Bedeutung von TLR9 im Zusammenhang mit entzündlichen Erkrankungen des Parodont untersucht werden sollten.

Als Testsystem sollte eine *in vitro*-Kultur primärer humaner Gingiva-Fibroblasten (HGFs) zur Stimulation mit unterschiedlichen TLR9-Liganden genutzt werden, um eine Sekretion proinflammatorischer Zytokine auszulösen, zu quantifizieren und selbige auch zu inhibieren.

Hierbei sollte zunächst mit Hilfe einer ersten experimentellen Serie in einem Zellliniensystem, bestehend aus mouse TLR9-transfizierten HEK-Zellen, die Beurteilung des stimulatorischen Potentials verschiedener TLR9-Liganden und die Dosisfindung hinsichtlich einer optimalen zu applizierenden Stimuluskonzentration ermöglicht werden. Die dabei erzielten Erkenntnisse sollten in einem weiteren Schritt auf ein humanes Zellliniensystem, bestehend aus human TLR9-transfizierten HEK-Zellen, angewandt und mit diesen verglichen werden.

Für eine bessere Vergleichbarkeit der Ergebnisse des Stimulationsverhaltens zwischen Zelllinien und primären Zellen sowie zur Optimierung einer Stimulation primärer Zellen sollten in einem weiteren Ansatz humane PBMCs als Referenzsystem untersucht werden, um letztendlich den immunologischen Effekt einer TLR9-Stimulation in primären HGFs mit synthetischen Oligodeoxynukleotiden einerseits und bDNA andererseits, messbar anhand der sezernierten Zytokinmengen, zu analysieren.

Das Hauptziel sollte sein, eine durch bDNA induzierte TLR9-Aktivierung in HGFs *in vitro* spezifisch durch den Einsatz inhibitorischer Oligodeoxynukleotide zu blockieren, um nachgeschaltete Signalkaskaden, die zur Freisetzung proinflammatorischer Zytokine und somit der Entstehung entzündlicher Prozesse am Zahnfleisch führen, zu unterbinden.

Darüber hinaus sollten die Expressionsstärke und Lokalisation von TLR9 in humanen Gingiva-Fibroblasten mittels immunhistochemischer Färbung und Fluoreszenzmikroskopie untersucht werden.

4 Material und Methoden

4.1 Material

4.1.1 Laborgeräte

Laborgerät	Modell	Firma, Firmensitz
8-Kanal-Pipette	50 – 300 µl	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
Abzug	Typ 2-453-GFHD	Köttermann, Uetze/Hänigsen
Anaerobiertopf	Anaerocult®	Merck, Darmstadt
Brutschrank	- BBD 6220 - Typ 5060	Heraeus GmbH; Hanau Heraeus GmbH; Hanau
Drigalski-Spatel, Glas	50 mm	Kobe, Marburg
ELISA-Reader	MRX II	Dynatech Laboratories, Chantilly (USA)
Flake Eismaschine	-	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
Fluoreszenzmikroskop	Axiophot	Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen
Glaspipetten	5 ml, 10 ml, 20 ml	Brand GmbH, Wertheim
Halogenlampe	HXP 120	Leistungselektronik GmbH, Jena
Handstückzähler	H 20	Hilß GmbH, Lautertal
Heizblock	Digiblock HLC	NeoLab, Heidelberg Kobe, Marburg
Kamera	Spot Insight 2Mpixel Monochrome	Visitron Systems GmbH, Puchheim
Kühlschrank	KT 1730 FKS 5010	Liebherr, Biberach Liebherr, Biberach
Kühltruhe -20 °C	- Premium	Engmann Kühlsysteme, Mannheim; Liebherr, Biberach
Kühltruhe -80 °C	HERAfreeze	Heraeus GmbH, Hanau
Laborgasbrenner	Gasprofi 1	WLD-Tec, Arenshausen

Magnetrührer	RH basic 2	IKA-Werke GmbH, Staufen
Mikroskop	DM IL	Leica, Wetzlar
Neubauer-Zählkammer	-	Brand GmbH, Wertheim
pH-Meter	CG 843	Schott, Hofheim
Photometer	BioPhotometer	Eppendorf, Hamburg
Pinzette, rostfrei	-	Hamacher, Solingen
Pipetten	10 µl, 20 µl, 200 µl, 1 000 µl	Eppendorf AG, Hamburg Gilson, Middleton (USA)
Pipetten	Finnpipette 10 µl, 100 µl, 1 000 µl	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
Pipettierhilfe	Pipetboy acu	IBS Integra Bioscience, Fernwald
Spectrophotometer	NanoDrop 1000	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
Sterilbank	- HERAsafe - Cellgard Biological Safety Cabinet, Class II	Heraeus GmbH, Hanau; IBS Integra Bioscience, Fernwald
Stoppuhr	TR112	Oregon Scientific, Neu-Isenburg
Taschenrechner	SL-300VER	Casio, Norderstedt
Vortexer	Lab dancer MS 2 Minishaker	IKA-Werke GmbH, Staufen IKA-Werke GmbH, Staufen
Waage	H51-D	Sartorius, Göttingen
Wasserbad	-	Köttermann, Uetze/Hänigsen
Wasserfiltereinheit	Millipak 40™	Millipore, Billerica (MA, USA)
Zentrifuge	Biofuge pico (ungekühlt) Biofuge stratos (gekühlt) Megafuge 1.0R	Heraeus GmbH; Hanau Heraeus GmbH; Hanau Heraeus GmbH; Hanau

4.1.2 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Firma, Firmensitz
Handschuhe - „Nobaglove-Nitril“ - „rotiprotect-Latex“	Noba, Wetter Roth, Karlsruhe
Agarplatten (Columbia, Schädler)	Becton Dickinson, Heidelberg
Aluminiumfolie	Kobe, Marburg
BD GasPak™ EZ Anaerobic Container System	Becton Dickinson, Heidelberg
BD GasPak™ EZ Campy Container System	Becton Dickinson, Heidelberg
Brain Heart Infusion (BHI)	Oxoid, Wesel
Deckgläser	Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig
Einmal-Messküvette, steril, einzeln verpackt	Eppendorf, Heidelberg
Einwegskalpell, steril	Feather, Japan
ELISA-Mikrotiterplatten „Nunc Maxisorp“	Nunc, Roskilde (Dänemark)
Eppendorf-Reaktionsgefäße 500 µl, 1 500 µl, 2 000 µl	Sarstedt, Nürnberg
Falcon-Röhrchen (15 ml, 50 ml)	Sarstedt, Nürnberg Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
flexiPERM® slide 8-Kompertiment-Zellkultureinsätze	Sarstedt, Nürnberg
Impfeschlingen, 10 µl	Sarstedt, Nürnberg
Injektionsspritze (50 ml)	Becton Dickinson, Heidelberg
Kryokonservierungsröhrchen	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Objektträger, 76 x 26 mm	Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig
Pasteurpipetten	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
Pipettenspitzen „TipOne“, gestopft 10 µl, 100 µl, 1 000 µl	Starlab, Ahrensburg
Pipettenspitzen ungestopft 10 µl, 100 µl, 200 µl, 1 000 µl	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen; Gilson, Limburg
Plastikpipetten, steril, 5 ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Thiobouillon	Oxoid, Wesel

Venenpunktionsbesteck „Venofix“, 21 G	Braun, Melsungen
Zellkulturflaschen Cellstar (25, 75, 175 cm ²)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Zellkulturplatten (6-,12-,24-,48-,96-well)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Zellschaber 25 cm	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Klarlack	Essence Cosmetics, Cosnova GmbH, Sulzbach

4.1.3 Chemikalien und Reagenzien

Chemikalie/Reagenz	Firma, Firmensitz
4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure (HEPES)	Carl Roth, Karlsruhe
AE-Puffer	Qiagen, Hilden
Aminosäuren, nicht essentiell (100 x)	PAA Laboratories GmbH, Pasching
Aqua dest. (Wasser für Injektionszwecke)	Braun, Melsungen
Chloroform-Isoamylalkohol 24 : 1	Sigma-Aldrich, Steinheim
Click/RPMI 1640	Biochrom AG, Berlin
Dulbecco's modified eagle's medium (DMEM)	PAA Laboratories GmbH, Pasching
Dulbecco's modified eagle's medium (DMEM)	ATCC, Manassas, Virginia, USA
EDTA 0,5 M	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ethanol (EtOH) absolut	Otto Fischar GmbH, Saarbrücken
Ficoll, LSM 1077, Lymphocyte	PAA Laboratories GmbH, Pasching
Fötals Kälberserum (FCS)	Bio West, Nuaille, Frankreich
Fötales Kälberserum (FCS)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Geneticin (G418)	PAA Laboratories GmbH, Pasching
Heparin 5000 I.E./0,2 ml	Ratiopharm, Ulm
Humanes AB-Serum	Sigma-Aldrich, Steinheim
L-Glutamin 200mM (100 x)	PAA Laboratories GmbH, Pasching
NaCl (physiologische Kochsalzlösung)	Braun, Melsungen

Natriumacetat (CH_3COONa)	Merck, Darmstadt
Natriumbicarbonat (NaHCO_3)	Biochrom AG, Berlin
Natriumcarbonat (Na_2CO_3)	Merck, Darmstadt
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO_3)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Penicillin G	Biochrom AG, Berlin
Penicillin/Streptomycin (100 x)	PAA Laboratories GmbH, Pasching
Phosphate Buffered Saline (PBS)	Biochrom AG, Berlin
Proteinase K von <i>T. album</i> , 48 U/ml	Sigma-Aldrich, Steinheim
Reporter Lysis Buffer (5 x)	Promega, Madison, USA
Roti® Phenol	Carl Roth, Karlsruhe
Schwefelsäure (H_2SO_4)	Riedel-de Haën, Seelze
Sodium Dodecyl Sulfate (SDS), Pulver	Sigma-Aldrich, Steinheim
Sodium Pyruvate Solution (Natriumpyruvat) (100 mM)	PAA Laboratories GmbH, Pasching
β -Mercaptoethanol 50 mM (1 000 x)	Gibco Invitrogen, UK
Streptomycinsulfat	Biochrom AG, Berlin
TRIS-Hydrochlorid (TRIS-HCl)	Carl Roth, Karlsruhe
Triton x100	Sigma-Aldrich, Steinheim
Trypanblau	Sigma-Aldrich, Steinheim
Trypsin (1 x)	PAA Laboratories GmbH, Pasching
Trypsin-EDTA (10 x)	PAA Laboratories GmbH, Pasching
Tween 20	Sigma-Aldrich, Steinheim
Formaldehyd	Sigma-Aldrich, Steinheim
Saponin	Carl Roth, Karlsruhe
Fluorescent Mounting Medium	Sigma-Aldrich, Steinheim
Poly-L-Lysin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Bovines Serum-Albumin (BSA)	Biomol, Hamburg
Phorbol-12-Myristate-13-Acetate (PMA)	Sigma-Aldrich, Steinheim

4.1.4 Puffer und Lösungen

Puffer/Lösung	Zusammensetzung
0,1 M Natriumcarbonat-Puffer (pH 9,6) = Coating-Puffer ELISA	für 1 l: 7,13 g NaHCO ₃ + 1,59 g Na ₂ CO ₃ in 1 l Aqua dest. lösen → pH 9,6 → Lagerung bei 4 °C
Blockpuffer ELISA	PBS + 10 % FCS → Lagerung bei 4 °C
Lysispuffer	50 mM Tris-HCl 1 mM EDTA 0,5 % SDS-Pulver → Lagerung bei 4 °C vor Gebrauch hinzufügen: 20 mg/ml Lysozym
Phosphate Buffered Saline (PBS)	für 10 l: PBS-Trockensubstanz ohne Ca ²⁺ /Mg ²⁺ in 10 l Aqua dest. lösen → pH 7,25 → steril filtrieren → Lagerung bei 4 °C
Stopplösung ELISA	2 N H ₂ SO ₄
0,2 % Trypanblau	für 50 ml: 100 mg Trypanblau-Trockensubstanz mit 50 ml PBS mischen → im H ₂ O-Bad bei 37 °C lösen → steril filtrieren → Lagerung bei RT
Verdauungspuffer	100 mM NaCl 10 mM Tris-HCl (pH 8,0) 25 mM EDTA (pH 8,0) 0,5 % SDS-Pulver → Lagerung bei 4 °C vor Gebrauch hinzufügen: 0,2 mg/ml Proteinase K
Waschpuffer ELISA	PBS + 0,05 % Tween-20
2 % Formaldehyd in PBS	für 10 ml: 550 µl ml Formaldehyd (36%ig) + 9,45 ml PBS → Lagerung bei 4 °C

4.1.5 Medien und Medienzusätze für Zellkultur

Zellart	Medium/Mediumzusatz	Zusammensetzung
HEK	DMEM	<p><u>zu 500 ml hinzugeben:</u> 10 % FCS 1 % L-Glutamin 1 % Penicillin/Streptomycin 50 µM β-Mercaptoethanol</p> <p>für hTLR9-HEK und NFκB-HEK zusätzlich 500 ng/ml G418 hinzugeben → Lagerung bei 4 °C</p>
HGF	DMEM	<p><u>zu 500ml hinzugeben:</u> 10 % FCS → Lagerung bei 4 °C</p>
PBMCs	Click/RPMI 1640 Medium	<p><u>für 10 l:</u> Click/RPMI-Trockensubstanz + 0,6 g Penicillin (100 U/ml) + 1,32 g Streptomycin (100 U/ml) + 23,83 g HEPES + 11,75 g NaHCO₃ in 10 l Aqua dest. lösen → pH 7,25 → steril filtrieren → Lagerung bei 4 °C</p> <p><u>vor Gebrauch hinzugeben:</u> 0,5 % AB-Serum 1 % nicht-essentielle AS 1 % 100mM Na-Pyruvat 1 % L-Glutamin 500 µl Penicillin (0,06 g) 500 µl Streptomycin (0,1 g/ml) → Lagerung bei 4 °C</p>
THP-1	Click/RPMI 1640 Medium	<p><u>für 10 l:</u> Click/RPMI-Trockensubstanz + 0,6 g Penicillin (100 U/ml) + 1,32 g Streptomycin (100 U/ml) + 23,83 g HEPES + 11,75 g NaHCO₃ in 10 l Aqua dest. lösen → pH 7,25 → steril filtrieren → Lagerung bei 4 °C</p> <p><u>vor Gebrauch hinzugeben:</u> 10 % FCS 1 % L-Glutamin 1 % Na-Pyruvat → Lagerung bei 4 °C</p>
	FCS	<p>Das bei -20 °C gelagerte FCS bei RT auftauen → 30 min bei 56 °C inaktivieren → steril filtrieren und zu Medium dazugeben</p>

HEK	Einfriermedium	für 10 ml: 50 % FCS 5 ml FCS 40 % Kulturmedium 4 ml Kulturmedium 10 % DMSO 1 ml DMSO → Lagerung bei -20 °C
HGF THP-1	Einfriermedium	für 10 ml: 40 % FCS 4 ml FCS 50 % Kulturmedium 5 ml Kulturmedium 10 % DMSO 1 ml DMSO → Lagerung bei -20 °C

4.1.6 Zelllinien und Primäre Zellen

Zelllinie	Herkunft
Human embryonic kidney cell (HEK-293)	Institut für Immunologie, BMFZ, Marburg
humane Monozyten-Leukämie Zelllinie (THP-1)	Institut für Immunologie, BMFZ, Marburg
Primäre Zellen	Herkunft
Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs)	eigene Isolierung
Humane Gingiva-Fibroblasten (HGF-1)	LGC Standards, Middlesex, UK

4.1.7 Bakterien

Bakterium	Gram-	Stamm	Kulturbedingung
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	negativ	MCCM 37399	mikroaerophil
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	negativ	MCCM 3199	obligat anaerob

4.1.8 Synthetische Oligodeoxynukleotide

Name	Sequenz 5' → 3' (Länge in bp)	Firma, Firmensitz
CpG-ODN 1668	TCC ATG ACG TTC CTA TCT (20 bp)	TIB MolBiol, Berlin
CpG-ODN 2006	TCG TCG TTT TGT CGT TTT GTC GTT (24 bp)	TIB MolBiol, Berlin
G-ODN	CTC CTA TTG GGG GTT TCC TAT (21 bp)	Eurofins MWG Operon, Ebersberg

Alle verwendeten Oligodeoxynukleotide waren Phosphorothioate-modifiziert (PTO). Sie wurden in *aqua dest.* gelöst, auf eine Konzentration von 250 µM (CpG-ODNs) bzw. 100 µM (G-ODN) eingestellt und bei -20 °C aliquotiert gelagert.

4.1.9 Nukleinsäuren

Name	Firma, Firmensitz
ssDNA von <i>E. coli</i> K12, endotoxinfrei	Invivogen, San Diego, USA

Die lyophilisierte DNA wurde in *aqua dest.* gelöst, auf eine Konzentration von 1 000 µg/ml eingestellt und bei -20 °C aliquotiert gelagert.

4.1.10 ELISA-Kits

Detektiertes Zytokin	ELISA-Kit	Firma, Firmensitz
IL-6	BD OptEIA™ Human ELISA Set	Becton Dickinson, Heidelb.
IL-8	BD OptEIA™ Human ELISA Set	Becton Dickinson, Heidelb.

4.1.11 Antikörper

Unkonjugierte Antikörper

Name	erkannte Spezies	Klasse	Verwendung	Firma, Firmensitz
21E2 (α -hTLR9) (1,8 mg/ml)	Mouse anti-Human	IgG2a	Immunhistochemie	Generiert in der AG Prof. Dr. Stefan Bauer, Immunologie, Marburg
5G5 (α -hTLR9) (4,5mg/ml)	Mouse anti-Human	IgG2a	Immunhistochemie	Generiert in der AG Prof. Dr. Stefan Bauer, Immunologie, Marburg
α -Mouse IgG2a, K Clone: eBM2a (0,5 mg/ml)	Mouse anti-mouse	IgG2a	Isotypkontrolle IF	eBioscience, UK

Konjugierte Antikörper

Name	erkannte Spezies	Konjugiert	Klasse	Verwendung	Firma, Firmensitz
α -mouse IgG (2 mg/ml)	Goat anti-Maus	Alexa Fluor® 488	IgG	Immunhistochemie	Invitrogen, Darmstadt
α -mouse IgG (0,5 mg)	Goat anti-Maus	Dylight 649	IgG	Immunhistochemie	AbD Serotec, Düsseldorf
α -CD3 Clone: SP34-2	Mouse anti-Human	PerCP	IgG1	FACS	BD Pharmingen, Heidelberg
α -CD123 Clone: AC145	Mouse anti-Human	PE	IgG2a	FACS	Miltenyi, Bergisch Gladbach
α -CD303 (BDCA-2) Clone: AC144	Mouse anti-Human	APC	IgG1	FACS	Miltenyi, Bergisch Gladbach
α -mouse IgG1, K Clone: MOPC-21	Mouse anti-	PerCP/ Cy5.5	IgG1	Isotypkontrolle FACS	Biolegend, San Diego,

	Human				CA, USA
α -mouse IgG2a, κ Clone: eBM2a (0,2mg/ml)	Mouse anti-Human	PE	IgG2a	Isotypkontrolle FACS	eBioscience, Hatfield, UK
α -mouse IgG1, K Clone: P3.6.2.8.1 (0,2 mg/ml)	Mouse anti-Human	APC	IgG1	Isotypkontrolle FACS	eBioscience, Hatfield, UK

4.1.12 Software

Name	Hersteller
Excel 2003	Microsoft, Redmond, Washington, USA
Word 2003	Microsoft, Redmond, Washington, USA
Diva®	BD Bioscience, San José, CA, USA

4.2 Methoden

4.2.1 Arbeit mit Bakterienkulturen

4.2.1.1 Anzucht von anaeroben und mikroaerophilen Bakterien

Alle Bakterienstämme zu diesen Versuchen wurden aus der Stammsammlung des Instituts für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene der Philipps-Universität Marburg bezogen.

Die anaeroben und mikroaerophilen Bakterienspezies wurden aus lyophilisierten Kulturen frisch angezüchtet. Die Glasampullen wurden dazu unter einer Sterilbank geöffnet und das Lyophilisat in 1 ml einer Thioglycolat-Boullion beziehungsweise Brain-Heart-Infusion resuspendiert. Anschließend wurden mit einer sterilen Pasteurpipette je 4 Tropfen der jeweiligen Suspension auf eine Columbia-beziehungsweise Schädlerplatte gegeben und mit einem 3-Ösen-Ausstrich fraktioniert verteilt. Schließlich konnten die Agarplatten in einem Anaerobier-Gastopf den Wachstumsansprüchen der Bakterien entsprechend mit einem Anaerob- oder Mikroaerophil-GasPak für 5 Tage bei 37 °C bebrütet werden. Als Kontrolle wurde je eine Columbiaplatte unter aeroben Bedingungen bei 37 °C für 24 h bebrütet.

4.2.1.2 Ernte von Bakterienkulturen und Aufbereitung zur Konzentrationsbestimmung

Nach 5-tägiger Bebrütung der Anaerobier und Mikroaerophilen wurden die reinen Bakterienkulturen unter der Sterilbank mit Hilfe eines gläsernen Drigalskispatels oder eines Wattestäbchens mit steriler physiologischer Kochsalzlösung von den Agarplatten abgewaschen. Die gewonnene Bakteriensuspension wurde in einem sterilen 50 ml Reaktionsgefäß gesammelt und anschließend für 10 min bei 1 000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und nochmals wie oben beschrieben zentrifugiert. Die

so entstandenen Pellets wurden in 1 bis 2 ml *aqua dest.* resuspendiert, um daraufhin photometrisch die Bakterienkonzentration zu bestimmen.

4.2.1.3 Bestimmung der Bakterienkonzentration

Zur Bestimmung der Bakterienkonzentration wurde zuerst die optische Dichte der jeweiligen Bakteriensuspension gemessen und die eigentliche Konzentration mit Hilfe einer Formel berechnet.

4.2.1.3.1 Messung der optischen Dichte

Um die optische Dichte der Bakteriensuspension zu bestimmen wurde diese zunächst 1:100 (vor-) verdünnt. Dazu wurden zu 10 µl der Bakteriensuspension 990 µl *aqua dest.* gegeben und durch Pipettieren gut gemischt. Bei stark konzentrierten Bakteriensuspensionen wurden diese Vorverdünnungen gegebenenfalls nochmals 1:100 verdünnt. Anschließend wurde die OD_{600} mit einem Eppendorf BioPhotometer (Eppendorf, Hamburg) bei einer Wellenlänge von 600 nm in einer Plastik-Einwegküvette gemessen und die optische Dichte als Mittelwert aus 2 Einzelmessungen ermittelt.

4.2.1.3.2 Berechnung der Bakterienkonzentration

Mit den bei der OD-Messung ermittelten Werten war es möglich, die Konzentration der Bakteriensuspension mit Hilfe der folgenden Gleichung zu berechnen:

$$\text{Bakteriensuspension} \left[\frac{\text{Keime}}{\text{ml}} \right] = \frac{OD_{600}}{1,0392} \times 3 \times 10^8 \times F_{\text{Verd}}$$

F_{Verd} : Verdünnungsfaktor (*hier: 100 bzw. 10 000*)

4.2.1.4 Aliquotierung und Lagerung der Bakteriensuspensionen

Zur Aufbewahrung wurde die Bakteriensuspension auf eine gewünschte Konzentration von 10^8 Keime/ml eingestellt, in 1 ml Aliquots portioniert und in sterile 1,5 ml Reaktionsgefäße gegeben. Die Aliquots wurden bis zur Benutzung bei -20 °C gelagert.

4.2.1.5 DNA-Extraktion mittels Phenol-Chloroform und Ethanolpräzipitation

Die Phenol-Chloroform-Extraktion ist nicht nur ein klassisches Verfahren zur Aufreinigung und Konzentrierung von Nukleinsäurelösungen, die mit Proteinen verunreinigt sind (Marmur, 1961), sondern auch eine Methode zur Gewinnung von DNA aus Geweben oder Bakterien (Beji et al., 1987).

Die DNA-Extraktion gliedert sich in eine Lyse der Bakterienzellen mit anschließender Isolierung und Reinigung der Nukleinsäure.

4.2.1.5.1 Lyse der Bakterienzellen

Um intakte DNA gewinnen zu können, ist in der Regel ein möglichst schonender Aufschluss der Bakterienzellwand nötig. Generell stehen dazu mechanische, enzymatische oder chemische Methoden zur Verfügung, die häufig in Kombination zum Einsatz kommen, wie auch im vorliegenden Fall. Die aliquotierten gramnegativen Bakteriensuspensionen wurden in Reaktionsgefäßen 10 min lang bei 13 000 rpm und RT zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Anschließend wurde das Pellet in 500 µl Verdauungspuffer aufgenommen, Proteinase K hinzugefügt und die Probe über Nacht bei 50 °C auf einem Heischüttler inkubiert. Das Enzym Proteinase K bewirkt einen proteolytischen Abbau der Zellproteine und kann darüber hinaus in 0,5%igen SDS-Lösungen RNasen und DNasen inaktivieren (Shahriar et al., 2011). Eine Zugabe von

Lysozym, das eine Spaltung der β -1,4-glykosidischen Bindungen des Peptidoglykangerüsts der Zellwand bewirkt (Ibrahim et al., 1991), war im vorliegenden Fall nicht nötig, da gramnegative Bakterien keine Zellwand besitzen.

4.2.1.5.2 Isolierung und Reinigung der DNA

Nach der Zelllyse wurden die Verunreinigungen der DNA durch aufeinander folgende Zugabe von Phenol, Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1) und Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) sowie dazwischen liegenden Zentrifugationen schrittweise entfernt. Die Verunreinigungen, bei denen es sich zum größten Teil um Proteine handelt, werden dabei durch Phenol und Chloroform denaturiert, fallen aus und sammeln sich in der Interphase zwischen der oberen wässrigen und der unteren Phenolphase an. Isoamylalkohol reduziert ein Aufsäumen der jeweiligen Lösungen und wird zur besseren Phasentrennung eingesetzt (Marmur, 1961). Nach den jeweiligen Zentrifugationsschritten wurde die obere wässrige Phase, unter Meidung der Interphase, in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Zur Entfernung von Phenolresten und Konzentrierung der Nukleinsäuren wurde eine Präzipitation mit eiskaltem 100%igem Ethanol durchgeführt. Durch Zugabe des einfach geladenen Salzes Natriumacetat (pH = 5,2) in einer Endkonzentration von 0,3 M fiel die DNA in Ethanol spontan aus und wurde für mindestens 10 min bei 13 000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Verbliebene Salz- beziehungsweise Ethanolreste im DNA-Pellet wurden durch einen erneuten Waschschrift mit 70%igem eiskaltem Ethanol eliminiert. Anschließend wurde das DNA-Pellet unter der Sterilbank bei RT getrocknet und in 100 μ l AE-Puffer aufgenommen.

4.2.1.5.3 Messung des DNA-Gehaltes und ihrer Reinheit

Die Konzentration und Reinheit der gewonnenen DNA wurde durch Vermessung im NanoDrop 1000 (Thermo Scientific) spektrophotometrisch ermittelt. Dieses System ermöglicht die Analyse kleinster Probenvolumina (von 0,5 μ l bis 2,0 μ l) ohne zusätzliche Verwendung von Quarzküvetten oder Kapillaren.

Durchführung:

Um möglichst genaue Messergebnisse zu erzielen, wurde die DNA-Probe 1:100 mit *aqua dest.* verdünnt. Anschließend wurde 1 µl der verdünnten Probe direkt auf das Messpodest pipettiert. Während des Messvorgangs wurde die Probe zwischen dem Messpodest und dem Hebelarm automatisch zu einer Säule mit optimaler Messhöhe „geformt“. Zur photometrischen Bestimmung der Nukleinsäurenkonzentration wurde die Absorption bei 230 nm und 260 nm (Absorptionsmaximum der DNA). Um eine Aussage über die Reinheit der gewonnenen DNA machen zu können, wurde außerdem eine Messung bei 280 nm (Absorptionsmaximum für Proteine) durchgeführt. Die Angabe des Verhältnisses A_{260}/A_{280} erlaubt Rückschlüsse auf eine Verunreinigung der DNA mit Proteinen. Bei einem Absorptionsverhältnis A_{260}/A_{280} von $\geq 1,8$ kann man von einer DNA mit hohem Reinheitsgrad ausgehen (Beji et al., 1987).

4.2.1.5.4 Lagerung der DNA

Die in AE-Puffer resuspendierten DNA-Proben wurden bis zum weiteren Gebrauch in sterilen Reaktionsgefäßen bei -20 °C gelagert.

4.2.2 Arbeit mit Zellkulturen

4.2.2.1 Zelllinien

4.2.2.1.1 Human embryonic kidney cells (HEK 293)

Bei HEK 293 handelt es sich um adhärent wachsende Zellen, die aus menschlichen embryonalen Nieren gewonnen werden. Die HEK-Zellen wurden freundlicherweise von Prof. Dr. Stefan Bauer, Institut für Immunologie, Marburg zur Verfügung gestellt und waren stabil mit hTLR9/NFκB, mTLR9/NFκB oder nur NFκB (ko)transfiziert. Zur Selektionierung stabil transfizierter Zellklone wurde Geneticin (G418) in einer Konzentration von 500 ng/ml dem Kulturmedium

zugefügt. Die Kultivierung erfolgte in DMEM-Kulturmedium bei 37 °C mit 7,5 % CO₂-Gehalt und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 95 %.

4.2.2.1.2 THP-1

Die humane Monozyten-Leukämie Zelllinie wurde freundlicherweise von Prof. Dr. Markus Schnare, Institut für Immunologie, Marburg, zur Nutzung überlassen. Die Zellen wurden aus dem Blut eines an akuter monozytärer Leukämie erkrankten Jungen isoliert. Sie wachsen in Suspension und bilden teilweise traubenförmige Anhäufungen (Tsuchiya et al., 1980). Durch eine Behandlung mit Phorbolestern wie PMA (Phorbol-12-Myristate-13-Acetat) differenzieren THP-1 Zellen zu Makrophagen und werden adhärent (Park et al., 2007). Die Kultivierung erfolgte in Click/RPMI-Kulturmedium bei 37 °C mit einem CO₂-Gehalt von 5 % und einer Luftfeuchtigkeit von 95 %.

4.2.2.2 Primäre Zellen

4.2.2.2.1 Humane Gingivafibroblasten (HGF-1)

Primärisolate humaner gingivaler Fibroblasten (HGF-1) sind in der American Type Culture Collection (ATCC) hinterlegt und wurden über LGC Standards in Wesel erworben. Die Zellen wurden aus dem Zahnfleisch eines 28-jährigen gesunden männlichen Probanden kaukasischer Abstammung isoliert.

Die subepithelial gelegenen Gingivafibroblasten bilden den Hauptbestandteil des parodontalen Bindegewebes und halten dessen Integrität durch Regulation des Kollagen- und Proteoglykanstoffwechsels aufrecht. Darüber hinaus sind sie in der Lage, nach Stimulation mit bakteriellen Komponenten proinflammatorische Zytokine wie IL-6 und IL-8 zu sezernieren (Mahanonda & Pichyangkul, 2007).

