

PHAGOZYTOSE UND KILLING VERSCHIEDENER STÄMME VON  
PORPHYROMONAS GINGIVALIS

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades doctor medicinae  
dentariae (Dr. med. dent.)

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät  
der Friedrich-Schiller-Universität Jena  
von Daniel Schuster  
geboren am 17. Mai 1979 in Apolda

Gutachter

1. PD Dr. Sigrun Eick, Jena
2. Prof. Dr. Holger Jentsch, Leipzig
3. PD. Dr. Florentine Jahn, Jena

Tag der öffentlichen Verteidigung: 6. Juli 2010

## Abkürzungsverzeichnis

Arg	Arginin
c	counts, Einheiten
cfu	colony forming units, Kolonien bildende Einheiten
Cyt D	Dihydrocytochalasin D
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNase	Desoxyribonuklease
EM	Elektronenmikroskop
Hank's	Hank's balanced salt solution
HNE	Human Neutrophil Elastase, Granulozyten-Elastase
HRP	Horseradish Peroxidase, Meerrettich-Peroxidase
Lys	Lysin
MTT	Dimethylthiazolyl-Diphenyltetrazolium-Bromid
NET	neutrophile extracellular trap
nm	Nanometer
ORF	Open reading frames
<i>P. gingivalis</i>	<i>Porphyromonas gingivalis</i>
PBS	Phosphat gepufferte Saline
PMN	polymorphonuclear neutrophils, polymorphkernige Granulozyten
ROS	reaktive Sauerstoffarten
TEM	Transmissionselektronen-Mikroskop
$\Delta E$	Extinktionsänderung

Abkürzungsverzeichnis.....	3
1 Zusammenfassung.....	6
2 Einleitung.....	8
2.1 Parodontitis.....	8
2.2 Porphyromonas gingivalis.....	8
2.2.1 Stämme von Porphyromonas gingivalis.....	9
2.2.2 Virulenzfaktoren.....	9
2.3 Humanes Immunsystem.....	12
2.4 Polymorphkernige Granulozyten.....	13
2.4.1 Chemotaxis und Migration.....	15
2.4.2 Phagozytose.....	15
2.4.3 Killing.....	16
2.4.4 Zelltod.....	19
3 Ziele der Arbeit.....	21
4 Methodik .....	24
4.1 Charakterisierung der Stämme.....	24
4.1.1 Unterschiede in der Kapsel-Struktur.....	24
4.1.2 Unterschiede im Proteinprofil und in den Proteasen.....	26
4.1.3 DNase-Aktivität.....	31
4.2 Phagozytose.....	33
4.2.1 Phagozytose und Killing.....	33
4.2.2 Reaktion der Granulozyten auf Bakterien.....	35
5 Ergebnisse.....	37
5.1 Charakterisierung der Stämme.....	37
5.1.1 Unterschiede in der Kapsel-Struktur.....	37
5.1.2 Unterschiede in den Proteasen.....	39
5.1.3 DNase-Aktivität.....	46
5.2 Phagozytose und Killing.....	47

5.2.1 Phagozytose.....	47
5.2.2 Killing.....	48
5.2.3 Reaktionen der Granulozyten auf Bakterien.....	52
6 Diskussion.....	56
6.1 Angewandte Methodik.....	56
6.2 Elimination von <i>Porphyromonas gingivalis</i> durch polymorphkernige Granulozyten.....	58
6.3 Mechanismen des Killings.....	58
6.4 Virulenzfaktoren der Stämme.....	65
7 Schlussfolgerungen.....	71
8 Literatur- und Quellenverzeichnis.....	72
9 Anhang.....	83

## 1 Zusammenfassung

Die Pathogenese der Parodontitis wird heute als Interaktion von Bakterien mit Wirtszellen verstanden. Im Rahmen der angeborenen Immunität spielen Phagozytose und Killing von Bakterien durch polymorphkernige Granulozyten (PMNs) eine herausragende Rolle. Die parodontopathogene Spezies *Porphyromonas gingivalis* exprimiert eine Vielzahl wirkungsvoller Virulenzfaktoren, welche eine Veränderung der PMN-Funktion bewirken. So ist das Bakterium in der Lage, die Immunantwort sowohl zu stimulieren als auch zu unterdrücken. Die Stämme von *P. gingivalis* können in invasive und nicht-invasive Stämme eingeteilt werden.

Ziel dieser Studie war es, den Vorgang der Phagozytose und des Killings bei verschiedenen Stämmen von *P. gingivalis* durch PMNs zu untersuchen. Daneben sollte die Aktivität humaner neutrophiler Elastase bestimmt und die Bildung reaktiver Substanzen analysiert werden. Zum besseren Verständnis der Vorgänge sollten die Stämme einer genaueren Untersuchung ihrer Virulenzeigenschaften unterzogen werden. Alle Experimente wurden mit drei Stämmen der Spezies *P. gingivalis* durchgeführt. Bei Stamm ATCC 33277 handelt es sich um einen avirulenten Laborstamm. Der sequenzierte Stamm W83 verursacht Abszesse. *P. gingivalis* M 5-1-2 ist ein klinisches Isolat, welches einem Patienten mit schwerer chronischer Parodontitis entstammt. Zur Analyse der Virulenzeigenschaften erfolgte eine PCR auf Kapselgene. In einer Aufreinigung sowie anschließendem Western Blot sollten Differenzen in den Cystein-Proteasen aufgedeckt werden. Ebenso wurden die Stämme auf DNase-Aktivität untersucht. Bei den In vitro-Versuchen wurden die Stämme von isolierten PMNs phagozytiert. Die Vorgänge wurden nach 5, 30, 60 bzw. 120 Minuten unterbrochen und nach Kultur konnten Rückschlüsse auf Phagozytose und Killing gezogen werden. Ergänzend wurde extrazelluläres Killing durch Ausschaltung der Phagozytose mit Cytochalasin D bestimmt sowie EM-Aufnahmen angefertigt. Darüber hinaus wurde die Bildung intrazellulärer und extrazellulärer Sauerstoff-Radikale (ROS) mittels Chemolumineszenz mit Luminol bzw. Isoluminol gemessen sowie die Aktivität der Granulozyten-Elastase (HNE) als nicht-oxidativer Parameter ermittelt. Der Einfluss von *P. gingivalis* auf die Lebensfähigkeit der PMNs wurde bestimmt.

Unsere Untersuchung konnte zeigen, dass bei allen Stämmen eine gute Phagozytose und Abtötung der Bakterien durch Granulozyten erfolgte. Die Erreger wurden in hohem Maße abgetötet. Unter den Bedingungen unseres Versuches nahmen PMNs die Hälfte der *P. gingivalis* in weniger als 5 min (ATCC 33277) bzw. 30 min (M 5-1-2, W83) auf. Zwischen

dem avirulenten Laborstamm ATCC 33277 und dem virulenten Stamm W83 konnte in der Phagozytose kein signifikanter Unterschied gefunden werden. Stamm M 5-1-2 wurde zunächst schlechter, am Ende jedoch gleich gut phagozytiert. Das Killing phagozytierter *P. gingivalis* erfolgte innerhalb von 5 min, danach überlebten die Bakterien in den Phagosomen der PMNs. Unter den gegebenen Versuchsbedingungen betrug das extrazelluläre Killing nur 4% (*P. gingivalis* M 5-1-2) bis 24% (*P. gingivalis* ATCC 33277) des gesamten Killings durch PMNs, der größere Teil bakterizider Aktivität erfolgte phago-lysosomal.

Bei infizierten PMNs war die extrazelluläre Aktivität von HNE generell erhöht. Es fielen hohe Anfangswerte bei *P. gingivalis* M 5-1-2 sowie generell höhere Werte bei Stamm W83 auf. Der Kontakt von PMNs mit *P. gingivalis* führte in allen Fällen zu einem erhöhten Nachweis von extrazellulären und intrazellulären Sauerstoff-Radikalen. Die Messungen von ROS und HNE waren in ihren Ergebnissen gegenläufig. Stamm ATCC 33277, bei dem sehr wenig HNE freigesetzt wurde, provozierte die höchste Freisetzung von ROS bei Kontakt mit PMNs. Die DNase-Aktivität war bei Stamm M 5-1-2 am höchsten, gegen NET-vermitteltes extrazelluläres Killing erwies dieser sich als weitgehend resistent. Vermutlich kann sich *P. gingivalis* M 5-1-2 durch Zerstören der NETs ausbreiten und bildet dadurch einen invasiven Stamm. In den Cystein-Proteasen zeigten sich kaum Unterschiede bei den drei Stämmen. Bei allen Stämmen ließen sich Rgp-Proteasen wie Kgp-Proteasen in einem Komplex bei ~45 kDa nachweisen. Nach anfänglicher Stress-Aktivierung der PMNs bei Kontakt mit *P. gingivalis* verringerte sich die Lebenszeit der Zellen.

Es handelt sich bei *P. gingivalis* um eine bakterielle Spezies mit moderater Virulenz, welche Gewebeschädigung durch Modulation der Immunreaktion fördert. Klinische Isolate reagieren anders als Laborstämme. Weiterführende Untersuchungen sollten ebenso isogene Mutanten klinischer Isolate einbeziehen, welche mit dem Krankheitsbild assoziiert sind.

## **2 Einleitung**

### **2.1 Parodontitis**

Etwa 20% der 35- bis 44-Jährigen und 40% der 65- bis 74-jährigen in der BRD leiden derzeit unter einer schweren Form von Parodontal-Erkrankung. Die Tendenz ist steigend (Micheelis und Schiffner 2006). Die Parodontitis als lokale Infektion ist klinisch durch die Entzündung parodontalen Bindegewebes gekennzeichnet, welche zu einer chronisch entzündlichen Antwort der die Zähne umgebenden Gewebe führt. Die Zerstörung parodontaler Gewebe sowie der Verlust von Alveolarknochen kann in Zahnverlust gipfeln (Pihlstrom et al. 2005). Nach Geschwindigkeit des Verlustes an parodontalen Strukturen wird zwischen aggressiver Parodontitis und chronischer Parodontitis unterschieden. Parodontal-Erkrankungen werden als polymikrobielle Mischinfektionen angesehen, welche für destruktive Wirtsantwort verantwortlich sind. Es wird generell angenommen, dass die meisten Formen der Parodontitis durch Kolonisation pathogener Bakterien im gingivalen Sulkus hervorgerufen werden (Loe et al. 1965, Socransky und Haffajee 2005). Um Parodontitis zu verursachen, müssen pathogene Bakterien in der Lage sein, die Wirtsantwort und lokale protektive Mechanismen zu umgehen. Bestimmte Bakteriengruppen, meist gram-negative Spezies, wurden vermehrt aus destruktiven Läsionen isoliert. *Porphyromonas gingivalis* ist gemeinsam mit *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* und *Tannerella forsythia* Markerkeim der Parodontitis (Delima und Van Dyke 2003). Noch immer sind viele Mechanismen, die dem Einsetzen der Parodontitis zugrunde liegen, weitestgehend unbekannt. Welche Rolle spielt der Wirt, und welchen Anteil haben Erreger an der Parodontitis?

### **2.2 *Porphyromonas gingivalis***

Während *P. gingivalis* in erhöhtem Maße in Läsionen parodontaler Destruktion nachgewiesen wurde, ist das Bakterium an gesunden Stellen oder bei Gingivitis beinahe nicht nachweisbar. Die Elimination dieser Mikroorganismen aus der parodontalen Umgebung führt zu einer Rückkehr zu parodontaler Gesundheit, während ihre Persistenz zu refraktären Formen der Erkrankung führt (Delima und Van Dyke 2003). *P. gingivalis* gehört zu den asaccharolytischen obligat anaeroben gram-negativen nicht motilen Stäbchen der oralen Organismen. Bei Kultur auf Blutagar bilden sie glatte, erhobene Kolonien. Diese sind anfänglich weiß bis cremefarben, bilden aber nach 4 bis 8 d mit Protohäm korrelierende typisch braune oder schwarze Pigmente. Darum wird *P. gingivalis* zur Gruppe der schwarz pigmentierten Anaerobier gezählt. Hämin stellt für schwarz pigmentierte Anaerobier einen essentiellen Wachstumsfaktor dar (Lamont und Jenkinson

1998).

### **2.2.1 Stämme von *Porphyromonas gingivalis***

Nicht alle Stämme eines Mikroorganismus, die zu einer angeblich pathogenen Spezies gehören, bilden die gleichen Virulenzeigenschaften aus. Häufig werden auch avirulente Stämme dieser Mikroorganismen isoliert (Offenbacher 1996). So können auch die Stämme von *P. gingivalis* in invasive und nicht-invasive Stämme eingeteilt werden (Dorn et al. 2000). Es wurde demonstriert, dass invasive Stämme von *P. gingivalis* mehr pathogene Aktivität vorweisen als nicht invasive Stämme (Lamont et al. 1995). Bei ATCC 33277 handelt es sich um einen Laborstamm, der nur geringe virulente Eigenschaften aufweist. Basierend auf seiner Pathogenität in Mausmodellen wird der sequenzierte Stamm W83 als hoch virulente Variante von *P. gingivalis* betrachtet (van Steenberg et al. 1982, Yoshino et al. 2007). *P. gingivalis* W83 wurde ursprünglich aus einem parodontalen Abszess isoliert (Dahlén et al. 2007) und ist somit für schwere und generalisierte phlegmonöse Infektionen verantwortlich (Yoshino et al. 2007). Bei *P. gingivalis* M 5-1-2 handelt es sich um ein klinisches Isolat eines Patienten mit schwerer chronischer Parodontitis. Die einzelnen Stämme der Spezies *P. gingivalis* unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Virulenz z.T. erheblich. Auf diese Weise sind verschiedene Stämme unterschiedlich widerstandsfähig gegen Phagozytose (Conrads et al. 1999). Ein avirulenter Stamm von *P. gingivalis* wird leicht phagozytiert, während ein virulenter Stamm nicht phagozytiert wird (Sundqvist et al. 1982). Obwohl Kapsel, Virulenz und Beeinträchtigung der Phagozytose miteinander in Beziehung stehen, kann zwischen diesen Parametern keine klare Korrelation gefunden werden, wenn sie zusammen studiert werden (Zadeh et al. 1999). Die Details der Schlüssel-Faktoren eines invasiven Stamms sind noch nicht geklärt.

### **2.2.2 Virulenzfaktoren**

Pathogene Mikroorganismen haben eine Vielzahl von Strategien gegen Angriffe des Immunsystems entwickelt, damit sie in dem Wirt überleben können. Virulenzfaktoren sind Metabolite oder strukturelle Bestandteile, welche die Wirtsantwort unterbrechen und so zum Fortschreiten der Erkrankung beitragen (Loesche 1993). *P. gingivalis* ist für Studien zum Teil wegen seiner großen Menge an Virulenzfaktoren interessant. Dieser Mikroorganismus exprimiert eine Vielzahl wirkungsvoller Virulenzfaktoren, welche gegen ein breites Spektrum an Wirtsproteinen aktiv sind und damit Umgehung der Wirtsabwehr bieten. Zu den wichtigen Mechanismen gehört die Veränderung der PMN-Funktion (Imamura 2003). Lösliche Produkte von *P. gingivalis* behindern beispielsweise PMN-

Chemotaxis in vitro. Durch *P. gingivalis* wird die transepitheliale Migration der PMNs in Abhängigkeit von der Konzentration blockiert. Außerdem veranlasst *P. gingivalis*-Infektion eine Änderung der epithelialen Zellfunktion (Madianos et al. 1997). Da Virulenzfaktoren zur Pathogenese der Parodontitis beitragen, reflektieren sie sowohl den Beginn als auch die Progression der Erkrankung. Aus der Kenntnis über Virulenzfaktoren des Erregers ist eine genauere Analyse der komplexen Interaktionen des Immunsystems mit Parodontitis-Bakterien möglich. Dies betrifft die Besiedelung der parodontalen Tasche und Beeinflussung der Immunantwort sowie der entzündlichen Antwort des Wirts.

### ***Kapsel***

Eine der ersten strukturellen antigenen Komponenten pathogener Bakterien, auf welche die Wirtsabwehr trifft, ist die Kapsel, von der das Bakterium umschlossen ist. *P. gingivalis* besitzt eine dichte Kapsel, welche im Schutz gegen widrige Umweltbedingungen eine Rolle spielt und Resistenz gegen Phagozytose durch Effektorzellen des Wirts vermittelt (Condorelli et al. 1998). Mutanten von *P. gingivalis*, die zahlreiche extrazelluläre Polysaccharide exprimieren, sind resistenter gegen Phagozytose und intrazelluläres Killing als der Mutterstamm. Es gibt sechs Serotypen dieses Organismus, die sich anhand ihrer Kapsel-Polysaccharide (K-Antigene) unterscheiden lassen. Verkapselte Stämme (K+) führen im Mausmodell zu verstärkter Abszessbildung verglichen mit K-Antigen negativen Stämmen (K-). Dies lässt eine pathogene Rolle in der akuten Manifestation der Erkrankung vermuten (Laine und van Winkelhoff 1998). Der in unseren Versuchen verwendete Stamm W83 lässt sich dem pathogenen und anti-phagozytischen K1-Serotyp zuordnen. Serotyp K1 wurde bei 3,7% der *P. gingivalis*-Stämme von Erwachsenen mit Parodontitis gefunden (Yoshino et al. 2007). Die Kapsel des Stammes M 5-1-2 wurde bisher nicht klassifiziert.

### ***Enzyme***

*P. gingivalis* ist in der Lage, eine Vielzahl an Enzymen zu synthetisieren, welche Zerstörung des Gewebes verursachen können (Curtis et al. 1999).

#### *Gingipaine*

Unter den gramnegativen Bakterien besitzt *P. gingivalis* die höchste proteolytische Aktivität. Dieses hohe enzymatische Potential erhält der Erreger in erster Linie durch die Cystein-Proteinasen (Gingipaine). Diese umfassen Arg-spezifische Proteinasen namens Rgp sowie Lys-spezifische Proteinasen namens Kgp. Die Arg-spezifischen Gingipaine lassen sich anhand ihrer molekularen Struktur in RgpA und RgpB einteilen (Potempa et al. 2003). Bakterielle Proteasen versorgen die Bakterien mit Nährstoffen. Dabei spalten sie

Bestandteile der parodontalen Gewebe und tragen damit direkt zu dessen Schädigung bei (Imamura 2003). Außerdem verursachen die proteolytischen Enzyme spezifische Aktivierung und Deaktivierung bioaktiver Proteine. Dazu gehört die Aktivierung der Blutgerinnung (Pike et al. 1996) sowie die Steigerung vaskulärer Permeabilität (Imamura et al. 2001). Durch Spaltung von Immunglobulinen, Komplement und Regulatorproteinen schützen Gingipaine *P. gingivalis* auch vor der Immunabwehr (Popadiak et al. 2007). Gingipaine bewirken zusätzlich eine Modifikation der neutrophilen Funktionen (Imamura et al. 2001). Durch Neutralisierung von chemotaktischen Faktoren und deren Rezeptoren auf den PMNs werden Granulozyten zwar in den gingivalen Sulkus angelockt, können die Erreger aber nicht phagozytieren (Mikolajczyk-Pawlinska et al. 1998). Gegen *P. gingivalis* setzen sich inflammatorische Antworten fort. Akkumulierte Leukozyten stützen fruchtlose Attacken, die zu einer Schädigung im parodontalen Gewebe und zu einem Fortschreiten der Parodontitis führen. An Stellen mit Infektionen durch *P. gingivalis* scheinen Gingipaine gemeinsam mit Proteasen aus aktivierten Phagozyten durch ihre proteolytischen Eigenschaften die Zerstörung subgingivalen Gewebes synergistisch zu beschleunigen (Into et al. 2006). Gingipaine könnten als anti-phagozytischen Faktoren eine Schlüsselfunktion im Überleben der Erreger darstellen.

#### *DNase-Aktivität*

Das Enzym mit DNA-bindender Aktivität kann in extrazellulären Vesikeln der äußeren Membran gefunden werden, welche *P. gingivalis* produziert. Jene Vesikel werden von der bakteriellen Zelloberfläche freigesetzt (Mayrand und Grenier 1989). DNasen werden durch viele pathogen Bakterienspezies exprimiert (Sumbly et al. 2005, Buchanan et al. 2006). So findet sich DNase auch bei *P. gingivalis* (Leduc et al. 1995), aber die Rolle des Enzyms, welches extrazelluläre DNA auflöst, blieb lange Zeit unverstanden. Erst kürzlich wurde eine Bedeutung von DNase im Rahmen des extrazellulären Killings erschlossen. In NETs werden Erreger gefangen. Besonders invasive Bakterien haben mit extrazellulären DNasen Virulenzmechanismen entwickelt, um sich aus den Fallen der PMNs zu befreien. Die NETs werden durch DNase zerstört, da ihre Struktur durch DNA aufrecht erhalten wird. Auflösung der NETs mittels DNasen eliminiert deren antimikrobiellen Eigenschaften. Auf diese Weise wird die extrazelluläre Aktivität der PMNs gegen Bakterien stark reduziert, weil sich Erreger aus den bakteriziden Fallen befreien können (Brinkmann et al. 2004). Der Zusammenhang zwischen DNasen bei parodontalen Erregern und extrazellulärem Killing wurde bisher noch nicht erforscht.

## 2.3 Humanes Immunsystem

Ein Teil des Systems ist grundlegend und angeboren, der andere Teil wird erst in Kontakt mit Erregern erworben. Beide Verteidigungssysteme beeinflussen sich gegenseitig und sind durch ein Netzwerk von Zytokinen synchronisiert, um Eindringlinge zu eliminieren. Allerdings muss die Abwehr auch Schäden am umliegenden Gewebe hinnehmen und kann trotzdem nicht immer erfolgreich die Ausbreitung von Mikroorganismen verhindern (Ishikawa 2007).

### ***Erworbene Immunantwort***

Die erworbene Immunantwort setzt sich aus Antikörpern, Makrophagen und T-Zellen zusammen. Antikörper erhöhen die bakterielle Phagozytose und helfen, die bakteriellen Toxine zu entgiften (Ebersole und Taubman 1994). Es wird angenommen, dass eine substantielle Antikörper-Antwort auf parodontale Mikroorganismen in der Begrenzung der Gewebeerstörung mitwirkt (Meng et al. 2007). Die bedeutende protektive Funktion der PMNs, welche in Phagozytose und Killing der Bakterien besteht, hängt oft von der Serum-Opsonierung durch Antikörper und Komplement ab. Bei Opsonierung handelt es sich um ein Einhüllen des Bakteriums mit für Phagozyten wahrnehmbaren körpereigenen Molekülen. Diese Funktion übernehmen Antikörper und/oder Komplement. Phagozytose benötigt normalerweise Opsonierung oder erreicht durch sie erst einen effektiven Wirkungsgrad (Zadeh et al. 1999). Die durch Opsonine vermittelte Wahrnehmung findet vor der Phagozytose von Fremdkörpern statt. Derartig wird die Wahrnehmung durch Interaktion von opsonierenden Immunglobulinen und dem Komplement-Fragment C3b sowie deren Rezeptoren auf der Oberfläche der PMNs erreicht. Phagozytose wird erleichtert, wenn die Mikroben mit opsonierenden Proteinen wie Immunglobuline oder Komplement-Fragment C3b ummantelt sind (Delima und Van Dyke 2003). Fehlen Antikörper, erfolgt die Aktivierung durch nicht spezifische Opsonine im Serum oder durch das Komplement-System. Für die Opsonine bildet der PMN bestimmte multiple spezifische Rezeptoren aus (Kantarci et al. 2003). Auf viele Erreger haben Opsonine bereits einen antimikrobiellen Effekt. Gegen *P. gingivalis* wird ein Immunglobulin (IgG2) ausgebildet. Wegen der geringen Komplement-Fixation, der geringen opsonierenden Fixation sowie der geringen Aktivität der Immunglobuline ist das Clearing jedoch sehr ineffektiv (Kobayashi et al. 2006). Komplement und Antikörper werden durch Proteasen von *P. gingivalis* abgebaut (Sundqvist et al. 1984). Entsprechend ist die Bakterienspezies gegen Killing durch Antikörper und Komplement im Serum resistent und überlebt sehr hohe Serum-Konzentrationen (Popadiak et al. 2007).

## **Angeborene Immunantwort**

Die angeborene Immunantwort spielt in der zufriedenstellenden Lösung einer bakteriellen Infektion durch den Wirt eine entscheidende Rolle. Sie wird hauptsächlich von phagozytierenden PMNs ausgeführt, denn diese bilden die erste Verteidigungslinie des Körpers gegen eindringende Mikroorganismen (Nathan 2006).

### **2.4 Polymorphkernige Granulozyten**

PMNs sind primäre Effektorzellen der angeborenen Immunabwehr. Gemeinsam mit Monozyten und Makrophagen gelangen sie auf chemotaktische Signale hin in großer Zahl als erste an einen Infektionsherd (Buchanan et al. 2006). Die Funktion der PMNs kann als Adhärenz, Chemotaxis, Phagozytose und mikrobizide Aktivität kategorisiert werden (Kantarci et al. 2003). Phagozyten akkumulieren sich schnell an Stellen der Infektion, verschlingen die Mikroben und töten sie durch verschiedene Mechanismen ab (Nathan 2006). Als Bestandteile der angeborenen Immunabwehr sind sie nicht in der Lage, ihre Reaktion unterschiedlichen Erregern anzupassen und erkennen Erreger auch bei erneutem Befall des Organismus nicht wieder. Aber auch zur Erlangung der erworbenen Immunität sind PMNs als Teile des angeborenen Immunsystems unverzichtbar, denn sie präsentieren nach der Phagozytose Antigene, durch welche spezifische Immunreaktionen möglich sind (Zadeh et al. 1999). PMNs spielen ebenfalls in der Regulierung der Entzündungsantwort durch Zytokine und Interleukin-1 eine wichtige Rolle. Sie beeinflussen die Wundheilung, Reparatur-Mechanismen am Gewebe und die Abstimmung der Immunantwort (Nathan 2006).

PMNs umfassen einen großen Anteil kernhaltiger Zellen des peripheren Blutes und bilden 60-70% der im Blut zirkulierenden Leukozyten. Sie werden in Stammzellen des Knochenmarks in einem Differenzierungsprozess gebildet, der etwa 14 Tage für die Reifung benötigt. Im Knochenmark werden bei einem gesunden Erwachsenen täglich  $10^{11}$  PMNs gebildet. Reife PMNs gelangen ins Blutsystem und zirkulieren für 7-10 Stunden (Meng et al. 2007). Als Antwort auf entzündliche Stimuli migrieren PMNs aus dem zirkulierenden Blut in infizierte Gewebe. Dort binden, phagozytieren und inaktivieren sie Bakterien effizient. Phagozytierte Bakterien werden schnell durch proteolytische Enzyme und antimikrobielle Proteine abgetötet. PMNs besitzen auch die Fähigkeit der Degranulation, wobei sie antimikrobielle Faktoren in das extrazelluläre Medium freisetzen (Brinkmann et al. 2004). PMNs gewinnen die von ihnen benötigte Energie über  $O_2$ -unabhängige Glykolyse. Dies ist notwendig, weil innerhalb des gingivalen Sulkus sowie im entzündeten Gewebe der  $O_2$ -Partialdruck vermindert ist. Derart kann der Granulozyt seine

Energie auch unter anaeroben Bedingungen gewinnen, wie es im hypoxisch entzündeten Gewebe der Fall ist (Zadeh et al. 1999).

PMNs töten Bakterien, beeinflussen ihr Wachstum oder modifizieren die Kolonisation der Mikroorganismen auch im Parodont. Bakterielle Komponenten und intakte Mikroben können in PMNs nachgewiesen werden, welche aus dem gingivalen Sulkus isoliert wurden (Lange und Schroeder 1971). Ein Anstieg ihrer Zahl wurde in entzündlichen parodontalen Läsionen gefunden (Skapski und Lehner 1976). Neutrophile Granulozyten sind jene Entzündungszellen, welche sich in der größten Menge in gingivalem Geweben und im gingivalen Sulkus finden. Selbst in dem gingivalen Sulkus keimfreier Versuchstiere sind Granulozyten vorhanden. Während tiefer liegende Verbindungsgewebe von chronisch inflammatorischen Zellen dominiert werden, finden sich in Bindegewebe und im gingivalen Sulkus vornehmlich PMNs. In parodontalen Läsionen finden sich jene Leukozyten im gingivalen Sulkus sowie direkt in bzw. unmittelbar unterhalb des Verbindungsepithels. Die Örtlichkeit dient als zentraler Punkt, von dem aus einige der Parameter verringert werden, die mit parodontaler Erkrankung verbunden sind. Dies geschieht entweder durch Bekämpfung parodontaler Bakterien oberhalb des Epitheliums oder durch Bereitstellung anti-inflammatorischer Signale an chronische Entzündungszellen innerhalb darunter liegender Gewebe (Zadeh et al. 1999). PMNs spielen eine Schlüsselrolle in der Aufrechterhaltung der parodontalen Gesundheit und in der Verteidigung des dento-gingivalen Raumes gegen Mikroorganismen und physiologische Nebenprodukte (Wilton 1982). Die Bedeutung funktionsfähiger PMNs für gesunde parodontale Verhältnisse zeigt sich in erhöhter Anfälligkeit bei Patienten mit neutrophilen Mangelfunktionen. Eine chronische Neutropenie äußert sich z.B. in präpubertärer Parodontitis (Zaromb et al. 2006).

Während PMNs in der Begrenzung bakterieller Invasion effektiv sein müssen, können Entzündungsantwort sowie Immunantwort auch zur Zerstörung von Wirtsgewebe beitragen. Obwohl die Parodontitis bakteriellen Ursprungs ist, hängen Ausmaß und Schwere der Krankheit von der Interaktion pathogener Mikroben und Wirtsantwort ab (Smith 1994, Delima und Van Dyke 2003). Verschiedene neutrophil-spezifische Moleküle verstärken die entzündliche Immunantwort (Battino et al. 1999, Yamalik et al. 2000). Die Freisetzung von Granula-Inhalten aus infiltrierenden Leukozyten wie lysosomale Enzyme und ROS, die normalerweise für den Abbau aufgenommener Mikroben vorgesehen sind, kann auch zum Gewebeabbau und zur Verstärkung der entzündlichen Antwort mit kontinuierlicher Rekrutierung neuer Leukozyten führen. Deren Aktivierung führt zu

abweichender Freisetzung eines Spektrums von Noxen, die für den Kampf gegen Bakterien vorgesehen waren, aber auch weitere Gewebeschäden verursachen können (Pouliot et al. 2000). Die Anhäufung von PMNs in großer Zahl in purulenten Exsudaten (Pus) ist normalerweise mit schweren Gewebeschäden verbunden. Die Schädigung wird zum Teil durch Entleerung ihres Inhalts aus den Granula hervorgerufen (Appelberg 2007).

#### **2.4.1 Chemotaxis und Migration**

PMNs werden kontinuierlich im Knochenmark produziert und zirkulieren im Blut, bis sie in infiziertes Gewebe rekrutiert werden (Appelberg 2007). Chemotaxis ist die direkte Bewegung einer Zelle entlang eines chemischen Konzentrationsgradienten. Ausgereifte PMNs, die schnellsten Zellen im Körper, sind in der Lage, sich mit einer Geschwindigkeit von 400  $\mu\text{m}/\text{h}$  zu bewegen. Phagozyten kriechen und schwimmen nicht. Um zu kriechen, nimmt der Phagozyt eine asymmetrische Gestalt an und heftet sich reversibel an einige Substrate an. Die Muskulatur, welche in diese Form der zellulären Motilität einbezogen ist, liegt im klaren Zytoplasma. Die Bewegung entsteht durch Polymerisation und Depolymerisation von Aktin (Zadeh et al. 1999). Die von primären Effektorzellen gebildeten Zytokine während einer Gingivitis führen zu vermehrter Einwanderung und Aktivierung weiterer Abwehrzellen wie Makrophagen und Lymphozyten. PMNs in Zirkulation werden durch Zytokine in infizierte Gewebe geleitet. Dies geschieht durch die Kooperation von Adhäsions-Molekülen an der Oberfläche der PMNs sowie endothelialen Zellen und von chemotaktischen Substanzen, die von vielen Zellarten ausgeschieden werden (Appelberg 2007). Es besteht eine beständige Migration aus den peripheren Blutgefäßen durch die Gingiva in den Sulkusbereich. Auf diese Weise soll ein effektiver Schutz vor Infekten gebildet werden. Im Sulkus kann die Konzentration von PMNs deren Zahl im peripheren Blut bei weitem überschreiten. Befinden diese sich einmal im Sulkus, bilden die PMNs einen Leukozytenwall (Schroeder und Münzel-Pedrazzoli 1970). Dabei bilden sie Aggregate aus Entzündungszellen entlang der Ränder der vorrückenden Plaquefront (Delima und Van Dyke 2003).

#### **2.4.2 Phagozytose**

Mikroskopische Studien an PMNs aus der Plaque-Oberfläche zeigen eingeschlossene Bakterien in Phagosomen (Lange und Schroeder 1971). Ähnliches lässt sich auch an PMNs nachweisen, die aus der Sulkusflüssigkeit isoliert wurden (Sandholm 1984). Elektronen-Mikroskopie bestätigte auch, dass die Mehrzahl der PMNs aus dem Sulkus strukturell intakt waren, während die Bakterien in ihren Vesikeln verdaut wurden (Attström 1970). PMNs sind hoch effizient beim Umschließen mikrobieller Partikel und

körperfremden Materials an Infektionsherden. Jener Prozess, bei dem Partikel physisch durch PMNs in Plasma-Membran eingeschlossen und in Phagosomen abgekapselt werden, nennt sich Phagozytose. Das Zusammentreffen von PMNs mit Bakterien führt zur Aktivierung weiterer Granulozyten. Erreichen PMNs die Mikroorganismen, ist ein wichtiger initialer Schritt die Wahrnehmung des Partikels als Fremdkörper. Die durch Opsonine vermittelte Wahrnehmung findet vor der Phagozytose der Fremdkörper statt (Kantarci et al. 2003). Die Interaktion zwischen Opsoninen und Rezeptoren führt zu einer sub-membranösen Aktivierung kontraktiver Mikrofilamente. Dies führt zur Bildung von Pseudopodien und Einschließen der Partikel (Van Dyke und Hoop 1990). Während der Phagozytose werden Teile der Phagozyten-Membran nach außen gestülpt. Diese Pseudopodien, welche Erreger umschließen können, werden durch Polymerisation von Aktin-Filamente im Cytoskelett gebildet (Oliver 1978). Eine intrazelluläre Vakuole oder Phagosom entsteht, die von der Zellwand ins Innere wandert (Dennison und Van Dyke 1997). Phagozytose wird von Virulenzfaktoren der Erreger wie z.B. einer Kapsel erschwert, da diese einer Wahrnehmung der PMNs entgegen wirken. Bei bisherigen Untersuchungen wurde bei Phagozytose-Versuchen in vitro mit unterschiedlich virulenten Stämmen von *P. gingivalis* keine eindeutigen Aussagen gefunden (Sundqvist et al. 1991, Popadiak et al. 2007).

