

**Expression der Toll-like-Rezeptoren 2/4 und deren
Signalmoleküle auf oralen
Plattenepithelkarzinomzellen**

Inauguraldissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Zahnmedizin

des Fachbereichs Medizin

der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

Alexander Weber

aus Gießen

Gießen 2022

Aus dem Fachbereich Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

**Poliklinik für Parodontologie des Zentrums für Zahn-, Mund und
Kieferheilkunde**

Gutachter: Prof. Dr. Meyle

Gutachter: Prof. Dr. Wittekindt

Tag der Disputation: 19.09.2022

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung.....	1
2 Wissenschaftliche Grundlagen	2
2.1 Parodontitis	2
2.2 <i>Porphyromonas gingivalis</i>	5
2.3 Zusammenhänge zwischen Tumoren und Entzündung	11
2.4 Das orale Plattenepithelkarzinom	13
2.5 Toll-like Rezeptoren (TLRs) und ihre Signalmoleküle	15
2.5.1 Toll-like Rezeptor 2.....	15
2.5.2 Toll-like Rezeptor 4.....	16
2.5.3 IRAK-1	19
3 Ziele der Studie.....	22
4. Materialien und Methoden	26
4.1 Anzucht der Zellen und Kultur der verschiedenen Zelllinien	26
4.2 Stimulation der Zellen mit Rezeptor-Agonisten.....	28
4.3 Analyse mittels Western-Blot.....	29
4.4 Analyse im Durchflusszytometer.....	31
5 Ergebnisse.....	33
5.1 Durchflusszytometrie	33
5.1.1 Expression von IRAK1 in IHGK	33
5.1.2 Expression von IRAK1 in SCC-25	35
5.1.3 Expression von TLR2 auf SCC-25.....	37
5.1.4 Expression von TLR2 auf IHGK.....	39
5.1.5 Expression von TLR4 auf IHGK.....	41
5.1.6 Expression von TLR4 auf SCC-25.....	43
5.2 Western-Blot	45
5.2.1 IRAK1-Expression in SCC-25 bei Inhibierung von TLR2.....	45
5.2.2 IRAK1-Expression in SCC-25 bei Inhibierung von TLR4.....	46
5.2.3 IRAK1-Expression in IHGK.....	47
5.2.4 TLR2-Expression auf SCC-25	48
5.2.5 TLR2-Expression auf IHGK	49

5.2.6 TLR4-Expression auf SCC-25	50
5.2.7 TLR4-Expression auf IHGK	51
6. Diskussion	52
7. Zusammenfassung	62
8. Summary	64
9. Abkürzungsverzeichnis	66
10. Abbildungsverzeichnis	70
11. Tabellenverzeichnis	72
12. Literatur	73
13. Anhang	94
14. Ehrenwörtliche Erklärung	96
15. Danksagung	97
16. Lebenslauf	Fehler! Textmarke nicht definiert.

1 Einleitung

Seit über 5000 Jahren ist die Parodontitis der Menschheit als Krankheitsentität bekannt [1]. Heutzutage gehören parodontale Erkrankungen zu den am häufigsten vorkommenden Volkskrankheiten. Zwar ist die Prävalenz entsprechend der aktuellen deutschen Mundgesundheitsstudie (DMS V) abnehmend. Die demografische Entwicklung und die Zunahme chronischer Munderkrankungen im höherem Lebensalter erfordern einen erhöhten Therapiebedarf. Zurzeit leiden circa 65% der jüngeren Senioren an einer parodontalen Erkrankung, bei den 75- bis 100-jährigen sind neun von zehn Menschen betroffen [2].

In aller Regel ist die Parodontitis eine progrediente Erkrankung, wobei die zugrundeliegenden Mechanismen bis zum heutigen Zeitpunkt nicht vollständig geklärt sind, jedoch scheint unter anderem *Porphyromonas gingivalis*, ein gramnegatives anaerobes Bakterium, das in der Mundhöhle vorkommt, eine Schlüsselrolle bei der Entstehung zu spielen [3-5].

Schon in der Mitte des 19. Jahrhunderts hat Rudolf Virchow auf den Zusammenhang zwischen entzündlichen Geschehen und Tumoren hingewiesen [6, 7]. Mittlerweile hat sich diese Theorie für eine Vielzahl von Malignomen bestätigt [8-10]. In der Umgebung von chronisch entzündetem Gewebe akkumulieren Chemokine, Zytokine, Prostaglandine und freie Radikale und haben bei Persistenz die Fähigkeit, Zellproliferation zu induzieren und über die Aktivierung von Onkogenen bzw. Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen den Zellzyklus zu beeinflussen. Dies kann zu einer genetischen Instabilität führen und somit die Entstehung eines Karzinoms begünstigen [10, 11]. Epidemiologische Studien haben auf einen Zusammenhang zwischen Parodontitis und oralem Plattenepithelkarzinom hingewiesen [12-15].

Bei der Induktion von Entzündungsreaktionen und der Erkennung von Fremdkörpern sind die Toll-like-Rezeptoren (TLR) 2, 4 und deren Signalmolekül Interleukin-1-Rezeptor-assoziierte Kinase 1 (IRAK1) beteiligt.

Die Zielsetzung der hier vorgelegten Studie war es zu klären, ob die TLRs 2, 4 und IRAK1 in oralen malignen und nicht-malignen Epithelzellen exprimiert sind und welchen Effekt eine Infektion mit Komponenten des Parodontalpathogens *P. gingivalis* auf die Expression ausübt. Die Ergebnisse dieser Studie sollten weitere

Einblicke geben, inwieweit die genannten Rezeptoren und Signalmoleküle eine Rolle bei Parodontopathien, bzw. oralen Entzündungen spielen. Hierzu wurde die Expression der TLRs 2, 4 und deren Signalmolekül IRAK1 auf einer oralen Plattenepithelkarzinomzelllinie sowie immortalisierten humanen gingivalen Keratinozyten vor und nach Stimulation mit deren Agonisten und nach Infektion mit der Membranfraktion von *Porphyromonas gingivalis* nachgewiesen. In einem weiteren Schritt wurde die Modifikation der Expression von IRAK1 nach Zugabe eines Inhibitors gegen TLR2 und TLR4 gezeigt.

2 Wissenschaftliche Grundlagen

2.1 Parodontitis

Pierre Fauchard schrieb in der 2. französischen Auflage von Le Chirurgien Dentiste 1746 erstmalig über die Parodontitis marginalis (Alveolarpyorrhoe) und diskutierte über Ätiologie und Behandlungsmodalitäten [16]. Parodontitis ist eine chronisch entzündliche Erkrankung des Zahnhalteapparats, die eine destruktive Immunantwort auslöst und zur Zerstörung von zahntragendem Gewebe, einschließlich der Gingiva, des parodontalen Ligaments und des Alveolarknochens, führt. Die klinischen Merkmale einer anhaltenden Parodontitis sind Zahnfleischbluten, tiefe Parodontaltaschen, Attachmentverlust und Zahnbeweglichkeit, die bei weiterem Fortschreiten zu Zahnverlust führen kann [17]. In Entwicklungsländern ist die Prävalenz der Parodontitis im Vergleich zu Industrieländern erhöht [18].

In den letzten 30 Jahren wurde die Klassifikation immer wieder revidiert. Um den großen Wissenszuwachs gerecht zu werden, wurde auf dem 2017er- „World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions“ in Chicago ein neues Rahmenwerk zur Klassifikation der Parodontitis entwickelt [19].

Aktuell wird zwischen drei Formen unterschieden: Parodontitis, nekrotisierende Parodontitis und Parodontitis als Manifestation systemischer Erkrankungen [20, 21].

Des Weiteren gibt es die Neuerung, Parodontitis im Rahmen eines multidimensionalen „Staging and Grading“-Systems näher zu unterteilen. Hierbei

bezieht sich Staging auf das Stadium der Erkrankung und ist abhängig vom Schweregrad der Infektion und von der Komplexität der Behandlung. Das Staging ist in vier Kategorien unterteilt (Stadium I bis IV). Die Einordnung erfolgt über die klinischen und röntgenologischen Befunde. Hierzu zählen klinischer Attachmentverlust, röntgenologischer Knochenabbau, Sondierungstiefen, vertikale Defekte, Furkationsbeteiligung, Zahnbeweglichkeit und Zahnverluste aufgrund von Parodontitis.

Grading, also der Grad der Erkrankung, beinhaltet zusätzliche Informationen bezüglich der Krankheitsprogression und weiterer Risiken. Das Grading der Parodontitis ist in drei Kategorien unterteilt. Grad A bedeutet niedriges Risiko, Grad B mittleres Risiko und Grad C hohes Risiko für die Krankheitsprogression. Das Grading wird auch durch Faktoren wie Rauchen oder der metabolischen Kontrolle eines Diabetes mellitus bestimmt [19, 22].

Die Parodontitis hat einen multifaktoriellen Ursprung, wobei die Hauptursache der bakterielle Biofilm ist, der sich auf den Zahnoberflächen befindet [23-25]. Loe et al. 1965 bestätigte in ihrer bahnbrechenden Studie: "Experimentelle Gingivitis beim Menschen" die Rolle von Zahnplaque bei der Entstehung von Zahnfleisch- und Parodontalerkrankungen. Innerhalb einer Zeitspanne von 7 bis 21 Tagen nach Absetzen der Mundhygienemaßnahmen kommt es zur Entwicklung einer Gingivitis. Diese Entwicklung der Gingivitis ist ein reversibler Prozess innerhalb von 7 bis 10 Tagen nach Wiederherstellung der Mundhygienemaßnahmen [26]. Biofilme sind komplexe Gemeinschaften von Mikroorganismen. In der Mundhöhle entsteht Zahnplaque, ein Biofilm der sich auf den Oberflächen der Zähne und der Schleimhaut befindet und in dem mehr als 1200 Bakterienarten nachgewiesen wurden [27]. Ein Großteil dieser Mikroorganismen sind kommensale Bakterien der oropharyngealen Normalflora, mit einem meist geringen Anteil pathogener vertreten. Die Keime sind von einer schützenden Matrix, bestehend aus extrazellulären Polysacchariden und Glykoproteinen umgeben [28]. Dieser Schutzmechanismus des dentalen Biofilms macht ihn 1000- bis 1500-mal widerstandsfähiger gegen antimikrobielle Wirkstoffe [5].

Eine weitere Fähigkeit zwischen den Mikrokolonien der Bakterien, bekannt als "Quorum Sensing", ist die Möglichkeit die Zelldichte zu ermitteln und darauf durch Genregulation zu reagieren. Dies resultiert in der Bildung vorteilhafter Phänotypen [29].

Der Biofilm bietet physikalischen Schutz und einen Sauerstoffgradienten der das Wachstum anaerober Spezies begünstigt. Die verschiedenen im Biofilm vorhandenen Kreislaufkanäle unterstützen die Verteilung vieler Nährstoffe und die Ausscheidung der anfallenden Stoffwechselschlacken. Weiterhin können innerhalb eines Biofilms Stoffwechselnebenprodukte einer Spezies von anderen Spezies, in einem als Crossfeeding bezeichneten Prozess, als Nährstoffe verwendet werden [27, 30].

Studien von Theilade et al. 1966 zeigten die bakteriologischen Grundlagen auf, die für die Verschiebung der grampositiven Bakterienpopulation zu einer vorherrschenden gramnegativen Bakterienpopulation, die mit Parodontitis assoziiert ist, verantwortlich sind [31].

Die Komplextheorie nach Socransky teilt die parodontopathogenen Bakterien je nach Eigenschaften und Pathogenität in verschieden farbige Komplexe ein, welche in wechselseitigen Beziehungen zueinander stehen um eine geeignete Lebensgrundlage zu schaffen. Hierbei wird zwischen den Frühkolonisierer, grün- und orange-assoziiierter Komplex mit moderater Pathogenität, einer Brückenspezies, oranger Komplex, und den Spätkolonisierern, roter Komplex und Aa-Komplex, unterschieden [25].

Das Gleichgewicht des oralen Mikrobioms ist äußerst bedeutend für die Aufrechterhaltung der oralen und systemischen Gesundheit. Wird dieses Gleichgewicht gestört kann es zu dem Zustand einer Dysbiose kommen [32]. Neure Untersuchungen von Hajishengallis und Lamont führten zur Theorie die als polymikrobielle Synergie und Dysbiose bekannt wurde. Diese besagt, dass Parodontitis durch eine synergistische polymikrobielle Gemeinschaft initiiert wird. Dabei wirken innerhalb der bakteriellen Gemeinschaft verschiedene Spezies zusammen um ein stabiles dysbiotisches, pathogenes Mikrobiom zu etablieren [33].

Zusätzlich spielen Genetik, Umwelteinflüsse, systemische Gesundheit des Patienten und dessen Lebensgewohnheiten wie zum Beispiel Nikotinabusus, schlechte Mundhygiene oder Ernährung bei der Entstehung einer Parodontitis eine Rolle [23]. Vor jeder Parodontitis steht die Gingivitis, jedoch nicht jede Gingivitis entwickelt sich zu dem Krankheitsbild der Parodontitis, da dies von den oben genannten spezifischen Faktoren des Wirts abhängt [23].

Die schädlichen Auswirkungen von parodontalpathogenen Keimen sind nicht auf

das Parodont beschränkt, sondern können sich auch negativ auf die systemische Gesundheit des Patienten auswirken [34]. Verschiedene Studien deuten auf einen möglichen Zusammenhang zwischen Parodontitis und Diabetesrisiko, rheumatoide Arthritis, Arteriosklerose, Bluthochdruck und Alzheimer-Krankheit hin [35-42].

2.2 *Porphyromonas gingivalis*

Porphyromonas gingivalis (*P. gingivalis*, *P.g.*) ist ein gramnegatives anaerobes Bakterium, welches in der Mundhöhle vorkommt und die Entstehung einer Parodontitis begünstigen kann [3, 4]. Hierbei scheint *P. gingivalis* laut Hajishengallis et al., 2012 (Keystone-Pathogen Hypothese) eine Schlüsselrolle zu spielen. Aktuelle Studien zeigen, dass *Porphyromonas gingivalis* alleine in keimfreien Mäusen keine Parodontitis auslösen kann. Allerdings geht man davon aus, dass *P. gingivalis* zusammen mit anderen Keimen eine Umwandlung des oralen Mikrobioms von einer symbiotischen Gemeinschaft in eine dysbiotische Gemeinschaft einleitet, die eine destruktive parodontale Entzündung auslösen kann (Hajishengallis et al. 2011).

Dieses Pathogen hat die Fähigkeit in orale Epithel- und Endothelzellen einzudringen, und es kann die Produktion von pro-inflammatorischen Zytokinen durch neutrophile Granulozyten, Monozyten und Makrophagen induzieren [43-45]. *P. gingivalis* kann Immunzellen *in vitro* und *in vivo* desensibilisieren [46, 47].

Interaktion *Porphyromonas gingivalis* mit Epithel- und Immunzellen

Epithelzellen, die die Mundschleimhaut auskleiden, dienen als Barriere gegenüber bakteriellen Angriffen und verhindern als Teil des Abwehrsystems die Invasion in tiefere Gewebsschichten [48]. Es wurde gezeigt dass *P. gingivalis in vitro* die Fähigkeit besitzt, in Epithelzellen, Fibroblasten und desmodontale Zellen einzudringen und damit die Epithelbarriere zu durchbrechen [49, 50]. Viele bakterielle Pathogene sind dafür bekannt, dass sie in nicht-phagozytierende Zellen eindringen. Die Invasion kommt durch zelluläre Aktin-Umordnung zustande, welche durch spezifische Interaktionen zwischen bakteriellen Liganden und Zell-Oberflächenrezeptoren induziert wird [51]. In mehreren Studien wurden Lipid-Rafts der Plasmamembran als bakterielle Eintrittspforte

angenommen [52, 53]. Lipid-Rafts sind Membran-Subdomänen, die reich an Cholesterin, Sphingolipiden und spezifischen Membranproteinen wie Glykosylphosphatidylinositol-Anker und Caveolae sind. Caveolae sind sackförmige Einbuchtungen der Plasmamembran, die in Cholesterin-Homöostase, Endozytose und Zellkommunikation involviert sind [54]. *P. gingivalis* setzt extrazellulär Membranstrukturen frei, die alle Bestandteile der Membran besitzen (Proteine, Peptidoglykane und Fimbrien) [55, 56]. Es exprimiert eine Reihe adhäsiver Komponenten wie Fimbrien, Proteasen (Gingipaine), Hämagglutinine und Lipopolysaccharide (LPS) [57]. Zudem besitzt es die Fähigkeit, Abwehrmechanismen zu inhibieren, unter anderen die IL-8-Sekretion von Epithelzellen [58-62]. Dieses Phänomen wird als lokale Chemokin-Paralyse bezeichnet. Durch diesen Virulenzmechanismus kann der IL-8-Gradient im gesunden Gewebe verringert werden, was die Einwanderung von neutrophilen Granulozyten in das parodontale Gewebe beeinträchtigt [58]. Die Phosphoserin-Phosphatase (SerB), ein Enzym das von *P. gingivalis* produziert wird, scheint hierbei eine Rolle zu spielen [63]. Die Synthese von SerB wird bei Kontakt mit Epithelzellen induziert [64]. *P. gingivalis* besitzt als Bestandteil der Lipopolysaccharide der äußeren Membran Lipid A, welche als TLR4-Antagonist wirkt und somit die Immunantwort umgehen kann [65, 66]. Die Struktur von Lipid A in *P. gingivalis* ist heterogen [67-69]. Eine 5-Acyl-Monophosphatstruktur ist ein schwacher TLR4 Agonist während eine 4-Acyl-Monophosphat Struktur ein TLR4-Antagonist ist [69]. Welche der beiden Varianten von Lipid A exprimiert wird, kann durch die Häminkonzentration im Kulturmedium reguliert werden. Vermutlich sind Lipid-A-Phosphatasen daran beteiligt [70, 71]. Es wurde gezeigt, dass der TLR4-Antagonist in einem humanen *in vitro*-Gingiva-Epithelzellkulturmodell zu einer verminderten Expression von β -Defensin führt und die Unterbrechung des epidermalen Wachstumsfaktor-abhängigen Signalwegs induziert, welcher bei der Regeneration des parodontalen Gewebes eine Rolle spielt [72-76]. In Makrophagen induziert *P. gingivalis* die Rekrutierung und Ko-Assoziation von Lipid-Rafts, TLR2 und zwei G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (dem CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 4 und dem C5a-Rezeptor). Dies induziert eine anhaltend hohe Konzentration von cyclischem Adenosinmonophosphat (cAMP) [75, 76]. Das Bakterium ist selbst in der Lage, durch eine C5-Konvertase ähnliche enzymatische Aktivität, vermittelt durch Arginin-spezifische Zystein-Proteinasen

(RgpA Gingipain), C5a abzuspalten [76]. Zusätzlich kann *P. gingivalis* CXCR4 direkt durch seine Fimbrien aktivieren, ohne dass CXCL12 als Ligand benötigt wird [75]. Die Aktivierung von TLR2 durch *P. gingivalis* allein verursacht nur eine leichte Erhöhung des cAMP-Spiegels, während eine alleinige Aktivierung von CXCR4 oder C5aR keine Veränderung des cAMP-Spiegels bewirkt. Wenn durch *P. gingivalis* aktivierter TLR2 mit aktivierten C5aR und CXCR4 interagiert, kommt es zu einem synergistischen Effekt. Dies führt zu einer Steigerung der Aktivität der Proteinkinase A, welche die Glykogensynthase-Kinase 3 β inaktiviert, und damit zur Induktion der von Stickstoffmonoxid-Synthase abhängigen Tötung von Bakterien *in vitro* und *in vivo* [75, 76]. TLR2 kann sowohl mit C5aR als auch mit CXCR-4 interagieren, um diesen Effekt zu verursachen, jedoch ist der Effekt am stärksten, wenn alle drei Rezeptoren interagieren [76]. *P. gingivalis* interagiert auch mit TLR4, wobei TLR4 durch die Lipopolysaccharide entweder schwach aktiviert (5-Acyl-Monophosphat-Lipid A) oder sogar antagonisiert (4-Acyl-Monophosphat-Lipid A) wird [24]. Weiterhin wurde demonstriert, dass *P. gingivalis* NOD1- und NOD2-Rezeptoren aktivieren kann. In parodontalen Fibroblasten wurde dadurch eine erhöhte Expression von IL-6, IL-8 und vaskulärem Zelladhäsionsmolekül 1 nachgewiesen [77].

Fimbrien von *P. Gingivalis* und deren Interaktion mit Integrinen

Es ist bekannt, dass Fimbrien eine wichtige Rolle bei der Invasion von *P. gingivalis* in die Wirtszelle spielen [78-80]. Fimbrien sind dünne, filamentöse, Oberflächenanhängsel, die auf vielen Bakterienspezies vorkommen. Auf *P. gingivalis* wurden sie erstmalig mittels Elektronenmikroskopie nachgewiesen [81]. Die Fimbrien erlauben es dem Bakterium an Epithelzellen, Fibroblasten, Speichelkomponenten und Proteine der extrazellulären Matrix zu binden und das parodontale Gewebe zu infiltrieren [82]. Es befinden sich zwei verschiedene Fimbrien auf der Oberfläche von *P. gingivalis*, lange und kurze Fimbrien [49]. Lange Fimbrien bestehen aus einem 41 kDa großen Protein (FimA, Fimbrillin), welches durch das fimA-Gen codiert wird [83]. Kurze Fimbrien bestehen aus einem 67 kDa großen Protein (Mfa1), welches durch das mfa1-Gen codiert wird [84, 85]. Eine Defizienz des fimA-Gens führte in einem gnotobiotischen Rattenmodell zur verminderten Fähigkeit, sich an gingivale Fibroblasten und Epithelzellen zu binden und zum verminderten parodontalen Knochenabbau [86, 87]. Untersuchungen zeigten, dass Mutanten von *P. gingivalis* ohne lange

Fimbrien eine verminderte Fähigkeit besitzen, in gingivale Epithelzellen und KB-Zellen einzudringen [88-90]. In Makrophagen und neutrophilen Granulozyten induzieren lange Fimbrien die Überproduktion von pro-inflammatorischen Zytokinen wie Interleukin-1 (IL-1), IL-6, und Tumornekrosefaktor- α [91, 92]. Untersuchungen zeigten, dass die langen Fimbrien für die Entwicklung von Biofilmen aus *P. gingivalis* auf Streptokokken-Substraten benötigt werden [93]. Es wurde demonstriert, dass die kurzen Fimbrien für die Autoaggregation von *P. gingivalis* von Bedeutung sind [94]. Mfa1 induziert in Peritonealmakrophagen von Mäusen die Expression von IL-1 α , IL-1 β , und Tumornekrosefaktor- α [95]. Als intrazelluläres Pathogen besitzt *P. gingivalis* die Fähigkeit, zelluläre Signalmoleküle zu zersetzen und zelluläre Funktionen wie Adhäsion, Migration und Proliferation zu stören [50, 78, 81]. Die Fimbrien ermöglichen es *P. gingivalis*, mit verschiedenen körpereigenen Komponenten zu interagieren, darunter Speichelproteine, Hämoglobin, Proteine der extrazellulären Matrix, gingivale Epithelzellen und Fibroblasten [82]. Direkt nach Eintritt in die Mundhöhle reagiert *P. gingivalis* als erstes mit dem Speichel. Während Komponenten wie Fibrinogen, Histatin und Fibronectin die Adhäsion zum parodontalen Gewebe inhibieren, fördern Speichelkomponenten wie Prolin-reiche Proteine, Prolin-reiche Glykoproteine und Statherin die initiale Verankerung von *P. gingivalis* [96-99]. Nach der initialen Verankerung kolonisiert *P. gingivalis* die marginale Gingiva, was vermutlich durch die über Fimbrien vermittelte Adhäsion an Wirtsproteine zustande kommt [100]. Untersuchungen weisen darauf hin, dass die Interaktion von Fimbrien mit gingivalen Epithelzellen eine wichtige Rolle bei der Etablierung einer chronischen Parodontitis spielen kann [50, 101]. Es wurde gezeigt, dass Fimbrien von *P. gingivalis* an zelluläre $\alpha 5 \beta 1$ -Integrine binden [102, 103]. Zelluläre Integrine sind ubiquitär exprimierte, heterodimere Rezeptoren für Proteine der extrazellulären Matrix, welche in physiologische zelluläre Prozesse involviert sind, die mit Zellaktivierung, Proliferation, Metabolismus und Motilität assoziiert sind [104]. Diese Zellfunktionen sind zum Teil abhängig von der Interaktion zwischen $\alpha 5 \beta 1$ -Integrin und seinem Liganden Fibronectin [105]. Eine Studie, in der eine Zelllinie verwendet wurde, die $\alpha 5 \beta 1$ -Integrin überexprimiert, demonstriert, dass die Fimbrien von *P. gingivalis* mit Fibronectin um die $\alpha 5 \beta 1$ -Integrin-Bindungsstelle konkurrieren und die über Fibronectin/Integrin regulierten zellulären Funktionen inhibiert wurden [106]. Der Komplement-Rezeptor 3 (CR3)

ist ein $\beta 2$ -Intergrin, der eine Rolle in der Phagozytose von apoptotischen Zellen, der Leukozytenwanderung und der Regulation der Produktion von Zytokinen spielt [107]. Seine Aktivität ist strikt reguliert. Während er in ruhenden Zellen eine geringe Affinität aufweist, kann er durch ein Signal vom Zellinneren (inside-out signaling), vermittelt durch Chemokin- oder Anaphylatoxin-Rezeptoren, in einen Zustand mit hoher Affinität gebracht werden [108]. Wird durch *P. gingivalis* TLR2 oder TLR4 aktiviert, kann dieses via Aktivierung des Komplementfaktors C3 eine gesteigerte Aufnahme der Bakterien in Makrophagen induzieren. CR3-defizitäre Makrophagen sind gegenüber Wildtyp-Mausmakrophagen hinsichtlich des intrazellulären Abtötens von *P. gingivalis* überlegen [109, 110].

P. gingivalis kann mittels Fimbrien CR3 binden, was die ERK1- und ERK2 (extrazellulär-signalregulierte Kinasen)-Signaltransduktion aktiviert und so die TLR2 induzierte Produktion von IL-12 inhibiert [111]. Es wurde gezeigt, dass *P. gingivalis* durch eine Wechselwirkung zwischen den Fimbrien und $\alpha 5 \beta 1$ -Integrinen an gingivalen Epithelzellen sowie Endothelzellen haftet und in diese eindringt [79, 82, 112]. Das Zytoskelett der Wirtszelle ist ein nachgeschaltetes Ziel Integrin-vermittelter Signaltransduktion [113]. Die durch Integrine vermittelte bakterielle Invasion wird normalerweise mit minimalem und vorübergehendem Zytoskelett-Remodeling assoziiert [114].

Die Invasion von *P. gingivalis* in gingivale Epithelzellen induziert die Nukleation von Aktinfilamenten zu „Microspike“-artigen Vorsprüngen und langen stabil geformten Mikrofilamenten [115]. Ergebnisse aus Studien, die eine Infektion von Osteoblasten mit *P. gingivalis* untersuchten, legen nahe, dass *P. gingivalis* über seine langen Fimbrien an $\alpha 5 \beta 1$ -Integrin der Osteoblasten bindet und Aktin-Mikrofilamente reorganisiert, um in Osteoblasten einzudringen. In infizierten Osteoblasten wurde die Aktivierung des JNK-Signalwegs (C-Jun-N-terminale Kinase), sowie eine anfängliche Erhöhung des zellulären Überlebens mit anschließend erhöhtem Zelltod nachgewiesen [116].