Die Kultivierung der HGF-1 erfolgte in DMEM-Kulturmedium (ATCC) bei 37 °C mit einem CO₂-Gehalt von 5 % und einer 95%igen Luftfeuchtigkeit. In Kultur wachsen

die Zellen adhären und haben eine Verdopplungszeit von durchschnittlich 5 bis 7 Tagen.

4.2.2.2 Gewinnung von PBMCs

PBMCs (*peripheral blood mononuclear cells*) wurden aus venösem Frischblut mittels Dichtegradientenzentrifugation gewonnen. Als Zellseparationsmedium diente Ficoll-Hypaque, eine synthetisch hergestellte Polysaccharidlösung mit einer Dichte von 1,077 g/ml, von welcher 15 ml in ein 50 ml Reaktionsgefäß gegeben wurden. Die Gewinnung von humanem Frischblut erfolgte durch herkömmliche Venenpunktion, wobei der Doktorand dieser Arbeit als einziger Spender diente. 15 ml Blut wurden in einer sterilen Injektionsspritze mit 2500 I.E./100 µl Heparin antikoaguliert und zur Verdünnung mit dem gleichen Volumen PBS in einem 50 ml Reaktionsgefäß gemischt. Danach wurde das verdünnte Blut mit einer sterilen Pipette langsam auf das Ficoll geschichtet, ohne dass es dabei zu einer Vermischung der beiden Phasen kam, und 18 min bei 4 °C und 2 000 rpm (ca. 800 g) ohne Bremse zentrifugiert. Aufgrund der Dichteunterschiede wandern Erythrozyten und Granulozyten durch die Zentrifugation als Pellet auf den Boden des Reaktionsgefäßes, während sich die leichteren mononukleären Zellen (Monozyten und Lymphozyten) in einer sichtbar milchigen Interphase zwischen dem Separationsmedium und dem Plasma sammeln. Diese Interphase wurde mit Hilfe einer Pasteurpipette vorsichtig abgenommen und jeweils einmal mit PBS und Waschlösung (serumfreies Medium) gewaschen (10 min bei 4 °C und 800 rpm), bevor sie in 5 ml Kulturmedium aufgenommen wurde. Schließlich konnte die Zellzahl mit einer Neubauer-Zählkammer bestimmt (siehe 1.2.4) und die PBMCs in der gewünschten Konzentration in 48-well Platten ausgesät werden. Bis zur Stimulation wurden die Zellen bei 37 °C und 5 % CO₂ aufbewahrt.

4.2.2.3 Kultivieren und Passagieren der Zellen

Alle Arbeiten mit Zellkulturen wurden unter einer Sterilbank durchgeführt, die jeweils vor und nach Benutzung mit 70 % vergälltem Ethanol desinfiziert wurde.

Jegliche verwendete Lösungen, Medien und Puffer waren steril filtriert (Porendurchmesser der Filter 0,2 μm) und wurden, wenn nicht anders beschrieben, vor Benutzung im Wasserbad auf 37 °C erwärmt. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in einem CO₂-Begasungsbrutschrank bei 37 °C mit 5 % beziehungsweise 7,5 % CO₂ und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 95 %. Dazu wurden die Zellen je nach Anzahl und Zielsetzung in Zellkulturplatten oder Zellkulturflaschen mit einer Wachstumsfläche von 25 cm², 75 cm² oder 175 cm² ausgesät.

Im Allgemeinen wurden die Zellen bei Erreichen einer Konfluenz von 80 bis 90 % passagiert, um optimale Wuchsbedingungen zu erzielen. Als Passage 0 wurden Zellen nach dem Auftauen beziehungsweise nach der primären Isolierung definiert.

Zum Passagieren wurden die adhärennten Zellen (HEK und HGF) zunächst zweimal mit PBS gewaschen. Für ein schonendes Ablösen wurde die Zellschicht je nach Wachstumsfläche mit 1 bis 6 ml einer 1-fach konzentrierten Trypsin-EDTA Lösung bedeckt und bei RT für 30 bis 60 sec (HEK) oder bei 37 °C für maximal 2 min (HGF-1) inkubiert. Wenn noch einige Zellen am Flaschenboden hafteten, wurden diese mit Hilfe eines Zellschabers vorsichtig mechanisch abgelöst. Zellverbände konnten gegebenenfalls durch Aufziehen mit einer Pipette aufgelöst werden. Die enzymatische Wirkung des Trypsins wurde durch Zugabe des doppelten Volumens an kaltem Kulturmedium abstoppt. Die THP-1 Zellen konnten, da sie in Suspension wachsen, einfach aus der Zellkulturflasche abpipettiert und in ein Reaktionsgefäß gegeben werden. Nach 5-minütiger Zentrifugation mit 1 500 rpm (HEK und THP-1) beziehungsweise 1 000 rpm (HGF-1) bei 4 °C konnte der zellfreie Überstand verworfen und das gewonnene Zellpellet in 5 ml des entsprechenden Kulturmediums resuspendiert werden. Anschließend erfolgte eine Bestimmung der Zellvitalität und Zellzahl.

Zur weiteren Kultivierung wurden die Zellen im Verhältnis 1:10 (HEK und THP-1) respektive 1:3 (HGFs) gesplittet und in neue Zellkulturflaschen ausgesät.

Regelmäßig erfolgte durch mikroskopische Kontrolle der Zelllinien bei 20- und 40-facher Vergrößerung eine Prüfung auf Wachstum, Morphologie, Adhärenz oder Kontamination. Bei einem Farbumschlag des Indikators Phenolrot im Kulturmedium nach orange oder gelb wurde das Medium durch frisches ausgetauscht.

4.2.2.4 Bestimmung von Zellvitalität und Zellzahl

Zur Bestimmung der Anzahl lebendiger Zellen wurde ein Aliquot der Zellsuspension 1:10 mit 0,2%iger Trypanblaulösung verdünnt. Trypanblau ist ein saurer Azofarbstoff, dessen Anionen durch die Zellmembran toter Zellen dringen und an zytosolische Proteine binden können. Die intakte Plasmamembran lebendiger Zellen hingegen ist für Trypanblau undurchlässig, sodass bei mikroskopischer Betrachtung vitale Zellen ungefärbt und tote Zellen gefärbt erscheinen. Zur Zellzählung wurde eine Neubauer-Zählkammer mit 10 µl der gefärbten Zellsuspension bestückt, die lebenden Zellen in den vier Eckquadraten der Zählkammer ausgezählt und der Mittelwert berechnet.

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mit Hilfe der folgenden Formel:

$$\text{vitale Zellen/ml} = \text{MW der Anzahl ungefärbter Zellen} \times 10^4 \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

4.2.2.5 Einfrieren und Lagerung humaner Zellen

Die Lagerung von Zellkulturen über einen längeren Zeitraum erfolgt bevorzugt bei -196 °C in flüssigem Stickstoff. Mit dieser sogenannten Kryokonservierung kann die Vitalität der Zellen über eine lange Zeit sichergestellt werden. Dabei soll das Kryoprotektat DMSO die Bildung von Eiskristallen, die während des Einfrierungsprozesses zu einer Schädigung der Zellen führen können, verhindern. Wichtig ist, dass die Zellpassage so niedrig wie möglich ist, die Zellen sich in einer Ruhephase befinden und nicht stimuliert sind. Alle Behältnisse und Reagenzien sollten auf Eis vorgekühlt werden.

Durchführung:

Die Zellen wurden wie unter 1.2.3 und 1.2.4 beschrieben geerntet, gezählt und nach Abzentrifugieren des Kulturmediums in eiskaltem Einfriermedium aufgenommen. Anschließend wurde je 1 ml mit mindestens 1×10^6 Zellen auf Kryoröhrchen verteilt und diese in einen mit eiskaltem Isopropanol befüllten Behälter langsam um 1 °C/min auf -80 °C runtergekühlt. Nach zwölf Stunden wurden die Zellen zur Langzeitlagerung in einen Flüssigstickstoff-Tank überführt. Zur Kontrolle wurde nach mindestens 1 bis 2 Tagen ein gefrorenes Röhrchen aufgetaut und in eine kleine Zellkulturflasche ausgesät.

4.2.2.6 Auftauen gefrorener Zellen

Um ein optimales Wachstum der Zellkultur nach dem Auftauen zu erzielen ist ein zügiges und schonendes Vorgehen nötig, da einige Zellarten sehr empfindlich reagieren können.

Durchführung:

Nach der Entnahme aus dem Stickstoffbehälter wurde das Kryoröhrchen bei 37 °C angetaut und der noch fast gefrorene Inhalt mit Hilfe einer Pasteurpipette in ein Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurde die Zellsuspension langsam mit kaltem Medium auf 25 ml aufgefüllt, 5 min bei 1 000 rpm und 4 °C zentrifugiert und in frischem Kulturmedium resuspendiert. Um das toxisch wirkende DMSO zur Genüge auszuwaschen wurde der Waschvorgang wiederholt. Schließlich erfolgte die Aussaat je nach Zellzahl in entsprechende Zellkulturflaschen. Zusätzlich wurde noch eine Erhaltungsplatte in einer 1:2 Verdünnung angelegt, um eventuell verbliebenes DMSO weiter auszutitrieren und eine optimale Wachstumsdichte für die Zellen zu gewährleisten.

Mittels PCR wurde eine Kontamination der Zellkulturen mit Mykoplasmen ausgeschlossen.

4.2.2.7 Zellstimulation „*in vitro*“

Die Zellkulturen wurden nach mikroskopischer Kontrolle wie in 1.2.3 und 1.2.4 beschrieben geerntet und gezählt. Lag der Anteil avitaler gefärbter Zellen unter 10 %, konnte die Zellsuspension für eine Stimulation weiterverwendet werden und wurde hierfür auf eine gewünschte Konzentration eingestellt. Die Zellen wurden in einer Dichte zwischen 4×10^4 und 1×10^6 Zellen/100 μ l/Well in entsprechende Zellkulturplatten (48-well oder 96-well) ausgesät, wobei jede Stimulation als Doppelbestimmung durchgeführt wurde. Wurden HEKs, HGFs und THP-1 Zellen für eine gute Adhärenz bereits einen Tag vor der Stimulation in die Kavitäten gegeben, so fanden PBMCs unmittelbar nach der Isolierung aus Frischblut Verwendung. Die Stimuli wurden jeweils kurz vor der Benutzung in sterilen Reaktionsgefäßen vorbereitet und gegebenenfalls Verdünnungsreihen in sterilen Rundbodenplatten angelegt.

4.2.2.7.1 Stimulation von HEKs

Abhängig davon, ob ein Luziferase-Assay oder eine Zytokindetektion mittels ELISA erfolgen sollte, wurden 4×10^4 beziehungsweise $1,5 \times 10^5$ Zellen in 100 μ l/Well am Vortag einer Stimulation in 96-well-Kulturplatten ausgesät. Am Folgetag wurde das Kulturmedium durch frisches Medium mit 1 % FCS ersetzt und 100 μ l der Stimulationslösung hinzupipettiert, sodass ein Endvolumen von 200 μ l/Well erzielt wurde. Um die gewünschte Endkonzentration zu erreichen wurden die jeweiligen Stimuli dem Verdünnungsverhältnis entsprechend 2-fach oder höher konzentriert eingesetzt. Für einen Luciferase-Assay erfolgte eine Inkubation von 6 Stunden, der Stimulationsansatz für eine Zytokindetektion mittels ELISA hingegen inkubierte 22 bis 24 Stunden bei 37 °C und dem entsprechenden CO₂-Gehalt.

4.2.2.7.2 Stimulation von HGFs

HGFs wurden ein Tag vor der Stimulation in einer Konzentration von $4,5 \times 10^4$ in 96-*well*-Kulturplatten ausgesät und wuchsen unter mikroskopischer Kontrolle zu einer nahezu konfluenten Zellschicht zusammen. Am Tag der Stimulation wurde auch hier das Medium ausgetauscht und die frisch vorbereiteten Stimuli hinzugegeben, sodass anschließend eine 22-stündige Inkubation unter gewohnten Kulturbedingungen erfolgen konnte. Schließlich wurden die zellfreien Überstände abgenommen und zur zeitnahen Zytokinbestimmung mittels ELISA eingesetzt.

4.2.2.7.3 Differenzierung und Stimulation von THP-1 Zellen

Damit THP-1 Zellen bestmöglich auf Stimuli ansprechen und eine detektable Reaktion zeigen, ist eine vorhergehende Differenzierung entlang der myeloischen Zellreihe zu Makrophagen erforderlich. Dazu wurden 1×10^6 Zellen/Well in einer 48-*well*-Platte mit Phorbol 12-Myristate 13-Acetat (PMA) in einer Konzentration von 5 ng/ml für 48 Stunden behandelt, was dazu führte, dass sie ihre Fähigkeit zur Proliferation verloren, adhärent wurden und statt der ursprünglich kugeligen, eine längliche und flache Form aufwiesen. Nach 48-stündiger Inkubation wurde das PMA-haltige Medium entfernt, die nun adhärennten Makrophagen dreimal vorsichtig mit PBS gewaschen und für 3 Stunden in serumfreiem Kulturmedium ruhen gelassen. Nachdem dieses abgenommen worden war, erfolgte die Zugabe des gewünschten Stimulus in einem Endvolumen von 300 μ l/Well und eine 22-stündige Inkubation im Brutschrank, in Folge derer auch hier die zellfreien Überstände abgenommen und für eine Zytokinbestimmung mittels ELISA genutzt wurden.

4.2.2.7.4 Stimulation von PBMCs

Vor jeder Stimulation wurden PBMCs wie unter 1.2.2.1 beschrieben frisch aus Venenblut isoliert und sofort für eine Stimulation in einer Dichte von 1×10^6 Zellen/150 μ l in eine 48-*well*-Platte ausgesät. Nach Zugabe der 2-fach

konzentrierten Stimuli in einem Volumen von 150 µl wurden die Zellen 22 Stunden bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert und anschließend die Zytokinkonzentration in den zellfreien Überständen gemessen.

4.2.2.8 Gewinnung und Lagerung zellfreier Stimulationsüberstände

Nach Ablauf der jeweiligen Inkubationszeiten wurden unter einer Sterilbank 200 bis 250 µl der Stimulationsüberstände der Zellkulturen vorsichtig abgenommen und in einer Mikrotiter-Rundbodenplatte gesammelt. Wurden die Überstände nicht direkt hinsichtlich ihres Zytokingehaltes untersucht, konnten sie verschlossen bei -20 °C gelagert und zeitnah verwendet werden.

4.2.3 Proteinbiochemische Methoden

4.2.3.1 Zytokindetektion mittels ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay)

Prinzip:

Der ELISA ist eine immunologische Methode zum quantitativen Nachweis von löslichen Proteinen und Biomolekülen wie Zytokinen oder Hormonen. Er basiert auf einer Antigen-Antikörper-Reaktion mit einer nachgeschalteten enzymgekoppelten Farbreaktion. Bei dem sogenannten *Sandwich*-ELISA wird mit einer definierten Menge eines immobilisierten *Capture*-Antikörpers das zu detektierende Antigen an einem bestimmten Epitop gebunden. Ein weiterer, enzymgekoppelter löslicher Antikörper, der sogenannte Detektions-Antikörper, kann anschließend das Antigen spezifisch durch Bindung an ein anderes Epitop markieren. Durch die Zugabe eines chromogenen Substrates, welches von dem Enzym des Detektions-Antikörpers umgesetzt wird, kommt es zu einer Farbreaktion, wobei sich die Farbintensität proportional zur umgesetzten Substratmenge und der Konzentration des zu bestimmenden Zytokins verhält. Durch photometrische Messung des Farbumschlags im Vergleich zu einer

Standardverdünnungsreihe als Referenz kann so die Konzentration der zu ermittelnden Substanz bestimmt werden.

Durchführung:

Zur Konzentrationsbestimmung der Zytokine in den zellfreien Überständen der Übernachtskulturen wurde nach Herstellerprotokoll verfahren (BD OptEIA™, San Diego, USA).

Zu Beginn wurde eine 96-well-Mikrotiterplatte mit 100 µl/well des 1:500 in *Coating*-Puffer verdünnten *Capture*-Antikörpers bei 4 °C über Nacht abgedeckt inkubiert. Danach wurde jedes *well* dreimal mit 200 µl Waschpuffer gewaschen, um überschüssige Erstantikörper zu entfernen. Um unspezifische Proteinbindestellen abzusättigen und dadurch die Hintergrundaktivität zu reduzieren folgte eine Inkubation mit 200 µl Blockpuffer pro *well* für 1 Stunde bei RT. Nach einem erneuten Waschschrift wie oben beschrieben erfolgten die Proben- und Standardaufträge als Doppelbestimmung mit einem Endvolumen von 100 µl/well. Sollte der Probenauftrag verdünnt erfolgen, so wurde als Verdünnungssubstanz PBS 1 % FCS verwendet. Der bei -80 °C aliquotiert gelagerte Standard wurde durch Zugabe von PBS 10 % FCS auf die gewünschte Ausgangskonzentration von 2 000 pg/ml gebracht und davon ausgehend eine 1:1 Verdünnungsreihe in PBS 1 % FCS erstellt. Anschließend wurde die Platte abgedeckt 2 Stunden bei RT oder alternativ bei 4 °C über Nacht inkubiert, sodass der Erstantikörper an das im Stimulationsüberstand befindliche Antigen binden konnte. Anschließend wurde die Platte wie beschrieben fünfmal gewaschen und 100 µl des 1:500 in Blockpuffer gelösten Detektions-Antikörpers mit dem Enzym (Streptavidin-Merrettichperoxidase) in jedes *well* pipettiert. Nach einer einstündigen Inkubation bei RT wurde die ELISA-Platte siebenmal gewaschen, um nicht gebundenen Zweitantikörper zu entfernen. Es folgte die Zugabe des in deionisiertem Wasser gelösten farblosen Substrats *o*-Phenylenediamindihydrochlorid (OPD) in einer Endkonzentration von 0,4 mg/ml, welches in einer 30-minütigen Inkubation bei RT im Dunkeln durch eine enzymatische Reaktion umgesetzt wurde. Bei positivem Zytokinnachweis kam es zu einem deutlich sichtbaren orange-gelben

Farbumschlag. Die Zugabe von 50 µl 1 M Schwefelsäure pro *well* beendete die Reaktion durch Enzymdenaturierung. Abschließend erfolgte die Messung der optischen Dichte (OD) mit einem ELISA-Reader bei einer Testwellenlänge von 450 nm. Die Berechnung der Zytokinkonzentration aus den OD-Werten erfolgte anhand einer Standardkurve, wobei eventuelle Verdünnungen im Probenauftrag bei der Auswertung berücksichtigt wurden.

4.2.3.2 Luziferase Reportergen-Assay

Prinzip:

Diese Form des Reportergen-Assays wird genutzt um Gen- bzw. Proteinexpressionen zu untersuchen. Dazu wird ein Reportergen unter die Kontrolle eines Promotors in Form einer DNA-Sequenz mit regulatorischer Einheit gestellt. In diesem Fall waren die verwendeten hTLR9-HEK- beziehungsweise mTLR9-HEK-Zellen mit einem NFκB-Reporter-Plasmid kotransfiziert, welches als Reportergen ein Luziferase-Gen mit einem vorgeschalteten NFκB-induzierbaren Promotor enthielt. Erfolgt nach TLR9-Stimulation die Aktivierung des NFκB-Promotors, führt dies über Transkription des nachgeschalteten Luziferase-Gens zur Synthese des gleichnamigen Enzyms. Die Luziferase wird aus dem Leuchtkäfer *Photinus pyralis* gewonnen und kann nach Aktivierung in Gegenwart der Kofaktoren ATP, O₂ und Mg²⁺ sein Substrat Luziferin zu Oxyluziferin umsetzen. Bei dieser enzymatischen Oxidationsreaktion wird neben AMP und CO₂ auch Licht der Wellenlänge 560 nm frei, welches sich detektieren und quantifizieren lässt. Auf diese Weise kann die Aktivität des Promotors anhand der intrazellulären Expression der Luziferase beziehungsweise der freigesetzten Lichtmenge bestimmt werden. Hierzu werden die Zellen nach der Stimulation lysiert und die Substratlösung zum Zelllysat gegeben, sodass die Luziferase im Zelllysat die photochemische Reaktion katalysieren kann. Anschließend wird die emittierte Lichtmenge mit einem Luminometer gemessen und quantifiziert, sodass anhand des Lumineszenzlevels als Maß für die Menge an Luziferase auf die Aktivität des Promotors rückgeschlossen werden kann.

Durchführung:

Nach 6-stündiger Stimulation der transfizierten HEKs, wie in 1.2.7.1 beschrieben, wurden die Überstände abgenommen und die Zellen mit 50 µl/well 1fach konzentriertem Lysispuffer für 15 min auf einem Schüttler bei RT inkubiert. Durch anschließendes 30-minütiges Einfrieren bei -80 °C und Auftauen der Zellen wurden diese lysiert und jeweils 20 µl Zelllysat auf eine opake 96-well-Polystyrolplatte übertragen. Durch das Luminometer wurden beim Messvorgang automatisch 50 µl Substratlösung pro well hinzugegeben und nach 5 sec Reaktionszeit die Lichtemission gemessen, wobei die Angabe in RLU (*relative light units*) erfolgte.

4.2.4 Durchflusszytometrische Analyse (FACS)

4.2.4.1 Das Durchflusszytometer

Die Durchflusszytometrie, auch *fluorescence-activated cell sorting (FACS)* genannt, ist ein Verfahren zur Untersuchung und Einteilung von Zellen hinsichtlich Größe, Struktur und Expressionsdichte von Oberflächenmarkern wie auch von intrazellulären Proteinen. Dazu werden die in Suspension befindlichen zu untersuchenden Zellen mit bestimmten fluorochromgekoppelten Antikörpern markiert; diese werden mittels Laserstrahlen bestimmter Wellenlänge, die die Zellen einzeln erfassen, angeregt. Das daraufhin emittierte Licht wird - je nach Wellenlänge - von verschiedenen Detektoren im Durchflusszytometer registriert. Die Detektion der Richtung des Streulichts gibt außerdem Informationen über die Zellgröße (Vorwärtsstreulicht = *forward scatter*, FSC) und ihre Granularität (Seitwärtsstreulicht = *sideward scatter*, SSC). Mit dieser Methode können innerhalb kürzester Zeit mehrere tausend Zellen einzeln anhand ihres Fluoreszenzmusters sowie Größe und Struktur charakterisiert werden.

Häufig in der Durchflusszytometrie eingesetzte Farbstoffe sind unter anderem FITC (Fluorescein-Isothiocyanat), PE (Phycoerythrin), PerCP (Peridin Chlorophyll

Protein) oder APC (Allophycocyanin), die, mit Licht unterschiedlicher Wellenlänge angeregt, verschiedene Emissionsspektren aufweisen. Diese werden von einer Linse gesammelt, von einem System aus Spiegeln und Filtern nach ihren Wellenlängenbereichen getrennt und zu verschiedenen Detektoren ausgelenkt. Werden Antikörper verwendet, die mit unterschiedlichen Farbstoffen gekoppelt sind, können mehrere Parameter einer Zelle gleichzeitig untersucht werden, zumal jeder Fluoreszenzfarbstoff ein spezifisches Signal erzeugt, das getrennt von anderen detektiert und quantifiziert werden kann. Dabei spiegelt das emittierte Licht die Menge an zellgebundenen Antikörpern wider und dient so als Maß für die Expressionsstärke des interessierenden Merkmals auf oder in der Zelle.

4.2.4.2 Detektion humaner pDCs durch den Nachweis von CD123 und CD303 auf der Zelloberfläche

Vor der direkten Zelloberflächenfärbung wurden frisch gewonnene humane PBMCs (2×10^6 /Probe) mit PBS + 1 % FCS durch Zentrifugation bei 1 500 rpm 5 min in einem FACS-Röhrchen gewaschen und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde daraufhin im Rücklauf (etwa 100 μ l) resuspendiert und mit den im Folgenden angegebenen empfohlenen Antikörperverdünnungen von Anti-CD3 (1:5), Anti-CD123 (1:10) und Anti-CD303 (BDCA-2) (1:10) 20 min lang bei 4 °C unter Lichtausschluss inkubiert. Um die Gefahr der proteolytischen Abspaltung gebundener Antikörper oder ihre Internalisierung mittels Endozytose zu verringern, wurden sämtliche Arbeitsschritte bei 4 °C durchgeführt. Um nicht gebundene Antikörper zu entfernen und somit die störende Hintergrundfluoreszenz zu reduzieren, wurden die Zellen anschließend durch Zentrifugation gewaschen, bevor sie für die durchflusszytometrische Messung in 500 μ l PBS + 1 % FCS aufgenommen wurden.

Zum Ausschluss unspezifisch gebundener Antikörper wurde bei den Experimenten jeweils eine Isotypkontrolle mitgeführt, wobei diese dem Isotyp des Antikörpers entsprach und mit demselben Farbstoff konjugiert war. Die Färbung wurde analog zu den Proben durchgeführt.

Im vorliegenden Fall erfolgte die Analyse an einem BD FACS Aria III™-Zellsortiersystem. Pro Probe wurden mindestens 5×10^4 Zellen aufgenommen. Die abschließende Auswertung der Daten wurde unter Verwendung der DIVA®-Software durchgeführt. Die entsprechenden Parameter oder Fluoreszenzen wurden dazu auf die X- oder Y-Achse eines zweidimensionalen Dot-Plot aufgetragen, um die Beziehung zweier verschiedener Fluoreszenzen einander gegenüber zu stellen und so bestimmte Aussagen über eine interessierende Zellpopulation treffen zu können (Luttmann et al., 2006).

4.2.5 Immunhistochemische Färbung und Fluoreszenzmikroskopie

Prinzip:

Die Immunhistochemie ist eine Methode zur Detektion und Identifizierung von Proteinen über die Bindung von mono- oder polyklonalen Antikörpern an gewebe- oder zellspezifischen Antigenen. Dadurch können nicht nur Hinweise auf die Expressionsstärke eines bestimmten Proteins (beispielsweise ein bestimmter (Membran-) Rezeptor) gegeben, sondern auch dessen Verteilung und Lokalisation im Gewebe oder in Zellen ermittelt werden. Bei der indirekten 2-Schritt-Methode wird ein am Antigen gebundener unkonjugierter Erst-Antikörper mit einem konjugierten sekundären Antikörper gekoppelt. Dieser ist gegen das Fc-Fragment des Primär-Antikörpers gerichtet. Als Konjugat dienen beispielsweise partikuläres Material (z. B. Goldpartikel), radioaktive Isotope, Enzyme oder Fluoreszenzfarbstoffe. Bei der heute kaum noch angewandten direkten Methode können Erst-Antikörper jedoch auch direkt konjugiert eingesetzt werden.

Die Fluoreszenzmethode ist rasch und einfach durchführbar, wobei die eingesetzten Fluorochrome mit einer bestimmten Wellenlänge – als Lichtquelle können unter anderem Laser, Halogen- oder UV-Lampen dienen – angeregt werden. Diese geben die aufgenommene Energie sofort in Form von Lichtstrahlen ab, wobei die Wellenlänge des emittierten Lichtes länger als die des Anregungslichtes ist.

Häufig angewandte Fluorochrome sind FITC (Fluorescein Isothiocyanat) oder TRITC (Tetramethyl Rhodamine Isothiocyanat), die auch in Versuchen zu dieser Arbeit Verwendung fanden. Nach Anregung mit einer Lichtquelle emittiert FITC ein grünes Fluoreszenzlicht mit einem Emissionspeak bei ca. 520 nm und TRITC bei ca. 600 nm.

Durchführung:

Die Zellen wurden am Vortag der Färbung auf sterile Glasobjektträger mit aufgesetzten 8-Kompartiment-Zellkultureinsätzen aus Silikon (flexiPERM® slide) ausgesät. Zur Verbesserung der Zelladhäsion waren die Objektträger zuvor mit 0,01 mg/ml Poly-L-Lysin (ein Homopolymer der essentiellen Aminosäure L-Lysin) beschichtet worden, das den Objektträgeroberflächen eine positive Ladung verleiht und, vor allem bei Abwesenheit von Serumproteinen, Zellen besser anhaften lässt. Die Färbung erfolgte am Folgetag direkt in den Zellkultureinsätzen.

Zum Ausschluss unspezifisch gebundener Antikörper wurde bei den Experimenten jeweils eine Isotypkontrolle mitgeführt, wobei diese dem Isotyp des Antikörpers entsprach. Die Färbung wurde analog zu den Proben durchgeführt.

4.2.5.1 Extrazelluläre Färbung

Für die Färbung extrazellulärer Strukturen wurden die Zellen mit PBS 5 min lang bei 4 °C gewaschen und anschließend für 30 min mit dem Primärantikörper (21E2 oder 5G5) beziehungsweise der Isotypkontrolle α -Mouse IgG2a in PBS + 0,5 % BSA in einer feuchten Kammer bei RT inkubiert. Nach einem erneuten Waschschrift erfolgte die Inkubation des in PBS + 0,5 % BSA gelösten fluoreszenzgekoppelten Sekundärantikörpers (Alexa Fluor 488, ein FITC-Homolog, 1:500; sowie Dylight 649 1:200) für 30 min bei RT. Daraufhin wurden die Zellen gewaschen und 20 min lang mit 2 % Formaldehyd in PBS fixiert. Um ein schnelles Ausbleichen der Fluorochrome zu verhindern und ein Austrocknen der Zellen zu verzögern wurden die Objektträger nach Abnahme der Zellkultureinsätze mit einigen Tropfen *Flourescent Mounting Medium* versehen und möglichst ohne

Einschluss von Luftblasen mit einem Deckglas abgedeckt. Zur Abdichtung wurden die Ränder des Deckglases zusätzlich mit Klarlack versiegelt.

4.2.5.2 Intrazelluläre Färbung

Für die Färbung intrazellulärer Strukturen wurden die Zellen mit PBS 5 min lang bei RT gewaschen und daraufhin mit PBS + 2 % Formaldehyd für 10 min bei RT fixiert. Nach einem weiteren Waschschrift wurden die Zellen mit PBS + 0,3 % Saponin + 2 % FCS für 1 h behandelt, um die Durchlässigkeit der Zellmembran für die Antikörper zu erhöhen. Anschließend erfolgte die Inkubation des Primärantikörpers beziehungsweise der Isotypkontrolle ü. N. bei 4° C. Am Folgetag wurden die Zellen mit Saponinlösung 5 min bei RT gewaschen und daraufhin mit dem Sekundärantikörper Alexa Fluor 488 goat α -mouse IgG 1:500 in PBS + 0,3 % Saponin + 2 % FCS verdünnt für 1 h bei RT inkubiert. Nach einem letzten Waschschrift konnten die Zellen wie oben beschrieben mit *Flourescent Mounting Medium* versehen und mit einem Deckglas abgedeckt werden. So konnten die in Aluminiumfolie gewickelten Objektträger bis zu 2 Wochen in einer dunklen Kammer bei 4 °C aufbewahrt werden.