### **2.4.3 Killing**

Nach Phagozytose der Erreger wenden PMNs eine komplexe Vielfalt an Mechanismen zur Elimination eingeschlossener Mikroorganismen in intrazellulären Phagozyten-Vakuolen an. In Membran-gebundenen Vesikeln sind antimikrobielle Toxine verpackt. Diese werden primäre (azurophile) und sekundäre (spezifische) Granula genannt. Membran-gebundene Granula mit kationischen Peptiden und lytischen Enzymen verschmelzen mit den Phagosomen und werden zu Phago-Lysosomen, in denen Bakterien abgetötet und zerlegt werden. Die Granula tragen zum Zelltod sowie zum Abbau der Mikroorganismen bei (Williams 2006). Damit wirken kraftvolle antimikrobielle Moleküle wie kationische Peptide, Proteasen und Laktoferrin auf Erreger ein. Kationische Peptide trennen die Membran der Bakterien auf. Lysozyme zerstören die Bakterien-Wand, so dass es zum osmotischen Schock kommt. Das Molekül Laktoferrin cheliiert Eisen und entzieht den Mikroorganismen dieses lebenswichtige Metall. Dazu sind PMNs in der Lage, für oxidatives Killing reaktive Arten von  $O_2$  (ROS) und Stickstoff abzugeben (Nathan 2006). Killing ist bei phagozytierten, intrazellulären Bakterien am effektivsten. Einige Bakterien werden jedoch extrazellulär ohne Phagozytose abgetötet. PMNs setzen hierbei

ihre Granula-Inhaltsstoffe in die Umgebung frei und töten damit die Mikroorganismen ab (Kantarci et al. 2003).

### ***Oxidatives Killing***

Vor Adhärenz an einen Ziel-Mikroorganismus beginnt der PMN mit dem Konsum von O<sub>2</sub>. Dieser Vorgang wird „respiratory burst“ genannt. Sehr wenig des verbrauchten O<sub>2</sub> wird für die Energiegewinnung genutzt. Stattdessen werden reduzierte O<sub>2</sub>-Metaboliten gebildet, welche reaktive Sauerstoffe (ROS) genannt werden. Die reaktiven Metaboliten werden zum Abtöten der Ziel-Mikrobe genutzt (Zadeh et al. 1999). Man glaubt, dass O<sub>2</sub>-Metabolite sowohl in der Plasma-Membran als auch in der phago-lysosomalen Membran produziert und konsequent in die Phago-Lysosomen bzw. in die extrazelluläre Umgebung abgegeben werden (Takeuchi et al. 1988). Die Freisetzung der Myeloperoxidase, eines leistungsfähigen oxidativen Enzyms aus azurophilen Granulas der Granulozyten, ergibt einen Anstieg von Hypochlorsäure sowie von Chloraminen. Von der Myeloperoxidase unabhängig initiiert das NADPH-Oxidase System die O<sub>2</sub>-Reduktion bei Wasserstoffperoxid, Hyperoxid-Anionen, Hydroxyl-Anionen, Hydroxyl-Radikalen und bei Singulett-Sauerstoff (Delima und Van Dyke 2003). Die reaktionsfreudigen Radikale, welche von PMNs produziert werden, können jedes biologisch relevante Molekül wie Proteine, Lipide, Kohlenhydrate und Nukleinsäuren oxidativ verändern und damit funktionell schwer beeinträchtigen (Ambrosio und Tritto 1999). So verursachen O<sub>2</sub>-Verbindungen die Peroxidation von Membran-Lipiden des Bakteriums. Aber gemeinsam mit O<sub>2</sub>-unabhängige zytotoxischen Mechanismen spielen ROS auch bei Schäden am Wirtsgewebe eine wichtige Rolle, die von Granulozyten verursacht werden (Hirayama et al. 2001).

### ***Nicht oxidatives Killing***

Weil die parodontale Tasche von einem reduzierten O<sub>2</sub>-Gehalt gekennzeichnet ist, bleibt die Verteidigung gegen Mikroorganismen in dieser Umgebung maßgeblich auf O<sub>2</sub>-unabhängige Mittel angewiesen. Die anaerobe Umgebung zwingt PMNs, andere Verbindungen zu nutzen als jene, die über O<sub>2</sub> gebildet werden. Daran sind PMNs gut angepasst (Claesson et al. 1994). Bei nicht oxidativem Killing werden Enzyme aus den Granula der PMNs im Vorgang der Degranulierung abgesondert (Kantarci et al. 2003). Mit den Enzymen können die Granulozyten Bakterien auflösen. Zu den nicht oxidativ wirkenden kationischen Peptiden gehören Proteasen, Defensine, LL-37, bactericidal permeability inducing proteins (BPI-Proteine), Cathepsin G, humane neutrophile Elastase (HNE), Proteinase 3, Azurocidin, Lysozyme und Lactoferrin (Delima und Van Dyke 2003).

Die neutralen Serin-Proteasen sind Hauptbestandteil azurophiler Granula in den PMNs. Es gibt drei bekannte Vertreter der Serin-Proteasen. Zu ihnen gehören HNE, Proteinase 3 und Cathepsin G (de Haar et al. 2006).

Das proteolytische Enzym HNE kann verschiedene extrazelluläre Matrix-Proteine wie Elastin, Fibronectin sowie Kollagen hydrolysieren und auflösen (Kantarci et al. 2003). HNE gehört zu den Molekülen, die als Signatur der PMNs betrachtet werden, denn es wird nur in den Granulozyten gebildet. Das Enzym wird weder im Speichel noch im Sulcus-Epithel produziert (Zadeh et al. 1999). Aktive Enzyme werden während des Lebens eines neutrophilen Granulozyten in zytoplasmatischen azurophilen primären Granula gespeichert, bis sie bei spezifischer Aktivierung in Phago-Lysosomen entleert oder in die Umgebung der Zelle ausgeschüttet werden. Intrazelluläre HNE spielt eine Schlüsselrolle als Effektormolekül der primären Immunantwort (Belaaouaj et al. 1998). HNE wurde übereinstimmend in neutrophil-vermittelte Schäden verwickelt, weil es im extrazellulären Raum Bindegewebe auflöst. Die Existenz von HNE in abgeschirmten perizellulären Räumen könnte erklären, warum Gewebe trotz eines augenscheinlich geringen Entzündungsgrad abgebaut wird (Kantarci et al. 2003). Bisher unerforscht ist, ob bei Stämmen mit unterschiedlichem Virulenz-Potential immer die gleiche Menge an HNE freigesetzt wird. Ein erhöhte Freisetzung von HNE bei bestimmten Stämmen könnte schwerere Schäden an paradontalem Gewebe verursachen.

### *Extrazelluläres Killing*

PMNs können extrazelluläre pathogene Mikroorganismen auch in Abwesenheit von Phagozytose töten. Das Killing extrazellulärer Bakterien mag vorteilhaft erscheinen, denn es bietet eine schnellere und breitere Kontrolle der Infektion. Dieselben Enzyme und Wirkstoffe, welche in das Phagosom abgesondert werden, können auch in den extrazellulären Raum freigesetzt werden. Extrazelluläres Killing trägt zu einer großen Ausweitung der Elimination eindringender Mikroorganismen bei. Diese Funktion wird durch Enzyme wie HNE sowie durch ROS vermittelt (Kantarci et al. 2003).

### **Ausbildung von Neutrophil Extracellular Traps**

Erst in neuer Zeit wurde nachgewiesen, dass aktivierte PMNs Netze aus extrazellulären DNA-Fasern ausscheiden können, welche Histone und Granula-Proteinasen wie HNE enthalten (Brinkmann et al. 2004). Ihre Entdeckung erweitert das Verständnis der mikrobiellen Killing-Kapazität dieser spezialisierten Leukozyten. NETs fangen und töten umgebende Bakterien extrazellulär unabhängig von deren Aufnahme durch Phagozytose. Die EM-Struktur besteht aus faserigen DNA-Strängen und kugelförmigen

Proteindomänen, die sich zu größeren Ketten ansammeln können. Diese Proteine bilden das Netzwerk mit antimikrobieller Aktivität. Die Gegenwart von HNE und Histonen lässt sich in den NETs in kugelförmigen Bereichen nachweisen. Die Fallen sind aus granulären und nuklearen Bestandteilen des PMNs zusammengesetzt. Granula-Komponenten in den Strukturen sind Peptide und Enzyme wie HNE und Myeloperoxidase, die normalerweise in azurophilen, primären Granula gespeichert werden. Die nuklearen Bestandteile sind DNA-Chromatin und Histone. Für das bakterielle Killing der NETs sind die Granula-Proteine und Histone verantwortlich. Die antimikrobielle Aktivität von Histonen gilt als gesichert (Hirsch 1958, Brinkmann et al. 2004). DNA ist die bedeutendste strukturelle Komponente der NETs. Sie bildet das Rückgrat, auf dem die Effektoren sitzen. Als Chromatin bildet DNA extrazelluläre Strukturen, welche die Effektivität antimikrobieller Substanzen verstärkt, indem sie deren hohe Konzentration sichert.

Die extrazellulären Fallen werden ausgebreitet, um Bakterien zu fangen, die dann durch HNE abgebaut werden. Das Fangen und Abtöten eindringender Bakterien bietet eine schnelle und umfassende Kontrolle der Infektion. NETs töten auch Mikroben, welche PMNs wegen deren Größe nicht phagozytieren können (Urban et al. 2006). Zusätzlich zu ihren antimikrobiellen Eigenschaften könnten NETs als physikalische Barrieren dienen, welche eine weitere Streuung der Bakterien verhindert. Weiterhin könnte das Abkapseln der Granulaproteine in NETs ihre potentiell noxischen Proteasen davon abhalten, hinweg zu diffundieren. Sonst könnten sie im angrenzenden Gewebe an entzündlichen Stellen Schaden verursachen. NETs minimieren den Schaden an Wirtszellen (Balloy et al. 2003).

Aktivierete Zellen, nicht aber naive Zellen bilden NETs aus. NETs sind nicht das Resultat eines Austretens von DNA während zellulärer Zersetzung, sondern neutrophile Granulozyten stellen die NETs aktiv her. Es ist ein Prozess, der von Nekrose und Apoptose zu unterscheidenden ist. Dieser aktive Prozess hängt von der Bildung von ROS durch NADPH-Oxidase ab. Die Erzeugung von ROS durch NADPH-Oxidase wird einerseits für effizientes phagozytisches Killing benötigt. Andererseits wirkt ROS als „Second Messenger“, um die NET-Ausbildung zu triggern. Die Ausbildung von NETs ist spezifisch für PMNs (Fuchs et al. 2007). Die Auswirkung von NETs auf das Killing von *P. gingivalis* blieb bisher unerforscht. Der Anteil extrazellulären Killings bei *P. gingivalis* und die Auswirkung von DNase sind nicht bekannt.

#### **2.4.4 Zelltod**

PMNs sind kurzlebige Phagozyten (Williams 2006). Die meisten Zellen sterben, während sie sich noch in Zirkulation befinden. Sofern sie nicht in infiziertes Gewebe migriert sind,

so werden PMNs nach 8-20 h Zirkulation im peripheren Kreislauf abgekapselt und in der Milz abgebaut (Meng et al. 2007). Nur ein Teil der Neutrophilen wird gegen Infektionen ankämpfen, wenn sie aus intakten Blutgefäßen in das umgebende Körpergewebe übertreten. Normalerweise sterben PMNs innerhalb von Stunden durch einen streng regulierten programmierten Zelltod, Apoptose genannt (Borregaard und Cowland 1997). PMNs sind gewöhnlich zur Apoptose bereit, um die Auslösung entzündlicher Reaktionen zu vermeiden, besonders wenn ihre Aktivität nicht benötigt wird. Zu diesem Zeitpunkt treffen sie auf Makrophagen. Diese nehmen die PMNs auf und bauen ihre Bestandteile ab. Die Anhäufung von PMNs in großer Zahl in purulenten Exsudaten (Pus) ist normalerweise mit schweren Gewebeschäden verbunden. Die Schädigung wird zum Teil durch Entleerung ihres Inhalts aus den Granula hervorgerufen (Appelberg 2007). PMNs haben Oberflächen-Rezeptoren, die bestimmte Oberflächen-Moleküle der Bakterien erkennen und binden. Dies kann die Phagozyten in Alarmbereitschaft versetzen und ihr Leben verlängern (Zadeh et al. 1999). Die Granulozyten werden ebenfalls oft durch bakterielle Toxine aus phagozytierten Erregern zerstört. *P. gingivalis* wirkt zytotoxisch auf PMNs. Die Wand der Phagozytosevakuole wird nach einigen Stunden durchlässig. Die darin enthaltenen Enzyme ergießen sich in die Zelle und zerstören diese (Kurita-Ochiai et al. 2001). In der Virulenz der Stämme von *P. gingivalis* könnte der Zelltod von PMNs ein wichtiger Faktor sein. Von Bedeutung ist demnach, wie sich eine Infektion mit *P. gingivalis* auf die Lebensfähigkeit von PMNs auswirkt.

### 3 Ziele der Arbeit

Die Pathogenese der Parodontitis wird heute als Interaktion von Bakterien mit Wirtszellen verstanden. Im Rahmen der angeborenen Immunität spielen Phagozytose und Killing von Bakterien durch PMNs eine herausragende Rolle. Noch immer sind viele Mechanismen, die dem Einsetzen der Parodontitis zugrunde liegen, weitestgehend unbekannt. Ziel dieser Studie war es, den Vorgang der Phagozytose und des Killings bei verschiedenen Stämmen von *P. gingivalis* durch PMNs zu untersuchen. Daneben sollte die Aktivität der humanen neutrophilen Elastase bestimmt und die Bildung reaktiver Substanzen analysiert werden. Zum besseren Verständnis der Vorgänge sollten die Stämme einer genaueren Untersuchung ihrer Virulenzeigenschaften unterzogen werden.

Zum Einsatz kamen drei Stämme mit unterschiedlichen Eigenschaften. Bei dem Referenzstamm ATCC 33277 handelte es sich um einen avirulenten Laborstamm. Der sequenzierte Stamm W83 wurde aus einem parodontalen Abszessen isoliert. Das klinische Isolat M 5-1-2 ist ein bisher nicht näher untersuchter invasiver Stamm, der schwere chronische Parodontitis verursacht. Von den drei Stämmen waren aufgrund ihrer unterschiedlichen klinischen Krankheitsbilder Differenzen in der Interaktion mit dem Immunsystem und in ihren Virulenzeigenschaften zu erwarten.

Die Details der Schlüssel-Faktoren eines invasiven Stamms sind noch nicht geklärt. Phagozytose-Versuche mit verschiedenen virulenten und avirulenten Stämmen sollten diese Kenntnislücke schließen. Phagozytose wird von Virulenz-Faktoren der Erreger wie z.B. einer Kapsel erschwert, da diese einer Wahrnehmung der PMNs entgegen wirken. Bei bisherigen Untersuchungen wurde bei Phagozytose-Versuchen in vitro mit unterschiedlich virulenten Stämmen von *P. gingivalis* keine eindeutigen Aussagen gefunden. Der bisher nicht genau klassifizierte Stamm M 5-1-2 verursacht klinisch eine schwere chronische Parodontitis. Besitzt *P. gingivalis* M 5-1-2 eine Kapsel Typ K1 wie Stamm W83, die ihn vor Phagozytose schützt? Weil extrazelluläre Proteasen als anti-phagozytischen Faktoren eine Schlüsselfunktion im Überleben der Erreger darstellen könnten, wurde Gingipainen in unserer Untersuchung besondere Aufmerksamkeit geschenkt. Würden sich Unterschiede in den klinischen Bildern bei Infektion mit den jeweiligen Stämmen durch Unterschiede in den Gingipainen erklären lassen? Durch DNasen wird die extrazelluläre Aktivität der PMNs gegen Bakterien stark reduziert, weil sich Erreger aus den bakteriziden Fallen befreien können. Der Zusammenhang zwischen DNasen bei *P. gingivalis* und extrazellulärem Killing wurde bisher noch nicht erforscht. Welche Stämme bilden DNasen aus, und hat das Enzym bei parodontalen Erregern eine

Auswirkung auf das Killing durch PMNs? Bieten DNasen *P. gingivalis* Schutz gegen extrazelluläres Killing?

Koinkubationsversuche mit humanen PMNs sollten den Widerstand verschiedener Stämme von *P. gingivalis* gegen Phagozytose und Killing deutlich machen. Wie würden sich intrazelluläre Produktion und extrazelluläre Freisetzung von ROS durch PMNs unterscheiden, wenn eine Infektion durch drei Stämme mit abweichendem klinischen Hintergrund erfolgt? Welcher Anteil der gebildeten ROS würde freigesetzt und könnte damit im extrazellulären Raum zu einer Gewebeschädigung führen? Bisher unerforscht ist, ob bei Stämmen mit unterschiedlichem Virulenz-Potential immer die gleiche Menge an aktiver HNE freigesetzt wird. Eine erhöhte Freisetzung von aktiver HNE bei bestimmten Stämmen könnte schwerere Schäden an parodontalem Gewebe verursachen. Es bestehen bisher keine Kenntnisse darüber, ob Abweichungen im Killing verschieden virulenter Stämme von *P. gingivalis* auftreten. Sind Mechanismen des Killings bei den Stämmen verschieden gewichtet? Möglicherweise können daraus Erkenntnisse über einen kollateralen Gewebeschaden durch Immun-Mechanismen gewonnen werden. Die Rolle von NETs im extrazellulären Killing durch PMNs ist für verschiedene Erreger geklärt, aber die Auswirkung von NETs auf das Killing von *P. gingivalis* blieb bisher unerforscht. Erfolgt bei Infektion mit parodontalen Erregern eine Ausbildung von NETs? Welchen Anteil hat extrazelluläres Killing bei *P. gingivalis*? Werden parodontopathogene Spezies in NETs gefangen und abgetötet? In der Virulenz der Stämme von *P. gingivalis* könnte der Zelltod von PMNs ein wichtiger Faktor sein. Darum sollte geklärt werden, wie sich eine Infektion mit *P. gingivalis* auf die Lebensfähigkeit von PMNs auswirkt.

In der nachfolgenden Übersicht (Abbildung 1) erfolgt nochmals eine Darstellung der Ziele der vorliegenden Dissertation.

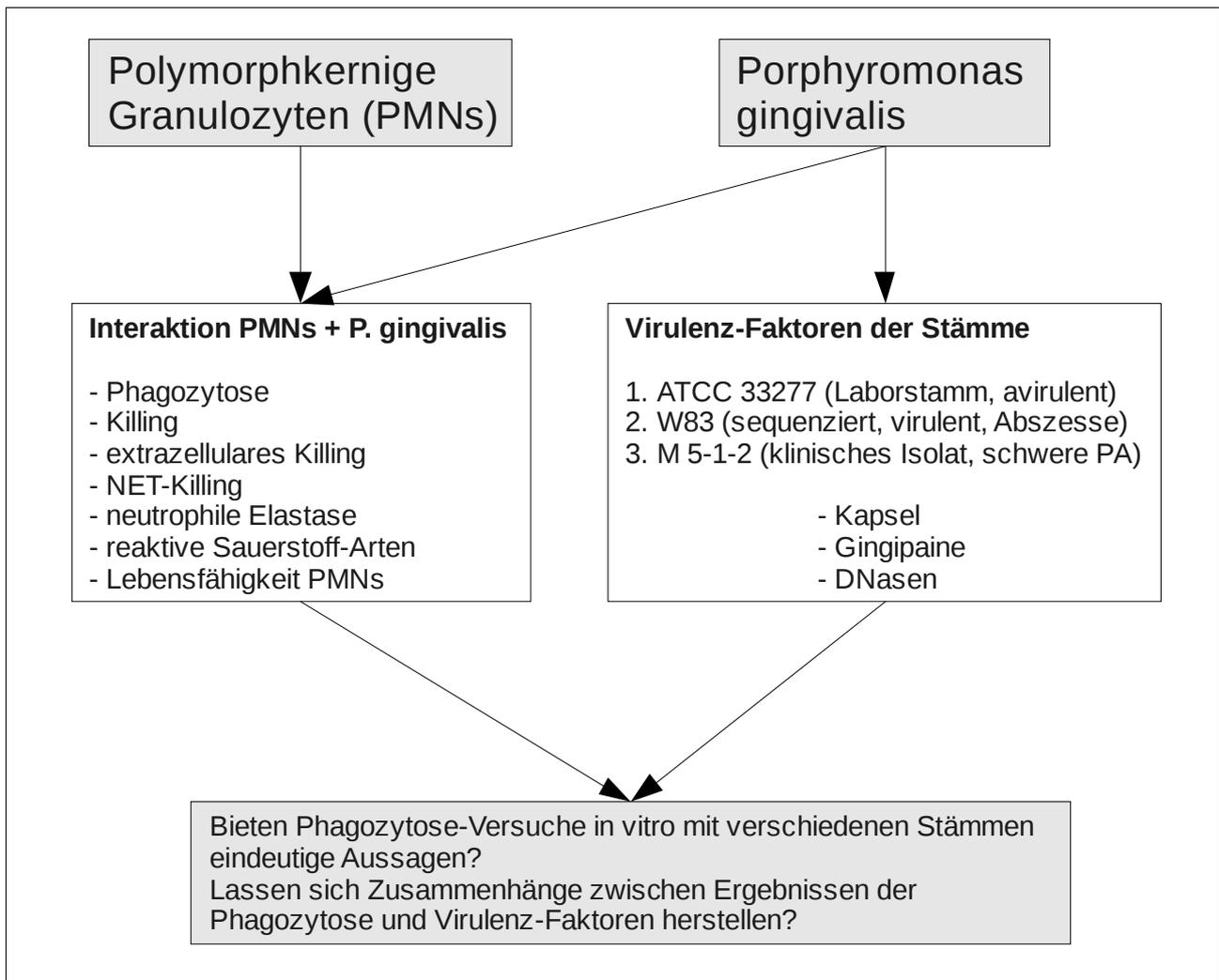


Abbildung 1: Übersicht der Ziele und Fragestellungen

## 4 Methodik

Alle Rezepturen für Versuchsgemische finden sich im Anhang. Für das Studienprotokoll wurde das Votum der Ethikkommission der Friedrich-Schiller-Universität Jena eingeholt.

### 4.1 Charakterisierung der Stämme

Alle Experimente wurden mit drei Stämmen der Spezies *P. gingivalis* (Tabelle 1) durchgeführt, die zunächst näher charakterisiert werden sollten.

Tabelle 1: Verwendete Stämme von *P. gingivalis*

<b>Stamm</b>	<b>Herkunft</b>
<i>P. gingivalis</i> ATCC 33277	Typ-Stamm, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen, Braunschweig
<i>P. gingivalis</i> W83	sequenzierter Stamm, zur Verfügung gestellt durch Prof. Potempa, Krakau, PL, aus einem Abszess isoliert
<i>P. gingivalis</i> M 5-1-2	klinisches Isolat, schwere chronische Parodontitis, 64% der kultivierbaren anaeroben Mikroflora in der subgingivalen Plaque

Die Anzucht der Kulturen erfolgte entweder auf Schaedler-Agar (Oxoid, Wesel) mit Zusatz von 8% Schafblut oder in Schaedler-Bouillon mit Vitamin K (2,5 µg/l) bei 37°C unter anaeroben Bedingungen (Anaerogen-System, Oxoid, Wesel).

#### 4.1.1 Unterschiede in der Kapsel-Struktur

Differenzen in der Kapsel-Struktur beeinflussen die Virulenz. Deshalb sollten die Stämme auf das Vorhandensein von bestimmten Kapselgenen geprüft werden. Hierzu erfolgte zunächst die DNA-Extraktion aus *P. gingivalis*-Kulturen. Zwei Tage alte Kulturen wurden mit PBS gewaschen und zentrifugiert. Die genomische DNA wurde anschließend mit dem Kit Genomic Mini (A&A Biotechnology, Gdynia) extrahiert. Dabei wurde zunächst 200 µl Total-Lysis-Puffer und 20 µl Proteinase K zugegeben und die Bakterien-Suspension 20 s auf einem Vortex Gerät durchmischt. Auf eine Inkubation bei 37°C (20 min) folgten 5 min bei 70°C in einem Thermomixer. Die lysierten Zellen wurden in ein Filtertube (Siliziumdioxid-Filter) mit Auffanggefäß übertragen. Dann wurde die DNA bei 14.000 U/min (1 min) aus dem Puffergemisch gefiltert. Nach Entfernen des Durchlaufs erfolgte die Zugabe von 500 µl des Waschpuffers. Nach erneuter Zentrifugation bei 14.000 U/min (1 min) wurde das Auffanggefäß verworfen, das Filtertube in ein neues 2 ml Tube eingesetzt und 400 µl Waschpuffer zupipettiert. Die Zentrifugation bei 14.000 U/min wurde 2 min

durchgeführt, und anschließend wurde das Filtertube in ein sauberes 1,5 ml Eppendorf-Tube eingesetzt. Im letzten Schritt wurde auf das Filtertube je 100 µl erhitzter Tris-Puffer (75°C) gegeben und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert, bevor eine Zentrifugation bei 14.000 U/min erfolgte. Die so eluierte DNA wurde bei -20°C gelagert. Für die nachfolgende PCR wurden die in Tabelle 2 aufgelisteten Primer angewendet.

Tabelle 2: Primer Sequenzen, welche für die PCR-Reaktionen genutzt wurden

<b>ORF</b>	<b>Kodiertes Protein</b>	<b>Primer</b>	<b>Primer-Sequenz (5-3)</b>	<b>Amplicon-Länge</b>
PG0110	Glycosyl-Transferase, Gruppe-1-Familie Protein	Forward	AGCCACAGGTAACCTCAACC	670 bp
		Reverse	CCACCGATATTTGGCGATAC	
PG0111	Kapsel-Polysaccharid	Forward	CGGAGTCGTTCTAAGCCTTG	711 bp
		Reverse	AGTCCACAATGACTCCTGGG	
PG0117	Polysaccharid-Transport Protein	Forward	TCAATATTCGAGGGGCGTAG	824 bp
		Reverse	AGGAGCGCAAATAGCAAAAA	

So stammen die Primer PG0110, PG0111 und PG0117 aus einem Cluster von Genen, welche in die Biosynthese von Polysacchariden der Kapsel verwickelt sind. PG0110 steht für eine Glykosyl-Transferase, PG0111 für ein Kapsel-Polysaccharid und PG0117 für ein Polysaccharid-Transport Protein (Chen et al. 2004). Der Nachweis für *P. gingivalis* wurde mit dem Pg-Primer (5'-AGG CAG CTT GCC ATA CTG CG-3') durchgeführt (Ashimoto et al. 1996). Der Mastermix setzte sich zusammen aus: 2,5 µl 10fach Puffer, 2,5 µl 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 2,5 µl Nukleotide, je 1,25 µl 10 pMol Primer 1 und Primer 2 sowie einer U taq-Polymerase und 11,5 µl dH<sub>2</sub>O (alles MBI Fermentas, Vilnius). Nachdem pro Probe 22,5 µl Mastermix in die Tubes pipettiert waren, erfolgte die Zugabe von 2,5 µl DNA. Für die Negativkontrolle wurde dem Mastermix statt 2,5 µl DNA lediglich 2,5 µl dH<sub>2</sub>O zugefügt. In einem Thermocycler (Eppendorf, Hamburg) wurde zunächst der Zyklus der Denaturierung (95°C, 2 min) durchgeführt. Danach wurde die Temperatur schrittweise um 1°C für die spezifische Primerhybridisierung (Pg 0110 58°C, Pg 0111 58°C, Pg 0117 54°C, Pg 60°C) abgesenkt und 1 min inkubiert (Chen et al. 2004). Schließlich erfolgte die Elongation bei 72°C, 1 min. Die Zyklen wurden 30 mal wiederholt, aber im finalen Zyklus der Elongation wurden die Proben 10 min bei 72°C inkubiert. Anschließend wurde das PCR-Produkt auf einem 1,5%igen Agarosegel dargestellt.

#### **4.1.2 Unterschiede im Proteinprofil und in den Proteasen**

Wesentliches Virulenzmerkmal von *P. gingivalis* sind seine Cystein-Proteasen. Deshalb sollten Abweichungen im diesbezüglichen Proteinprofil aufgedeckt werden. Eine Vorkultur von Schaedler-Agar Platten wurde in je 1 l Schaedler-Bouillon mit Vitamin K (2,5 µg/l) überführt und anschließend unter beständigem Schwenken 96 h inkubiert.

#### **Aufreinigung der Proteine aus dem Kulturüberstand**

Die Zellmasse wurde durch Zentrifugation (6000 g, 4°C, 30 min) aus der Bakterien-Kultur entfernt. Anschließend wurde das zellfreie Medium (ca. 900 ml) langsam mit 1450 ml eiskaltem Azeton versetzt (Endkonzentration 60%). Nach Ausfällung der Proteine auf Eis (15 min) folgte eine erneute Zentrifugation für 30 min (6000 g, -15°C), und das Präzipitat wurde in der kleinstmöglichen Menge Gelfiltrationspuffer gelöst. Das Präzipitat wurde gegen den Gelfiltrationspuffer dialysiert, um die enthaltenen Aceton-Reste zu minimieren. Dafür wurde das Gemisch in einer Dialyse-Membran über Nacht bei 4°C in 300 ml Puffer gelegt, der zur Stabilisierung der Enzyme 1,5 mM Aldithriol enthielt, denn diese Substanz verhindert die Autokatalyse der Enzyme. Der Puffer wurde zweimal ausgetauscht. Die nachfolgenden Schritte Chromatographie, Bestimmung der amidolytischen Aktivität, Proteingel und Western Blot erfolgten im Institut für Biotechnologie der Jagiellonen-Universität Krakau. Zur Trennung der gelösten Proteine von den ungelösten wurde die dialysierte Lösung in einer Ultrazentrifuge (10.000 g, 30 min, 4°C) geklärt. Die im Pellet verbliebenen ungelösten Proteine wurden verworfen. Zur Konzentrierung des Überstandes wurde ein Ultrafilter (MWCO 30.000) benutzt und das Protein-Gemisch auf 5 ml konzentriert. Dabei wurde eine Stickstoff-Atmosphäre von 2 bar aufrecht erhalten und das Gemisch beständig mit einem Magnetrührer in Bewegung gehalten. Direkt vor dem Aufbringen auf die Gelfiltrations-Säule wurde die Probe durch erneute Ultrazentrifugation für eine Stunde bei 12.000 g von jedem Präzipitat sowie von verunreinigenden Partikeln gesäubert.

#### **Gelfiltration-Chromatografie**

Gelfiltration separiert Moleküle entsprechend ihres Molekulargewichtes, dabei funktioniert das Gel als molekulares Sieb, aus dem Moleküle mit sinkendem Molekularewicht nacheinander eluiert werden. Die Chromatografie-Säule wurde in dem ÄKTA Explorer mit Matrix befüllt und mit Gelfiltrationspuffer präequilibriert. Die Proben wurden nun bei 4°C auf die Säule gebracht und die Gelfiltration-Chromatografie bei einer Fließrate von 30 ml/h durchgeführt. Nachdem 600 ml Puffer durch die Säule gelaufen waren, wurde die Sammlung von Fraktionen mit jeweils 1,5 ml begonnen. Der Prozess wurde fortgesetzt,

bis dunkelbraunes Material aus der Säule austrat. Eine Menge von 5 µl jeder Fraktion wurden zur Untersuchung der Aktivität von Rgp bzw. Kgp genutzt.

### ***Amidolytische Aktivität***

Nach jedem Teilschritt der Isolierung wurden die Proben auf Aktivität von Cystein-Proteasen untersucht. Weil *P. gingivalis* keine anderen Arg-spezifischen oder Lys-spezifischen Proteasen in signifikantem Masse produziert (Shi et al. 1999), kann die Rate in der Hydrolyse von BL-BApNA und Ac-Lys-pNA als eine direkte Messung der Gingipain-Aktivität gelten. Die Schnelligkeit des Farbumschlages ist enzymatischer Aktivität der Gingipaine proportional und kann in einem Spectrophotometer gemessen werden. Gingipaine benötigen für eine Aktivierung Cystein als Reduktionsmittel. Für die Aktivitätsmessung der Rgp-Proteasen wurde das Substrat 10 mM BL-BApNA in DMSO verwendet, das bei seiner hydrolytischen Spaltung das gelbe p-Nitroanilin freisetzt. In die Wells einer 96er Mikrotitrierplatte wurde zu je 10 µl Probe 180 µl Gingipain-Versuchspuffer mit 20 mM Cystein gegeben bzw. zu 5 µl Probe 185 µl Versuchspuffer gegeben, so dass jeweils ein Endvolumen von 190 µl erreicht wurde. Zur Aktivierung der Enzyme wurde das Reaktionsgemisch zunächst für 10 min bei 37°C inkubiert. Danach wurde jedem Well mit einer Multichannel-Pipette 10 µl des Substrates BL-BApNA zugefügt. Die Messung erfolgte in einem Spectrophotometer (Spectra Max 250, Molecular Devices, Sunnyvale) 5 min bei 37 °C. Die Extinktion des BApNA wurde alle 10 s bei einer Wellenlänge von 405 nm gemessen. Die Aktivitätsmessung der Kgp-Proteasen erfolgte mit einem Substrat-Gemisch bestehend aus 1 µl 10 mM Ac-Lys-pNA in DMSO und 49 µl Versuchspuffer. Zuerst wurden 20 µl Probe mit 130 µl Gingipain-Versuchspuffers mit Cysteinhydrochlorid versetzt. Es folgte eine Inkubation bei 37°C für 10 min, um das Enzym zu aktivieren. Anschließend wurde die Elimination des Ac-Lys-pNA mit 405 nm für 60 min (37°C) aufgezeichnet.

### ***Arg-Sepharose Affinitätchromatografie***

Der erste Peak in der Aktivität wurde zusammengefasst und durch Ultrafiltration in einem Amicon PM-30 Konzentrator (Millipore, Schwalbach) um das ca. 10fache auf 3 ml konzentriert. Der konzentrierte Peak aus der Gelfiltration wurde gegen 2 l Affinitätspuffer bei 4°C und drei Puffer-Wechseln dialysiert. Die dialysierten Proben wurden in einer Filtration durch einen 0,2 µm Spritzen-Filter geklärt. Danach wurde eine Arg-Sepharose Affinitätschromatografie durchgeführt. Die Affinitätschromatografie trennte Kgp-Proteine und HRgpA-Proteine auf Basis einer reversiblen Interaktion zwischen Protein und spezifischem Liganden, der an eine Chromatografie-Matrix (Sepharose) gekoppelt ist, so

dass Moleküle entsprechend ihrer Affinität zu einem Liganden separiert werden.

Entgaste Arg-Sepharose wurde in eine leere Chromatografie-Säule (1,5 cm im Durchmesser und 40 cm lang, 50 ml) gegeben. Die Säule wurde entsprechend der Herstellerangaben mit dH<sub>2</sub>O gewaschen und mit dem 5fachen Volumen an entgastem Affinitätspuffer auf eine Fließrate von 20 ml/h (11,3 cm/h) äquibriert. Die Säule wurde in eine 4°C Umgebung gebracht und an das Flüssig-Chromatografie System angeschlossen. Schließlich wurden die Proben aufgetragen und die Säule mit dem 3fachen Volumen an Affinitätspuffer (4°C) gewaschen, um die nicht gebundenen Enzyme zu eluieren. Der Ausfluss wurde in 1,5 ml Einheiten gesammelt und die Absorbtion bei 280 nm während des gesamten Verlaufes der Chromatografie aufgezeichnet. Zur Auswaschung der Zielmoleküle aus dem Affinitätsmedium kann die Interaktion umgekehrt werden. Die Waschung mit steigendem NaCl-Gradienten ist eine nicht selektive Elutionsmethode, denn mit ansteigender Ionenstärke in dem linearen Gradienten werden unspezifisch gebundene Bestandteile der Fraktion ausgewaschen. Ein Stufen-Gradient von 0,5 M NaCl in 4°C Affinitätspuffer wurde aufgetragen und die Säule mit dieser NaCl-Konzentration gewaschen, bis die OD<sub>280</sub> Basislinie auf Null fiel. Eine Re-Äquibrierung der Säule wurde mit dem 3fachen Volumen an 4°C Affinitätspuffer vorgenommen.