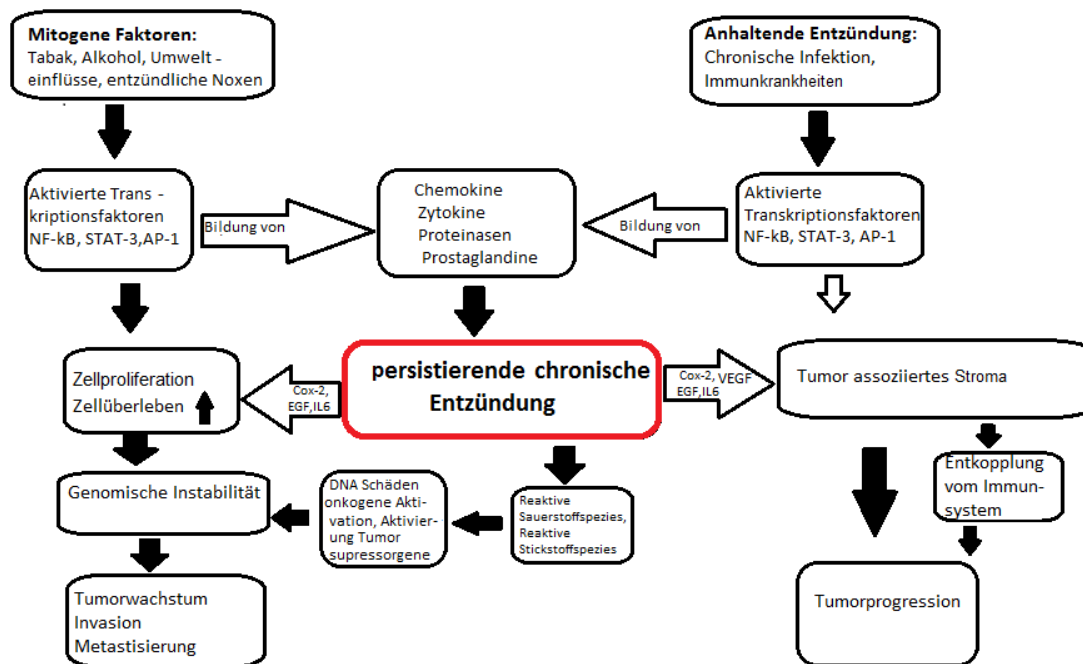
Es wurde gezeigt, dass Mutationen im fimA-Gen das Anheften der Bakterien an Wirtszellen verhindern können [86]. Frühere Studien zeigten, dass die Fimbrien von *P. gingivalis* in der Lage sind in menschlichen gingivalen Fibroblasten und murinen Peritonealmakrophagen die Expression von inflammatorisch wirkenden Zytokinen (wie IL-1 α , IL-1 β , TNF- α , JE/monocyte chemoattractant protein 1) zu induzieren [117-120]. Vermutlich spielt N-Acetyl-D-Galaktosamin bei der

Interaktion von Fimbrien und Makrophagen eine funktionelle Rolle. Weiterhin wurde gezeigt, dass *P. gingivalis* via β 2-Integrin an murine Peritonealmakrophagen bindet und die β -Kette (CD-18) bei der durch Fimbrien induzierten Expression von Interleukin-1 β und Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) eine zentrale Rolle spielt [121]. Es wurde demonstriert, dass die Fähigkeit von murinen Makrophagen, Interleukin-12 als Reaktion auf Fimbrien von *P. gingivalis* zu exprimieren, bei Integrin- β 2-Defizienz hochreguliert wird, während es bei einer TLR2-Defizienz zur Hemmung der Ausschüttung von Interleukin-12 kommt [122]. Weiterhin wurde gezeigt, dass die Fimbrien von *P. gingivalis* eine Ko-Assoziation von TLR 2, β 2-Integrin und CD14 induzieren [123]. Die Bindung der Fimbrien an CD14 und Aktivierung des TLR2- und des Phosphatidylinositol-3-Kinase-Signalwegs könnte zur Induktion einer Konformationsänderung der β 2-Integrine führen, welcher einen Zustand mit hoher Bindungsaffinität gegenüber *P. gingivalis* aufweist. Somit könnten die Fimbrien von *P. gingivalis* als Aktivator und als Ligand für β 2-Integrine fungieren [110].

Epidemiologische Studien haben Zusammenhänge zwischen der Parodontitis und dem oralen Plattenepithelkarzinom demonstriert [12-15]. In einer Studie, die das Vorliegen einer Parodontitis bei Patienten mit oralem Plattenepithelkarzinom berücksichtigte, wurde über eine Odds-Ratio von 4,52 gegenüber parodontal gesunden Patienten berichtet [13]. Die Entstehung eines Zungenkarzinoms bei Patienten mit Parodontitis ist gemäß den Ergebnissen von Tezal et al. (2007) um das 5,23-fache begünstigt [12]. Eine weitere Studie ergab, dass Parodontitis mit der Mortalität von Karzinomen des Aerodigestivtrakts assoziiert ist, wobei *P. gingivalis* als spezifischer und potentiell unabhängiger mikrobieller Risikofaktor gilt [124]. *P. gingivalis* fördert die Invasivität des oralen Plattenepithelkarzinoms durch Aktivierung und Induktion von Pro-Matrix-Metalloprotease 9 [125]. Es wurde gezeigt, dass die Expression von B7-H1- und B7-DC-Rezeptoren in oralen Plattenepithelkarzinomzellen durch *P. gingivalis* hochreguliert wird [126]. *P. gingivalis* ist in hohem Maße in malignem oralem Epithel nachweisbar, welches eine potentielle Assoziation mit dem oralen Plattenepithelkarzinom vermuten lässt [127].

2.3 Zusammenhänge zwischen Tumoren und Entzündung

Es gibt viele Beispiele für eine Verbindung von entzündlichen Erkrankungen und der Tumorgenese. So gilt eine chronische Infektion mit *Helicobacter pylori* als Risikofaktor für die Entwicklung eines Magenkarzinoms, eine chronische Hepatitis B und C kann die Entstehung von Leberkrebs begünstigen und eine chronische Prostatitis kann Prostatakrebs verursachen [8-10]. Sowohl dysregulierte entzündliche Prozesse durch autoimmune Reaktionen als auch sich ständig wiederholende Weichgewebstraumata können das Krebsrisiko steigern [128]. Die Transkriptionsfaktoren, welche die Gene für Entzündungsmediatoren regulieren, steuern zum Teil auch Proliferation [11]. In genetisch veränderten Zellen können somit die Mechanismen, welche das Zellwachstum und Proliferation steuern, ebenfalls die Produktion von Entzündungsmediatoren induzieren. Das entzündete Milieu wiederum unterhält die weitere Zellproliferation, begünstigt das Überleben der veränderten Zellen, fördert Angiogenese und die Umgehung der Immunantwort [8-10]. Hat sich eine entzündliche Tumormikroumgebung etabliert, so begünstigen wechselseitige Interaktionen zwischen den sich neu bildenden Tumorzellen und dem Tumorstroma das Tumorwachstum [129, 130]. Dadurch lässt sich eine Verbindung zwischen Tumorbildung und entzündlichen Geschehen herstellen. Die Zusammenhänge sind in Abb. 1 grafisch dargestellt.



[9]

Abbildung 1: Interaktion zwischen Tumorentstehung und Entzündung. Mitogene Faktoren und durch chronische Entzündungen aktivierte Transkriptionsfaktoren können die Entwicklung und Progression eines Tumors begünstigen (Abbildung nach Mantovani et al., 2010).

Durch Tabak, Alkohol, Umwelteinflüsse und entzündliche Noxen kann es zur Aktivierung verschiedener Transkriptionsfaktoren, wie z. B. STAT-Proteine (signal transducer and activator of transcription), Aktivator Protein 1 (AP-1), und NF-κB (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells) kommen. Infolge dessen aktivieren die Tanskriptionsfaktoren Onkogene, welche Zellproliferation, Apoptose und Angiogenese fördern, sowie Gene, welche die Ausschüttung von Entzündungsmediatoren wie Wachstumsfaktoren, Prostaglandine, Zytokine und Proteinasen induzieren [8, 10, 131-133]. Die Entzündungsreaktion begünstigt eine unkontrollierte selbstunterhaltende Proliferation. Die Tumorprogression und die entzündliche Tumorumgebung sind eng miteinander vergesellschaftet, was auch erklärt, warum in der Umgebung vieler Tumoren Entzündungszellen und Mediatoren nachweisbar sind [8, 10]. Ein weiteres Indiz hierfür ist, dass schnell wachsende Tumoren starke entzündliche Infiltrate aufweisen [128]. In nicht karzinogenem entzündetem Gewebe kann es durch die Transkriptionsfaktoren STAT-3, AP-1 und NF-κB zu vermehrter Proliferation kommen, was die Entwicklung von Tumoren begünstigt [8, 10, 132].

TLR2 und TLR4 haben die Fähigkeit NF- κ B zu aktivieren [50,51,55]. Durch Immunzellen kommt es zur Bildung von reaktiven Sauerstoff- und Stickstoffspezies, was die Entartung der Zellen begünstigen kann [10, 128, 129]. Reaktive Stickstoffspezies können zudem als intrazelluläre Botenstoffe wirken und die Mitogen-aktivierte-Proteinkinase (MAPK) Signalkaskade aktivieren, welche Proliferation und Zelldifferenzierung hochreguliert [131].

2.4 Das orale Plattenepithelkarzinom

Die Inzidenz des Mundhöhlenkarzinoms beträgt 200.000–350.000 Neuerkrankungen/Jahr weltweit mit steigender Erkrankungshäufigkeit [134, 135]. In Deutschland liegt die Zahl der Neuerkrankungen bei circa 10.000 pro Jahr, wobei überwiegend Männer betroffen sind. Damit steht das Mundhöhlenkarzinom an 7. Stelle aller malignen Tumoren bei Männern. Insgesamt betreffen 5 % aller malignen Tumoren die Mundhöhle [136, 137]. In 95 % der Karzinome der Mundhöhle handelt es sich um Plattenepithelkarzinome [137-139]. Als Risikofaktoren des oralen Plattenepithelkarzinoms gelten neben chronischem Alkoholabusus und Tabakkonsum auch chronisch entzündliche Prozesse, ausgelöst durch bakterielle, virale oder chemische Noxen [8-10, 129, 131, 132, 140, 141].

Trotz Voranschreiten der therapeutischen Ansätze hat sich die Morbidität und Mortalität bezüglich des oralen Plattenepithelkarzinoms in den letzten 30 Jahren nicht wesentlich geändert. Bei Männern liegt die Morbidität bei 6,6/100.000 und die Mortalität bei 3,1/100.000, während bei den Frauen die Morbidität 2,9/100.000 und die Mortalität 1,4/100.000 beträgt [142]. Die Inzidenz des oralen Plattenepithelkarzinoms steigt in der Bevölkerungsgruppe zwischen 18 und 44 Jahren vor allem unter den Frauen [143]. Haupt-Risikofaktoren für die Entstehung des oralen Plattenepithelkarzinoms sind der Konsum von Tabak und Alkohol [144]. Vor allem die im Tabak enthaltenden Karzinogene wie Nitrosamine [145] und aromatische Kohlenwasserstoffe können beim kombinierten Konsum mit Alkohol, welcher die Mundschleimhautpermeabilität erhöht, besonders effektiv das Gewebe penetrieren. Damit erhöht sich beim Mischkonsum das Risiko nochmals um ein Vielfaches [146]. Zu den ebenfalls begünstigenden Faktoren werden das Kauen von Betelnüssen, die Infektion mit humanen

Papillomaviren und Hepatitis-C-Viren gezählt [147-149]. Die orale Leukoplakie gilt als Präkanzerose mit malignen Transformationsraten zwischen 0,9 und 17,5 % [150, 151]. Plattenepithelkarzinome der Mundhöhle zeigen sich vielgestaltig, sie können auf der Basis einer Erythroplakie und Leukoplakie entstehen, aber auch in Form eines nicht-heilenden Ulkus oder eines exophytisch wachsenden Tumors auftreten [152]. Ein Großteil der Tumoren, etwa neun von zehn, wird erst diagnostiziert, wenn der Patient bereits tumorassoziierte Symptome zeigt. Lediglich 10 % der Tumoren werden im Rahmen einer Routineuntersuchung entdeckt [153]. Veränderungen der Mundschleimhaut werden in der Regel zunächst durch Inspektion und Palpation beurteilt, da jedoch auch makroskopisch harmlos wirkende Schleimhautveränderungen ein malignes Geschehen verbergen können, sollten alle Mundschleimhautveränderungen, welche länger als zwei Wochen persistieren, durch eine Biopsie abgeklärt werden [154-156]. Zwei Verfahren neben der klinischen Beurteilung sind die Bürstenbiopsie und das VEL-Scope (Vision Enhanced Lesion Scope) [157]. Die Bürstenbiopsie mit anschließender diagnostischer DNA-Zytometrie ist ein Verfahren, mit dem am gewonnenen Zellmaterial entsprechende DNA-Zytometrie zur Bestimmung der DNA-Aneuploidie als Marker für maligne Transformation durchgeführt wird [158]. Bei der Untersuchung mit dem VEL-Scope wird die Fluoreszenz der intra- und extrazellulären Substanzen wie FAD, Kollagen, NADPH, Keratine und Porphyrine genutzt. Es entstehen Fluoreszenzauslöschungen, die auf eine gestörte Gewebestruktur hinweisen, um somit den Verdacht auf Malignität zu erhärten [159]. Ist die Diagnose gesichert, müssen weitere Untersuchungen zur Stadienbestimmung erfolgen.

Das Therapiekonzept von Tumoren richtet sich nach Alter, Allgemeinzustand, anatomischer Lage und dem Tumorgrading. Tumoren der Klassen I und II lassen sich in 80 bis 90 % durch die alleinige chirurgische Exzision behandeln. Ab dem Stadium III sollte eine multimodale Behandlung, bestehend aus Tumorresektion, Radiotherapie und Chemotherapie, erfolgen [160-163]. Die Prognose des Patientenguts mit vorangeschrittenem Tumorwachstum liegt bei einer 5-Jahres-Überlebensrate von nur 45 bis 53 %. Eine mögliche Ursache könnte sein, dass es nicht nur zu einer regionalen Progression des Tumors kommt, sondern in bis zu 38 % der Fälle zu Fernmetastasen, bevorzugt in der Lunge [164, 165].

2.5 Toll-like Rezeptoren (TLRs) und ihre Signalmoleküle

Insgesamt sind 10 humane TLRs, TLR1–TLR10 bekannt, bei Mäusen wurden 12 identifiziert, TLR1–TLR9 und TLR11–TLR13 [166]. TLRs spielen eine wichtige Rolle bei der initialen Immunantwort und werden durch eine große Bandbreite exogener und endogener Antigene aktiviert. Sie erkennen sogenannte PAMPs (pathogen-associated molecular patterns) sowie doppelsträngige RNA Moleküle [167, 168]. Man bezeichnet diese Gruppe von Rezeptoren daher auch als Pattern Recognition Rezeptoren (PRRs). Neben den PAMPs können die Rezeptoren auch von endogenen Damage-Associated Molecular Patterns (DAMPs) aktiviert werden. Zu den DAMPs, welche TLRs aktivieren können, zählen: HMGB1 (high mobility group protein B1), Hitzeschockproteine (HSP), S-100-Proteine und Hyaluron [169-171]. Die Aktivierung von TLRs führt zur vermehrten Expression von pro-inflammatorischen Mediatoren [172]. Es ist davon auszugehen, dass TLRs, bei der Entstehung und Progression von Tumoren involviert sind [172, 173]. TLRs werden auf Endothel-, Epithel- und Tumorzellen exprimiert, unter anderem auch in Kopf-Hals-Karzinomen [173-177].

2.5.1 Toll-like Rezeptor 2

TLR2 erkennt seine Liganden über die Interaktion mit TLR1 oder TLR6 zu einem Heterodimer. Bereits vor der Aktivierung durch einen Agonisten liegen die TLR2/TLR1- und TLR2/TLR6- Rezeptorkomplexe schwach assoziiert auf der Zelloberfläche vor [178]. Durch die Fähigkeit von TLR2, Lipopeptide eigenständig zu erkennen, wird auch die Bildung von TLR2-Homodimeren in Betracht gezogen [179]. Die TLR2/TLR1- und TLR2/TLR6-Komplexe binden ihre Liganden indem sie M-förmige Strukturen bilden, in deren Einbuchtung die spezifischen Agonisten gekoppelt werden [180]. TLR2 kann aktiviert werden durch Spirochäten, Pilze, Bestandteile Gram-positiver Bakterien wie Peptidoglykan, Lipoteichonsäure, Lipoarabinomannan und Lipoproteine sowie durch Lipopolysacharid (LPS) von bestimmten gramnegativen Bakterien [181-187]. Während die Aktivierung von TLR2 mit Triacyl- und Diacyl-Lipoproteinen in Makrophagen die Bildung entzündungsfördernder Zytokine verursacht, wurde bei viral stimulierten Monozyten die Produktion von Interferon 1 nachgewiesen. Dies suggeriert einen Zelltyp-abhängigen Reaktionsmechanismus [188].

2.5.2 Toll-like Rezeptor 4

TLR-4 bildet mit dem Myeloid-Differenzierungsfaktor 2 (MD2) ein Komplex welcher LPS bindet [189, 190]. Zunächst bindet das Serumprotein Lipopolysaccharide binding protein (LPB) an die Lipid A Komponente von LPS und spaltet dieses auf [191]. Dadurch werden Einzelne LPS-Moleküle von LBP auf CD14 transferiert und anschließend LPS auf den TLR4/MD-2-Rezeptorkomplex übertragen. Hierbei dient ausschließlich MD-2 als LPS-Bindungspartner, wobei TLR4 alleine kein LPS bindet [192-194]. TLR-4-MD2 mit dem gebundenen LPS kann als kristalline Struktur dargestellt werden [195]. Die nachfolgende Homodimerisierung von TLR4 stellt den letzten Schritt in der LPS Signaltransduktion dar [189]. Zu den Agonisten von TLR4 zählen: LPS gramnegativer Bakterien, VSV (vesicular stomatitis virus) Glycoprotein G, RSV (respiratorische Synzytialviren), MMTV (Maus-Mammatumovirus) virale Hüllenproteine, Mannan (*Candida albicans*), Glucuronoxylomannan (*Cryptococcus neoformans*), Glycosylinositolphospholipide (*Trypanosoma*), HSP60, HSP70, Fibrinogen, HMGB1, Nickel und Poly-Inosin und Poly-Cytidyl-Säure (Poly I:C) [166, 196]. Die Signalkasade von TLR 2 und TLR4 ist in Abbildung 2 dargestellt:

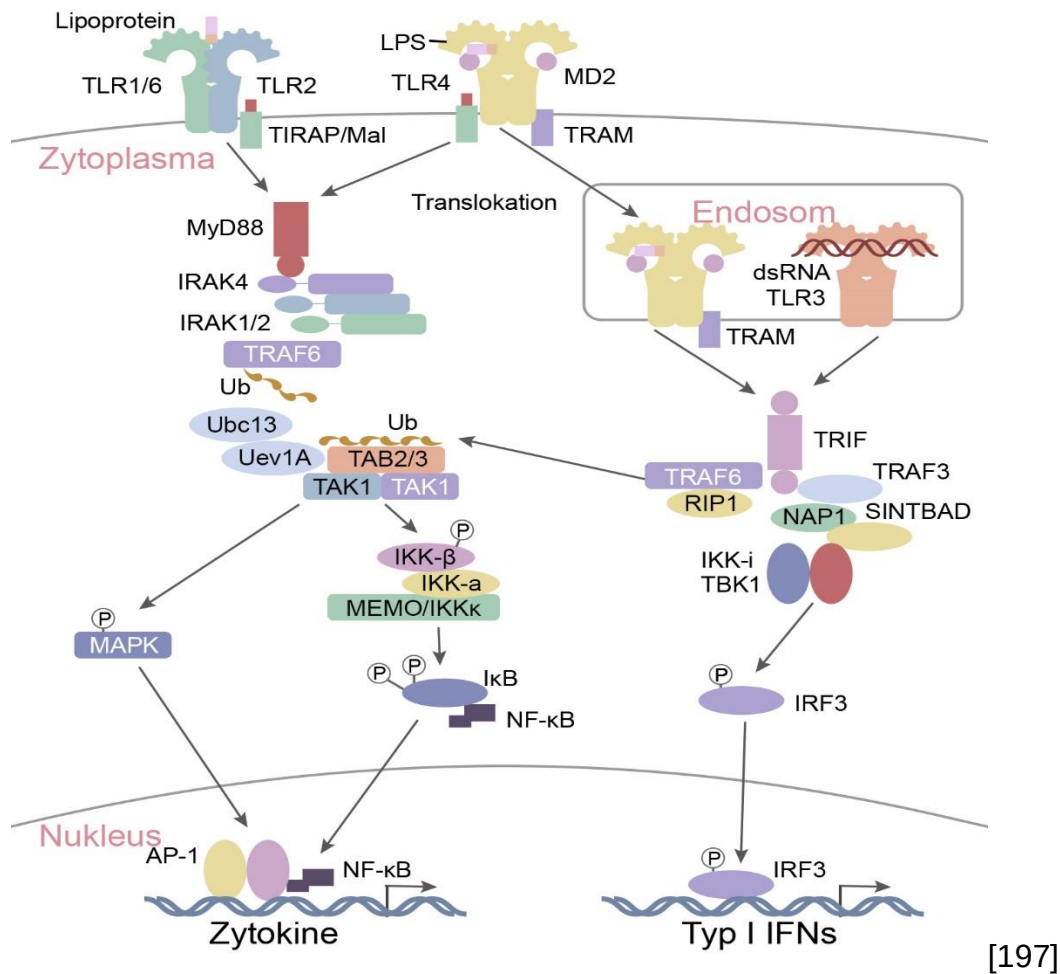


Abbildung 2: Schematischer Ablauf der Signalkaskaden von TLR 2 und TLR 4. Abkürzungen: LPS = Lipopolysaccharid, MD2 = myeloid differentiation protein 2, TIRAP/Mal = MyD88 adapter-like protein, MyD88 = myeloid differentiation primary response 88, IRAK 1/2/4 = IL-1 Rezeptor assoziierte Proteinkinase 1/2/4, Traf 6 = Tumornekrosefaktor-assoziierter Faktor 6, Ubc13 und Uev1A = Ubiquitin-konjugierender Enzymkomplex, TAK 1 = transforming growth factor beta-activated kinase 1, TAB 1/2/3 = TAK1-bindendes Protein 1/2/3, IKK-β = inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase, NF-κB = nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells, SINTBAD = similar to NAP-1 TBK1 adaptor, IRF3 = interferon regulatory factor 3, NEMO = NF-κB-essentieller Modulator, IκB = nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, MAPK = Mitogen-aktivierte Proteinkinase, AP-1 = Aktivator-Protein 1, TRIF = TIR-domain-containing adapter-inducing interferon-β, TRAM = TRIF-related adaptor molecule, RIP 1 = receptor-interacting protein 1, TBK1 = TANK-binding kinase 1, IFNs = Interferone

Die Aktivierung von TLR2 und TLR4 kann über zwei Signalwege ablaufen, die myeloid differentiation primary response (MyD88)-abhängige Signaltransduktion und den TIR-domain-containing adaptor protein inducing interferon beta (TRIF)-abhängigen Signalweg.

Der MyD88-Signalweg wird sowohl von TLR2 als auch von TLR4 aktiviert. MyD88 besteht aus einer Death-Domäne (DD) und einer TIR-Domäne. Für die Signaltransduktion an MyD88 benötigen TLR2 und TLR4 das MyD88 adapter-like protein (Mal) [198, 199]. MyD88 interagiert mit der IL-1R-assoziierten Kinase (IRAK)-4, einer Serine/Threonine-Kinase mit einer N-terminalen Death-Domäne. Daraufhin bindet IRAK1 mit seiner Death-Domäne an MyD88 und IRAK4 [200]. IRAK4 phosphoryliert nun IRAK1, dies führt zur Aktivierung der Kinaseaktivität von IRAK1, woraufhin sich hyperphosphoryliertes IRAK1 durch Autophosphorylierung bildet. Ebenfalls interagiert IRAK1 mit TRAF6. Daraufhin erfolgt die Dislozierung von IRAK1 und TRAF6 von MyD88, welche mit dem Tumornekrosefaktor-assoziierten Faktor 6 (TRAF6) reagieren, der als E3-Ubiquitin-Protein-Ligase agiert. Zusammen mit dem E2 Ubiquitin-konjugierendem Enzymkomplex (Ubc13 und Uev1A) katalysiert TRAF6 die Formation einer Lysin 63(K63)-gekoppelten Polyubiquitin-Kette an TRAF6 und die Bildung einer freien unkonjugierten Polyubiquitinkette [201]. Die freie unkonjugierte K63-Ubiquitinkette aktiviert einen Komplex aus transformierender Wachstumsfaktor-b-aktivierter Kinase 1 (TAK1), TAK1-bindendem Protein 1 (TAB1), TAB2 und TAB3, welches die I κ B-Kinase (IKK)-b und die MAP -Kinase 6 (MAPK 6) phosphoryliert. Anschließend phosphoryliert der IKK Komplex (bestehend aus: IKK- α , IKK- β , und NF-kB-essentiellen Modulator [NEMO]), I κ B α , ein NF-kB-inhibitorisches Protein. Phosphoryliertes I κ B α baut sich durch das Ubiquitin-Proteasomsystem ab, wobei NF-kB frei wird, um in den Zellkern zu translozieren und die Expression von Genen proinflammatorischer Zytokine zu induzieren. Die Aktivierung der MAP-Kinase-Kaskade ist verantwortlich für die Bildung eines zusätzlichen Transkriptionsfaktorkomplexes, Aktivatorprotein 1 (AP-1), welches ebenfalls die Expression von Zytokin-induzierenden Genen aktiviert [202].

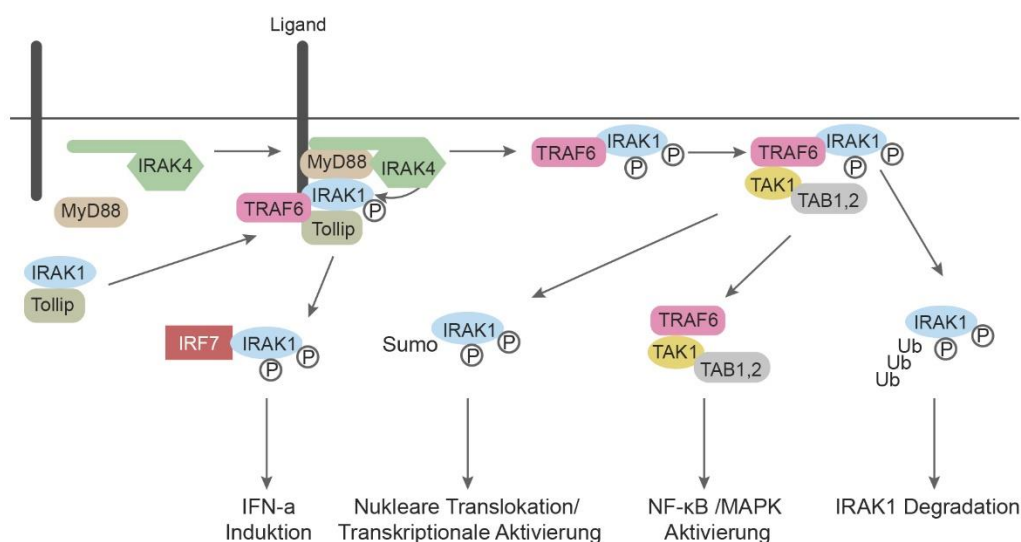
Der TRIF (TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β)-Signalweg wird durch TLR4 aktiviert, jedoch nicht durch TLR2. TLR4 benötigt zur Aktivierung von TRIF als weiteres Adapterprotein TRAM (TRIF-related adaptor molecule). Eine

Spleißvariante von TRAM namens TRAM-Adaptor mit GOLD-Domäne (TAG) gilt als Inhibitor des TRIF-Signalwegs [203]. TRIF vereinigt sich mit TRAF3 und TRAF6 durch TRAF-bindende Motive am N-terminalen Ende. TRIF beinhaltet auch ein C-terminales Rezeptor-Interaktionsprotein (RIP) homotypisches Interaktionsmotiv (RHIM) und interagiert darüber mit RIP1 und RIP3. In Menschen inhibiert SARM (selective androgen receptor modulator) die TRIF-abhängige Signaltransduktion [204]. Das TNFR-assoziierte death domain protein (TRADD), ein wichtiger Adapter für die TNFR-Signalkasade, ist an dem TRIF-abhängigen Signalweg beteiligt [205]. TRADD bildet einen Komplex mit dem FAS-assoziierten death domain containing protein (FADD) und RIP1, zusätzlich vermittelt TRADD die Ubiquitinierung von RIP1, welches für die Aktivierung von NF- κ B benötigt wird. FADD aktiviert die Caspase-8 oder Caspase-10 als Reaktion auf Poly-Inosin-: Poly-Cytidyl-Säure (poly I:C) und die gespaltenen Kaspasen aktivieren NF- κ B [206]. TRAF3 wird benötigt, um IKK (I κ B α -Kinase-Komplex)-verwandte Kinasen, TANK-bindende Kinase 1 (TBK1) und IKK-i (IKK-3) zu aktivieren [207, 208]. An TRAF3 erfolgt eine K63-vermittelte auto-Ubiquitination und es wirkt als E3-Ubiquitinligase. Die TRAF3-Aktivierung wird inhibiert durch das Deubiquitinierungsenzym (DUBA) [209]. Proteasom-vermittelter Abbau von TRAF3 ist essenziell für die Aktivierung von MAP-Kinasen und der Produktion von entzündungsfördernden Zytokinen [210]. Ubc5, eine E2-Ubiquitinligase, wird für die Aktivierung von IRF3 (Interferon-regulatorischer Faktor 3) der für die Katalysierung der K63-type Polyubiquitin-Kettenbildung benötigt wird [211]. TBK1-IKK-i-Phosphorylate und IRF3-IRF7-Dimere translozieren in den Zellkern, induzieren die Bildung von Typ-I-Interferonen und die Expression von IFN-induzierbaren Genen. IKK-i phosphoryliert auch STAT1, um die Hochregulation einer Reihe von IFN-induzierbaren Genen wie Adar1, Ifit3, und Irf7 auszulösen [212].

2.5.3 IRAK-1

Insgesamt wurden vier verschiedene Interleukin-1-Rezeptor-assoziierte Kinasen (IRAK1, IRAK2, IRAK3 [IRAK-M], und IRAK4) identifiziert. Sie sind Serin/Threonin-Proteinkinasen, welche an der Signaltransduktion von Toll-like Rezeptoren und Interleukin-1-Rezeptor 1 beteiligt sind [213-216]. IRAK2 und IRAK3 sind Pseudokinasen ohne katalytische Aktivität, wobei sie trotzdem eine Rolle in der Signalkaskade spielen [214, 217].