Zur Auswertung der Färbung wurden die Zellen unter einem Fluoreszenzmikroskop (Axiophot, Carl Zeiss Microimaging, Göttingen) mit einer Halogenlampe (HXP 120, Leistungselektronik GmbH, Jena) als Anregungslicht-Quelle betrachtet und mit einer Spot Insight Monochrome (Visitron Systems GmbH, Puchheim) fotografiert.

5 Ergebnisse

5.1 Stimulationsvergleich verschiedener Zelllinien mit unterschiedlichen TLR9-Liganden

5.1.1 Stimulation von mit murinem TLR9 transfizierten HEK-293 mit verschiedenen ODN

Zunächst wurden mTLR9 HEK 293 Zellen, die mit einem NFκB-Luziferase-Reporterplasmid kotransfiziert waren (HEK 293-mTLR9-luc), mit verschiedenen TLR9-Liganden stimuliert, um die Wirkung der jeweiligen Substanzen auf die Zellen zu bestimmen und optimale Stimuluskonzentrationen zu ermitteln.

In Grafik 1 ist die NFκB-Aktivität vergleichend nach Stimulationen mit ODN 1668, einem spezifischen murinen TLR9-Liganden, und ODN 2006, einem spezifischen humanen TLR9-Liganden, dargestellt. Als Negativkontrolle (NTC) diente Medium ohne Stimuluszusatz.

Im Vergleich zur Negativkontrolle war eine sehr starke NFκB-Induktion durch die Stimulation mit ODN 1668 zu erkennen, die im höchsten Wert mehr als das 270-fache der Negativkontrolle betrug. Weiterhin zeigte sich, dass die NFκB-Induktion durch beide Oligodeoxynukleotide dosisabhängig erfolgte. Interessanterweise wies die Stimulation mit 0,3 μM ODN 1668 eine deutlich höhere Induktion auf als die dreifach konzentrierte Substanz (1 μM).

Zu erkennen ist weiterhin, dass ODN 2006 auch als nicht-spezifischer mTLR9-Ligand ein deutliches Stimulationspotential besitzt. Verglichen mit ODN 1668 jedoch bewegten sich die NFκB-Induktionen in einem erheblich niedrigeren Wertebereich. Sie entsprachen in etwa einem Drittel bis der Hälfte einer Stimulation durch ODN 1668, zeigten aber dennoch, gemessen an der Negativkontrolle, ein circa 80- bis 100-faches Induktionspotential. Im Gegensatz zu den Beobachtungen bei ODN 1668 verhielt sich die Induktionsrate durch ODN 2006 jedoch proportional zu den Stimuluskonzentrationen. Der Unterschied in der Induktion durch die unterschiedlichen Stimuluskonzentrationen war dabei jedoch geringer als es für ODN 1668 beobachtet worden war.

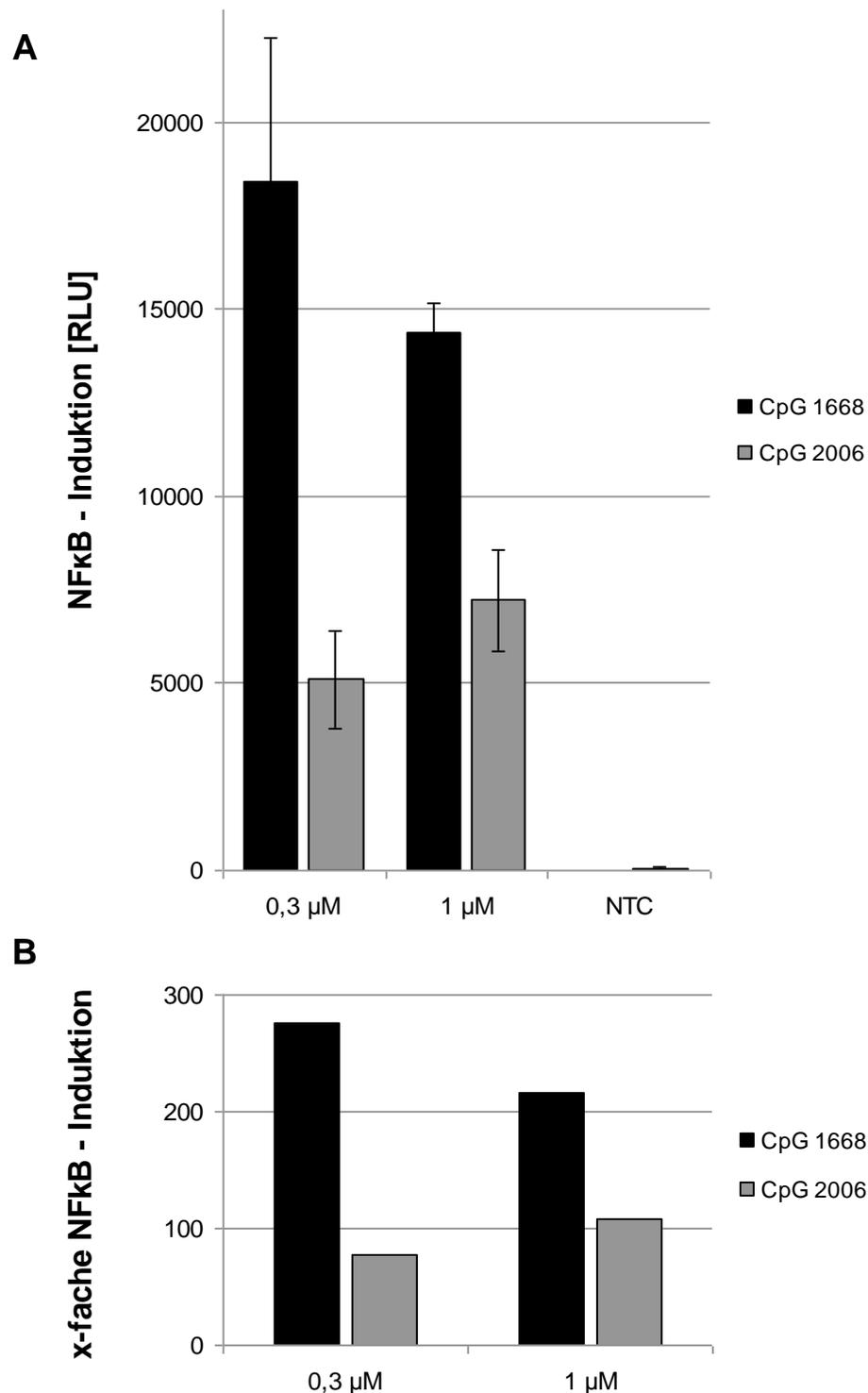


Abbildung 5-1: Unterschiede in der NFκB-Induktion bei HEK 293-mTLR9-luc durch verschiedene ODN. HEK 293-mTLR9-luc (4×10^4 Zellen/well) wurden 6h mit den angegebenen Stimuli inkubiert. Es erfolgte die Messung der NFκB-Aktivität mittels Luziferase-Assay. **(A)** NFκB-Aktivität von HEK 293-mTLR9-luc nach Stimulation mit ODN 1668 und ODN 2006 in verschiedenen Konzentrationen. Grafisch dargestellt sind die Mittelwerte und ihre Standardabweichungen aus zwei unabhängigen Experimenten. **(B)** Darstellung der x-fachen NFκB-Induktion durch ODN 1668 und ODN 2006 im Vergleich.

5.1.2 Stimulation von mit humanem TLR9 transfizierten HEK 293 mit ODN 2006

In weiteren Versuchen wurden HEK 293 - hTLR9 Zellen, die mit einem NFκB-Luziferase-Reporterplasmid kotransfiziert waren (HEK 293-hTLR9-luc), hinsichtlich ihrer NFκB-Induktion durch eine Stimulation mit ihrem spezifischen Liganden ODN 2006 untersucht. Um auch hier eine optimale Stimuluskonzentration ermitteln zu können, erfolgte in einem Vorversuch die Stimulation der Zellen mit einer ODN 2006–Titrationsreihe. Als Negativkontrolle (NTC) diente Medium ohne Stimuluszusatz. Die Ergebnisse sind in Grafik 5-2 dargestellt.

Die Daten zeigen, dass nur minimale Abstufungen in der NFκB-Induktion durch die ODN 2006-Verdünnungsreihe festzustellen waren. Darüber hinaus ist zu erkennen, dass durch eine weitere Erhöhung der Stimuluskonzentration keine signifikante Steigerung der NFκB-Aktivität erzielt werden konnte. Somit waren 0,3 μM ODN 2006 ausreichend und wurden fortan als Standardkonzentration eingesetzt. Die Angaben der Standardabweichungen verdeutlichen außerdem, dass es zwischen den Einzelversuchen erhebliche Unterschiede in der Höhe des Induktionsniveaus gab (Grafik 5-2 A).

Weiterhin ist auffällig, dass die Negativkontrolle bei diesen Zellen im Vergleich zum murinen Pendant extrem hohe Werte annimmt (circa 60 000 RLU bei hTLR9-HEK vs. circa 30 RLU bei mTLR9-HEK). Dies schlägt sich durch entsprechend wesentlich niedrigere Induktionsraten bei hTLR9-HEK im Vergleich zum murinen System nieder (Grafik 5-2 B). Während bei letzterem durch 0,3 μM des spezifischen Liganden ODN 1668 eine mehr als 250-fache NFκB-Induktion hervorgerufen werden konnte, bewirkte ODN 2006 als spezifischer Ligand nur eine etwa 6-fache Induktion bei hTLR9-HEK (Grafik 5-2 C).

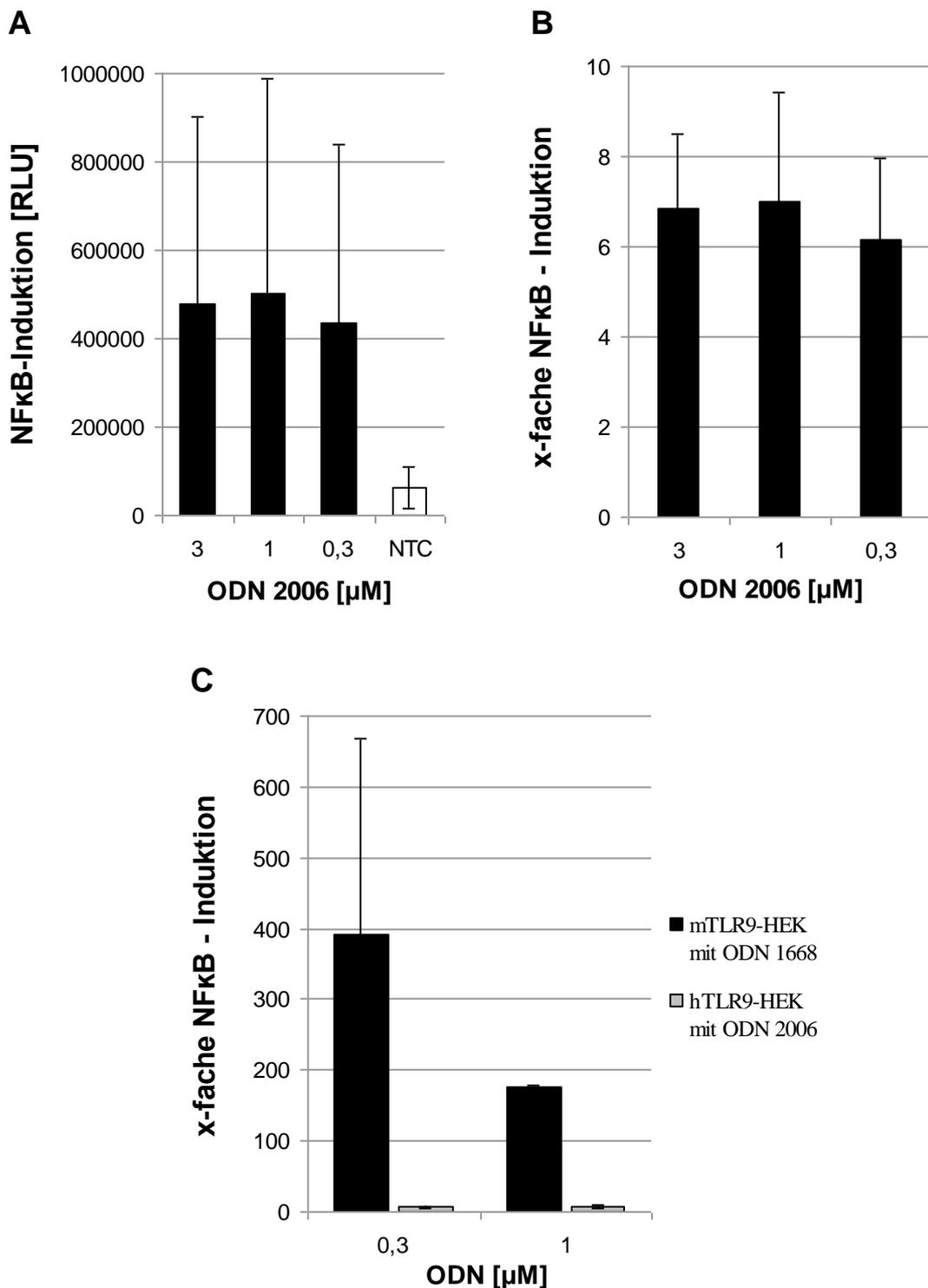


Abbildung 5-2: NF κ B-Induktion bei HEK 293-hTLR9-luc durch ODN 2006. (A) Stimulation von hTLR9-HEK mit einer ODN 2006-Verdünnungsreihe sowie Medium als Negativkontrolle (NTC). (B) Darstellung der entsprechenden x-fachen NF κ B-Induktionen durch ODN 2006. (C) Vergleichende Gegenüberstellung der NF κ B-Induktionsraten bei mouse TLR9-HEK und human TLR9-HEK durch ihre jeweiligen spezifischen Liganden. Grafisch dargestellt sind die Mittelwerte und ihre Standardabweichungen aus jeweils zwei unabhängigen Experimenten.

5.1.3 Versuche mit humanen PBMCs

5.1.3.1 Stimulation humaner PBMCs mit ODN 2006

Humane PBMCs, die aus Frischblut eines Spenders aufgereinigt worden waren, wurden in 48-Well-Kulturplatten in einem Endvolumen von 300 µl/Vertiefung mit einer ODN 2006-Verdünnungsreihe stimuliert, wobei die Inkubationszeit 22 h betrug. Anschließend wurden die Kulturüberstände hinsichtlich ihres Gehaltes an Interleukin 6 als proinflammatorischem Zytokin mittels ELISA untersucht. Die entsprechenden Ergebnisse als Mittelwerte und ihre Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimenten sind in Grafik 5-3 zusammengestellt.

Primär auffällig ist eine Negativkontrolle (Medium ohne Stimuluszusatz) mit einem signifikant niedrigeren Wert im Vergleich zu demjenigen der hTLR9 HEK 293 Zellen.

Weiterhin zu erkennen ist, dass eine Stimulation von PBMCs mit ODN 2006 zu einer deutlichen dosisabhängigen Produktion von Interleukin 6 führte, wobei aufgrund der niedrigen Negativkontrolle hohe Induktionsraten erzielt werden konnten (bspw. etwa 23-fache Induktion durch eine Stimulation mit 3 µM ODN 2006).

Interessant ist die Beobachtung, dass sich die Interleukin 6-Werte reziprok zu den Stimuluskonzentrationen verhielten, sprich mit abnehmender ODN-Konzentration steigende Zytokinsekretionen erzielt werden konnten. Während beispielsweise die höchste Stimuluskonzentration von 3 µM ODN 2006 eine Produktion von etwa 375 pg/ml Interleukin 6 hervorrief, konnten mit 0,01 µM mehr als das Doppelte an Interleukin-6 und somit etwa das 48-fache der Negativkontrolle erzielt werden.

Die gezeigten Ergebnisse ließen sich in allen Experimenten, die unter identischen Bedingungen durchgeführt wurden, gut reproduzieren, was unter anderem an der geringen Streubreite der Werte zu erkennen ist.

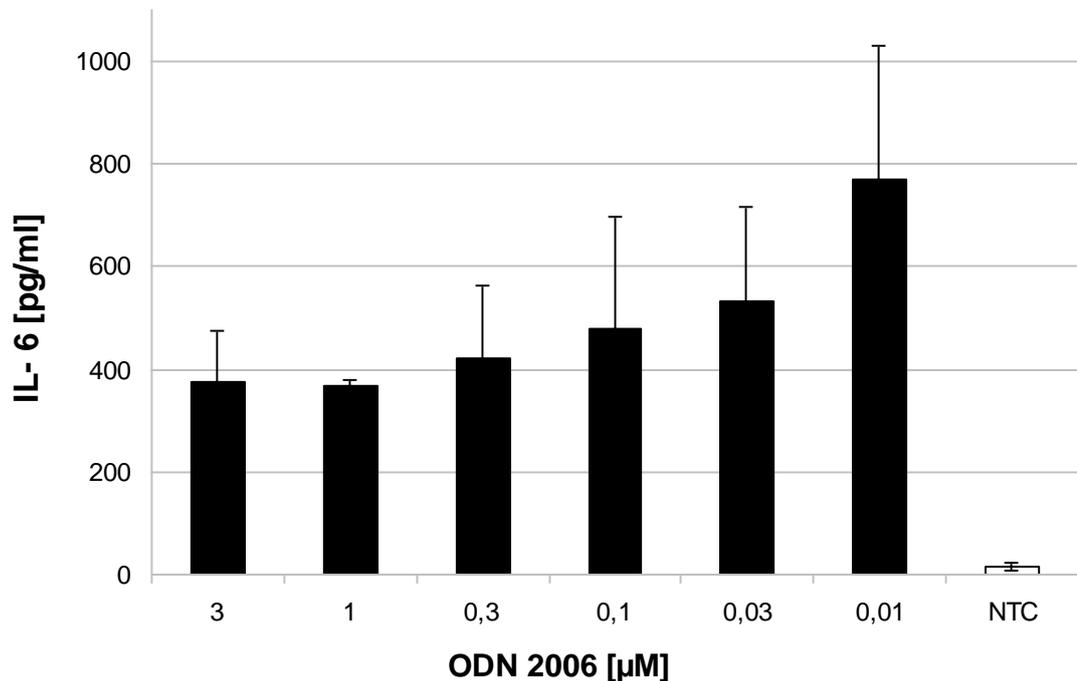


Abbildung 5-3: IL-6-Sekretion durch humane PBMCs nach Stimulation mit ODN 2006.

PBMCs (1×10^6 Zellen/well) wurden 22h mit dem TLR9-Liganden ODN 2006 in verschiedenen Konzentrationen in einem Endvolumen von 300 μ l inkubiert. Anschließend erfolgte die Bestimmung von IL-6 im Kulturüberstand mittels ELISA. NTC = Medium ohne Stimulus. Grafisch dargestellt sind die Mittelwerte und ihre Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimenten.

5.1.3.2 Stimulation humaner PBMCs mit bDNA von *E. coli* K12

Nachdem die Sekretion von Interleukin-6 durch PBMCs nach einer Stimulation mit dem spezifischen TLR9-Liganden ODN 2006 überprüft worden war, sollte in weiteren Versuchen das Ansprechen der Zellen auf die bDNA des Stammes *E. coli* K12 untersucht werden. Es wurden mehrere unabhängige Experimente durchgeführt, von denen zwei in Grafik 5-4 exemplarisch dargestellt sind.

Es ist zu erkennen, dass eine Stimulation mit *E. coli*-DNA zu einer signifikanten Interleukin-6-Sekretion führte. Auffällig hierbei im Vergleich zu der Stimulation mit ODN 2006 war, dass die erzielten Zytokinwerte in einem deutlich höheren

Werteniveau lagen als bei Stimulationen mit ODN 2006 und sich außerdem proportional zu den Stimuluskonzentrationen verhielten. Somit sank die induzierte Interleukin-6-Sekretion mit abnehmender Stimuluskonzentration.

Weiterhin zeigte sich, dass in Reaktion auf eine Stimulation mit 200 µg/ml bDNA von *E. coli* K12 mehr als das Doppelte der Menge an Interleukin-6 im Vergleich zu einer Stimulation mit 0,01 µM ODN 2006 sezerniert wurde.

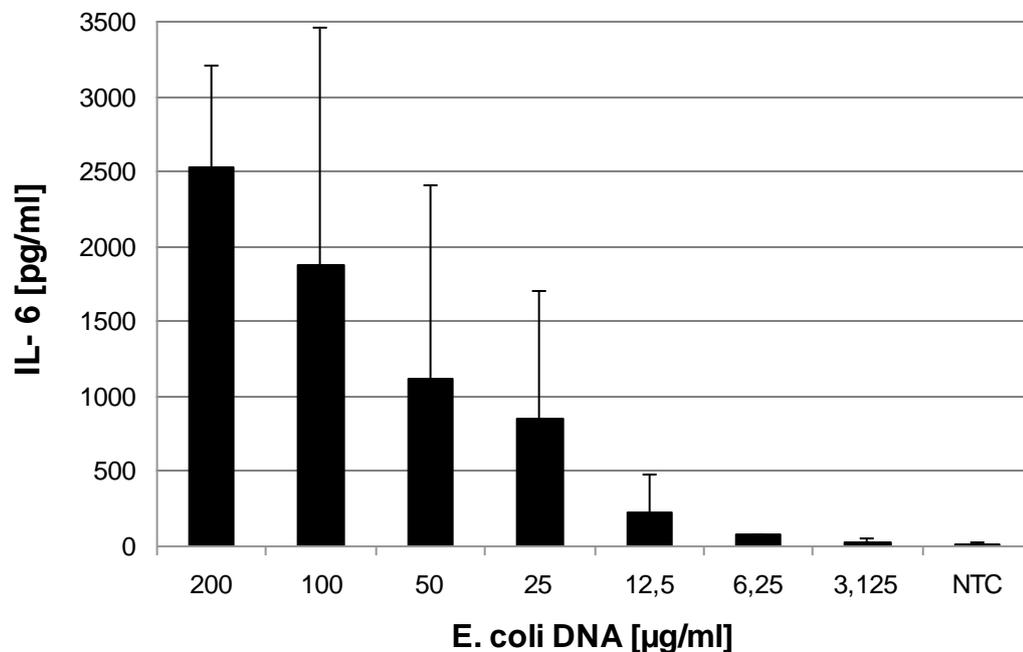


Abbildung 5-4: IL-6-Sekretion durch humane PBMCs nach Stimulation mit bDNA von *E. coli* K12. PBMCs (1×10^6 Zellen/well) wurden 22h mit dem TLR9-Liganden *E. coli* - DNA in verschiedenen Konzentrationen in einem Endvolumen von 300 µl inkubiert. Anschließend erfolgte die Bestimmung von IL-6 im Kulturüberstand mittels ELISA. NTC = Medium ohne Stimulus. Grafisch dargestellt sind die Mittelwerte und ihre Standardabweichungen aus zwei unabhängigen Experimenten.

5.1.4 Stimulationsergebnisse der verschiedenen Referenzzelllinien

Zusammenfassend lassen die Ergebnisse der verschiedenen Stimulationen erkennen, dass ODN 1668 als spezifischer Ligand von mTLR9-HEK 293 bereits bei niedrigen Konzentrationen von 0,3 μM sehr hohe NF κ B-Induktionen hervorrufen konnte. Hinsichtlich einer Stimulation mit ODN 2006 zeigten die Zellen ein deutlich schwächeres Ansprechen.

Als spezifischer Ligand von hTLR9 induzierte ODN 2006 bei hTLR9-HEK 293 eine signifikante NF κ B-Aktivität und Interleukin 8-Produktion. Verglichen mit den Daten der mTLR9-HEK Zellen jedoch lagen hier die Negativkontrollen jederzeit auf einem sehr hohen Wertenniveau, weshalb die Induktionsraten insgesamt gesehen bei hTLR9-HEK deutlich schwächer waren.

PBMCs wiesen in den Negativkontrollen eine sehr niedrige Hintergrundaktivität auf, sodass eine Stimulation mit den spezifischen hTLR9-Liganden ODN 2006 und bDNA von *E. coli* K12 zu einer signifikanten Sekretion von Interleukin-6 und somit zu hohen Induktionsraten führte. Auffällig dabei war, dass sich die ODN 2006-induzierten Zytokinkonzentrationen reziprok, die durch *E. coli*-DNA induzierten Interleukinkonzentrationen jedoch proportional zu den Stimuluskonzentrationen verhielten. Generell lagen die durch *E. coli*-DNA induzierten Zytokinsekretionen in einem deutlich höheren Wertebereich.

5.1.5 Versuche mit humanen Gingiva-Fibroblasten (HGFs)

5.1.5.1 Stimulation von HGF-1 mit ODN 2006

Nachdem in PBMCs als humanem Referenzmodell die Stimulustestung und die für unsere Versuche optimale Dosisfindung durchgeführt worden war, sollten die gewonnenen Erkenntnisse in weiteren Experimenten auf die zu untersuchende primäre Zelllinie humaner Gingiva-Fibroblasten übertragen werden, um ein Infektionsmodell *in vitro* zu etablieren.

Humane Gingiva-Fibroblasten (HGF-1), ATCC CRL-2014, bezogen von LGC Standards, wurden in einem Endvolumen von 100 µl/Vertiefung mit einer Verdünnungsreihe des spezifischen TLR9-Liganden ODN 2006 stimuliert, wobei die Inkubationszeit 24 h betrug. Daraufhin wurden die Kulturüberstände hinsichtlich ihres Gehaltes an Interleukin 6 als proinflammatorischem Zytokin mittels ELISA untersucht.

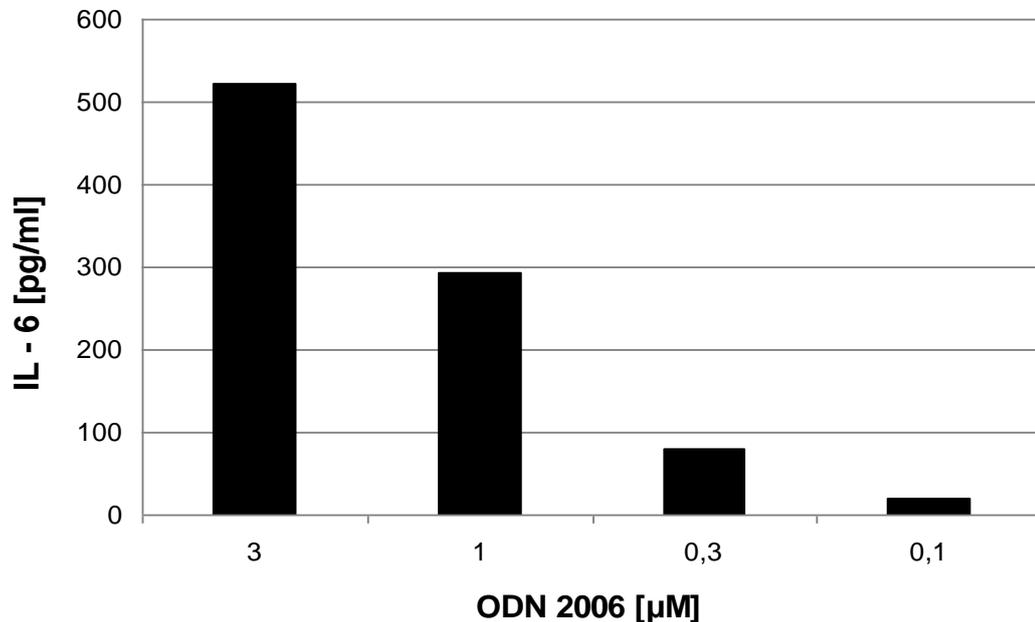


Abbildung 5-5: IL-6-Sekretion durch HGF-1 nach Stimulation mit ODN 2006.

HGFs ($4,5 \times 10^5$ Zellen/well) wurden 24h mit dem TLR9-Liganden ODN 2006 in verschiedenen Konzentrationen in einem Endvolumen von 100 µl inkubiert. Anschließend erfolgte die Bestimmung von IL-6 im Kulturüberstand mittels ELISA. Grafisch dargestellt ist eines von zwei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten, die vergleichbare Ergebnisse lieferten. Alle Werte sind abzüglich der Negativkontrolle aufgeführt.

Es zeigt sich, dass HGFs ein dosisabhängiges Ansprechen auf den Stimulus ODN 2006 als spezifischem TLR9-Liganden aufwiesen. Auffällig hierbei war, dass sich die erzielten Zytokinwerte proportional zu den Stimuluskonzentrationen verhielten, wohingegen bei der Stimulation humaner PBMCs mit demselben Stimulus ein reziprokes Induktionsverhalten beobachtet worden war (siehe Grafik 5-3). Somit sank die induzierte Interleukin-6-Sekretion mit abnehmender Stimuluskonzentration. Insgesamt gesehen lagen die hier erzielten IL-6-Werte auf einem niedrigeren Niveau verglichen zu Versuchen mit humanen PBMCs (\leq ca. 500 pg/ml).

5.1.5.2 Stimulation von HGF-1 mit bDNA von *E. coli* K12

Nachdem die Zytokinsekretion durch HGFs nach Stimulation mit dem spezifischen TLR9-Liganden ODN 2006 validiert worden war, wurde in weiteren Experimenten das Ansprechen der Zellen auf die bDNA von *E. coli* K12 untersucht. Es wurden mehrere unabhängige Versuche durchgeführt. Die entsprechenden Ergebnisse sind in Grafik 5-6 dargestellt.

Grafik 5-6 A zeigt, dass eine Stimulation von HGFs mit bDNA von *E. coli* K12 zu einer deutlichen Zytokinproduktion und -sekretion führte. Hierbei verhielten sich die erzielten Zytokinwerte proportional zu den eingesetzten Stimuluskonzentrationen, ähnlich wie es bereits in den Experimenten mit PBMCs beobachtet worden war. In dem hier dargestellten Versuch wurden $4,5 \times 10^4$ Zellen pro Vertiefung auf der Stimulationsplatte eingesetzt, also deutlich weniger Zellen als in den Versuchen mit PBMCs. Somit lagen die erzielten Interleukin-6-Werte in vergleichsweise niedrigeren Bereichen. In einem weiteren Experiment sollte untersucht werden, ob die Induktionsraten durch eine Erhöhung der Zellzahl im Versuchsansatz gesteigert werden können.

In den folgenden Versuchen wurde die Zellzahl verdoppelt auf 1×10^5 Zellen pro Vertiefung. Das Resultat kann Grafik 5-6 B entnommen werden.