Bei kompetitiver Elution kam zuerst Lysin zur spezifischen Entfernung von Kgp zum Einsatz, wobei unter Benutzung eines Gradienten-Bildners ein linearer Gradient von 0 bis 750 mM L-Lysin in einem gesamten Volumen von 350 ml bei 4°C aufgetragen wurde, worauf 150 ml 750 mM L-Lysin bei 4°C folgten. Erneut war ein Re-Äquibrierung der Säule in dem 3fachen Volumen an Affinitätspuffer (4°C) notwendig. Zur Eluierung von HRgpA wurde wiederum unter Benutzung eines Gradienten-Bildners ein linearer Gradient von 0 bis 100 mM L-Arg bei 4°C in einem gesamten Volumen von 300 ml aufgetragen. Proben gewonnener Fraktionen wurden auf ihre Aktivität an Rgp und Kgp analysiert. Jene Fraktionen mit enzymatischer Aktivität, welche symmetrisch eine Spur der Protein-Konzentration (OD<sub>280</sub>) überlagerten, wurden zusammengefasst. Die Dialyse erfolgte drei Mal gegen 2 l des Gelfiltrationspuffers bei 4°C. Die Konzentrierung zusammengefasster Fraktionen aufgereinigter Kgp und Rgp um das etwa 10fache auf 1,5 ml erfolgte wiederum in Ultrafiltration unter Benutzung einer Amicon PM-30 Membran. Folgende Pools wurden aus der Chromatographie erhalten:

1. Nach Gelfiltration
2. Vor Arg-Sepharose
3. Erster Peak aus Arg-Sepharose

#### 4. Zweiter Peak aus Arg-Sepharose

Diese wurden mittels SDS-PAGE weiter analysiert.

##### **Analyse der Gingipaine mit SDS-PAGE**

In der Studie wurde die SDS-PAGE Methode benutzt, wie sie durch Schagger und von Jagow (1987) beschrieben wurde. Durch eine SDS-Polyacrylamidgel Elektrophorese unter nicht reduzierenden Bedingungen mit einem 10%igen Gel erfolgte eine Trennung der Bestandteile in den Pools nach ihrem Molekulargewicht. Dabei werden unter anderem Gingipaine mit hoher molekularer Masse (Kgp und RgpA) von RgpB getrennt. Durch Inkubation der Proteine mit Natrium Dodecylsulphat (SDS) und Dithiothreitol (DTT) als S-S reduzierende Mittel werden diese vollständig denaturiert und dissoziiert. SDS bindet an hydrophobe Regionen der Proteine; auf diese Weise überträgt es proportional zu deren Länge eine negative Ladung auf die Polypeptide. Gingipaine zeigen eine starke Neigung zu autoproteolytischem Abbau während der Denaturierung, insbesondere unter stark reduzierenden Bedingungen. Dies ist besonders in den Fällen von RgpB und RgpA offensichtlich. Autoproteolyse kann durch die kombinierte Behandlung mit einem Inhibitor und durch Erhitzen auf 99°C in einem nicht reduzierenden Proben-Puffer vermieden werden. Dabei ist das Aufkochen für eine Dissoziation stark nonkovalenter Bindungen zwischen den Proteinen notwendig, damit die großen katalytischen Komplexe aufgelöst werden (Pike et al. 1994).

In einem diskontinuierlichen Puffer-System wurde ein Sammelgel über ein Trenngel geschichtet (Davis 1964, Ornstein 1964). Zunächst wurde das Trenngel vorbereitet und im Elektrophorese-Kit (Bio-Rad, München) polymerisiert, wobei das Gel mit Wasser überschichtet wurde. Nach 20 min Polymerisation wurde das Sammelgel entsprechend der Mischung zubereitet und nach Einsetzen des Taschenkamms auspolymerisiert. Jeweils 1 µl Gingipain-Lösung wurde mit dem Tosyl-L-Lysin Chloromethylketon (TLCK)-Inhibitor aus einer 200 mM Stammlösung zu einer endgültigen Lösung von 2 mM vermischt. Die Proben wurden für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend mit 1/5 des Probenvolumens an 5fach-konzentriertem nicht reduzierendem Probenpuffer versetzt. Die Erhitzung der Proben erfolgte für 5 min in einem 100°C-Wasserbad. In diesem Schritt wurde aktives Gingipain irreversibel durch TLCK inhibiert, und die Erhitzung in Gegenwart von SDS denaturierte irreversibel alle Proteine in der Probe. Nach einer sanften Zentrifugation wurde das reduzierende Reagens 10% DTT in Menge von 1/10 des Probenvolumens zugefügt und erneut für 5 min auf 100°C erhitzt, damit eine vollständige Denaturierung erreicht wurde. Das fertige Gel wurde in die

Elektrophorese-Kammer eingesetzt und mit den mit Proben-Puffer vorbereiteten Proben sowie Markerproteinen bestückt. Gestartet wurde die Elektrophorese mit 10 mA, bis die Proben sich an der Grenze zwischen Sammel- und Trenngel gesammelt hatten. Dann wurde die Elektrophorese mit 20 mA weitergeführt. Für das Sammelgel wurde ein Strom von 30 V angelegt, bei dem Trenngel wurden 80 V benutzt. Der innen eingebrachte Kathoden Puffer bestand aus 0,1 M Tris-HCl, 0,1 M Tricine und 0,1% SDS. Der äußere Anodenpuffer bestand aus 0,9 M Tris-HCl bei einem pH von 8,9. Die Elektrophorese wurde abgebrochen, sobald die Lauffront ca. 0,5 cm vor dem Gel-Ende angelangt war.

### *Coomassie-Färbung*

Nach Einfärbung diente die Intensität des Bandes als ein grober Indikator für die in der Probe enthaltene Menge des Proteins. Bei Färbung mit Coomassie Blue in fixierender Lösung bildete eine Menge von 0,1–0,3 µg an Protein die untere Nachweisgrenze in einem Band. Das prozessierte Gel wurde für ca. 30 min in Fixierlösung eingeweicht und danach in die Färbelösung überführt. In Coomassie Blue Färbelösung (1,5 g Coomassie R 250 Brillantblau auf 1 l Fixierlösung) erfolgte ein langsames Schütteln für vier Stunden. Die Färbelösung wurde durch entfärbende Lösung ersetzt. Für 30 min unter langsamem Schütteln wurde so der größte Teil überschüssiger Färbung entfernt. Die entfärbende Lösung wurde ersetzt, bis der Hintergrund des Gels klar wurde. Das Gel wurde mit einem digitalen Scanner eingelesen.

### **Western Blot**

Bei dieser Technik werden Proteine für eine Antigen-Antikörper Reaktion von dem Gel auf eine Membran übertragen. Als Membranmaterial für den Blot wurde Polyvinyliden Difluorid (PVDF) unter Verwendung des *semi-dry* Verfahrens benutzt. Die Membran wurde mit Methanol und dH<sub>2</sub>O vorbehandelt und gemeinsam mit einem Filterpapier und dem Gel in kaltem Transfer-Puffer für 30 min eingeweicht. Danach wurde ein Sandwich in der Reihenfolge Flies, Filterpapier, Gel, PVDF, Filterpapier, Flies aufgeschichtet. Der geschichtete Stapel wurde so in ein Elektrophorese-Gerät eingebracht, dass die Kathode (-) auf Seite des Gels und die Anode (+) auf Seite der Membran angebracht wurde. Der Transfer erfolgte bei 4°C mit 80 V über 3 Stunden in dem BORAD-Gerät (Bio-Rad, München). Nach einer Spülung mit dH<sub>2</sub>O wurde die Membran mit den geblotteten Proteinen in einer separaten Schachtel für 3 min mit Ponceau S Lösung (0,25% Ponceau S Lösung in 1% Essigsäure) eingefärbt, um die Proteine (Standard-Marker) auf der Membran sichtbar zu machen. Nachdem das ungebundene Ponceau S mit Wasser ausgewaschen wurde, erfolgte eine Markierung nun sichtbarer Protein-Standards auf der

Membran mit Bleistift.

Nach Übertragung der Proteine können an die Membran gebundene Proteine mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen werden. Im ersten Schritt erfolgte die Blockung freier Protein-Bindestellen, indem die Membran für 2 h bei Raumtemperatur in bovinem Serum-Albumin, BSA (1% in TBS) inkubiert wurde. Daraufhin wurde primärer Antikörper anti-Rgp 18E6 für die Identifikation von Rgp-Proteasen bzw. anti-Kgp MAb 7B für Kgp-Proteasen (jeweils 1:2000 verdünnt in TBS+1% BSA) zugefügt. Nach Entfernen der Lösung erfolgten vier Waschungen mit TTBS jeweils für 15 min bei Raumtemperatur. Schließlich wurde die Membran 1 h bei Raumtemperatur unter Schütteln mit sekundärem Antikörper anti-mouse inkubiert (Amersham Biosciences, Freiburg; 1:2.000 in TBS mit 1% BSA ). Danach wurde wiederum viermal mit TTBS gewaschen. Zur Anfärbung der Antikörper wurde das Substrat ECL Plus (Amersham Biosciences, Freiburg) entsprechend den Hersteller-Angaben zugefügt. Die Membran wurde für ca. 60 min in dem Streptavidin-HRP Komplex inkubiert (Verdünnung 1:10.000 in TBS) und danach sechsmal für jeweils 15 min in 100 ml TTBS gewaschen, bevor das Detektionsreagens aufgetragen wurde. Nach 5 min Inkubation wurde die Entwicklung der Farbe mit dH<sub>2</sub>O gestoppt und der Western Blot zwischen zwei Filterpapieren getrocknet. Ein digitales Bild des Western Blots wurde aufgenommen.

#### **4.1.3 DNase-Aktivität**

DNase gilt als Virulenzfaktor der Bakterien. Eine semiquantitative Analyse der Stämme auf das Enzym DNase wurde mittels DNase-Agar (BD, Heidelberg) durchgeführt. Folglich wurde eine Vorkultur der Stämme auf Schaedler-Agar sowie in 10 ml Schaedler-Bouillon mit Vitamin K (2,5 µg/l) angelegt. Nach 36 h Kultur wurde die Bouillon 20 min bei 5000 g zentrifugiert. Die Suspension der Kulturen der Schaedler-Platte sowie das Sediment der Bouillon wurde in PBS auf eine optische Dichte von 0,2 bei 640 nm eingestellt. Pro Platte DNase-Agar wurden mit einer Stanze vier Löcher angelegt, die mit flüssigem Agar verschlossen wurden. In die entstandenen Vertiefungen wurden jeweils 0,1 ml Suspension bzw. 0,1 ml Negativkontrolle gegeben. Die DNase-Aktivität wurde bestimmt, nachdem die Platten für 1 min mit 0,1 M Salzsäure geflutet wurden. Beurteilt wurde der durch die DNase im Agar entstandene Hof.

In Abbildung 2 wird das Prinzip der Versuche zur Charakterisierung der Stämme *P. gingivalis* ATCC 33277, M 5-1-2 und W83 zusammenfassend dargestellt.

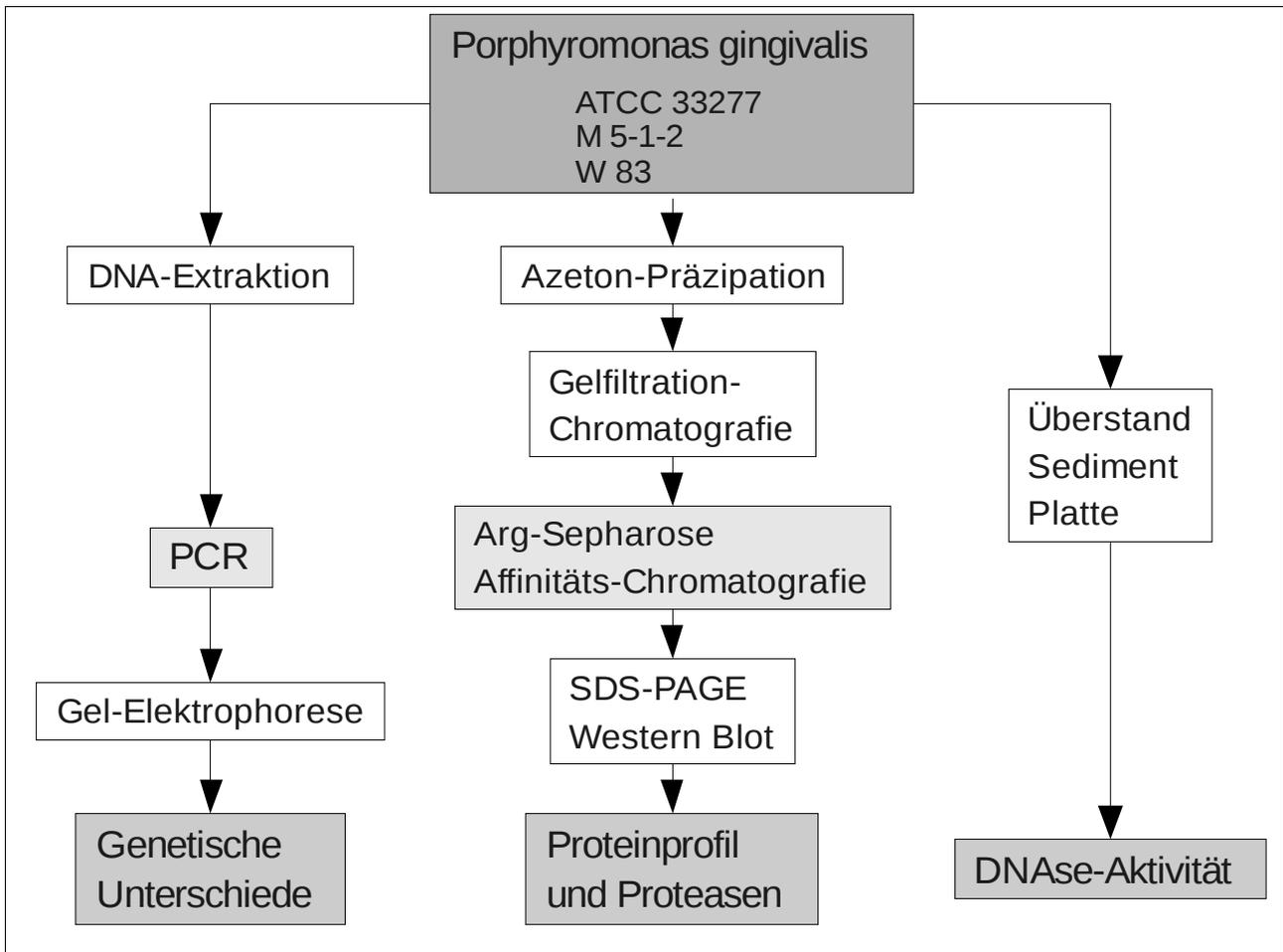


Abbildung 2: Durchgeführte Methodik zur Charakterisierung der verwendeten Stämme

## 4.2 Phagozytose

### 4.2.1 Phagozytose und Killing

#### *Präparation der Bakterien*

Die Bakterien wurden nach 48 h Kultur auf einer Schaedler-Agar Platte in PBS suspendiert und die Zell-Suspension photometrisch auf eine optische Dichte von 0,1 bei einer Wellenlänge von 640 nm eingestellt; dies entspricht einer Zahl von  $2 \times 10^8$  Bakterien/ml. Die so eingestellte Bakterien-Suspension wurde für 10 min bei 5000 g zentrifugiert. Peripheres Blut, nicht heparinisiert, wurde mit 250 g 5 min zentrifugiert. Das den Überstand bildende Serum mit Komplementfaktoren diente der Opsonierung der Bakterien. 200 µl des Spenderserums wurden zu dem Bakterien-Sediment gegeben und für 10 min bei 5% CO<sub>2</sub>, 37°C in einer anaeroben Kammer inkubiert. Das Gemisch wurde nochmals zentrifugiert, Serum entfernt und die so vorbereiteten Bakterien in 2,5ml RPMI 1640 suspendiert.

#### *Präparation der PMNs*

Für die Gewinnung humaner Phagozyten wurde 10 ml heparinisiertes Blut eines gesunden Erwachsenen (männlich, 28 Jahre) genutzt. Die Schicht der PMNs wurde durch Dextran-Sedimentation (1:1 mit 3%iger Dextranlösung, 10 min bei Raumtemperatur) vorsichtig aus dem Blut isoliert. Im Leukozytenfilm des Überstandes wurden nach einer Zentrifugation (250 g, 20°C, 5 min) die Erythrozyten entfernt. Dazu wurden 4 ml dH<sub>2</sub>O zu dem Sediment gegeben und nach 40 s mit 4 ml doppelt konzentriertem PBS der isotonische Zustand wieder hergestellt. In hypotoner Lösung wurden so die verbliebenen empfindlicheren roten Blutkörperchen lysiert. Es erfolgte eine erneute Zentrifugation mit 250 g bei 20°C für 5 min. Die Suspension wurde auf eine Leukozyten-Konzentration von  $10^7$  Zellen/ml in 5ml RPMI 1640 eingestellt. Der Trypanblau Ausschluss-Test demonstrierte die Lebensfähigkeit der Phagozyten.

#### ***Phagozytose von Porphyromonas gingivalis-Stämmen***

Eine Probe aufbereiteter PMNs (100 µl) wurde mit einer Probe opsonierter Bakterien-Suspension (100 µl) gemischt. Die Reaktionsgemische enthielten jeweils 100 µl PMNs in einer Endkonzentration von  $1 \times 10^7$  Zellen/ml sowie  $2 \times 10^8$  P. gingivalis/ml, so dass PMN und P. gingivalis in einem Verhältnis von 1:20 reagierten. In den Kontrollen wurde die PMN-Suspension durch RPMI 1640 ersetzt, um das Bakterienwachstum während des Versuchs zu bestimmen. Die Inkubation der Bakterien mit PMNs bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> wurde nach 5 min, 30 min, 60 min und 120 min unterbrochen. Bestimmt wurde die Zahl extrazellulärer und intrazellulärer vitaler Bakterien. Um beide Prozesse zu unterscheiden,

wurde eine Zentrifugation bei geringer Geschwindigkeit (400 g, 4 min) angewendet. Die Zahl lebensfähiger Bakterien als Kolonien bildende Einheiten (cfu) im Überstand (extrazellulär) und im Neutrophilen-Pellet (intrazellulär=cfu<sub>intra</sub>) wurde durch Zählen der Kolonien bestimmt. Vom Überstand wurden 10 µl in einer Verdünnung von 1:100 auf Schaedler-Agar Platten ausgestrichen (cfu<sub>extra</sub>). Das Pellet wurde nach zweimaligem Waschen in PBS mit 500 µl eiskaltem dH<sub>2</sub>O lysiert und danach 10 µl auf die Platte gegeben (cfu<sub>intra</sub>). Von der Probe ohne PMNs wurden ebenfalls 10 µl entnommen und auf Kulturmedien aufgebracht. Die Platten wurden für 9 Tage inkubiert, und danach wurde die Zahl koloniebildender Einheiten (cfu) gezählt. Alle Verdünnungsschritte wurden einberechnet. Killing von *P. gingivalis* wurde als prozentuale Verminderung der Zahl der Zellen im Verhältnis zu den Kontrollen ausgedrückt ( $= \text{cfu}_{\text{con}} - \text{cfu}_{\text{extra}} - \text{cfu}_{\text{intra}} / \text{cfu}_{\text{con}} * 100$ ). Für die mikrobizide Aktivität der PMNs selbst wurde die Formel  $= \text{cfu}_{\text{con}} - \text{cfu}_{\text{extra}} - \text{cfu}_{\text{intra}} / (\text{cfu}_{\text{con}} - \text{cfu}_{\text{extra}}) * 100$  angewendet.

### **Extrazelluläres Killing**

Die Zugabe von Cyt D bewirkt eine Hemmung der Aktin-Polymerisation, während extrazelluläre Freisetzung von Granula-Enzymen sowie die Ausbildung von NETs nicht beeinträchtigt wird (Oliver 1978, Buchanan et al. 2006). Auf diese Weise ist eine Messung extrazellulären Killings möglich (Sumbly et al. 2005)

Die Isolierung der PMNs und die Vorbereitung der Bakterien-Suspension erfolgte, wie bereits beschrieben. Zu humanen PMNs (10<sup>7</sup>/ml) wurde Cyt D zugegeben (10 µg/ml). Nach einer Infektion mit *P. gingivalis* erfolgte eine Inkubation für 5, 30, 60 bzw. 120 min bei 37°C in einem CO<sub>2</sub> Inkubator. Als Kontrolle dienten 100 µl Bakterien, denen 100 µl RPMI-Medium mit 10 µg/ml Cyt D ohne PMNs beigelegt wurden. Zu den Zeitpunkten 5, 30, 60 und 120 min wurden die Kulturen bei 400 g für 4 min zentrifugiert, um Neutrophile von freien Bakterien zu trennen. Die Überstände mit freien Bakterien jedes Killing-Versuchs wurden 1:100 mit PBS verdünnt und je 10 µl verdünnter Bakterienlösung auf Schaedler-Agar plattiert. Zum Zeitpunkt 60 min wurden für den Ausschluss jeder Phagozytose bei zwei Proben zentrifugierte PMNs mit 1000 µl PBS gewaschen, die Zellen für 15 min mit 500 µl eiskaltem Wasser lysiert und 10 µl auf Nährmedium ausplattiert. Die Auswertung der cfu erfolgte wie bereits beschrieben.

### **Elektronenmikroskopische Beobachtungen der Phagozyten in Kontakt mit *Porphyromonas gingivalis***

Die Aufnahmen wurden freundlicherweise von Magdalena Puklo, Universität Krakau, zur Verfügung gestellt.

## 4.2.2 Reaktion der Granulozyten auf Bakterien

### ***Granulozyten-Elastase Aktivität***

Die photometrische Aktivitätsbestimmung der HNE als nicht-oxidativer Parameter des Killings beruhte auf enzymatischer Umsetzung des Substrates N-Methoxysuccinyl-Ala-Ala-Pro-Val-p-Nitroanilid (Sigma-Aldrich, Taufkirchen), wobei das chromogene p-Nitroanilin freigesetzt wurde. Der Phagozytose-Ansatz wurde durchgeführt, wie bereits beschrieben. Zu den entsprechenden Zeitpunkten wurden die PMNs bei 400 g, 4 min (20°C) zentrifugiert. Der Überstand wurde bis zur Analyse der Elastase-Aktivität eingefroren (-20°C). Ein Volumen von 100 µl lysierter Zellen bzw. 100 µl Überstand wurde mit 100 µl Substratlösung in einer Mikrotiterplatte mit Flachboden gemischt. Die Absorption wurde bei 405 nm in einem Mikroplatten-Reader gemessen und die Proben bei 37°C inkubiert. Nach 30 min erfolgte eine erneute Messung, und die Differenz zum Ausgangswert wurde berechnet. Als Einheit wurde jene Menge Enzym berechnet, die 1 nmol des Substrates in 1 min hydrolysierte.

### ***Bildung reaktiver Sauerstoff-Radikale, ROS***

Die Bildung gesamter und extrazellulärer ROS wurde mittels Chemolumineszenz mit Luminol bzw. Isoluminol gemessen. Eine Menge von 100 µl Suspension opsonierter *P. gingivalis* in Hank's wurden 100µl PMNs in Hank's sowie 50 µl Luminol-Lösung (bzw. Isoluminol-Lösung) zugefügt und in einer 96-well Kulturplatte inkubiert. Während einer Dauer von 2 h bei 37°C wurde die Lichtintensität mit einem Chemoluminometer (PE Applied Biosystems, Foster City) gemessen. Als Positivkontrolle dienten 100 µl Phorbol-12-Myristat-13-Azetat Lösung (PMA) in RPMI 1640 (1 µg/ml).

### ***Nachweis der Lebensfähigkeit von PMNs***

Zur Bestimmung des Einflusses von *P. gingivalis* auf die Lebensfähigkeit der PMNs wurde ein Test mit Dimethylthiazolyl-Diphenyltetrazolium-Bromid, MTT durchgeführt, welcher über die Aktivität mitochondrialer Dehydrogenase der Zellen deren Wachstum und Lebensfähigkeit bestimmt. Gelber Farbstoff MTT wird in Alkohol-lösliches Formazan von violetter Farbe umgewandelt, dessen Menge der Zahl lebender Zellen direkt proportional ist und spektrophotometrisch gemessen werden kann (Alley et al. 1988). Je 100 µl PMN-Suspension, in Hanks gelöst, und 100 µl Suspension der Bakterien-Stämme, in Hanks gelöst, wurden in eine 96-well Mikrotiter-Platte mit Flachboden gegeben. Als Kontrolle dienten 100 µl Suspension von PMNs und 100 µl Bakterien-Suspension, vermischt mit 100 µl Hanks-Lösung. Anschließend wurden Bakterien und PMNs inkubiert (37°C; 5% CO<sub>2</sub>, Luftfeuchtigkeit 100%). Nach 24 h wurde jeder Probe 20 µl MTT-Lösung (5 mg

MTT/ml PBS) zugefügt. Nach Inkubation (2 h, 37°C) wurde die Reaktion mit 20 µl SDS-Lösung (6% in dH<sub>2</sub>O) gestoppt, und es wurden 200 µl Isopropanol (5 mg/ml 0.04 N HCl) zugegeben, um färbende Formazan-Kristalle zu lösen. Nach 20 min ließen sich violett-farbige Moleküle erkennen, und es erfolgte die spektrophotometrische Messung der Absorption in einem ELISA-Reader bei 570 nm (Referenz-Wellenlänge 650 nm). Der Versuch wurde in vierfacher Ausführung für die Kontrollen und in achtfacher Ausführung für die Phagozytose-Proben durchgeführt. Die Ergebnisse wurden in Extinktionseinheiten (U) angegeben.

In folgender Übersicht (Abbildung 3) soll nochmals der Ablauf der Phagozytose-Versuche anschaulich zusammengefasst werden.

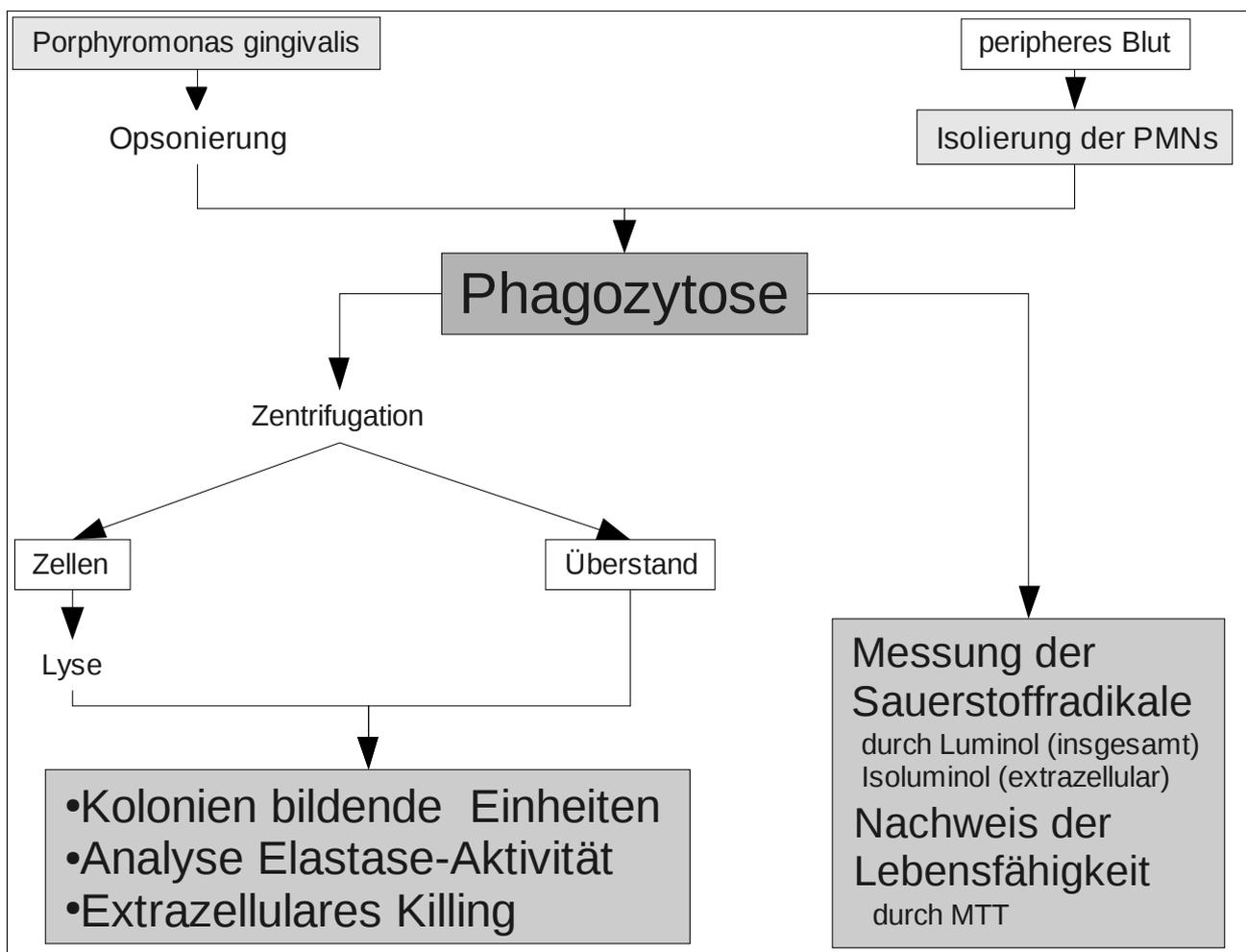


Abbildung 3: Schema zum Ablauf der angewendeten Phagozytose-Versuche

## 5 Ergebnisse

### 5.1 Charakterisierung der Stämme

Die Stämme *P. gingivalis* ATCC 33277, W83 und M 5-1-2 wurden über ihre Kapsel-Struktur, ihre Proteasen sowie ihre DNase-Aktivität charakterisiert.

#### 5.1.1 Unterschiede in der Kapsel-Struktur

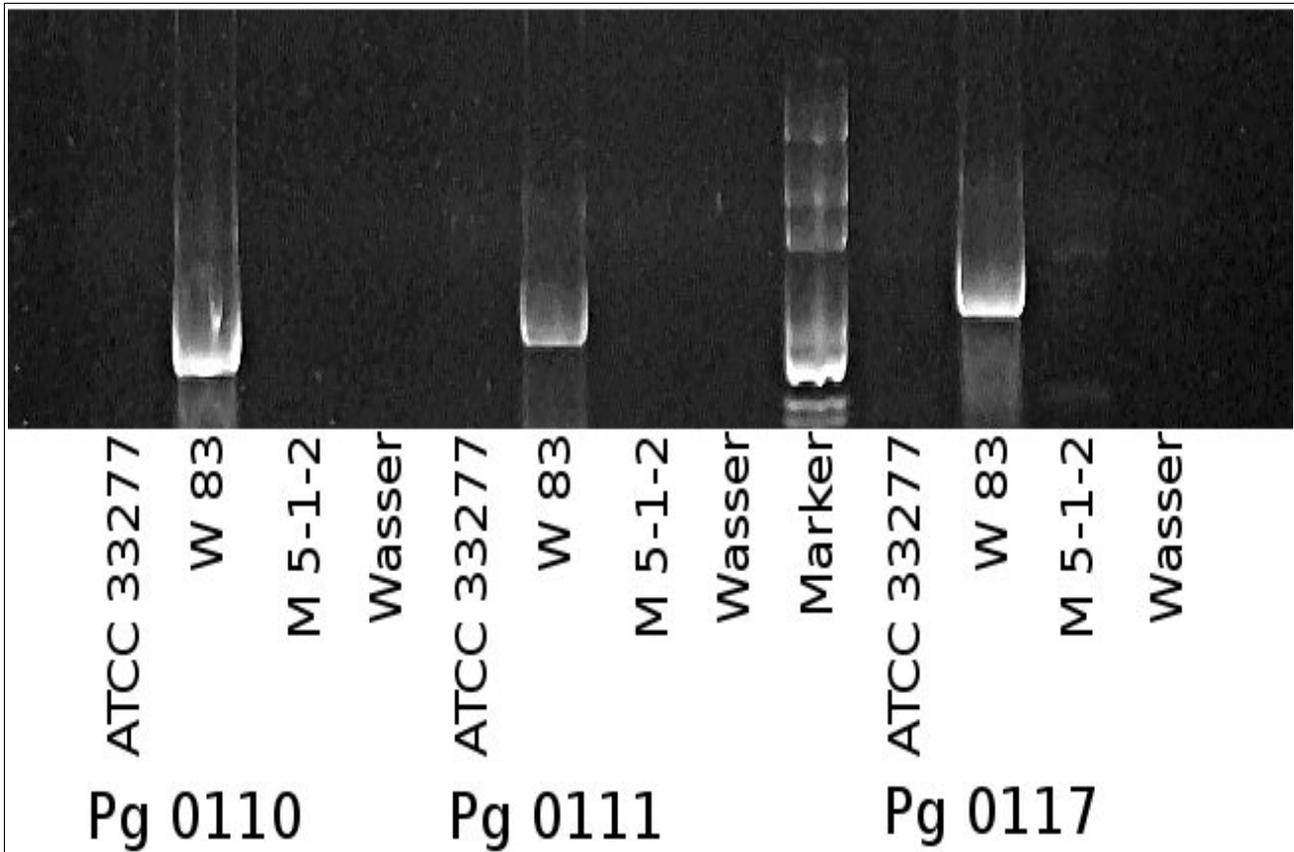


Abbildung 4: Agarose-Gel nach PCR der Primer Pg 0110 (670 bp), Pg 0111 (711 bp) und Pg 0117 (824 bp). Nur Stamm W83 wies Gene für eine Kapsel auf.

Mittels PCR wurden die Stämme *P. gingivalis* ATCC 33277, W83 und M 5-1-2 auf das Vorkommen von Genen untersucht, die mit dem Serotyp K1 assoziiert sind. Amplifikate, deren Größe den Genen Pg 0110 (670 bp), Pg 0111 (711 bp) und Pg 0117 (824 bp) entsprachen, ließen sich nur bei dem Stamm *P. gingivalis* W83 nachweisen (Abbildung 4). So zeigte W83 deutliche Banden für den Primer Pg 0110, welcher das Gen für eine Glycosyl-Transferase synthetisiert. Ebenso ließ sich der Nachweis für Gene der Biosynthese eines Kapsel-Polysaccharides (Pg 0111) sowie für ein Polysaccharid-Transport Protein (Pg 0117) lediglich für *P. gingivalis* W83 nachweisen. Glycosyl-Transferase, Polysaccharide und Polysaccharid-Transport Protein sind Zeichen für die Ausbildung einer Kapsel, die mit dem Serotyp K1 vergesellschaftet ist. Die Stämme *P.*

gingivalis ATCC 33277 und *P. gingivalis* M 5-1-2 wiesen die untersuchten Kapselgene nicht auf. In der Kultur auf Schaedler-Agar fiel jedoch deutlich auf, dass *P. gingivalis* M 5-1-2 ausgesprochen schleimige Kolonien bildete, was bei W83 und ATCC 33277 nicht der Fall war. In der TEM-Aufnahme (Abbildung 5) zeigte sich bei Stamm M 5-1-2 auch eine entsprechend verdickte Kapsel.