Das IRAK1-Protein besitzt eine N-terminale Death-Domäne, eine zentrale Kinase-Domäne mit einer Aktivierungsschleife und eine C-terminale C1- und C2-Domäne. Während IRAK1–IRAK4 ähnliche funktionelle Domänen besitzen, liegt die Sequenzhomologie dieser Proteine bei nur circa 30–40 %. IRAK 1, 2 und 4 sind ubiquitär exprimiert, Irak 3 scheint nur in Makrophagen vorzukommen [218, 219]. IRAK1-defiziente Makrophagen produzieren verminderte Mengen von TNF- α bei TLR2- und TLR4-Aktivierung. Diese Beeinträchtigung der TLR-Funktion in IRAK1-defizienten Mäusen führt zur Reduktion der letalen septischen Wirkung von LPS oder Gram-negativen bakteriellen Infektionen [220]. Die Signaltransduktion von IRAK1 ist in Abbildung 3 dargestellt:



[221]

Abbildung 3: Signaltransduktion von IRAK1.

Abkürzungen: IFN- α = Interferon- α , IRAK = Interleukin-1-Rezeptor-assozierte Kinase, IRF7 = Interferon-regulatorischer Faktor 7, MAPK = Mitogen-aktivierte Proteinkinase, MyD88 = myeloid differentiation primary response 88, NF- κ B = nuclear factor, kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells, SUMO = small ubiquitin-like modifier, TAB = transforming growth factor β -activated protein kinase 1-binding protein, TAK 1 = transforming growth factor beta-activated kinase 1, Tollip = toll interacting protein, Traf6 = Tumornekrosefaktor–assoziierter Faktor 6, P = phosphoryliert, Ub = Ubiquitin

Inaktiv ist IRAK1 an Tollip (toll interacting protein) gebunden. IRAK4 und MyD88 liegen frei im Zytosol vor. Durch Aktivierung der Toll-like-/Interleukin-1-

Rezeptoren (TLR/IL-1R), kommt es zur Interaktion von MyD88 mit dem Rezeptor über die TIR-Domäne, welche sowohl in TLR und MyD88 vorliegt. Daraufhin bindet IRAK1 über seine Death Domäne an MyD88 und IRAK4. Ebenfalls interagiert IRAK1 mit TRAF6. IRAK4 phosphoryliert nun IRAK1, was die Kinaseaktivität von IRAK1 aktiviert, woraufhin sich hyperphosphoryliertes IRAK1 durch Autophosphorylierung bildet. Nun löst sich das hyperphosphorylierte IRAK1 von Myd88 und Tollip, um einen zytosolischen IRAK1-Traf6-Komplex zu bilden.

Durch Interaktion mit TAK1 und TAB1 und TAB2 bildet sich ein Komplex der TAK1 aktiviert. Das aktivierte TAK1 wiederum führt zur Aktivierung des NF- κ B und des MAPK-Signalwegs. Durch SUMO kann IRAK1 in den Zellkern transloziert werden. Beim TLR7/9-Signalweg phosphoryliert IRAK1 IRF7, welches in den Zellkern transloziert und IFN- α induziert. IRAK1 kann nach Ubiquitinierung abgebaut werden.

3 Ziele der Studie

Ziel dieser *in vitro*-Studie war es, die Protein-Expression der Toll-like Rezeptoren 2 und 4 sowie deren Signalprotein IRAK1 in einer oralen Plattenepithelkarzinomzelllinie und in immortalisierten humanen gingivalen Keratinozyten nachzuweisen.

Ein weiteres Ziel war der Vergleich der Expression von IRAK1 mit und ohne Inhibierung des TLR2/4-Signalweges. Die folgenden Fragestellungen sollten geklärt werden:

1. Werden TLR2, TLR4 und IRAK1 auf dem oralen Plattenepithelkarzinom exprimiert?
2. Wie verändert sich deren Expression unter Zugabe Rezeptor-spezifischer Stimuli?
3. Wie verändert sich die Expression nach Stimulation mit isolierten Membranproteinen von *Porphyromonas gingivalis*?
4. Wie verhält sich die Expression von IRAK1 nach Inhibition des Signalwegs von TLR2 und TLR4?

Arbeitshypothesen

Daraus ergaben sich die folgenden zu testenden Hypothesen:

Hypothese 1

- **H0:** TLR2 wird nicht konstitutiv exprimiert.
- **H1:** TLR2 wird konstitutiv auf den zu testenden Zelllinien exprimiert.

Hypothese 2

- **H0:** TLR2 zeigt keine Hochregulation nach Stimulation mit dessen spezifischen Agonist.
- **H1:** TLR2 wird durch Stimulation mit dessen spezifischen Agonist hochreguliert.

Hypothese 3

- **H0:** TLR2 zeigt keine Hochregulation nach Stimulation mit isolierten Membranproteinen von *P. gingivalis*.
- **H1:** TLR2 wird durch Stimulation mit Membranproteinen von *P. gingivalis* hochreguliert.

Hypothese 4

- **H0:** TLR4 wird nicht konstitutiv exprimiert.
- **H1:** TLR4 wird konstitutiv auf den zu testenden Zelllinien exprimiert.

Hypothese 5

- **H0:** TLR4 zeigt keine Hochregulation nach Stimulation mit dessen spezifischen Agonist.
- **H1:** TLR4 wird durch Stimulation mit dessen spezifischen Agonist hochreguliert.

Hypothese 6

- **H0:** TLR4 zeigt keine Hochregulation nach Stimulation mit isolierten Membranproteinen von *P. gingivalis*.
- **H1:** TLR4 wird durch Stimulation mit Membranproteinen von *P. gingivalis* hochreguliert.

Hypothese 7

- **H0:** IRAK1 wird nicht konstitutiv exprimiert.
- **H1:** IRAK1 wird konstitutiv auf den zu testenden Zelllinien exprimiert.

Hypothese 8

- **H0:** IRAK1 zeigt keine Hochregulation nach Stimulation mit TLR2/4 spezifischen Agonisten.
- **H1:** IRAK1 wird durch Stimulation mit TLR2/4 spezifischen Agonisten hochreguliert.

Hypothese 9

- **H0:** IRAK1 zeigt keine Hochregulation nach Stimulation mit isolierten Membranproteinen von *P. gingivalis*.
- **H1:** IRAK1 wird durch Stimulation mit Membranproteinen von *P. gingivalis* hochreguliert.

Hypothese 10

- **H0:** Die Inhibition des TLR2-Signalwegs hat keinerlei Einfluss auf die Expression von IRAK1.
- **H1:** Die Inhibition des TLR2-Signalwegs verändert die Expression von IRAK1.

Hypothese 11

- **H0:** Die Inhibition des TLR4-Signalwegs hat keinen Einfluss auf die Expression von IRAK1.
- **H1:** Die Inhibition des TLR4-Signalwegs verändert die Expression von IRAK1.

Experimentelles Konzept

Das methodische Vorgehen bestand in folgenden Schritten:

- Die zu untersuchenden Zelllinien wurden in Zellkulturflaschen angezüchtet und für die Experimente entsprechend präpariert.
- Die Zelllinien wurden mit dem zugehörigen Agonisten stimuliert.
- Die Zelllinien wurden mit den isolierten Membranproteinen aus *Porphyromonas gingivalis* infiziert.
- Inhibition des TLR2/4-Signalwegs: Die Zelllinien wurden vor der Stimulation mit den Agonisten mit einem blockierenden Antikörper gegen TLR2/4 behandelt.
- Die Analysen wurden mittels Durchflusszytometrie und Western Blot durchgeführt.

4. Materialien und Methoden

4.1 Anzucht der Zellen und Kultur der verschiedenen Zelllinien

Es wurden 2 verschiedene Zelllinien untersucht:

- SCC-25 (ATCC, Manassas, Va, U.S.A.) aus oralen Plattenepithelkarzinomen
- immortalisierte humane gingivale Keratinozyten (IHGK)

Zellkulturmedien und Lösungen

Die spezifischen Kulturmedien für die Zelllinien sind Tabelle 3 aufgelistet:

Tabelle 1: Spezifische Kulturmedien der verschiedenen Zelllinien

Zelllinie	Zellkulturmedium	
IHGK	serumfreies Proliferationsmedium:	
	Material	Menge
	DMEM ohne Ca^{2+}	145,05 ml
	Ham's F12	48,35 ml
	Hydrocortison (10 $\mu\text{g/ml}$)	8 μl
	1 M Hepes	2 ml
	ITSX	2 ml
	rHu EGF 1 g/l	2 μl
	Choleratoxin	0,2 ml
	serumhaltiges Differenzierungsmedium:	
	DMEM mit Ca^{2+}	146,96 ml
	Ham's F12	48,98 ml
	1 M Hepes	2,02 ml
	Penicillin/Streptomycin	2,02 ml
	FCS	10%
SCC-25	DMEM	88 ml
	Ham's F12	88 ml
	FCS	20 ml
	1 M Hepes	2 ml
	Hydrocortison (10 $\mu\text{g/ml}$)	8 μl

Hydrocortisonlösung (10 µg/ml) wurde durch Auflösung von 0,05 mg Hydrocortison in 50 ml Ethanol hergestellt.

Trypsin (0,5 %) wurde den Herstellerangaben entsprechend verdünnt (5 ml Trypsinkonzentrat auf 45 ml PBS -/-). Dies entspricht einer Endkonzentration von 0,05 %.

Zellkultur

Alle Zelllinien wurden in 75 mm² Zellkulturflaschen bei konstant 37° C, 92 % relativer Feuchte und 5 % CO₂ mit 15 ml der jeweiligen Kulturmedien, inkubiert. Alle zwei Tage wurden die Zellkulturen mit 10 ml PBS (phosphate-buffered saline) gewaschen und 15 ml frisches Medium zugesetzt. Bei Erreichen einer Konfluenz von über 75 % wurden die Zellen auf weitere Zellkulturflaschen aufgeteilt. Hierfür wurden die Zellen nach Verwerfen des verbrauchten Mediums mit 10 ml PBS gewaschen und danach mit 2 ml 0,05 % Trypsinlösung beschickt und für 5–10 min inkubiert, bis die Zellen sich vom Flaschenboden gelöst hatten. Der Ablösevorgang wurde sowohl makroskopisch als auch mikroskopisch kontrolliert. Anschließend wurde das Trypsin mit 4 ml Kultivierungsmedium abgestoppt. Jeweils 3 ml der Zellsuspension wurde in eine Zellkulturflasche pipettiert und mit frischem Medium auf 15 ml aufgefüllt.

Zellzählung mittels Neubauerkammer

Die Zellen wurden vorab mittels Trypsinlösung abgelöst und mit der doppelten Menge des Zellkulturmediums abgestoppt. Die Lösung wurde zentrifugiert und das Pellet resuspendiert. In der Sterilbank wurden die jeweiligen Zellsuspensionen erneut gemischt und 10 µl mit einer Eppendorf-Pipette entnommen und in eine Kammer pipettiert. Die Kammern wurden unter ein Inversmikroskop gelegt und mit einer zehnfachen Vergrößerung im Phasenkontrast-Objektiv gezählt. Es wurden im oberen und unteren Zählfeld alle vier Eckquadrate ausgezählt. Aus den Einzelwerten wurde ein Mittelwert gebildet und die Zellzahl berechnet:

$$\text{Zellzahl/ml} = \text{Mittelwert} * \text{Verdünnungsfaktor} * 10^4 \text{ Zellen/ml.}$$

Aussaat der Zellen

Die Zellen wurden bei einer Zellzahl von 1×10^6 Zellen/ml/Probe in 6-Well-Platten zur weiteren Behandlung ausgesät. Für die IHGK wurde für die Aussaat das serumhaltige Differenzierungsmedium verwendet.

4.2 Stimulation der Zellen mit Rezeptor-Agonisten

Ein für den jeweiligen Rezeptor spezifischer Stimulus (Tabelle 4) wurde den Zellkulturen 1 h nach Aussaat zugesetzt und nach 24 h Inkubationszeit eine Probe zur Bestimmung der induzierten Rezeptorexpression entnommen.

Die Inhibierungsversuche wurden mit spezifischen blockierenden Antikörpern durchgeführt, welche 1 h vor der Stimulierung zugesetzt wurden.

Tabelle 2: Rezeptoren mit ihren jeweiligen Agonisten :

Rezeptor	Stimuli
TLR2	Pam3CSK4 10 µg
	<i>P.g</i> Membran (TM) 100 µg
TLR4	LPS (<i>E. coli</i>) 10 µg
	<i>P.g.</i> Membran 100 µg
IRAK1	Pam3CSK4 10 µg
	Pam3CSK4 10 µg + Anti-hTLR2-IgA 5 µg
	<i>P.g.</i> Membran 100 µg
	<i>P.g.</i> Membran 100 µg + Anti-hTLR2-IgA 5 µg
	<i>P.g.</i> Membran 100 µg + Anti-hTLR4-IgG 5 µg
	LPS (<i>E. coli</i>) 10 µg
	LPS (<i>E. coli</i>) 10 µg + Anti-hTLR4-IgG 5 µg
	Anti-hTLR2-IgA 5 µg
	Anti-hTLR4-IgG 5 µg

Herstellung der totalen Membranfraktion (TM) von *P. gingivalis*

Die Herstellung der Membranfraktion von *P. gingivalis* wurde in Zusammenarbeit mit dem Forschungszentrum Borstel durchgeführt. Hierfür wurden die geernteten Bakterien mittels French-Press aufgeschlossen. Die Membranfraktion wurde bei 150.000 x g für 2 h bei 4 °C abzentrifugiert. Nach Zugabe von DNase und RNase wurde der Überstand (zytosolische Fraktion) isoliert. Die Membranfraktion wurde dreifach gewaschen und in 10 mM HEPES, pH 7,4 bei -20 °C gelagert.

4.3 Analyse mittels Western-Blot

Der Western-Blot ist ein molekularbiologisches Verfahren, mit dem elektrophoretisch aufgetrennte Proteine aus dem Trenngel auf einen Träger wie z. B. Nitrozelleulose übertragen werden. Anschließend wird das Zielprotein mit einem spezifischen Antikörper gebunden und durch eine indirekte oder direkte Färbung sichtbar gemacht.

Gelelektrophorese und Blot

Das Medium wurde aus den 6-Well-Platten abpipettiert und die Zellen zweifach mit PBS +/- gewaschen. Danach wurden die Zellen mit 200 µl 1X RIPA-Buffer (Thermo Scientific™, Waltham, MA, USA) mit 1 % Protease-Inhibitor-Cocktail lysiert (Thermo Scientific™, Halt™, Waltham, MA, USA), mit einem Zellschaber abgelöst und in ein 1,5 ml Probenröhrchen übertragen. Die Proben wurden danach bei 14.000 rpm für 15 Minuten bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Probenröhrchen pipettiert. Mit dem Pierce BCA Protein Essay Kit (Thermo Scientific™, Waltham, MA, USA) wurde die Proteinkonzentration nach Herstellerangaben ermittelt. Hierzu wurden je 30 µl Probe mit 600 µl Assay-Reagenz bei 37 °C für 30 min im Wasserbad inkubiert. Anschließend wurden die Absorption der Proben im Photometer (Hach DR/2000, Loveland, CO, USA) bei einer Wellenlänge von 562 nm gemessen. Aus den Standardwerten bekannter Proteinkonzentrationen konnte anhand einer Regressionsgeraden die Proteinkonzentration der Proteinproben errechnet werden. Nun wurden die Proben mit 1X RIPA-Puffer (+1 % PIC) auf 1 µg/µl (20 µg Protein/Bahn) eingestellt und 100 µl Probe zusammen mit 20 µl (5x) SDS-Ladepuffer in ein frisches Probenröhrchen überführt. Die Proben wurden für 5 min bei 95 °C im Wasserbad erhitzt und danach auf Eis abgekühlt und für 10 sec in einer

Tischzentrifuge zentrifugiert. Für die SDS-Gelelektrophorese wurden pro Bahn 20 µg Probe in ein 10 % Gel (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) geladen. Als Größenstandard wurde je Gel die erste Bahn mit einer Proteinleiter (PageRuler™ Plus, Thermo Scientific™, Waltham, MA, USA) beladen. Die Gele liefen bei einer Spannung von 80 Volt (BioRad PowerPac HC) 30 min, danach bei 130 Volt für 1,5 Stunden in einer Elektrophorese Zelle (BioRad Mini-PROTEAN Hercules, CA, USA). Nach Abschluss der Gelelektrophorese wurden die Proteine aus dem Gel mittels Semi-Dry-Blotting 10 Minuten bei 25 V und einer Stromstärke von maximal 2,5 A (Trans-Blot Turbo, BioRad, Hercules, CA, USA) auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Die Membran wurde anschließend mit Ponceau S (Sigma St. Louis, MO, USA) gefärbt und auf einen erfolgreichen Proteintransfer überprüft. Vor dem Immunoblot wurde die Membran mit destilliertem Wasser gewaschen bis der überschüssige Farbstoff entfernt wurde.

Antikörpermarkierung

Die Nitrozellulosemembran wurde für 1 h mit 2 % Milchpulver (MP) in TBST (Tris-buffered saline with Tween) präinkubiert. Hiernach wurde die Membran über Nacht bei 4 °C mit den primären Antikörpern (zu Konzentrationen siehe Tabelle 5) inkubiert.

Tabelle Nr. 3: Primär- und Sekundärantikörperkonzentrationen

Primärantikörper	Konzentration Primärantikörper in 2 % MP/TBST	Sekundärantikörper	Konzentration Sekundärantikörper in 2 % MP/TBST
anti-TLR2	1:500	Goat anti-Mouse IgG	1:500
anti-TLR4	1:10 000	Goat anti-Mouse IgG	1:1000
anti-IRAK1	1:1000	Goat anti-Rabbit IgG	1:500

Die Membran wurde mit TBST dreimal für 10 min bei Raumtemperatur gewaschen. Sie wurde dann in die verdünnte Lösung mit dem Sekundärantikörper gelegt und für 1 h auf einem Taumelrollenmischer bei

Raumtemperatur inkubiert. Die Membran wurde erneut mit TBST dreimal für 10 min bei Raumtemperatur gewaschen. Anschließend wurde die Membran auf Klarsichtfolie platziert und für 5 min mit ECL-Lösung (BioRad, Hercules, CA, USA) inkubiert. Es erfolgte das Einschlagen in die Klarsichtfolie und die Inkubation mit Röntgenfilmen im Dunkeln für 1 min, 5 min, 10 min und 15 min. Anschließend wurden die Filme entwickelt und eingescannt. Die Auswertung der eingescannten Röntgenbilder erfolgte mit dem Bildverarbeitungsprogramm ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA). Alle Experimente wurden mit mindestens 3 biologischen Replikaten durchgeführt.

4.4 Analyse im Durchflusszytometer

Die Durchflusszytometrie ist eine Methode zur Analyse von Zellen in einer Zellsuspension. Die an den Zellen nachzuweisenden Oberflächenmoleküle, intrazellulären Proteinen und DNA werden mit Antikörpern, die mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt sind, markiert.

Analyse der durch die Infektion ausgelösten Rezeptorexpression

Die Zellen wurden nach 24 h entnommen, um sie im Durchflusszytometer zu analysieren. Um die Zellen für die Immunfärbung zu ernten, wurden sie mittels eines Zell-Schabers von dem Boden der 6-Well-Platte gelöst und mit je 1 ml FACS-Färbepuffer gewaschen, für 5 min bei 5000 rpm zentrifugiert und in einem 1,5 ml Probenröhrchen mit 100 µl Färbepuffer resuspendiert. Für die Antikörperfärbung von TLR2 und TLR4 wurden die Zelllösungen mit 5 µl eines mit Alexa Fluor 488 markierten Antikörpers gegen TLR2 (#53-9922-42, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) und TLR4 (sc-293072, Santa Cruz Biotech, Dallas, TX, USA) für 60 min bei 4 °C inkubiert. Eine Probe wurde jeweils mit einem Isotyp-Kontrollantikörper inkubiert (#IC002G, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA). Anschließend wurden die Zellen mit Färbepuffer zweifach gewaschen, in PBS +/- resuspendiert und durch einen Filter mit einer Porengröße von 50 µm gegeben. Für die Antikörperfärbung von IRAK1 wurden die Proben mit je 1 ml FACS-Färbepuffer gewaschen, für 5 min bei 5000 rpm zentrifugiert und in ein 1,5 ml Probenröhrchen mit 100 µl BD Cytofix/Cytoperm Fixierungs- und Permeabilisierungspuffer nach Herstellerangaben resuspendiert und 50 min

inkubiert. Danach wurden die Proben 3 x mit Permeabilisierungspuffer per Zentrifugation/Resuspension gewaschen. Die Inkubation dauert mind. 45-50 min. (eBioscience™, San Diego, CA, USA). Die Zelllösungen wurden dann je mit 2 µl des primären Antikörpers (#38-5600, Invitrogen,) für 60 min bei 4 °C in Dunkelheit inkubiert. Eine Probe wurde jeweils mit einem Isotyp-Kontrollantikörper inkubiert (#16-4714-82, eBioscience). Nach zweimaligem Waschen mit Färbepuffer wurden die Proben mit 1:500 eines mit Alexa Fluor 488 markierten sekundären Antikörpers (ab150077, Abcam, Cambridge, UK) für 60 min bei 4 °C in Dunkelheit inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit Färbepuffer gewaschen, in PBS -/- resuspendiert und durch einen 50 µm Filter gegeben. Für die Messungen wurde das Durchflusszytometer CyanADP (Beckmann-Coulter, Brea, CA, USA) verwendet, dessen Anregungswellenlänge dem Fluorophor entsprechend eingestellt wurde.

Auswertung der Durchflusszytometer-Analyse der Zellen

Das Gerät und die Software Summit® verwalten alle Messereignisse. Die Ergebnisse sind u. a. unter Verwendung von Auswertefenstern (*Gates*) darstellbar. Die Ergebnisse wurden als Histogramme dargestellt, auf der Ordinate die analysierten Ereignisse (Counts), und auf der Abszisse die Fluoreszenzintensität in logarithmischer Darstellung. Zur Ermittlung der mittleren Fluoreszenzintensität der in Zellkulturflaschen angezüchteten Zellen wurde ein Gate um die Glockenkurve gelegt (R1) und die Werte ausgelesen. Die Analyse kann so gezielt auf ausgewählte Ereignispopulationen ausgerichtet werden. Die Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus 3 unabhängigen Experimenten errechnet.

Die statistische Analyse erfolgte mittels zweiseitigem t-Test für unverbundene Stichproben. Die Art der Analyse war explorativ, der p-Wert wurde bei einem Wert von kleiner 0,1 (*) als Trend, kleiner 0,05 (**) als signifikant und kleiner 0,01 als hochsignifikant (***) definiert.

5 Ergebnisse

5.1 Durchflusszytometrie

5.1.1 Expression von IRAK1 in IHGK

Die durchflusszytometrische Analyse der IHGK ergab eine um das 1,66-fache höhere Expression von IRAK1 nach Stimulation mit LPS und eine um das 1,67-fach höhere Expression nach Stimulation mit TM (Abbildungen 4 und 5).

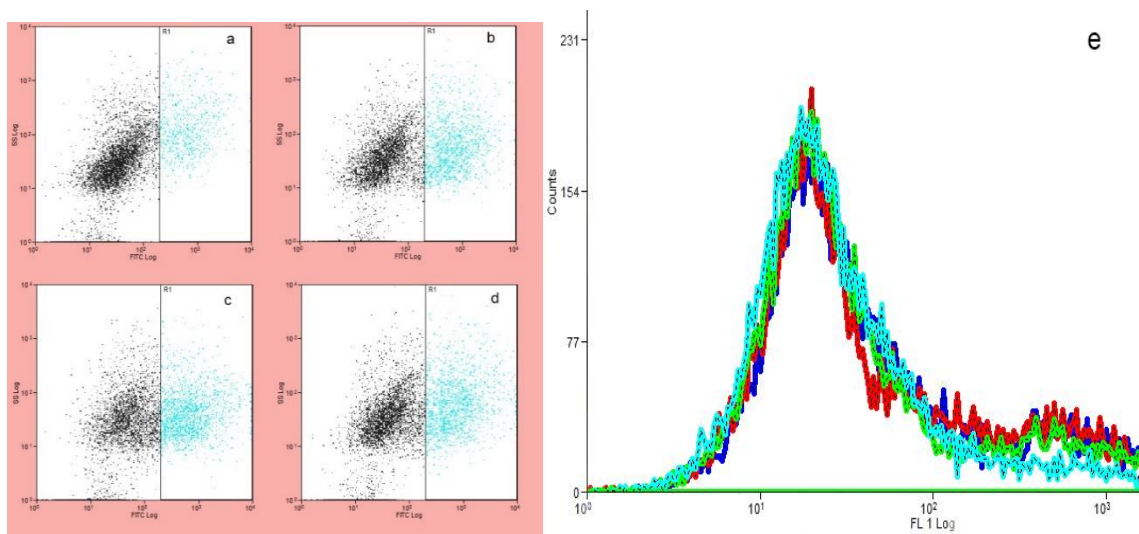


Abbildung 4: Durchflusszytometrische Messung der IRAK1-Expression in IHGK.

a-d: Dotplot der IRAK1-Expression in IHGK. Abszisse = Fluoreszenzintensität als Readout der Expression (FITC Log), Ordinate = Zellgranularität (SS Log). a = Isotyp-Kontrolle, b = negativ, c = LPS, d = TM.

e: Overlay der Histogramme der IRAK1-Expression in IHGK. Counts (Ordinate) versus Fluoreszenzintensität als Readout der Expression (Abszisse) Türkis = Isotyp-Kontrolle, Grün = negativ, Rot = LPS, Blau = TM.

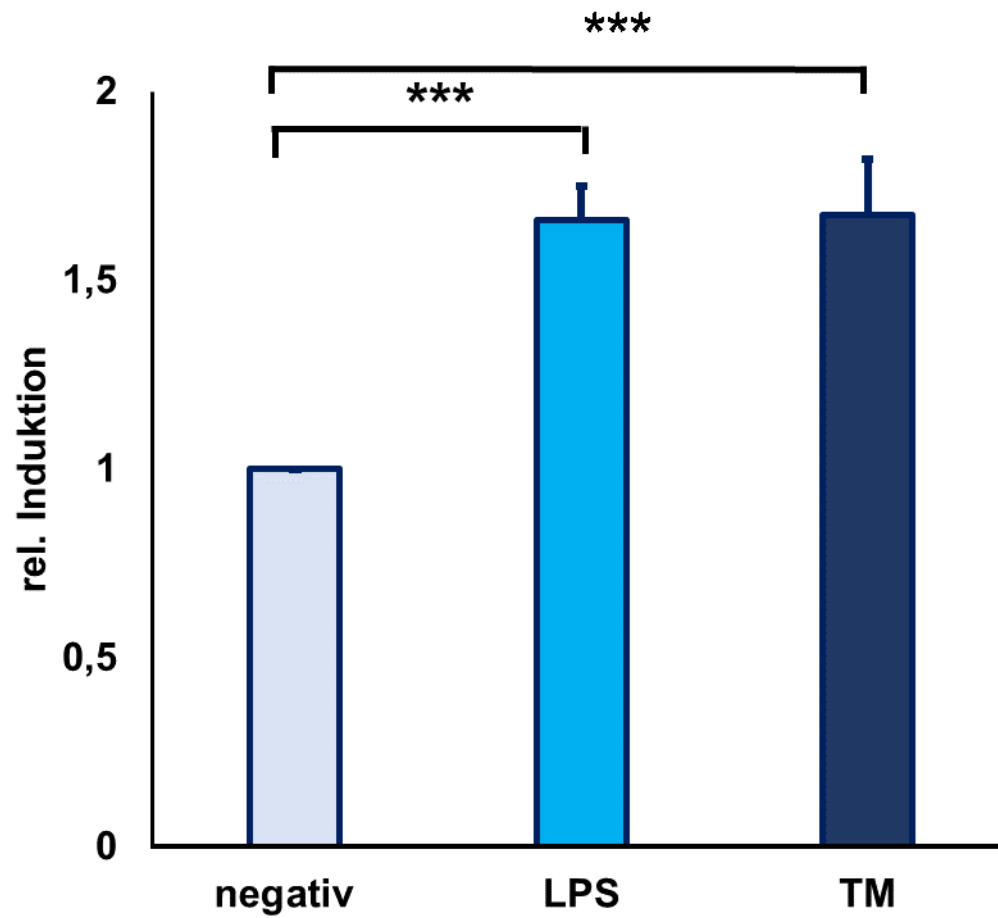


Abbildung 5: Relative Expression von IRAK1 in IHGK nach Stimulation mit LPS oder TM im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (n = 3), *** = $p < 0,01$.

5.1.2 Expression von IRAK1 in SCC-25

Bei den SCC-25 Zellen lag die IRAK1-Expression nach Stimulation mit LPS bei dem 1,31-fachen und nach Stimulation mit TM bei dem 1,13-fachen der nicht-stimulierten Kontrolle (Abbildungen 6 und 7).