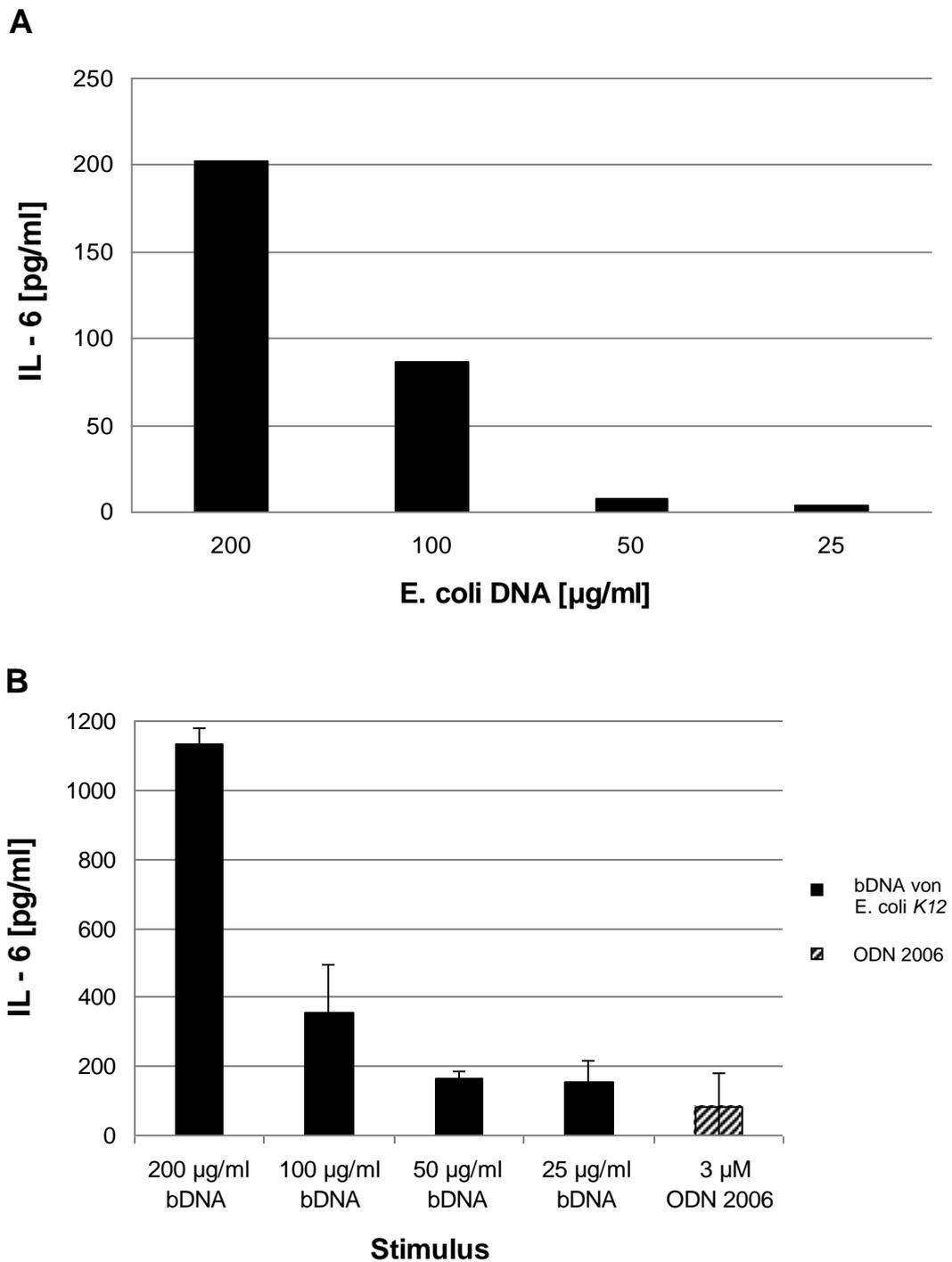


Abbildung 5-6: IL-6-Sekretion durch HGF-1 nach Stimulation mit bDNA von *E. coli* K12.

(A) $4,5 \times 10^4$ Zellen/well bzw. (B) 1×10^5 Zellen/well wurden 24 h mit dem TLR9-Liganden bDNA von *E. coli* K12 in verschiedenen Konzentrationen in einem Endvolumen von 100 µl inkubiert. Anschließend erfolgte die Bestimmung von IL-6 im Kulturüberstand mittels ELISA. Grafik (A) zeigt die Ergebnisse eines von zwei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten, die vergleichbare Resultate lieferten. In Grafik (B) sind grafisch die Mittelwerte und ihre Standardabweichungen aus zwei unabhängigen Experimenten dargestellt. Vergleichend ist als Positivkontrolle die IL-6-Induktion durch 3 µM ODN 2006 gezeigt.

Es ist zu erkennen, dass durch eine Verdopplung der Zellzahl im Stimulationsansatz die Induktionsraten mindestens vervierfacht und somit deutlich gesteigert werden konnten (204 pg/ml IL-6 durch $4,5 \times 10^4$ Zellen gegenüber 130 pg/ml IL-6 durch 1×10^5 Zellen bei einer Stimulation mit 200 µg/ml DNA). Dieses Ergebnis konnte in zwei unabhängigen Experimenten reproduziert und bestätigt werden, was unter anderem an der geringen Streubreite der Werte zu erkennen ist.

Um das Stimulationspotential der bDNA von *E. coli* K12 besser einstuft zu können, ist in Grafik 5-6 B vergleichend die durchschnittliche durch ODN 2006 induzierte Zytokinproduktion als Positivkontrolle aufgeführt. Wie zu erkennen ist, wird durch eine Stimulation mit bDNA eine bis zu 14fach höhere Interleukin-6-Sekretion erzielt als durch die Kontrollsubstanz ODN 2006.

Um ausschließen zu können, dass es sich bei der doch deutlich höheren Induktionsrate durch die bDNA von *E. coli* K12 um Artefakte durch beispielsweise Verunreinigungen handelt, wurde zur Kontrolle eine Einzelstimulation der HGFs mit 0,1 µg/ml LPS durchgeführt. In Grafik 5-7 sind die erzielten Zytokinsekretionen durch Einzelstimulationen mit Lipopolysaccharid, *E. coli*-DNA und ODN 2006 vergleichend dargestellt.

Lipopolysaccharid wies eine sehr hohe Interleukin-6-Induktion auf. Im Vergleich dazu war das Stimulationspotential der bDNA nur etwa halb so hoch, lag damit aber um ein Vielfaches höher als das Induktionspotential des synthetischen Oligodeoxynukleotids ODN 2006. Dieses Ergebnis zeigt, dass eine Endotoxinverunreinigung der hier verwendeten Stimuli unwahrscheinlich ist.

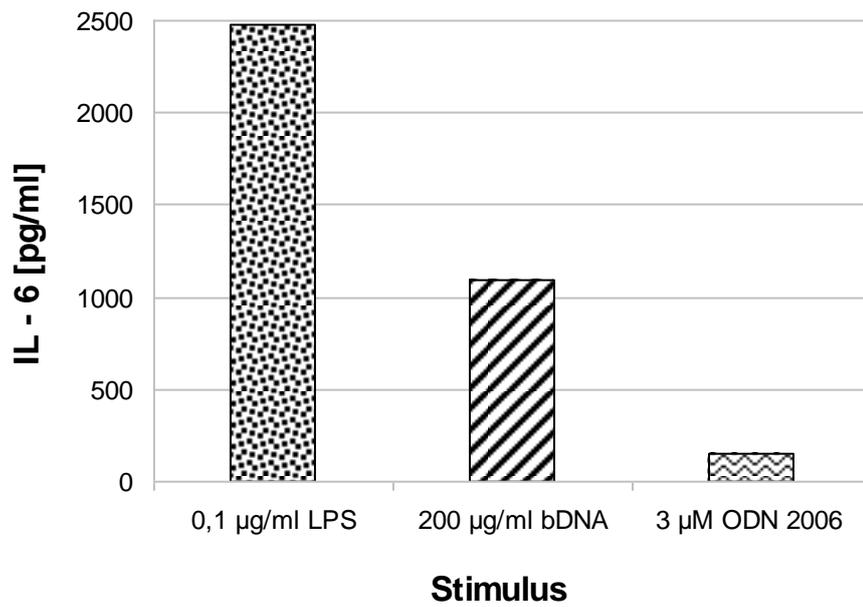


Abbildung 5-7: Vergleich der IL-6-Induktion durch LPS, bDNA und ODN 2006.

In dieser Grafik sind vergleichend die erzielten IL-6-Werte durch eine Einzelstimulation mit LPS, bDNA von *E. coli K12* oder ODN 2006 dargestellt. Die Werte sind abzüglich der Negativkontrolle aufgeführt.

5.2 Suppressionsvergleich verschiedener Zelllinien mit G-ODN

5.2.1 Versuche mit murinen TLR9 - HEK 293

5.2.1.1 Suppression der NFκB-Induktion durch ODN 1668 mit G-ODN

In weiteren Versuchen wurde der Effekt einer Ko-Stimulation mit CpG 1668 und einem inhibitorischen, poly-Guanosin-haltigen ODN untersucht. Stellvertretend sind in Grafik 5-8 die Ergebnisse eines von zwei unabhängigen Versuchen dargestellt, welche vergleichbare Resultate zeigten.

Die NFκB-Aktivität durch eine Stimulation mit ODN 1668, wie sie bereits in 5.1.1 beschrieben wurde, bestätigte sich in diesen Versuchen erneut mit vergleichbar hohen Induktionswerten.

Die Stimulation von HEK 293-mTLR9-luc mit ODN 1668 in Anwesenheit des inhibitorischen Oligodeoxynukleotids G-ODN (1 μM) bewirkte eine signifikante Suppression der NFκB-Induktion auf fast 1 % des Ausgangswertes. Durch eine Erhöhung der G-ODN-Konzentration auf 3 μM konnte eine weitere Inhibition der NFκB-Aktivität bis auf Werte im Bereich der Negativkontrolle erzielt werden (Grafik 5-8 A). Weiterhin ist zu erkennen, dass eine Stimulation mit G-ODN alleine kaum stimulatorische Effekte aufwies (Grafik 5-8 C).

Als Kontrollsubstanz diente GC-ODN, ein Oligodeoxynukleotid, bei welchem die CpG-Dinukleotide zu einer GpC-Sequenz ohne eigene stimulatorische oder inhibitorische Wirkung invertiert waren. Durch eine Kostimulation von ODN 1668 mit GC-ODN wurden mehr als 85 % des Ausgangswertes erreicht, was verdeutlicht, dass GC-ODN die stimulatorischen Effekte von ODN 1668 kaum beeinträchtigte (Grafik 5-8 C). Aufgrund dessen kann davon ausgegangen werden, dass die gezeigten Hemmeffekte von G-ODN spezifisch waren. Dieses Kontroll-ODN wies zwar im Vergleich zu G-ODN eine etwas höhere

stimulatorische Aktivität auf, die jedoch gemessen an der Induktion durch CpG 1668 sehr niedrig war.

Bei einer Kostimulation mit ODN 2006 und G-ODN konnten ähnliche Effekte beobachtet werden (Grafik 5-8 B). Zunächst konnte erneut das deutlich schwächere Induktionspotential von ODN 2006 verglichen mit ODN 1668 bestätigt werden. Des Weiteren führte die Zugabe von G-ODN auch hier zu einer Inhibition der NFκB-Aktivität.

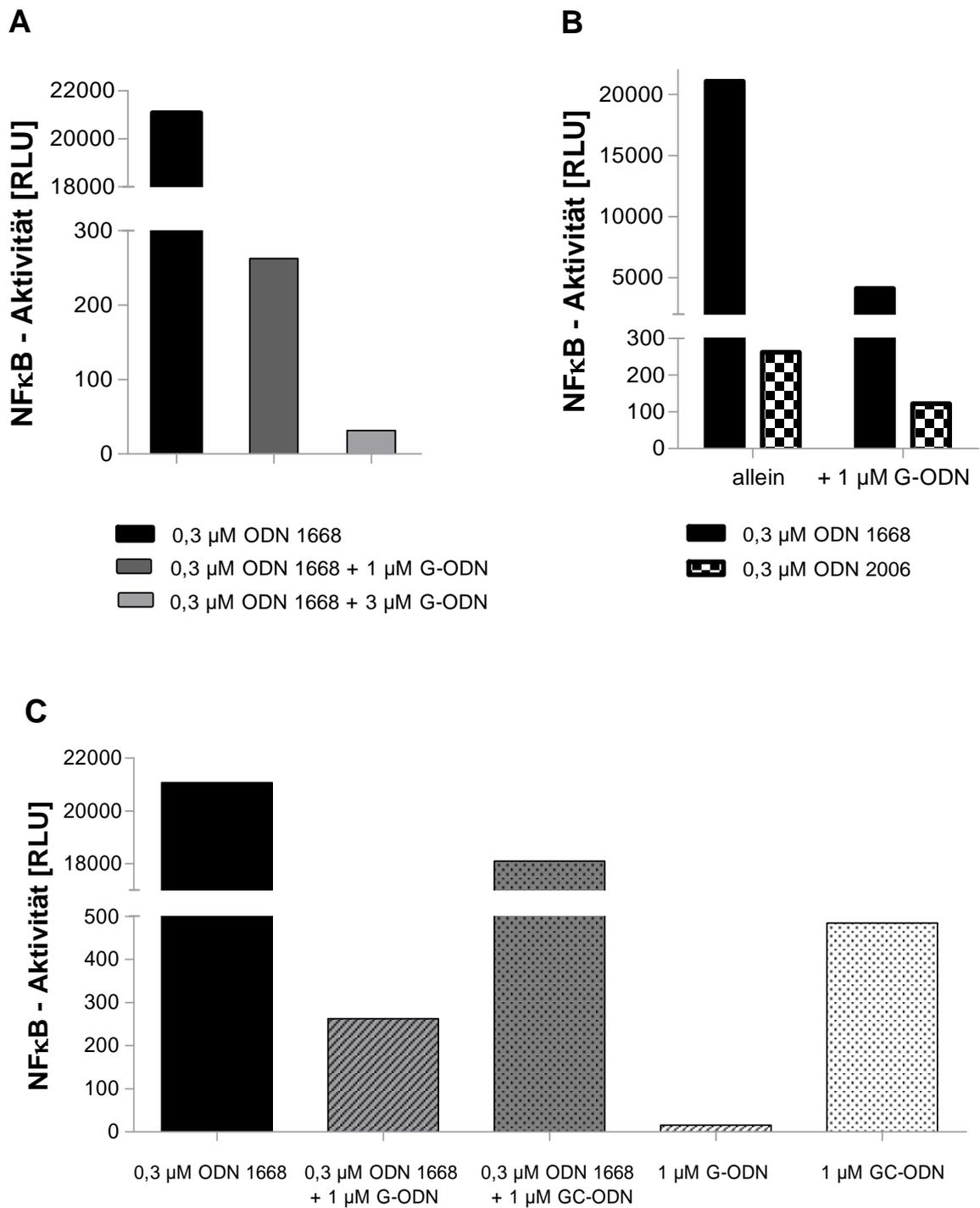


Abbildung 5-8: Inhibition einer NF κ B-Induktion bei HEK 293-mTLR9-luc durch G-ODN. (A) NF κ B-Induktion durch CpG 1668 und Inhibition durch 1 μM und 3 μM G-ODN. (B) Darstellung der NF κ B-Induktion durch ODN 1668 und ODN 2006 sowie ihrer Suppression durch 1 μM G-ODN im Vergleich. (C) NF κ B-Aktivität von HEK 293-mTLR9-luc nach 6 h Stimulation mit 0,3 μM ODN 1668 allein und einer Kostimulation mit 0,3 μM ODN 1668 und 1 μM G-ODN bzw. 1 μM GC-ODN. Grafisch dargestellt ist jeweils einer von zwei unabhängigen Experimenten, die vergleichbare Ergebnisse lieferten. Alle Werte sind abzüglich der Negativkontrolle aufgeführt (NTC = 36).

5.2.2 Versuche mit humanen TLR9 HEK 293

5.2.2.1 Suppression der NF κ B-Induktion durch ODN 2006 mit G-ODN

Nachdem eine optimale Stimuluskonzentration gefunden worden war, wurde die inhibitorische Wirkung von G-ODN auf ODN 2006 bei hTLR9-HEK Zellen geprüft. Dazu wurden die Zellen mit ODN 2006 und G-ODN kostimuliert und die NF κ B-Aktivität im Zelllysate mittels Luziferase-Assay gemessen beziehungsweise die Stimulationsüberstände hinsichtlich ihres Interleukin 8-Gehaltes mittels ELISA untersucht. Die Ergebnisse können Grafik 5-9 entnommen werden.

Die NF κ B-Aktivität durch eine Stimulation mit ODN 2006, wie sie bereits in 5.2.1 beschrieben wurde, bestätigte sich in diesen Versuchen erneut, wenn auch mit deutlich höheren Induktionswerten.

Anhand der Daten aus den Luziferase-Assays ist zu erkennen, dass die Zugabe von 1 μ M G-ODN zum Stimulationsansatz mit 0,3 μ M ODN 2006 eine deutliche Reduktion der NF κ B-Aktivität auf etwa 36 % des Ausgangswertes hervorruft. Eine Erhöhung der G-ODN-Konzentration auf 3 μ M reduzierte die NF κ B-Aktivität weiter auf etwa 26 % des Ausgangswertes (Grafik 5-9 A).

Zum Vergleich ist in Grafik 5-9 B die Interleukin 8-Produktion von hTLR9-HEK nach 24-stündiger Inkubation mit den entsprechenden Stimuli dargestellt. Medium ohne Stimuluszusatz, welches als Negativkontrolle diente, zeigte bereits eine leichte Induktion der Zytokinproduktion. Eine Stimulation der Zellen mit 0,3 μ M ODN 2006 induzierte eine Freisetzung von fast 1,2 ng/ml Interleukin 8, welche durch die Zugabe von 1 μ M beziehungsweise 3 μ M G-ODN erneut signifikant auf bis zu 16 % des Ausgangswertes reduziert werden konnte.

In beiden Assays konnte gezeigt werden, dass durch eine Kostimulation mit G-ODN, welches alleine eine leichte stimulatorische Aktivität aufwies, maximal 60 % der Kontrollstimulation erreicht wurden.

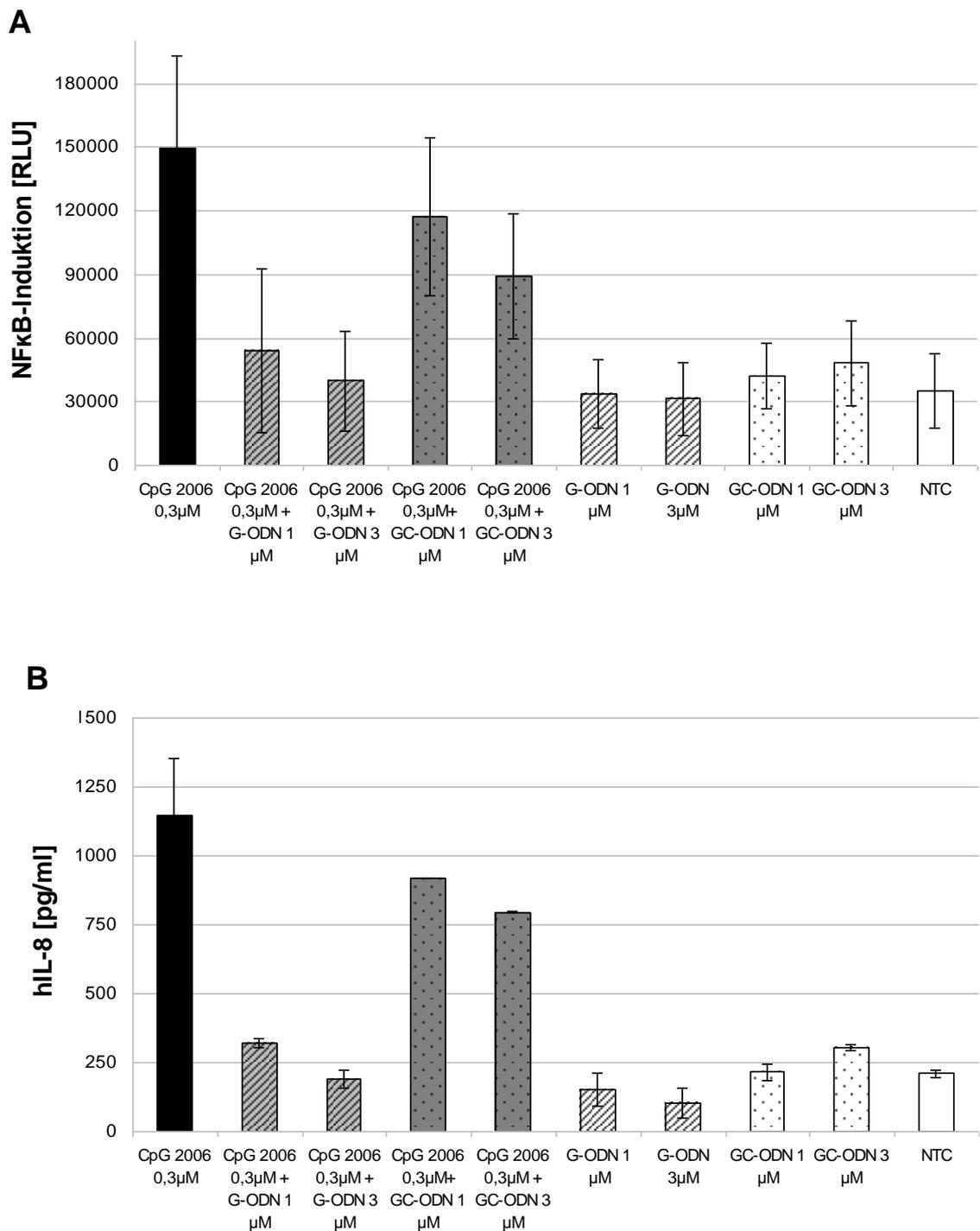


Abbildung 5-9: Suppression einer NFκB-Induktion bei HEK 293-hTLR9-luc durch das inhibitorische Oligodeoxynukleotid G-ODN.

(A) NFκB-Aktivität von HEK 293-hTLR9-luc nach 6 h Stimulation mit ODN 2006 0,3 µM allein sowie einer Kostimulation mit ODN (=CpG) 2006 0,3 µM und G-ODN bzw. GC-ODN 1 µM. (B) IL-8 Freisetzung von HEK 293-hTLR9-luc nach 24 h Stimulation mit ODN 2006 0,3 µM alleine und einer Kostimulation mit ODN (=CpG) 2006 0,3 µM und G-ODN bzw. GC-ODN 1 µM. Grafisch dargestellt sind die Mittelwerte und ihre Standardabweichungen aus zwei bzw. drei unabhängigen Experimenten.

Als Negativkontrolle zur transfizierten Zelllinie wurden untransfizierte HEK 293 Zellen sowie HEK 293 Zellen, die nur mit einem NFκB-Reporterplasmid transfiziert waren (HEK 293-luc), verwendet und mit den gleichen Stimuli behandelt. Die Ergebnisse sind in Grafik 5-10 dargestellt.

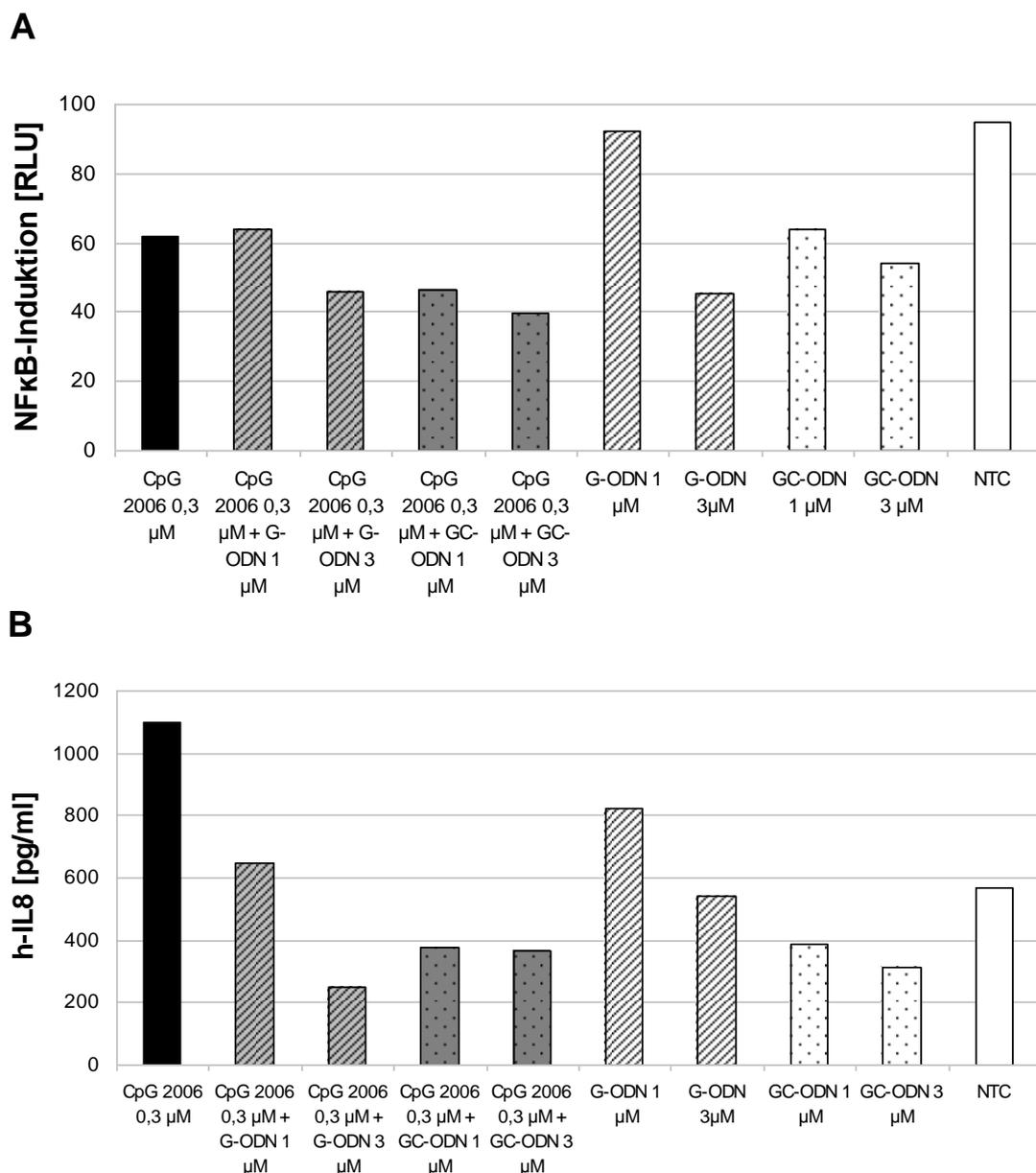


Abbildung 5-10: Stimulation und Suppression einer NFκB-Induktion bei HEK 293-luc und HEK 293 Zellen als Negativkontrolle. (A) NFκB-Aktivität von HEK 293-luc nach 6 h Stimulation mit ODN 2006 0,3 μM allein sowie einer Kostimulation mit ODN (=CpG) 2006 0,3 μM und G-ODN bzw. GC-ODN 1 μM. **(B)** IL-8 Freisetzung durch HEK 293 nach 24 h Stimulation mit ODN 2006 0,3 μM alleine sowie einer Kostimulation mit ODN (=CpG) 2006 0,3 μM und G-ODN bzw. GC-ODN 1 μM. Dargestellt ist jeweils einer von zwei unabhängigen Versuchen, die vergleichbare Ergebnisse lieferten.

In Grafik 5-10 A sind die Ergebnisse einer Stimulation und Suppression der NF κ B-Induktion bei HEK 293-luc dargestellt. Es ist sehr schön zu erkennen, dass alle Stimuli keine NF κ B-Induktion hervorrufen, da alle Werte unterhalb der Negativkontrolle liegen.

Ähnliches ließ sich auch für HEK 293 Zellen zeigen, die nach Stimulation hinsichtlich ihrer Interleukin 8-Produktion im Kulturüberstand untersucht wurden. Einzig die Daten der Einzelstimulationen mit 0,3 μ M ODN 2006 und 1 μ M G-ODN weisen Werte auf, die deutlich über der Negativkontrolle liegen.

5.2.3 Versuche mit humanen PBMCs

5.2.3.1 Vergleich der Effekte von ODN 2006 und G-ODN auf humane PBMCs

Um eingangs ein stimulatorisches Potential des inhibitorischen Oligodeoxynukleotids auf PBMCs auszuschließen, wurde wie bei den anderen Zellsystemen immer eine Kontrollstimulation der Zellen mit G-ODN alleine durchgeführt. In Grafik 5-11 ist vergleichend dargestellt, wie PBMCs auf eine Stimulation mit ODN 2006 oder G-ODN ansprachen. Wie zu erkennen ist, wies G-ODN alleine leichte stimulatorische Effekte auf. So bewirkte bereits eine Konzentration von 0,1 μ M G-ODN eine Sekretion von Interleukin-6, die etwa dem 3-fachen Wert der Negativkontrolle entsprach. Auffällig hierbei war, dass eine weitere Erhöhung der G-ODN-Konzentration bis auf 3 μ M nicht zu einer zusätzlichen Steigerung des Induktionspotentials führte, dieses also auch bei hohen Konzentrationen das oben beschriebene Niveau nicht überschritt. Somit war in den Experimenten eine konstante leichte stimulatorische Wirkung von G-ODN zu beobachten, die jedoch deutlich unter den durch eine Stimulation mit ODN 2006 erzielten Werten lag (etwa 23- bis 48-facher Wert der Negativkontrolle). Dieser geringe stimulatorische Effekt von G-ODN wurde im Folgenden bei der Berechnung der Ergebnisse berücksichtigt.

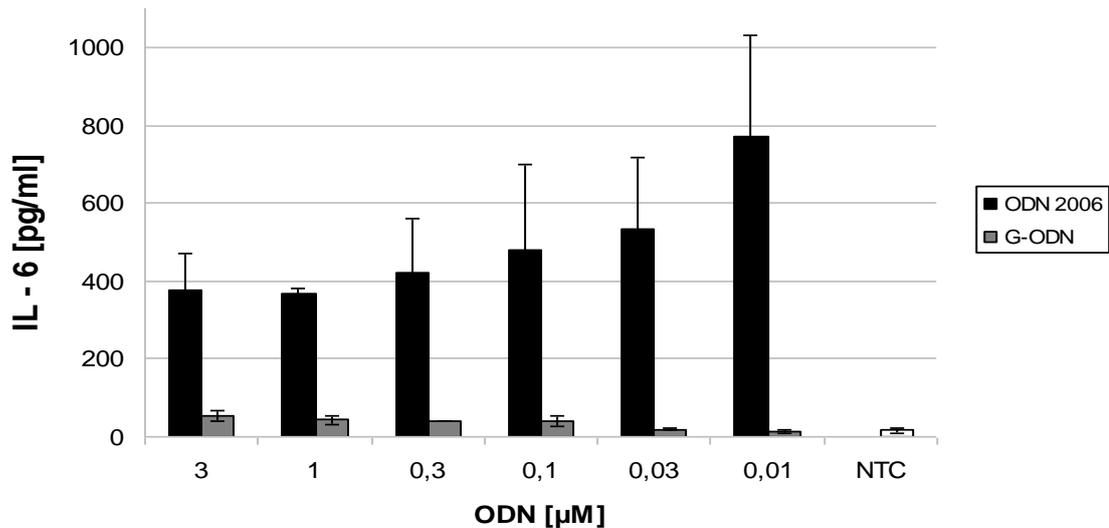


Abbildung 5-11: Vergleichende Darstellung einer Stimulation von PBMCs mit ODN 2006 oder G-ODN. NTC = Medium ohne Stimulus. Grafisch dargestellt sind die Mittelwerte und ihre Standardabweichungen aus zwei unabhängigen Experimenten.