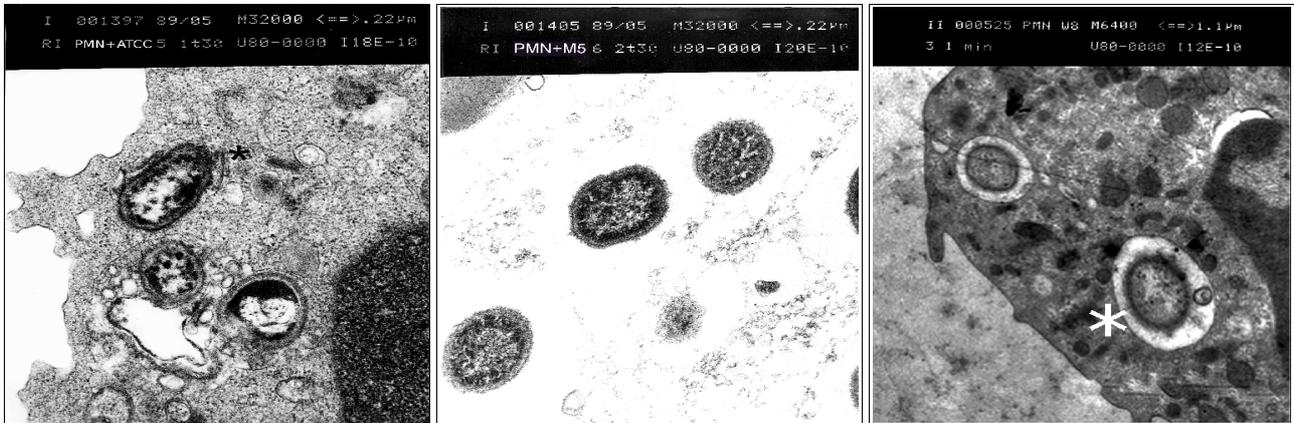


Abbildung 5: TEM-Aufnahmen der Stämme *P. gingivalis* ATCC 33277, M 5-1-2 und W83 (jeweils mit „\*“ markiert), zum Teil innerhalb von Phagosomen der PMNs. Erkennbar ist die deutlich verdickte Schleimkapsel bei M 5-1-2 im mittleren Bild

### 5.1.2 Unterschiede in den Proteasen

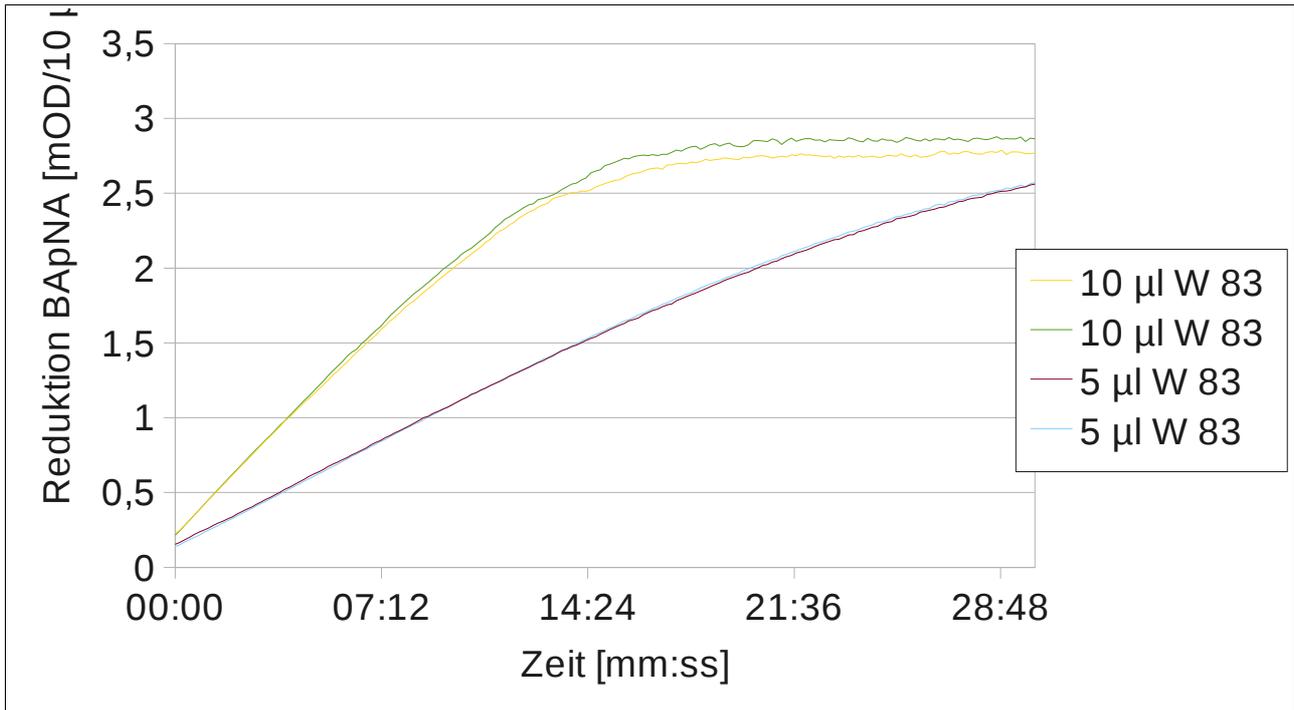


Abbildung 6: Arg-spezifische amidolytische Aktivität im Präzipitat des Stammes *P. gingivalis* W83. Die Reduktion von 10 µl BApNA durch 5 µl bzw. 10 µl Präzipitat wurde über 30 min aufgezeichnet. Es zeigte sich eine hohe amidolytische Aktivität.

Im Präzipitat der Überstände der *P. gingivalis*-Kulturen wurde stets eine hohe Arg-spezifische Aktivität gegen 10 µl des Substrates BApNA nachgewiesen. Das heißt, eine erfolgreiche Ausfällung der Gingipaine war gelungen (Abbildung 6 sowie Abbildung 22 und Abbildung 23 im Anhang). Lediglich der lineare Anstieg der Reduktion von BApNA wurde in die Berechnung amidolytischer Aktivität eingeschlossen, da ein nicht linearer Anstieg in der Änderung der Extinktion [mOD] für Erschöpfung des Substrates sprach. Das Maß amidolytischer Aktivität der Präzipitate aller Stämme gegen 10 µl BApNA zeigte hohe Werte, die bei allen Stämmen in etwa gleich waren (ATCC 33277  $\Delta E=0,202$ ; W83  $\Delta E=0,196$  und M 5-1-2  $\Delta E=0,177$ ).

## Gelfiltration Chromatografie

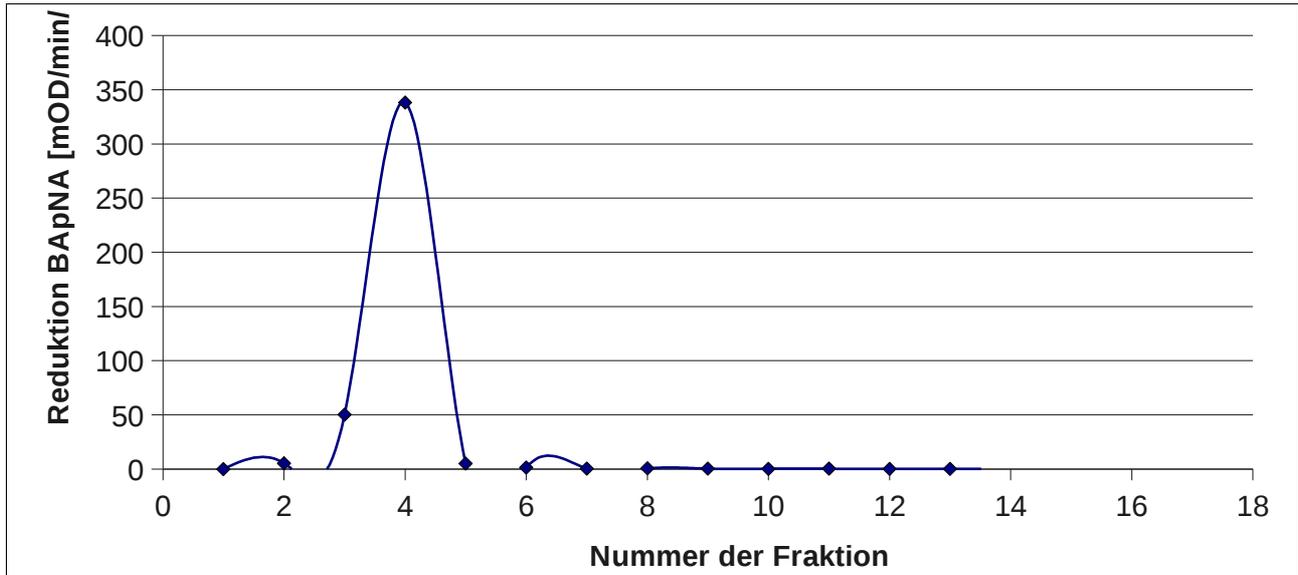


Abbildung 7: Amidolytische Aktivität der Fraktionen aus der Gelfiltration in der Spaltung des Substrates BL-BApNA für Stamm *P. gingivalis* W83. Die Fraktionen mit einer erhöhten Aktivität bildeten einen symmetrischen Peak und wurden für die weitere Aufbereitung genutzt.

Die gesammelten Fraktionen aus der Gelfiltration wurden auf ihre Rgp-Aktivität ( $\Delta E/20 \mu l$  BApNA) untersucht, welche gegen die Nummern der Fraktionen grafisch dargestellt wurde. Abbildung 7 zeigt exemplarisch die Verteilung der BApNA-spaltenden Aktivität ( $\Delta E/min$ ) in den Fraktionen der Elution aus der Gelfiltration-Chromatografie bei Stamm W83. Der entstehende Graph erzeugte einen symmetrischen Peak der Protease-Aktivitäten und erlaubte die Bündelung der Gingipain enthaltenden Fraktionen (bei Stamm W83 Fraktionen 13 bis 30). Eine Zusammenfassung von Fraktionen aus den Schultern des Peaks wurde vermieden. Die Fraktionen mit der höchsten amidolytischen Aktivität dienten als Ausgangspunkt der weiteren Aufreinigung der Enzyme. Die Aktivität der Stämme *P. gingivalis* ATCC 33277 und *P. gingivalis* M 5-1-2 finden sich in den Grafiken Abbildung 24 und Abbildung 25 im Anhang. In Übereinstimmung mit Stamm W83 zeigte sich bei ATCC 33277 und M 5-1-2 in der amidolytischen Aktivität der aufgetrennten Fraktionen ein einziger symmetrischer Peak.

## Affinitäts-Chromatographie

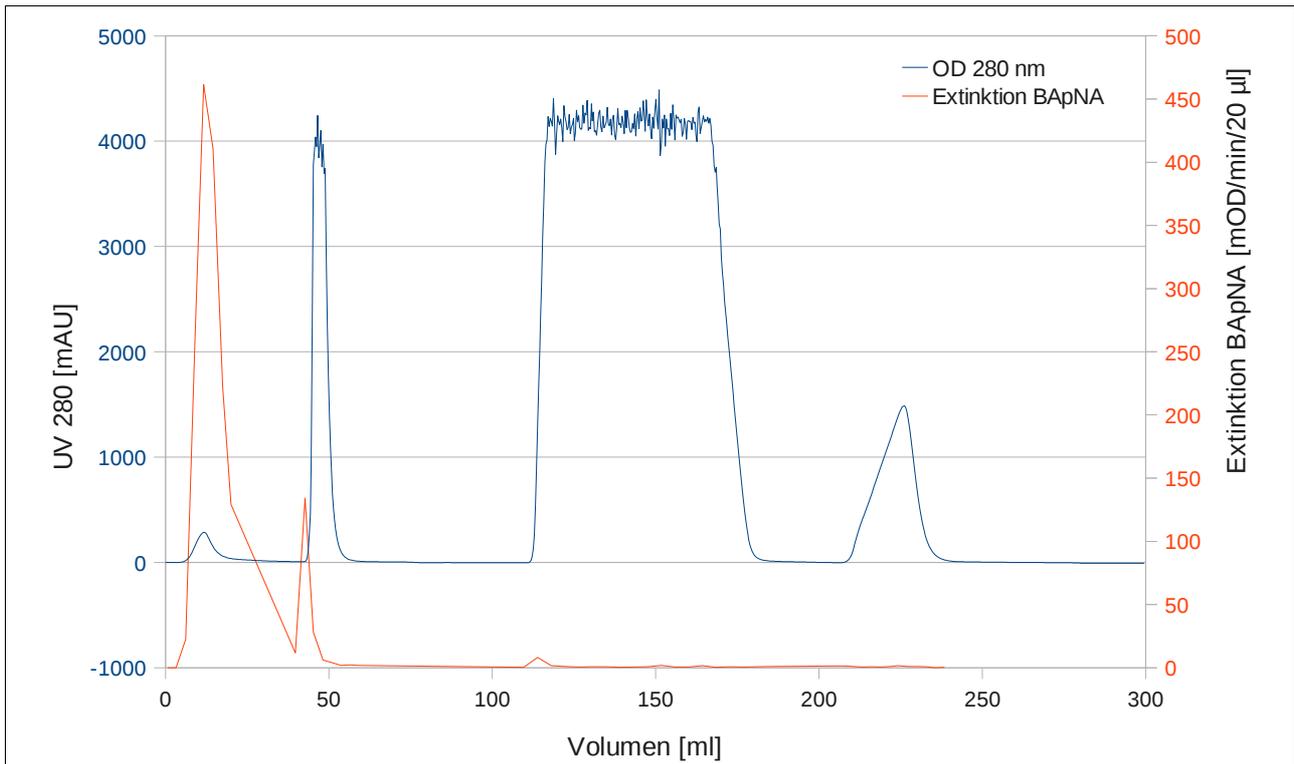


Abbildung 8: Chromatogramm (gemessen bei 280 nm) und Rgp-Aktivität, bestimmt mit BApNA während der Affinitätschromatografie für Stamm *P. gingivalis* W83. Die amidolytische Aktivität überlagerte den Durchlauf-Peak und den Kochsalz-Peak. Die Elution mit Lysin und Arginin wusch keine Enzyme mehr aus der Säule, weil die Gingipaine in einem Komplex vorlagen und nicht an die Säule gebunden hatten.

Das Bild der Affinitätschromatografie, bei der Enzyme durch die Elutionsmittel Affinitätsbuffer, Kochsalz-Lösung, Arginin und Lysin ausgeschwemmt wurden, findet sich in Abbildung 8 für Stamm W83. Hierbei wurde ein Chromatogramm aufgenommen, das den Wechsel in der Konzentration an Probenbestandteilen zeigt, wie sie die Säule in der Folge ihrer molekularen Größe verließen. Im Chromatogramm ist das Proteinprofil in Form der UV-Absorption bei 280 nm dargestellt. Die blaue Linie bildete die Extinktionswerte bei 280 nm, weiterhin wurde die Extinktionsaktivität für das Substrat BApNA in rot eingezeichnet. Bei der Elution mit NaCl, Lysin und Arginin erschien ein Adsorptionspeak, der auf linear steigende Gradienten zurückzuführen war. Anhand der x-Achse des Diagramms lässt sich das aus der Säule ausgetretene Volumen verfolgen. Für BL-BApNA (Abbildung 8) wie für Ac-Lys-pNA (Abbildung 9) zeigten sich zwei Peaks mit Substratspaltender Aktivität, die bei Elution mit Affinitätsbuffer (Durchlauf-Peak) sowie bei Elution mit Kochsalz auftraten. Der Durchlauf-Peak enthielt die höchste BL-BApNA-spaltende Aktivität, während der Kochsalz-Peak eine weit geringere Aktivität aufwies. Die Elutionsmittel Lysin und Arginin spülten keine Enzyme mehr aus der Arg-Sepharose Matrix. Das Chromatogramm der Stämme ATCC 33277 und *P. gingivalis* M 5-1-2

entsprach für die Rgp-Aktivität im Wesentlichen dem des Stammes *P. gingivalis* W83, wie in Abbildung 26 und Abbildung 28 im Anhang ersichtlich ist.

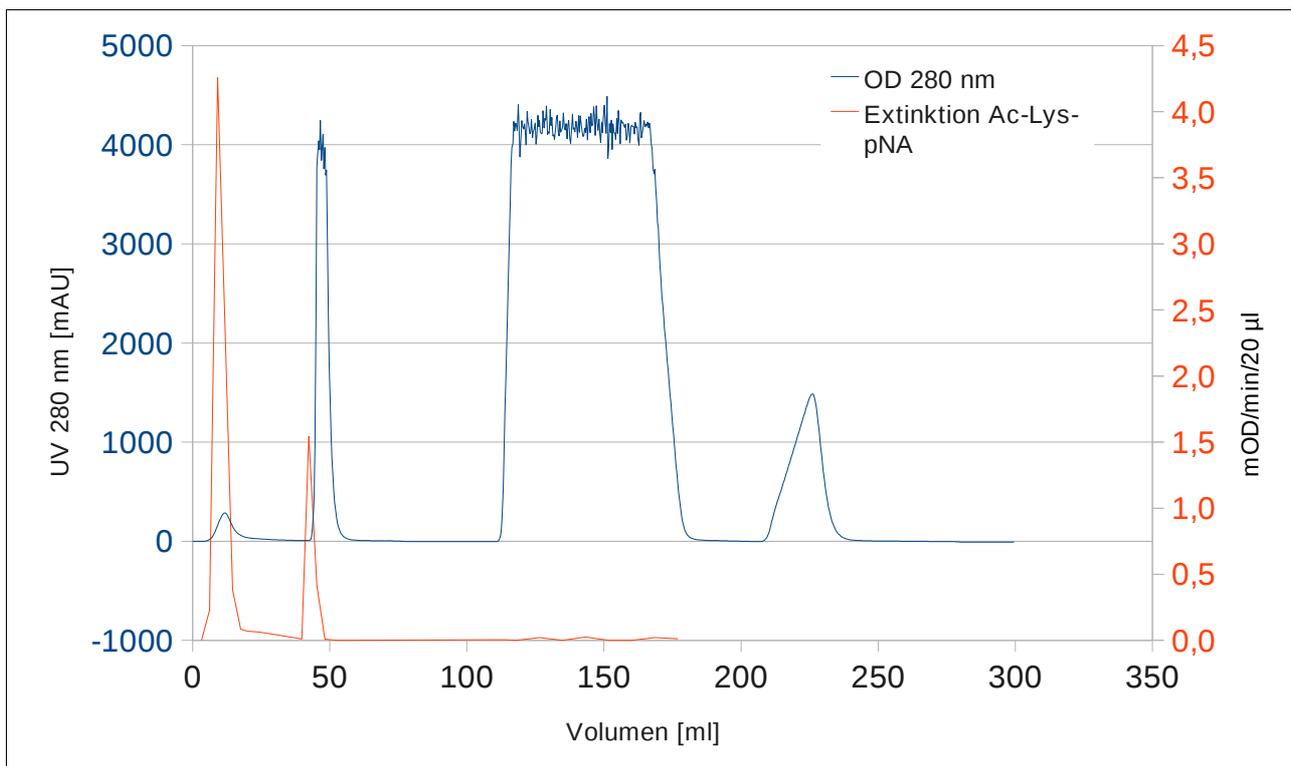


Abbildung 9: Chromatogramm (gemessen bei 280 nm) und Kgp-Aktivität, bestimmt mit Ac-Lys-pNA während der Affinitätschromatografie für Stamm *P. gingivalis* W83. Es zeigte sich ein ähnliches Bild wie bei Rgp. Die Aktivität überlagerte die Waschung mit Affinitätspuffer und mit NaCl. Bei der Elution mit Arginin und Lysin ließ sich keine Aktivität in den Fraktionen ermitteln. Rgp und Kgp lagen in einem Enzym-Komplex vor, der nicht spezifisch an die Matrix gebunden hatte. Die amidolytische Aktivität und demnach die Menge von Kgp in den Proben war weit geringer als für Rgp.

Die Ac-Lys-pNA spaltende Aktivität von Kgp trat gemeinsam mit BL-BApNA-spaltender Aktivität von Rgp aus der Chromatografie-Säule aus. Daran lässt sich ablesen, dass Rgp und Kgp in einem Komplex vorlagen. Trotz 60-minütiger Messdauer waren die gemessenen Extinktionswerte für Ac-Lys-pNA sehr gering (Abbildung 9). Daraus kann geschlussfolgert werden, dass der Anteil an Lys-spezifischen Cystein-Proteasen deutlich geringer war als der Anteil Arg-spezifischer Cystein-Proteasen. Die Tendenz, dass Lys-spezifische Enzyme gemeinsam mit Arg-spezifischen Enzymen austraten, war jedoch deutlich zu erkennen. Das Elutionsprofil von *P. gingivalis* ATCC 33277 entsprach dem des Stammes W83 (Abbildung 27 im Anhang). Stamm M 5-1-2 zeigte in Ac-Lys-pNA spaltender Aktivität lediglich einen singulären Durchlauf-Peak, aber keinen Peak bei Elution mit NaCl (Abbildung 29 im Anhang). Dies war aber auf eine stärkere Verdünnung der Probe zurückzuführen.

## Auftrennung der Pools mittels SDS-PAGE

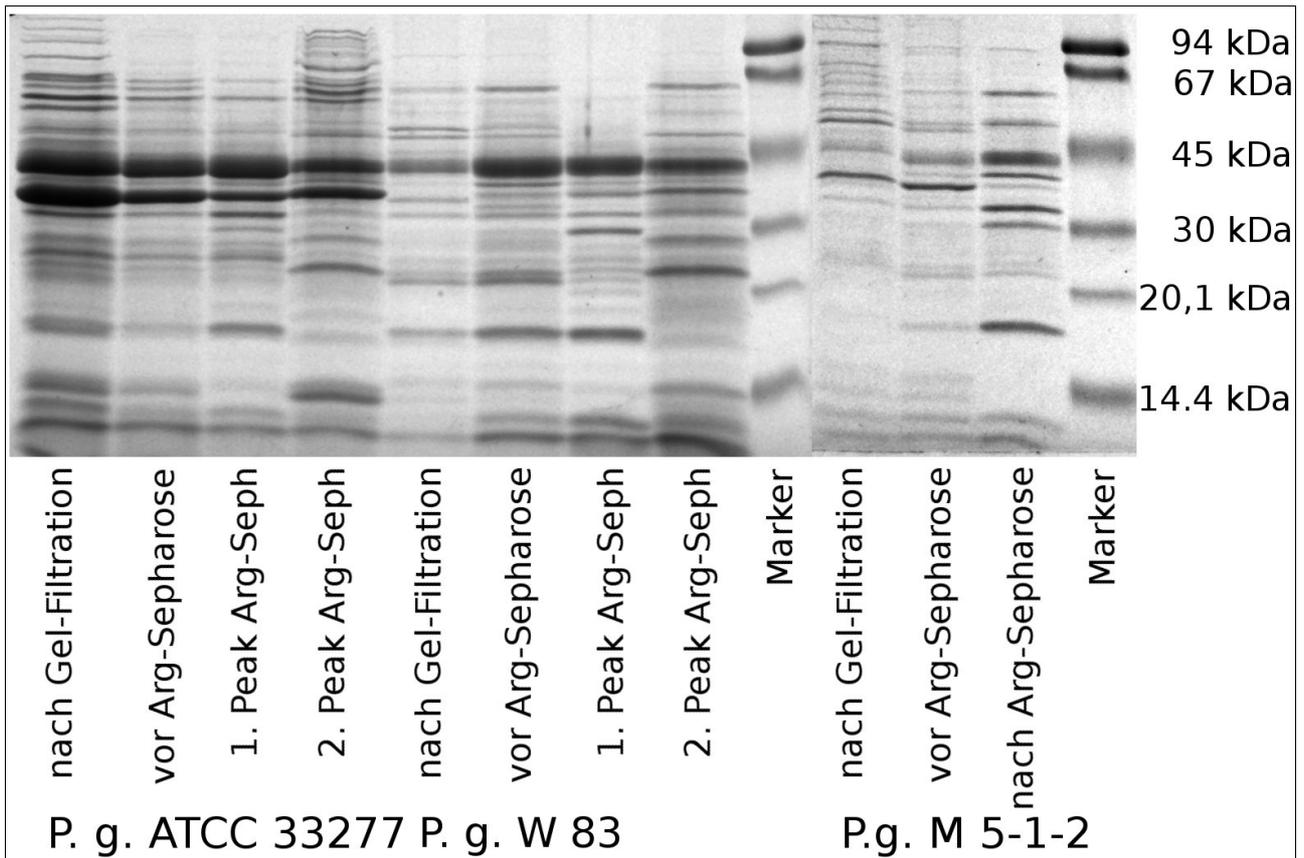


Abbildung 10: Polyacrylamid-Gel nach Auftrennung der Proteine in SDS-PAGE; Proben der Stämme aus verschiedenen Schritten der chromatografischen Aufreinigung, Proteine mit Coomassie Blue eingefärbt. Die stärksten Banden zeigten sich bei 45 kDa. Darin ließen sich sowohl Rgp-Proteasen als auch Kgp-Proteasen vermuten.

Die gepoolten Fraktionen jedes Schrittes in der chromatografischen Aufreinigung der Cystein-Proteasen wurden in einer SDS-PAGE Elektrophorese nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Enzymkomplexe dissoziierten in ihre Bestandteile. Zur Anfärbung wurde Coomassie gewählt. Die stärksten Banden ergaben sich bei 45 kDa, während kleinere Banden im gesamten Spektrum sichtbar waren. Vielfältige Banden über das gesamte Spektrum molekularer Massen wiesen Proteine in allen Größen nach. Bei Stamm M 5-1-2 ergaben sich labortechnische Probleme (Materialverlust). Deshalb wurden die Proben zusammengefasst und in der Folge fielen die Banden insgesamt schwächer aus.

## Western Blot

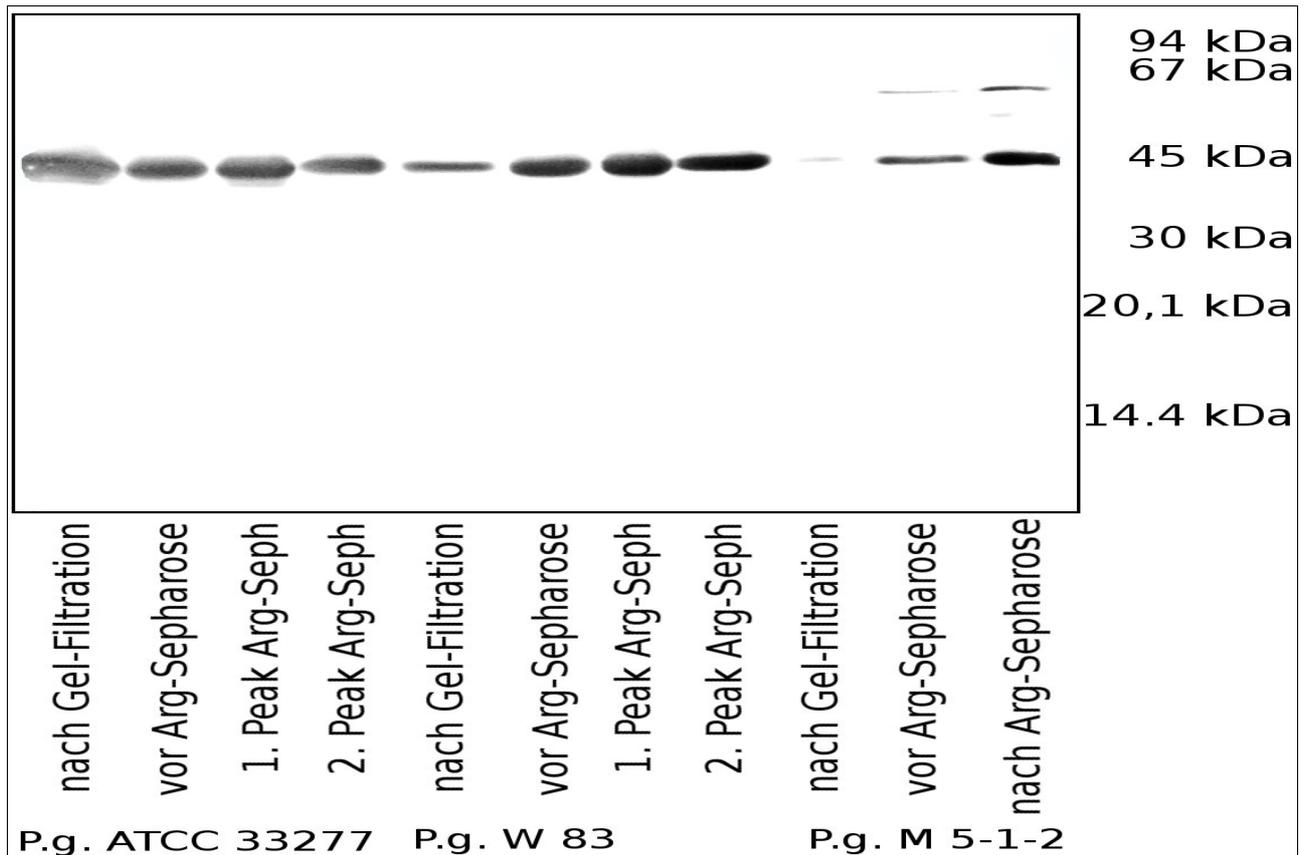


Abbildung 11: Western Blot der SDS-PAGE für Rgp-Proteasen auf Nitrozellulose-Membran; die molekulare Masse der Marker (in Kilodaltons) ist auf der rechten Seite des Gels angezeigt. Bei den Stämmen ATCC 33277 und W83 zeigte sich eine einzige Bande bei 45 kDa. Nur Stamm M 5-1-2 wies eine zusätzliche Bande bei 67 kDa auf.

Das Polyacrylamid-Gel aus der SDS-PAGE wurde auf Nitrozellulose-Membran übertragen. Auf der Membran wurden Gingipaine mit den Antikörpern anti-Rgp 18E/6 bzw. anti-Kgp 7B markiert. Aus den Western Blots in Abbildung 11 und Abbildung 12 ist ersichtlich, dass die Aufreinigung der Cystein-Proteasen gelungen war. Wie bereits in der SDS-PAGE vermutet, bestand die Aktivität für eine Anheftung an Arg-Reste in höheren molekularen Massen-Anteilen aus der Gelfiltration-Chromatografie. In den meisten Proben zeigte sich eine einzige Bande bei 45 kDa. Anti-Rgp 18E/6 identifizierte die Banden bei 45 kDa aus der SDS-PAGE als Rgp-Proteasen (Abbildung 11). Zwischen den verschiedenen Stufen der Aufreinigung zeigten sich kaum Unterschiede. Weder zeigten die Banden eine unterschiedliche Aktivität, noch traten zusätzliche Banden bei anderen Stämmen auf. Nur *P. gingivalis* M 5-1-2 wies auf anti-Rgp neben den Hauptbanden bei 45 kDa Nebenbanden in der Größenordnung von 67 kDa auf.

In Abbildung 12 ist ersichtlich, dass besonders deutlich angefärbte Banden bei 45 kDa aus der SDS-PAGE auch die Kgp-Proteasen enthielten. Demzufolge lagen die Cystein-Proteasen Rgp und Kgp beide in einer molekularen Größe von 45 kDa vor. Für Kgp gilt,

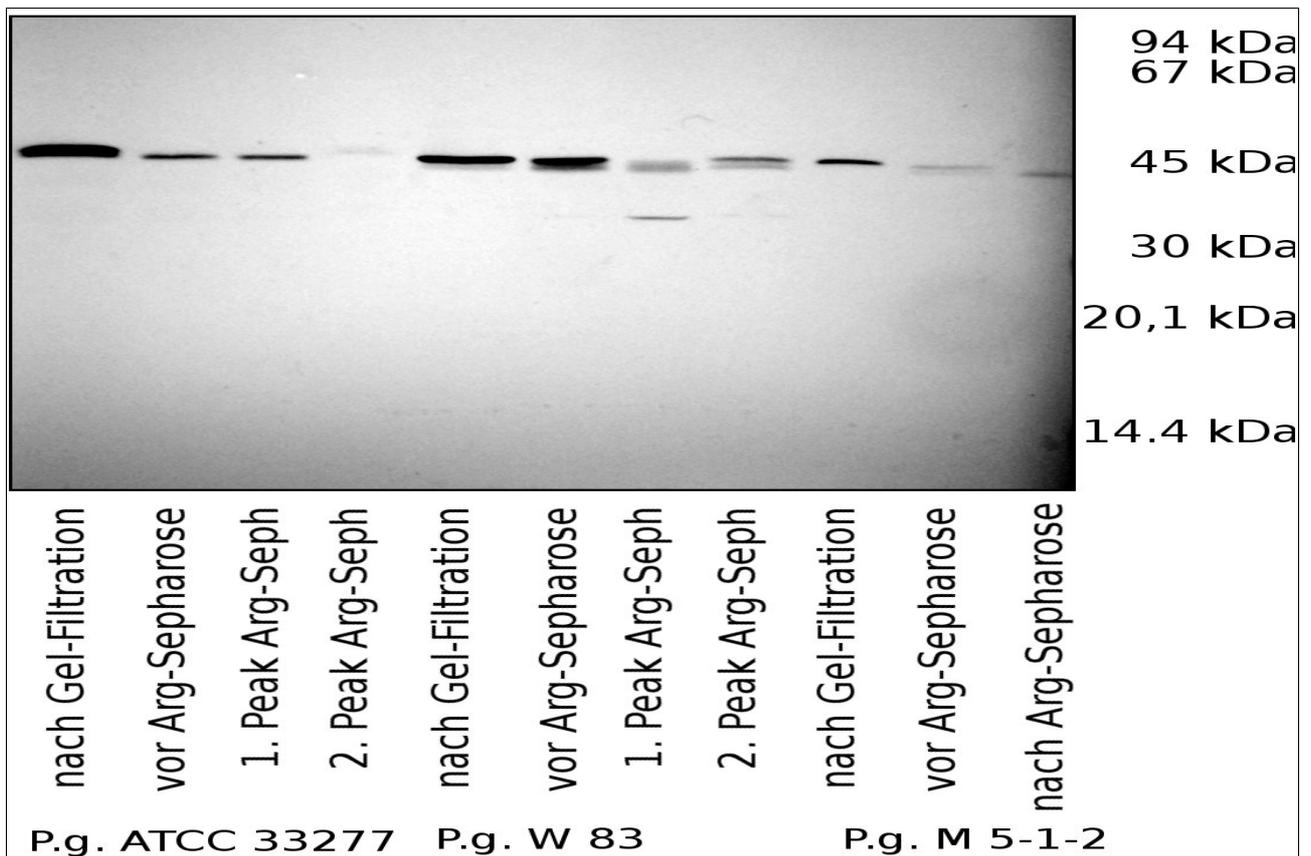


Abbildung 12: Western Blot der SDS-PAGE für Kgp-Proteasen auf Nitrozellulose-Membran; die molekulare Masse der Marker (in Kilodaltons) ist auf der rechten Seite des Gels angezeigt. Kgp bildete bei allen Stämmen nur eine Bande bei 45 kDa. Bei der zusätzlichen Bande bei W83 im ersten Peak aus der Arg-Separose handelte es sich um ein Spaltprodukt.

dass seine Menge während jeden Schrittes in der Aufbereitung nachließ, wie an schwächeren Banden bei 45 kDa in Abbildung 12 deutlich wird. Diese Erscheinung war in einer Autoproteolyse der Gingipaine begründet. Im Western Blot der Kgp-Proteasen wies der Stamm W83 im ersten Peak aus der Arg-Separose im Gegensatz zu den anderen Stämmen eine zusätzliche Bande bei 30 kDa auf, bei der es sich vermutlich lediglich um ein Spaltprodukt in der Autoproteolyse handelte, das in den vorherigen Schritten der Aufreinigung nicht bestanden hatte. Trotz einer übereinstimmenden amidolytischen Aktivität aller drei Stämme zeigten sich Abweichungen im Proteinprofil sowie in den Western Blots der Kgp-Proteasen. Deutlich sichtbar wies der Stamm M 5-1-2 beim ersten Peak der Arg-Separose eine zusätzliche Bande bei 67 kDa auf. Somit bildete Stamm M 5-1-2 für Rgp-Proteasen Formen des Enzyms aus, die sich bei den anderen Stämmen nicht nachweisen ließen.