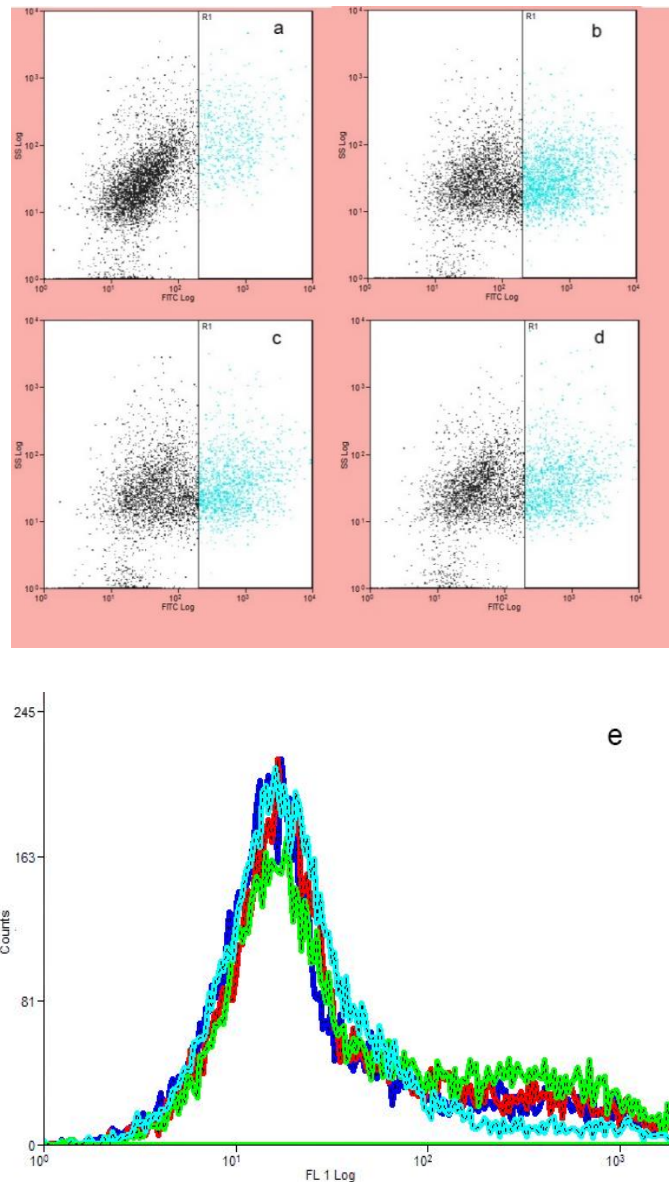


Abbildung 6: Durchflusszytometrische Messung der IRAK1-Expression in SCC-25.

a-d: Dotplot der IRAK1-Expression in SCC-25. Abszisse = Fluoreszenzintensität als Readout der Expression (FITC Log), Ordinate = Zellgranularität (SS Log) a = Isotyp-Kontrolle, b = negativ, c = LPS, d = TM.

e: Overlay der Histogramme der IRAK1-Expression in SCC-25. Counts (Ordinate) versus Fluoreszenzintensität als Readout der Expression (Abszisse) Türkis = Isotyp-Kontrolle, Grün = negativ, Rot = LPS, Blau = TM.

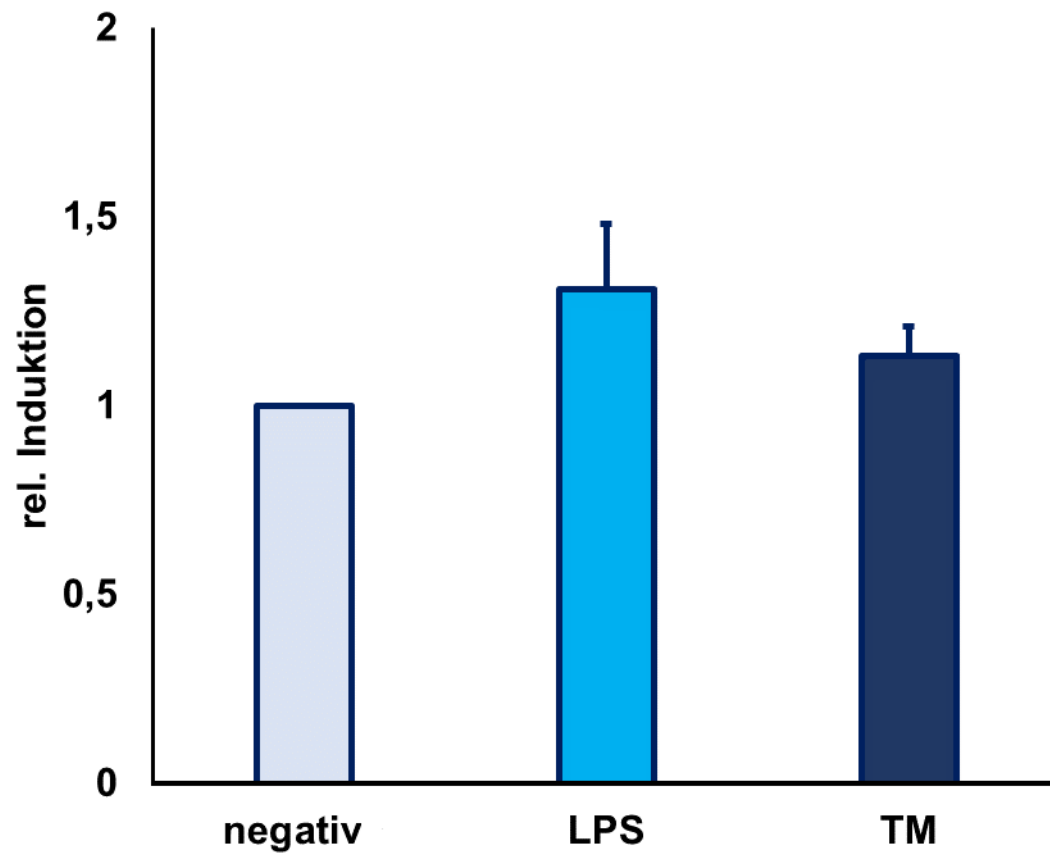


Abbildung 7: Relative Expression von IRAK1 in SCC25-Zellen nach Stimulation mit LPS oder TM im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (n = 3).

5.1.3 Expression von TLR2 auf SCC-25

Die Expression von TLR2 lag bei SCC-25 nach Stimulation mit Pam3CSK4 bei dem 1,05-fachen und nach Stimulation mit TM bei dem 1,16-fachen der nicht-stimulierten Kontrolle. (Abbildungen 8 und 9).

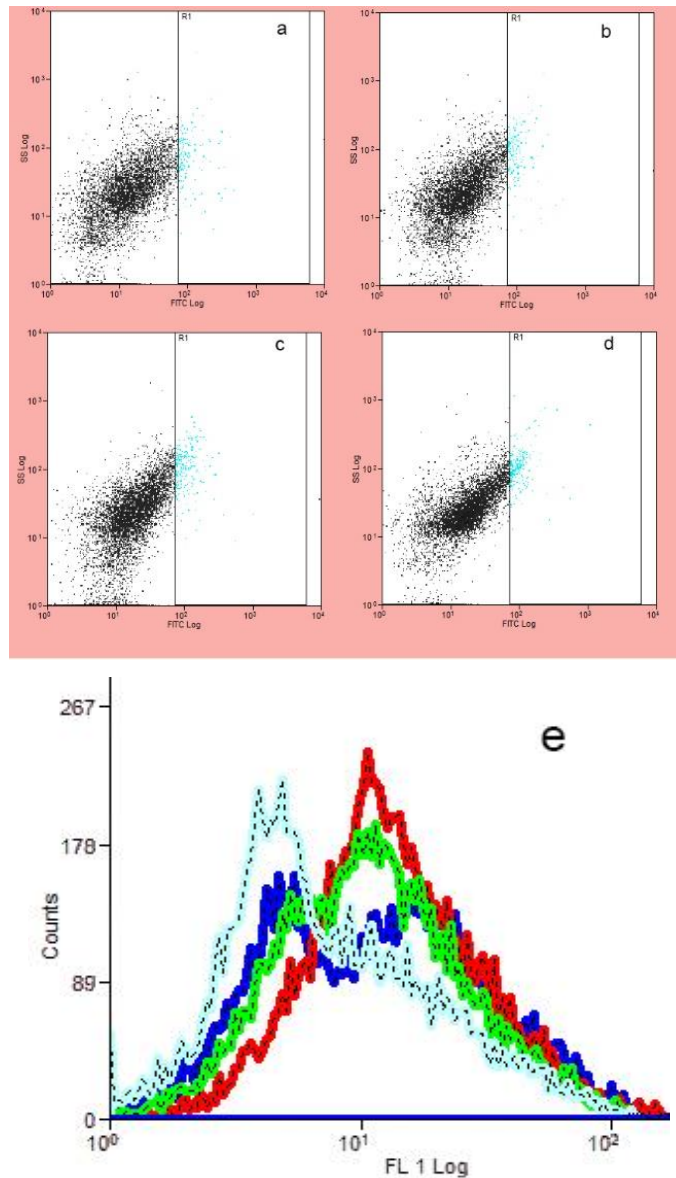


Abbildung 8: Durchflusszytometrische Messung der TLR2-Expression auf SCC-25.

a-d: Dotplot der TLR2-Expression auf SCC-25. Abszisse = Fluoreszenzintensität als Readout der Expression (FITC Log), Ordinate = Zellgranularität (SS Log) a = Isotyp-Kontrolle, b = negativ, c = LPS, d = TM.

e: Overlay der Histogramme der TLR2-Expression auf SCC-25. Counts (Ordinate) versus Fluoreszenzintensität als Readout der Expression (Abszisse) Türkis = Isotyp-Kontrolle, Grün = negativ, Rot = LPS, Blau = TM.

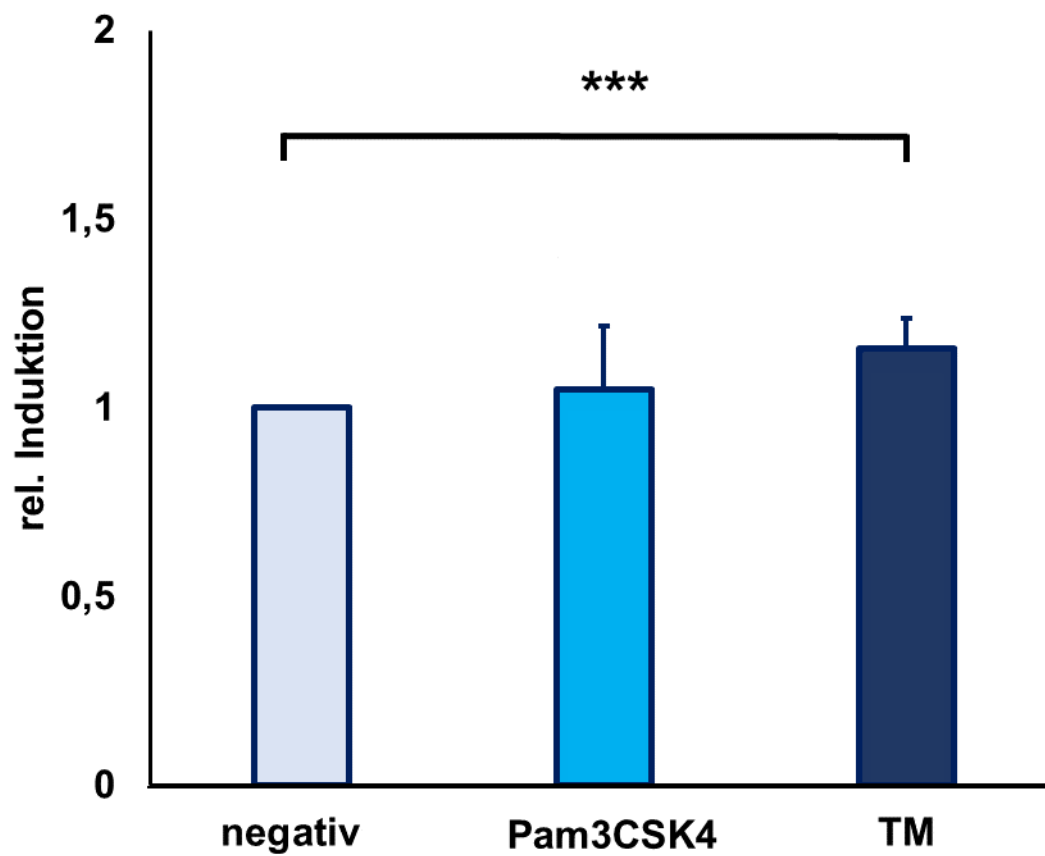


Abbildung 9: Relative Expression von TLR2 auf SCC25-Zellen nach Stimulation mit LPS oder TM im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (n=4), *** = $p < 0,01$.

5.1.4 Expression von TLR2 auf IHGK

Die Expression von TLR2 lag bei den IHGK nach Stimulation mit Pam3CSK4 bei dem 1,15-fachen und nach Stimulation mit TM bei dem 1,14-fachen der nicht-stimulierten Kontrolle (Abbildungen 10 und 11).

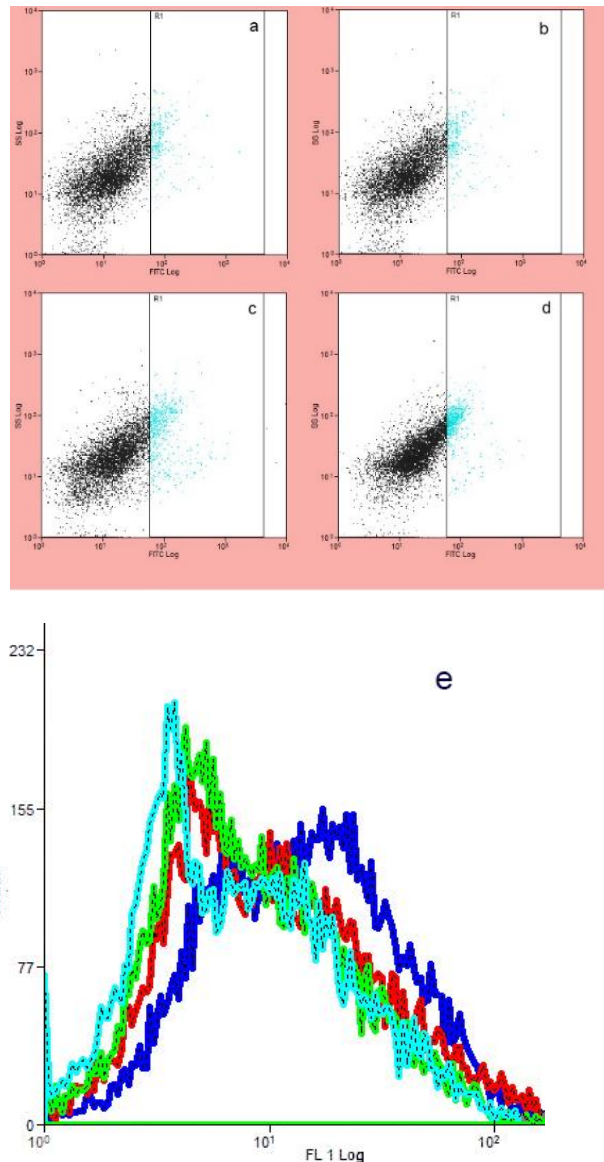


Abbildung 10: Durchflusszytometrische Messung der TLR2-Expression auf IHGK.

a-d: Dotplot der TLR2-Expression auf IHGK. Abszisse = Fluoreszenzintensität als Readout der Expression (FITC Log), Ordinate = Zellgranularität (SS Log) a = Isotyp-Kontrolle, b = negativ, c = LPS, d = TM

e: Overlay der Histogramme der TLR2-Expression auf IHGK. Counts (Ordinate) versus Fluoreszenzintensität als Readout der Expression (Abszisse) Türkis = Isotyp-Kontrolle, Grün = negativ, Rot = LPS, Blau = TM.

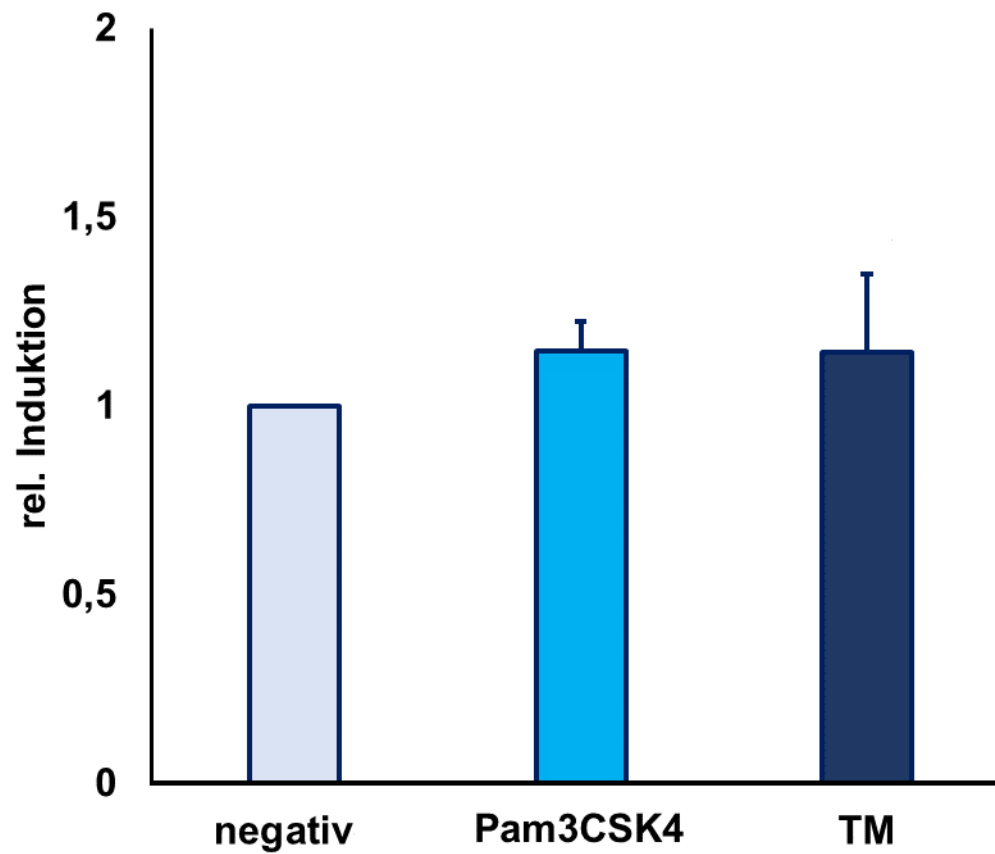


Abbildung 11: Relative Expression von TLR2 auf IHGK nach Stimulation mit LPS oder TM im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (n=4).

5.1.5 Expression von TLR4 auf IHGK

Die Analyse von TLR4 auf IHGK ergab nach Stimulation mit LPS eine 1,04-fache und nach Stimulation mit TM eine 1,24-fache Expression im Vergleich zur Negativkontrolle (Abbildungen 12 und 13).

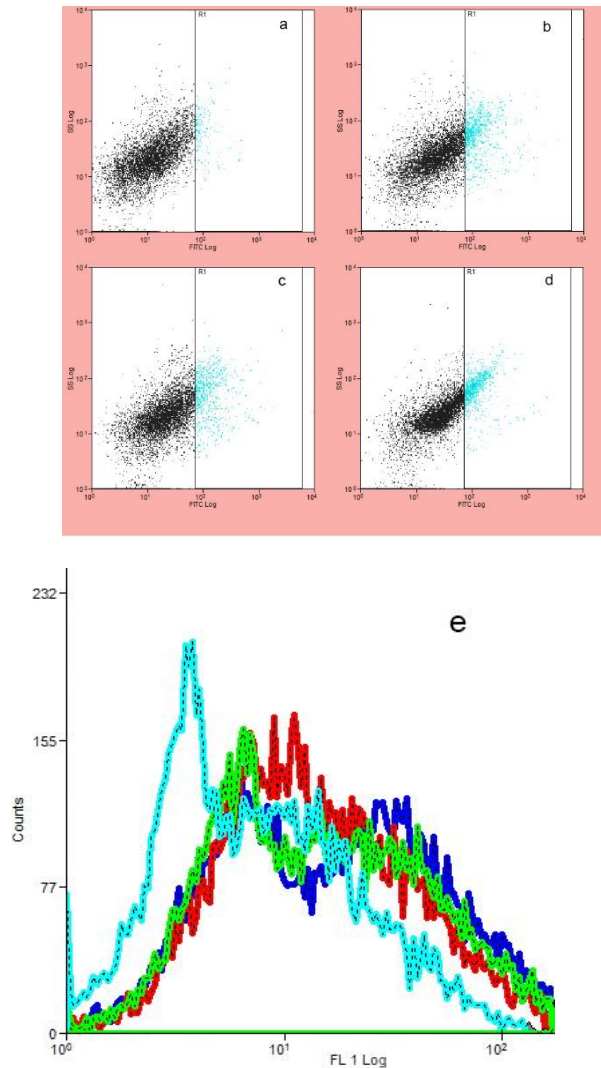


Abbildung 12: Durchflusszytometrische Messung der TLR4-Expression auf IHGK.

a-d: Dotplot der TLR4-Expression auf IHGK. Abszisse = Fluoreszenzintensität als Readout der Expression (FITC Log), Ordinate= Zellgranularität (SS Log)
a = Isotyp-Kontrolle, b = negativ, c = LPS, d = TM

e: Overlay der Histogramme der TLR4-Expression auf IHGK. Counts (Ordinate) versus Fluoreszenzintensität als Readout der Expression (Abszisse) Türkis = Isotyp-Kontrolle, Grün = negativ, Rot = LPS, Blau = TM.

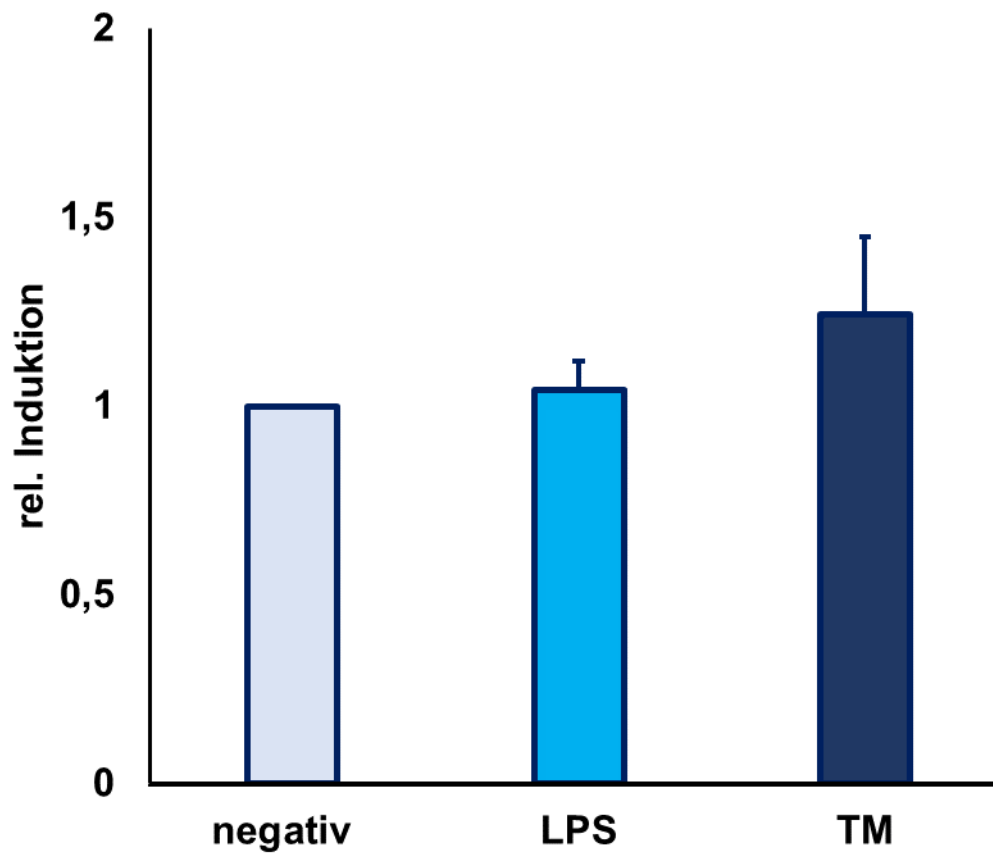


Abbildung 13: Relative Expression von TLR4 auf IHGK nach Stimulation mit LPS oder TM im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (n=4).

5.1.6 Expression von TLR4 auf SCC-25

Bei den SCC-25 Zellen lag die TLR4-Expression nach Stimulation mit LPS bei dem 1,02-fachen und nach Stimulation mit TM bei dem 1,11-fachen der nicht-stimulierten Kontrolle (Abbildungen 14 und 15).

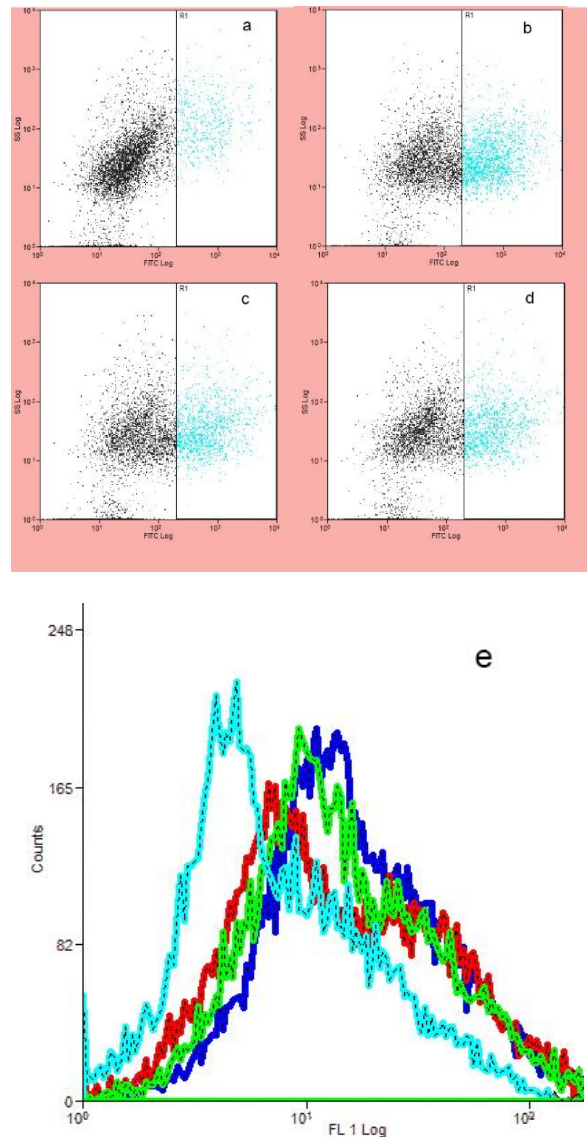


Abbildung 14: Durchflusszytometrische Messung der TLR4-Expression auf SCC-25.

a-d: Dotplot der TLR4-Expression auf SCC-25. Abszisse = Fluoreszenzintensität als Readout der Expression (FITC Log), Ordinate = Zellgranularität (SS Log)
a = Isotyp-Kontrolle, b = negativ, c = LPS, d = TM.

e: Overlay der Histogramme der TLR4-Expression auf SCC-25. Counts (Ordinate) versus Fluoreszenzintensität als Readout der Expression (Abszisse)
Türkis = Isotyp-Kontrolle, Grün = negativ, Rot = LPS, Blau = TM.

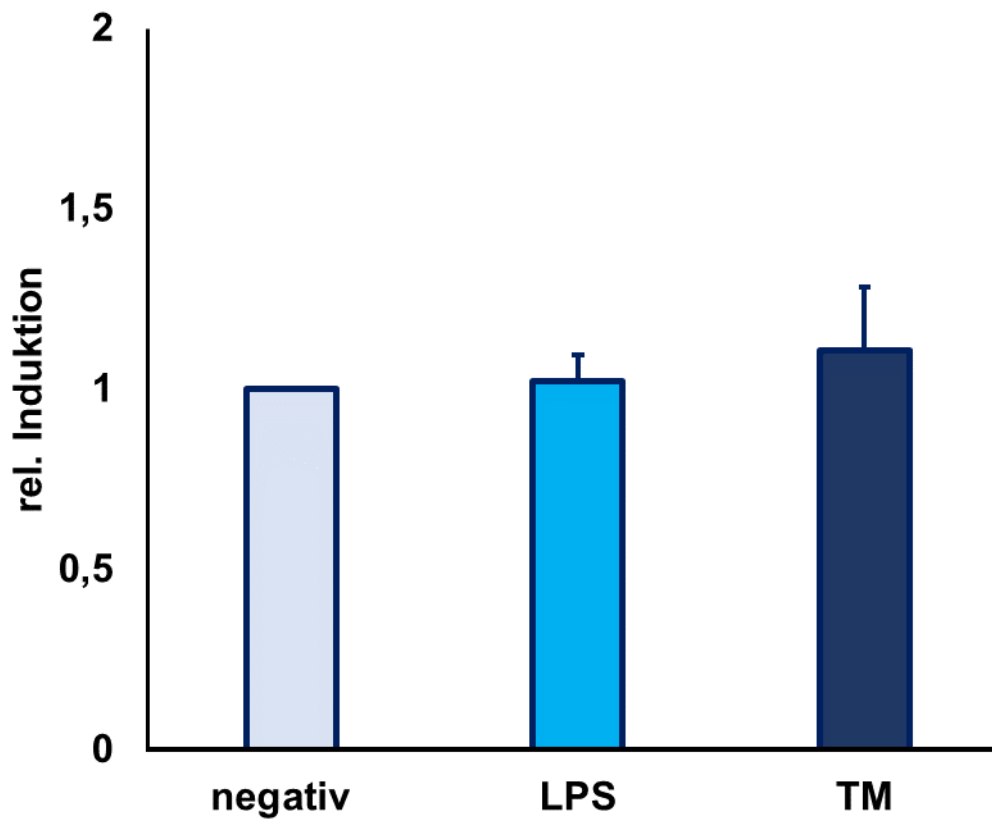


Abbildung 15: Relative Expression von TLR4 auf SCC-25-Zellen nach Stimulation mit LPS oder TM im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (n=4).

5.2 Western-Blot

5.2.1 IRAK1-Expression in SCC-25 bei Inhibierung von TLR2

Die Ergebnisse der Western-Blot-Analyse von IRAK1 bei Inhibierung von TLR2 auf SCC-25 Zellen sind in Tabelle 6 und Abbildung 16 gezeigt.