5.2.3.2 Suppression der ODN 2006-induzierten Zytokinsekretion

Nachdem die Wirkung des TLR-9-Liganden ODN 2006 auf PBMCs untersucht worden war, sollten die inhibitorischen Effekte von G-ODN auf den Stimulus überprüft werden. Dazu wurden die Zellen mit einer Titrationsreihe ODN 2006 sowie 4 unterschiedlichen Konzentrationen an G-ODN kostimuliert und die Stimulationsüberstände hinsichtlich ihres Gehaltes an Interleukin-6 mittels ELISA untersucht. Die Ergebnisse können Grafik 5-12 entnommen werden.

Grafik 5-12 A zeigt die Ergebnisse der Inhibition einer ODN 2006 – Titrationsreihe mit 3 µM beziehungsweise 1 µM G-ODN im Vergleich zu einer Stimulation mit ODN 2006 alleine. Neben einer geringen Streubreite ist erkennbar, dass sowohl mit 3 µM als auch 1 µM G-ODN eine deutliche Suppression der ODN 2006-induzierten Aktivierung von PBMCs bei Stimuluskonzentrationen ≤ 1 µM ODN 2006 erzielt werden konnten, wobei eine Konzentration von 3 µM G-ODN die effektivsten Inhibitionen hervorrief. Als einzige Ausnahme fiel eine Stimuluskonzentration von 3 µM ODN 2006 ins Auge, die selbst durch 3 µM G-

ODN nicht inhibiert werden konnte. Hier bewirkte G-ODN sogar insofern einen gegenteiligen Effekt, als dass es durch die Kostimulation zu einer leichten Steigerung des Induktionspotentials kam.

Weiterhin war auffällig, dass die Suppression der Interleukin-6-Sekretion umso effektiver war, je niedriger der Stimulus konzentriert war. Während eine durch 1 μM ODN 2006 induzierte Interleukin-6-Sekretion auf etwa 80 % (1 μM G-ODN) beziehungsweise 25 % (3 μM G-ODN) des Ausgangswertes inhibiert wurden, konnte die Aktivität von 0,01 μM ODN 2006 auf etwa 11 % (1 μM G-ODN) beziehungsweise 7 % (3 μM G-ODN) supprimiert werden.

In Grafik 5-12 B sind die Ergebnisse der Inhibition einer ODN 2006 – Titrationsreihe mit 0,3 beziehungsweise 0,1 μM G-ODN im Vergleich zu einer Stimulation mit ODN 2006 alleine dargestellt. Es fällt auf, dass - abgesehen von wenigen Ausnahmen - die Zytokinwerte der Kostimulationen im Allgemeinen höher lagen als die Werte der ODN 2006-Einzelstimulationen, diese somit anstelle einer Inhibition sogar eine Steigerung der Zytokinproduktion zu bewirken schienen.

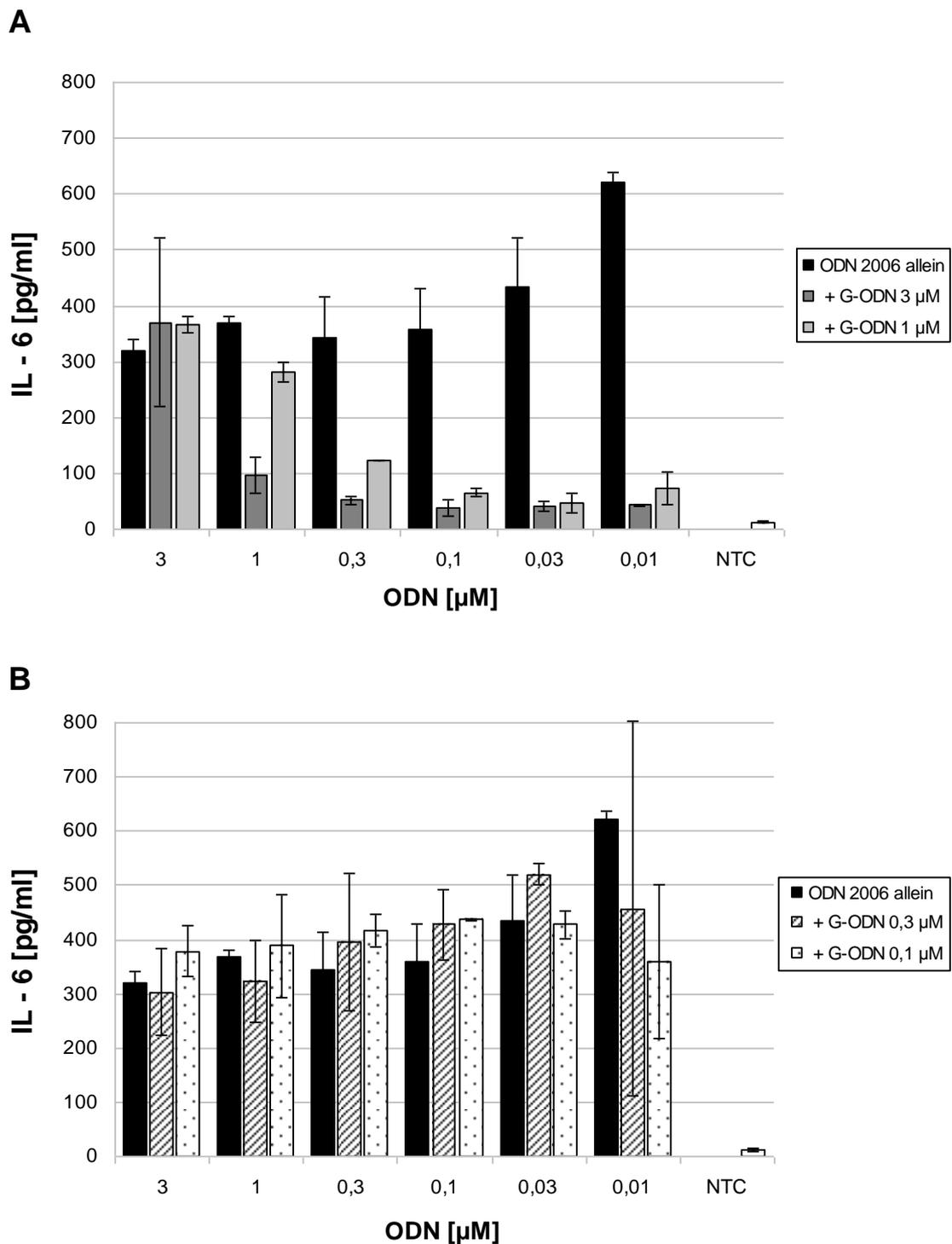


Abbildung 5-12: Suppression einer mit ODN 2006-induzierten Sekretion von IL-6 bei PBMCs. PBMCs (1×10^6 Zellen/well) wurden 22h mit ODN 2006 alleine oder zusätzlich mit G-ODN in verschiedenen Konzentrationen (ko-) stimuliert. Anschließend erfolgte die Bestimmung von IL-6 im Kulturüberstand mittels ELISA. **(A)** Inhibition mit $3 \mu\text{M}$ bzw. $1 \mu\text{M}$ G-ODN. **(B)** Inhibition mit $0,3 \mu\text{M}$ bzw. $0,1 \mu\text{M}$ G-ODN. NTC = Medium ohne Stimulus. Grafisch dargestellt sind die Mittelwerte und ihre Standardabweichungen aus zwei unabhängigen Experimenten abzüglich des geringen stimulatorischen Effekts von G-ODN.

5.2.3.3 Suppression der *E. coli*-DNA-induzierten Zytokinsekretion

In weiteren Versuchen sollte vergleichend die Supprimierbarkeit einer durch *E. coli*-DNA induzierten Zytokinsekretion mit G-ODN analysiert werden. Dazu wurden auch hier die Zellen mit einer Titrationsreihe bDNA von *E. coli* K12 sowie unterschiedlichen Konzentrationen an G-ODN kostimuliert und anschließend der Gehalt an Interleukin-6 in den Stimulationsüberständen mittels ELISA gemessen.

Da sich eine Konzentration von 3 μM G-ODN als sehr effektiv zur Inhibition einer ODN 2006-induzierten Zytokinsekretion herausgestellt hatte, sollte die inhibitorische Wirkung dieser Konzentration auf die *E. coli*-Titrationsreihe untersucht werden. Die Ergebnisse eines Versuches sind exemplarisch in Grafik 5-13 dargestellt. Die durch eine Stimuluskonzentration von 200 $\mu\text{g/ml}$ induzierte Produktion von Interleukin-6 wurde durch 3 μM G-ODN deutlich auf etwa ein Drittel supprimiert. Dieser Effekt konnte jedoch für die niedrigeren Stimuluskonzentrationen ≤ 100 $\mu\text{g/ml}$ nicht beobachtet werden: Hier führte die Kostimulation mit dem inhibitorischen Oligodeoxynukleotid sogar zu einer teilweise deutlich gesteigerten Zytokinsekretion.

Um diesen Effekt zu umgehen und eine effektive Suppression aller Stimuluskonzentrationen zu erzielen wurde in den folgenden Experimenten die Konzentration von G-ODN verdoppelt. Wie in Grafik 5-13 B zu erkennen ist, konnte mit einer erhöhten Konzentration von 6 μM G-ODN eine signifikante Inhibition der durch *E. coli*-DNA induzierten Aktivierung der PBMCs erreicht werden. Die durch eine Stimuluskonzentration von 200 $\mu\text{g/ml}$ induzierte Produktion von Interleukin-6 wurde durch 6 μM G-ODN weiter auf etwa ein Viertel des Ausgangswertes supprimiert. Der inhibitorische Effekt auf die niedrigeren Stimuluskonzentrationen war deutlich signifikanter: Hier wurden die Zytokinkonzentrationen auf 10 % oder weniger des Ausgangswertes gedrosselt und fielen teilweise sogar unter den Wert der Negativkontrolle. Dieses Ergebnis wurde in zwei unabhängigen Versuchen bestätigt.

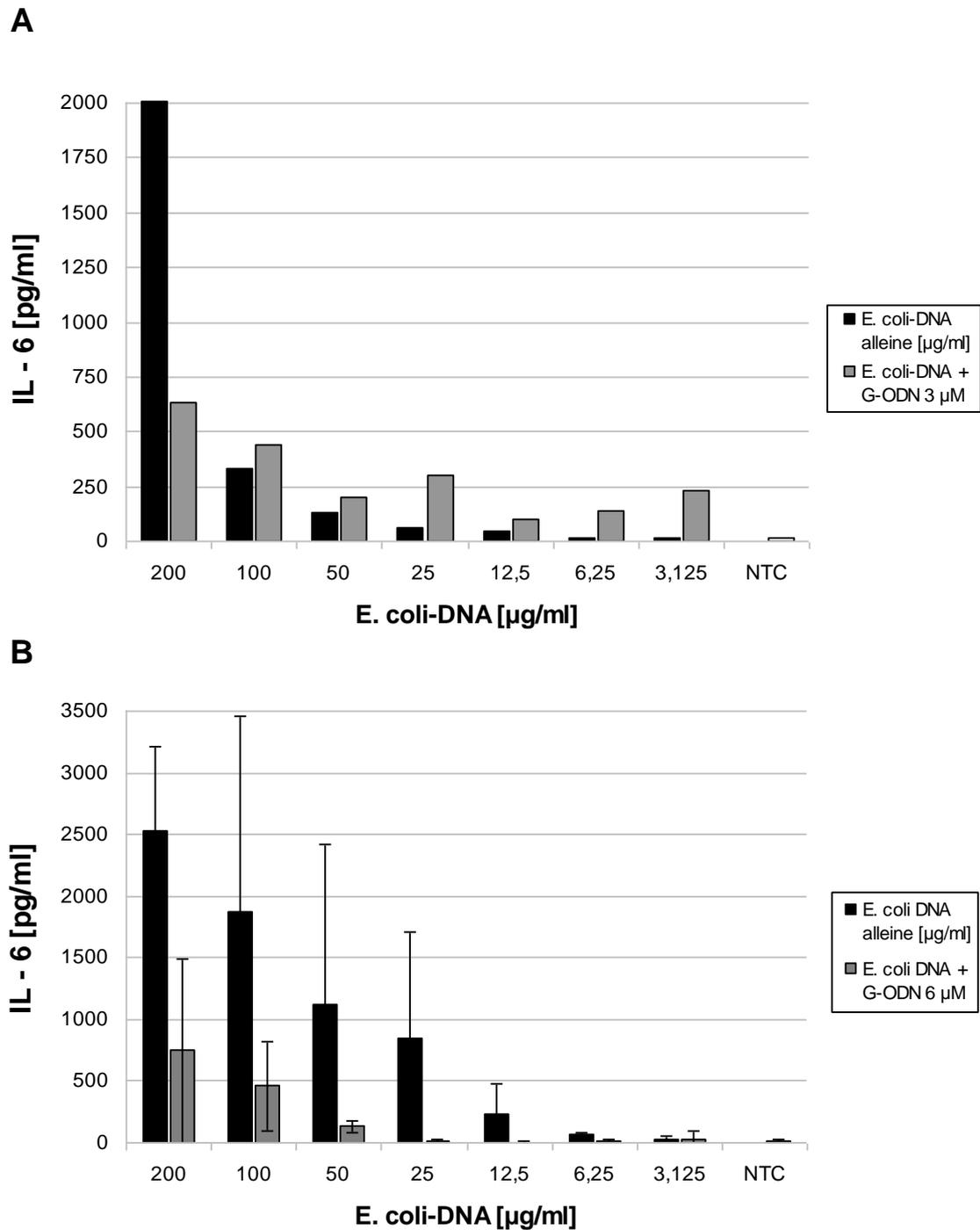


Abbildung 5-13: Suppression einer durch *E. coli*-DNA induzierten Sekretion von IL-6 bei PBMCs mit 3 µM und 6 µM G-ODN im Vergleich. PBMCs (1×10^6 Zellen/well) wurden 22 h mit *E. coli*-DNA alleine oder zusätzlich mit (A) 3 µM G-ODN oder (B) 6 µM G-ODN (ko-) stimuliert und die IL-6-Konzentration im Kulturüberstand mittels ELISA gemessen. In (A) sind exemplarisch die Ergebnisse eines Experiments gezeigt, in (B) sind grafisch die Mittelwerte und ihre Standardabweichungen aus zwei unabhängigen Experimenten dargestellt, wobei jeweils die Werte der Kostimulationen abzüglich des geringen stimulatorischen Effekts von G-ODN abgebildet sind.

5.2.4 Inhibitionsergebnisse der verschiedenen Referenzzelllinien

Die NF κ B-Induktionen, welche durch eine Stimulation von mTLR9-HEK 293 mit ihrem spezifischen Liganden ODN 1668 erzielt wurden, ließen sich mit inhibitorischem G-ODN deutlich supprimieren, ebenso die etwas schwächeren ODN 2006-induzierten NF κ B-Werte. Durch eine Kostimulation mit der Kontrollsubstanz GC-ODN konnte gezeigt werden, dass die inhibitorischen Effekte von G-ODN keine Artefakte waren.

Ebenso konnten die durch ODN 2006-induzierte NF κ B-Aktivität und Interleukin-8-Sekretion durch eine Ko-Stimulation mit G-ODN deutlich inhibiert werden. Die Kontrollsubstanz GC-ODN schien bei diesen Versuchen leichte inhibitorische Effekte aufzuweisen. Durch Kontrollversuche mit HEK 293-luc und HEK 293, die keine Reaktion auf die verschiedenen Stimuli aufwiesen, konnte belegt werden, dass TLR9 als CpG-DNA-Rezeptor essentiell ist für eine NF κ B-Induktion und somit Interleukin 8-Produktion.

In den Experimenten mit PBMCs wies G-ODN ein stimulatorisches Potential auf, das jedoch, gemessen an den Stimulationen durch ODN 2006 und *E. coli*-DNA, vernachlässigbar gering war. Während 3 μ M und 1 μ M G-ODN zu einer signifikanten Suppression der Zytokinproduktion führten, schienen niedrigere Konzentrationen des inhibitorischen Oligodeoxynukleotids anstelle einer Suppression eine Steigerung der Zytokinsekretion hervorzurufen. Für eine Inhibition der durch *E. coli*-DNA-induzierten Interleukinproduktion erwies sich eine Konzentration von 3 μ M G-ODN initial als nicht ausreichend. Durch die Verdopplung der G-ODN-Konzentration auf 6 μ M konnte dann eine deutliche Suppression der Zytokinsekretion erreicht werden.

5.2.5 Versuche mit humanen Gingiva-Fibroblasten (HGFs)

5.2.5.1 Suppression der ODN 2006-induzierten Zytokinsekretion

Die Stimulation humaner Gingiva-Fibroblasten mit dem TLR-9-Liganden ODN 2006 ergab eine deutliche stimulatorische Wirkung auf die Zellen (siehe 5.1.5.1). In weiterführenden Versuchen sollten in diesem Zellsystem die inhibitorischen Effekte von G-ODN auf den Stimulus überprüft werden. Hierzu wurden HGFs mit unterschiedlichen Konzentrationen ODN 2006 und einer festen Konzentration G-ODN kostimuliert und im Anschluss die sezernierte Zytokinmenge mittels ELISA gemessen und quantifiziert. Die Ergebnisse sind der nachfolgenden Grafik zu entnehmen.

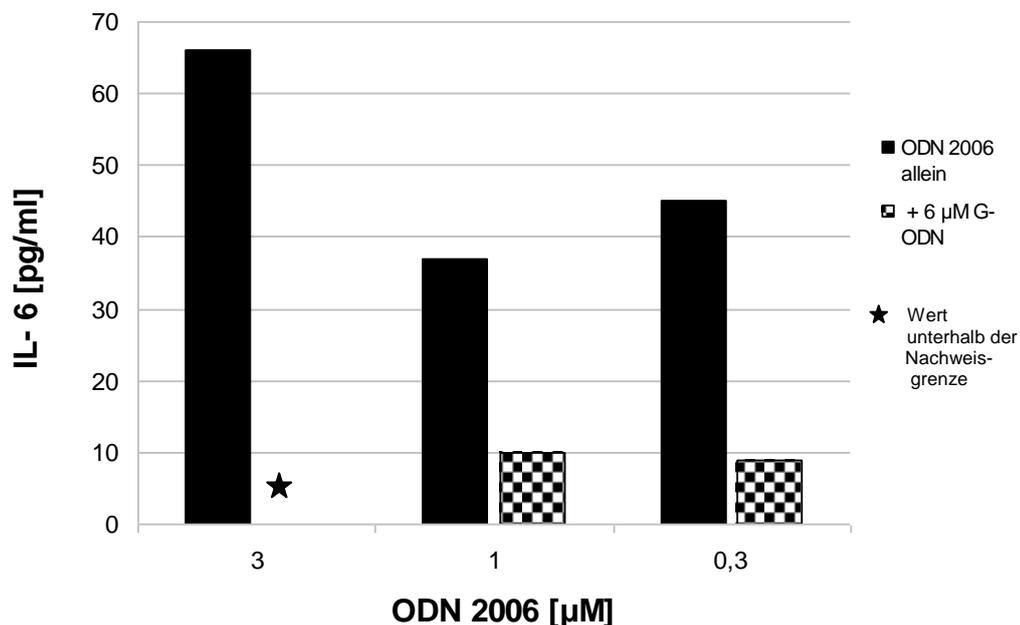


Abbildung 5-14: Suppression einer durch ODN 2006 induzierten IL-6- Sekretion bei HGF-1 mit 6 µM G-ODN. HGFs ($4,5 \times 10^4$ Zellen/well) wurden 24h mit ODN 2006 alleine oder zusätzlich mit 6 µM G-ODN (ko-)stimuliert und die IL-6-Konzentration im Kulturüberstand mittels ELISA gemessen. Alle Werte sind abzüglich der Negativkontrolle aufgeführt.

Eine dosisabhängige Interleukin 6-Induktion, wie in 5.1.5.1 beschrieben, bestätigte sich in diesem Versuch, wenngleich die erzielten Werte in einem deutlich niedrigeren Bereich lagen und größere Schwankungen aufwiesen.

Weiterhin zeigte sich, dass mit 6 μM G-ODN der stimulatorische Effekt des ODN 2006 auf HGFs deutlich reduziert werden konnte. Auffällig ist hierbei die Beobachtung, dass die Inhibition des höchstkonzentrierten Stimulus sich derart gestaltete, dass der Gehalt an Interleukin 6 sogar unter die Nachweisgrenze fiel. Bei den niedriger konzentrierten Stimuli konnte eine Suppression der IL-6-Sekretion auf ca. 20 % bzw. 25 % des Ausgangswertes erzielt werden.

5.2.5.2 Suppression der *E.coli*-DNA-induzierten Zytokinsekretion

In abschließenden Experimenten wurde die inhibitorische Wirkung des Oligodeoxynukleotids G-ODN auf eine durch bDNA von *E. coli* K12 induzierte Zytokinsekretion in humanen Gingiva-Fibroblasten untersucht.

Dazu wurden die Zellen mit einer Titrationsreihe bDNA und einer festen Konzentration G-ODN kostimuliert und die Stimulationsüberstände mittels ELISA hinsichtlich ihres Gehalts an Interleukin-6 untersucht. Die Ergebnisse sind in Grafik 5-15 dargestellt.

Es ließ sich eine durch bDNA induzierte Zytokinproduktion in humanen Gingiva-Fibroblasten reproduzieren und bestätigte somit das dosisabhängige Ansprechen der Zellen auf den Stimulus.

Darüber hinaus zeigte sich, dass G-ODN den stimulatorischen Effekt bDNA auf HGFs deutlich supprimieren oder sogar völlig inhibieren konnte. Während durch den Einsatz von G-ODN der höchstkonzentrierte Stimulus (200 $\mu\text{g}/\text{ml}$) auf etwa die Hälfte seines ursprünglichen Induktionspotentials gedrosselt wurde, konnten das stimulatorische Potential der niedriger konzentrierten bDNA derart inhibiert

werden, dass die Menge an produziertem Zytokin unter die Nachweisgrenze fiel und somit nicht mehr detektierbar war.

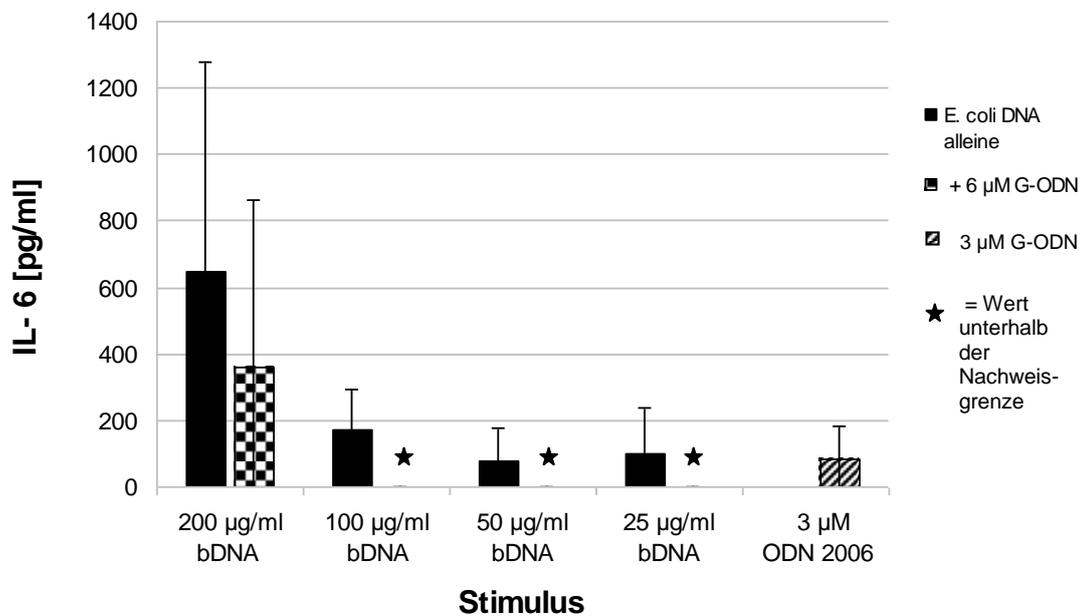


Abbildung 5-15: Suppression einer durch *E. coli*-DNA-induzierten IL-6-Sekretion bei HGF-1 mit 6 µM G-ODN. HGFs ($4,5 \times 10^4$ Zellen/well) wurden 24 h mit *E. coli*-DNA alleine oder zusätzlich mit 6 µM G-ODN (ko-)stimuliert und die IL-6-Konzentration im Kulturüberstand mittels ELISA gemessen. Die Werte der Einzelstimulationen sind abzüglich der Negativkontrolle, die Werte der Kostimulationen abzüglich des geringen stimulatorischen Effekts von G-ODN aufgeführt. Vergleichend ist als Positivkontrolle die IL-6-Induktion durch 3 µM ODN 2006 gezeigt.

5.3 Detektion humaner plasmocytoider DCs durch den Nachweis der Oberflächenexpression von CD123 und CD303 mittels FACS

In den beschriebenen Stimulations- und Suppressionsversuchen wurden frisch isolierte humane PBMCs in ihrer Gesamtheit eingesetzt ohne weitere Isolierung spezifischer Zellsubpopulationen. In einer Studie über die quantitative Expression von TLRs konnte nachgewiesen werden, dass sowohl humane B-Zellen als auch humane pDCs TLR9 exprimieren, letztere jedoch in einem deutlich höheren Maße (Hornung et al., 2002). Dies gibt Anlass zur Vermutung, dass ein Großteil der gezeigten Stimulationsergebnisse auf eine Aktivierung von pDCs zurückzuführen ist, wobei sicherlich auch B-Lymphozyten zur Zytokinproduktion beitragen. Um speziell diese für die erzielten Induktionen nicht unerhebliche Subpopulation (pDCs) in der Gesamtpopulation der PBMCs zu detektieren, wurde eine Analyse mittels FACS durchgeführt und der prozentuale Anteil der pDCs an der Gesamtheit aller mononukleärer Zellen ermittelt.

Dazu wurde zunächst in einer *Dot-Plot*-Graphik, bei der *forward scatter* und *sideward scatter* einander gegenübergestellt und folglich die Parameter Zellgröße und Granularität in Relation zueinander gesetzt werden, Zellrümpfer von lebenden Zellpopulationen abgegrenzt. Um die entsprechende Zellpopulation wurde ein *gate* gelegt und hiervon ausgehend weitere Parameter untersucht. Es konnten damit die PE-Fluoreszenz-Emission des CD123-Antikörpers sowie die APC-Fluoreszenz-Emission des CD303-Antikörpers registriert werden. So konnte die gesuchte Zellsubpopulation der pDCs sukzessive als doppelt positiv markierte Zellen in Abhängigkeit ihrer Fluoreszenzeigenschaften (FL2- und FL3-positiv) eingegrenzt und näher charakterisiert werden.

In Abbildung 5-1 ist die durchflusszytometrische Analyse der Oberflächenmoleküle CD123 und CD303 (BDCA-2) dargestellt und den entsprechenden Isotypkontrollen gegenübergestellt. Zur näheren Eingrenzung der gesuchten Zellpopulation wurden CD3-positive Zellen ausgegrenzt. Im rechten oberen Quadranten des jeweils

letzten *Dot-Plots* in Abbildung 5-1 A und B sind die pDCs als doppelt positive Zellen (CD123+ und CD303+) zu finden.

Hiernach beträgt der prozentuale Anteil der pDCs an der Gesamtmenge aller mononukleärer Zellen 0,4% und liegt somit deutlich im erwarteten Wertebereich von <1% (Iwasaki & Medzhitov, 2004). Im entsprechenden Quadranten der mitgeführten Isotypkontrolle liegt der Anteil doppelt positiver Zellen bei 0,0%. Somit kann davon ausgegangen werden, dass unspezifische Antikörperbindungen ausgeschlossen sind.

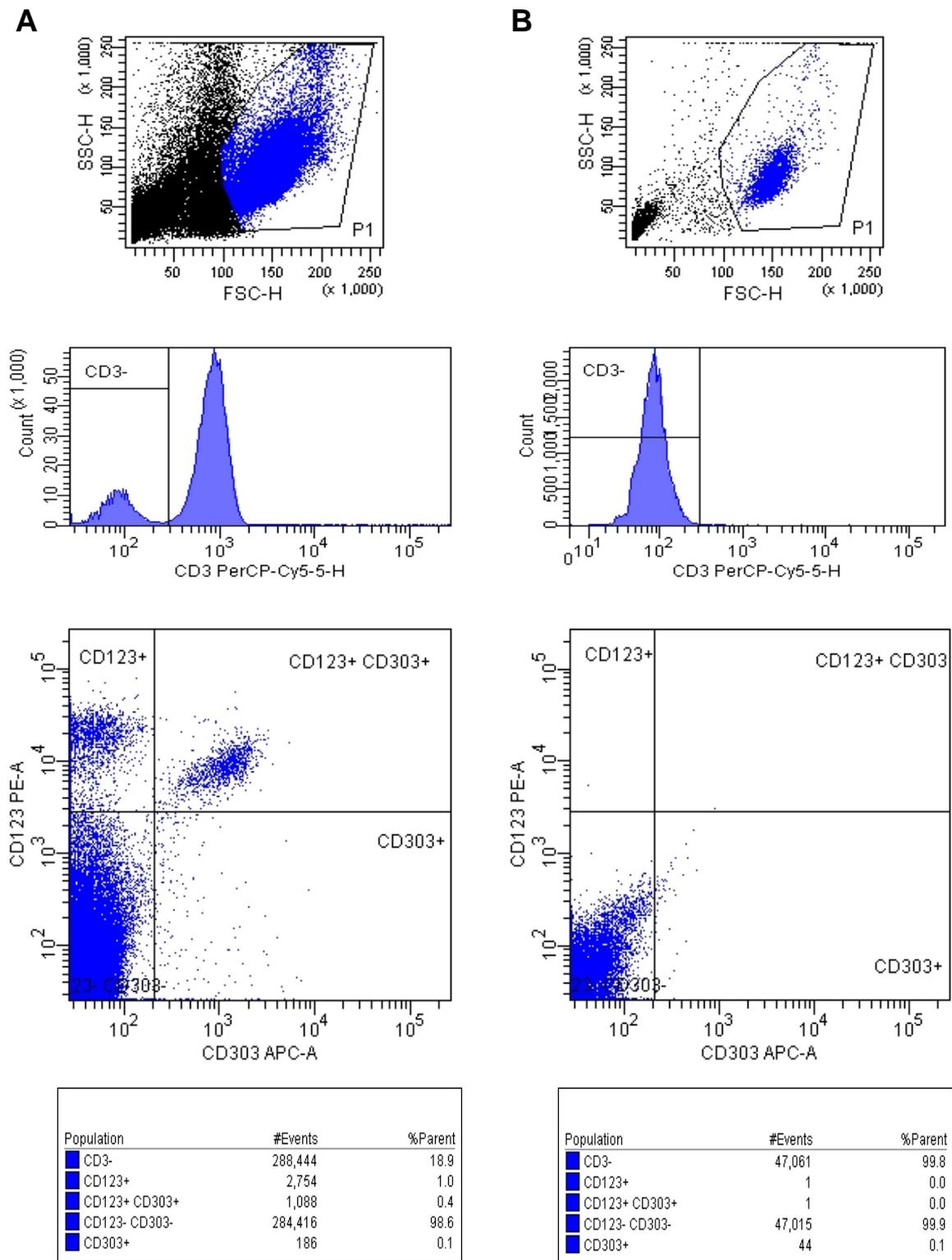


Abbildung 5-16: Durchflusszytometrische Analyse der Oberflächenexpression von CD123 und CD303 zur Detektion von pDCs. (A) Färbung von frisch isolierten humanen PBMCs mit Anti-CD3, Anti-CD123 und Anti-CD303 (Anti-BDCA-2) und durchflusszytometrische Messung der Fluoreszenz. **(B)** Entsprechende Isotypkontrollen. Dargestellt ist eine von zwei unabhängig durchgeführten Untersuchungen, die vergleichbare Ergebnisse lieferten.