### 5.1.3 DNase-Aktivität

Tabelle 3: DNase-Aktivität der Stämme auf Spezial-Agar; Stamm M 5-1-2 wies Membran-gebundene DNase auf, wie in deutlicher DNase-Aktivität im Sediment der Bouillon sowie in der Platten-Kultur ersichtlich ist.

<b>Herkunft</b>	<b><i>P.g. ATCC 33277</i></b>	<b><i>P.g. W83</i></b>	<b><i>P.g. M 5-1-2</i></b>
Sediment Bouillon	+	0	++
Überstand Bouillon	(+)	0	(+)
Platte	+	0	++

Im dem Versuch mit Spezial-Agar (BD, Heidelberg) zeigte Stamm M 5-1-2 die höchste DNase-Aktivität, unabhängig vom Wachstumsmedium. Bei dem Stamm ATCC 33277 war sie geringer ausgeprägt, und bei W83 konnte keine Aktivität nachgewiesen werden. Die Negativkontrolle zeigten keine DNase-Aktivität auf Spezial-Agar. Die Veränderungen des DNase-Agars glichen sich bei den Proben des Sedimentes aus Schaedler-Bouillon mit den Proben von Schaedler-Platte. Im Überstand der Bouillon konnte lediglich sehr geringe Aktivität nachgewiesen werden. Daraus ließ sich folgern, dass *P. gingivalis* M 5-1-2 wirksame Mengen DNase produzierte. Aber das Enzym wurde ohne Stimulus nicht in die Umgebung (Überstand) abgesondert. Die DNase war an die Zellmembran (Sediment) gebunden.

## 5.2 Phagozytose und Killing

Die Lebensfähigkeit im Trypan-Blau Test betrug in allen Versuchen 95% bis 97%.

### 5.2.1 Phagozytose

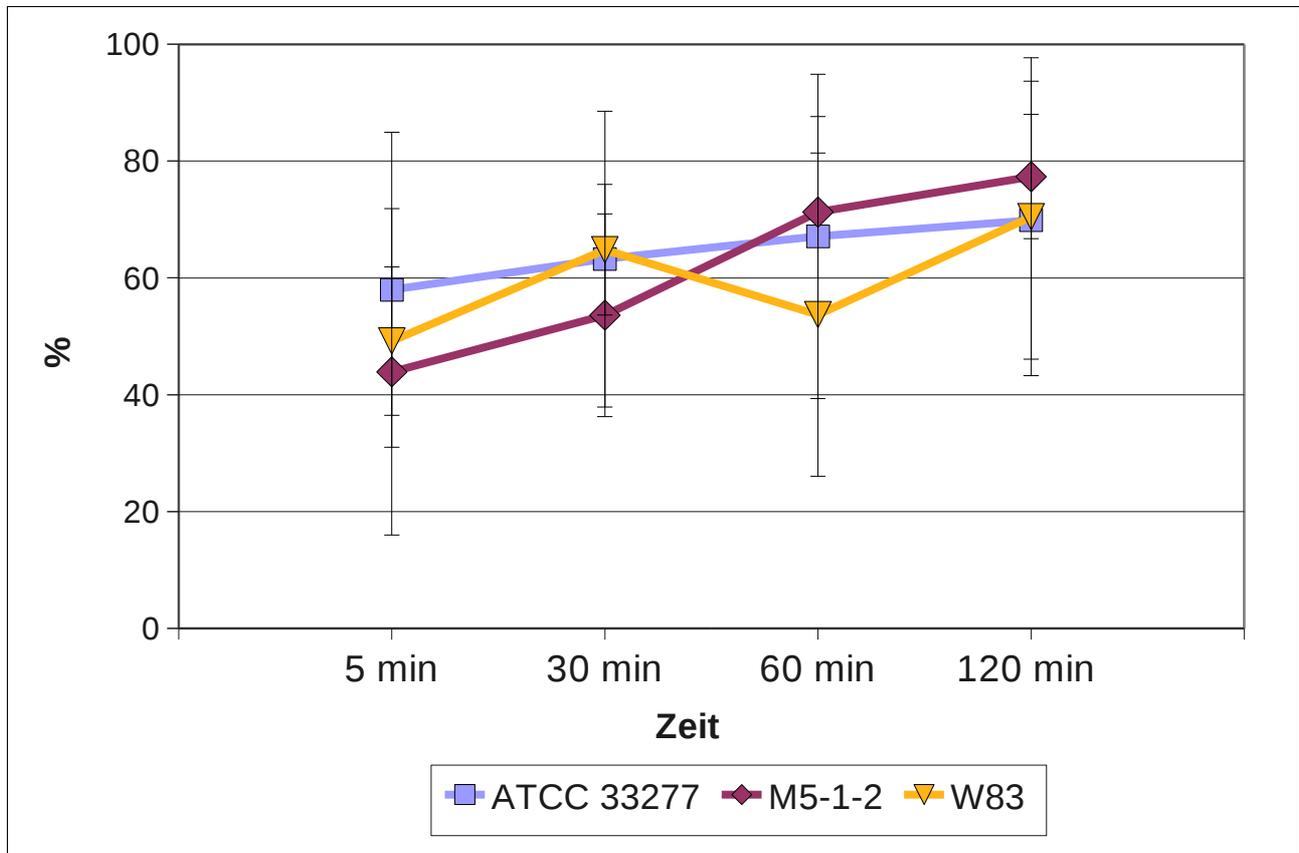


Abbildung 13: Phagozytose von *P. gingivalis* durch PMNs; Zeit-abhängiger Anteil phagozytierter Bakterien in Prozent der vorhandenen *P. gingivalis*: Keine signifikanten Unterschiede waren bei den Stämmen auswertbar.

Die PMNs konnten den Großteil, aber nicht alle Bakterien phagozytieren (Abbildung 13). Auch 120 min nach Infektion wurden – je nach Stamm – lediglich 70% bis 77% der Bakterien phagozytiert. Es ist davon auszugehen, dass sich der größte Teil der Phagozytose (44% bis 58%) in den ersten 5 min vollzog. Danach verlangsamte sich der Vorgang deutlich bei allen Stämmen, stieg aber um mindestens 12% an. Die Beobachtung der Phagozytose bot keine signifikanten Unterschiede zwischen den Stämmen, es wurde nur die Tendenz sichtbar, dass diese bei Stamm M 5-1-2 zu Beginn schlechter erfolgte. Nach 120 min erreichte die Phagozytose bei M 5-1-2 aber Werte wie bei den Stämmen ATCC 33277 und W83.

## 5.2.2 Killing

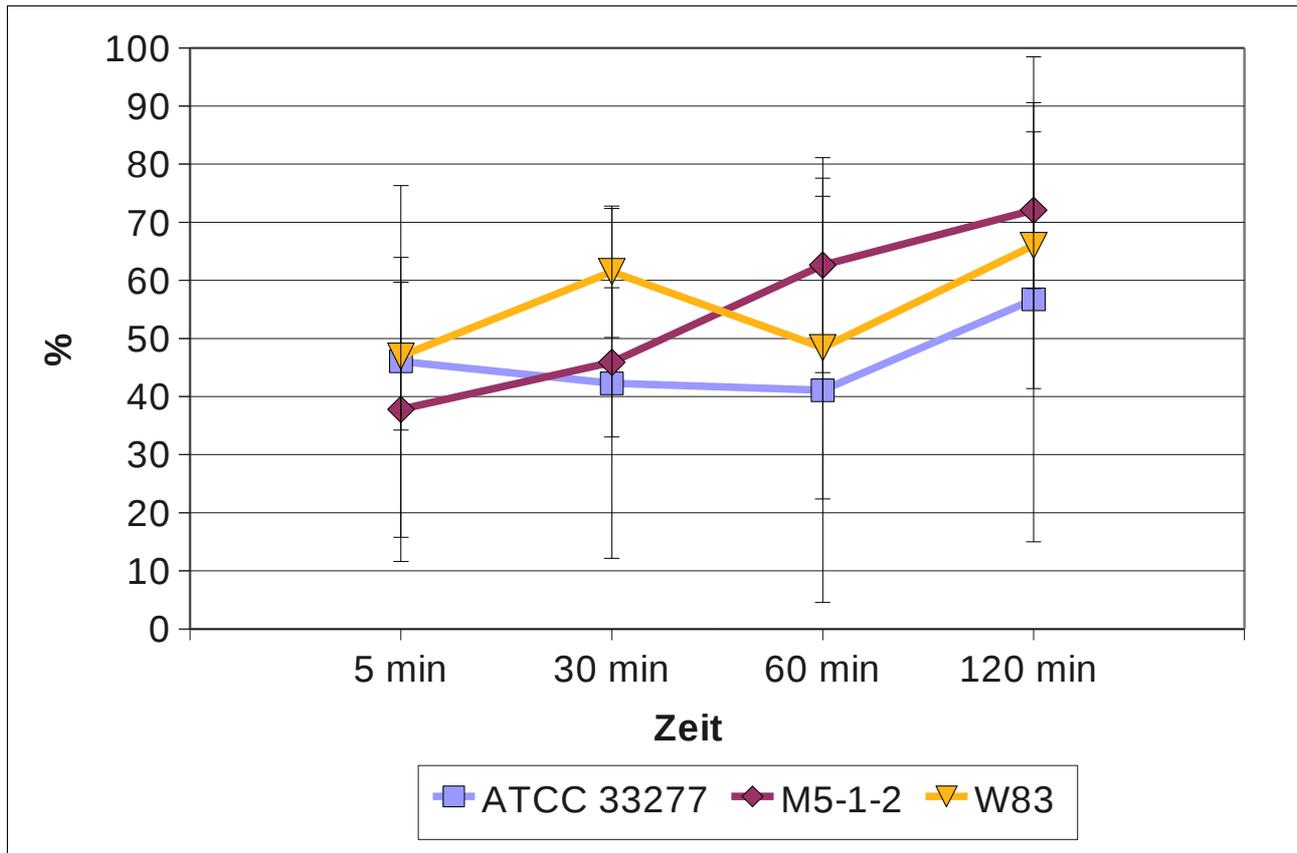


Abbildung 14: Killing von *P. gingivalis* durch PMNs insgesamt; Zeit-abhängiger Anteil an Bakterien in Prozent, die keine cfu mehr bildeten; keine signifikanten Unterschiede

Im Killing (Abbildung 14) waren lediglich Tendenzen erkennbar. So wurde nach einem Zeitraum von 5 min ein Maß von mindestens 38% erreicht. Das Maximum des Killings wurde am Ende der Messung, nach 120 min, erreicht. Das Killing in den Phago-Lysosomen der PMNs erreichte Werte von 38% nach 5 min bis zu einem Maximum von 63% nach 120 min. Wie bei der Phagozytose waren bei der Berechnung des Killings zwischen den verschiedenen Stämmen keine signifikanten Differenzen erkennbar. Auch hier zeigte sich die Tendenz, dass das Niveau des Killings bei Stamm M 5-1-2 zunächst unter dem der Stämme ATCC 33277 und W83 lag. Nach 120 min wurden aber bei allen Stämmen ähnliche Werte erreicht.

Auch im Killing phagozytierter Bakterien (Abbildung 15) bestanden keine signifikanten Abweichungen bei den Stämmen. Der größte Teil phagozytierter *P. gingivalis* wurde eliminiert. Zum ersten Messpunkt (5 min) wurde ein Killing von mindestens 70% erreicht. Wurden die Bakterien nicht gleich nach Phagozytose abgetötet, so überlebten sie in den Phago-Lysosomen der Zellen. Das Killing phagozytierter *P. gingivalis* stieg bis 120 min nur noch geringfügig an.

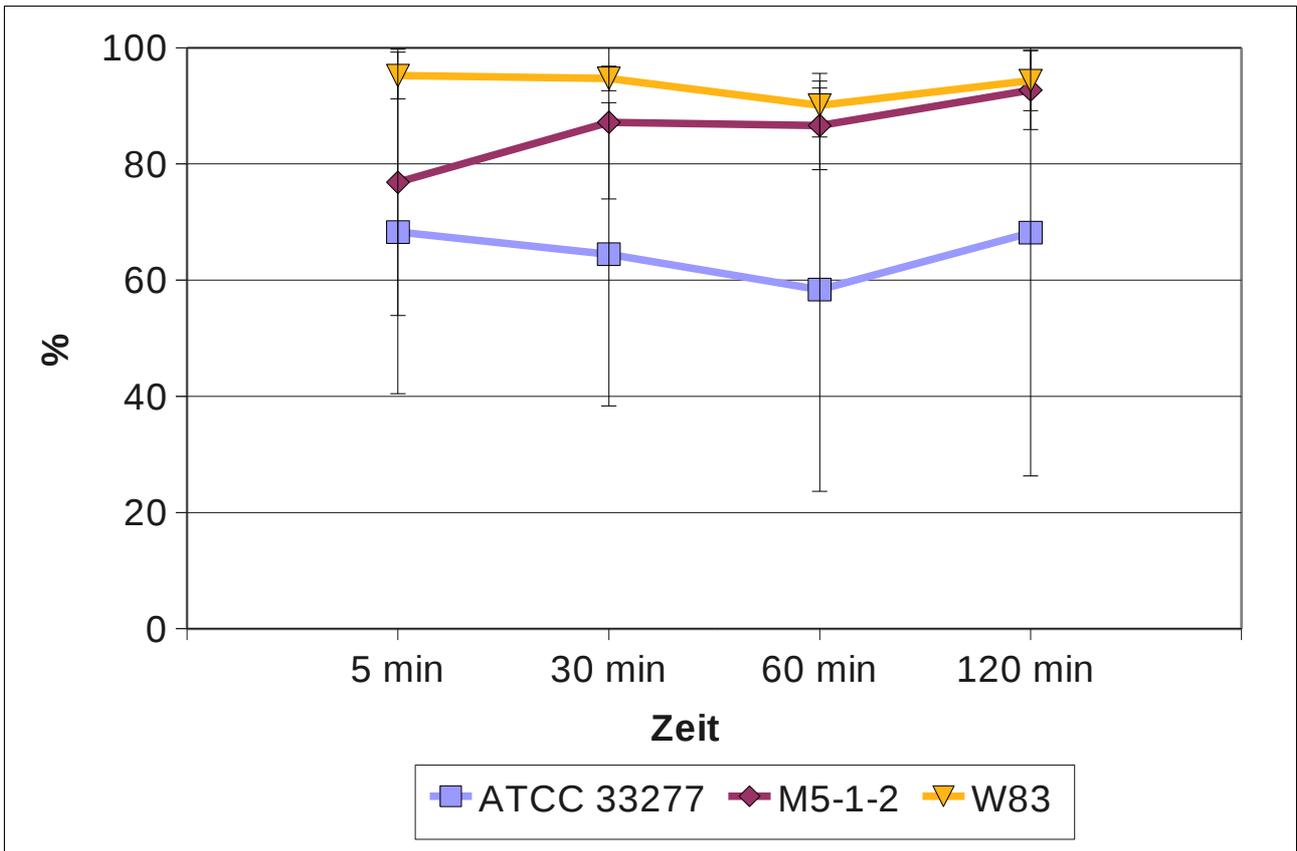


Abbildung 15: Killing phagozytierter *P. gingivalis* in den Phagosomen; Zeit-abhängiger Anteil an Bakterien in Prozent aus lysierten PMNs, die keine cfu mehr bildeten; keine signifikanten Unterschiede. Das Killing vollzog sich bis zum ersten Messpunkt (5 min). Danach überlebten die verbliebenen Bakterien in den Phagosomen.

### Extrazelluläres Killing

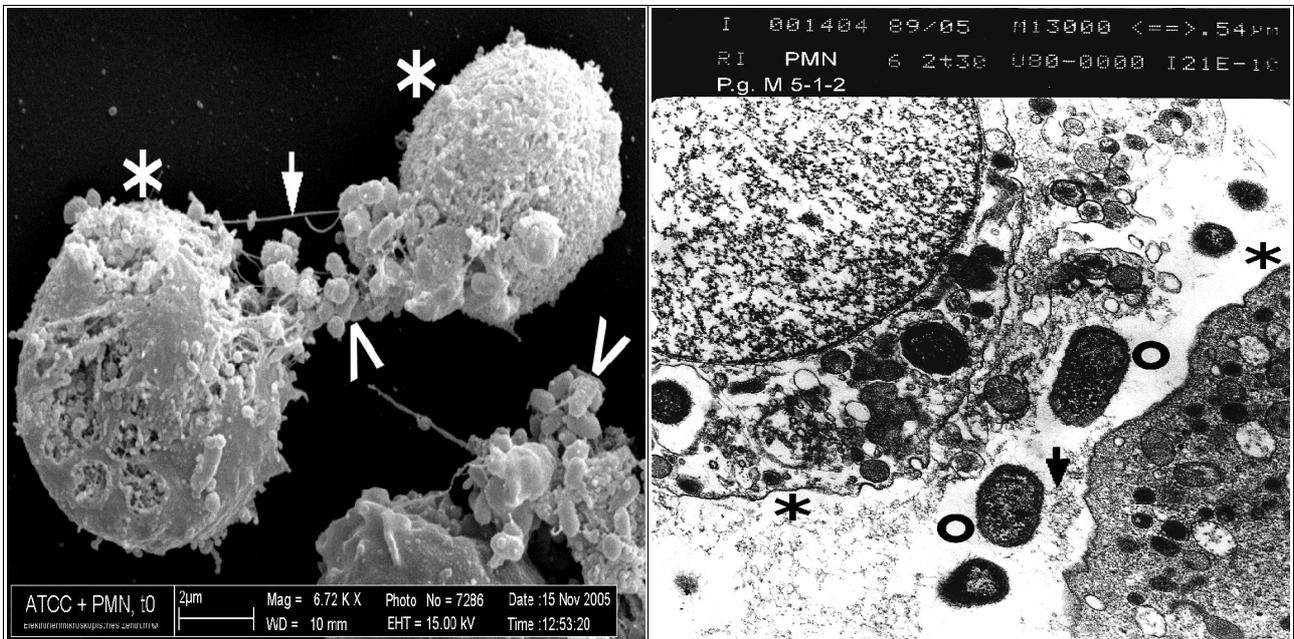


Abbildung 16: NET-vermitteltes Killing im EM; zerfallende PMNs (\*) mit *P. gingivalis* ATCC 33277 (<) in DNA-Gerüsten der NETs (Pfeil) in REM-Aufnahme und *P. gingivalis* M 5-1-2 (°) in TEM-Aufnahme. Deutlich erkennbar waren faserige Strukturen (durch Pfeil markiert), in denen Bakterien gefangen waren.

Durch Zugabe von Cyt D, einem Inhibitor der Phagozytose, in einer Konzentration von 10

µg/ml RPMI 1640 konnte die Effektivität extrazellulären Killings gesondert untersucht werden. Die Vorgänge extrazellulären Killings wurden anhand von EM-Aufnahmen dokumentiert. Wie in Abbildung 16 und Abbildung 17 ersichtlich ist, verloren PMNs bei Kontakt mit *P. gingivalis* ihre Struktur. Beim Zerfall bildeten sie faserige Strukturen, in denen sich Bakterien verfangen. Es muss davon ausgegangen werden, dass es sich bei den erkennbaren Strukturen um DNA-Gerüste der NETs handelte.

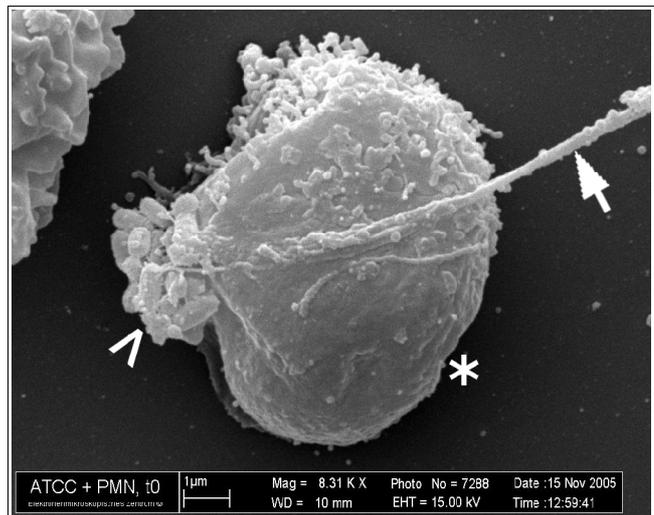


Abbildung 17: REM-Aufnahme; PMN (\*) bei Infektion mit *P. gingivalis* ATCC 33277 (>). Deutlich zu erkennen sind faserige DNA-Strukturen (Pfeil), in denen Bakterien gefangen sind.

Ohne Phagozytose betrug das Killing bei allen drei Stämmen 4% bis 24% der Kontrollwerte, aber Stamm *P. gingivalis* M 5-1-2 zeigte ein signifikant geringeres extrazelluläres Killing (Abbildung 18). Bei 5 min und 30 min war das Killing des Stammes ATCC 33277 mit 30% und 20% signifikant höher als für M 5-1-2 mit 11% und 4% ( $p < 0,05$  und  $p < 0,01$ ). Bei 60 min und 120 min war das Killing für Stamm W83 (19% und 22%)

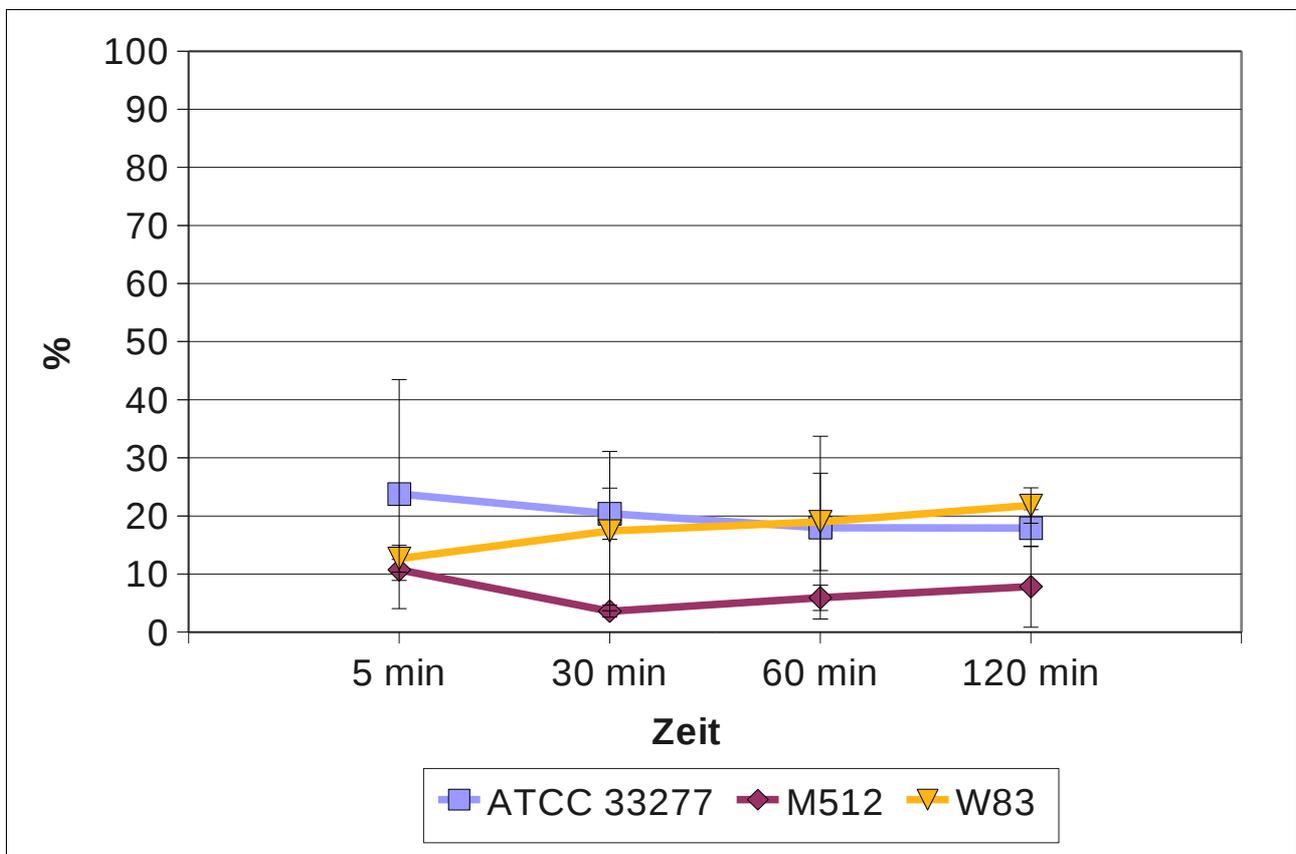


Abbildung 18: Killing von *P. gingivalis* durch PMNs bei blockierter Phagozytose; Zeit-abhängiger Anteil abgetöteter Bakterien in Prozent der vorhandenen *P. gingivalis*; Phagozytose der PMNs wurde mit Cyt D blockiert. Ein signifikant geringes extrazelluläres Killing für M 5-1-2 ist erkennbar.

signifikant höher als für Stamm M 5-1-2 (6% und 8%;  $p < 0,05$ ). Ein zweifacher Anstieg der cfu bei *P. gingivalis* in Gegenwart von PMNs, deren Phagozytose mit Cyt D geblockt wurde, war zu bemerken. Damit war der Anteil extrazellulären Killings mit 4% bis 24% gegenüber einem gesamten Killing von 38% bis 72% deutlich geringer.

### 5.2.3 Reaktionen der Granulozyten auf Bakterien

#### Aktivität der Granulozyten-Elastase

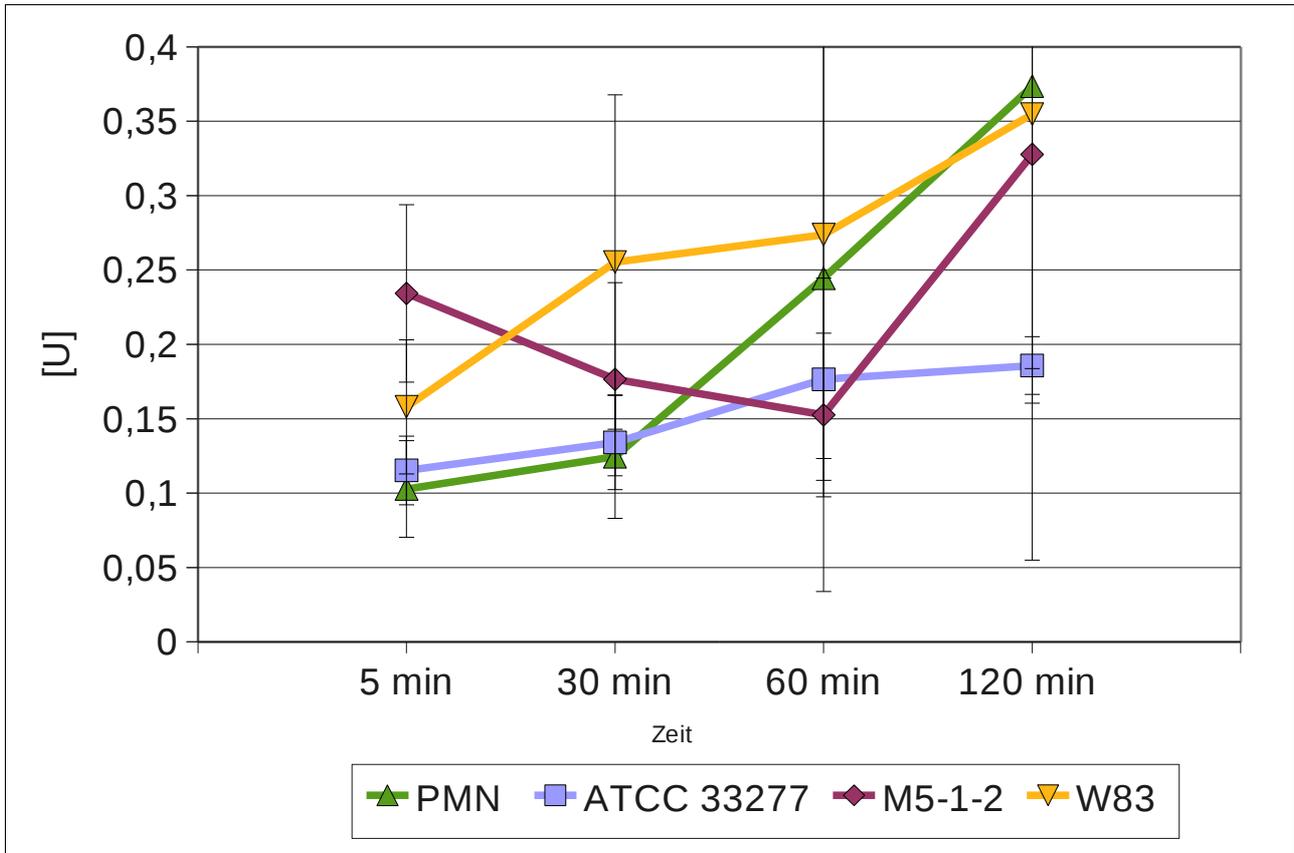


Abbildung 19: HNE-Aktivität im Überstand nach Infektion der PMNs mit *P. gingivalis*; PMNs ohne Bakterien als Kontrolle; Zeit-abhängige Menge an HNE. Bei Kontakt mit *P. gingivalis* zeigte sich eine erhöhte Freisetzung des Enzyms. Ab 60 min war das Einsetzen von Schäden an den PMNs in Folge von Überarbeitung erkennbar in einem Absinken der HNE-Aktivität.

Die Aktivität von HNE aus humanen peripheren PMNs wurde untersucht, nachdem diese *P. gingivalis* ausgesetzt waren. Zum Zeitpunkt 5 min konnte extrazellulär eine erhöhte Aktivität der HNE gegenüber nicht infizierten Zellen (100 mU) bei Stamm M 5-1-2 (230 mU;  $p < 0,01$ ) sowie bei Stamm W83 (160 mU;  $p < 0,05$ ) nachgewiesen werden. Nach 30 min übertraf die Menge an HNE bei Stamm W83 (260 mU) noch signifikant die Menge extrazellulärer HNE der Negativkontrolle (120 mU;  $p < 0,05$ ). Spätere höhere Werte der Kontrolle ließen sich durch eine mögliche Schädigung der Zellen erklären. Mit *P. gingivalis* infizierte PMNs setzten mehr HNE in ihre Umgebung frei als ruhende Zellen. Nach 60 min trat eine Schädigung der Granulozyten ein.

## Chemoluminiszenz

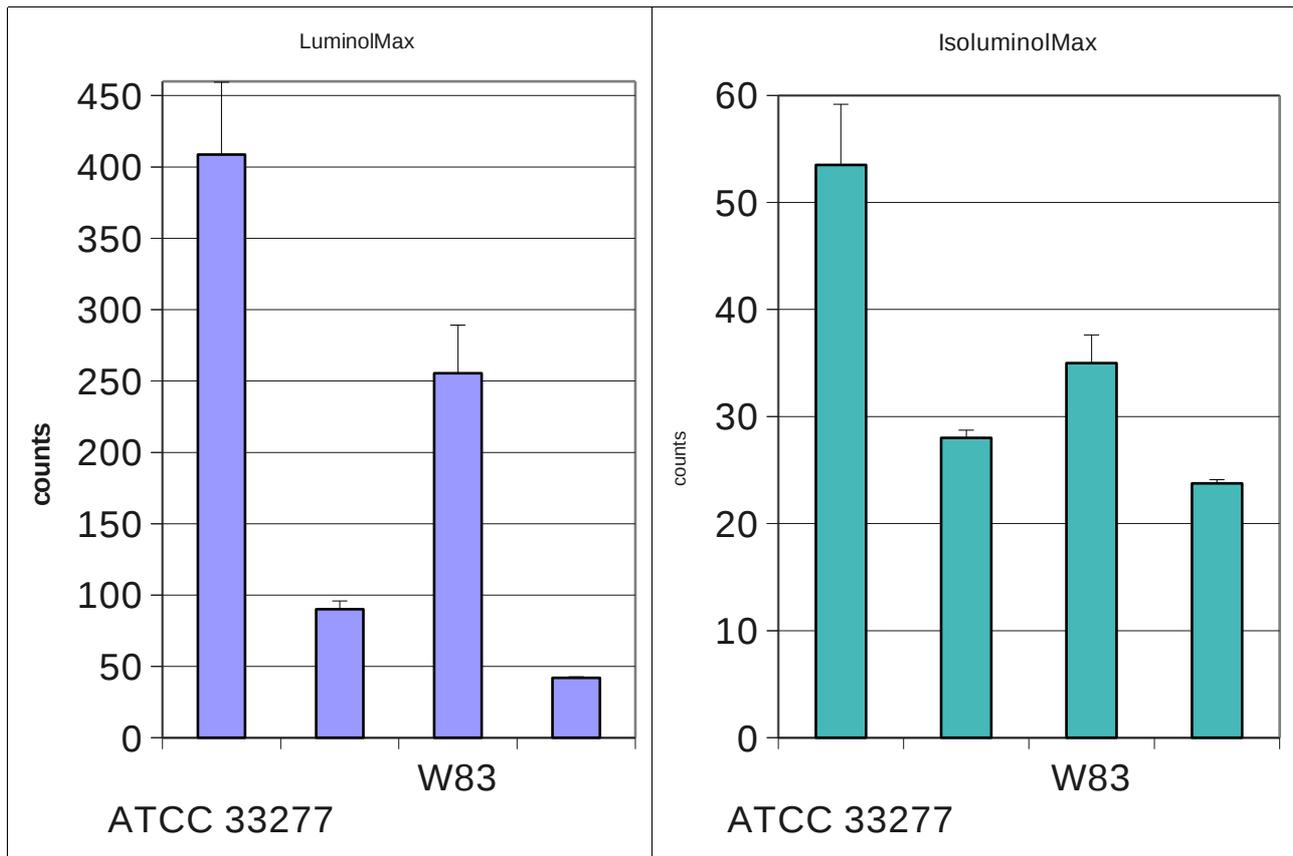


Abbildung 20: Maximalwerte der Chemolumineszenz für Luminol und Isoluminol zur Analyse der Produktion intrazellulärer sowie extrazellulärer ROS. Die Menge insgesamt produzierter ROS war bei allen Stämmen signifikant höher als in der Kontrolle. Stamm ATCC 33277 produzierte insgesamt signifikant mehr ROS als Stamm M 5-1-2. Extrazelluläre ROS waren bei Stamm ATCC 33277 gegenüber der Kontrolle signifikant erhöht.

Mit chromogenem Substrat Luminol wurde das Maximum reaktiver ROS bestimmt (Abbildung 20), die **insgesamt** in den PMNs gebildet wurden. Bei allen Stämmen zeigte sich eine signifikante Erhöhung in maximaler Luminol-abhängiger Chemolumineszenz gegenüber nicht infizierten PMNs. Der größte Unterschied zeigte sich bei Stamm ATCC 33277 ( $p < 0,01$ ) und bei Stamm W83 ( $p < 0,05$ ) zu den Kontrollen. Aber auch bei Stamm M 5-1-2 zeigten die PMNs noch eine signifikant erhöhte Produktionsspitze an intrazellulären ROS ( $p < 0,001$ ). Stammspezifische Differenzen bestanden insofern, dass die Menge an ROS bei Stamm ATCC 33277 ein signifikant höheres Maximum als bei Stamm M 5-1-2 erreichte ( $p < 0,001$ ).