Tabelle 4: Expression von IRAK1 bei Inhibierung von TLR2 auf SCC-25-Zellen, quantifiziert durch Western-Blot.

Probe	Relative Expression
neg + Anti-hTLR2-IgA (I2)	2,30
TM	6,34
TM + I2	4,52
Pam3CSK4	1,83
Pam3CSK4 + I2	5,59

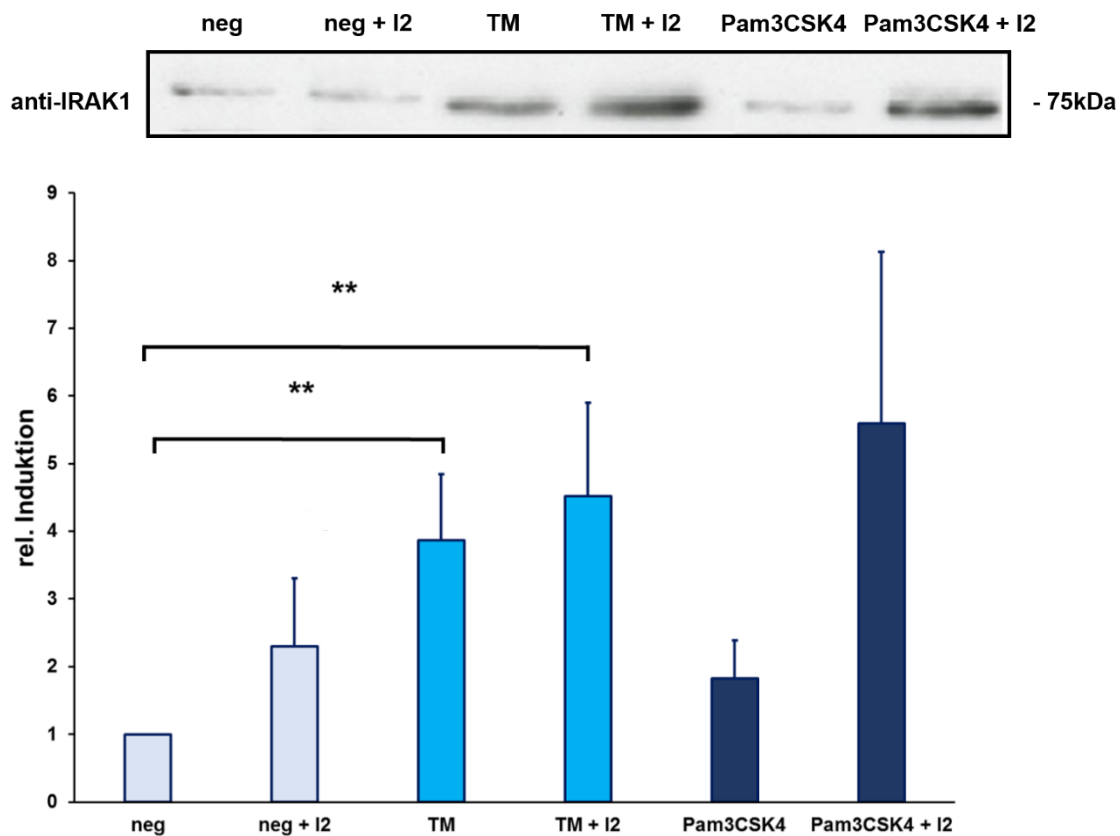


Abbildung 16: Relative Proteinexpression von IRAK1 in SCC-25-Zellen ± Anti-hTLR2-IgA (I2) bei Stimulation mit Pam3CSK4 oder TM im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (n=3), ** = p < 0,05.

5.2.2 IRAK1-Expression in SCC-25 bei Inhibierung von TLR4

Tabelle 7 und Abbildung 17 zeigen die Ergebnisse der Western-Blot-Analyse der IRAK1-Expression mit Inhibierung von TLR4 in SCC-25-Zellen.

Tabelle 5: Expression von IRAK1 bei Inhibierung von TLR4 auf SCC-25-Zellen, quantifiziert durch Western-Blot.

Probe	Relative Expression
neg + Anti-hTLR4-IgG (I4)	3,06
TM	6,34
TM + I4	12,52
LPS	5,03
LPS + I4	8,20

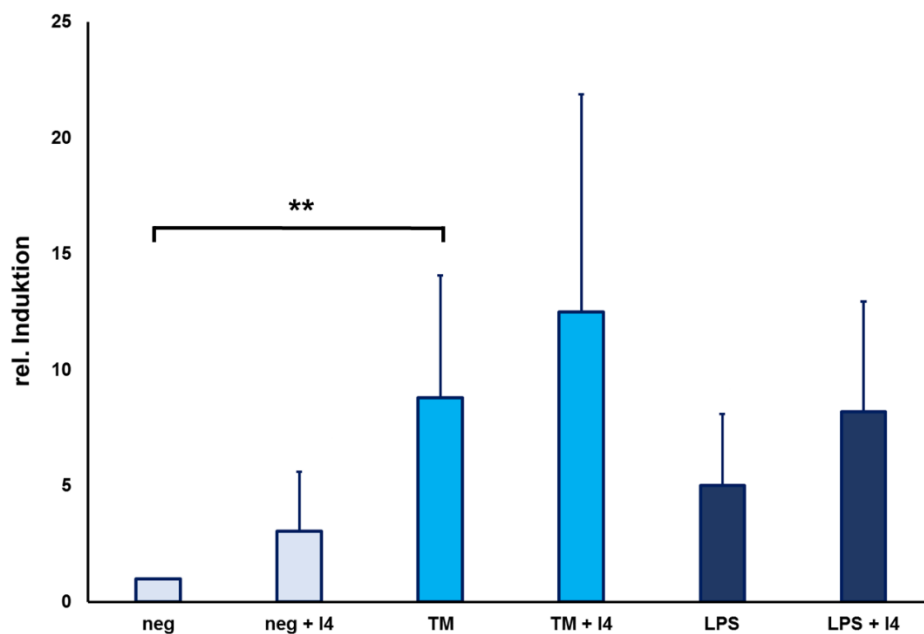
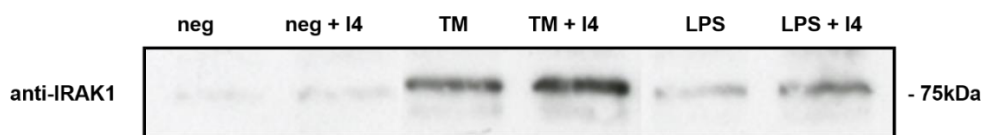


Abbildung 17: Relative Proteinexpression von IRAK1 in SCC-25-Zellen $\pm$ Anti-hTLR4-IgG (I4) bei Stimulation mit LPS oder TM im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (n=3), ** = $p < 0,05$.

5.2.3 IRAK1-Expression in IHGK

Die Banden für IRAK1 der stimulierten IHGK waren bei den Versuchsreihen zur IRAK1-Expression mit den TLR2- und TLR4-Inhibitoren vergleichsweise schwach und die Negativkontrolle zeigte keinerlei detektierbare Aktivität, sodass eine Auswertung mittels ImageJ nicht möglich war.

Bei einer Versuchsreihe ohne Inhibitoren mit IHGK-Stimulation lag die IRAK1-Expression nach Stimulation mit LPS bei dem 2,55-fachen und nach Stimulation mit TM bei dem 4,91-fachen der nicht-stimulierten Kontrolle (Abbildung 18).

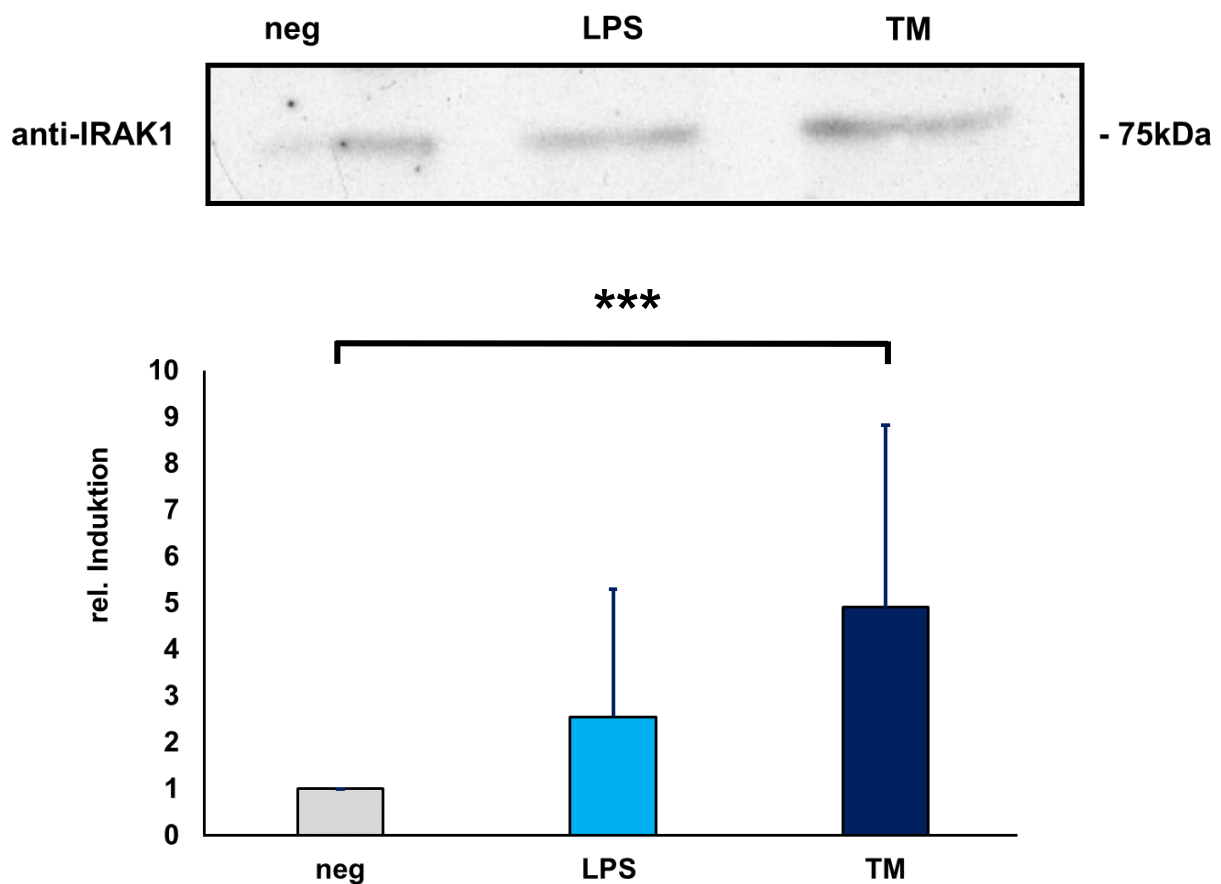


Abbildung 18: Relative Proteinexpression von IRAK1 in IHGK nach Stimulation mit LPS oder TM im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (n=10), *** = $p < 0,01$.

5.2.4 TLR2-Expression auf SCC-25

Die Expression von TLR2 lag bei SCC-25 nach Stimulation mit Pam3CSK4 bei dem 1,22-fachen und nach Stimulation mit TM bei dem 1,56-fachen der nicht-stimulierten Kontrolle (Abbildung 19).

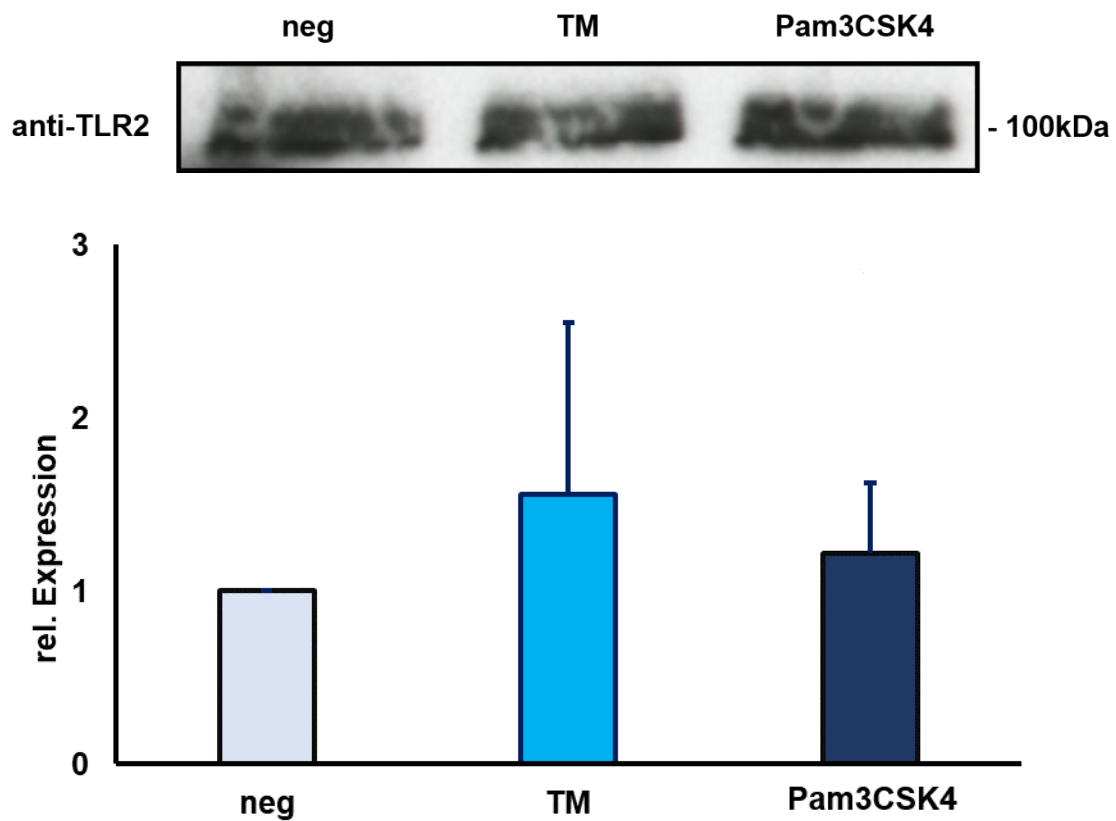


Abbildung 19: Relative Proteinexpression von TLR2 auf SCC-25-Zellen nach Stimulation mit Pam3CSK4 und TM im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (n=4).

5.2.5 TLR2-Expression auf IHGK

Die TLR2-Expression betrug auf den IHGK nach Stimulation mit Pam3CSK4 das 0,9-fache der Expression ohne Stimulation. Nach Stimulation mit TM verringerte sich die Expression auf das 0,31-fache (Abbildung 20).

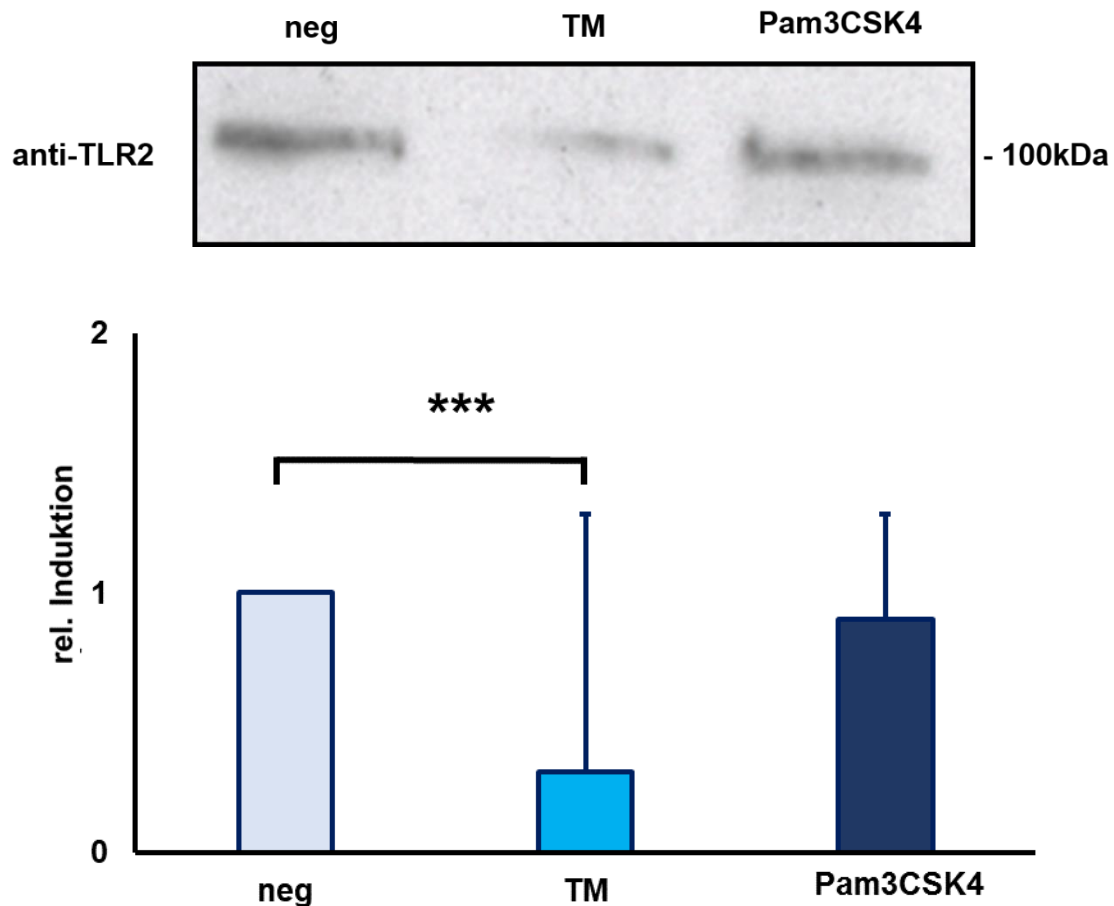


Abbildung 20: Relative Proteinexpression von TLR2 auf IHGK-Zellen nach Stimulation mit Pam3CSK4 und TM im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (n=4) *** = $p < 0,01$.

5.2.6 TLR4-Expression auf SCC-25

Die Expression von TLR4 lag bei SCC-25 nach Stimulation mit LPS bei dem 1.11-fachen und nach Stimulation mit TM bei dem 1,01-fachen der nicht-stimulierten Kontrolle (Abbildung 15).

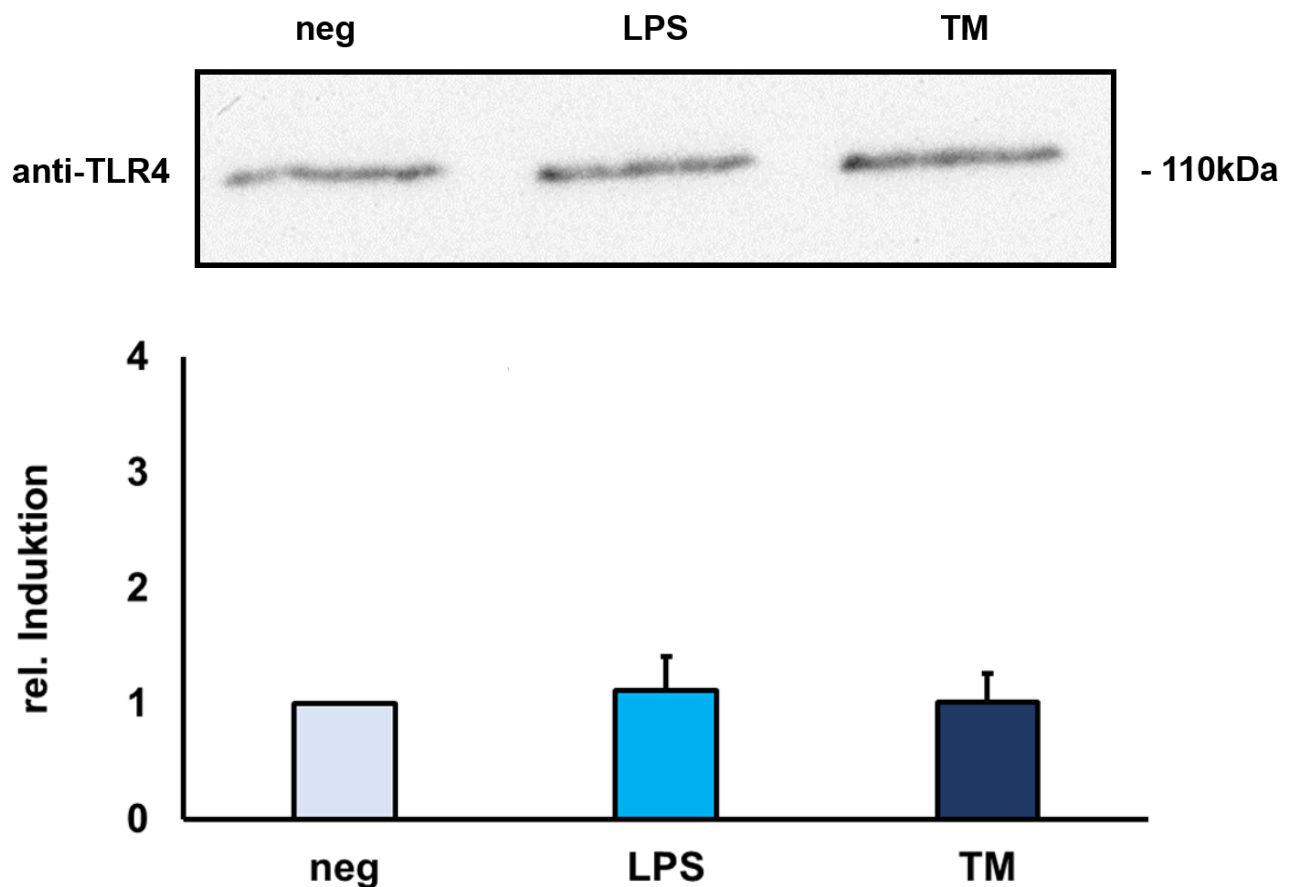


Abbildung 21: Relative Proteinexpression von TLR4 auf SCC-25-Zellen nach Stimulation mit LPS und TM im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle n=13.

5.2.7 TLR4-Expression auf IHGK

Die Expression von TLR4 lag bei den IHGK nach Stimulation mit LPS bei dem 1,14-fachen und nach Stimulation mit TM bei dem 1,03-fachen der nicht-stimulierten Kontrolle (Abbildung 22).

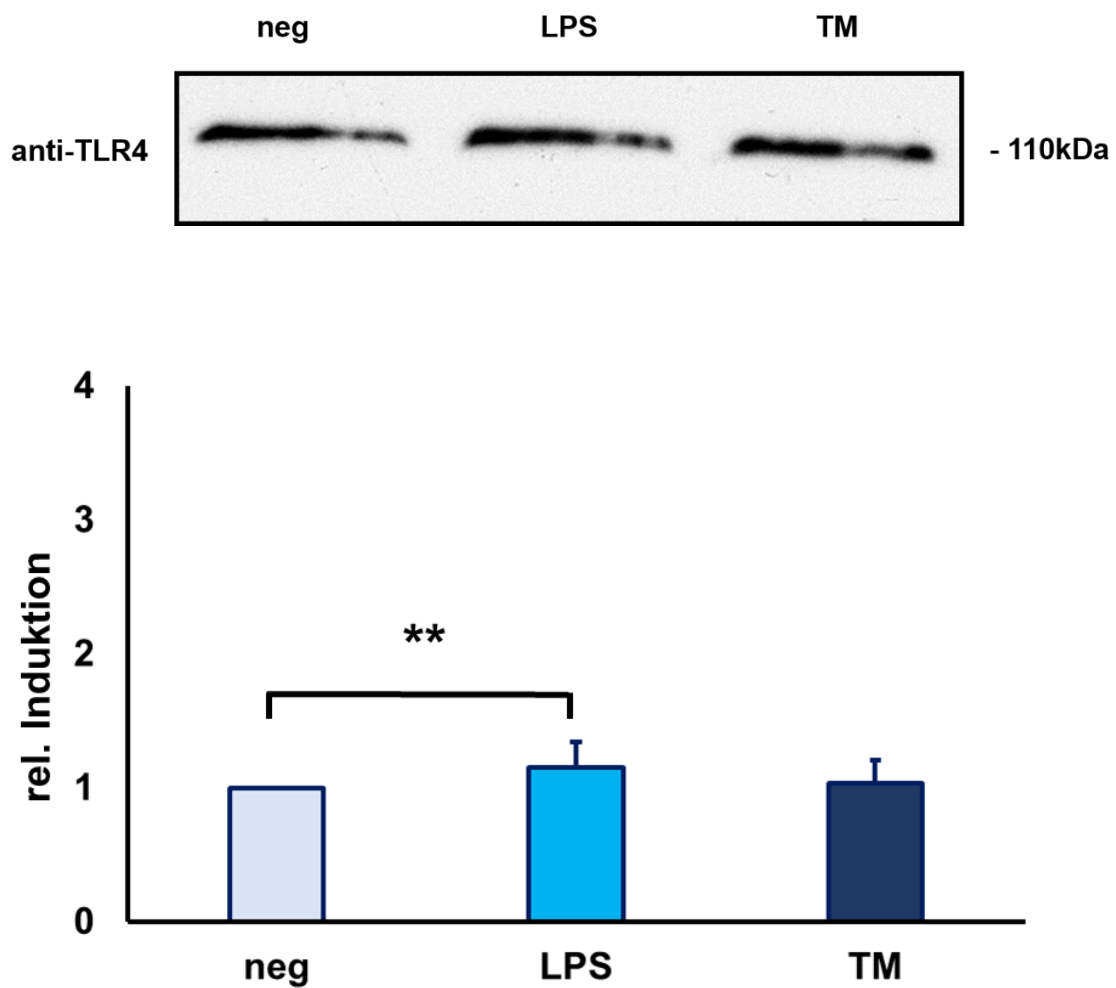


Abbildung 22: Relative Proteinexpression von TLR4 auf IHGK nach Stimulation mit LPS oder TM im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (n=11), ** = $p < 0,05$.

6. Diskussion

Ziel dieser Studie war es, die Expression der Toll-like Rezeptoren TLR 2 und 4 sowie deren Signalmolekül IRAK1 (Interleukin-1-Rezeptor-assoziierte Kinase 1) nach Inkubation mit spezifischen Agonisten, Inhibitoren und der Membranfraktion von *P. gingivalis* mittels Durchflusszytometrie und Western-Blot auf oralen Epithelzellen zu untersuchen.

Während sich die im Rahmen dieser Arbeit gemessene Expression von TLR2 auf den IHGK in der durchflusszytometrischen Untersuchung nach Stimulation durch die Membranfraktion von *P. gingivalis* (TM) und Pam3CSK4 nicht veränderte, ergab die Analyse mittels Western-Blot eine durch TM induzierte Herunterregulation von TLR2. Die Expression von TLR2 auf SCC-25-Zellen war in den Analysen der Western-Blots und der durchflusszytometrischen Analyse unverändert. Eine Studie, die aus Patientenproben entnommene Larynx-Plattenepithelkarzinomzellen und nicht tumoröse Epithelzellen untersuchte, zeigte eine Erhöhung der Menge an TLR2-mRNA und eine höhere Proteinexpression auf den Karzinomzellen im Vergleich zum benachbarten normalen Epithelgewebe [222]. Möglicherweise sind die Unterschiede der gemessenen Expression zwischen den immortalisierten humanen gingivalen Keratinozyten (IHGK) und den Plattenepithelkarzinomzellen (SCC-25) mit einer für Tumorzellen spezifischen Regulierung als Reaktion auf bakterielle Reize im Vergleich zu nicht malignen Zellen erklärbar.

Die mittels Western-Blot ermittelte 0,31-fach verminderte TLR2-Expression, induziert durch TM auf den IHGK, gegenüber der nicht veränderten Expression nach durchflusszytometrischer Analyse, könnte zum Teil methodische Hintergründe haben. Western-Blot und die durchflusszytometrische Untersuchung unterscheiden sich sehr stark vom methodischen Ansatz. Während in der Durchflusszytometrie native antigene Strukturen mittels Antikörpermarkierung auf Zellebene nachgewiesen werden können, erfasst der Western-Blot denaturierte Proteine, die nach ihrer molaren Masse aufgetrennt wurden. Die Durchflusszytometrie hat den Vorteil, dass die nachzuweisenden Antigene auf zellulärer Ebene und im unveränderten Zustand dargestellt werden können. Der Western-Blot hat den Vorteil, dass er sehr sensitiv ist und selbst geringe Antigenmengen detektieren kann [223, 224]. Beide Methoden ergänzen sich daher im Prinzip sehr gut.

In anderen *in vitro* Versuchen wurden aus Patientenblut gewonnene Monozyten, welche zu dendritischen Zellen differenziert wurden, für 24 und 48 h mit verschiedenen Stämmen von *P. gingivalis* und *A. actinomycetemcomitans* stimuliert [225]. Danach wurde die Expression von TLR2 und TLR4 mittels Durchflusszytometrie und Polymerase-Kettenreaktion quantifiziert. Die durchflusszytometrische Analyse ergab im Einklang mit der hier vorliegenden Arbeit ebenfalls keine wesentliche Erhöhung der Expression von TLR2 nach Stimulation mit beiden Bakterienarten. Die Analyse mittels PCR ergab eine Hochregulation der TLR2-mRNA-Expression nur bei den Zellen, welche mit Stämmen von *A. actinomycetemcomitans* stimuliert wurden, nicht aber mit Stämmen von *P. gingivalis*. Die Ergebnisse der PCR-Analyse sind somit in Übereinstimmung mit denen der vorliegenden Studie. Interessanterweise zeigten sich Unterschiede zwischen den einzelnen Stämmen von *A. actinomycetemcomitans*. Die TLR2-Expression wurde durch *A. actinomycetemcomitans* ATCC 43718 stärker hochreguliert als durch die Stämme *A. actinomycetemcomitans* ATCC 43717 und ATCC 43719. Die Autoren betrachten als möglichen Grund für dieses Phänomen die unterschiedlichen O-polysaccharid-Strukturen im LPS von *A. actinomycetemcomitans* ATCC 43718 im Vergleich zu den beiden anderen Stämmen.