5.4 Detektion einer intrazellulären TLR9-Expression in humanen Gingivafibroblasten

Bisherigen Erkenntnissen zufolge ist die Expression von TLR9 in humanen Gingivafibroblasten gesichert (Nonnenmacher et al., 2003). Darüber hinaus konnten Beklen und Kollegen (2008) nachweisen, dass in entzündlich veränderten parodontalen Läsionen TLR9 in erhöhtem Maße exprimiert wird. In dieser Arbeit sollte mittels immunhistochemischer Färbung die genaue zelluläre Lokalisation des Rezeptors in humanen Gingivafibroblasten untersucht werden.

In Abbildung 5-2 ist im Vergleich zur Isotypkontrolle eine deutliche Färbung zu erkennen, die auf eine spezifische Expression von TLR9 deuten lässt. Der verwendete primäre monoklonale Antikörper 21E2 war auf seine Fähigkeit zur Detektion von ausschließlich intrazellulär lokalisiertem humanen TLR9 mittels eines eigens etablierten ELISA-Testsystems überprüft worden (Doktorarbeit Mark A. Rutz, 2004), weshalb von einer intrazellulären Expression von TLR9 in den hier verwendeten Gingivafibroblasten ausgegangen werden kann. Da die Zellen in diesen Versuchen vor den immunhistochemischen Färbungen nicht stimuliert wurden, kann davon ausgegangen werden, dass es sich bei der abgebildeten exprimierenden Struktur um Endoplasmatisches Retikulum handelt, wo TLR9 in ruhenden Zellen lokalisiert ist (Latz et al., 2004). Zur Bestimmung der genauen Lokalisation sind weitere Untersuchungen nötig.

Um unspezifische Antikörperbindungen auszuschließen, wurden Isotypkontrollen mitgeführt.

Durch den Einsatz des Antikörpers 5G5, der sowohl humanen als auch murinen TLR9 erkennt, konnten keine weiteren Erkenntnisse gewonnen werden (Ergebnisse nicht gezeigt).

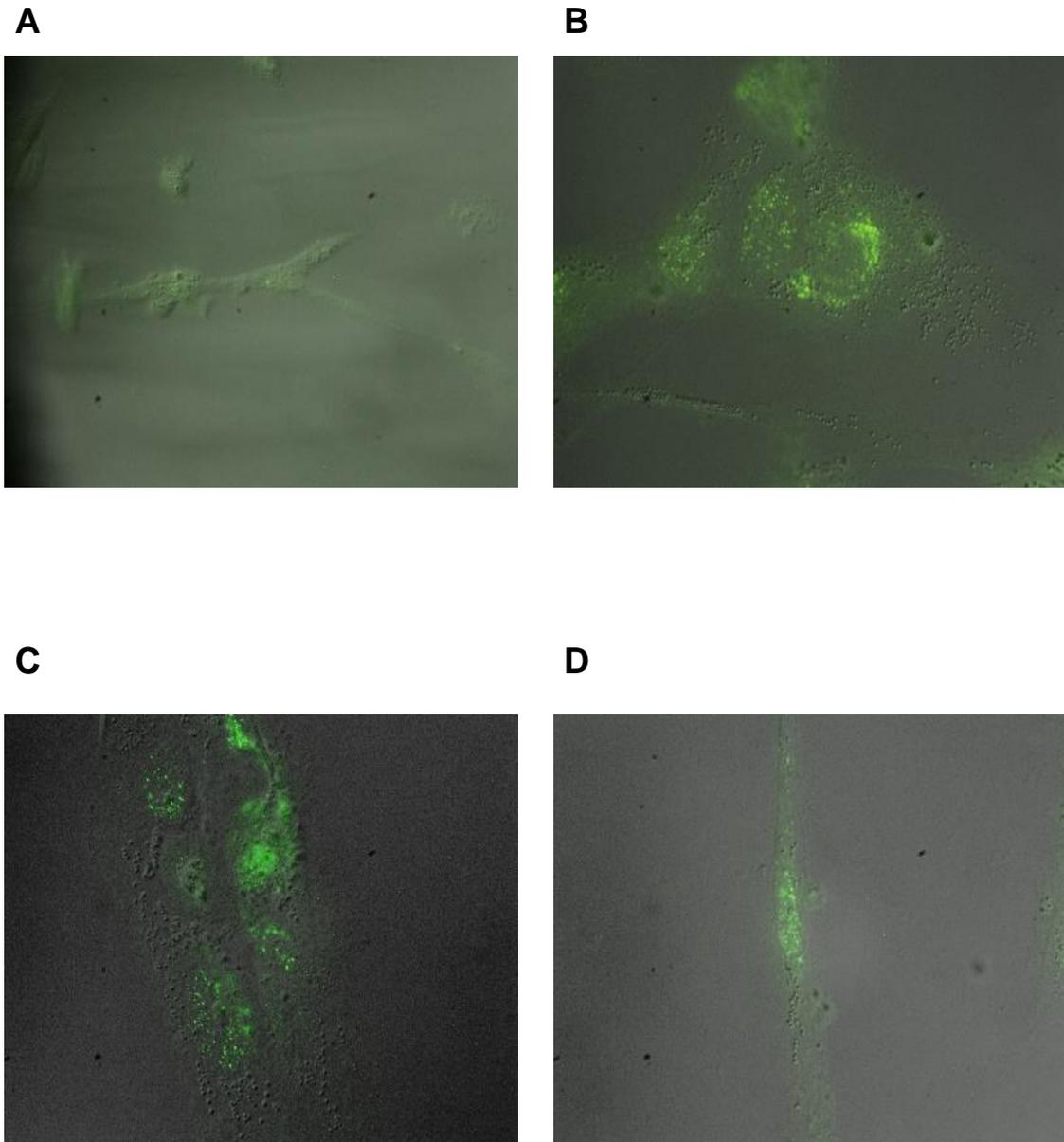


Abbildung 5-17: Intrazelluläre Expression von TLR9 in humanen Gingivafibroblasten.

(B-D) HGFs wurden mit dem monoklonalen Antikörper 21E2 ($c = 1\mu\text{g/ml}$) behandelt, der wiederum mit einem sekundären Alexa Fluor 488 konjugierten Antikörper (grüne Fluoreszenz) detektiert wurde. (A) Entsprechende Isotypkontrolle mit α -Mouse IgG2a ($c = 1\mu\text{g/ml}$). Abgebildet sind die Ergebnisse eines von zwei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten, die vergleichbare Resultate lieferten.

6 Diskussion

Mikrobielle Infektionen führen durch unterschiedliche Mechanismen zu einer Aktivierung des humanen Immunsystems, die sich klinisch als akute Entzündungsreaktion äußert und auf eine Eliminierung des Pathogens zielt. Im Rahmen der Parodontitis kann das entzündliche Geschehen sogar so weit fortschreiten, dass bei ausbleibender Therapie der Verlust von Zähnen die Folge ist. Trotz dieser Erkenntnis sind die Zusammenhänge der zugrunde liegenden genetischen, mikrobiellen und immunologischen Ursachen der Parodontitis noch nicht in Gänze verstanden.

In verschiedenen *in vitro* Studien konnte bisher unter anderem ein deutliches stimulatorisches Potential von bDNA - ein spezifischer TLR9-Ligand - auf humane Gingivafibroblasten beobachtet werden, was anhand der induzierten Interleukin-6-Menge gemessen wurde (Takeshita et al., 1999). Darüber hinaus wurde die Expression von TLR9 in HGFs nachgewiesen und folglich die Bedeutung des Rezeptors in der Pathogenese der Parodontitis postuliert (Nonnenmacher et al., 2003). Die bakterielle Nukleinsäure dient somit als PAMP und wird als immer wiederkehrendes konserviertes Molekülmuster von Rezeptoren des angeborenen Immunsystems erkannt, was die Aktivierung einer immunologischen Signalkaskade zur Folge hat. Dies stellt jedoch nur einen Bruchteil der gesamtursächlichen Prozesse dar, zumal die tatsächliche Situation, wie sie am infizierten Parodont vorherrscht, sehr komplex ist und in Studien nur fragmentarisch nachgestellt werden kann. Die jeweiligen gewebsschädlichen Moleküle parodontopathogener Bakterien entfalten ihre Wirkung auf ganz unterschiedliche Art, und auch bei der Erkennung und Eliminierung der Pathogene sind mit Sicherheit mehrere Zellarten involviert. Gerade im Hinblick auf die polymikrobielle Genese der Parodontitis (Aas et al., 2005) ist eine Kombination verschiedenster miteinander verknüpfter immunologischer Effektormechanismen nicht unwahrscheinlich. Dennoch sind Untersuchungen an einzelnen Toll-like Rezeptoren und ihren Liganden/PAMPs sinnvoll, um zum Verständnis der ätiologischen Gesamtzusammenhänge beitragen zu können.

Ziel der vorliegenden Arbeit war daher, anhand eines oralen mikrobiellen Infektionsmodells *in vitro* einen Beitrag zum Verständnis der Genese des Krankheitsbildes der Parodontitis im Allgemeinen sowie den ihr zugrunde liegenden immunologischen Prozessen und einer durch diese bedingten Imbalance in der Expression inflammatorischer Mediatoren im Speziellen zu liefern. Dazu sollten HGFs, die eine erste Barriere zur oralen Mikroflora bilden und als primäre Zellen mit parodontopathogenen Bakterien in Kontakt kommen, mit TLR9-Liganden wie bDNA *in vitro* stimuliert werden. Die dadurch aktivierten immunologischen Signalkaskaden, die zu überschießenden Entzündungsreaktionen am Parodont führen können, sollten erfasst und quantifiziert werden. Durch den Einsatz inhibitorischer Oligodeoxynukleotide sollte der stimulatorische Effekt bDNA auf TLR9 blockiert werden, was wiederum einen Ansatz in der Therapie CpG-induzierter Parodontitis darstellen könnte. In diesem Zusammenhang hatte unsere Arbeitsgruppe die Hypothese aufgestellt, dass die ständige Exposition der Zellen gegenüber parodontopathogenen Bakterien zu einer Translokation von TLR9 vom intrazellulären Kompartiment an die Zelloberfläche führen kann, wie es in intestinalen Epithelzellen beobachtet worden war (Ewaschuk et al., 2007). Um dieser Hypothese nachzugehen, sollte mit Hilfe immunhistochemischer Methoden die zelluläre Lokalisation des TLR9 in primären HGFs ermittelt werden.

Um die Ergebnisse vor dem Hintergrund etablierter Kenntnisse über immunologische Signaltransduktionen interpretieren zu können, sollten zudem die Stimulation und Inhibition auch an TLR9-transfizierten HEK 293 Zellen sowie PBMCs als primär isolierten Zellen vorgenommen werden.

6.1 Auswahl eines optimalen synthetischen Oligodeoxynukleotids als Referenzstimulus

Synthetische, CpG-Dinukleotide enthaltende ODNs besitzen die Fähigkeit, direkt mit der Ektodomäne von TLR9 zu interagieren und über eine Veränderung der Konformation zu einer allosterischen Aktivierung nachgeschalteter Signalkaskaden zu führen (Latz et al., 2007). Die bisher beschriebenen Klassen immunstimulatorischer CpG-ODNs (A – C und P) weisen unterschiedliche strukturelle und funktionale Eigenschaften auf (Meng et al., 2011). Bei der Auswahl eines optimalen CpG-ODNs, das als Kontrollstimulus für eine TLR9-Aktivierung in den Versuchen zu dieser Arbeit dienen sollte, waren bestimmte Faktoren von entscheidender Bedeutung.

Die primäre Anforderung war, dass das CpG-ODN seine immunstimulatorischen Effekte nur über TLR9 entfalten sollte, zumal in der Literatur Oligodeoxynukleotide beschrieben werden, die auch TLR9-unabhängig Signalkaskaden auslösen können (Yasuda et al., 2005). Letzteres trifft beispielsweise auf Klasse-A ODNs zu, von denen ODN 2216 ein typischer Vertreter im humanen System ist (Kerkmann et al., 2003). Klasse-A ODNs, charakterisiert als multimerisch aggregierte Strukturen mit einem poly-G-Motiv am 3'-Ende, binden im frühen Endosom an TLR9 (Gilliet et al., 2008) und induzieren durch die Aktivierung des MyD88-TRAF6-IRF7-Komplexes in pDCs vorrangig hohe Mengen an Typ-I-Interferonen wie IFN- α und IFN- β , die in erster Linie im Rahmen viraler Infektionen eine Rolle spielen (Krug et al., 2001; Kawai et al., 2004). ODN 2006 hingegen, ein klassischer Vertreter der monomerischen Klasse-B ODNs im humanen System, transloziert in das stärker azidifizierte späte Endosom und führt über eine Aktivierung von NF κ B (Gilliet et al., 2008) vor allem zu einer dosisabhängigen Induktion proinflammatorischer Zytokine wie IL-6 und TNF- α sowie der Expression kostimulatorischer Moleküle (Gürsel et al., 2002; Ågren et al., 2006), wie sie bei der Pathogenese der Parodontitis relevant sind.

Darüber hinaus sollte das gesuchte Oligodeoxynukleotid resistent gegenüber im Serum enthaltenen Nukleasen sein, um eine möglichst effektive TLR9-Aktivierung zu erzielen. Dazu werden ODNs mit Phosphodiestern (PD) oder Phosphorothioate (PTO) modifiziert, wobei für letztere ein deutliches NF κ B-Induktionspotential ohne Effekt auf die IFN- α -Produktion beobachtet wurde (Meng et al., 2011). In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass zudem die immunstimulatorische Aktivität PTO-modifizierter ODNs gänzlich TLR9-anhängig ist, wohingegen PD-modifizierte Nukleinsäuren auch TLR9-unabhängig Signalkaskaden aktivieren können (Yasuda et al., 2005).

Somit wurden aufgrund der hier aufgeführten Argumente synthetische ODNs der Klasse B mit PTO-Modifizierung als Kontrollstimulus für die Experimente zu dieser Arbeit ausgewählt.

6.2 Auswahl einer optimalen bakteriellen ssDNA als TLR9-Ligand

Um die immunologischen Effekte parodontopathogener Bakterien auf gingivale Zellen *in vitro* nachzuvollziehen, sollten die hier verwendeten Zellen exemplarisch mit bDNA von *P. gingivalis* und *A. actinomycetemcomitans*, häufig aus parodontalen entzündlichen Läsionen isolierte Bakterien (Nonnenmacher et al., 2001; Bakaletz, 2004), stimuliert werden. Die DNA-Aufreinigung der eigens angezüchteten anaeroben und mikroaerophilen Keime erfolgte nach herkömmlichen Protokollen mittels Phenol-Chloroform-Extraktion wie in Kapitel 1.1.5 beschrieben.

Bei der Auswertung der Versuche war auffällig, dass das erzielte Induktionsprofil, welches den erwarteten Wertebereich für IL-6 deutlich überschritt, sehr stark einer Stimulation mit LPS ähnelte und durch G-ODN nicht zu inhibieren war (Ergebnisse nicht gezeigt). Folglich vermuteten wir eine Kontamination der bDNA mit LPS oder β -Glukan, die sich in einem LAL-Assay, das freundlicherweise von PD Dr. Stief aus der Abteilung für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin der Philipps-

Universität Marburg durchgeführt wurde, bestätigte. Folglich konnte die bDNA von *P. gingivalis* und *A. actinomycetemcomitans* nicht weiter für unsere Experimente eingesetzt werden, zumal bei Verwendung einer bekanntlich kontaminierten bDNA keine exakten Rückschlüsse auf die zugrunde liegenden Rezeptor-Ligand-Interaktionen möglich und somit fehlerfreie und verlässliche Ergebnisinterpretationen ausgeschlossen sind. Letzteres ist nur möglich, wenn sowohl saubere Zellkulturen als auch Stimulussubstanzen für Experimente verwendet werden. Eine DNA-Dekontamination, die sich laut Dr. Stief generell als mühsam und vor allem für β -Glukan als schwierig gestaltet, konnte und sollte nicht das Ziel der vorliegenden Arbeit sein, sondern soll in künftigen Studien durchgeführt werden.

Demzufolge musste alternativ eine bakterielle ssDNA gefunden werden, die nicht nur endotoxinfrei ist, sondern als spezifischer TLR9-Ligand keine weiteren Toll-like Rezeptor-Aktivitäten wie beispielsweise über TLR2 oder TLR4 aufweist. Aus diesem Grunde wurde in den Versuchen zu dieser Arbeit endotoxinfreie ssDNA von *E. coli K12* (Firma Invivogen) verwendet, die die oben genannten Voraussetzungen erfüllt.

6.3 Stimulationsvergleich mTLR9 vs. hTLR9-HEK

Synthetische Oligodeoxynukleotide enthalten definierte, auf die jeweilige Zielspezies optimierte CpG-Dinukleotidsequenzen, sodass TLR9 seinen jeweiligen optimalen Liganden spezies- beziehungsweise sequenzspezifisch binden kann (Rutz et al., 2004). Laut Hartmann und Kollegen (2000) unterscheidet sich das optimale CpG-Motiv zur Aktivierung des murinen TLR9 (mTLR9: 5'–GACGTT–3') leicht von der effektiven humanen Stimulationssequenz (hTLR9: 5'–GTCGTT–3').

In den Ergebnissen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine Stimulation von HEK 293 Zellen, die stabil mit einem murinen TLR9 sowie einem NF κ B-Reporterplasmid kotransfiziert waren (HEK 293-mTLR9-luc), ein deutliches dosisabhängiges Ansprechen der Zellen auf den spezifischen murinen

TLR9-Liganden (ODN 1668) und eine schwächere Reaktion auf den spezifischen humanen TLR9-Liganden (ODN 2006) aufwiesen. Dies spricht für eine direkte Interaktion des Rezeptors mit seinem CpG-DNA-Liganden. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit den Erkenntnissen, die Bauer und Kollegen (2001) in einer Studie gezeigt hatten: Murine Splenozyten sprachen ebenfalls auf beide ODNs an, wobei eine Stimulation mit ODN 1668 deutlich stärkere Effekte erzielte als das humane Pendant. Eine mögliche Ursache hierfür kann die PTO-Modifizierung sein, da murine PTO-ODNs einen sehr starken stimulatorischen Effekt auf murine und eine nur sehr schwache bis gar keine Wirkung auf humane Zellen haben (Hartmann et al., 2000).

Außerdem konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass sich die erzielten Induktionsraten bei mTLR9-HEK reziprok zu den Stimuluskonzentrationen verhielten, folglich mit hoch konzentrierten Stimuli niedrigere Induktionen hervorgerufen werden konnten. Dies kann darauf zurückgeführt werden, dass bereits bei einer niedrigen Stimuluskonzentration von hier 0,3 μM eine Sättigung des Rezeptors erreicht wurde.

Bei der Stimulation von HEK 293 Zellen, die stabil mit einem humanen TLR9 sowie einem NF κ B-Reporterplasmid kotransfiziert waren (HEK 293-hTLR9-luc), ließ sich beobachten, dass die Zellen auf eine Stimulation mit ihrem spezifischen Liganden reagierten, die NF κ B-Induktion jedoch deutlich schwächer war als bei mTLR9-HEK. Ein Grund dafür ist möglicherweise die in Studien ermittelte ODN-Konzentration für die halbmaximale Aktivierung der jeweiligen Zelllinien. Während bei HEK 293-mTLR9-luc 70 nM ODN 1668 für eine halbmaximale Induktion der Zellen ausreichend sind, werden beim humanen Pendant 400 nM ODN 2006 zur Aktivierung benötigt. Dies lässt eine deutlich niedrigere Rezeptoraffinität im humanen System vermuten (Bauer et al., 2001). Weiterhin ist die Ansprechbarkeit der stabil transfizierten Zellen abhängig von Transfektionserfolg, zumal höchstwahrscheinlich nicht alle Zellen nach der Transfektion TLR9 exprimieren, was ebenfalls die schlechtere Induzierbarkeit der hTLR9-HEK begründen könnte.

Darüber hinaus spielt die Endosom-Azidifikation für die pH-abhängige Rezeptor-Ligand-Interaktion eine entscheidende Rolle (Häcker et al., 1998). Es ist vorstellbar, dass in den hier verwendeten hTLR9-HEK kein optimaler intraendosomaler pH-Wert zur Ligand-Bindung vorherrschte, sodass in der Folge verschiedene intrazelluläre Prozesse nur unvollständig oder gar nicht ausgeführt wurden. So kann man spekulieren, ob eine fehlende pH-Ansäuerung zu einer leichteren Dissoziation des Liganden vom Rezeptor geführt und somit eine effektive TLR9-Stimulation verhindert hat. Zudem kann eine mangelnde Azidifikation die TLR-Prozessierung durch Cystein-Proteasen so gestört haben, dass eine Rekrutierung von MyD88 zur Aktivierung nachgeschalteter Signalkaskaden erschwert wurde (Ewald et al, 2008).

Des Weiteren konnte in den Experimenten beobachtet werden, dass nur minimale Abstufungen in der NFκB-Induktion durch eine Stimulation mit ODN 2006 erzielt wurden. Dies kann durch hohe Sättigungsbereitschaft des humanen Rezeptors begründet sein, zumal durch eine weitere Erhöhung der Stimuluskonzentration keine signifikante Steigerung der NFκB-Aktivität erreicht werden konnte.

Die Effekte von CpG-DNA auf TLR9 in murinen Versuchsmodellen sind sehr gut untersucht und charakterisiert, wohingegen Erkenntnisse diesbezüglich im humanen System limitiert sind (Hartmann & Krieg, 2000). Aus diesem Grund sind die hier aufgeführten möglichen Ursachen einer schlechteren Stimulierbarkeit von HEK 293-hTLR9-luc eher hypothetischer oder spekulativer Natur und bedürfen weiterer eingehender Untersuchungen.

6.4 Humane PBMCs vs. THP-1

Da sich die Stimulierbarkeit von hTLR9-HEK durch CpG-ODNs in den Experimenten zu dieser Arbeit als sehr schwach erwies, sollte eine andere humane Zelllinie als Kontrollpopulation für die hier durchgeführten Stimulationen und Inhibitionen herangezogen werden. Die humane Monozyten-Leukämie

Zelllinie THP-1 schien für diese Zwecke geeignet, zumal die Zellen TLR9 exprimieren und auf eine Stimulation mit dem TLR9-Liganden CpG-DNA der Klasse B ansprechen sollen (Doyle et al., 2007). Sahingur und Kollegen (2010) konnten darüber hinaus in einer Studie zeigen, dass eine Stimulation von THP-1 Zellen mit bDNA die Produktion proinflammatorischer Zytokine induziert. Um ein optimales Ansprechen der Zellen auf Stimuli zu gewährleisten, ist eine durch Phorbol-12-myristat-13-acetat induzierte Differenzierung der THP-1 Zellen zu Makrophagen entlang der Monozyten-Makrophagen-Zelllinie erforderlich (Park et al., 2007).

Auf diesen Erkenntnissen basierend wurden in einer Versuchsreihe THP-1 Zellen nach vorausgegangener PMA-induzierter Differenzierung mit CpG-ODN und einem suppressiven ODN kostimuliert. Im Ergebnis konnte wiederholt keine TLR9-Induktion durch entsprechende Liganden erzielt werden (Ergebnisse nicht gezeigt).

Das fehlende Ansprechen der THP-1 Zellen kann durch eine unzureichende Differenzierung der Zellen zu Makrophagen mittels PMA einerseits oder eine toxische Wirkung dieser Substanz auf die Zellen andererseits begründet sein. In den Versuchen wurden die Zellen anhand eines von Park und Kollegen (2007) empfohlenen Protokolls behandelt. Eine weitere Ursache kann eine mögliche Mutation der Zelllinie oder eine reduzierte TLR9-Expression in dem hier verwendeten Zellklon sein. Diese Faktoren können bereits durch veränderte Wachstumsbedingungen oder Zellpassagierung beeinflusst werden.

Im Gegensatz zu den in der Arbeit von Doyle und Kollegen (2007) erzielten Erkenntnissen finden sich in der Literatur jedoch auch Studien, die eine TLR9-Expression in THP-1 Zellen negieren (Takeshita et al., 2004). Diese widersprüchlichen Feststellungen machen bewusst, dass auch eine Zelllinie nicht immer identische Charakteristika und Merkmale aufweist, wie man es erwarten würde. Aus diesem Grunde war es erforderlich, andere Zellen als Referenz für die Versuche zu finden.

Die Erkennung bakterieller DNA durch das menschliche Immunsystem hängt nicht nur vom jeweiligen Gehalt an unmethylierten CpG-Dinukleotiden ab, sie setzt auch das Vorhandensein eines intakten TLR9 voraus (Vollmer et al., 2004). Dieser Rezeptor weist eine deutlich erhöhte Frequenz in oberflächlichen Epithelzellschichten von entzündetem Parodontalgewebe auf (Ewaschuk et al., 2007). Das histologische Bild der Parodontitis wiederum ist geprägt durch ein chronisches Infiltrat mononukleärer Zellen, die einen Großteil der TLR-vermittelten mikrobiellen Abwehr im parodontalen Gewebe ausmachen (Beklen et al., 2008). In einer Studie über die quantitative Expression von TLRs in mononukleären Zellen des peripheren Blutes (Hornung et al., 2002) konnte nachgewiesen werden, dass vor allem zwei Subpopulationen der PBMCs, nämlich B-Zellen und pDCs, eben diesen für die Erkennung bDNA wichtigen Rezeptor exprimieren, wobei das Ausmaß der TLR9-Expression in pDCs deutlich höher liegt als in B-Zellen.

Aufgrund dieser Zusammenhänge schienen PBMCs eine stärkere physiologische Relevanz für die Versuche zu dieser Arbeit zu besitzen und wurden als Kontroll- und Referenzsystem eingesetzt.

6.5 Eignung humaner PBMCs als Referenzmodell

Es konnte gezeigt werden, dass humane PBMCs beziehungsweise die TLR9-exprimierenden Subpopulationen der PBMCs dosisabhängig auf eine Stimulation mit den spezifischen Liganden ODN 2006 und DNA von *E. coli K12* ansprachen und deutlich höhere Induktionsraten als hTLR9-HEK aufwiesen. Die signifikanten Stimulationen ließen sich mit G-ODN effektiv supprimieren. Auffällig war, dass die Inhibition bei mTLR9-HEK (Suppression auf 1 % des Ausgangswertes, vergl. Grafik 4.7) bedeutend effizienter war als bei PBMCs (Suppression auf 36 % des Ausgangswertes, vergl. Grafik 4-12), was im Einklang mit bekannten Befunden steht (Peter et al., 2007).

Im Gegensatz zu den Erkenntnissen von Peter und Kollegen (2007) wies das inhibitorische Oligodeoxynukleotid G-ODN ein leichtes stimulatorisches Potential in allen für die Versuche eingesetzten Zellen auf. Bemerkenswert ist weiterhin, dass G-ODN in niedrigen Konzentrationen wie 0,1 μM anstelle einer Suppression eine Steigerung der Zytokinproduktion hervorzurufen schien, was ebenfalls nicht von Peter und Kollegen (2007) beobachtet werden konnte. Ein fraglicher Grund könnte sein, dass das leichte, ansonsten vernachlässigbar geringe stimulatorische Potential von G-ODN in niedrigen Konzentrationen einen additiven Effekt auf den eigentlichen Stimulus ODN 2006 hat.

Zusammenfassend haben die Experimente mit humanen PBMCs gute Ergebnisse geliefert und die Erwartungen erfüllt. Dennoch kann anhand der Resultate nicht gesagt werden, auf welche Subpopulation der Großteil der Induktionen zurückzuführen ist. Bisherigen Erkenntnissen bezüglich der Expression von TLR9 zufolge kommen zwei Subpopulationen der PBMCs in diesem Fall in Frage: humane B-Zellen und pDCs. Letztere weisen laut Hornung und Kollegen (2002) zwar eine bedeutend höhere TLR9-Expression auf als B-Zellen, sind jedoch hauptsächlich als Produzenten großer Mengen an Typ-I-Interferonen im Rahmen von Virusinfektionen oder als Antwort auf eine Stimulation mit Klasse-A ODNs bekannt (Colonna et al., 2004). Dennoch wurde in Studien gezeigt, dass pDCs auch auf Klasse-B ODNs ansprechen (Gilliet et al., 2008) und proinflammatorische Zytokine wie IL-6 oder Chemokine produzieren, wobei letztere eine weitere Rekrutierung von Leukozyten zu Entzündungsherden bewirken (Barchet et al., 2005). Es kann demnach davon ausgegangen werden, dass in den eigenen Experimenten pDCs auf ODN 2006 als synthetischen und bDNA von *E. coli* K12 als natürlichen TLR9-Liganden reagiert und einen nicht unerheblichen Teil zu den dargestellten TLR9-Induktionen beigetragen haben. Denkbar wäre, dass sich die gezeigten Ergebnisse durch den Einsatz reiner TLR9-exprimierender PBMC-Subpopulationen verbessern sowie eindeutiger definieren und interpretieren ließen, was weiterer Untersuchungen bedarf.

Somit stellen PBMCs als Gesamtpopulation vor allem hinsichtlich der Ergebnisinterpretation, weniger jedoch hinsichtlich ihrer Eignung als Versuchsmodell nur ein suboptimales System dar, welches dennoch gute Resultate lieferte. Zu beachten ist außerdem, dass die Versuche zu dieser Arbeit mit PBMCs eines gesunden freiwilligen Spenders durchgeführt wurden und demnach nicht zwingend als repräsentativ für eine Grundgesamtheit angesehen werden sollten. Interessant wäre folglich, ob sich durch die Verwendung von PBMCs kranker oder allergischer Spender unterschiedliche oder abweichende Ergebnisse beobachten ließen beziehungsweise welche Resultate durch die Verwendung einer reinen pDCs Subpopulation erzielt würden.