Isoluminol ist aufgrund seiner hydrophilen Eigenschaften nicht in der Lage, die Zellmembranen zu überqueren und weist demnach nur **extrazelluläre** ROS nach. In Abbildung 20 ist der Spitzenwert in Isoluminol-abhängiger Chemolumineszenz dargestellt. Dabei zeigte sich eine signifikante Erhöhung maximaler Werte extrazellulärer ROS gegenüber der Kontrolle nur bei dem Stamm ATCC 33277 ( $p < 0,01$ ). Die

Chemolumineszenz des Stammes ATCC 33277 bei Isoluminol war auch signifikant höher als bei M 5-1-2 ( $p < 0,001$ ) und höher als bei W83 ( $p < 0,05$ ). Der Kontakt von PMNs mit *P. gingivalis* stimulierte die Bildung und Freisetzung von ROS aus Granula der PMNs. Bei Stamm ATCC 33277 zeigte sich eine besonders hohe Chemolumineszenz sowohl auf Luminol als auch auf Isoluminol, was für eine höhere Freisetzung von ROS bei Kontakt mit diesem Stamm sprach.

## Nachweis der Lebensfähigkeit polymorphkerniger Granulozyten mit MTT

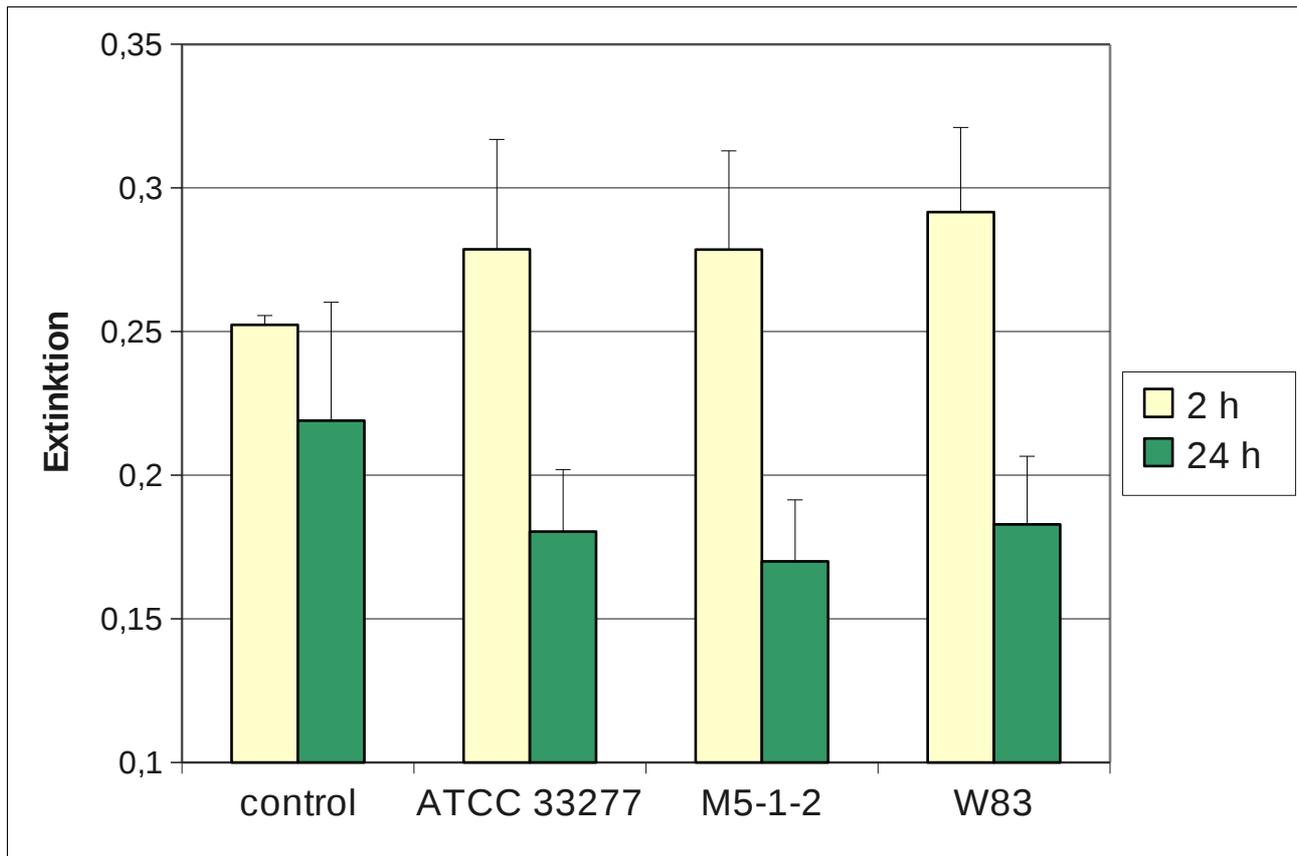


Abbildung 21: Im MTT-Versuch wurde eine Reduktion an Lebensfähigkeit der Zellen durch vermindertes Erscheinen von Formazan nach 2 h bzw. 24 h Koinkubation mit *P. gingivalis* gemessen. Die Menge an Formazan war nach 2 h gegenüber der Kontrollgruppe sichtbar erhöht. Nach 24 h lag die Menge an lebensfähigen Zellen bei den infizierten PMNs jedoch deutlich unter den Werten der Kontrollen.

Die Lebensfähigkeit der PMNs wurde mit chromogenem Substrat MTT über die Aktivität mitochondrialer Dehydrogenase bestimmt. Die in Abbildung 21 dargestellten Ergebnisse zeigten 2 h nach Infektion einen gesteigerten Stoffwechsel der infizierten Zellen. Für den Stamm W83 war die Abweichung zu nicht infizierten PMNs signifikant ( $p < 0,05$ ). Nach 24 h war die Lebensfähigkeit der PMNs mit *P. gingivalis* infizierten PMNs gegenüber den Kontrollen verringert. Die Stämme wiesen alle eine signifikante Verringerung des Wachstums in ähnlichem Maße auf (ATCC 33277:  $p < 0,05$ ; M 5-1-2:  $p < 0,01$ ; W83:  $p < 0,05$ ). Es wurde sichtbar, dass *P. gingivalis* die Lebensspanne der PMNs zunächst durch Stress-Aktivierung verlängerte. Dies war auf eine erhöhte Aktivität mitochondrialer Dehydrogenase in einem stimulierten Stoffwechsel während der Immunabwehr zurück zu führen. Nach 24 h induzierte *P. gingivalis* mit geringer Irrtumswahrscheinlichkeit das Absterben der PMNs bei allen Stämmen. Dazu trug die zellschädigende Wirkung der Bakterien bei.

## 6 Diskussion

In vorliegender Untersuchung wurden Interaktionen der Stämme ATCC 33277, W83 und M 5-1-2 der Spezies *P. gingivalis* mit humanen PMNs *in vitro* beleuchtet. Ausgangspunkt war die Zufallsbeobachtung, dass der ATCC-Stamm die Bildung von ROS im Gegensatz zu Stamm W83 verstärkt induziert. Bereits in anderen Untersuchungen wurde *P. gingivalis* W83 als hoch virulent und Referenzstamm ATCC 33277 als harmlos deklariert (Grenier und Mayrand 1987, Chen et al. 2004). Unsere Untersuchung konnte zeigen, dass bei allen Stämmen eine gute Phagozytose und Abtötung der Bakterien durch Granulozyten erfolgte. Bei infizierten PMNs war die Freisetzung von HNE und ROS generell erhöht, auch wenn die Bildung der ROS bei dem Referenzstamm höher lag als bei den Stämmen M 5-1-2 und W83. Nach Stress-Aktivierung der PMNs bei Kontakt mit *P. gingivalis* verringerte sich die Lebenszeit der Zellen. Eine hohe Aktivität der DNase bei *P. gingivalis* M 5-1-2 verhinderte effektives Killing des Stammes in den NETs. Nur Stamm W83, aber nicht M 5-1-2 oder ATCC 33277, besitzt eine anti-phagozytische Kapsel vom Typ K1. In den Cystein-Proteasen zeigten sich kaum Unterschiede bei den drei Stämmen.

### 6.1 Angewandte Methodik

Die Phagozytose von *P. gingivalis* wurde in zahlreichen Studien untersucht (Sundqvist et al. 1982, Ji et al. 2007), aber bisher wurden die Zusammenhänge zwischen den Mechanismen der Elimination und den Virulenzfaktoren der Spezies noch nie in dieser Kombination überprüft. Neu war insbesondere die Untersuchung des extrazellulären Killings, bei dem eine Rolle der NETs anzunehmen ist. Phagozytose und Killing wurden anhand aufwändiger Kulturversuche bestimmt, denen wegen ihrer genauen Angabe der Zellzahl gegenüber einer FACS-Analyse der Vorzug gegeben wurde. Hierfür wurde ein größerer zeitlicher Aufwand in Kauf genommen, der für die Gewinnung verwertbarer Daten notwendig war. Für unsere Phagozytose-Versuche wurde die Methode von Hampton et al. (1994) angepasst. Diese Methode bestimmt sowohl freie lebensfähige Bakterien als auch die Menge phagozytierter Bakterien. Die Unfähigkeit zur Unterscheidung zwischen anheftenden und intrazellulär eingeschlossenen lebensfähigen Bakterien beschränkt die Aussagefähigkeit dieser Methode. Erst durch eine gesonderte Versuchsreihe unter Zugabe von Cyt D war eine Unterscheidung zwischen extrazellulär und intrazellulär abgetöteten Bakterien möglich. In unserem Versuchsaufbau fanden PMNs aus dem peripheren Blut Verwendung, welche sich in ihren Eigenschaften von PMNs aus der Mundhöhle unterscheiden könnten. Die Abwehrzellen erfahren beim Eintritt in das parodontale Gewebe eine Aktivierung, so dass ihre Phagozytose-Leistung im

parodontalen Sulkus sich leicht von jener im peripheren Blut unterscheidet. PMNs jedoch, welche aus dem Sulkus isoliert werden, sind häufig geschädigt, sie zeigen Degranulationen, weisen eine Reduktion phagozytischer Funktion auf und ihre Lebensfähigkeit ist verkürzt (Zadeh et al. 1999). Wilton et al. (1977) berichteten eine leichte Reduktion der phagozytischen Funktion von PMNs aus dem Gingivalsulkus gesunder Patienten, verglichen mit der phagozytischen Funktion peripherer Blutzellen. Die Verwendung der PMNs nur einer Versuchsperson, wie bei uns erfolgt, liefert keine universelle Aussage über die Phagozytose dentaler Plaque-Bakterien bei parodontal gesunden Personen, denn höchste intersubjektive Abweichungen werden bei allen neutrophilen Funktionen in allen diagnostischen Kategorien beobachtet (Takahashi et al. 2001). Um sehr große Abweichungen bei Verwendung von PMNs aus dem Blut verschiedener Spender zu umgehen, wurden in unseren Versuchen lediglich Blutzellen einer einzigen Person verwendet. Damit wird deutlich, dass die Funktion der PMNs im menschlichen Körper unzähligen Variablen unterworfen ist, die bei In vitro-Versuchen nicht alle imitiert werden können. Die von uns angewendete Isolierung der Zellen durch Dextran-Sedimentation führt zu einer Aktivierung der Zellen. Eine Infektion von PMNs mit Bakterien produziert kräftige Mengen an NETs, welche mit der Zeit noch anwachsen (Fuchs et al. 2007). Die Zahl der NETs korreliert mit der Menge an *P. gingivalis*, welche den PMNs zugesetzt werden (Beiter et al. 2006). Entsprechend können die PMNs bei Kontakt mit den Erregern aufgrund der Voraktivierung bereits NETs bilden. Durch die angewendete Dextran-Sedimentation kann ebenso eine erhöhte ROS-Produktion in PMNs angenommen werden (Rebecchi et al. 2000).

In unseren Versuchen konnten Gingipaine bei den untersuchten Stämmen nachgewiesen werden. Ein Vergleich der Menge und Aktivität produzierter Cystein-Proteasen war nur eingeschränkt möglich. Das Chromatogramm wurde zu einer semiquantitativen Analyse genutzt. In der Aceton-Präzipitation wurde nur die freigesetzte Form der Gingipaine im Kulturmedium untersucht. Die Vermutung liegt nahe, dass eine größere Menge der Gingipaine in Membran-gebundener Form vorlag (Potempa et al. 1995). Zu den bakteriellen DNasen lieferten unsere Ergebnisse lediglich orientierende semiquantitative Aussagen. Eine Auflösung der NETs durch extrazelluläre DNasen wie bei Streptokokken der Gruppe A (Buchanan et al. 2006) kann aber aus der Literatur als gesichert angenommen werden.

## 6.2 Elimination von *Porphyromonas gingivalis* durch polymorphkernige Granulozyten

In unserer Studie wurden die Bakterien in hohem Maße abgetötet, was auf eine starke Immunabwehr der PMNs hinweist. Der Widerstand gegen Phagozytose und Killing war bei allen Stämmen sehr ähnlich. Unter den Bedingungen unseres Versuches nahmen PMNs die Hälfte der *P. gingivalis* in weniger als 5 min (ATCC 33277) bzw. 30 min (M 5-1-2, W83) auf. Stamm M 5-1-2 wurde zunächst schlechter, am Ende jedoch gleich gut phagozytiert. Maximal 72% (M 5-1-2) der Erreger wurden nach 120 min eliminiert, und in den Phagosomen überlebten 5% (W83) bis 42% (ATCC 33277) intrazellulärer Bakterien. Das Killing phagozytierter *P. gingivalis* geschah innerhalb von 5 min, danach überlebten die Bakterien in den Phagosomen. Dazu ist bekannt, dass einige pathogene Mikroorganismen sich die Fähigkeit angeeignet haben, antimikrobielle Aktivität der Phagozyten zu unterlaufen und ins Innere professioneller Phagozyten zu gelangen. Insbesondere betrifft dies Makrophagen, wo resistente Erreger nicht abgetötet werden, sondern überleben und sich im Inneren der Phagozyten proliferieren (Laskay et al. 2003). Eine solche Proliferation in humanen PMNs kann bei Überlebensraten von bis zu 42% in unseren Ergebnissen bei *P. gingivalis* in Betracht gezogen werden. Zur Stützung dieser These wären weitere Untersuchungen notwendig.

## 6.3 Mechanismen des Killings

Wie in Untersuchungen gezeigt wurde, ist eine subgingivale Infektion Auslöser parodontaler Erkrankung. Die Präsenz der Mikroorganismen allein ist aber nicht der einzige Faktor, welcher für parodontale Zerstörung verantwortlich ist (Albandar und Rams 2002). Die Antwort des Wirts auf pathogene Bakterien ist zudem von zentraler Bedeutung. Virulenzfaktoren der Parodontitis-Bakterien lösen einen Überschuss entzündlicher Reaktionen aus. Dazu gehören Infiltration und Aktivierung der PMNs, was zu einer Freisetzung entzündlicher Mediatoren, Proteasen sowie ROS und zu der Zerstörung parodontalen Gewebes führt (Lösche et al. 1988, Zekonis und Zekonis 2004). So scheinen PMNs aus chronischer und aggressiver Parodontitis hyperreaktiv, denn diese phagozytieren mehr *P. gingivalis* und setzen vermehrt ROS sowie HNE frei als PMNs gesunder Personen (Guentsch et al. 2009).

Bei Freisetzung aktiver **HNE** fielen hohe Anfangswerte bei *P. gingivalis* M 5-1-2 sowie eine generell höhere Freisetzung bei Stamm W83 auf. Elastase wirkt auf viele Erreger, indem sie deren Virulenzfaktoren ausschaltet (Hirsch 1958). HNE stellt ein proteolytisches Enzym aus Primärgranula der PMNs dar, das auf Aktivierung der Neutrophilen freigesetzt

wird. Das Enzym ist in der Lage, verschiedene extrazelluläre Matrix-Proteine angrenzender Gewebe zu hydrolysieren (Nicu et al. 2007). Die Spaltung von Matrix-Molekülen durch Kollagenase und HNE bildet Peptid-Fragmente, welche für Monozyten chemotaktisch sind. So wird die Rekrutierung von Monozyten an die Stelle der Schädigung gefördert. Die HNE ist somit an durch Neutrophile vermittelte Schäden beteiligt (Kantarci et al. 2003) und kann als Marker-Substanz zur Differenzierung zwischen akuten pyogenen Infektionen und anderen Exsudaten dienen (Alegre et al 2000).

*P. gingivalis* W83 besitzt eine Kapsel vom Typ K1 und bildet Abszesse. Aus diesen Eigenschaften war eine erhöhte Freisetzung von HNE in unseren Ergebnissen gegenüber dem avirulenten Stamm ATCC 33277 zu erwarten. Die Kapsel-Strukturen könnten eine erhöhte Produktion an HNE indizieren, weil PMNs insuffiziente Phagozytose durch erhöhtes extrazelluläres Killing zu kompensieren suchen. Andererseits kann HNE im Überstand auch aus lysierten Zellen stammen, die nach Verlust ihrer Integrität alle Enzyme in die Umgebung entleeren. Im extrazellulären Raum könnte eine Aktivierung durch Cathepsin C erfolgen (Méthot et al. 2008, Pham 2008). Das bakterielle Enzym DNase baut unter anderem das DNA-Gerüst der NETs ab und zerstört damit deren funktionelle Integrität. HNE ist ein antibakteriell wirksamer Bestandteil der NETs, welcher bei Auflösung der Strukturen in die Umgebung freigesetzt werden könnte (Beiter et al. 2006). Der Stamm M 5-1-2 besaß die höchste DNase-Aktivität, und nach Kontakt mit PMNs wurde hier entsprechend viel aktive HNE freigesetzt. Dabei ist extrazelluläre Freisetzung von ROS und HNE nicht wirksam im Killing der Bakterien, trägt aber zur Schädigung umgebenden parodontalen Gewebes bei (Asman 1988, Sheikhi et al. 2001).

Der Kontakt der PMNs mit *P. gingivalis* führte zu erhöhter Bildung und Freisetzung von **ROS**. Die Messungen von ROS und HNE waren in ihren Ergebnissen gegenläufig. Stamm ATCC 33277, bei dem sehr wenig HNE freigesetzt wurde, provozierte die höchste Produktion von ROS bei Kontakt mit den PMNs. Sauerstoff-Radikale wurden aber hier vor allem in das Phago-Lysosom abgesondert. Obwohl bei Chemolumineszenz von Stamm M 5-1-2 mit Luminol ein sehr viel niedrigerer Pegel an gesamten ROS als bei Stamm ATCC 33277 auffiel, war die Abweichung bei extrazellulären ROS (Isoluminol-abhängige Chemolumineszenz) geringer. Dies deutet darauf hin, dass trotz insgesamt geringerer Produktion durch die extrazelluläre Freisetzung von ROS der Stamm M 5-1-2 ein ähnlich schädigendes Potenzial wie der der Stamm ATCC 33277 besitzt. Oxidativer Stress ist in die Entwicklung von Fettsucht, Typ II Diabetes, vaskuläre Erkrankungen und in Ereignisse verwickelt, die zu ungünstigen Auswirkungen auf die Schwangerschaft führen.

Extrazelluläre Freisetzung von ROS kann Lipid-Peroxidation hervorrufen. In den letzten Jahren wurde auch die Verwicklung von ROS in die Pathogenese der Parodontitis aufgedeckt. Überproduktion an ROS könnte eine Schlüsselkomponente der Hyper-Inflammation sein, welche mit Parodontitis assoziiert ist (Ishikawa 2007).

In Übereinstimmung mit unseren Ergebnissen vermuteten Sheikhi et al. (2001), dass parodontopathogene Bakterien die Freisetzung von ROS aus PMNs stimulieren könnten, da bei deren In vitro-Studie *Fusobacterium nucleatum* die Produktion von ROS in PMNs stimulierte. Diese These wurde auch von Katsuragi et al. (2003) durch eine In vitro-Studie bestätigt, bei der erhöhte intra- und extrazelluläre Freisetzung von ROS nach Phagozytose von *P. gingivalis* gefunden wurde. Die Rolle von ROS und Antioxidantien in parodontaler Gewebeerstörung ist teilweise bekannt. Oxidativer Stress führt nicht nur zu direkter Gewebeerstörung, sondern aktiviert auch Schlüssel-Faktoren nuklearer Transkription, so dass zusätzlich pro-inflammatorische Schlüssel-Mediatoren exprimiert werden (Chapple and Matthews 2007). Erst bei extrazellulären ROS wirkt sich die gewebescheidende Wirkung der Superoxide aus. Bei *P. gingivalis* ATCC 33277 ist die Freisetzung von ROS in die Umgebung im Verhältnis zur gesamten Produktion an ROS in den PMNs sehr hoch. Der Laborstamm könnte demnach in umliegendem Gewebe umfangreiche oxidative Schäden provozieren, würde aber schnell eliminiert. Ein insgesamt geringer Pegel in der Produktion von Superoxiden durch PMNs nach Phagozytose von *P. gingivalis* M 5-1-2 ermöglicht den Bakterien ein Überleben und Entrinnen der Wirtsabwehr (Pouliot et al. 2000, Rudney et al. 2001). *P. gingivalis* M 5-1-2 kann so parodontales Gewebe penetrieren und fortschreitende parodontale Gewebeerstörung vorantreiben.

ROS zeigen ein breites Spektrum an Biotoxizität und sind damit in der Wirtsabwehr gegen Mikroorganismen entscheidend. Im Gegenzug haben Mikroorganismen komplexe Strategien entwickelt, um nicht nur den Kontakt mit Oxidantien aus den Phagozyten zu vermeiden, sondern auch, um Schäden zu vermeiden, wenn sie erst einmal mit den Oxidantien zusammengetroffen sind (Miller und Britigan 1997). Das aerotolerante Bakterium *P. gingivalis* scheint in der Lage zu sein, der Wirtsantwort entgegen zu wirken und diese sogar durch eine Vielzahl von Mechanismen zu modifizieren. So aktivieren Sensor-Proteine in *P. gingivalis* Systeme, welche Schäden reduzieren, die durch oxidativen Stress an dem Bakterium gebildet werden (Yoneda et al. 1990). Aus unseren Ergebnissen lassen sich solche Mechanismen bei dem Stamm M 5-1-2 vermuten, müssen aber bezüglich der Details in zukünftigen Arbeiten weitergehend untersucht werden. Weil

Stämme, die eine hohe Produktion an ROS provozieren, eine geringe Freisetzung von HNE bewirken, lässt sich vermuten, dass es Stämme gibt, bei deren Killing entweder vermehrt oxidative Mechanismen oder vermehrt nicht oxidative Mechanismen wirken. So scheinen bei Stamm ATCC 33277 die oxidativen Mechanismen zu überwiegen. Möglicherweise liegt die Ursache in einer Superoxid-Dismutase, mit der *P. gingivalis* die ROS-Produktion der PMNs auslöschen kann (Yamakura et al. 1998). Eine Rolle der ROS-Bildung während einer Infektion neben intra-phagosomalem Killing in lebendigen Neutrophilen wird auch für NET-vermitteltes Killing post mortem vermutet. Die Erzeugung von ROS durch NADPH-Oxidase wird einerseits für ein effizientes phagozytisches Killing benötigt. Andererseits wirkt ROS als Second Messenger, um die NET-Ausbildung zu triggern (Fuchs et al. 2007). Extrazelluläres Killing durch ROS könnte demnach die Ausbildung von NETs steigern. Dies ist für den Wirt mit Vorteilen aber auch mit Nachteilen behaftet. Die Anwendung oxidativer oder nicht oxidativer Mechanismen des Killings wird in vivo vermutlich von zusätzlichen Parametern beeinflusst. So wird die Verfügbarkeit von O<sub>2</sub> im jeweiligen Gewebe über die Anwendung O<sub>2</sub>-abhängiger Mechanismen entscheiden. PMNs können extrazelluläre Mikroorganismen auch in Abwesenheit von Phagozytose töten. Dieselben Enzyme und Wirkstoffe, welche in das Phagosom abgesondert werden, gelangen auch in den extrazellulären Raum. Extrazelluläres Killing trägt zu einer Ausweitung der Elimination eindringender Mikroorganismen bei. Diese Funktion wird u.a. durch Enzyme wie HNE sowie ROS vermittelt. Gleichzeitig können diese Wirkstoffe die umgebenden Zellen und Gewebe beschädigen (Kantarci et al. 2003). **NETs** minimieren den Schaden an Wirtszellen. PMNs bildeten in unseren EM-Aufnahmen faserige NET-Strukturen aus, in denen sie *P. gingivalis* einfingen. Aber das klinische Isolat M 5-1-2 war in Kulturversuchen gegen NET-vermitteltes Killing weitgehend resistent. Im Gegensatz zu der Elimination von *Candida albicans* (Urban et al. 2006) erfolgte das Killing bei dem Erreger *P. gingivalis* hauptsächlich phago-lysosomal. *P. gingivalis* wird im Gegensatz zu anderen Mikroben durch NETs nicht effektiv abgetötet. Unter den gegebenen Versuchsbedingungen betrug das extrazelluläre Killing nur 4% (*P. gingivalis* M 5-1-2) bis 24% (*P. gingivalis* ATCC 33277) des gesamten Killings durch die PMNs. In vivo wird dieses Verhältnis von spezifischen lokalen Bedingungen abhängen, welche entweder extrazelluläres oder intrazelluläres Killing fördern. Das extrazelluläre Killing erhöhte sich während des Beobachtungszeitraumes nicht. Es ist davon auszugehen, dass sich die Menge bestehender NETs während der Zeit des Versuches nur geringfügig änderte. *P. gingivalis* exprimiert häufig eine anti-phagozytische Kapsel. Dadurch könnte

Phagozytose in der Anfangsphase der Infektion dem Wirt nur unzureichenden Schutz bieten. Die große Mehrheit der Infektionen mit *P. gingivalis* resultieren aber in einer Besiedelung des Gingivalspaltes ohne weitere Ausbreitung. Es muss also einen Mechanismus geben, der eine örtliche Begrenzung der Infektion bewirkt. Das extrazelluläre Einfangen der *P. gingivalis* in NETs könnte einen solchen Mechanismus darstellen. Aktivierte Neutrophile, welche ein dichtes Netz an extrazellulären Fasern anlegen, lassen sich nicht mit der Anforderung vereinbaren, dass sie entlang der Chemotaxis zu infizierten Stellen migrieren. Trotzdem könnten NETs, die *P. gingivalis* einfangen, wichtig sein, indem sie deren Ausbreitung begrenzen. Das Einfangen parodontopathogener Spezies in NETs mag den Wirt schützen, indem die Wahrscheinlichkeit reduziert wird, dass Erreger in den Blutstrom streuen.

Parodontitis mit Nachweis von *P. gingivalis* zeichnet sich durch reichliche Rekrutierung von PMNs aus. Es ist vorstellbar, dass NETs als Barriere für die Rekrutierung weiterer weißer Blutzellen wirken. Damit würden sie die Beseitigung chronischer Infektionen behindern, wie dies bei Abszessen der Fall ist (Lee and Grinstein 2004). Der Abszessbildende Stamm W83 weist keine DNasen auf und ruft eine örtlich begrenzte Immunreaktion hervor. NETs interagieren mit einer Vielzahl verschiedener Mikroorganismen. Bisher wurde eine bakterizide Wirkung sowohl auf gram-positive Staphylokokken und Streptokokken (Brinkmann et al. 2004, Buchanan et al. 2006), auf gram-negative Salmonellen und Shigellen (Brinkmann et al. 2004), als auch auf Pilze wie *Candida albicans* (Urban et al. 2006) beschrieben. Die Wirkung auf parodontale Erreger wie *P. gingivalis* wurde noch nicht untersucht. Das geringfügige NET-Killing in unseren Versuchen zeigt, dass *P. gingivalis* zwar gefangen, aber im Gegensatz zu anderen Erregern nur schlecht abgetötet wird. Damit wird die Frage aufgeworfen, welche Faktoren *P. gingivalis* ein Überleben in bakteriziden NETs ermöglichen.

Unsere Ergebnisse stehen in Übereinstimmung mit den Erkenntnissen anderer Autoren, die eine signifikante Rolle des extrazellulären Killings in PMN-vermittelter angeborener Immunität zeigten. DNase-Aktivität ist notwendig und effektiv, die bakterielle Widerstandsfähigkeit gegen neutrophiles Killing zu unterstützen, denn das Enzym korreliert direkt mit der Fähigkeit verschiedener Bakterienstämme, extrazelluläres Killing zu überleben. In Studien an *Streptococcus pneumoniae* wurden einige Bakterien zwar in den NETs gefangen, erwiesen sich aber als relativ resistent gegen das NET-vermittelte Killing (Beiter et al. 2006). Eine ähnliche Resistenz gegen Killing (max. 24%) fand sich auch bei *P. gingivalis*. Im Gegensatz zu einem NET-vermittelten Killing bei

*Staphylococcus aureus*, das ebenso effektiv sein kann wie Phagozytose (Fuchs et al. 2007), scheint das NET-vermittelte Killing bei *P. gingivalis* nicht die Größenordnung der Phagozytose zu erreichen. Ausgebreitete NETs heften sich an die mikrobielle Zellwand an. Neben den DNasen entsteht ein beschriebener Mechanismus im Widerstand gegen NET-Killing durch positive Ladung an der Erreger-Oberfläche. Damit werden die ebenfalls positiv aufgeladenen antimikrobiellen Peptide des NETs abgestoßen (Wartha et al. 2007). Ob ein solcher Mechanismus auch bei *P. gingivalis* wirkt, empfiehlt sich als Gegenstand weiterer Untersuchungen.

Die DNA-Struktur der NETs wird durch DNasen abgebaut, aber nicht durch Proteasen (Urban et al. 2006). Extrazelluläre DNase schützt *P. gingivalis* durch Teilung der NETs vor extrazellulärem Killing der PMNs. Bei der Auflösung von NETs mit DNasen durch *P. gingivalis* erhöht sich möglicherweise das Risiko einer Schädigung angrenzenden Gewebes, weil in den NETs gebundene Enzyme sich frei im Gewebe verteilen. Die Exprimierung extrazellulärer DNasen könnte ein entscheidendes Merkmal invasiver Parodontal-Pathogene sein. Sundqvist et al. (1991) zeigten, dass invasive Stämme von *P. gingivalis* sich ausbreitende Infektionen verursachten, während andere nicht invasive Stämme lokalisierte Abszesse produzierten. Wenn sich der invasive Stamm M 5-1-2 durch DNasen aus den NETs befreit, könnte die systemische Ausbreitung und die Herauslösung Gewebe-schädigender Enzyme aus der DNA-Struktur für den dramatischeren klinischen Verlauf ausschlaggebend sein. Damit tragen DNasen zum Umgehen extrazellulären Killings und zum Fortschreiten parodontaler Erkrankung bei. Eine hohe DNase-Aktivität und ein entsprechend geringes extrazelluläres Killing bei blockierter Phagozytose spricht dafür, dass Stamm M 5-1-2 sich im extrazellulären Killing effektiv aus den DNA-Gerüsten der NETs befreien konnte. Mit Hilfe seiner DNasen konnte sich Stamm M 5-1-2 einer Elimination in den NETs entziehen. Stämme, denen DNase fehlt, sind zur Befreiung aus NETs nicht in der Lage, während Stämme, die DNase in hohem Maße exprimieren, eher zum Entkommen aus den NETs fähig sind. Die Tatsache, dass DNasen das Gerüst der NETs abbauen, gilt als bewiesen (Wartha et al. 2007). Eine Abweichung in der Überlebensfähigkeit der eingeschlossenen Stämme ATCC 33277 und W83 ließ sich nicht feststellen. Die Differenzen bei bakteriellem Killing in Kulturen mit und ohne DNase reflektieren die antimikrobielle Aktivität der NETs.

**Zelltod** spielt in der Regulierung der Entzündung und in der Immunantwort des Wirtes eine kritische Rolle (Cohen 1991). Einsetzendes Absterben der PMNs ist mit Verlust verschiedener wichtiger Funktionen wie Adhäsion und Phagozytose verbunden

(Dransfield et al. 1995). Werden PMNs aus dem gingivalen Sulcus isoliert, so findet sich ein Anteil von 20% - 25% abgestorbener Zellen (Thurre et al. 1984). Ein hohes Maß an Produktion von ROS durch PMNs führt dazu, dass die PMNs selbst oxidativem Stress ausgesetzt werden und absterben (Katsuragi et al. 2003). Einerseits könnte eine erhöhte funktionelle Lebensspanne der PMNs die Möglichkeit erhöhen, eine bakterielle Infektion in den Griff zu bekommen. Andererseits führt ein vermindertes Absterben zum Verweilen der PMNs an Stellen der Infektion und steigert deren pro-inflammatorisches Potential. Die Akkumulation könnte zu Exazerbation der Entzündung mit vermehrter Zerstörung parodontalen Gewebes führen. Im gingivalen Sulcus werden abgestorbene PMNs durch Sulcus-Flüssigkeit ausgespült. In parodontalem Gewebe werden avitale PMNs von Makrophagen eliminiert (Savill 1997, Preshaw et al. 1999). Die Aktivierung von Makrophagen und Lymphozyten durch PMNs im Gewebe kann zu weiterem Schaden führen. Die Phagozytose toter PMNs durch Makrophagen führt zu einer Sequestrierung potenziell schädigender Enzyme aus neutrophilen Granula. Dieser Mechanismus ist entscheidend für die Entfernung von PMNs und damit entscheidend für die Auflösung der Entzündung (Savill et al. 1989).

Aus unseren Ergebnissen ließ sich ein vermindertes Absterben der PMNs 2 h nach Infektion ablesen, was auf Aktivierung im Kontakt mit *P. gingivalis* zurück zu führen ist. Bei Infektion steigt die mitochondriale Aktivität der Granulozyten an. Infolge einer späteren Schädigung der PMNs 24 h nach Infektion war die Zahl abgestorbener infizierter PMNs im Vergleich zu nicht infizierten PMNs erhöht. Zwischen einzelnen Stämmen des Erregers *P. gingivalis* ließen sich keine Unterschiede ablesen. Bei der Messung freigesetzter HNE ließ sich einsetzende Schädigung der PMNs bereits nach 60 min feststellen. Damit wird die ausgewogene Balance deutlich, wenn bei Infektion eine Aktivierung der Abwehr-Zellen erfolgt. Drohen Gewebeschäden, so sterben die Immunzellen ab. Wie in unseren Ergebnissen, fanden auch andere Autoren verzögerte Apoptose der PMNs unter Zugabe von *P. gingivalis* (Gamonal et al. 2003). Bakterielle Produkte, die von verschiedenen Stämmen des Bakteriums *P. gingivalis* isoliert wurden, führen in Abhängigkeit von der Dosis zu verspäteter Apoptose (Preshaw et al. 1999). Differenzen in der Pathogenität verschiedener Stämme korrelieren nicht mit ihrem Einfluss auf die Apoptose der PMNs (Peshaw et al. 1999, Miyabe et al. 2004). Eine Verzögerung des Zelltods erfahren die PMNs nicht nur durch Kontakt mit *P. gingivalis*, sondern bereits bei Migration aus dem Blut durch das Epithel in den Sulcus verlängern verschiedene Signale die Lebensspanne der PMNs (Ginis und Faller 1997). Auch Arg-spezifische Gingipaine inaktivieren den

Tumor Nekrose Faktor  $\alpha$  und verzögern damit die Apoptose (Calkins et al. 1998). Diese modulierenden Faktoren konnten in unser Versuchsmodell nicht einbezogen werden.