Untersuchungen legen nahe, dass das LPS von *P. gingivalis* ebenfalls strukturelle Unterschiede aufweist und multiple Lipid-A-Spezies gebildet werden, welche alternativ TLR2 oder TLR4 binden können [226]. Die Reaktionen auf LPS von *P. gingivalis* könnten als heterogen bezeichnet werden, da sowohl agonistische als auch antagonistische Effekte auf TLR2 und TLR4 demonstriert wurden [226-228]. Die Diversität von *P. gingivalis* könnte auch erklären, warum die im Folgenden vorgestellten Studien zu gegensätzlichen Ergebnissen im Vergleich zu der hier vorgestellten Studie kommen.

In den Studien von Aswarpati (2013) und Lu et al. (2018) wurde der gering virulente Labor-Referenzstamm *P. gingivalis* ATCC 33277 im Gegensatz zu dem hier verwendeten hochvirulenten Stamm W83 zur Stimulation benutzt. Hierbei wurden humane gingivale Fibroblasten für 2 bzw. 24 Stunden mit *P. gingivalis* ATCC 33277 und LPS von *P. gingivalis* stimuliert. Die Ergebnisse zeigten nach PCR-Analyse eine dosisabhängige Hochregulierung der TLR2-mRNA [229].

Eine weitere Studie von Lu et al. (2018) untersuchte die Expression von TLR2 und TLR4 auf THP-1 Zellen [230]. Hierbei wurden THP-1 Zellen, eine humane monozytische Zelllinie, die von einem Patienten mit akuter monozytischer Leukämie stammt, für 24 h mit *P. gingivalis* ATCC 33277, *P. gingivalis*-Isolaten aus Patienten mit chronischer Parodontitis und *E. coli* ATCC 25922 stimuliert. Ein Teil der Zellen wurde nach 24 h zur Analyse geerntet der andere Teil wurde restimuliert und nach weiteren 24 h geerntet. Die durchflusszytometrische Analyse ergab eine erhöhte Expression von TLR2 für alle Stimulantien, wobei *E. coli* ATCC 25922 zu einer höheren Expression führte als *P. gingivalis* ATCC 33277 und *P. gingivalis* aus klinischen Isolaten. Ein Unterschied zwischen *P. gingivalis* ATCC 33277 und den klinischen Isolaten wurde nicht gezeigt. Die Re-Stimulation nach 24 h führte zu keiner nennenswerten Änderung der Expression. Die Ergebnisse zeigten im Gegensatz zu den hier vorgestellten Untersuchungen eine Hochregulierung von TLR2 nach Stimulation. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte in den unterschiedlichen verwendeten Stämmen von *P. gingivalis* liegen.

Der in der vorliegenden Arbeit eingesetzte Stamm W83 unterscheidet sich vom Stamm ATCC 3327 in mehreren Eigenschaften. So verfügt *P. gingivalis* ATCC 33277 über keine extrazelluläre Kapsel und weist eine geringere Virulenz im Vergleich zu *P. gingivalis* W83 auf. Microarray-Analysen, welche das Genom der Stämme ATCC 33277 und W83 verglichen, ergaben eine 7%ige Sequenzdifferenz [231]. Während Genomgröße und GC-Gehalt übereinstimmten, wurden umfangreiche genomische Rearrangements zwischen den beiden Stämmen nachgewiesen [232]. Unterschiedliche Ergebnisse könnten auch durch die Form, in der *P. gingivalis* zur Stimulation verwendet worden ist, bedingt sein. Während Aswarpati et al. LPS aus *P. gingivalis* und Lu et al. *P. gingivalis* als lebendes Bakterium verwendeten, nutzte die hier vorgestellte Studie die Membranfraktion von *P. gingivalis*. Eine Studie von Ji et al. 2007 mit einer humanen oralen Keratinozyten-Zelllinie (HOK-16B) zeigte unterschiedliche Zytokinproduktion als Reaktion auf lebende im Vergleich zu lysierten parodontalpathogene Keime [60].

Die Studie von Kwon et al. (2010), in der equine Monozyten für 1 h, 4 h, 8 h, 12 h und 20 h mit Pam3CSK4 stimuliert wurden, demonstrierte eine zeitabhängige Veränderung der Expression von TLR2 [233]. Die Untersuchung

mittels PCR ergab, dass die Genexpression von TLR2 nach Stimulation mit Pam3CSK4 nach 4 h am höchsten war. Die Genexpression sank danach kontinuierlich über die folgenden 8–12 h. Nach 20 h hatte sich die gemessene Expression der nicht-stimulierten Kontrolle angenähert. Die hier vorgestellte Studie, in der die Proben 24 h nach Stimulation entnommen wurden, zeigte auf Proteinebene und auf der Zelloberfläche keine Hochregulation der TLR2-Expression nach Stimulation mit Pam3CSK4. Daher könnte auch bei den hier untersuchten Zellen die Expression zunächst angestiegen und nach 24 h wieder auf das Niveau vor der Stimulation abgefallen sein.

Weitere Gründe für die unterschiedliche Expression könnten in den verwendeten Zelltypen liegen. Während in der hier vorgestellten Arbeit Epithelzellen verwendet worden sind, wurden in den zum Vergleich herangezogenen Studien dendritische Zellen, Monozyten und Fibroblasten verwendet. Untersuchungen an erkranktem parodontalen Gewebe zeigten, dass vor allem Antigen-präsentierende Zellen wie Makrophagen und dendritische Zellen mit einer erhöhten TLR2- und TLR4-Expression assoziiert sind [234, 235].

Die durchflusszytometrischen Messungen ergaben, dass die Stimulation mit LPS und TM keinen Einfluss auf die Expression von TLR4 auf der Zellmembran von IHGK und SCC-25-Zellen hatte. Die Western-Blots zeigten ebenfalls keine Erhöhung der Proteinexpression von TLR4 in IHGK und SCC-25-Zellen nach Stimulation. Während bei den Versuchen von Zuniga et al. (2015) die durchflusszytometrische Analyse ebenfalls keine Erhöhung der Expression von TLR4 nach Stimulation durch verschiedene Stämme von *P. gingivalis* und *A. actinomycetemcomitans* ergab, zeigten die Ergebnisse von Lu et al. (2018) eine Hochregulierung von TLR4 auf der Zellmembran von THP-1-Zellen nach 24-stündiger Stimulation mit *P. gingivalis* ATCC 33277, *P. gingivalis*-Isolaten aus Patienten mit chronischer Parodontitis und *E. coli* ATCC 25922 [225, 230]. Die Re-Stimulation für weitere 24 h führte zu keiner weiteren Erhöhung der Expression. Auf mRNA-Ebene wurde in den Versuchen von Diaz-Zuniga et al. (2015) bei der Analyse mittels PCR ebenfalls eine Zunahme der TLR4-Expression gezeigt. Hierbei stellte sich heraus, dass die Stämme W83 und HG184 eine stärkere Hochregulation der Expression induzieren als die Stämme ATCC 33277, A7A1-28, ATCC 49417, HG1690 und HG1691.

Eine mögliche Erklärung könnte neben den verschiedenen verwendeten Zelltypen, eine unterschiedliche Interaktion zwischen Lipid A von *P. gingivalis* und TLR4 sein. Der Aufbau von Lipid A ist abhängig vom Nährstoffangebot. So können Unterschiede in den Wachstumsbedingungen der Bakterien zur Synthese von Lipid A mit differierenden molekularen Strukturen führen [226]. Je nach Wachstumsbedingungen wurden 4 verschiedene Varianten von Lipid A nachgewiesen. Es wurde gezeigt dass vor allem die Häminkonzentration im Nährmedium für die Bildung unterschiedlicher Varianten verantwortlich ist. Ist die Häminkonzentration unter 1 µg/ml, wird vor allem die 5-Acyl-Monophosphat-Lipid A Variante gebildet. Ist die Häminkonzentration hoch mit über 10 µg/ml so wird überwiegend 4-Acyl-Monophosphat-Lipid A und zu unterschiedlichen Anteilen die 5-Acyl-Diphosphat-Lipid A Variante gebildet. Ist die Häminkonzentration zwischen 1 und 10 µg/ml wird 4-Acyl-non-Phosphat-Lipid A gebildet. Dies ist die häufigste Form des Wildtyp-Stammes von *P. gingivalis*, welche unter Bedingungen mit geringer Häminkonzentration gebildet wird. LPS angereichert mit 5-Acyl-Monophosphat-Lipid A und 5-Acyl-Diphosphat-Lipid A bindet an TLR4 als Agonist. LPS-Präparationen, welche mit 4-Acyl-Nonphosphat-Lipid A und einer geringen Menge an 5-Acyl-Monophosphat-Lipid angereichert sind, sind schwach TLR4 agonistisch. Dies deutet darauf hin, dass die 4-Acyl-Nonphosphat-Lipid A Variante keine Affinität zu TLR4 besitzt. Die 4-Acyl-Monophosphat-Lipid A Variante wirkt hingegen als TLR4-Antagonist.

Im entzündeten Gewebe kommt es bedingt durch die Erhöhung der Vaskularität auch zu einer erhöhten Häminkonzentration, hierdurch könnte sich der Anteil der 4-Acyl-Monophosphat-Lipid A Variante erhöhen und eine immunsuppressive Wirkung durch einen TLR4-Antagonismus begünstigt werden. Dies wiederum könnte zur Immunevasion von *P. gingivalis* beitragen.

Während die Ergebnisse einer Studie von Wu et. al. (2018) auf mRNA-Ebene mit denen der hier vorgestellten Studie für einen Teil der verwendeten Zelltypen konform sind, wurde bei einem Teil der Zellen sowohl eine verminderte als auch eine erhöhte TLR4-Expression nach Stimulation festgestellt [236]. In den Untersuchungen von Wu et al. wurde die mRNA-Expression von TLR4 in aus Hasen entnommenen mononukleären Zellen, Kupferzellen, Alveolarmakrophagen und Peritonealmakrophagen, die für 24 h mit LPS von *P. gingivalis* und *E. coli* stimuliert wurden, mittels quantitativer Real Time PCR

analysiert. Die Ergebnisse zeigten eine verminderte TLR4-mRNA-Expression nach Stimulation in mononukleären Zellen und den Peritonealmakrophagen. Bei den Kupfferzellen und Alveolarmakrophagen kam es zu keiner Hochregulierung der Expression nach Stimulation. Im Rahmen der Studie wurden die gleichen Zelltypen aus hyperlipidämischen Hasen gewonnen. Dabei reagierten die Kupfferzellen und Peritonealmakrophagen mit einer verminderten TLR4-Expression nach Stimulation mit LPS aus *E. coli*, während die Expression nach Stimulation mit LPS aus *P. gingivalis* unverändert blieb. Die mononukleären Zellen, die aus den hyperlipidämischen Hasen gewonnen wurden, reagierten mit verstärkter TLR4-Expression nach Stimulation mit LPS von *P. gingivalis*. LPS von *E. coli* hingegen führte zu einer verminderten Expression von TLR4-mRNA. Die Alveolarmakrophagen reagierten mit erhöhter TLR4-Expression sowohl nach Stimulation mit LPS von *P. gingivalis* als auch mit LPS von *E. coli*. Die unterschiedlichen Expressionslevels lassen auf einen komplexen Mechanismus schließen, welcher nicht nur vom Zelltyp abhängig ist, sondern auch von systemischen Erkrankungen beeinflusst werden kann. Die hier gezeigte Studie analysierte im Gegensatz zu den vorher genannten Vergleichsstudien, die Expression auf Proteinebene. Nachgewiesene mRNA Quantifizierungen lassen zum einen nicht unbedingt auf die gebildete Proteinmenge schließen, zum anderen ist auch ein Proteinabbau im Verlauf der Inkubationszeit denkbar.

In Gegensatz zu den hier vorgestellten Ergebnissen in Bezug auf LPS aus *E. coli* zeigten andere Studien eine Erhöhung der TLR4-Expression nach Stimulation mit *E. coli* LPS. Wang et al. (2017) untersuchten mittels Western-Blot und PCR aus Ratten gewonnene glatte Lungenmuskelzellen, welche für 24 h mit LPS aus *E. coli*, dem TLR4-Inhibitor TAK 242 und mit beiden Komponenten kombiniert inkubiert wurden [237]. Bei der alleinigen Inkubation mit LPS wurde eine erhöhte TLR4-Proteinexpression festgestellt, nach Zugabe von TAK242 und LPS war die Proteinexpression hingegen vermindert. Untersuchungen von Kwon et al. (2010) an equinen Monozyten zeigten nach Stimulation mit LPS aus *E. coli* einen kontinuierlichen Anstieg der TLR4-mRNA-Expression über einen Zeitraum von 20h [233]. Eine Studie von Li et al. (2007) untersuchte humane glatte Gefäßmuskelzellen, die mit LPS aus *E. coli* für 2h, 4h, 6h, 12h, 24h und 48h in verschiedenen Konzentrationen stimuliert wurden [238]. Die Expression von

TLR4 wurde hierbei mittels Real Time PCR, Western-Blot und Durchflusszytometrie analysiert. Die Ergebnisse zeigten einen Anstieg der TLR4-Expression sowohl auf der mRNA- als auch auf der Proteinebene. Wurden die Zellen mit 10 bzw. 100 ng LPS stimuliert, stieg die Expression zeitabhängig an und hatte nach 24 h das Maximum erreicht. Konzentrationen von 0,1 und 1 ng LPS hingegen hatten keinen Einfluss auf die Expression.

Ein Erklärungsansatz für die fehlende Regulation von TLR4 durch LPS aus *E. coli* in der hier vorgestellten Studie könnte sein, dass im Gegensatz zu Vergleichsstudien, in welchen Muskel- und immunkompetente Zellen verwendeten wurden, hier maligne und benigne transformierte Epithelzellen untersucht wurden. Ein weiterer möglicher Einflussfaktor könnte die LPS-Konzentration sein. Während in dieser Studie eine Konzentration von 10 µg/ml zur Stimulation verwendet wurden, kamen in anderen Studien Konzentrationen zwischen 100 pg/ml und 1 µg/ml zum Einsatz, dies allerdings bei immunkompetenten Zellen. Zu hohe Konzentrationen an Stimulanzien können bei diesen Zellen, insbesondere bei T-Zellen, zu einem Effekt führen, welcher als T Cell Exhaustion bekannt ist. Hierbei verlieren Zellen die Fähigkeit auf einen Stimulus zu reagieren [239]. Es bleibt zu diskutieren, inwieweit ein solcher Effekt auch bei Epithelzellen möglicherweise zum Tragen kommt. Die in dieser Studie verwendete Konzentration wurde auf Grundlage von Vorversuchen und der Herstellerempfehlungen gewählt.

Die Western-Blot-Analysen ergaben, dass IRAK1 in SCC-25-Zellen nach Stimulation mit TM, TM plus TLR2-Inhibitor, hochreguliert wurde.

Stimulation mit Pam3CSK4 plus TLR2-Inhibitor und LPS plus TLR4-Inhibitor löste eine Expressionsveränderung aus welche als statistischer Trend einzuordnen war. Stimulation mit LPS und Pam3CSK4 ohne Inhibitoren induzierte keine signifikante Veränderung der Expression. Die Versuchsreihe zur IRAK1-Expression auf IHGK Zellen mit Inhibitoren von TLR2 und TLR4 konnte aufgrund der sehr schwachen Expression in den IHGK nicht quantifiziert werden. Jedoch ergaben die im Vorfeld durchgeführten Western-Blot-Versuche ohne Einsatz von Inhibitoren eine Induktion von IRAK1 nach Stimulation mit TM. Die durch LPS ausgelöste Expressionsveränderung stellte statistisch einen Trend dar. Dies könnte ein Indiz für eine höhere Expression von IRAK1 auf den

Plattenepithelkarzinomzellen (SCC-25) als auf den Keratinozyten (IHGK) sein. Die Analyse mittels Durchflusszytometrie ergab eine schwache Hochregulation von IRAK1 in IHGK und in SCC-25-Zellen einen Trend in Richtung einer Expressionsveränderung nach Stimulation mit LPS und TM. Eine vergleichbare *in vitro*-Studie zeigte nach Stimulation mit LPS von *E. coli* (3h) eine Hochregulation der Proteinexpression von IRAK1 in THP1-Zellen [240]. Eine weitere Studie, die die immunkompetente, Mausmakrophagen-ähnliche Zelllinie RAW 264.7 für Untersuchungen verwendete, zeigte eine kurzzeitige Hochregulierung der Proteinexpression nach drei- bzw. sechsminütiger Stimulation mit LPS von *E. coli*, welche 7 min nach Stimulation wieder auf die Ausgangsexpression zurückging [241]. Die geringeren Zeitintervalle, in der die Hochregulierung auf diesen Zellen nachgewiesen wurde, könnte im Vergleich zu den hier verwendeten Epithelzellen auf eine schnellere Regulation der Rezeptorexpression in Makrophagen im Vergleich zu Epithelzellen hindeuten. Andere *in vivo*-Studien, welche Proben aus muriner Großhirnrinde nach Stimulation mit LPS von *E. coli* und *P. gingivalis* untersuchten, zeigten ebenfalls eine erhöhte IRAK1-Expression, sowohl auf Protein- als auch auf mRNA-Ebene im Vergleich zur nicht-stimulierten Kontrolle [242, 243].

Untersuchungen von Liu et al. (2012) mit murinen dendritischen Zellen weisen auf eine über TLR2 vermittelte Degradation von IRAK1 hin. Anders als in der hier vorgestellten Studie wurde in der Studie von Liu et al. IRAK1 90 min nach Stimulation mit Pam3CSK4 herunterreguliert [244].

Im Gegensatz zu den hier vorliegenden Ergebnissen zeigten Untersuchungen von Domon et al. (2008) eine verminderte IRAK1-Expression nach Stimulation mit LPS von *P. gingivalis* und *E. coli* [245]. Bei den Versuchen wurden THP-1 Zellen zu Makrophagen-ähnlichen Zellen differenziert und für 6 h, 9 h, 12 h, und 15 h mit LPS von *P. gingivalis* 381 und *E. coli* stimuliert. Die Analyse mittels Western-Blot ergab eine stark verminderte IRAK1-Expression nach Stimulation mit LPS aus *E. coli* zu allen Zeitpunkten. Dagegen war die Expression nach Stimulation mit LPS aus *P. gingivalis* nach 6 h vermindert und näherte sich danach kontinuierlich der Expression der nicht-stimulierten Kontrolle an [245]. Die Gründe für die unterschiedliche gemessene Expression zu den hier vorgestellten Ergebnissen könnten auch hier in den unterschiedlichen Zelltypen liegen. So zeigten Untersuchungen der TLR2- und TLR4-Signalwege eine

Zelltyp-spezifische Abhängigkeit in MyD88-defizienten Mäusen [246]. Hierbei wurde unter anderem die lokale Zytokinproduktion in unterschiedlichen Organen nach Sepsis-Induktion analysiert. Die Produktion der Zytokine TNF- α , IL-12 und IL-10 erwies sich als organspezifisch unterschiedlich. Zusätzlich wurden in Lunge und Leber die Chemokine MIP-2 (macrophage-inflammatory protein 2), und KC (Cytokine-induced Neutrophil Chemoattractant) MyD88-abhängig synthetisiert, während die Produktion in der Milz MyD88-unabhängig war. Da die Gewebe der verschiedenen Organe aus unterschiedlichen Zelltypen bestehen, lässt dies auf eine zellspezifische TLR-vermittelte Signaltransduktion in der Immunantwort schließen.

Unterschiedliche Stämme von *P. gingivalis* könnten ebenfalls ein Grund für Differenzen zwischen Ergebnissen verschiedener Untersuchungen sein. In Versuchen von Domon et al. (2008) wurde, im Gegensatz zu dem hier verwendeten W83-Stamm, *P. gingivalis* 381 verwendet. Nachweislich können unterschiedliche Stämme einer Bakterienspezies die akute adaptive Immunantwort in variabler Weise modifizieren [247]. Auch die Inkubationsdauer mit den Agonisten könnte bezüglich der IRAK1-Expression eine Rolle spielen. So demonstrierten verschiedene Studien eine zeitabhängige Veränderung der Rezeptorexpression [241, 245].

Zusammengefasst zeigte die hier vorgestellte Studie erstmalig die Auswirkungen verschiedener bakterieller Komponenten auf die Expression von TLR2, TLR4 und IRAK1 in immortalisierten humanen gingivalen Keratinozyten und oralen Plattenepithelkarzinomzellen. Die gezeigten Ergebnisse führen zu der Schlussfolgerung, dass Stimulation mit der Zellmembran von *P. gingivalis* eine Hochregulation von IRAK1 induziert. Sowohl eine Inhibierung des TLR2- als auch des TLR4-Signalwegs mittels eines blockierenden Antikörpers modifizierte diesen Effekt nicht. Der Mechanismus, durch welchen dieser Effekt ausgelöst wird, ist noch ungeklärt. Ein möglicher Erklärungsansatz wäre der Sachverhalt, dass TLR2 mit TLR1/6 bei der Aktivierung Bindungskomplexe eingeht. Möglicherweise ist eine Inhibierung lediglich des TLR2 nicht ausreichend, um die IRAK1 Hochregulation zu blockieren. TLR2 geht Interaktionen mit einer Vielfalt an Bindungsproteinen ein [248]. TLR2 bildet mit den strukturell ähnlichem TLR1 und TLR6 Heterodimere, die vermutlich zwischen di- und triacylierten Agonisten unterscheiden. Untersuchungen mit TLR6 defizienten Makrophagen aus Mäusen

zeigten, dass bei Zellen mit TLR6 Defizienz diacylierte Lipopeptide einen schwachen Stimulus darstellten, während triacylierte Lipopeptide als starker Stimulus fungierten [249]. TLR1-defiziente Maus-Makrophagen zeigen ein entgegengesetztes Verhalten [184]. Weiterführende Untersuchungen sind daher notwendig, um die zugrundeliegenden Mechanismen aufzuklären. So könnten in weiteren Experimenten unter anderem die Zytokine quantifiziert werden, welche von den Zellen produziert und in das überstehende Nährmedium abgegeben werden. Diese Untersuchungen könnten weitere Erkenntnisse im Hinblick auf Aktivierung von Rezeptoren und deren Signalwege liefern. Unter Berücksichtigung der hier verglichenen Studien wären weiterhin Probenentnahmen nach kürzeren Zeitintervallen sinnvoll.

Die Ergebnisse vergleichbarer Studien sind nicht einheitlich. Die Expression von IRAK1 und dessen Modulation durch infektiöse Stimulanzien ist noch nicht ausreichend untersucht. Studien, die sich mit epithelialen Zellen befassen, sind rar. Vergangene Studien untersuchten im Wesentlichen die Reaktionen immunkompetenter Zellen [230, 233, 236, 240, 241, 244, 245]. Deshalb wären zukünftig weitere Untersuchungen hilfreich, welche die zugrundeliegenden Vorgänge und Mechanismen weiter aufklären können.

7. Zusammenfassung

Porphyromonas gingivalis ist ein gramnegatives anaerobes Bakterium, welches in der Mundhöhle vorkommt und eine Schlüsselrolle bei der Entstehung der Parodontitis einnimmt [5]. Die Toll-like-Rezeptoren (TLR) 2 und 4 sind als Teil der initialen Immunantwort an der Erkennung von pathogenen Keimen und der daraus resultierenden Induktion von Entzündungsreaktionen beteiligt. Ein möglicher Zusammenhang zwischen Parodontitis und oralen Plattenepithelkarzinomen wird diskutiert [12, 13].

Ziel dieser *in vitro*-Studie war es, die Expression der Toll-like Rezeptoren 2 und 4 (TLR2 und TLR4) nach Stimulation auf immortalisierten humanen gingivalen Keratinozyten (IHGK) und einer oralen Plattenepithelkarzinom-Zelllinie (SCC-25) nachzuweisen. Nach 24-stündiger Inkubation mit deren spezifischen Agonisten, d. h. für TLR2 das synthetische triacylierte Lipopeptid Pam3CSK4 (Pam3CysSerLys4), für TLR4 das Lipopolysaccharid von *E. coli* (LPS) und bakteriellen Bestandteilen von *P. gingivalis*, (Präparate von dessen Zellmembran), wurden die Zellen mittels Durchflusszytometrie und Western-Blot untersucht.

Zur weiteren Aufklärung des Signalmechanismus wurde die Expression des TLR-Signalmoleküls Interleukin-1-Rezeptor-assozierte Kinase 1 (IRAK1) analysiert. Hierzu wurden die Zellen ebenfalls mit den TLR2- und TLR4-Agonisten und der Zellmembran von *P. gingivalis* stimuliert und nach 24 h mittels Durchflusszytometrie und Western-Blot analysiert. Weiterhin wurden spezifische Inhibitoren gegen TLR2 und TLR4 eingesetzt, um deren Einfluss auf die Expression von IRAK1 zu zeigen.

Die Expression von TLR4 änderte sich im Vergleich zur Negativkontrolle nicht oder nur sehr geringfügig. Die Expression von TLR2 nach Stimulation mit der Zellmembran von *P. gingivalis* war ebenfalls im Wesentlichen unverändert.

Die Expression von IRAK1 in SCC-25 Zellen hingegen wurde signifikant induziert durch die Zellmembran von *P. gingivalis* plus $\pm$ TLR2-Inhibitor. Die Stimulation mit der Zellmembran von *P. gingivalis* plus TLR4-Inhibitor löste keine signifikante Expressionsveränderung aus.

Die Analyse der IHGK ergab eine statistisch signifikante Induktion von IRAK1 nach Stimulation mit der Zellmembran von *P. gingivalis*.

Aus den hier gezeigten Ergebnissen lässt sich schließen, dass die Zellmembran von *P. gingivalis* eine Hochregulation von IRAK1 induziert. Der Rezeptor, in dessen Signalweg IRAK1 involviert ist, konnte nicht eindeutig geklärt werden, da weder der TLR2 noch der TLR4 Ligand eine Hochregulation von IRAK1 auslöste und eine Inhibierung weder von TLR2 noch von TLR4 mittels blockierender Antikörper diesen Effekt wesentlich beeinflussen konnte. Dieses Resultat ließe sich damit erklären, dass TLR2 mit TLR1/6 bei der Aktivierung Bindungskomplexe eingeht [180]. Möglicherweise ist eine Inhibierung des TLR2 bzw. TLR4 als einzelne Proteine nicht ausreichend, um die IRAK1 Hochregulation zu blockieren.

8.Summary

Porphyromonas gingivalis is a gram-negative anaerobic bacterium which is present in the oral cavity and plays a key role in the development of periodontitis [5]. As part of the innate immune response, toll-like receptors (TLR) 2 and 4 are involved in the recognition of pathogenic germs and the resulting induction of inflammatory reactions. A possible connection between periodontitis and oral squamous cell carcinoma has been discussed [12, 13].

The aim of this in vitro study was to demonstrate the expression of toll-like receptors 2 and 4 (TLR2 and TLR4) after stimulation on immortalized human gingival keratinocytes (IHGK) and an oral squamous cell carcinoma cell line (SCC-25). After 24 hours of incubation with their specific agonists, for TLR2 the synthetic triacylated lipopeptide Pam3CSK4 (Pam3CysSerLys4), for TLR4 the lipopolysaccharide of *E. coli* (LPS) and bacterial components of *P. gingivalis* (preparations of its cell membrane) the cells were examined by means of flow cytometry and Western blot.

To further elucidate the signaling mechanism, the expression of the TLR signaling molecule interleukin-1 receptor-associated kinase 1 (IRAK1) was analyzed. For this purpose, the cells were also stimulated with the TLR2 and TLR4 agonists and the cell membrane of *P. gingivalis* and analyzed after 24 h by flow cytometry and Western blot. Furthermore, specific inhibitors against TLR2 and TLR4 were used to show their influence on the expression of IRAK1.

The expression of TLR4 did not change or changed only very slightly compared to the negative control. The expression of TLR2 after stimulation with the *P. gingivalis* cell membrane was also essentially unchanged.

The expression of IRAK1 in SCC-25 cells, however, was significantly induced by the cell membrane of *P. gingivalis* plus $\pm$ TLR2 inhibitor. The stimulation with the cell membrane of *P. gingivalis* plus TLR4 inhibitor did not trigger any significant changes in expression.

The analysis of the IHGK revealed a statistically significant induction of IRAK1 after stimulation with the cell membrane of *P. gingivalis*.

From the results demonstrated in this work it can be concluded, that the cell membrane of *P. gingivalis* induces upregulation of IRAK1. The receptor, in whose signaling pathway IRAK1 is involved, could not clearly be identified, since neither the TLR2 nor the TLR4 ligand triggered an upregulation of IRAK1

and an inhibition of neither TLR2 nor TLR4 by means of blocking antibodies could significantly influence this effect. Inhibition of TLR2 and TLR4 proteins alone may not be sufficient to block the IRAK1 upregulation.