6.6 Bedeutung der inhibitorischen Wirkung von G-ODN auf die stimulatorischen Effekte bDNA via TLR9

TLR9 ist in verschiedene Immunabwehrprozesse des angeborenen Immunsystems involviert. So ist der Rezeptor unter anderem wichtig für die Erkennung bakterieller Infektionen mit beispielsweise *M. tuberculosis*, *N. meningitidis* oder *S. pneumoniae* (Trinchieri & Sher, 2007; Albiger et al., 2007). Weiterhin trägt TLR9 auch entscheidend zur Abwehr viraler Erreger wie CMV oder HSV sowie mykotischer Erreger wie *C. albicans* bei (Trinchieri & Sher, 2007; Van de Veerdonk et al., 2007) und ist außerdem essentiell für die Bekämpfung parasitärer Erreger wie *T. cruzi* (Bartholomeu et al., 2008).

Darüber hinaus wurde beschrieben, dass TLR9 durch Erkennung Chromatin-assoziiierter Strukturen und Aktivierung autoreaktiver B-Zellen durch körpereigene DNA in die Pathogenese verschiedener Autoimmunerkrankungen wie rheumatoide Arthritis oder Systemischer Lupus Erythematoses (SLE) involviert zu sein scheint (Viglianti et al., 2003; Boulé et al., 2004). Auch in der Pathogenese der Parodontitis scheint TLR9 beteiligt zu sein, zumal die bDNA verschiedener periodontopathogener Keime die IL-6 Produktion in primären humanen Gingivafibroblasten (HGFs) induziert (Nonnemacher et al., 2003). Vor allem diese

negativen Effekte der TLR9-Aktivierung haben ein zunehmendes Interesse an der Entdeckung von CpG-DNA-Antagonisten oder TLR9-Inhibitoren bedeutend gemacht. Demzufolge sollte der inhibitorische Effekt des suppressiven Oligodeoxynukleotids G-ODN auf die stimulatorische Wirkung von bDNA von *E. coli K12* untersucht werden.

6.6.1 PBMCs

Durch eine Stimulation humaner PBMCs mit *E. coli*-DNA konnten signifikante Rezeptorinduktionen erzielt werden, was sich in den hohen sezernierten Zytokinmengen zeigte. Die signifikanten Stimulationen ließen sich durch den Einsatz des inhibitorischen Oligodeoxynukleotids G-ODN mit hoher Effizienz supprimieren. Bereits bei hohen Stimuluskonzentrationen von 200 µg/ml *E. coli* DNA konnte in Versuchen zur vorliegenden Arbeit eine Inhibition von etwa 70 % hinsichtlich der Sekretion IL-6 beobachtet werden. Ähnliches war zuvor für murine Makrophagen und BMDCs beschrieben worden (Peter et al., 2007). Niedrigere Stimuluskonzentrationen der bDNA konnten sogar auf 10 % oder weniger des Ausgangswertes supprimiert werden. Somit war die inhibitorische Wirkung von G-ODN umso effektiver, je niedriger der TLR9-Stimulus konzentriert war.

Interessant in diesem Zusammenhang war die Beobachtung, dass eine Kostimulation des inhibitorischen Oligonukleotids mit ODN 2006 einer- als auch bDNA andererseits in bestimmten Konzentrationsverhältnissen anstatt in einer Suppression in einer Steigerung der Zytokininduktion resultierte (vergl. Abschnitt 5.2.3.2 und 5.2.3.3). Dieses Phänomen ließ sich vor allem dann beobachten, wenn G-ODN im Verhältnis zum eigentlichen Stimulus in entsprechend niedriger Konzentration vorlag. In den eigenen Versuchen konnte gezeigt werden, dass G-ODN wider Erwarten eine – wenn auch vernachlässigbar geringe – stimulatorische Wirkung zu besitzen scheint. Dies wiederum steht im Gegensatz zur klassischen Definition des kompetitiven Antagonisten, welche besagt, dass dieser keinerlei nachgeschalteten Effekt am Rezeptor im Sinne einer intrinsischen Aktivität

aufweist (Karow et al., 2010). Man kann spekulieren, ob im Rahmen der eigenen Experimente die Kostimulation eine Veränderung der Rezeptoraffinität herbeigeführt haben könnte. Weiterhin mag es auf molekularer Ebene zu einer gegenseitigen Beeinflussung der eigentlich entgegengesetzt wirkenden Substanzen gekommen sein, welche in einer additiven oder gar potenzierenden Wirkungsverstärkung resultierte.

Das inhibitorische Oligodeoxynukleotid wurde stets zeitgleich, also ohne zeitliche Verzögerung zum Stimulationsansatz hinzugegeben, um eine möglichst maximale Suppression der Zytokinsekretion zu erzielen. Dies war jedoch nur bei niedrigen Stimuluskonzentrationen möglich. In anderen Studien konnten suppressive ODN ihre Wirkung sogar bei Zugabe in einem Zeitraum von drei bis sieben Stunden nach einer Stimulation entfalten (Klinman et al., 2003, Peter et al., 2007). Hierbei ist zu bedenken, dass in den genannten Studien nur das reine spezifische CpG-Motiv als TLR9-Stimulus verwendet wurde und nicht, wie bei den hier vorliegenden Experimenten, vollständige bakterielle Nukleinsäuren. Dies könnte als mögliche Ursache für die etwas schwächere Suppression angesehen werden, zumal unterschiedliche Wechselwirkungen auf molekularer Ebene zwischen G-ODN und bDNA einerseits beziehungsweise CpG-ODN andererseits vorstellbar sind. Weil selbst die zeitgleiche Gabe von G-ODN zum Stimulus nicht zu einer 100%igen Suppression führte, wurde von zeitlich verzögerten Inhibitionen abgesehen.

Zusammenfassend zeigen die beobachteten Effekte, dass die intrinsische Aktivität bDNA durch den Einsatz von G-ODN inhibiert und eine Aktivierung nachgeschalteter Signalkaskaden über TLR9 und NFκB blockiert werden kann. In der Folge werden weniger bis keine proinflammatorischen Zytokine, die zur Entstehung entzündlicher Veränderungen an Geweben beitragen, produziert und sezerniert.

6.6.2 HGFs

In abschließenden Versuchsreihen zu dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Stimulation primärer humaner Gingiva-Fibroblasten mit ODN 2006 als synthetischem und bDNA von *E. coli* K12 als natürlichem Liganden zu einer deutlichen Produktion und Sekretion des proinflammatorischen Zytokins IL-6 führte. Dieses Ergebnis steht im Gegensatz zu den Beobachtungen einer Studie von Mahanonda und Kollegen (2007), in welcher zwar eine TLR9-mRNA-Expression in primären HGFs nachgewiesen, jedoch keine detektierbare CpG-ODN-induzierte Immunantwort ausgelöst werden konnte. Diese Diskrepanz zeigt die Schwierigkeit und Herausforderung in der Arbeit mit primär isolierten Zellen im Vergleich zu etablierten immortalisierten Zelllinien. Während letztere sich unter anderem dadurch auszeichnen, dass sie potentiell unsterblich sind und unabhängig von beliebig häufig wiederholten Zellpassagen identische Charakteristika aufweisen, ist die Anzahl der möglichen Zellteilungen bei Primärkulturen limitiert. Hier kann es mit zunehmender Zellpassage zu Veränderungen der Zelleigenschaften (beispielsweise Verlust intakter TLRs) kommen, bevor die Zellen - dem Hayflick-Phänomen entsprechend - in den programmierten Zelltod übergehen (Hayflick und Moorhead, 1961). Dies kann als mögliche Erklärung dienen, warum eine vermeintlich gleiche Zellart in verschiedenen Studien ein unterschiedliches Stimulationsverhalten aufweist. Darüber hinaus muss bedacht werden, dass es zur TLR9-Aktivierung einer proteolytischen Spaltung desselben im endolysosomalen Kompartiment in ein N- und C-terminales Fragment bedarf, wobei letzteres CpG-ODNs stärker und effektiver bindet als der ungespaltene Rezeptor (Park et al., 2008). Eine fehlende Proteolyse, wie sie bei Mahanonda und Kollegen vorgelegen haben mag, kann einen eigentlich intakten Rezeptor infunktional erscheinen lassen.

Bei beiden in diesen Experimenten verwendeten Stimuli handelte es sich um spezifische TLR-9-Agonisten, sodass davon ausgegangen werden kann, dass die erzielten Effekte TLR-9 vermittelt sind. Auffällig war, dass die bakterielle DNA ein höheres Stimulationspotential im Sinne höherer Zytokininduktionen aufzuweisen

schien als ODN 2006. Hierbei ist zu bedenken, dass die bakterielle DNA als vollständige Nukleinsäure zum Versuchsansatz gegeben wurde. ODN 2006 hingegen lag als isolierte stimulatorische Motivsequenz vor, welche als solche in der Lage ist, die immunstimulatorische Aktivität bakterieller DNA zu imitieren (Ishii et al., 2004). Eine weitere mögliche Erklärung für das unterschiedliche Induktionsverhalten kann eine variable Rezeptoraffinität der beiden Liganden in den hier vorliegenden Experimenten sein. Darüber hinaus wäre denkbar, dass ODN 2006 gegebenenfalls empfindlicher gegenüber äußeren Versuchsbedingungen ist, und es beispielsweise einer Optimierung des pH-Wertes, der Temperatur oder der Inkubationsdauer zur bestmöglichen Rezeptor-Liganden-Interaktion bedarf. Nicht zuletzt darf man mutmaßen, ob die vollständige Nukleinsäure im Gegensatz zum synthetischen Oligonukleotid Wechselwirkungen mit anderen Rezeptoren eingeht, was sich als gesteigerte Zytokinproduktion zeigen könnte.

Die durch bakterielle DNA induzierte TLR9-Aktivierung in HGFs, welche zu einer Freisetzung proinflammatorischer Zytokine führt, sollte durch den Einsatz suppressiver Substanzen unterbunden werden. In früheren Studien konnte dieser Effekt bereits durch Behandlung mit DNase (Takeshita et al., 1999) oder Methylierung der DNA (Nonnenmacher et al., 2003) aufgehoben werden. Beide Vorgänge führen letztlich zu einer Inaktivierung des TLR-9-Liganden.

In dieser Arbeit sollten die Erkenntnisse, welche aus Inhibitionsstudien des suppressiven Oligonukleotids G-ODN mit dem stimulatorischen CpG-ODN vorlagen, auf vollständige bakterielle Nukleinsäuren angewandt werden. Wie aus den Ergebnissen zu dieser Arbeit ersichtlich, konnte G-ODN die stimulatorische Aktivität bDNA in einer Primärkultur humaner Gingiva-Fibroblasten deutlich drosseln oder gar völlig inhibieren.

In der Literatur finden sich teilweise sehr unterschiedliche Hypothesen bezüglich der Wirkungsweise inhibitorischer Oligodeoxynukleotide, welche auf das hier eingesetzte Zellsystem übertragbar wären.

Dieser Effekt könnte durch das Prinzip des kompetitiven Antagonismus erklärt werden (Trieu et al., 2006). Dabei besetzt das als Antagonist im Überschuss angebotene G-ODN die TLR9-Bindungsstelle und verhindert auf diese Weise, dass der eigentliche Agonist (bDNA) seine Wirkung am bereits besetzten Rezeptor entfalten kann. Laut Klinman und Kollegen (2003) wiederum verhindert G-ODN die Reifung endosomaler Vesikel, in welchen die sequenzspezifische CpG-Erkennung erfolgt, und blockiert zudem die Kolo-kalisierung des TLR-9-Liganden mit dem Rezeptor innerhalb dieser Vesikel. In anderen Studien wurde herausgefunden, dass suppressive Oligodeoxynukleotide die Oberflächenbindung und Internalisierung stimulatorischer ODNs verringern, was eine verminderte TLR9 mRNA-Expression und demnach eine reduzierte Zytokinfreisetzung zur Folge hat (Wang et al., 2007). Darüber hinaus wurde durch weitere Untersuchungen die Vermutung geäußert, inhibitorische ODNs würden ihre Wirkung durch Bindung an TLR9-Signalosomen anstelle des Rezeptors selbst entfalten, wobei die Erkenntnisse diesbezüglich noch sehr fragmentarisch sind (Lenert et al., 2005). Bei Signalosomen handelt es sich um Proteinkomplexe mit Kinaseaktivität, welche in die Signaltransduktion des Ubiquitin-Proteasomen-Systems bzw. der NFκB-Signalkaskade involviert sind (Leppert et al., 2011; Skaug et al., 2009).

Welcher Wirkmechanismus und welche molekularen Wechselwirkungen der oben vorgestellten dem inhibitorischen Effekt des hier angewandten G-ODNs auf eine Stimulation einer Primärkultur humaner Gingiva-Fibroblasten mit bDNA zugrunde liegen und wie genau diese letztlich zu einer reduzierten Freisetzung proinflammatorischer Zytokine führen, soll Gegenstand weiterer eingehender Untersuchungen sein.

Die hier aufgeführten Ergebnisse als auch die Resultate anderer Studien in der Literatur zeigen, dass eine Immunstimulation mittels bDNA nicht nur auf etablierte Zelllinien beschränkt ist, sondern auch in Primärkulturen wie HGFs stattfinden kann. Darüber hinaus kann festgehalten werden, dass inhibitorische Oligodeoxynukleotide die Aktivierung humaner und muriner TLR9 *in vitro*

unterbinden können, ohne dabei eine zelluläre Toxizität aufzuweisen. Vor allem die Tatsache, dass G-ODN bzw. SAT05f als weiteres suppressives ODN effektiv auch *in vivo* eine exzessive Zytokinausschüttung inhibieren und Mäuse vor einem letalen Zytokinschock bewahren (Peter et al., 2007; Sun et al., 2010), eröffnet die Möglichkeit, dass diese Erkenntnisse einen Ansatz in der Therapie der Parodontitis darstellen könnten. Ein erster Schritt zu einem möglichen Einsatz inhibitorischer Oligodeoxynukleotide wie G-ODN in der Therapie der Parodontitis soll das in dieser Arbeit etablierte orale Infektionsmodell *in vitro* sein. Ob und wie dieses in einem murinen oder gar humanen Modell *in vivo* praktisch umgesetzt und angewandt werden kann bedarf weitergehender Untersuchungen, wobei zu bedenken gilt, dass sich der therapeutische Einsatz bei bereits progredienten Krankheitsstadien als schwierig erweisen könnte.

6.7 Expression und Lokalisation von TLR9 in HGFs

Mithilfe immunhistochemischer Färbung und Fluoreszenzmikroskopie ist es in dieser Arbeit gelungen, die Expression von TLR9 in HGFs, wie sie bereits in vorausgehenden Studien unserer Arbeitsgruppe nachgewiesen wurde (Nonnemacher et al., 2003), zu bestätigen. Ziel der vorliegenden Untersuchungen sollte sein, die genaue zelluläre Lokalisation des Rezeptors zu ermitteln. Die hier gezeigten Ergebnisse lassen vermuten, dass der Rezeptor in ruhendem Zustand intrazellulär lokalisiert sein muss, höchstwahrscheinlich im Endoplasmatischen Retikulum (Latz et al., 2004).

Uehara und Kollegen (2007) hatten in einer Studie die Expression und Lokalisation der funktionalen TLRs 1 bis 9 in HGFs untersucht und konnten selbige nachweisen. Im Gegensatz zu unseren Experimenten wurde jedoch keine Isotypkontrolle zum Ausschluss unspezifisch gebundener Antikörper mitgeführt. Die Interpretation immunhistochemischer Färbungen ist dadurch bedeutend erschwert und unsicher, zumal ein entsprechender Vergleich, der eine spezifische von einer unspezifischen Färbung hervorhebt, fehlt. Darüber hinaus ähneln sich

die mikroskopischen Aufnahmen der jeweiligen TLRs sehr untereinander und erwecken zudem den Eindruck, als würden alle detektierten Rezeptoren in der gesamten Zelle und nicht lokal begrenzt in oder an bestimmten zellulären Strukturen exprimiert. Auch eine genaue Differenzierung zwischen intra- und extrazellulärer Lokalisation der Rezeptoren erscheint durch die ubiquitäre starke Fluoreszenz der Zellen in den Abbildungen schwierig.

Die hier gezeigten Ergebnisse deuten nicht nur stark auf eine intrazelluläre Expression von TLR9 in HGFs hin, sondern zeigen vor allem eine lokale Begrenzung auf bestimmte intrazelluläre Strukturen. Über DCs und Makrophagen ist bekannt, dass TLR9 in ruhendem Zustand intrazellulär im Endoplasmatischen Retikulum lokalisiert ist (Latz et al., 2004), was die Vermutung nahelegt, dass diese Beobachtung auch für unstimulierte HGFs zutreffen könnte. Aufgrund von Schwierigkeiten in der Handhabung und Färbung primärer Zellen einerseits sowie der Interpretation der Befunde andererseits ist es sinnvoll und notwendig, die immunhistochemischen Methoden zu verbessern und zu optimieren. Hierbei sind verschiedene Möglichkeiten und Ansätze denkbar.

Das verwendete Protokoll kann in seinen Arbeitsschritten optimiert werden, beispielsweise durch veränderte Einwirkzeiten der verwendeten Substanzen oder einen Austausch selbiger. Die Auswertung der Färbungen in dieser Arbeit erfolgte mit einem Fluoreszenzmikroskop und erlaubte die Abbildung der betrachteten Objekte nur in zwei Dimensionen. Durch die Verwendung eines konfokalen Laser-Scanning-Mikroskops hingegen, das durch seine hohe axiale Auflösung eine Aufnahme in unterschiedlichen Schärfenebenen ermöglicht, kann ein scharfes dreidimensionales Bild erstellt werden, das eine Beurteilung sowie Interpretation immunhistochemischer Färbungen und abgebildeter zellulärer Strukturen bedeutend erleichtert. Um die detektierten Rezeptoren und ihre Lokalisation möglichst genau zu identifizieren, können andere zelluläre Strukturen oder Proteine zur besseren Abgrenzung mit unterschiedlich konjugierten Antikörpern markiert werden.

Die Parodontitis entsteht als Resultat einer kontinuierlichen Interaktion zwischen Wirtszellen und subgingivalen pathogenen Bakterien (Scheres et al., 2011). In verschiedenen Studien konnte eine gesteigerte TLR9-Expression in entzündetem Parodontalgewebe nachgewiesen werden, wobei der Rezeptor eine signifikant erhöhte Frequenz in den oberflächlichen Epithelzellschichten aufwies (Kajita et al., 2007; Beklen et al., 2008). Vergleichbar dazu wurde in Zellen aus humanen Tonsillen (Eaton-Bassiri et al., 2004) und Darmepithelien als Reaktion auf einen konstanten Antigenreiz ebenfalls eine erhöhte TLR9-Expression sowie zusätzlich eine Translokation des Rezeptors vom intrazellulären Kompartiment an die Zelloberfläche auch *in vivo* beobachtet (Ewaschuk et al., 2007), was für eine zumindest partielle Verursachung von Entzündungen intestinaler Zellen durch TLR9 spricht. Aufgrund der Analogien zwischen oralen und intestinalen Epithelien, die jeweils eine Barriere zur entsprechenden Mikroflora bilden, ist auch in humanen Gingivafibroblasten wegen der permanenten antigenen Stimulation durch bDNA eine Translokation von TLR9 an die Zelloberfläche vorstellbar.

Um diese Hypothese zu prüfen, wurden in Versuchen zu dieser Arbeit extrazelluläre Färbungen sowohl an ruhenden als auch mit TLR9-Liganden stimulierten HGFs durchgeführt. Durch die vorgeschaltete Stimulation sollte eine gesteigerte Expression und mögliche Translokation des Rezeptors an die Zelloberfläche ausgelöst und so das Resultat der Färbung verbessert werden. In unseren Experimenten konnte jedoch weder an stimulierten noch ruhenden HGFs eine extrazelluläre TLR9-Expression nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Es wäre denkbar, dass sich durch eine *in vitro* Stimulation an Gingivafibroblasten keine Translokation des TLR9 vom intrazellulären Kompartiment an die Zelloberfläche auslösen lässt; zumindest keine, die durch die hier angewandten Methoden detektierbar wäre. Eine mögliche Ursache könnte sein, dass die gewählten Zeiträume der *in vitro* Stimulation (0 bis 48h) gegebenenfalls nicht ausreichend waren, um eine Rezeptortranslokation zu induzieren. Darüber hinaus sollte bedacht werden, dass die tatsächliche Situation der TLR9-Expression, wie sie am infizierten Parodont vorherrscht, viel komplexer ist als sie *in vitro* nachgestellt werden kann.

In künftigen Studien sollen die Techniken weiter verbessert werden. Neben einer Optimierung des Protokolls käme die Verwendung humaner Gingivafibroblasten, welche direkt aus parodontalen entzündlichen Läsionen isoliert werden, in Frage. Welche immunologischen Prozesse bei einer vermuteten entzündungsbedingten Rezeptortranslokation eine Rolle spielen, soll Gegenstand weiterer eingehender Untersuchungen sein.

7 Literaturverzeichnis

7.1 Wissenschaftliche Publikationen

- Aas JA, Paster BJ, Stokes LN, Olsen I, Dewhirst FE** (2005). Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. *J Clin Microbiol* 43(11): 5721-5732.
- Aderem A and Ulevitch RJ** (2000). Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature* 406(6797): 782-787.
- Agren J, Thiemermann C, Foster SJ, Wang JE, Aasen AO** (2006). Cytokine responses to CpG DNA in human leukocytes. *Scand J Immunol* 64(1): 61-68.
- Akira S and Takeda K** (2004). Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol* 4(7): 499-511.
- Akira S, Uematsu S, Takeuchi O** (2006). Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 124(4): 783-801.
- Al-Ahmad A, Roth D, Wolkewitz M, Wiedmann-Al-Ahmad M, Follo M, Ratka-Krüger P, Deimling D, Hellwig E, Hannig C** (2010). Change in diet and oral hygiene over an 8-week period: effects on oral health and oral biofilm. *Clin Oral Investig* 14(4): 391-396.
- Albiger B, Dahlberg S, Sandgren A, Wartha F, Beiter K, Katsuragi H, Akira S, Normark S, Henriques-Normark B** (2007). Toll-like receptor 9 acts at an early stage in host defence against pneumococcal infection. *Cell Microbiol* 9(3): 633-644.
- Alexander WS** (2002). Suppressors of cytokine signalling (SOCS) in the immune system. *Nat Rev Immunol* 2(6): 410-416.
- Alexopoulou L, Holt AC, Medzhitov R, Flavell RA** (2001). Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature* 413(6857): 732-738.
- Anderson KV** (2000). Toll signaling pathways in the innate immune response. *Curr Opin Immunol* 12(1): 13-19.
- Artis D** (2008). Epithelial-cell recognition of commensal bacteria and maintenance of immune homeostasis in the gut. *Nat Rev Immunol* 8(6): 411-420.
- Bakaletz LO** (2004). Developing animal models for polymicrobial diseases. *Nat Rev Microbiol* 2(7): 552-568.

- Barchet W, Blasius A, Cella M, Colonna M** (2005). Plasmacytoid dendritic cells: in search of their niche in immune responses. *Immunol Res* 32(1-3): 75-83.
- Bartholomeu DC, Ropert C, Melo MB, Parroche P, Junqueira CF, Teixeira SM, Sirois C, Kasperkovitz P, Knetter CF, Lien E, Latz E, Golenbock DT, Gazzinelli RT**(2008). Recruitment and endo-lysosomal activation of TLR9 in dendritic cells infected with *Trypanosoma cruzi*. *J Immunol* 181: 1333-1344.
- Bauer S, Kirschning CJ, Häcker H, Redecke V, Hausmann S, Akira S, Wagner H, Lipford GB** (2001). Human TLR9 confers responsiveness to bacterial DNA via species-specific CpG motif recognition. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(16): 9237-9242.
- Bauer S, Pigisch S, Hangel D, Kaufmann A, Hamm S** (2008). Recognition of nucleic acid and nucleic acid analogs by Toll-like receptors 7, 8 and 9. *Immunobiology* 213(3-4): 315-328.
- Beji A, Izard D, Gavini F, Leclerc H, Leseine-Delstanche M, Krembel J** (1987). A rapid chemical procedure for isolation and purification of chromosomal DNA from gram-negative bacilli. *Anal Biochem* 162(1): 18-23.
- Beklen A, Ainola M, Hukkanen M, Gürkan C, Sorsa T, Konttinen YT** (2007). MMPs, IL-1, and TNF are regulated by IL-17 in periodontitis. *J Dent Res* 86(4): 347-351.
- Beklen A, Hukkanen M, Richardson R, Konttinen YT** (2008). Immunohistochemical localization of Toll-like receptors 1-10 in periodontitis. *Oral Microbiol Immunol* 23(5): 425-431.
- Belvin MP and Anderson KV** (1996). A conserved signaling pathway: the *Drosophila* toll-dorsal pathway. *Annu Rev Cell Dev Biol* 12: 393-416.
- Berezow AB and Darveau RP** (2011). Microbial shift and periodontitis. *Periodontol* 2000 55(1): 36-47.
- Bettelli E, Korn T, Kuchroo VK** (2007). Th17: the third member of the effector T cell trilogy. *Curr Opin Immunol* 19(6): 652-657.
- Blasius AL and Beutler B** (2010). Intracellular toll-like receptors. *Immunity* 32(3): 305-315.
- Bogaert D, van Belkum A, Sluijter M, Luijendijk A, de Groot R, Rümke HC, Verbrugh HA, Hermans PW** (2004). Colonisation by *Streptococcus pneumoniae* and *Staphylococcus aureus* in healthy children. *Lancet* 363(9424): 1871-1872.
- Boulé MW, Broughton C, Mackay F, Akira S, Marshak-Rothstein A, Rifkin IR** (2004). Toll-like receptor 9-dependent and -independent dendritic cell activation by chromatin-immunoglobulin G complexes. *J Exp Med* 199(12): 1631-1640.

- Brint EK, Xu D, Liu H, Dunne A, McKenzie AN, O'Neill LA, Liew FY** (2004). ST2 is an inhibitor of interleukin 1 receptor and Toll-like receptor 4 signaling and maintains endotoxin tolerance. *Nat Immunol* 5(4): 373-379.
- Brogden KA, Guthmiller JM, Taylor CE** (2005). Human polymicrobial infections. *Lancet* 365(9455): 253-255.
- Choi BK, Moon SY, Cha JH, Kim KW, Yoo YH** (2005). Prostaglandin E(2) is a main mediator in receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand-dependent osteoclastogenesis induced by *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, and *Treponema socranskii*. *J Periodontol* 76(5): 813-820.
- Chuang TH and Ulevitch RJ** (2004). Triad3A, an E3 ubiquitin-protein ligase regulating Toll-like receptors. *Nat Immunol* 5(5): 495-502.
- Cochran DL** (2008). Inflammation and bone loss in periodontal disease. *J Periodontol* 79(8 Suppl): 1569-1576.
- Colonna M, Trinchieri G, Liu YJ** (2004). Plasmacytoid dendritic cells in immunity. *Nat Immunol* 5(12): 1219-1226.
- Dalpke A, Frank J, Peter M, Heeg K** (2006). Activation of toll-like receptor 9 by DNA from different bacterial species. *Infect Immun* 74(2): 940-946.
- Darveau RP** (2010). Periodontitis: a polymicrobial disruption of host homeostasis. *Nat Rev Microbiol* 8(7): 481-490.
- Darveau RP, Pham TT, Lemley K, Reife RA, Bainbridge BW, Coats SR, Howald WN, Way SS, Hajjar AM** (2004). *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide contains multiple lipid A species that functionally interact with both toll-like receptors 2 and 4. *Infect Immun* 72(9): 5041-5051.
- Diebold SS, Kaisho T, Hemmi H, Akira S, Reis e Sousa C** (2004). Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA. *Science* 303(5663): 1529-1531.
- Doyle SL, Jefferies CA, Feighery C, O'Neill LA** (2007). Signaling by Toll-like receptors 8 and 9 requires Bruton's tyrosine kinase. *J Biol Chem* 282(51): 36953-36960.
- Eaton-Bassiri A, Dillon SB, Cunningham M, Ryczyn MA, Mills J, Sarisky RT, Mbow ML** (2004). Toll-like receptor 9 can be expressed at the cell surface of distinct populations of tonsils and human peripheral blood mononuclear cells. *Infect Immun* 72(12): 7202-7211.
- Ewald SE, Lee BL, Lau L, Wickliffe KE, Shi GP, Chapman HA, Barton GM** (2008). The ectodomain of Toll-like receptor 9 is cleaved to generate a functional receptor. *Nature* 456(7222): 658-662.

- Ewaschuk JB, Backer JL, Churchill TA, Obermeier F, Krause DO, Madsen KL** (2007). Surface expression of Toll-like receptor 9 is upregulated on intestinal epithelial cells in response to pathogenic bacterial DNA. *Infect Immun* 75(5): 2572-2579.
- Fine DH, Kaplan JB, Kachlany SC, Schreiner HC** (2006). How we got attached to *Actinobacillus actinomycetemcomitans*: A model for infectious diseases. *Periodontol* 2000 42: 114-157.
- Fitzgerald KA, Palsson-McDermott EM, Bowie AG, Jefferies CA, Mansell AS, Brady G, Brint E, Dunne A, Gray P, Harte MT, McMurray D, Smith DE, Sims JE, Bird TA, O'Neill LA** (2001). Mal (MyD88-adaptor-like) is required for Toll-like receptor-4 signal transduction. *Nature* 413(6851): 78-83.
- Fitzgerald KA, Rowe DC, Barnes BJ, Caffrey DR, Visintin A, Latz E, Monks B, Pitha PM, Golenbock DT** (2003). LPS-TLR4 signaling to IRF-3/7 and NF-kappaB involves the toll adapters TRAM and TRIF. *J Exp Med* 198(7): 1043-1055.
- Fredricks DN and Relman DA** (1996). Sequence-based identification of microbial pathogens: a reconsideration of Koch's postulates. *Clinical Microbiological Reviews* 9(1): 18 - 33.
- Gilliet M, Cao W, Liu YJ** (2008). Plasmacytoid dendritic cells: sensing nucleic acids in viral infection and autoimmune diseases. *Nat Rev Immunol* 8(8): 594-606.
- Gürsel M, Verthelyi D, Gürsel I, Ishii KJ, Klinman DM** (2002). Differential and competitive activation of human immune cells by distinct classes of CpG oligodeoxynucleotide. *J Leukoc Biol* 71(5): 813-820.
- Häcker H, Mischak H, Miethke T, Liptay S, Schmid R, Sparwasser T, Heeg K, Lipford GB, Wagner H** (1998). CpG-DNA-specific activation of antigen-presenting cells requires stress kinase activity and is preceded by non-specific endocytosis and endosomal maturation. *EMBO J* 17(21): 6230-6240.
- Haffajee AD and Socransky SS** (1994). Microbial etiological agents of destructive periodontal diseases. *Periodontol* 2000 5: 78-111.
- Hajjar AM, O'Mahony DS, Ozinsky A, Underhill DM, Aderem A, Klebanoff SJ, Wilson CB** (2001). Cutting edge: functional interactions between toll-like receptor (TLR) 2 and TLR1 or TLR6 in response to phenol-soluble modulins. *J Immunol* 166(1): 15-19.
- Hartmann G and Krieg AM** (2000). Mechanism and function of a newly identified CpG DNA motif in human primary B cells. *J Immunol* 164(2): 944-953.
- Hartmann G, Weeratna RD, Ballas ZK, Payette P, Blackwell S, Suparto I, Rasmussen WL, Waldschmidt M, Sajuthi D, Purcell RH, Davis HL, Krieg AM** (2000). Delineation of a CpG phosphorothioate oligodeoxynucleotide for

activating primate immune responses in vitro and in vivo. *J Immunol* 164(3):1617-1624.