Zum einen ist es möglich, dass PMNs im gingivalen Sulcus durch Nekrose sterben (Crawford et al. 2000). Neue Ergebnisse zum Zelltod der PMNs im Rahmen der Immunabwehr besagen aber, dieser Vorgang muss nicht zwangsläufig einen rein passiven Prozess nach Erschöpfung darstellen, sondern kann auch unter Ausbildung von NETs geschehen. Ob PMNs bei Infektion durch Apoptose, Nekrose oder einen aktiven Prozess mit begleitender NET-Bildung sterben, ist noch nicht endgültig geklärt. Das NET-Phänomen scheint ein aktiver Prozess unabhängig von Nekrose oder Apoptose zu sein. Es ist denkbar, dass die NET Bildung ein frühes Ereignis im Zelltod ist (Brinkmann et al. 2004).

#### **6.4 Virulenzfaktoren der Stämme**

Die Stämme von *P. gingivalis* können in invasive und nicht invasive Stämme eingeteilt werden (Dorn et al. 2000). In Tierversuchen wurden die Stämme W83 und ATCC 33277 als virulent und avirulent klassifiziert, und definierte Mutanten haben sowohl die Modelle als auch die vermeintlichen Virulenzfaktoren bestätigt (Baker et al. 2000). Bei einer Phänotyp-Studie wurde *P. gingivalis* Serotyp B (vertreten durch Stamm W83) nur in 4% unter den isolierten Stämmen von Patienten mit chronischer Parodontitis gefunden, während Serotyp B aber zu 35% in parodontalen Abszessen gefunden wurde. Zu dem virulenten Serotyp B gehören Stämme des **Kapsel**-Serotypen K1, den wir in unserer Untersuchung *P. gingivalis* W83 zuweisen konnten. Der typisierte Stamm W83 verursacht schwere und generalisierte phlegmonöse Infektionen, besitzt aber keinen direkten Bezug zur Parodontitis, weil seine Isolation aus einem Abszess erfolgte (van Steenberghe et al. 1982). Bei dem Stamm ATCC 33277 handelt es sich um einen Laborstamm, der nur geringe virulente Eigenschaften aufweist (Dahlén et al. 2007). Der Stamm M 5-1-2 wurde bei einem Patienten mit schwerer chronischer Parodontitis in hoher Keimzahl gefunden und sollte somit besonders parodontopathogene Eigenschaften aufweisen. Einzelne Stämme produzieren unterschiedliche Kapseln und Serotypen (Eick et al. 2002). Studien zu Kapsel, Virulenz und Phagozytose-Resistenz wurden durch Beobachtungen angeregt, nach denen ein avirulenter Stamm von *P. gingivalis* leicht phagozytiert wurde, während ein virulenter Stamm nicht phagozytiert wurde (Sundqvist et al. 1982). Eine Mutante von *P. gingivalis*, die zahlreiche extra-zelluläre Polysaccharide exprimiert, war resistenter gegen Phagozytose und intra-zelluläres Killing als der Mutterstamm (Genco et al. 1995). Die Kapsel vermindert das Potential einer Phagozytose, indem sie die Opsonierung des

Erregers verhindert (Dennison und Van Dyke 1997). Gene für eine Ausbildung von Glykosyl-Transferase, Kapsel-Polysaccharid sowie Polysaccharide-Transport Protein scheinen für die Synthese kapsulärer Polysaccharide bei *P. gingivalis* verantwortlich zu sein. Es gibt sechs Serotypen des Bakteriums, welche sich auf die kapsulären Polysaccharid (K) Antigene beziehen. Die Schwere der Parodontal-Erkrankung korreliert mit dem Nachweis einer Kapsel und dem Serotyp der Kapsel in Mausinfektions- Modellen (Laine und van Winkelhoff 1998). Genetische Unterschiede für die Kapsel wurden bereits untersucht und stimmten mit den von uns gefundenen Ergebnisse überein. Das Genom von *P. gingivalis* W83 wurde komplett sequenziert (Nelson et al. 2003). Demnach entspricht *P. gingivalis* W83 dem Serotyp K1, dessen Kapsel mit der schwersten Verlaufsform in Tierinfektionsstudien assoziiert war. ATCC 33277, welcher keine Kapsel ausbildet (K-), verursacht lediglich eine minimale Infektion (Chen et al. 2004). *P. gingivalis* M 5-1-2 ist ein in seinem Serotyp bisher unbekanntes klinisches Isolat, verursacht aber schwere chronische Parodontitis. Daraus folgte unsere Vermutung, das klinische Isolat gehöre wie der virulente Stamm W83 zu Serotyp K1. Diese Annahme bestätigte sich nicht, denn das Isolat M 5-1-2 ließ sich wie Laborstamm ATCC 33277 dem Serotyp K- zuordnen. Auffällig ist, dass *P. gingivalis* M 5-1-2 in EM-Aufnahmen sowie in der Kultur eine dicke Schleimkapsel erkennen ließ, die aber nicht durch die bekannten Kapselgene bestimmt werden konnte. Diese Schleimkapsel könnte anfänglich Phagozytose und Killing erschweren, was sich in unseren Ergebnissen bestätigte. Dementsprechend wurde *P. gingivalis* M 5-1-2 anfänglich schlechter phagozytiert. Eine genaue Charakterisierung der Schleimkapsel konnte im Rahmen vorliegender Dissertation nicht erfolgen. Die Untersuchung anti-phagozytischer Eigenschaften der Schleimkapsel in weiteren Arbeiten verspricht genauere Kenntnis über den Zusammenhang mit dem schweren klinischen Verlauf bei Stamm M 5-1-2.

In unseren Ergebnissen ließen sich aus der Zuordnung der Stämme zu den Serotypen K1 und K- keine direkten Zusammenhänge zu den Beobachtungen aus der Phagozytose erschließen. Entgegen unseren Vermutungen konnte zwischen dem avirulenten Laborstamm ATCC 33277 und dem virulenten Stamm W83 in der Phagozytose kein signifikanter Unterschied gefunden werden. Darum vermuteten wir, dass neben der Kapsel noch andere Virulenzfaktoren den Grad der Phagozytose beeinflussen oder für die Ausbildung klinischer Merkmale verantwortlich sein müssen. Eine weitere Ursache der überraschenden Ergebnisse im Phagozytose-Vergleich virulenter Stämme mit Referenzstämmen könnte darin liegen, dass die Bedingungen in vivo bei In vitro-

Untersuchungen nur sehr beschränkt nachgeahmt werden können. So fanden auch Sundqvist et al. (1991), trotz der klassischen Erkenntnis, dass Kapseln, Virulenz und Beeinträchtigung der Phagozytose miteinander in Beziehung stehen, kann zwischen diesen Parametern keine klare Korrelation gefunden werden, wenn sie zusammen studiert werden. Bisher wurden bei *P. gingivalis* meist isogene Mutanten verglichen. Wegen seiner hohen Aussagekraft hat sich dieses Vorgehen bewährt. Bei dem Vergleich verschiedener Stämme fällt die Aussage oft nicht eindeutig aus. In Zukunft empfiehlt sich demnach weiterhin der Vergleich von definierten Mutanten, allerdings sollten wegen besserer Aussagekraft von verschiedenen Stämmen Mutanten gebildet werden. Dabei sollten auch klinische Isolate des entsprechenden Krankheitsbildes Verwendung finden.

Auch extrazellulären Proteasen wurde als anti-phagozytischen Faktoren Aufmerksamkeit geschenkt. Die Inkubation von PMNs mit Produkten aus dem Überstand, die von *P. gingivalis* abgegeben wurden, verringerte die Phagozytose der PMNs (Zadeh et al. 1999). Eine Schlüsselstellung in den Virulenzfaktoren nimmt die hydrolytische Proteinase namens **Gingipain** bei klinischen Isolaten von *P. gingivalis* ein. An Stellen mit Infektionen durch *P. gingivalis* scheinen Gingipaine gemeinsam mit Proteasen aus aktivierten Neutrophilen die Zerstörung subgingivalen Gewebes synergistisch durch ihre proteolytischen Aktivitäten zu beschleunigen. Auf diese Weise sind Gingipaine beachtenswerte Determinanten der Virulenz in der Entwicklung chronischer Parodontitis (Into et al. 2006). Gingipain ist ein Hauptenzym in der Kulturflüssigkeit von *P. gingivalis* (Chen et al. 1992). In einem Modell mit befruchteten Hühnereiern wurde gezeigt, dass Gingipain einen wesentlichen Virulenzfaktor von *P. gingivalis* darstellt (Eick et al. 2009). Gingipaine wurden in vielen verschiedenen Formen nachgewiesen. Ihr Erscheinungsbild hängt ab vom Stamm der Spezies *P. gingivalis*, von der Aufteilung des Enzyms auf die Membran oder in lösliche Fraktionen sowie von der analytischen Methode, welche in der Charakterisierung dieser Proteine angewandt wird (Potempa et al. 1995). Die Gingipaine RgpA und Kgp mit unterschiedlicher Substrat-Spezifität treten allein oder in einem nonkovalenten Komplex auf (Potempa und Nguyen 2007).

Bei unserer Chromatografie mit Arg-Sepharose fand sich statt der erwarteten zwei Peaks lediglich eine singuläre Spitze in der Aktivität der Cystein-Proteinasen. Die enzymatische Aktivität sollte symmetrisch die Spur der Protein-Konzentration ( $OD_{280}$ ) überlagern. Im Lys-Peak und im Arg-Peak sollten Gingipaine mit hoher Aktivität für Kgp und HRgpA eluiert werden, da anzunehmen war, dass diese fest an die Aminosäuren binden. Es war zu erwarten, dass die erste Spitze für HrgpA/Kgp bei ~100 kDa aus der Säule austritt und

eine zweite Spitze für RgpB bei ~48 kDa. Lediglich ein geringes Maß an enzymatischer Aktivität sollte im Waschen der Säule mit Affinitätspuffer sowie mit 0,5 M NaCl-Puffer zu finden sein. Der Durchlauf-Peak bei der Waschung mit Affinitätspuffer enthält Probenbestandteile, die nicht an den Liganden Arginin gebunden wurden. Unsere Zielproteine waren zum größten Teil in diesem Peak enthalten. Durch das Erhitzen in der SDS-PAGE erfolgte eine Dissoziation der Komplexe in einzelne Formen. Lediglich das gemeinsame Austreten in der Arg-Sepharose ließ auf das Vorliegen von großen Komplexen aus Rgp und Kgp schließen. Eine hohe Kreuzkontamination (>5%) für Rgp mit Kgp wie in unserer Isolierung spricht dafür, dass beide Enzyme in einem großen non-kovalenten Komplex vorlagen und so nur gemeinsam aufgereinigt werden konnten (Potempa und Nguyen 2007). Wenn Rgp und Kgp einen solchen großen Komplex bilden, so könnte der Spacer-Arm zwischen Ligand und Matrix in der verwendeten Arg-Sepharose zu kurz sein, so dass die Bindungsstelle in dem Enzymkomplex den Liganden Arginin nicht erreicht. Hierdurch konnte keine Bindung der Enzyme an die Matrix erfolgen. Die Bindungsstelle für das Zielprotein befindet sich oft tief innerhalb des Moleküls (GE Healthcare 2007).

Gingipaine können Bestandteile der Wirtsabwehr (Immunglobuline, Komplement, Regulatorproteine) oder aber Proteine aus dem Bindegewebe des Wirts abbauen. Die Rolle der Gingipaine in der Phagozytose wurde noch nicht endgültig geklärt. Es scheint allerdings, als vermeiden sie eher den Kontakt mit PMNs durch Abbau von Entzündungsmediatoren und Beeinflussung der Chemotaxis (Madianos et al. 2005). Aufgereinigte Kgp und Rgp sind normalerweise >95% rein (Potempa und Nguyen 2007). Arg-spezifische Gingipaine treten als 110-, 95-, 70- bis 90- und als 48-kDa Proteine auf (Potempa und Nguyen 2007). RgpA hat eine molekulare Masse von 95-kDa und unterscheidet sich von dem 50-kDa RgpB. Der Vergleich der Aktivitäten von RgpA und RgpB zeigte, dass RgpA eine potentere Aktivität bei bestimmten Wirtsproteinen aufweist (Mezyk-Kopec et al. 2005). Andere Autoren fanden in Mausinfektionsmodellen höhere Virulenzeigenschaften für RgpB (Pathirana et al. 2007). Das Profil unserer aufgereinigten Cystein-Proteasen im Western Blot zeigte keine wesentlichen Unterschiede, denn bei allen Stämmen ließen sich Rgp-Proteasen wie Kgp-Proteasen in einem Komplex bei ~45 kDa nachweisen. Ihrer Größe entsprechend ließen sich die Proteasen als RgpB-Gingipain einordnen, das eine Größe von ca. 45 kDa aufwies. Bemerkenswert war eine Form der Gingipaine bei Stamm M 5-1-2 mit hoher molekularer Masse, die sich bei den anderen untersuchten Stämmen nicht fand. Bei dem Fragment im Western Blot bei 67 kDa

handelte es sich mit hoher Wahrscheinlichkeit um RgpA.

Formen der Gingipaine mit dem höchsten molekularen Gewicht finden sich vorwiegend in Vesikeln oder Membran assoziierten Fraktionen. Gingipaine mit geringem molekularen Gewicht sind meist lösliche Formen der Enzyme (Potempa et al. 1995). Bereits aus der Größe unserer Gingipaine von nur 45 kDa folgt, dass die Aufreinigungen der Kulturflüssigkeit nur lösliche Formen von Gingipainen aufwiesen. Während des Wachstums ist bei den meisten Stämmen von *P. gingivalis* der Großteil der Gingipain-Aktivität an der Zelloberfläche oder in kleinen Bläschen (Vesikeln) der äußeren Membran festgelegt. Nur recht kleine Mengen der Enzyme werden in löslicher Form in das Wachstumsmedium freigesetzt (Potempa et al. 1995). Da bei unseren Experimenten lediglich lösliche Formen der Gingipaine untersucht wurden, mussten die Membran-gebundenen Formen unberücksichtigt bleiben. Ob hier eine ähnliche Übereinstimmung bei den Stämmen zu beobachten wäre, kann an dieser Stelle nicht beurteilt werden. Inwieweit lösliches RgpA bei 67 kDa das klinische Bild einer Infektion mit *P. gingivalis* M 5-1-2 beeinflusst, muss weiteren Untersuchungen vorbehalten bleiben.

Into et al. 2006 fanden in Übereinstimmung mit unseren Ergebnissen bei klinischen Isolaten Rgp (50 kDa) in einem Protein-Komplex, der nonkovalent an Kgp gebunden ist. Bei Eick et al. (2009) wies Arg-Gingipain eine Größe zwischen 15 kDa und 98 kDa auf, aber die Isolierung erfolgte in diesem Fall nicht über Arg-Sepharose, sondern über eine Benzamidin-Säule. Pathirana et al. (2007) fanden in Experimenten mit dem Stamm W50 bei 48 kDa die Arg-spezifische katalytische Domäne für Rgp und bei 48 kDa die Lys-spezifische katalytische Domäne für Kgp. Popadiak et al. (2007) bestätigen, dass der Wildtyp-Stamm W83 die Cystein-Proteasen RgpA, RgpB und Kgp aufweist. Somit lagen unsere Ergebnisse nahe bei den Erkenntnissen anderer Autoren. Es wurde gezeigt, dass die enzymatische Aktivität der Rgps stärker ist als jene der Kgps. Dies stimmt mit den Ergebnissen anderer Autoren überein (Mezyk-Kopec et al. 2005). Eine Differenz in der amidolytischen Wirkung der Proteasen des Stammes M 5-1-2 zu den Stämmen ATCC 33277 sowie W83 ließ sich allerdings nicht erkennen.

Das extrazelluläre Killing von *P. gingivalis* M 5-1-2 (4%) war signifikant geringer als bei W83 (19%) und ATCC 33277 (20%). Somit zeigte Stamm M 5-1-2 die stärkste Widerstandskraft gegen Killing in NETs. Darüber hinaus jedoch haben unsere Versuche gezeigt, dass dieser Stamm eine hohe DNase-Aktivität aufweist. Diese ermöglicht *P. gingivalis* M 5-1-2 eine höhere Virulenz oder gar die Fähigkeit, sich systemisch auszubreiten. Vermutlich kann sich *P. gingivalis* M 5-1-2 durch Zerschneiden der NETs

ausbreiten und bildet dadurch einen invasiven Stamm. Stamm W83 dagegen bildet nur örtlich begrenzte Infektionen in Abszessen (Dahlén et al. 2007). Ein Mangel an DNAsen könnte die weitere Ausbreitung von W83 behindern, wenn der Stamm in NETs der PMNs gefangen wird. Enzymatische Aktivität fand sich in unserer Untersuchung vor allem in Vesikeln der Zellwand. DNAsen in Vesikeln der äußeren Membran tragen zum Fortschreiten einer infektiösen Erkrankung bei (Brinkmann et al. 2004, Buchanan et al. 2006). Leduc et al. 1995 fanden bei *P. gingivalis* ATCC 33277 im Gegensatz zu unserem Versuch eine stark ausgeprägte DNase-Aktivität. Allerdings setzten sie in ihren Versuchen eine andere Isolationsmethode für Endonukleasen ein. DNase Produktion stellt einen bisher wenig beschriebenen Mechanismus dar, den pathogene Mikroorganismen nutzen, um der angeborenen Immunfunktion zu entgehen. Es ist anzunehmen, dass DNase neben den bekannten Virulenz-Faktoren wie Kapselbildung und Proteasen zum Widerstand gegen ein umfassendes Killing durch die Phagozyten beiträgt.

## 7 Schlussfolgerungen

*P. gingivalis* als Parodontitis-Erreger werden in hohem Maße phagozytiert und abgetötet, was auf starke Immunabwehr der PMNs hinweist. Der größte Teil der Phagozytose vollzieht sich in den ersten 5 min nach Infektion. Die PMNs können den Großteil, aber nicht alle Bakterien phagozytieren. Werden die Bakterien nicht gleich nach Phagozytose abgetötet, so überleben sie in den Phago-Lysosomen der Zellen. Der größere Teil der Erreger wird in Phagosomen der PMNs vernichtet, während extrazelluläres Killing einen geringeren Stellenwert einnimmt. PMNs bilden faserige NET-Strukturen aus, in denen *P. gingivalis* eingefangen wird. *P. gingivalis* wird durch NETs nicht effizient abgetötet, sondern das Bakterium wird in den Strukturen nur eingefangen und in seiner Ausbreitung begrenzt. Der Kontakt der PMNs mit *P. gingivalis* führt generell zu erhöhter Bildung und Freisetzung von ROS. Die Produktion von ROS und die Freisetzung von aktiver HNE ist bei den *P. gingivalis*-Stämmen gegenläufig. Nach anfänglicher Stress-Aktivierung der PMNs bei Kontakt mit *P. gingivalis* verringert sich die Lebenszeit der Zellen.

Der mit der Parodontitis assoziierte Stamm *P. gingivalis* M 5-1-2 besitzt eine starke Schleimkapsel, die jedoch nicht dem Kapseltyp K1 angehört. Im Vergleich zu den Laborstämmen ATCC 33277 und W83 bildet er vermehrt DNase. *P. gingivalis* M 5-1-2 sezerniert zusätzlich zu 45 kDa großen Gingipainen (RgpB) ein 67 kDa großes Gingipain-Molekül (RgpA). Nach Kontakt mit PMNs besitzt die HNE extrazellulär eine hohe-Aktivität und trotz geringerer ROS-Produktion der PMNs wird eine mit den anderen Stämmen vergleichbare Menge an ROS extrazellulär freigesetzt. Alle diese Besonderheiten könnten Ursache sein für die anfängliche schlechtere Phagozytose und das verminderte extrazelluläre Killing sowie die Schädigung der umliegenden Gewebe.

Es handelt sich bei *P. gingivalis* um eine bakterielle Spezies mit moderater Virulenz, welche Gewebeschädigung durch Modulation der Immunreaktion fördert. Klinische Isolate reagieren anders als Laborstämme. Weiterführende Untersuchungen sollten ebenso isogene Mutanten von klinischen Isolaten einbeziehen, die mit dem Krankheitsbild assoziiert sind.

## 8 Literatur- und Quellenverzeichnis

Albandar JM, Rams TE. 2002. Risk factors for periodontitis in children and young persons. *Periodontol 2000*, 29:207-222.

Alegre J, Suriñach JM, Varela E, Armadans L, Marti R, Segura R, u. a. 2000. Diagnostic accuracy of pleural fluid polymorphonuclear elastase in the differentiation between pyogenic bacterial infectious and non-infectious pleural effusions. *Respiration*, 67(4):426-432.

Alley MC, Scudiero DA, Monks A, Hursey ML, Czerwinski MJ, Fine DL, u. a. 1988. Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay. *Cancer Res*, 48(3):589-601.

Ambrosio G, Tritto I. 1999. Reperfusion injury: experimental evidence and clinical implications. *Am Heart J*, 138(2):69-75.

Appelberg R. 2007. Neutrophils and intracellular pathogens: beyond phagocytosis and killing. *Trends Microbiol*, 15(2):87-92.

Ashimoto A, Chen C, Bakker I, Slots J. 1996. Polymerase chain reaction detection of 8 putative periodontal pathogens in subgingival plaque of gingivitis and advanced periodontitis lesions. *Oral Microbiol Immunol*, 11(4):266-273.

Asman B. Peripheral PMN cells in juvenile periodontitis. 1988. Increased release of elastase and of oxygen radicals after stimulation with opsonized bacteria. *J Clin Periodontol*, 15(6):360-364.

Attström R. 1970. Presence of leukocytes in crevices of healthy and chronically inflamed gingivae. *J Periodontal Res*, 5(1):42-7.

Baker PJ, Dixon M, Evans RT, Roopenian DC. 2000. Heterogeneity of *Porphyromonas gingivalis* strains in the induction of alveolar bone loss in mice. *Oral Microbiol Immunol*, 15(1):27-32.

Balloy V, Sallenave J, Crestani B, Dehoux M, Chignard M. 2003. Neutrophil DNA contributes to the antielastase barrier during acute lung inflammation. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 28(6):746-753.

Battino M, Bullon P, Wilson M, Newman H. 1999. Oxidative injury and inflammatory periodontal diseases: the challenge of anti-oxidants to free radicals and reactive oxygen species. *Crit Rev Oral Biol Med*, 10(4):458-476.

Beiter K, Wartha F, Albiger B, Normark S, Zychlinsky A, Henriques-Normark B. 2006. An

endonuclease allows *Streptococcus pneumoniae* to escape from neutrophil extracellular traps. *Curr Biol*, 16(4):401-407.

Belaouaj A, McCarthy R, Baumann M, Gao Z, Ley TJ, Abraham SN, u. a. 1998. Mice lacking neutrophil elastase reveal impaired host defense against gram negative bacterial sepsis. *Nat Med*, 4(5):615-618.

Borregaard N, Cowland JB. 1997. Granules of the human neutrophilic polymorphonuclear leukocyte. *Blood*, 89(10):3503-3521.

Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, u. a. 2004. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science*, 303(5663):1532-1535.

Buchanan JT, Simpson AJ, Aziz RK, Liu GY, Kristian SA, Kotb M, u. a. 2006. DNase expression allows the pathogen group A *Streptococcus* to escape killing in neutrophil extracellular traps. *Curr Biol*, 16(4):396-400.

Calkins CC, Platt K, Potempa J, Travis J. 1998. Inactivation of tumor necrosis factor-alpha by proteinases (gingipains) from the periodontal pathogen, *Porphyromonas gingivalis*. Implications of immune evasion. *J Biol Chem*, 273(12):6611-4.

Chapple ILC, Matthews JB. 2007. The role of reactive oxygen and antioxidant species in periodontal tissue destruction. *Periodontol 2000*, 43:160-232.

Chen T, Hosogi Y, Nishikawa K, Abbey K, Fleischmann RD, Walling J, u. a. 2004. Comparative whole-genome analysis of virulent and avirulent strains of *Porphyromonas gingivalis*. *J Bacteriol*, 186(16):5473-9.

Chen Z, Potempa J, Polanowski A, Wikstrom M, Travis J. 1992. Purification and characterization of a 50-kDa cysteine proteinase (gingipain) from *Porphyromonas gingivalis*. *J Biol Chem*, 267(26):18896-901.

Claesson R, Johansson E, Carlsson J. 1994. Oxygen-dependent modulation of release and activity of polymorphonuclear leukocyte granule products. *Oral Microbiol Immunol*, 9(2):81-87.

Cohen JJ. 1991. Programmed cell death in the immune system. *Adv Immunol*, 50:55-85.

Condorelli F, Scalia G, Calì G, Rossetti B, Nicoletti G, Lo Bue AM. 1998. Isolation of *Porphyromonas gingivalis* and detection of immunoglobulin A specific to fimbrial antigen in gingival crevicular fluid. *J Clin Microbiol*, 36(8):2322-2325.

Conrads G, Herrler A, Moonen I, Lampert F, Schnitzler N. 1999. Flow cytometry to monitor phagocytosis and oxidative burst of anaerobic periodontopathogenic bacteria by human

polymorphonuclear leukocytes. *J Periodont Res*, 34(3):136-144.

Crawford JM, Wilton JM, Richardson P. 2000. Neutrophils die in the gingival crevice, periodontal pocket, and oral cavity by necrosis and not apoptosis. *J Periodontol*, 71(7):1121-9.

Curtis MA, Kuramitsu HK, Lantz M, Macrina FL, Nakayama K, Potempa J, u. a. 1999. Molecular genetics and nomenclature of proteases of *Porphyromonas gingivalis*. *J Periodont Res*, 34(8):464-472.

Dahlén G, Gmür R, Yoshino T. 2007. Phenotypes, serotypes and antibiotic susceptibility of Swedish *Porphyromonas gingivalis* isolates from periodontitis and periodontal abscesses. *Oral Microbiol Immunol*, 22(2):80-86.

Davis BJ. 1964, Disc Electrophoresis. II. Method and Application to human Serum Proteins. *Ann N Y Acad Sci*, 121:404-427.

de Haar SF, Hiemstra PS, van Steenberg MTJM, Everts V, Beertsen W. 2006. Role of polymorphonuclear leukocyte-derived serine proteinases in defense against *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Infect Immun*, 74(9):5284-5291.

Delima AJ, Van Dyke TE. 2003. Origin and function of the cellular components in gingival crevice fluid. *Periodontol 2000*, 31:55-76.

Dennison DK, Van Dyke TE. 1997. The acute inflammatory response and the role of phagocytic cells in periodontal health and disease. *Periodontol 2000*, 14:54-78.

Dorn BR, Burks JN, Seifert KN, Progulske-Fox A. 2000. Invasion of endothelial and epithelial cells by strains of *Porphyromonas gingivalis*. *FEMS Microbiol Lett*, 187(2):139-144.

Dransfield I, Stocks SC, Haslett C. 1995. Regulation of cell adhesion molecule expression and function associated with neutrophil apoptosis. *Blood*, 85(11):3264-73.

Ebersole JL, Taubman MA. 1994. The protective nature of host responses in periodontal diseases. *Periodontol 2000*, 5:112-141.

Eick S, Fröhlich E, Kantyka T, Potempa J, Schmidt K, Pfister W, Stürzebecher J. 2009. Benzamidine derivatives inhibit virulence of *Porphyromonas gingivalis*. Veröffentlichung in Vorbereitung.

Eick S, Rödel J, Einax JW, Pfister W. 2002. Interaction of *Porphyromonas gingivalis* with KB cells: comparison of different clinical isolates. *Oral Microbiol Immunol*, 17(4):201-208.

Fuchs TA, Abed U, Goosmann C, Hurwitz R, Schulze I, Wahn V, u. a. 2007. Novel cell

death program leads to neutrophil extracellular traps. *J Cell Biol*, 176(2):231-241.

Gamonal J, Sanz M, O'Connor A, Acevedo A, Suarez I, Sanz A, u. a. 2003. Delayed neutrophil apoptosis in chronic periodontitis patients. *J Clin Periodontol*, 30(7):616-623.

GE Healthcare. 2007. *Affinity Chromatography. Principles and Methods [Handbook]*. Uppsala: GE Healthcare Bio-Sciences AB.

Genco CA, Schifferle RE, Njoroge T, Forng RY, Cutler CW. 1995. Resistance of a Tn4351-generated polysaccharide mutant of *Porphyromonas gingivalis* to polymorphonuclear leukocyte killing. *Infect Immun*, 63(2):393-401.

Ginis I, Faller DV. 1997. Protection from apoptosis in human neutrophils is determined by the surface of adhesion. *Am J Physiol*, 272(1 Pt 1):C295-309.

Grenier D, Mayrand D. 1987. Selected characteristics of pathogenic and nonpathogenic strains of *Bacteroides gingivalis*. *J Clin Microbiol*, 25(4):738-40.

Guentsch A, Puklo M, Preshaw PM, Glockmann E, Pfister W, Potempa J, u. a. 2009. Neutrophils in chronic and aggressive periodontitis in interaction with *Porphyromonas gingivalis* and *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *J Periodont Res*, 44(3):368-377.

Hampton MB, Vissers MC, Winterbourn CC. 1994. A single assay for measuring the rates of phagocytosis and bacterial killing by neutrophils. *J Leukoc Biol*, 55(2):147-52.

Hirayama A, Noronha-Dutra AA, Gordge MP, Neild GH, Hothersall JS. 2001. Uremic concentrations of guanidino compounds inhibit neutrophil superoxide production. *Kidney Int Suppl*, 78:S89-92.

Hirsch JG. 1958. Bactericidal action of histone. *J Exp Med*, 108(6):925-944.

Imamura T, Banbula A, Pereira PJ, Travis J, Potempa J. 2001. Activation of human prothrombin by arginine-specific cysteine proteinases (Gingipains R) from *porphyromonas gingivalis*. *J Biol Chem*, 276(22):18984-91.

Imamura T, Tanase S, Hamamoto T, Potempa J, Travis J. 2001. Activation of blood coagulation factor IX by gingipains R, arginine-specific cysteine proteinases from *Porphyromonas gingivalis*. *Biochem J*, 353(Pt 2):325-31.

Imamura T. 2003. The role of gingipains in the pathogenesis of periodontal disease. *J Periodontol*, 74(1):111-118.

Into T, Inomata M, Kanno Y, Matsuyama T, Machigashira M, Izumi Y, u. a. 2006. Arginine-specific gingipains from *Porphyromonas gingivalis* deprive protective functions of secretory leucocyte protease inhibitor in periodontal tissue. *Clin Exp Immunol*, 145(3):545-

54.

Ishikawa I. 2007. Host responses in periodontal diseases: a preview. *Periodontol* 2000, 439-13.

Ji S, Hyun J, Park E, Lee B, Kim K, Choi Y. 2007. Susceptibility of various oral bacteria to antimicrobial peptides and to phagocytosis by neutrophils. *J Periodontal Res*, 42(5):410-9.

Kantarci A, Oyaizu K, Van Dyke TE. 2003. Neutrophil-mediated tissue injury in periodontal disease pathogenesis: findings from localized aggressive periodontitis. *J Periodontol*, 74(1):66-75.

Katsuragi H, Ohtake M, Kurasawa I, Saito K. 2003. Intracellular production and extracellular release of oxygen radicals by PMNs and oxidative stress on PMNs during phagocytosis of periodontopathic bacteria. *Odontology*, 91(1):13-18.

Kobayashi T, Kaneko S, Tahara T, Hayakawa M, Abiko Y, Yoshie H. 2006. Antibody responses to *Porphyromonas gingivalis* hemagglutinin A and outer membrane protein in chronic periodontitis. *J Periodontol*, 77(3):364-369.

Kurita-Ochiai T, Ochiai K, Fukushima K. 2001. Butyric acid-induced T-cell apoptosis is mediated by caspase-8 and -9 activation in a Fas-independent manner. *Clin Diagn Lab Immunol*, 8(2):325-332.

Laine ML, van Winkelhoff AJ. 1998. Virulence of six capsular serotypes of *Porphyromonas gingivalis* in a mouse model. *Oral Microbiol*, 13(5):322-325.

Lamont RJ, Chan A, Belton CM, Izutsu KT, Vasel D, Weinberg A. 1995. *Porphyromonas gingivalis* invasion of gingival epithelial cells. *Infect Immun*, 63(10):3878-3885.

Lamont RJ, Jenkinson HF. 1998. Life below the gum line: pathogenic mechanisms of *Porphyromonas gingivalis*. *Microbiol Mol Biol Rev*, 62(4):1244-1263.

Lange D, Schroeder HE. 1971. Cytochemistry and ultrastructure of gingival Sulcus cells. *Helv Ododontol Acta*, 15:Suppl 15:65+.

Laskay T, van Zandbergen G, Solbach W. 2003. Neutrophil granulocytes--Trojan horses for *Leishmania major* and other intracellular microbes? *Trends Microbiol*, 11(5):210-214.

Leduc A, Grenier D, Mayrand D. 1995. Outer membrane-associated deoxyribonuclease activity of *Porphyromonas gingivalis*. *Anaerobe*, 1(2):129-134.

Lee WL, Grinstein S. 2004. Immunology. The tangled webs that neutrophils weave. *Science*, 303(5663):1477-1478.

- Löe H, Theilade E, Jensen SB. 1965. Experimental gingivitis in man. *J Periodontol*, 36:177-187.
- Loesche WJ. 1993. Bacterial mediators in periodontal disease. *Clin Infect Dis, Suppl* 4:S203-210.
- Lösche W, Michel E, Heptinstall S, Krause S, Groenewegen WA, Pescarmona GP, u. a. 1988. Inhibition of the behaviour of human polynuclear leukocytes by an extract of *Chrysanthemum parthenium*. *Planta Med*, 54(5):381-384.
- Madianos PN, Papapanou PN, Sandros J. 1997. Porphyromonas gingivalis infection of oral epithelium inhibits neutrophil transepithelial migration. *Infect Immun*, 65(10):3983-3990.
- Madianos PN, Bobetsis YA, Kinane DF. 2005. Generation of inflammatory stimuli: how bacteria set up inflammatory responses in the gingiva. *J Clin Periodontol*, 32 Suppl 6:57-71.
- Mayrand D, Grenier D. 1989. Biological activities of outer membrane vesicles. *Can J Microbiol*, 35(6):607-613.
- Meng H, Xu L, Li Q, Han J, Zhao Y. 2007. Determinants of host susceptibility in aggressive periodontitis. *Periodontol 2000*, 43:133-159.
- Méthot N, Guay D, Rubin J, Ethier D, Ortega K, Wong S, Normandin D, u. a. 2008. In vivo inhibition of serine protease processing requires a high fractional inhibition of cathepsin C. *Mol Pharmacol*, 73(6):1857-1865.
- Mezyk-Kopec R, Bzowska M, Potempa J, Bzowska M, Jura N, Sroka A, u. a. 2005. Inactivation of membrane tumor necrosis factor alpha by gingipains from *Porphyromonas gingivalis*. *Infect Immun*, 73(3):1506-14.
- Micheelis W, Schiffner U. 2006. Vierte Deutsche Mundgesundheitsstudie. Deutscher Zahnärzte Verlag.
- Mikolajczyk-Pawlinska J, Travis J, Potempa J. 1998. Modulation of interleukin-8 activity by gingipains from *Porphyromonas gingivalis*: implications for pathogenicity of periodontal disease. *FEBS Lett*, 440(3):282-286.
- Miller RA, Britigan BE. 1997. Role of oxidants in microbial pathophysiology. *Clin Microbiol Rev*, 10(1):1-18.
- Miyabe H, Ishihara K, Kigure T, Okuda K. 2004. Anti-phagocytic role of surface fibrous structure of an invasive *Porphyromonas gingivalis* strain. *Bull Tokyo Dent Coll*, 45(1):47-

57.

Nathan C. 2006. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nat Rev Immunol*, 6(3):173-182.