9. Abkürzungsverzeichnis

Ap-1	Aktivator Protein 1
ADAR1	Double-stranded RNA-specific adenosine deaminase 1
C5aR	complement component 5a receptor
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
CD	Cluster of differentiation
Cox-2	Cyclooxygenase-2
CR3	Komplement-Rezeptor 3
CTn	conjutive transposon
CXCR4	CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 4
CXCL12	CXC-Motiv-Chemokin 12
DAMPs	Damage-associated molecular patterns
DD	Death Domäne
DMEM	Dulbeccos modifiziertes Eagle-Medium
DUBA	Deubiquitinierungsenzym
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor
ERK	extrazellulär-signalregulierte-Kinasen
FACS	fluorescence activated cell sorting
FADD	FAS-associated death-domain containing protein
FCS	Fetales Kälberserum
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HSP	Hitzeschockproteine

HMGB1	High-Mobility-Group-Protein B1
Ifit3	Interferon induced protein with tetratricopeptide repeats 3
IFN	Interferon
IHGK	Immortalisierte humane gingivale Keratinozyten
IkB α	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor alpha
IKK- α	Inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase subunit alpha
IKK- β	inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase
IL	Interleukin
IRAK1	Interleukin-1-Rezeptor-assoziierte Kinase 1
IRF	Interferon-regulatorischer Faktor
IS	Insertion sequences
JNK	C-Jun-N-terminale Kinasen
kDa	Kilodalton
M	Metastasen
Mal	MyD88 adapter-like protein
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MITE	Miniature inverted-repeat transposable elements
MMTV	Maus-Mammatumovirus
MD2	Myeloid-Differenzierungsfaktor 2
MP	Milchpulver
MyD88	Myeloid differentiation primary response 88
NEMO	NF-kB-essentieller Modulator
NF-kB	nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells

N	Lymphknotenbefall
NOD	Nukleotid-bindende Oligomerisationsdomäne
LPS	Lipopolysaccharide
Pam3CSK4	Pam3CysSerLys4
PAMPs	Pathogen-associated molecular patterns
PAR	Protease-aktivierte Rezeptoren
PBS	Phosphate buffered saline
<i>P. gingivalis</i>	<i>Porphyromonas gingivalis</i>
RgpA	Recombinant <i>Porphyromonas gingivalis</i> Gingipain
<i>RIP</i>	<i>Receptor-interacting protein</i>
PRRs	Pattern recognition Receptors
RHIM	Rezeptor-Interaktionsprotein Protein (RIP) homotypisches Interaktionsmotiv
RNA	Ribonukleinsäure
Rpm	Rotationen pro Minute
RSV	Respiratorische Synzytialviren
SARM	Selective androgen receptor modulators
SerB	Phosphoserin phosphatase
STAT-Proteine	Signal transducer and activator of transcription
SINTBAD	Similar to NAP-1 TBK1 adaptor
T	Tumorgröße
TAB	Transforming growth factor β -activated protein kinase 1-binding protein

TAG	TRAM adaptor with GOLD domain TAK 1 Transforming growth factor beta-activated kinase 1
TBK1	TANK-binding kinase 1
TBST	Tris-buffered saline with Tween
TIRAP	toll-interleukin 1 receptor domain containing adaptor protein
TLR2	Toll-like Receptor 2
TLR4	Toll-like Receptor 4
TNF	Tumornekrosefaktor
TNFR	Tumornekrosefaktor-Rezeptor
Tollip	toll interacting protein
TRADD	Tumornekrosefaktor-Rezeptor -assoziierte Death-Domäne Protein
Traf3	Tumornekrosefaktor–assoziiertes Faktor 3
TRAM	TRIF-related adaptor molecule
TRIF	TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β
Ubc13	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 1
Uev1A	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 variant 1A
VEGF	Vascular endothelial growth factor

10. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Interaktion zwischen Tumorentstehung und Entzündung.....	12
Abbildung 2: Schematischer Ablauf der Signalkaskaden von TLR2 und TLR4.....	19
Abbildung 3: Signaltransduktion von IRAK1.....	22
Abbildung 4: Durchflusszytometrische Messung der IRAK1-Expression in IHGK.....	35
Abbildung 5: Relative Expression von IRAK1 in IHGK nach Stimulation mit LPS oder TM im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle.....	36
Abbildung 6: Durchflusszytometrische Messung der IRAK1-Expression in SCC- 25.....	37
Abbildung 7: Relative Expression von IRAK1 in SCC-25-Zellen nach Stimulation mit LPS oder TM im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle.....	38
Abbildung 8: Durchflusszytometrische Messung der TLR2-Expression auf SCC- 25.....	39
Abbildung 9: Relative Expression von TLR2 auf SCC-25-Zellen nach Stimulation mit LPS oder TM im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle.....	40
Abbildung 10: Durchflusszytometrische Messung der TLR2-Expression auf IHGK.....	41
Abbildung 11: Relative Expression von TLR2 auf IHGK nach Stimulation mit LPS oder TM im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle.....	42
Abbildung 12: Durchflusszytometrische Messung der TLR4-Expression auf IHGK.....	43
Abbildung 13: Relative Expression von TLR4 auf IHGK nach Stimulation mit LPS oder TM im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle.....	44

Abbildung 14: Durchflusszytometrische Messung der TLR4-Expression auf SCC-25.....	45
Abbildung 15:Relative Expression von TLR4 auf SCC-25 Zellen nach Stimulation mit LPS oder TM im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle.....	46
Abbildung 16: Relative Proteinexpression von IRAK1 in SCC-25-Zellen mit und ohne Inhibierung des TLR2 Signalwegs bei Stimulation mit Pam3CSK4 oder TM im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle.....	47
Abbildung 17: Relative Proteinexpression von IRAK1 in SCC-25-Zellen mit und ohne Inhibierung des TLR4-Signalwegs bei Stimulation mit LPS oder TM im Vergleich zur unbehandelten.....	48
Abbildung 18: Relative Proteinexpression von IRAK1 auf IHGK nach Stimulation mit LPS oder TM im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle.....	49
Abbildung 19: Relative Proteinexpression von TLR2 auf SCC-25-Zellen nach Stimulation mit Pam3CSK4 und TM.....	50
Abbildung 20: Relative Proteinexpression von TLR2 auf IHGK Zellen nach Stimulation mit Pam3CSK4 und TM.....	51
Abbildung 21: Relative Proteinexpression von TLR4 auf SCC-25-Zellen nach Stimulation mit LPS und TM	52
Abbildung 22: Relative Proteinexpression von TLR4 auf IHGK nach Stimulation mit LPS und TM.....	53

11. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Spezifische Kulturmedien der verschiedenen Zelllinien.....	26
Tabelle 2: Rezeptoren mit ihren jeweiligen Agonisten.....	28
Tabelle 3: Primär- und Sekundärantikörperkonzentrationen.....	30
Tabelle 4: Expression von IRAK1 bei Inhibierung von TLR2 auf SCC-25-Zellen, quantifiziert durch Western-Blot.....	45
Tabelle 5: Expression von IRAK1 bei Inhibierung von TLR4 auf SCC-25-Zellen, quantifiziert durch Western-Blot.....	46

12. Literatur

1. Highfield, J., *Diagnosis and classification of periodontal disease*. Aust Dent J, 2009. 54 Suppl 1: p. S11-26.
2. Institut der Deutschen Zahnärzte, *Fünfte Deutsche Mundgesundheitsstudie (DMS V)*. Deutscher Zahnärzteverlag, 2016.
3. Holt, S.C., et al., *Virulence factors of Porphyromonas gingivalis*. Periodontol 2000, 1999. 20: p. 168-238.
4. Moore, W.E. and L.V. Moore, *The bacteria of periodontal diseases*. Periodontol 2000, 1994. 5: p. 66-77.
5. Hajishengallis, G., R.P. Darveau, and M.A. Curtis, *The keystone-pathogen hypothesis*. Nat Rev Microbiol, 2012. 10(10): p. 717-25.
6. Balkwill, F. and A. Mantovani, *Inflammation and cancer: back to Virchow?* Lancet, 2001. 357(9255): p. 539-45.
7. Virchow, *Cellular pathology as based upon physiological and pathological histology*. Philadelphia: J. B. Lippincott, 1863.
8. Mantovani, A., et al., *Cancer-related inflammation*. Nature, 2008. 454(7203): p. 436-44.
9. Mantovani, A., *Molecular pathways linking inflammation and cancer*. Curr Mol Med, 2010. 10(4): p. 369-73.
10. Colotta, F., et al., *Cancer-related inflammation, the seventh hallmark of cancer: links to genetic instability*. Carcinogenesis, 2009. 30(7): p. 1073-81.
11. Moore, M.M., et al., *Inflammation and cancer: causes and consequences*. Clin Pharmacol Ther, 2010. 87(4): p. 504-8.
12. Tezal, M., et al., *Chronic periodontitis and the risk of tongue cancer*. Arch Otolaryngol Head Neck Surg, 2007. 133(5): p. 450-4.
13. Tezal, M., et al., *Chronic periodontitis and the incidence of head and neck squamous cell carcinoma*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2009. 18(9): p. 2406-12.
14. Fitzpatrick, S.G. and J. Katz, *The association between periodontal disease and cancer: a review of the literature*. J Dent, 2010. 38(2): p. 83-95.

15. Maruyama, T., et al., *Relationship between serum albumin concentration and periodontal condition in patients with head and neck cancer*. J Periodontol, 2012. 83(9): p. 1110-5.
16. [Pierre Fauchard's "Le Chirurgien-Dentiste". II]. Dent Cadmos, 1980. 48(6): p. 53-7.
17. Lang, N.P. and P.M. Bartold, *Periodontal health*. J Periodontol, 2018. 89 Suppl 1: p. S9-S16.
18. Ababneh, K.T., Z.M. Abu Hwajj, and Y.S. Khader, *Prevalence and risk indicators of gingivitis and periodontitis in a multi-centre study in North Jordan: a cross sectional study*. BMC Oral Health, 2012. 12: p. 1.
19. Papapanou, P.N., et al., *Periodontitis: Consensus report of workgroup 2 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions*. J Periodontol, 2018. 89 Suppl 1: p. S173-S182.
20. Herrera, D., et al., *Acute periodontal lesions (periodontal abscesses and necrotizing periodontal diseases) and endo-periodontal lesions*. J Periodontol, 2018. 89 Suppl 1: p. S85-S102.
21. Albandar, J.M., C. Susin, and F.J. Hughes, *Manifestations of systemic diseases and conditions that affect the periodontal attachment apparatus: Case definitions and diagnostic considerations*. J Periodontol, 2018. 89 Suppl 1: p. S183-S203.
22. Tonetti, M.S., H. Greenwell, and K.S. Kornman, *Staging and grading of periodontitis: Framework and proposal of a new classification and case definition*. J Periodontol, 2018. 89 Suppl 1: p. S159-S172.
23. Bartold, P.M. and T.E. Van Dyke, *Periodontitis: a host-mediated disruption of microbial homeostasis. Unlearning learned concepts*. Periodontol 2000, 2013. 62(1): p. 203-17.
24. Darveau, R.P., *Periodontitis: a polymicrobial disruption of host homeostasis*. Nat Rev Microbiol, 2010. 8(7): p. 481-90.
25. Socransky, S.S., et al., *Microbial complexes in subgingival plaque*. J Clin Periodontol, 1998. 25(2): p. 134-44.
26. Loe, H., E. Theilade, and S.B. Jensen, *Experimental Gingivitis in Man*. J Periodontol, 1965. 36: p. 177-87.

27. Rosan, B. and R.J. Lamont, *Dental plaque formation*. Microbes Infect, 2000. 2(13): p. 1599-607.
28. Hillman, J.D., S.S. Socransky, and M. Shivers, *The relationships between streptococcal species and periodontopathic bacteria in human dental plaque*. Arch Oral Biol, 1985. 30(11-12): p. 791-5.
29. Plancak, D., L. Music, and I. Puhar, *Quorum Sensing of Periodontal Pathogens*. Acta Stomatol Croat, 2015. 49(3): p. 234-41.
30. Sakanaka, A., et al., *Dual lifestyle of Porphyromonas gingivalis in biofilm and gingival cells*. Microb Pathog, 2016. 94: p. 42-7.
31. Theilade, E., et al., *Experimental gingivitis in man. II. A longitudinal clinical and bacteriological investigation*. J Periodontal Res, 1966. 1: p. 1-13.
32. Rosier, B.T., P.D. Marsh, and A. Mira, *Resilience of the Oral Microbiota in Health: Mechanisms That Prevent Dysbiosis*. J Dent Res, 2018. 97(4): p. 371-380.
33. Hajishengallis, G. and R.J. Lamont, *Beyond the red complex and into more complexity: the polymicrobial synergy and dysbiosis (PSD) model of periodontal disease etiology*. Mol Oral Microbiol, 2012. 27(6): p. 409-19.
34. Kim, J. and S. Amar, *Periodontal disease and systemic conditions: a bidirectional relationship*. Odontology, 2006. 94(1): p. 10-21.
35. Ide, R., et al., *Periodontal disease and incident diabetes: a seven-year study*. J Dent Res, 2011. 90(1): p. 41-6.
36. Preshaw, P.M., et al., *Periodontitis and diabetes: a two-way relationship*. Diabetologia, 2012. 55(1): p. 21-31.
37. Chou, Y.Y., et al., *Rheumatoid Arthritis Risk Associated with Periodontitis Exposure: A Nationwide, Population-Based Cohort Study*. PLoS One, 2015. 10(10): p. e0139693.
38. Lundberg, K., et al., *Periodontitis in RA-the citrullinated enolase connection*. Nat Rev Rheumatol, 2010. 6(12): p. 727-30.
39. Joshipura, K., J.C. Zavallos, and C.S. Ritchie, *Strength of evidence relating periodontal disease and atherosclerotic disease*. Compend Contin Educ Dent, 2009. 30(7): p. 430-9.
40. Kebschull, M., R.T. Demmer, and P.N. Papapanou, *"Gum bug, leave my heart alone!"--epidemiologic and mechanistic evidence linking periodontal infections and atherosclerosis*. J Dent Res, 2010. 89(9): p. 879-902.

41. Czesnikiewicz-Guzik, M., et al., *Causal association between periodontitis and hypertension: evidence from Mendelian randomization and a randomized controlled trial of non-surgical periodontal therapy*. Eur Heart J, 2019. 40(42): p. 3459-3470.
42. Dominy, S.S., et al., *Porphyromonas gingivalis* in Alzheimer's disease brains: Evidence for disease causation and treatment with small-molecule inhibitors. Sci Adv, 2019. 5(1): p. eaau3333.
43. Darveau, R.P., et al., *Ability of bacteria associated with chronic inflammatory disease to stimulate E-selectin expression and promote neutrophil adhesion*. Infect Immun, 1995. 63(4): p. 1311-7.
44. Deshpande, R.G., M. Khan, and C.A. Genco, *Invasion strategies of the oral pathogen porphyromonas gingivalis: implications for cardiovascular disease*. Invasion Metastasis, 1998. 18(2): p. 57-69.
45. Socransky, S.S. and A.D. Haffajee, *Periodontal microbial ecology*. Periodontol 2000, 2005. 38: p. 135-87.
46. Dobrovolskaia, M.A., et al., *Induction of in vitro reprogramming by Toll-like receptor (TLR)2 and TLR4 agonists in murine macrophages: effects of TLR "homotolerance" versus "heterotolerance" on NF-kappa B signaling pathway components*. J Immunol, 2003. 170(1): p. 508-19.
47. Ulevitch, R.J. and P.S. Tobias, *Receptor-dependent mechanisms of cell stimulation by bacterial endotoxin*. Annu Rev Immunol, 1995. 13: p. 437-57.
48. Gibbons, R.J., *Bacterial adhesion to oral tissues: a model for infectious diseases*. J Dent Res, 1989. 68(5): p. 750-60.
49. Amano, A., et al., *Variations of Porphyromonas gingivalis fimbriae in relation to microbial pathogenesis*. J Periodontal Res, 2004. 39(2): p. 136-42.
50. Lamont, R.J. and O. Yilmaz, *In or out: the invasiveness of oral bacteria*. Periodontol 2000, 2002. 30: p. 61-9.
51. Cossart, P. and P.J. Sansonetti, *Bacterial invasion: the paradigms of enteroinvasive pathogens*. Science, 2004. 304(5668): p. 242-8.
52. Garner, M.J., R.D. Hayward, and V. Koronakis, *The Salmonella pathogenicity island 1 secretion system directs cellular cholesterol*

- redistribution during mammalian cell entry and intracellular trafficking. Cell Microbiol*, 2002. 4(3): p. 153-65.
53. Lafont, F. and F.G. van der Goot, *Bacterial invasion via lipid rafts. Cell Microbiol*, 2005. 7(5): p. 613-20.
 54. Simons, K. and E. Ikonen, *Functional rafts in cell membranes. Nature*, 1997. 387(6633): p. 569-72.
 55. Grenier, D. and D. Mayrand, *Functional characterization of extracellular vesicles produced by Bacteroides gingivalis. Infect Immun*, 1987. 55(1): p. 111-7.
 56. Zhou, L., et al., *On the origin of membrane vesicles in gram-negative bacteria. FEMS Microbiol Lett*, 1998. 163(2): p. 223-8.
 57. Holt, S.C. and J.L. Ebersole, *Porphyromonas gingivalis, Treponema denticola, and Tannerella forsythia: the "red complex", a prototype polybacterial pathogenic consortium in periodontitis. Periodontol* 2000, 2005. 38: p. 72-122.
 58. Darveau, R.P., et al., *Local chemokine paralysis, a novel pathogenic mechanism for Porphyromonas gingivalis. Infect Immun*, 1998. 66(4): p. 1660-5.
 59. Huang, G.T., et al., *Differential regulation of cytokine genes in gingival epithelial cells challenged by Fusobacterium nucleatum and Porphyromonas gingivalis. Microb Pathog*, 2004. 37(6): p. 303-12.
 60. Ji, S., et al., *Innate immune responses of gingival epithelial cells to nonperiodontopathic and periodontopathic bacteria. J Periodontal Res*, 2007. 42(6): p. 503-10.
 61. Huang, G.T., et al., *Interleukin-8 and intercellular adhesion molecule 1 regulation in oral epithelial cells by selected periodontal bacteria: multiple effects of Porphyromonas gingivalis via antagonistic mechanisms. Infect Immun*, 2001. 69(3): p. 1364-72.
 62. Vankeerberghen, A., et al., *Differential induction of human beta-defensin expression by periodontal commensals and pathogens in periodontal pocket epithelial cells. J Periodontol*, 2005. 76(8): p. 1293-303.
 63. Hasegawa, Y., et al., *Role of Porphyromonas gingivalis SerB in gingival epithelial cell cytoskeletal remodeling and cytokine production. Infect Immun*, 2008. 76(6): p. 2420-7.

64. Tribble, G.D., et al., *A Porphyromonas gingivalis haloacid dehalogenase family phosphatase interacts with human phosphoproteins and is important for invasion*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. 103(29): p. 11027-32.
65. Coats, S.R., et al., *MD-2 mediates the ability of tetra-acylated and penta-acylated lipopolysaccharides to antagonize Escherichia coli lipopolysaccharide at the TLR4 signaling complex*. J Immunol, 2005. 175(7): p. 4490-8.
66. Coats, S.R., et al., *Antagonistic lipopolysaccharides block E. coli lipopolysaccharide function at human TLR4 via interaction with the human MD-2 lipopolysaccharide binding site*. Cell Microbiol, 2007. 9(5): p. 1191-202.
67. Bainbridge, B.W., S.R. Coats, and R.P. Darveau, *Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide displays functionally diverse interactions with the innate host defense system*. Ann Periodontol, 2002. 7(1): p. 29-37.
68. Kumada, H., et al., *Structural study on the free lipid A isolated from lipopolysaccharide of Porphyromonas gingivalis*. J Bacteriol, 1995. 177(8): p. 2098-106.
69. Reife, R.A., et al., *Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide lipid A heterogeneity: differential activities of tetra- and penta-acylated lipid A structures on E-selectin expression and TLR4 recognition*. Cell Microbiol, 2006. 8(5): p. 857-68.
70. Al-Qutub, M.N., et al., *Hemin-dependent modulation of the lipid A structure of Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide*. Infect Immun, 2006. 74(8): p. 4474-85.
71. Coats, S.R., et al., *Human Toll-like receptor 4 responses to P. gingivalis are regulated by lipid A 1- and 4'-phosphatase activities*. Cell Microbiol, 2009. 11(11): p. 1587-99.
72. Lu, Q., et al., *Differential modulation of human {beta}-defensins expression in human gingival epithelia by Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide with tetra- and penta-acylated lipid A structures*. Innate Immun, 2009. 15(6): p. 325-35.
73. Quinchia-Rios, B.H., et al., *Down-regulation of epidermal growth factor receptor-dependent signaling by Porphyromonas gingivalis*

- lipopolysaccharide in life-expanded human gingival fibroblasts. J Periodontal Res*, 2008. 43(3): p. 290-304.
74. Cardelli, P., et al., *[The modification of the extracellular matrix synthesized in vitro by human gingival fibroblasts in relation to aging]*. *G Chir*, 1992. 13(3): p. 83-6.
 75. Hajishengallis, G., et al., *Pathogen induction of CXCR4/TLR2 cross-talk impairs host defense function*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008. 105(36): p. 13532-7.
 76. Wang, M., et al., *Microbial hijacking of complement-toll-like receptor crosstalk*. *Sci Signal*, 2010. 3(109): p. ra11.
 77. Liu, J., Y. Wang, and X. Ouyang, *Beyond toll-like receptors: Porphyromonas gingivalis induces IL-6, IL-8, and VCAM-1 expression through NOD-mediated NF-kappaB and ERK signaling pathways in periodontal fibroblasts*. *Inflammation*, 2014. 37(2): p. 522-33.
 78. Kato, T., et al., *Virulence of Porphyromonas gingivalis is altered by substitution of fimbria gene with different genotype*. *Cell Microbiol*, 2007. 9(3): p. 753-65.
 79. Yilmaz, O., K. Watanabe, and R.J. Lamont, *Involvement of integrins in fimbriae-mediated binding and invasion by Porphyromonas gingivalis*. *Cell Microbiol*, 2002. 4(5): p. 305-14.
 80. Nakagawa, I., et al., *Invasion of epithelial cells and proteolysis of cellular focal adhesion components by distinct types of Porphyromonas gingivalis fimbriae*. *Infect Immun*, 2006. 74(7): p. 3773-82.
 81. Hintermann, E., et al., *Discrete proteolysis of focal contact and adherens junction components in Porphyromonas gingivalis-infected oral keratinocytes: a strategy for cell adhesion and migration disabling*. *Infect Immun*, 2002. 70(10): p. 5846-56.
 82. Amano, A., *Molecular interaction of Porphyromonas gingivalis with host cells: implication for the microbial pathogenesis of periodontal disease*. *J Periodontol*, 2003. 74(1): p. 90-6.
 83. Dickinson, D.P., et al., *Molecular cloning and sequencing of the gene encoding the fimbrial subunit protein of Bacteroides gingivalis*. *J Bacteriol*, 1988. 170(4): p. 1658-65.

84. Hamada, N., et al., *Isolation and characterization of a minor fimbria from Porphyromonas gingivalis*. Infect Immun, 1996. 64(11): p. 4788-94.
85. Park, Y., et al., *Short fimbriae of Porphyromonas gingivalis and their role in coadhesion with Streptococcus gordonii*. Infect Immun, 2005. 73(7): p. 3983-9.
86. Hamada, N., et al., *Construction and characterization of a fimA mutant of Porphyromonas gingivalis*. Infect Immun, 1994. 62(5): p. 1696-704.
87. Malek, R., et al., *Inactivation of the Porphyromonas gingivalis fimA gene blocks periodontal damage in gnotobiotic rats*. J Bacteriol, 1994. 176(4): p. 1052-9.
88. Njoroge, T., et al., *A role for fimbriae in Porphyromonas gingivalis invasion of oral epithelial cells*. Infect Immun, 1997. 65(5): p. 1980-4.
89. Sugano, N., et al., *Differential cytokine induction by two types of Porphyromonas gingivalis*. Oral Microbiol Immunol, 2004. 19(2): p. 121-3.
90. Weinberg, A., et al., *Role of fimbriae in Porphyromonas gingivalis invasion of gingival epithelial cells*. Infect Immun, 1997. 65(1): p. 313-6.
91. Ogawa, T., et al., *Humoral and cellular immune responses to the fimbriae of Porphyromonas gingivalis and their synthetic peptides*. J Med Microbiol, 1994. 40(6): p. 397-402.
92. Ogawa, T., H. Uchida, and S. Hamada, *Porphyromonas gingivalis fimbriae and their synthetic peptides induce proinflammatory cytokines in human peripheral blood monocyte cultures*. FEMS Microbiol Lett, 1994. 116(2): p. 237-42.
93. Lamont, R.J., et al., *Role of the Streptococcus gordonii SspB protein in the development of Porphyromonas gingivalis biofilms on streptococcal substrates*. Microbiology, 2002. 148(Pt 6): p. 1627-36.
94. Lin, X., J. Wu, and H. Xie, *Porphyromonas gingivalis minor fimbriae are required for cell-cell interactions*. Infect Immun, 2006. 74(10): p. 6011-5.
95. Hiramane, H., et al., *Porphyromonas gingivalis 67-kDa fimbriae induced cytokine production and osteoclast differentiation utilizing TLR2*. FEMS Microbiol Lett, 2003. 229(1): p. 49-55.
96. Nagata, H., et al., *Effect of binding of fibrinogen to each bacterium on coaggregation between Porphyromonas gingivalis and Streptococcus oralis*. Oral Microbiol Immunol, 1994. 9(6): p. 359-63.

97. Murakami, Y., et al., *Fibronectin in saliva inhibits Porphyromonas gingivalis fimbria-induced expression of inflammatory cytokine gene in mouse macrophages*. FEMS Immunol Med Microbiol, 1998. 22(3): p. 257-62.
98. Amano, A., et al., *Salivary receptors for recombinant fimbrillin of Porphyromonas gingivalis*. Infect Immun, 1994. 62(8): p. 3372-80.
99. Murakami, Y., et al., *Inhibitory effects of human salivary histatins and lysozyme on coaggregation between Porphyromonas gingivalis and Streptococcus mitis*. Infect Immun, 1991. 59(9): p. 3284-6.
100. Darveau, R.P., A. Tanner, and R.C. Page, *The microbial challenge in periodontitis*. Periodontol 2000, 1997. 14: p. 12-32.
101. Lamont, R.J. and H.F. Jenkinson, *Subgingival colonization by Porphyromonas gingivalis*. Oral Microbiol Immunol, 2000. 15(6): p. 341-9.
102. Tsuda, K., et al., *Molecular dissection of internalization of Porphyromonas gingivalis by cells using fluorescent beads coated with bacterial membrane vesicle*. Cell Struct Funct, 2005. 30(2): p. 81-91.
103. Nakagawa, I., et al., *Functional differences among FimA variants of Porphyromonas gingivalis and their effects on adhesion to and invasion of human epithelial cells*. Infect Immun, 2002. 70(1): p. 277-85.
104. Huttenlocher, A., M.H. Ginsberg, and A.F. Horwitz, *Modulation of cell migration by integrin-mediated cytoskeletal linkages and ligand-binding affinity*. J Cell Biol, 1996. 134(6): p. 1551-62.
105. Cox, E.A., S.K. Sastry, and A. Huttenlocher, *Integrin-mediated adhesion regulates cell polarity and membrane protrusion through the Rho family of GTPases*. Mol Biol Cell, 2001. 12(2): p. 265-77.
106. Nakagawa, I., et al., *Inhibitory effects of Porphyromonas gingivalis fimbriae on interactions between extracellular matrix proteins and cellular integrins*. Microbes Infect, 2005. 7(2): p. 157-63.
107. Ricklin, D., et al., *Complement: a key system for immune surveillance and homeostasis*. Nat Immunol, 2010. 11(9): p. 785-97.
108. Abram, C.L. and C.A. Lowell, *The ins and outs of leukocyte integrin signaling*. Annu Rev Immunol, 2009. 27: p. 339-62.

109. Wang, M., et al., *Fimbrial proteins of porphyromonas gingivalis mediate in vivo virulence and exploit TLR2 and complement receptor 3 to persist in macrophages*. J Immunol, 2007. 179(4): p. 2349-58.
110. Hajishengallis, G., et al., *Porphyromonas gingivalis fimbriae proactively modulate beta2 integrin adhesive activity and promote binding to and internalization by macrophages*. Infect Immun, 2006. 74(10): p. 5658-66.
111. Hajishengallis, G., et al., *Complement receptor 3 blockade promotes IL-12-mediated clearance of Porphyromonas gingivalis and negates its virulence in vivo*. J Immunol, 2007. 179(4): p. 2359-67.
112. Tsuda, K., et al., *Functional analysis of alpha5beta1 integrin and lipid rafts in invasion of epithelial cells by Porphyromonas gingivalis using fluorescent beads coated with bacterial membrane vesicles*. Cell Struct Funct, 2008. 33(1): p. 123-32.
113. Schoenwaelder, S.M. and K. Burridge, *Bidirectional signaling between the cytoskeleton and integrins*. Curr Opin Cell Biol, 1999. 11(2): p. 274-86.
114. Young, V.B., S. Falkow, and G.K. Schoolnik, *The invasin protein of Yersinia enterocolitica: internalization of invasin-bearing bacteria by eukaryotic cells is associated with reorganization of the cytoskeleton*. J Cell Biol, 1992. 116(1): p. 197-207.
115. Yilmaz, O., et al., *Gingival epithelial cell signalling and cytoskeletal responses to Porphyromonas gingivalis invasion*. Microbiology, 2003. 149(Pt 9): p. 2417-26.
116. Zhang, W., et al., *Integrin alpha5beta1-fimbriae binding and actin rearrangement are essential for Porphyromonas gingivalis invasion of osteoblasts and subsequent activation of the JNK pathway*. BMC Microbiol, 2013. 13: p. 5.
117. Hanazawa, S., et al., *Bacteroides gingivalis fimbriae stimulate production of thymocyte-activating factor by human gingival fibroblasts*. Infect Immun, 1988. 56(1): p. 272-4.
118. Hanazawa, S., et al., *Porphyromonas gingivalis fimbriae induce expression of the neutrophil chemotactic factor KC gene of mouse peritoneal macrophages: role of protein kinase C*. Infect Immun, 1992. 60(4): p. 1544-9.