Hasegawa Y, Tribble GD, Baker HV, Mans JJ, Handfield M, Lamont RJ (2008). Role of Porphyromonas gingivalis SerB in gingival epithelial cell cytoskeletal remodeling and cytokine production. *Infect Immun* 76(6): 2420-2427.

Hashimoto C, Hudson KL, Anderson KV (1988). The Toll gene of Drosophila, required for dorsal-ventral embryonic polarity, appears to encode a transmembrane protein. *Cell* 52(2): 269-279.

Haubek D, Ennibi OK, Poulsen K, Benzarti N, Baelum V (2004). The highly leukotoxic JP2 clone of Actinobacillus actinomycetemcomitans and progression of periodontal attachment loss. *J Dent Res* 83(10): 767-770.

Hayashi F, Smith KD, Ozinsky A, Hawn TR, Yi EC, Goodlett DR, Eng JK, Akira S, Underhill DM, Aderem A (2001). The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature* 410(6832): 1099-1103.

Hayflick L and Moorhead PS (1961). The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res* 25: 585-621.

Heil F, Hemmi H, Hochrein H, Ampenberger F, Kirschning C, Akira S, Lipford G, Wagner H, Bauer S (2004). Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. *Science* 303(5663): 1526-1529.

Hemmi H, Takeuchi O, Kawai T, Kaisho T, Sato S, Sanjo H, Matsumoto M, Hoshino K, Wagner H, Takeda K, Akira S (2000). A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* 408(6813): 740-745.

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

Hornung V, Rothenfusser S, Britisch S, Krug A, Jahrsdörfer B, Giese T, Endres S, Hartmann G (2002). Quantitative expression of toll-like receptor 1-10 mRNA in cellular subsets of human peripheral blood mononuclear cells and sensitivity to CpG oligodeoxynucleotides. *J Immunol* 168(9): 4531-4537.

Hoshino K, Takeuchi O, Kawai T, Sanjo H, Ogawa T, Takeda Y, Takeda K, Akira S (1999). Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the Lps gene product. *J Immunol* 162(7): 3749-3752.

Ibrahim HR, Kato A, Kobayashi K (1991). Antimicrobial effects of lysozyme against Gram-negative bacteria due to covalent binding of palmitic acid. *Journal of Agricultural and food Chemistry* 39(11): 2077-2082.

- Ishii KJ, Gursel I, Gursel M, Klinman DM** (2004). Immunotherapeutic utility of stimulatory and suppressive oligodeoxynucleotides. *Curr Opin Mol Ther* 6(2): 166-174.
- Kajita K, Honda T, Amanuma R, Domon H, Okui T, Ito H, Yoshie H, Tabeta K, Nakajima T, Yamazaki K** (2007). Quantitative messenger RNA expression of Toll-like receptors and interferon-alpha1 in gingivitis and periodontitis. *Oral Microbiol Immunol* 22(6): 398-402.
- Kang JG, Kim SH, Ahn TY** (2006). Bacterial diversity in the human saliva from different ages. *J Microbiol* 44(5): 572-576.
- Kaplan JB, Schreiner HC, Furgang D, Fine DH** (2002). Population structure and genetic diversity of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* strains isolated from localized juvenile periodontitis patients. *J Clin Microbiol* 40(4): 1181-1187.
- Kaufmann SH** (2007). The contribution of immunology to the rational design of novel antibacterial vaccines. *Nat Rev Microbiol* 5(7): 491-504.
- Kawai T, Adachi O, Ogawa T, Takeda K, Akira S** (1999). Unresponsiveness of MyD88-deficient mice to endotoxin. *Immunity* 11(1): 115-122.
- Kawai T and Akira S** (2007). TLR signaling. *Semin Immunol* 19(1): 24-32.
- Kawai T, Sato S, Ishii KJ, Coban C, Hemmi H, Yamamoto M, Terai K, Matsuda M, Inoue J, Uematsu S, Takeuchi O, Akira S** (2004). Interferon-alpha induction through Toll-like receptors involves a direct interaction of IRF7 with MyD88 and TRAF6. *Nat Immunol* 5(10): 1061-1068.
- Kerkmann M, Rothenfusser S, Hornung V, Tawarowski A, Wagner M, Sarris S, Giese T, Endres S, Hartmann G** (2003). Activation with CpG-A and CpG-B oligonucleotides reveals two distinct regulatory pathways of type I IFN synthesis in human plasmacytoid dendritic cells. *J Immunol* 170(9): 4465-4474.
- Kimbrell DA and Beutler B** (2001). The evolution and genetics of innate immunity. *Nat Rev Genet* 2(4): 256-267.
- Klinman DM, Zeuner R, Yamada H, Gursel M, Currie D, Gursel I** (2003). Regulation of CpG-induced immune activation by suppressive oligodeoxynucleotides. *Ann N Y Acad Sci* 1002: 112-123.
- Kobayashi K, Hernandez LD, Galán JE, Janeway CA Jr, Medzhitoc R, Flavell RA** (2002). IRAK-M is a negative regulator of Toll-like receptor signaling. *Cell* 110(2): 191-202.
- Krieg AM, Wu T, Weeratna R, Efler SM, Love-Homan L, Yang L, Yi AK, Short D, Davis HL** (1998). Sequence motifs in adenoviral DNA block immune

- activation by stimulatory CpG motifs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(21): 12631-12636.
- Krieg AM, Yi AK, Matson S, Waldschmidt TJ, Bishop GA, Teasdale R, Koretzky GA, Klinman DM** (1995). CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. *Nature* 374(6522): 546-549.
- Krug A, Rothenfusser S, Hornung V, Jahrsdörfer B, Blackwell S, Ballas ZK, Endres S, Krieg AM, Hartmann G** (2001). Identification of CpG oligonucleotide sequences with high induction of IFN-alpha/beta in plasmacytoid dendritic cells. *Eur J Immunol* 31(7): 2154-2163.
- Kurt-Jones EA, Popova L, Kwinn L, Haynes LM, Jones LP, Tripp RA, Walsh EE, Freeman MW, Golenbock DT, Anderson LJ, Finberg RW** (2000). Pattern recognition receptors TLR4 and CD14 mediate response to respiratory syncytial virus. *Nat Immunol* 1(5): 398-401.
- Latz E, Schoenemeyer A, Visintin A, Fitzgerald KA, Monks BG, Knetter CF, Lien E, Nilsen NJ, Espevik T, Golenbock DT** (2004). TLR9 signals after translocating from the ER to CpG DNA in the lysosome. *Nat Immunol* 5(2): 190-198.
- Latz E, Verma A, Visintin A, Gong M, Sirois CM, Klein DC, Monks BG, McKnight CJ, Lamphier MS, Duprex WP, Espevik T, Golenbock DT** (2007). Ligand-induced conformational changes allosterically activate Toll-like receptor 9. *Nat Immunol* 8(7): 772-779.
- Lawn SD** (2004). AIDS in Africa: the impact of coinfections on the pathogenesis of HIV-1 infection. *J Infect* 48(1): 1-12.
- Lee J, Mo JH, Katakura K, Alkalay I, Rucker AN, Liu YT, Lee HK, Shen C, Cajocaru G, Shenouda S, Kagnoff M, Eckmann L, Ben-Neriah Y, Raz E** (2006). Maintenance of colonic homeostasis by distinctive apical TLR9 signalling in intestinal epithelial cells. *Nat Cell Biol* 8(12): 1327-1336.
- Lemaitre B, Nicolas E, Michaut L, Reichhart JM, Hoffmann JA** (1996). The dorsoventral regulatory gene cassette *spatzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* 86(6): 973-983.
- Lenert P** (2005). Inhibitory oligodeoxynucleotides - therapeutic promise for systemic autoimmune diseases? *Clin Exp Immunol* 140(1): 1-10.
- Leppert U, Henke W, Huang X, Müller JM, Dubiel W** (2011). Post-transcriptional fine-tuning of COP9 signalosome subunit biosynthesis is regulated by the c-Myc/Lin28B/let-7 pathway. *J Mol Biol* 409(5): 710-721.
- Li X, Kolltveit KM, Tronstad L, Olsen I** (2000). Systemic diseases caused by oral infection. *Clin Microbiol Rev* 13(4): 547-558.

- Lipford GB, Heeg K, Wagner H** (1998). Bacterial DNA as immune cell activator. *Trends Microbiol* 6(12): 496-500.
- Liu SF and Malik AB** (2006). NF-kappa B activation as a pathological mechanism of septic shock and inflammation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 290(4): L622-L645.
- Lu Q, Darveau RP, Samaranayake LP, Wang CY, Jin L** (2009). Differential modulation of human β -defensins expression in human gingival epithelia by *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide with tetra- and penta-acylated lipid A structures. *Innate Immun* 15(6): 325-335.
- Mah TF and O'Toole GA** (2001). Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends Microbiol* 9(1): 34-39.
- Mahanonda R and Pichyangkul S** (2007). Toll-like receptors and their role in periodontal health and disease. *Periodontology* 2000 43(1): 41-55.
- Mahanonda R, Sa-Ard-lam N, Montreekachon P, Pimkhaokham A, Yongvanichit K, Fukuda MM, Pichyangkul S** (2007). IL-8 and IDO expression by human gingival fibroblasts via TLRs. *The Journal of Immunology* 178(2): 1151-1157.
- Marmur J** (1961). A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from micro-organisms. *Journal of Molecular Biology* 3(2): 208-218.
- Means TK, Wang S, Lien E, Yoshimura A, Golenbock DT, Fenton MJ** (1999). Human toll-like receptors mediate cellular activation by *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol* 163(7): 3920-3927.
- Medzhitov R and Janeway CA, Jr.** (1997). Innate immunity: impact on the adaptive immune response. *Curr Opin Immunol* 9(1): 4-9.
- Meng W, Yamazaki T, Nishida Y, Hanagata N** (2011). Nuclease-resistant immunostimulatory phosphodiester CpG oligodeoxynucleotides as human Toll-like receptor 9 agonists. *BMC Biotechnol* 11: 88.
- Nasidze I, Li J, Quingue D, Tang K, Stoneking M** (2009). Global diversity in the human salivary microbiome. *Genome Res* 19(4): 636-643.
- Nonnenmacher C, Dalpke A, Zimmermann S, Flores-De-Jacoby L, Mutters R, Heeg K** (2003). DNA from periodontopathogenic bacteria is immunostimulatory for mouse and human immune cells. *Infect Immun* 71(2): 850-856.
- Nonnenmacher C, Mutters R, de Jacoby LF** (2001). Microbiological characteristics of subgingival microbiota in adult periodontitis, localized juvenile periodontitis and rapidly progressive periodontitis subjects. *Clin Microbiol Infect* 7(4): 213-217.

- Nørskov-Lauritsen N and Kilian M** (2006). 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* 56(pt9): 2135-2146.
- O'Neill LA and Bowie AG** (2007). The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol* 7(5): 353-364.
- Ohkura N and Sakaguchi S** (2010). Regulatory T cells: roles of T cell receptor for their development and function. *Semin Immunopathol* 32(2): 95-106.
- Park B, Brinkmann MM, Spooner E, Lee CC, Kim YM, Ploegh HL** (2008). Proteolytic cleavage in an endolysosomal compartment is required for activation of Toll-like receptor 9. *Nat Immunol* 9(12): 1407-1414.
- Park EK, Jung HS, Yang HI, Yoo MC, Kim C, Kim KS** (2007). Optimized THP-1 differentiation is required for the detection of responses to weak stimuli. *Inflamm Res* 56(1): 45-50.
- Paturel L, Casalta JP, Habib G, Nezri M, Raoult D** (2004). *Actinobacillus actinomycetemcomitans* endocarditis. *Clin Microbiol Infect* 10(2): 98-118.
- Peltola VT and McCullers JA** (2004). Respiratory viruses predisposing to bacterial infections: role of neuraminidase. *Pediatr Infect Dis J* 23(1 Suppl): S87-97.
- Peter M, Bode K, Lipfarg GB, Eberle F, Heeg K, Dalpke AH** (2007). Characterization of suppressive oligodeoxynucleotides that inhibit Toll-like receptor-9-mediated activation of innate immunity. *Immunology* 123(1): 118-128.
- Pifer R, Benson A, Sturge CR, Yarovinsky F** (2011). UNC93B1 is essential for TLR11 activation and IL-12-dependent host resistance to *Toxoplasma gondii*. *J Biol Chem* 286(5): 3307-3314.
- Poltorak A, He X, Smirnova I, Liu MY, Van Huffel C, Du X, Birdwell D, Alejos E, Silva M, Galanos C, Freudenberg M, Ricciardi-Casatgnoli P, Layton B, Beutler B** (1998). Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in *Tlr4* gene. *Science* 282(5396): 2085-2088.
- Quinchia-Rios BH, Guerrero M, Abozeid S, Bainbridge B, Darveau R, Compton T, Bertics PJ** (2008). Down-regulation of epidermal growth factor receptor-dependent signaling by *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide in life-expanded human gingival fibroblasts. *J Periodontal Res* 43(3): 290-304.

- Regev-Yochay G, Dagan R, Raz M, Carmeli Y, Shainberg B, Rahav G, Derazne E, Rubinstein E** (2004). Association between carriage of *Streptococcus pneumoniae* and *Staphylococcus aureus* in Children. *JAMA* 292(6): 716-720.
- Rothman KJ and Greenland S** (2005). Causation and causal inference in epidemiology. *Am J Public Health* 95 Suppl 1: S144-150.
- Rudney JD, Chen R, Sedgewick GJ** (2005). *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, and *Tannerella forsythensis* are components of a polymicrobial intracellular flora within human buccal cells. *J Dent Res* 84(1): 59-63.
- Rutz M, Metzger J, Gellert T, Lupp P, Lipford GB, Wagner H, Bauer S** (2004). Toll-like receptor 9 binds single-stranded CpG-DNA in a sequence- and pH-dependent manner. *Eur J Immunol* 34(9): 2541-2550.
- Sahingur SE, Xia XJ, Alamgir S, Honma K, Sharma A, Schenkein HA** (2010). DNA from *Porphyromonas gingivalis* and *Tannerella forsythia* induce cytokine production in human monocytic cell lines. *Mol Oral Microbiol* 25(2): 123-135.
- Schacher B, Baron F, Rossberg M, Wohlfeil M, Arndt R, Eickholz P** (2007). *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* as indicator for aggressive periodontitis by two analysing strategies. *J Clin Periodontol* 34(7): 566-573.
- Scheres N, Laine ML, Sipos PM, Bosch-Tijhof CJ, Crielaard W, de Vries TJ, Everts V** (2011). Periodontal ligament and gingival fibroblasts from periodontitis patients are more active in interaction with *Porphyromonas gingivalis*. *J Periodontal Res* 46(4): 407-416.
- Schnare M, Holt AC, Takeda K, Akira S, Medzhitov R** (2000). Recognition of CpG DNA is mediated by signaling pathways dependent on the adaptor protein MyD88. *Curr Biol* 10(18): 1139-1142.
- Schwandner R, Dziarski R, Wesche H, Rothe M, Kirschning CJ** (1999). Peptidoglycan- and lipoteichoic acid-induced cell activation is mediated by toll-like receptor 2. *J Biol Chem* 274(25): 17406-17409.
- Shahriar M, Haque MR, Kabir S, Dewan I, Bhuyian MA** (2011). Effect of Proteinase-K on Genomic DNA Extraction from Gram-positive Strains. *Stamford Journal of Pharmaceutical Sciences* 4(1): 53-57.
- Skaug B, Jiang X, Zhen ZJ** (2009). The role of ubiquitin in NF-kappaB regulatory pathways. *Annu Rev Biochem* 78: 769-796.
- Smiley ST, King JA, Hancock WW** (2001). Fibrinogen stimulates macrophage chemokine secretion through toll-like receptor 4. *J Immunol* 167(5): 2887-2894.

- Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent RL Jr** (1998). Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol* 25(2): 134-144.
- Sun R, Sun L, Bao M, Zhang Y, Wang L, Wu X, Hu D, Liu Y, Yu Y, Wang L** (2010). A human microsatellite DNA-mimicking oligodeoxynucleotide with CCT repeats negatively regulates TLR7/9-mediated innate immune responses via selected TLR pathways. *Clin Immunol* 134(3): 262-276.
- Taams LS and Akbar AN** (2005). Peripheral generation and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Curr Top Microbiol Immunol* 293: 115-131.
- Takeda K and Akira S** (2005). Toll-like receptors in innate immunity. *Int Immunol* 17(1): 1-14.
- Takeshita A, Imai K, Hanazawa S** (1999). CpG motifs in *Porphyromonas gingivalis* DNA stimulate interleukin-6 expression in human gingival fibroblasts. *Infect Immun* 67(9): 4340-4345.
- Takeshita F, Suzuki K, Sasaki S, Ishii N, Klinman DM, Ishii KJ** (2004). Transcriptional regulation of the human TLR9 gene. *J Immunol* 173(4): 2552-2561.
- Takeuchi O and Akira S** (2010). Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell* 140(6): 805-820.
- Takeuchi O, Kawai T, Mühlradt PF, Morr M, Radolf JD, Zychlinski A, Takeda K, Akira S** (2001). Discrimination of bacterial lipoproteins by Toll-like receptor 6. *Int Immunol* 13(7): 933-940.
- Takeuchi O, Sato S, Horiuchi T, Hoshino K, Takeda K, Dong Z, Modlin RL, Akira S** (2002). Cutting edge: role of Toll-like receptor 1 in mediating immune response to microbial lipoproteins. *J Immunol* 169(1): 10-14.
- Taubman MA and Kawai T** (2001). Involvement of T-lymphocytes in periodontal disease and in direct and indirect induction of bone resorption. *Crit Rev Oral Biol Med* 12(2): 125-135.
- Teixeira RE, Mendes EN, Rogue de Carvalho MA, Nicoli JR, Farias Lde M, Magalhaes PP** (2006). *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotype-specific genotypes and periodontal status in Brazilian subjects. *Can J Microbiol* 52(3):182-188.
- Toshchakov V, Jones BW, Perera PY, Thomas K, Cody MJ, Zhang S, Williams BR, Major J, Hamilton TA, Fenton MJ, Vogel SN** (2002). TLR4, but not TLR2, mediates IFN-beta-induced STAT1alpha/beta-dependent gene expression in macrophages. *Nat Immunol* 3(4): 392-398.
- Trieu A, Roberts TL, Dunn JA, Sweet MJ, Stacey KJ** (2006). DNA motifs suppressing TLR9 responses. *Crit Rev Immunol* 26(6): 527-544.

- Trinchieri G and Sher A** (2007). Cooperation of Toll-like receptor signals in innate immune defence. *Nat Rev Immunol* 7(3): 179-190.
- Tsuchiya S, Yamabe M, Yamaguchi Y, Kobayashi Y, Konno T, Tada K** (1980). Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1). *Int J Cancer* 26(2): 171-176.
- Uehara A and Takada H** (2007). Functional TLRs and NODs in human gingival fibroblasts. *J Dent Res* 86(3): 249-254.
- Vabulas RM, Ahmad-Nejad P, ghose S, Kirschning CJ, Issels RD, Wagner H** (2002). HSP70 as endogenous stimulus of the Toll/interleukin-1 receptor signal pathway. *J Biol Chem* 277(17): 15107-15112.
- Van de Veerdonk FL, Netea MG, Jansen TJ, Jacobs L, Verschueren I, Van der Meer JW, Kullberg BJ** (2008) Redundant role of TLR9 for anti-Candida host defense. *Immunobiology* 213(8): 613-620.
- Van Dyke TE** (2008). The management of inflammation in periodontal disease. *J Periodontol* 79(8 Suppl): 1601-1608.
- Viglianti GA, Lau CM, Hanley TM, Miko BA, Shlomchik MJ, Marshak-Rothstein A** (2003). Activation of autoreactive B cells by CpG dsDNA. *Immunity* 19(6): 837-847.
- Vollmer J, Weeratna R, Payette P, Jurk M, Schetter C, Laucht M, Wader T, Tluk S, Liu M, Davis HL, Krieg AM** (2004). Characterization of three CpG oligodeoxynucleotide classes with distinct immunostimulatory activities. *Eur J Immunol* 34(1): 251-262.
- Wagner H** (2004). The immunobiology of the TLR9 subfamily. *Trends Immunol* 25(7): 381-386.
- Wald D, Qin J, Zhao Z, Qian Y, Naramura M, Tian L, Towne J, Sims JE, Stark GR, Li X** (2003). SIGIRR, a negative regulator of Toll-like receptor-interleukin 1 receptor signaling. *Nat Immunol* 4(9): 920-927.
- Wang L, Jiang W, Ding G, Cao H, Lu Y, Luo P, Zhou H, Zheng J** (2007). The newly identified CpG-N ODN208 protects mice from challenge with CpG-S ODN by decreasing TNF-alpha release. *Int Immunopharmacol* 7(5): 646-655.
- Watters TM, Kenny EF, O'Neill LA** (2007). Structure, function and regulation of the Toll/IL-1 receptor adaptor proteins. *Immunol Cell Biol* 85(6): 411-419.
- Wenner CA, Guler ML, Macatonia SE, O'Garra A, Murphy KM** (1996). Roles of IFN-gamma and IFN-alpha in IL-12-induced T helper cell-1 development. *J Immunol* 156(4): 1442-1447.
- 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** (2001). Leptospiral lipopolysaccharide activates cells through a TLR2-dependent mechanism. *Nat Immunol* 2(4): 346-352.
- Wyllie DH, Kiss-Toth E, Visintin A, Smith SC, Boussof S, Segal DM, Duff GW, Dower SG** (2000). Evidence for an accessory protein function for Toll-like receptor 1 in anti-bacterial responses. *J Immunol* 165(12): 7125-7132.
- Yamamoto M, Sato S, Hemmi H, Hoshino K, Kaisho T, Sanjo H, Takeuchi O, Sugiyama M, Okabe M, Takeda K, Akira S** (2003). Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway. *Science* 301(5633): 640-643.
- Yamamoto M, Sato S, Hemmi H, Sanjo H, Uematsu S, Kaisho T, Hoshino K, Takeuchi O, Kobayashi M, Fujita T, Takeda K, Akira S** (2002). Essential role for TIRAP in activation of the signalling cascade shared by TLR2 and TLR4. *Nature* 420(6913): 324-329.
- Yang HW, Asikainen S, Dogan B, Suda R, Lai CH** (2004). Relationship of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotype b to aggressive periodontitis: frequency in pure cultured isolates. *J Periodontol* 75(4): 592-599.
- Yasuda K, Yu P, Kirschning CJ, Schlatter B, Schmitz F, Heit A, Bauer S, Hochrein H, Wagner H** (2005). Endosomal translocation of vertebrate DNA activates dendritic cells via TLR9-dependent and -independent pathways. *J Immunol* 174(10): 6129-6136.

7.2 Dissertationen

Rutz MA (2004): Biochemische Charakterisierung von Toll-like Rezeptor 9 und Nachweis der direkten Interaktion mit dem Liganden bakterielle CpG-DNA.

Müller TC (2008): Biochemische Analyse von Toll-like Rezeptor 9.

Peter M (2009): Strukturelle und funktionelle Untersuchungen zur Ligandenerkennung von Toll-like Rezeptor 9.

Lindemeier D (2008): Etablierung und Evaluierung von molekularbiologischen Testsystemen zur in-vitro und in-vivo Charakterisierung von neuartigen Implantatmaterialien.

Gallauner S (2009): THP-1 Zellen als Modell für Phagozytose.

7.3 Bücher

Brogden K und Guthmiller, J: Polymicrobial diseases. ASM Press, Washington (DC) 2002.

Burkhardt F: Mikrobiologische Diagnostik. Thieme-Verlag, Stuttgart 1992.

Dörries R, Hof H: Medizinische Mikrobiologie. 3., komplett überarb. und erw. Auflage. Thieme-Verlag, Stuttgart 2005.

Karow T und Lang-Roth R: Allgemeine und Spezielle Pharmakologie und Toxikologie. 18. Auflage, 2010.

Lindhe J: Clinical Periodontology and Implant Dentistry. 5. Auflage. Blackwell Munksgaard, 2008.

Luttmann W, Bratke K, Küpper M, Myrtek D: Der Experimentator Immunologie. 3. Auflage. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg 2009.

Murphy K, Travers P, Walport M: Janeway Immunologie. 7. Auflage. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg 2009.

Mülhardt C: Der Experimentator Molekularbiologie/Genomics. 5. Auflage. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg 2006.

Müller HP: Checklisten der Zahnmedizin: Parodontologie. 2., aktual. und erw. Auflage. Thieme-Verlag, Stuttgart 2006.

Sanderink R, Bernhardt H, Knoke M et al.: Curriculum Orale Mikrobiologie und Immunologie. Quintessenz-Verlags GmbH, Berlin 2004.

Schütt C und Bröker B: Grundwissen Immunologie. 2. Auflage. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg 2009.

Vollmar A und Dingermann, T: Immunologie Grundlagen und Wirkstoffe. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart 2005.

Welsch U: Lehrbuch Histologie. 2. Auflage. Urban & Fischer Verlag, Elsevier GmbH, München 2005.

8 Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren die Damen und Herren

In Marburg:

Aigner, Alter, Arabin, Aumüller, Bahr, Barth, Bartsch, Basler, Bauer, Baum, Becker, Benes, Berger, Boeckhoff, Bölöni, Büch, Bücking, Burbelko, Burchert, Cetin, Czubayko, Daut, Del Rey, Dietrich, Dodel, Donner-Banzhoff, Droutsas, Eickmann, Ellenrieder, Fendrich, Feuser, Figiel, Frangen, Fuchs-Winkelmann, Gebhardt, Geks, Goeze, Görg, Gress, Grundmann, Grzeschik, Hasilik, Hegele, Heverhagen, Hinterseher, Höffken, Hoffmann, Holst, Hoyer, Jerrentrup, Josephs, Kann, Kanngießer, Kaufmann, Kerwat, Kill, Kircher, Klose, Koehler, Koolman, Krüger, Kühne, Kühnert, Langer, Lill, Löffler, Lohoff, Maier, Maisch, Maisner, Maurer, Meyer, Milani, Mittag, Moll, Moosdorgf, Mueller, Mutters, Neubauer, Neumüller, Nimphius, Nockher, Noutsias, Oberkircher, Oertel, Olbert, Pagenstecher, Pieper, Post, Preisig-Müller, Ramaswamy, Renz, Richter, Risse, Roeper, Röhm, Rolfes, Rosenow, Ruchholtz, Rustemeier, Sahmland, Schäfer, Schäfer, Schmidt, Schnare, Schneider, Schu, Schulze, Seitz, Sekundo, Sevinc, Sierra, Sohlbach, Steiniger, Teymoortash, Verhoff, Vogelmeier, Vogt, von Löw, Wagner, Waldegger, Weihe, Werner, Westermann, Wollmer, Wrocklage, Wulf, Yu, Zettl

In Siegen:

Brähler, Dölken, Franz, Gassmann, Hering, Marczyńska-Franczak, Schäfer, Schuster, Willeke

In Berlin:

Arastéh, Grunert, Lingesleben, Mackert, Mecke, Moslener, Schlieder

9 Danksagung

Herrn Prof. Dr. Michael Lohoff danke ich für die Möglichkeit, diese Arbeit an seinem Institut anfertigen zu dürfen.

Vielen Dank an Herrn Prof. Dr. Reinier Mutters für die Aufnahme in seine Abteilung und die Überlassung des Dissertationsthemas. Seinen Einsatz und sein Interesse an dieser Arbeit weiß ich sehr zu schätzen und danke ihm für die Übernahme der Erstkorrektur.

Für die ausgezeichnete Betreuung und Begleitung bedanke ich mich bei Frau Dr. med. dent. Claudia Nonnenmacher, die mich mit großem Sachverstand, konstruktiver Kritik und Interesse am Fortschreiten der Arbeit durch dieses Projekt geführt hat.

Danken möchte ich weiterhin Herrn Prof. Dr. Stefan Bauer für die vielen nützlichen Ideen und Anregungen zu dieser Arbeit.

Ein großer Dank gilt außerdem Herrn Dr. Alexander Višekruna. Mit viel Zeit und Geduld hat er vor allem in der Endphase des Projektes unentbehrliche Anregungen und Ratschläge geleistet und somit entscheidend zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Herrn Dr. Hartmann Raifer danke ich für seine wissenschaftliche und tatkräftige Unterstützung im Rahmen der durchflusszytometrischen Analysen und immunhistochemischen Färbungen.

Bei Herrn Dr. Andreas Kaufmann und Prof. Dr. Markus Schnare bedanke ich mich für die Bereitstellung der HEK-293 bzw. der THP-1 Zelllinien sowie diverser Antikörper und Reagenzien für die Versuche. Beide waren mit ihren Ratschlägen und ihrer Bereitschaft zur Diskussion eine große Hilfe.

Ein ganz besonderes Dankeschön spreche ich Helene Bykow und Claudia Trier aus. Sie haben mich herzlich in der AG Prof. Dr. Mutters aufgenommen und waren mir von der ersten Stunde an nicht nur in technischer, sondern auch menschlicher Hinsicht zu jeder Zeit eine große Stütze und hatten immer ein offenes Ohr für mich und meine Fragen. Eure Herzlichkeit und aufopferungsvolle Hilfsbereitschaft waren stets eine große Motivation für mich und gaben mir den nötigen Aufschwung.

Allen Postdocs, Doktoranden, Bachelor-Studenten und medizinisch-technischen Assistentinnen der AG Prof. Dr. Lohoff sei an dieser Stelle für die gute Arbeitsatmosphäre im Labor sowie die zahlreichen Erklärungen und hilfreichen Antworten auf meine Fragen gedankt.

Frau Rosel Lange möchte ich danken, die mir bei der Formatierung des Manuskriptes eine unermüdliche und wertvolle Hilfe war.

Schließlich möchte ich mich von Herzen bei meinen Eltern bedanken, ohne die ein Studium oder eine Doktorarbeit so niemals möglich gewesen wären. Danke, dass ihr immer an mich geglaubt und mich in jeglicher Hinsicht unterstützt habt.

10 Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin der Philipps Universität Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel

**„Zur Pathogenese polymikrobieller Infektionen
am Beispiel der Parodontitis“**

am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Reinier Mutters selbstständig und ohne unzulässige Hilfe Dritter durchgeführt, mich bei der Abfassung der Arbeit keiner anderen als der in der Dissertation aufgeführten Quellen und Hilfsmittel bedient und die den benutzten Werken wörtlich und inhaltlich entnommenen Stellen entsprechend gekennzeichnet 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.

Marburg 2013

Donatha Plag