119. Hanazawa, S., et al., *Bacteroides (Porphyromonas) gingivalis fimbriae activate mouse peritoneal macrophages and induce gene expression and production of interleukin-1*. Infect Immun, 1991. 59(6): p. 1972-7.
120. Murakami, Y., et al., *N-acetyl-D-galactosamine inhibits TNF-alpha gene expression induced in mouse peritoneal macrophages by fimbriae of Porphyromonas (Bacteroides) gingivalis, an oral anaerobe*. Biochem Biophys Res Commun, 1993. 192(2): p. 826-32.
121. Takeshita, A., et al., *Porphyromonas gingivalis fimbriae use beta2 integrin (CD11/CD18) on mouse peritoneal macrophages as a cellular receptor, and the CD18 beta chain plays a functional role in fimbrial signaling*. Infect Immun, 1998. 66(9): p. 4056-60.
122. Hajishengallis, G., P. Ratti, and E. Harokopakis, *Peptide mapping of bacterial fimbrial epitopes interacting with pattern recognition receptors*. J Biol Chem, 2005. 280(47): p. 38902-13.
123. Hajishengallis, G., et al., *Differential interactions of fimbriae and lipopolysaccharide from Porphyromonas gingivalis with the Toll-like receptor 2-centred pattern recognition apparatus*. Cell Microbiol, 2006. 8(10): p. 1557-70.
124. Ahn, J., S. Segers, and R.B. Hayes, *Periodontal disease, Porphyromonas gingivalis serum antibody levels and orodigestive cancer mortality*. Carcinogenesis, 2012. 33(5): p. 1055-8.
125. Inaba, H., et al., *Porphyromonas gingivalis promotes invasion of oral squamous cell carcinoma through induction of proMMP9 and its activation*. Cell Microbiol, 2014. 16(1): p. 131-45.
126. Groeger, S., et al., *B7-H1 and B7-DC receptors of oral squamous carcinoma cells are upregulated by Porphyromonas gingivalis*. Immunobiology, 2011. 216(12): p. 1302-10.
127. Katz, J., et al., *Presence of Porphyromonas gingivalis in gingival squamous cell carcinoma*. Int J Oral Sci, 2011. 3(4): p. 209-15.
128. Schafer, M. and S. Werner, *Cancer as an overhealing wound: an old hypothesis revisited*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2008. 9(8): p. 628-38.
129. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *Hallmarks of cancer: the next generation*. Cell, 2011. 144(5): p. 646-74.

130. Coussens, L.M. and Z. Werb, *Inflammation and cancer*. Nature, 2002. 420(6917): p. 860-7.
131. Hussain, S.P. and C.C. Harris, *Inflammation and cancer: an ancient link with novel potentials*. Int J Cancer, 2007. 121(11): p. 2373-80.
132. Aivaliotis, I.L., et al., *How do cytokines trigger genomic instability?* J Biomed Biotechnol, 2012. 2012: p. 536761.
133. Aggarwal, B.B. and P. Gehlot, *Inflammation and cancer: how friendly is the relationship for cancer patients?* Curr Opin Pharmacol, 2009. 9(4): p. 351-69.
134. La Vecchia, C., et al., *Epidemiology and prevention of oral cancer*. Oral Oncol, 1997. 33(5): p. 302-12.
135. Figuero Ruiz, E., et al., *Effects of the consumption of alcohol in the oral cavity: relationship with oral cancer*. Med Oral, 2004. 9(1): p. 14-23.
136. Lippman, S.M., et al., *Epidemiology, biology, and chemoprevention of aerodigestive cancer*. Cancer, 1994. 74(9 Suppl): p. 2719-25.
137. Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (GEKID) in Zusammenarbeit mit dem Robert Koch Institut: 5. überarbeitete, aktualisierte Ausgabe. Saarbrücken 2006.
138. Lo, W.L., et al., *Outcomes of oral squamous cell carcinoma in Taiwan after surgical therapy: factors affecting survival*. J Oral Maxillofac Surg, 2003. 61(7): p. 751-8.
139. Howaldt, H.P., et al., *[Results of the DOSAK tumor register]*. Mund Kiefer Gesichtschir, 2000. 4 Suppl 1: p. S216-25.
140. Talamini, R., et al., *Combined effect of tobacco and alcohol on laryngeal cancer risk: a case-control study*. Cancer Causes Control, 2002. 13(10): p. 957-64.
141. Lin, W.W. and M. Karin, *A cytokine-mediated link between innate immunity, inflammation, and cancer*. J Clin Invest, 2007. 117(5): p. 1175-83.
142. Mehrotra, R. and S. Yadav, *Oral squamous cell carcinoma: etiology, pathogenesis and prognostic value of genomic alterations*. Indian J Cancer, 2006. 43(2): p. 60-6.

143. Patel, S.C., et al., *Increasing incidence of oral tongue squamous cell carcinoma in young white women, age 18 to 44 years*. J Clin Oncol, 2011. 29(11): p. 1488-94.
144. Shah, J.P. and Z. Gil, *Current concepts in management of oral cancer--surgery*. Oral Oncol, 2009. 45(4-5): p. 394-401.
145. Gupta, P.C., P.R. Murti, and R.B. Bhonsle, *Epidemiology of cancer by tobacco products and the significance of TSNA*. Crit Rev Toxicol, 1996. 26(2): p. 183-98.
146. Rothman, K. and A. Keller, *The effect of joint exposure to alcohol and tobacco on risk of cancer of the mouth and pharynx*. J Chronic Dis, 1972. 25(12): p. 711-6.
147. Nagao, Y. and M. Sata, *High incidence of multiple primary carcinomas in HCV-infected patients with oral squamous cell carcinoma*. Med Sci Monit, 2009. 15(9): p. CR453-9.
148. Su, C.C., et al., *Distinctive features of oral cancer in Changhua County: high incidence, buccal mucosa preponderance, and a close relation to betel quid chewing habit*. J Formos Med Assoc, 2007. 106(3): p. 225-33.
149. Angiero, F., et al., *Frequency and role of HPV in the progression of epithelial dysplasia to oral cancer*. Anticancer Res, 2010. 30(9): p. 3435-40.
150. Kramer, I.R., et al., *Definition of leukoplakia and related lesions: an aid to studies on oral precancer*. Oral Surg Oral Med Oral Pathol, 1978. 46(4): p. 518-39.
151. Reibel, J., *Prognosis of oral pre-malignant lesions: significance of clinical, histopathological, and molecular biological characteristics*. Crit Rev Oral Biol Med, 2003. 14(1): p. 47-62.
152. Casiglia, J. and S.B. Woo, *A comprehensive review of oral cancer*. Gen Dent, 2001. 49(1): p. 72-82.
153. Mashberg, A. and A. Samit, *Early diagnosis of asymptomatic oral and oropharyngeal squamous cancers*. CA Cancer J Clin, 1995. 45(6): p. 328-51.
154. Napier, S.S. and P.M. Speight, *Natural history of potentially malignant oral lesions and conditions: an overview of the literature*. J Oral Pathol Med, 2008. 37(1): p. 1-10.

155. van der Waal, I., *Potentially malignant disorders of the oral and oropharyngeal mucosa; terminology, classification and present concepts of management*. Oral Oncol, 2009. 45(4-5): p. 317-23.
156. Ord, R.A. and R.H. Blanchaert, Jr., *Current management of oral cancer. A multidisciplinary approach*. J Am Dent Assoc, 2001. 132 Suppl: p. 19S-23S.
157. Remmerbach T, M.S., Weidenbach H, et al, *Nichtinvasive Bürstenbiopsie als innovative Methode in der Früherkennung des Mundhöhlenkarzinoms*. Mund Kiefer GesichtsChir, 2004. 8: p. 229-236.
158. Remmerbach, T.W., et al., *Toward a multimodal cell analysis of brush biopsies for the early detection of oral cancer*. Cancer, 2009. 117(3): p. 228-35.
159. Scheer M, N.J., Derman A, et al, *Autofluorescence imaging of potentially malignant mucosa lesions*. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod, 2011. 111: p. 568-577.
160. Bernier, J., et al., *Postoperative irradiation with or without concomitant chemotherapy for locally advanced head and neck cancer*. N Engl J Med, 2004. 350(19): p. 1945-52.
161. Bernier, J., *Current state-of-the-art for concurrent chemoradiation*. Semin Radiat Oncol, 2009. 19(1): p. 3-10.
162. Fan, K.H., et al., *Combined-modality treatment for advanced oral tongue squamous cell carcinoma*. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2007. 67(2): p. 453-61.
163. Kreppel, M., et al., *Combined-modality treatment in advanced oral squamous cell carcinoma: Primary surgery followed by adjuvant concomitant radiochemotherapy*. Strahlenther Onkol, 2011. 187(9): p. 555-60.
164. Neville, B.W. and T.A. Day, *Oral cancer and precancerous lesions*. CA Cancer J Clin, 2002. 52(4): p. 195-215.
165. Vokes, E.E., et al., *Head and neck cancer*. N Engl J Med, 1993. 328(3): p. 184-94.
166. Lee, C.C., A.M. Avalos, and H.L. Ploegh, *Accessory molecules for Toll-like receptors and their function*. Nat Rev Immunol, 2012. 12(3): p. 168-79.

167. Chang, Z.L., *Important aspects of Toll-like receptors, ligands and their signaling pathways*. Inflamm Res, 2010. 59(10): p. 791-808.
168. Rakoff-Nahoum, S. and R. Medzhitov, *Toll-like receptors and cancer*. Nat Rev Cancer, 2009. 9(1): p. 57-63.
169. Scheibner, K.A., et al., *Hyaluronan fragments act as an endogenous danger signal by engaging TLR2*. J Immunol, 2006. 177(2): p. 1272-81.
170. Wang, H., et al., *HMG-1 as a late mediator of endotoxin lethality in mice*. Science, 1999. 285(5425): p. 248-51.
171. Roth, J., et al., *Phagocyte-specific S100 proteins: a novel group of proinflammatory molecules*. Trends Immunol, 2003. 24(4): p. 155-8.
172. Cook, D.N., D.S. Pisetsky, and D.A. Schwartz, *Toll-like receptors in the pathogenesis of human disease*. Nat Immunol, 2004. 5(10): p. 975-9.
173. Bergmann, C., et al., *Toll-like receptor 4 single-nucleotide polymorphisms Asp299Gly and Thr399Ile in head and neck squamous cell carcinomas*. J Transl Med, 2011. 9: p. 139.
174. Huang B, Z.J., Li H et al, *Toll-like receptors on tumour cells facilitate evasion of immune surveillance*. Cancer Res, 2005. 65: p. 5009–5014.
175. Szczepanski, M.J., et al., *Triggering of Toll-like receptor 4 expressed on human head and neck squamous cell carcinoma promotes tumor development and protects the tumor from immune attack*. Cancer Res, 2009. 69(7): p. 3105-13.
176. Chuang, H.C., et al., *Toll-like receptor 3-mediated tumor invasion in head and neck cancer*. Oral Oncol, 2012. 48(3): p. 226-32.
177. Theodoropoulos, G.E., et al., *Toll-like receptors gene polymorphisms may confer increased susceptibility to breast cancer development*. Breast, 2012. 21(4): p. 534-8.
178. Triantafilou, M., et al., *Membrane sorting of toll-like receptor (TLR)-2/6 and TLR2/1 heterodimers at the cell surface determines heterotypic associations with CD36 and intracellular targeting*. J Biol Chem, 2006. 281(41): p. 31002-11.
179. Buwitt-Beckmann, U., et al., *TLR1- and TLR6-independent recognition of bacterial lipopeptides*. J Biol Chem, 2006. 281(14): p. 9049-57.
180. Jin, M.S., et al., *Crystal structure of the TLR1-TLR2 heterodimer induced by binding of a tri-acylated lipopeptide*. Cell, 2007. 130(6): p. 1071-82.

181. Yoshimura, A., et al., *Cutting edge: recognition of Gram-positive bacterial cell wall components by the innate immune system occurs via Toll-like receptor 2*. J Immunol, 1999. 163(1): p. 1-5.
182. Schwandner, R., et al., *Peptidoglycan- and lipoteichoic acid-induced cell activation is mediated by toll-like receptor 2*. J Biol Chem, 1999. 274(25): p. 17406-9.
183. Means, T.K., et al., *The CD14 ligands lipoarabinomannan and lipopolysaccharide differ in their requirement for Toll-like receptors*. J Immunol, 1999. 163(12): p. 6748-55.
184. Takeuchi, O., et al., *Cutting edge: role of Toll-like receptor 1 in mediating immune response to microbial lipoproteins*. J Immunol, 2002. 169(1): p. 10-4.
185. Werts, C., et al., *Leptospiral lipopolysaccharide activates cells through a TLR2-dependent mechanism*. Nat Immunol, 2001. 2(4): p. 346-52.
186. Gantner, B.N., et al., *Collaborative induction of inflammatory responses by dectin-1 and Toll-like receptor 2*. J Exp Med, 2003. 197(9): p. 1107-17.
187. Heine, H. and E. Lien, *Toll-like receptors and their function in innate and adaptive immunity*. Int Arch Allergy Immunol, 2003. 130(3): p. 180-92.
188. Barbalat, R., et al., *Toll-like receptor 2 on inflammatory monocytes induces type I interferon in response to viral but not bacterial ligands*. Nat Immunol, 2009. 10(11): p. 1200-7.
189. Kawai, T. and S. Akira, *Signaling to NF-kappaB by Toll-like receptors*. Trends Mol Med, 2007. 13(11): p. 460-9.
190. Visintin, A., et al., *Lysines 128 and 132 enable lipopolysaccharide binding to MD-2, leading to Toll-like receptor-4 aggregation and signal transduction*. J Biol Chem, 2003. 278(48): p. 48313-20.
191. Jerala, R., *Structural biology of the LPS recognition*. Int J Med Microbiol, 2007. 297(5): p. 353-63.
192. Wright, S.D., et al., *CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein*. Science, 1990. 249(4975): p. 1431-3.
193. Viriyakosol, S., et al., *MD-2 binds to bacterial lipopolysaccharide*. J Endotoxin Res, 2000. 6(6): p. 489-91.
194. Ohto, U., et al., *Crystal structures of human MD-2 and its complex with antiendotoxic lipid IVa*. Science, 2007. 316(5831): p. 1632-4.

195. Park, B.S., et al., *The structural basis of lipopolysaccharide recognition by the TLR4-MD-2 complex*. Nature, 2009. 458(7242): p. 1191-5.
196. Akira, S., S. Uematsu, and O. Takeuchi, *Pathogen recognition and innate immunity*. Cell, 2006. 124(4): p. 783-801.
197. Takeuchi, O. and S. Akira, *Pattern recognition receptors and inflammation*. Cell, 2010. 140(6): p. 805-20.
198. Adachi, O., et al., *Targeted disruption of the MyD88 gene results in loss of IL-1- and IL-18-mediated function*. Immunity, 1998. 9(1): p. 143-50.
199. Kawai, T., et al., *Unresponsiveness of MyD88-deficient mice to endotoxin*. Immunity, 1999. 11(1): p. 115-22.
200. Kawagoe, T., et al., *Sequential control of Toll-like receptor-dependent responses by IRAK1 and IRAK2*. Nat Immunol, 2008. 9(6): p. 684-91.
201. Xia, Z.P., et al., *Direct activation of protein kinases by unanchored polyubiquitin chains*. Nature, 2009. 461(7260): p. 114-9.
202. Negishi, H., et al., *Evidence for licensing of IFN-gamma-induced IFN regulatory factor 1 transcription factor by MyD88 in Toll-like receptor-dependent gene induction program*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. 103(41): p. 15136-41.
203. Palsson-McDermott, E.M., et al., *TAG, a splice variant of the adaptor TRAM, negatively regulates the adaptor MyD88-independent TLR4 pathway*. Nat Immunol, 2009. 10(6): p. 579-86.
204. Carty, M., et al., *The human adaptor SARM negatively regulates adaptor protein TRIF-dependent Toll-like receptor signaling*. Nat Immunol, 2006. 7(10): p. 1074-81.
205. Ermolaeva, M.A., et al., *Function of TRADD in tumor necrosis factor receptor 1 signaling and in TRIF-dependent inflammatory responses*. Nat Immunol, 2008. 9(9): p. 1037-46.
206. Takahashi, K., et al., *Roles of caspase-8 and caspase-10 in innate immune responses to double-stranded RNA*. J Immunol, 2006. 176(8): p. 4520-4.
207. Oganessian, G., et al., *Critical role of TRAF3 in the Toll-like receptor-dependent and -independent antiviral response*. Nature, 2006. 439(7073): p. 208-11.

208. Hacker, H., et al., *Specificity in Toll-like receptor signalling through distinct effector functions of TRAF3 and TRAF6*. Nature, 2006. 439(7073): p. 204-7.
209. Kayagaki, N., et al., *DUBA: a deubiquitinase that regulates type I interferon production*. Science, 2007. 318(5856): p. 1628-32.
210. Tseng, P.H., et al., *Different modes of ubiquitination of the adaptor TRAF3 selectively activate the expression of type I interferons and proinflammatory cytokines*. Nat Immunol, 2010. 11(1): p. 70-5.
211. Zeng, W., et al., *Key role of Ubc5 and lysine-63 polyubiquitination in viral activation of IRF3*. Mol Cell, 2009. 36(2): p. 315-25.
212. Tennoever, B.R., et al., *Multiple functions of the IKK-related kinase IKKepsilon in interferon-mediated antiviral immunity*. Science, 2007. 315(5816): p. 1274-8.
213. Cohen, P., *The TLR and IL-1 signalling network at a glance*. J Cell Sci, 2014. 127(Pt 11): p. 2383-90.
214. Flannery, S. and A.G. Bowie, *The interleukin-1 receptor-associated kinases: critical regulators of innate immune signalling*. Biochem Pharmacol, 2010. 80(12): p. 1981-91.
215. Jain, A., S. Kaczanowska, and E. Davila, *IL-1 Receptor-Associated Kinase Signaling and Its Role in Inflammation, Cancer Progression, and Therapy Resistance*. Front Immunol, 2014. 5: p. 553.
216. Rhyasen, G.W. and D.T. Starczynowski, *IRAK signalling in cancer*. Br J Cancer, 2015. 112(2): p. 232-7.
217. Hammaren, H.M., A.T. Virtanen, and O. Silvennoinen, *Nucleotide-binding mechanisms in pseudokinases*. Biosci Rep, 2015. 36(1): p. e00282.
218. Cao, Z., W.J. Henzel, and X. Gao, *IRAK: a kinase associated with the interleukin-1 receptor*. Science, 1996. 271(5252): p. 1128-31.
219. Wesche, H., et al., *IRAK-M is a novel member of the Pelle/interleukin-1 receptor-associated kinase (IRAK) family*. J Biol Chem, 1999. 274(27): p. 19403-10.
220. Swantek, J.L., et al., *IL-1 receptor-associated kinase modulates host responsiveness to endotoxin*. J Immunol, 2000. 164(8): p. 4301-6.
221. Gottipati, S., N.L. Rao, and W.P. Fung-Leung, *IRAK1: a critical signaling mediator of innate immunity*. Cell Signal, 2008. 20(2): p. 269-76.

222. Wang, X., et al., *[Expression and clinical significance of TLR2 in laryngeal carcinoma tissue]*. Lin Chung Er Bi Yan Hou Tou Jing Wai Ke Za Zhi, 2013. 27(12): p. 629-32.
223. Wilkinson, *Flow Cytometry in Microbiology: Technology and Applications*. 1 ed. 2015: Caister Academic Press.
224. Kurien, S., *Western Blotting*. 1 ed. 2015: Humana Press.
225. Diaz-Zuniga, J., et al., *Variability of the dendritic cell response triggered by different serotypes of Aggregatibacter actinomycetemcomitans or Porphyromonas gingivalis is toll-like receptor 2 (TLR2) or TLR4 dependent*. J Periodontol, 2015. 86(1): p. 108-19.
226. Darveau, R.P., et al., *Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide contains multiple lipid A species that functionally interact with both toll-like receptors 2 and 4*. Infect Immun, 2004. 72(9): p. 5041-51.
227. Kocgozlu, L., et al., *Variable cell responses to P. gingivalis lipopolysaccharide*. J Dent Res, 2009. 88(8): p. 741-5.
228. Tabeta, K., et al., *Toll-like receptors confer responsiveness to lipopolysaccharide from Porphyromonas gingivalis in human gingival fibroblasts*. Infect Immun, 2000. 68(6): p. 3731-5.
229. Wara-aswapati, N., et al., *Induction of toll-like receptor expression by Porphyromonas gingivalis*. J Periodontol, 2013. 84(7): p. 1010-8.
230. Lu, W., et al., *Tolerance induced by Porphyromonas gingivalis may occur independently of TLR2 and TLR4*. PLoS One, 2018. 13(7): p. e0200946.
231. Chen, T., et al., *Comparative whole-genome analysis of virulent and avirulent strains of Porphyromonas gingivalis*. J Bacteriol, 2004. 186(16): p. 5473-9.
232. Naito, M., et al., *Determination of the genome sequence of Porphyromonas gingivalis strain ATCC 33277 and genomic comparison with strain W83 revealed extensive genome rearrangements in P. gingivalis*. DNA Res, 2008. 15(4): p. 215-25.
233. Kwon, S., et al., *Differential induction of Toll-like receptor gene expression in equine monocytes activated by Toll-like receptor ligands or TNF-alpha*. Vet Immunol Immunopathol, 2010. 138(3): p. 213-7.

234. Mori, Y., et al., *Immunohistochemical localization of Toll-like receptors 2 and 4 in gingival tissue from patients with periodontitis*. Oral Microbiol Immunol, 2003. 18(1): p. 54-8.
235. Kajita, K., et al., *Quantitative messenger RNA expression of Toll-like receptors and interferon-alpha1 in gingivitis and periodontitis*. Oral Microbiol Immunol, 2007. 22(6): p. 398-402.
236. Wu, C., et al., *Changes in Expression of the Membrane Receptors CD14, MHC-II, SR-A, and TLR4 in Tissue-Specific Monocytes/Macrophages Following Porphyromonas gingivalis-LPS Stimulation*. Inflammation, 2018. 41(2): p. 418-431.
237. Wang, P., et al., *LPS enhances TLR4 expression and IFNgamma production via the TLR4/IRAK/NFkappaB signaling pathway in rat pulmonary arterial smooth muscle cells*. Mol Med Rep, 2017. 16(3): p. 3111-3116.
238. Li, H., et al., *Lipopolysaccharide regulates toll-like receptor 4 expression in human aortic smooth muscle cells*. Cell Biol Int, 2007. 31(8): p. 831-5.
239. Wherry, E.J. and M. Kurachi, *Molecular and cellular insights into T cell exhaustion*. Nat Rev Immunol, 2015. 15(8): p. 486-99.
240. Zhou, C., et al., *MicroRNA-146a inhibits NF-kappaB activation and pro-inflammatory cytokine production by regulating IRAK1 expression in THP-1 cells*. Exp Ther Med, 2019. 18(4): p. 3078-3084.
241. Park, J.G., et al., *Syk Plays a Critical Role in the Expression and Activation of IRAK1 in LPS-Treated Macrophages*. Mediators Inflamm, 2017. 2017: p. 1506248.
242. Hu, Y., et al., *Periodontitis Induced by P. gingivalis-LPS Is Associated With Neuroinflammation and Learning and Memory Impairment in Sprague-Dawley Rats*. Front Neurosci, 2020. 14: p. 658.
243. Zhang, J., et al., *Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide induces cognitive dysfunction, mediated by neuronal inflammation via activation of the TLR4 signaling pathway in C57BL/6 mice*. J Neuroinflammation, 2018. 15(1): p. 37.
244. Liu, Y.C., et al., *TLR2 signaling depletes IRAK1 and inhibits induction of type I IFN by TLR7/9*. J Immunol, 2012. 188(3): p. 1019-26.

- 245. Domon, H., et al., *Early and preferential induction of IL-1 receptor-associated kinase-M in THP-1 cells by LPS derived from Porphyromonas gingivalis*. J Leukoc Biol, 2008. 83(3): p. 672-9.
- 246. Weighardt, H., et al., *Cutting edge: myeloid differentiation factor 88 deficiency improves resistance against sepsis caused by polymicrobial infection*. J Immunol, 2002. 169(6): p. 2823-7.
- 247. Sela, U., et al., *Strains of bacterial species induce a greatly varied acute adaptive immune response: The contribution of the accessory genome*. PLoS Pathog, 2018. 14(1): p. e1006726.
- 248. Zahringer, U., et al., *TLR2 - promiscuous or specific? A critical re-evaluation of a receptor expressing apparent broad specificity*. Immunobiology, 2008. 213(3-4): p. 205-24.
- 249. Takeuchi, O., et al., *Discrimination of bacterial lipoproteins by Toll-like receptor 6*. Int Immunol, 2001. 13(7): p. 933-40.

13. Anhang

Verbrauchsmaterialien, Apparate und Instrumente:

Aqua dest. (B. Braun, Melsungen, DE)

Choleratoxin Proliferationsfördernde Lösung (ListLab, Campbell, CA, USA)

Clarity Western ECL Blotting Substrate (BioRad, Hercules, CA, USA)

DMEM ohne Ca^{2+} Kalziumfreies Nährmedium (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)

DMEM mit Ca^{2+} Kalziumhaltiges Nährmedium (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)

Durchflusszytometer Cleaning and Rinse solution (Dako, Glostrup, DNK)

Durchflusszytometer Cyan ADP Flow Cytometer (Dako, Glostrup, DNK)

FCS inaktiviert fetales Kälberserum (Biochrom, Berlin, DE)

Glaspipetten Techcolor (2 ml, 5 ml, 10 ml, 20 ml) (Hirschmann Eberstadt, DE)

Goat anti-Mouse IgG #32430 (Thermofisher, Waltham, MA, USA)

Goat anti-Rabbit IgG #3246 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)

Goat Anti-Rabbit IgG #ab150077 (Abcam, Cambridge, UK)

Ham's F12 Nährmedium (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)

1M HEPES Puffer (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)

Image J (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA)

Inkubator BBD 6220 (Heraeus, Hanau, DE)

Inversmikroskop Diaphot Nikon (Nikon, Düsseldorf, DE)

IRAK1 Antikörper #38-5600 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)

Iso Flow Sheath Fluid Spüllösung (Beckman Coulter, Brea, CA, USA)

LPS *E. coli* (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)

Milchpulver (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE)

Mini-PROTEAN precast gel 10 % (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)

Mini-PROTEAN Tetra cell (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)

Mouse IgG1 Isotype Control #IC002G (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA)

Neubauer Improved Bright Line (Labor Optik, BadHomburg, DE)

Page Ruler Plus (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA)

Pam3CSK4 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)

PBS (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)

Penicillin/Streptomycin Antibiotika (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)

Permeabilisierungspuffer (eBioscience, San Diego, CA, USA)

Photometer (Hach DR/2000, Loveland, CO, USA)

Pierce BCA Protein Essay Kit (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA)

Pipetten Eppendorf Reference Eppendorf (Eppendorf, Hamburg, DE)

Ponceau S (Sigma, St. Louis, MO, USA)

PowerPac HC (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)

Reinraumwerkbank HeraSafe (Heraeus, Hanau, DE)

1X RIPA- Buffer (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA)

Summit V4.3.01 (Dako, Glostrup, DNK)

TBST (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE)

TLR2 Antikörper #Ma5-16189 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)

TLR2 Antikörper #53-9922-42 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)

TLR4 Antikörper #sc-293072 (SantaCruzBiotech, Dallas, TX, USA)

TLR4 Antikörper #sc-293072 AF488 (SantaCruzBiotech, Dallas, TX, USA)

Trans-Blot Turbo (BioRad, Hercules, CA, USA)

Trypsin-EDTA 0,5% Dissoziationslösung (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)

Wasserbad GFL 1083 (GFL, Burgwedel, DE)

6 Well Zellkulturplatte (Greiner Bio-One, Frickenhausen, DE)

50 nm Zellfilter (Dako, Glostrup, DNK, DE)

Zellkulturflaschen 75cm² (Greiner Bio-One, Frickenhausen, DE)

Zellkulturflaschen 25cm² (Greiner Bio-One, Frickenhausen, DE)

Zentrifuge EBA 12 R (HettichTuttlingen, DE)

14. Ehrenwörtliche Erklärung

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, oder habe diese nachstehend spezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

Ort, Datum

Unterschrift

15. Danksagung

Ich danke Herrn Professor Dr. Jörg Meyle und Dr. Sabine Gröger für die Überlassung des Dissertationsthemas und die gute Betreuung.

Ganz besonders herzlich danken möchte Ich meinen Eltern Dr. Elena und Manfred Weber, sowie meinen Geschwistern für die aufmerksame, liebevolle und immerwährende Unterstützung.