Nelson KE, Fleischmann RD, DeBoy RT, Paulsen IT, Fouts DE, Eisen JA, u. a. 2003. Complete genome sequence of the oral pathogenic Bacterium *Porphyromonas gingivalis* strain W83. *J Bacteriol*, 185(18):5591-5601.

Nicu EA, Van der Velden U, Everts V, Van Winkelhoff AJ, Roos D, Loos BG. 2007. Hyper-reactive PMNs in FcγRIIIa 131 H/H genotype periodontitis patients. *J Clin Periodontol*, 34(11):938-945.

Offenbacher S. 1996. Periodontal diseases: pathogenesis. *Ann Periodontol*, 1(1):821-878.

Oliver JM. 1978. Cell biology of leukocyte abnormalities--membrane and cytoskeletal function in normal and defective cells. A review. *Am J Pathol*, 93(1):221-270.

Ornstein L. 1964. Disc Electrophoresis. I. Background and Theory. *Ann N Y Acad Sci*, 121:321-349.

Pathirana RD, O'Brien-Simpson NM, Brammar GC, Slakeski N, Reynolds EC. 2007. Kgp and RgpB, but not RgpA, are important for *Porphyromonas gingivalis* virulence in the murine periodontitis model. *Infect Immun*, 75(3):1436-1442.

Pham C. 2008. Neutrophil serine proteases fine-tune the inflammatory response. *Int J Biochem Cell Biol*, 40(6-7):1357-2725.

Pihlstrom BL, Michalowicz BS, Johnson NW. 2005. Periodontal diseases. *Lancet*, 366(9499):1809-1820.

Pike R, McGraw W, Potempa J, Travis J. 1994. Lysine- and arginine-specific proteinases from *Porphyromonas gingivalis*. Isolation, characterization, and evidence for the existence of complexes with hemagglutinins. *J Biol Chem*, 269(1):406-11.

Pike RN, Potempa J, McGraw W, Coetzer TH, Travis J. 1996. Characterization of the binding activities of proteinase-adhesin complexes from *Porphyromonas gingivalis*. *J Bacteriol*, 178(10):2876-2882.

Popadiak K, Potempa J, Riesbeck K, Blom AM. 2007. Biphasic effect of gingipains from *Porphyromonas gingivalis* on the human complement system. *J Immunol*, 178(11):7242-50.

Potempa J, Nguyen K. 2007. Purification and characterization of gingipains. *Curr Protoc Protein Sci*, Chapter 21:Unit 21.20.

- Potempa J, Pike R, Travis J. 1995. The multiple forms of trypsin-like activity present in various strains of *Porphyromonas gingivalis* are due to the presence of either Arg-gingipain or Lys-gingipain. *Infect Immun*, 63(4):1176-82.
- Potempa J, Sroka A, Imamura T, Travis J. 2003. Gingipains, the major cysteine proteinases and virulence factors of *Porphyromonas gingivalis*: structure, function and assembly of multidomain protein complexes. *Curr Protein Pept Sci*, 4(6):397-407.
- Pouliot M, Clish CB, Petasis NA, Van Dyke TE, Serhan CN. 2000. Lipoxin A(4) analogues inhibit leukocyte recruitment to *Porphyromonas gingivalis*: a role for cyclooxygenase-2 and lipoxins in periodontal disease. *Biochemistry*, 39(16):4761-4768.
- Preshaw PM, Schifferle RE, Walters JD. 1999. *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide delays human polymorphonuclear leukocyte apoptosis in vitro. *J Periodont Res*, 34(4):197-202.
- Rebecchi IM, Ferreira Novo N, Julian Y, Campa A. 2000. Oxidative metabolism and release of myeloperoxidase from polymorphonuclear leukocytes obtained from blood sedimentation in a Ficoll-Hypaque gradient. *Cell Biochem Funct*, 18(2):127-132.
- Rodrigues PH, Bélanger M, Dunn W, Progulske-Fox A. 2008. *Porphyromonas gingivalis* and the autophagic pathway: an innate immune interaction? *Front Biosci*, 131:78-87.
- Rudney JD, Chen R, Sedgewick GJ. 2001. Intracellular *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* in buccal epithelial cells collected from human subjects. *Infect Immun*, 69(4):2700-2707.
- Sandholm L. 1984. Cells and cellular interactions in gingival crevice washings from patients with juvenile periodontitis. *Scand J Dent Res*, 92(5):436-42.
- Savill J. 1997. Apoptosis in resolution of inflammation. *J Leukoc Biol*, 61(4):375-80.
- Savill JS, Wyllie AH, Henson JE, Walport MJ, Henson PM, Haslett C. 1989. Macrophage phagocytosis of aging neutrophils in inflammation. Programmed cell death in the neutrophil leads to its recognition by macrophages. *J Clin Invest*, 83(3):865-75.
- Schägger H, von Jagow G. 1987. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem*, 166(2):368-379.
- Schroeder HE, Münzel-Pedrazzoli S. 1970. Morphometric analysis comparing junctional and oral epithelium of normal human gingiva. *Helv Odontol Acta*, 14(2):53-66.
- Sheikhi M, Bouhafs RK, Hammarström KJ, Jarstrand C. 2001. Lipid peroxidation caused

by oxygen radicals from *Fusobacterium*-stimulated neutrophils as a possible model for the emergence of periodontitis. *Oral Dis*, 7(1):41-46.

Shi Y, Ratnayake DB, Okamoto K, Abe N, Yamamoto K, Nakayama K. 1999. Genetic analyses of proteolysis, hemoglobin binding, and hemagglutination of *Porphyromonas gingivalis*. Construction of mutants with a combination of *rgpA*, *rgpB*, *kgp*, and *hagA*. *J Biol Chem*, 274(25):17955-17960.

Skapski H, Lehner T. 1976. A crevicular washing method for investigating immune components of crevicular fluid in man. *J Periodontal Res*, 11(1):19-24.

Smith JA. 1994. Neutrophils, host defense, and inflammation: a double-edged sword. *J Leukoc Biol*, 56(6):672-86.

Socransky SS, Haffajee AD. 2005. Periodontal microbial ecology. *Periodontol 2000*, 38:135-187.

Sumby P, Barbian KD, Gardner DJ, Whitney AR, Welty DM, Long RD, u. a. 2005. Extracellular deoxyribonuclease made by group A *Streptococcus* assists pathogenesis by enhancing evasion of the innate immune response. *Proc Natl Acad Sci USA*, 102(5):1679-1684.

Sundqvist G, Bloom GD, Enberg K, Johansson E. 1982. Phagocytosis of *Bacteroides melaninogenicus* and *Bacteroides gingivalis* in vitro by human neutrophils. *J Periodontal Res*, 17(2):113-21.

Sundqvist G, Figdor D, Hänström L, Sörlin S, Sandström G. 1991. Phagocytosis and virulence of different strains of *Porphyromonas gingivalis*. *Scand J Dent Res*, 99(2):117-29.

Sundqvist GK, Carlsson J, Herrmann BF, Höfling JF, Väättäinen A. 1984. Degradation in vivo of the C3 protein of guinea-pig complement by a pathogenic strain of *Bacteroides gingivalis*. *Scand J Dent Res*, 92(1):14-24.

Takahashi K, Ohyama H, Kitanaka M, Sawa T, Mineshiba J, Nishimura F, u. a. 2001. Heterogeneity of host immunological risk factors in patients with aggressive periodontitis. *J Periodontol*, 72(4):425-437.

Takeuchi A, Shimizu A, Hashimoto T, Uchida T, Masuko S, Hosaka S. 1988. Effect of neutrophil activating substances on intracellular generation of phagocyte chemiluminescence by means of luminol-bound microspheres. *Int J Tissue React*, 10(3):169-175.

Thurre C, Robert M, Cimasoni G, Baehni P. 1984. Gingival sulcular leukocytes in periodontitis and in experimental gingivitis in humans. *J Periodontal Res*, 19(5):457-68.

Urban CF, Reichard U, Brinkmann V, Zychlinsky A. 2006. Neutrophil extracellular traps capture and kill *Candida albicans* yeast and hyphal forms. *Cell. Microbiol*, 8(4):668-676.

Van Dyke TE, Hoop GA. 1990. Neutrophil function and oral disease. *Crit Rev Oral Biol Med*, 1(2):117-33.

van Steenberg TJ, Kastelein P, Touw JJ, de Graaff J. 1982. Virulence of black-pigmented *Bacteroides* strains from periodontal pockets and other sites in experimentally induced skin lesions in mice. *J Periodont*, 17(1):41-49.

Wartha F, Beiter K, Albiger B, Fernebro J, Zychlinsky A, Normark S, u. a. 2007. Capsule and D-alanylated lipoteichoic acids protect *Streptococcus pneumoniae* against neutrophil extracellular traps. *Cell Microbiol*, 9(5):1162-1171.

Williams R. 2006. Killing controversy. *J Exp Med*, 203(11):2404.

Wilton JM, Renggli HH, Lehner T. 1977. A functional comparison of blood and gingival inflammatory polymorphonuclear leucocytes in man. *Clin Exp Immunol* 27(1):152-8.

Wilton JM. 1982. The role of the polymorphonuclear leukocyte in the control of subgingival plaque formation. *J Periodont Res*, 17(5):506-508.

Yamakura F, Rardin RL, Petsko GA, Ringe D, Hiraoka BY, Nakayama K, u. a. 1998. Inactivation and destruction of conserved Trp159 of Fe-superoxide dismutase from *Porphyromonas gingivalis* by hydrogen peroxide. *Eur J Biochem*, 253(1):49-56.

Yamalik N, Çağlayan F, Kiliç K, Kiliç A, Tümer C. 2000. The importance of data presentation regarding gingival crevicular fluid myeloperoxidase and elastase-like activity in periodontal disease and health status. *J Periodontol*, 71(3):460-467.

Yoneda M, Maeda K, Aono M. 1990. Suppression of bactericidal activity of human polymorphonuclear leukocytes by *Bacteroides gingivalis*. *Infect Immun*, 58(2):406-411.

Yoshino T, Laine ML, van Winkelhoff AJ, Dahlén G. 2007. Genotype variation and capsular serotypes of *Porphyromonas gingivalis* from chronic periodontitis and periodontal abscesses. *FEMS Microbiol Lett*, 270(1):75-81.

Zadeh HH, Nichols FC, Miyasaki KT. 1999. The role of the cell-mediated immune response to *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* in periodontitis. *Periodontol 2000*, 20:239-88.

Zaromb A, Chamberlain D, Schoor R, Almas K, Blei F. 2006. Periodontitis as a

manifestation of chronic benign neutropenia. *J Periodontol*, 77(11):1921-1926.

Zekonis G, Zekonis J. 2004. Effect of bacterial stimulants on release of reactive oxygen metabolites from peripheral blood neutrophils in periodontitis. *Medicina (Kaunas)*, 40(3):260-264.

## 9 Anhang

### **Gelfiltrationspuffer**

- 20 mM Bis-Tris, pH 6,8
- 150 mM NaCl
- 5mM CaCl<sub>2</sub>
- 0,02% NaN<sub>3</sub>

Der Puffer wurde als 10fache Stammlösung hergestellt und ist so bei 4°C für 5 Jahre haltbar. Unmittelbar vor der Benutzung wurde die Stammlösung mit destilliertem Wasser verdünnt, durch 0,22 µm gefiltert und unter Vakuum entgast.

### **Cystein-Lösung, 1 M, neutralisiert**

Cystein ist als Hydrochlorid erhältlich, darum muss die saure Lösung neutralisiert werden. Dazu wurden 1,75 g L-Cystein-HCl Monodhydrat in einem Gesamtvolumen von 10 ml dH<sub>2</sub>O gelöst. Vor der Nutzung wurde die saure Lösung durch Zusatz von 1 vol 8M NaOH zu 9 vol Cys-HCl neutralisiert. Diese Lösung wurde in dem Puffer in einem Verhältnis zugefügt, dass eine 20 mM Konzentration resultierte.

### **Gingipain-Versuchspuffer, 2 x**

- 200 mM Tris Cl, pH 7,6
- 150 mM NaCl
- 5 mM CaCl<sub>2</sub>
- 0,02% NaN<sub>3</sub>

Am Tag der Benutzung wurden 0,2 ml frisch neutralisierter 1 M L-Cystein HCl Stammlösung 10 ml des obigen Puffers in einer Konzentration von 20 mM zugefügt. Der Puffer wurde nach 5 h verworfen.

### **SDS-PAGE, Laemmli-Gel**

#### *Trenngel, 12%, 10 ml*

- 4 ml Acrylamid (30%)/bis (2%)
- 1,5 ml Puffer (1,5 M Tris/HCl), ph 8,8
- 3,35 ml dH<sub>2</sub>O
- 0,100 ml SDS (10% Sodium Dodecylsulphat)
- 0,050 ml APS (Ammonium Persulphat, Initiator-Peroxid)
- 0,007 ml TEMED ( N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamin, Katalysator )
- 1 ml Gelatine (1%)

### *Sammelgel, 4%, 5 ml*

- 0,64 ml Acrylamid (30%)/bis (2%)
- 1,25 ml Puffer (0,5 M Tris/HCl), pH 6,8
- 3,05 ml dH<sub>2</sub>O
- 0,05 ml SDS (10%)
- 0,025 ml APS (10%)
- 0,005 ml TEMED

APS und TEMED wurden erst unmittelbar vor dem Gießen zugefügt.

### ***Nicht reduzierender Proben-Puffer, 5x***

- 62,5 mM Tris Cl, pH 6,8
- 20% (v/v) Glycerol
- 2% (w/v) SDS
- 0,05% (w/v) Bromphenol Blau

### **Proben-Puffer für die SDS-PAGE**

- 2,0 ml 0,5 M Tris pH 6,8
- 1,6 ml 20% Glycerol
- 3,2 ml 10% SDS
- 1,2 ml dH<sub>2</sub>O
- Coomassie Blue G-250
- 50 mg/ml DTT

Das Verhältnis Probe gegen Puffer betrug 1:2.

### ***Coomassie Blue Laufpuffer (10-fach)***

- 30,3 g Tris
- 144 g Glycin
- 10 g SDS

### ***Coomassie Blue Fixierlösung***

- 0.04% Brilliant Blue R (Coomassie)
- 100 ml Essigsäure
- 500 ml Methanol
- 500 ml Aqua bidest.

30 min bis 4 h rühren, filtrieren

### ***Coomassie Blue Entfärber***

- 800 ml Methanol
- 100 ml Essigsäure
- 50 ml Glycerin
- 1050 ml Aqua bidest.

### ***Transfer-Puffer Western Blot***

- 6,06 g Tris 25 mM
- 28,8 g Glycin 192 mM
- 400 ml Methanol 20%

Die Pulver wurden in 1500 ml dH<sub>2</sub>O gelöst, und es wurden 400 ml Methanol zugefügt, um ein endgültiges Volumen von 2000 ml zu erreichen. Der pH lag bei 8,3, und der Puffer wurde bei 4°C gelagert.

### ***TBS, pH 7,5, 2000 ml***

- 4,84 g Tris 20 mM
- 58,4 g NaCl 0,5 M

### ***TTBS***

0,5 ml Tween 20 in 1000 ml TBS Lösung

### ***Affinitätspuffer Affinitätschromatografie***

- 50 mM Tris-Cl, pH 7,4
- 1 mM CaCl<sub>2</sub>
- 0,02% NaN<sub>3</sub>

vor der Verwendung durch 0,22 µ gefiltert und unter Vakuum entgast

### ***Granulozyten-Elastase Substratlösung***

- 1 ml 0,5 M Tris, pH 7,5
- 8 ml H<sub>2</sub>O
- 1 ml 10 mM N-Methoxysuccinyl-Ala-Ala-Pro-Val p-Nitroanilid in DMSO (Sigma M 4765)

### ***Luminol-Lösung und Isoluminol-Lösung, 10 ml, ph 9***

- 5,316 mg Luminol in 20µl 0,2 – 0,25 M NaOH lösen
- 9 ml PBS

## Unterschiede in den Proteasen

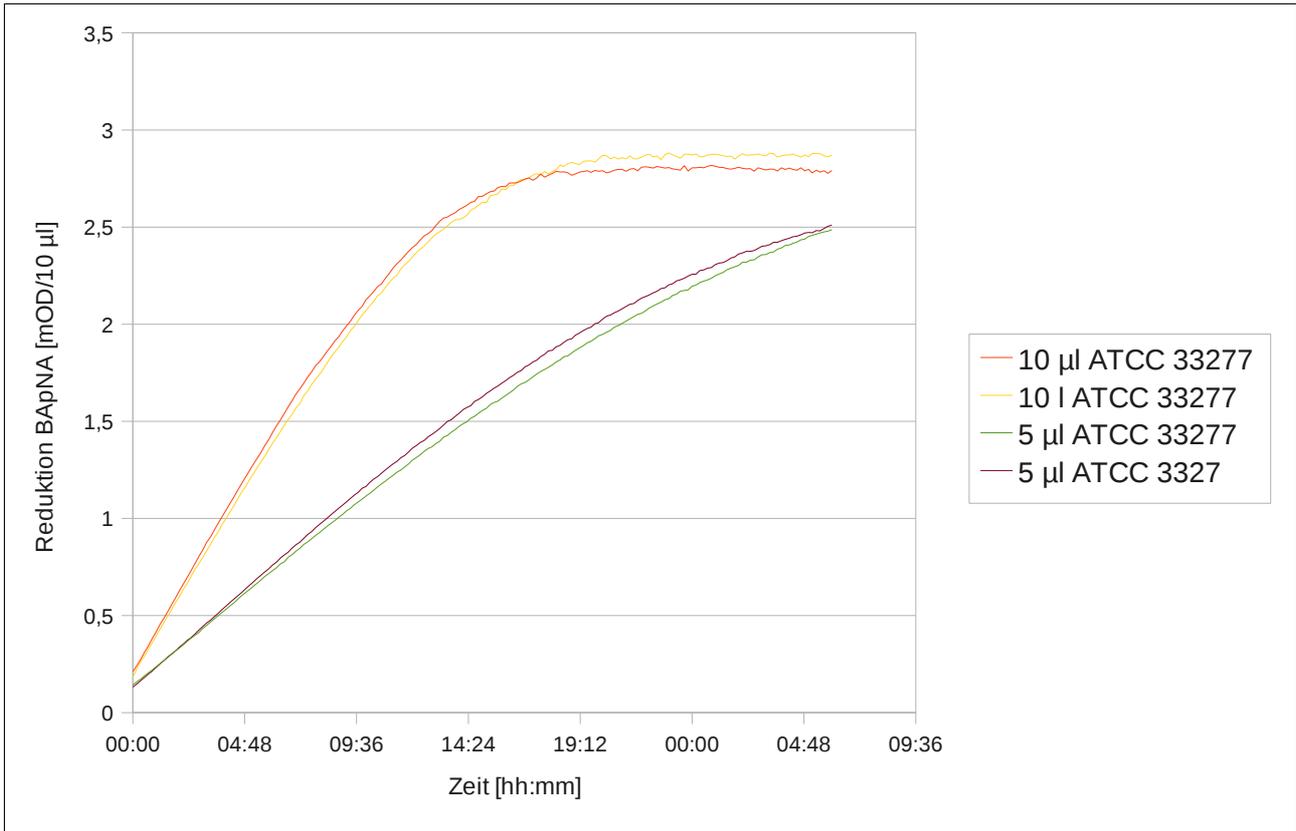


Abbildung 22: Arg-spezifische amidolytische Aktivität im Präzipitat des Stammes ATCC 33277.

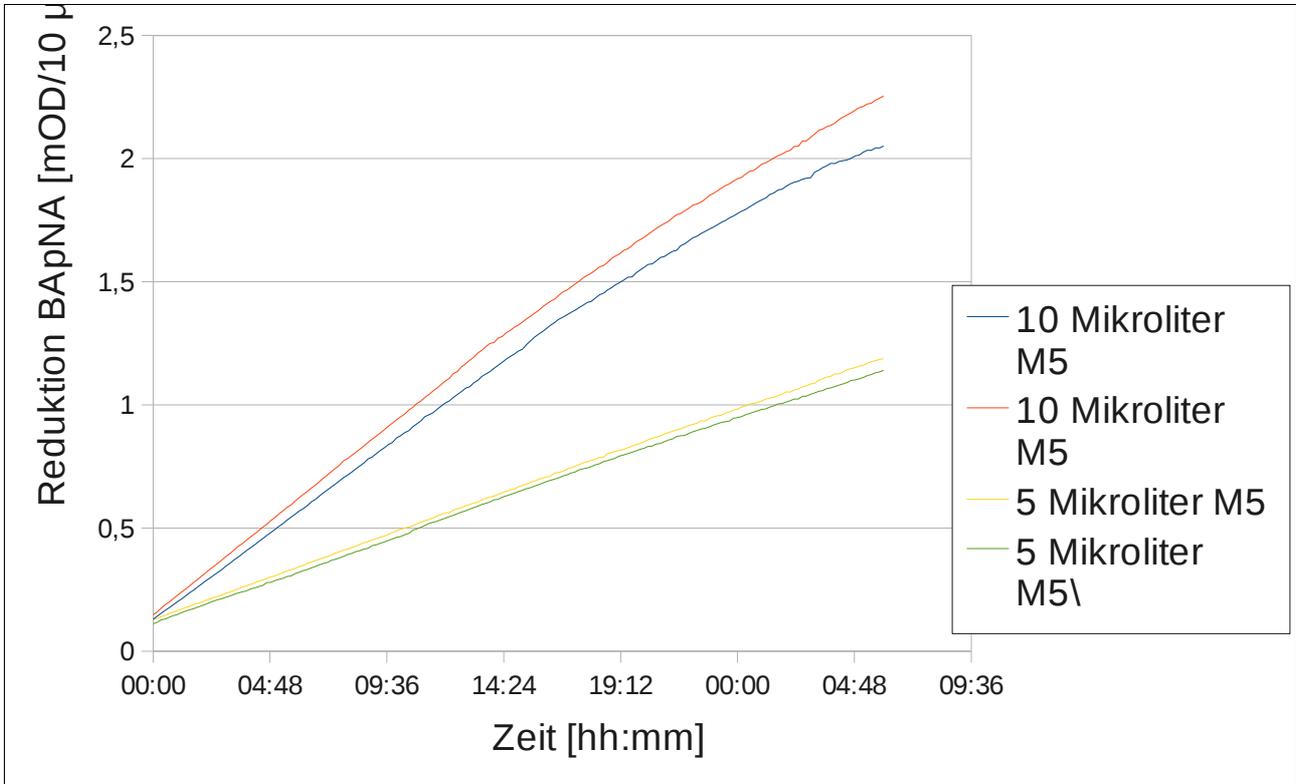


Abbildung 23: Arg-spezifische amidolytische Aktivität im Präzipitat des Stammes M 5-1-2

Gelfiltration Chromatografie

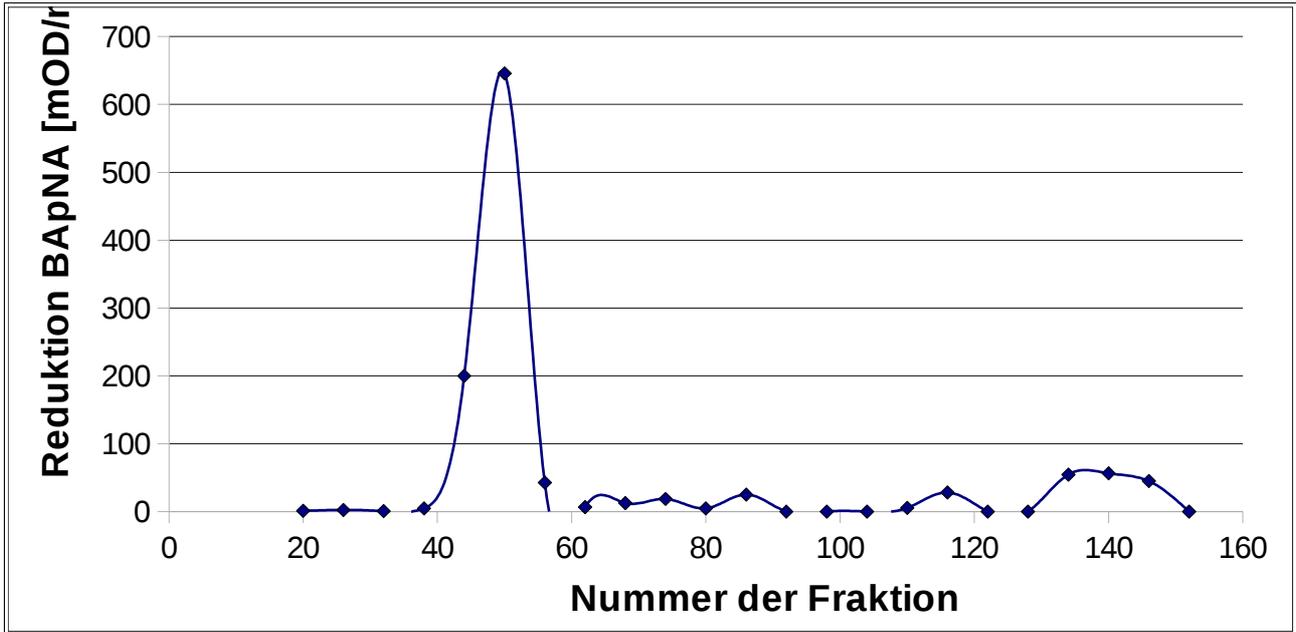


Abbildung 24: Amidolytische Aktivität in der Spaltung von BApNA der Fraktionen aus der Gelfiltration für den Stamm *P. gingivalis* ATCC 33277

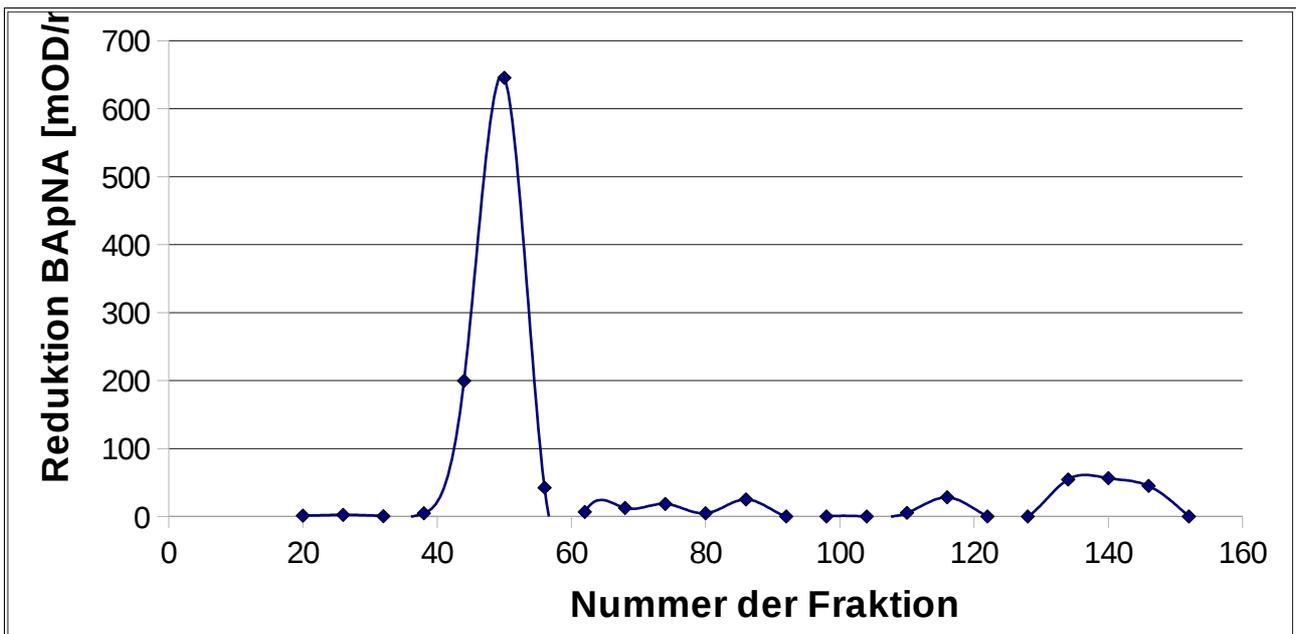


Abbildung 25: Amidolytische Aktivität in der Spaltung von BApNA der Fraktionen aus der Gelfiltration für den Stamm *P. gingivalis* M 5-1-2

# Affinitäts-Chromatographie

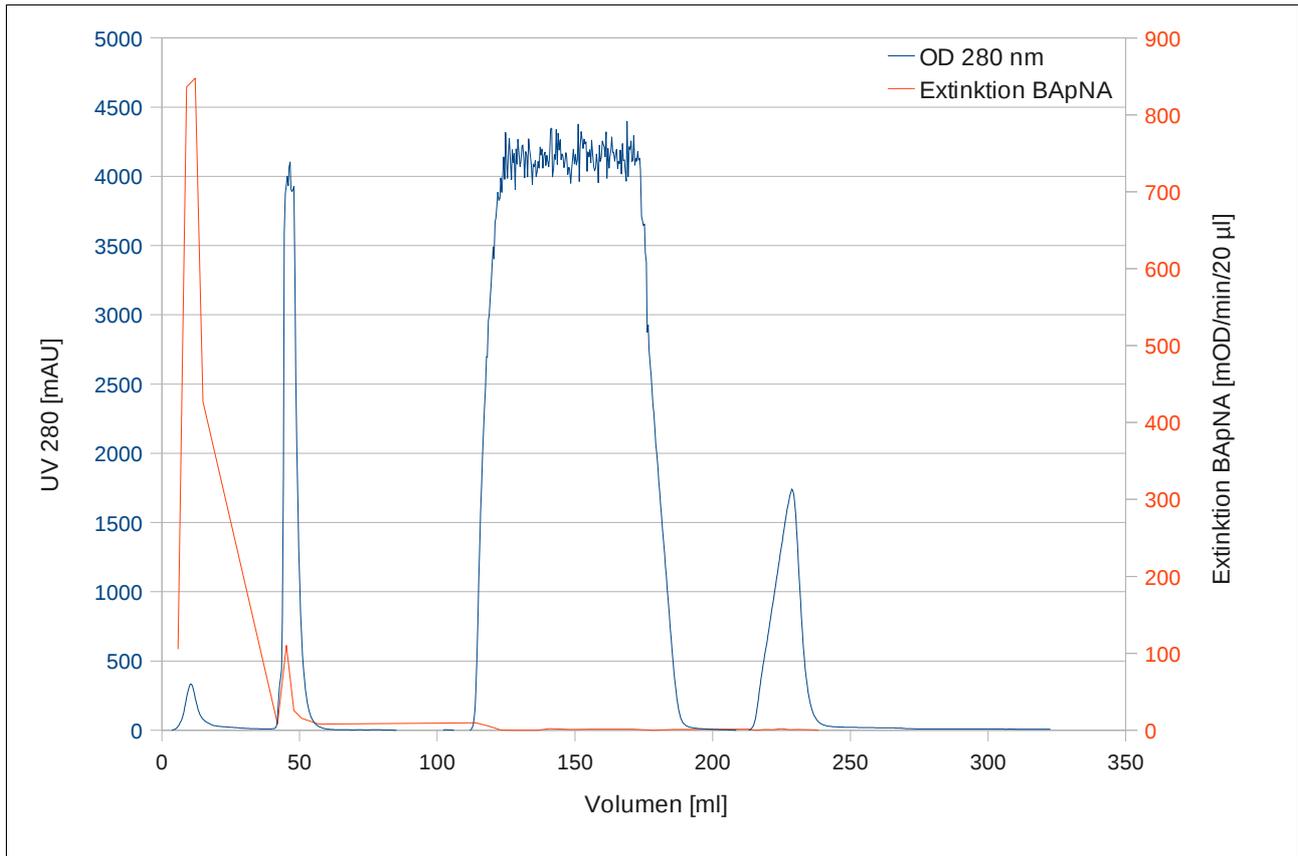


Abbildung 26: Chromatogramm und Rgp-Aktivität aus Affinitätschromatografie *P. gingivalis* ATCC 33277

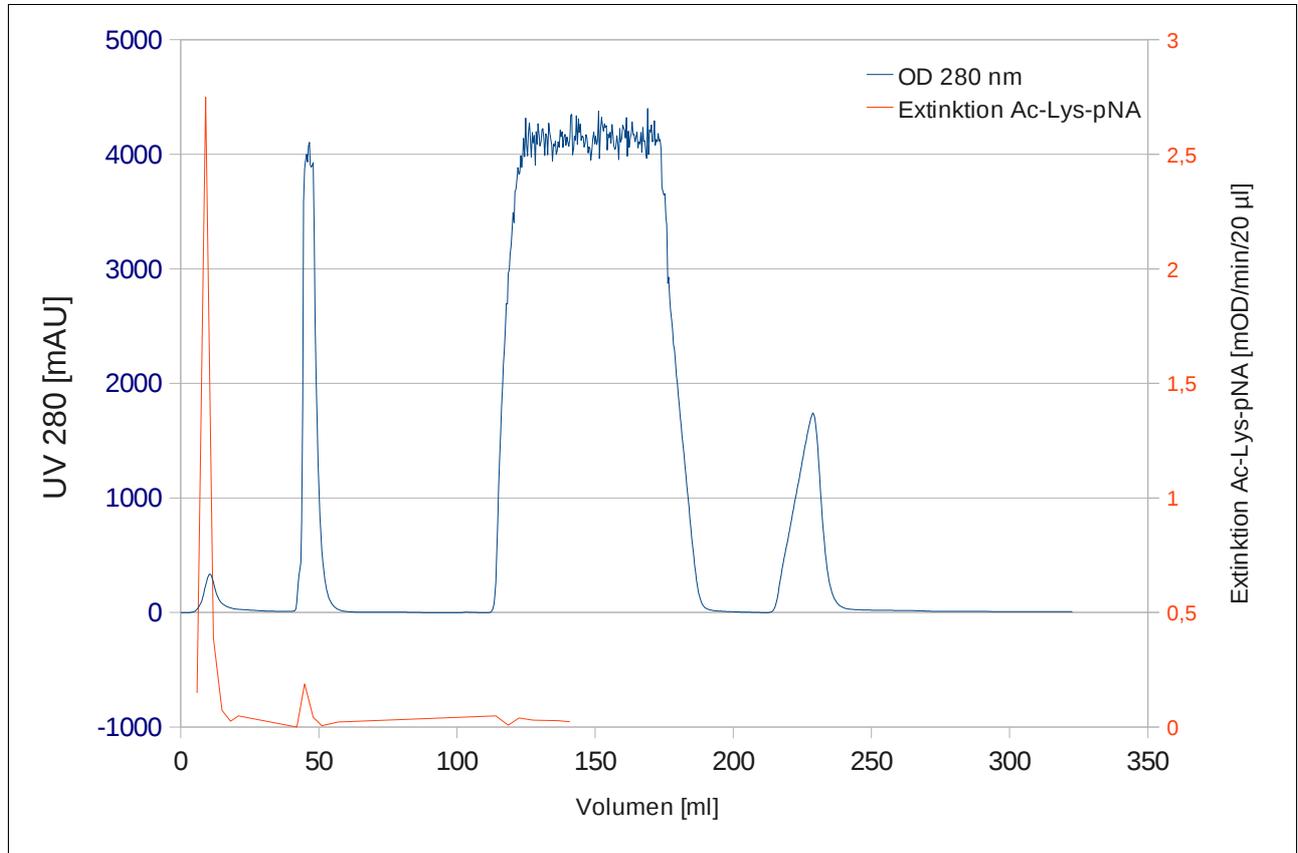


Abbildung 27: Chromatogramm und Kgp-Aktivität aus Affinitätschromatografie *P. gingivalis* ATCC 33277

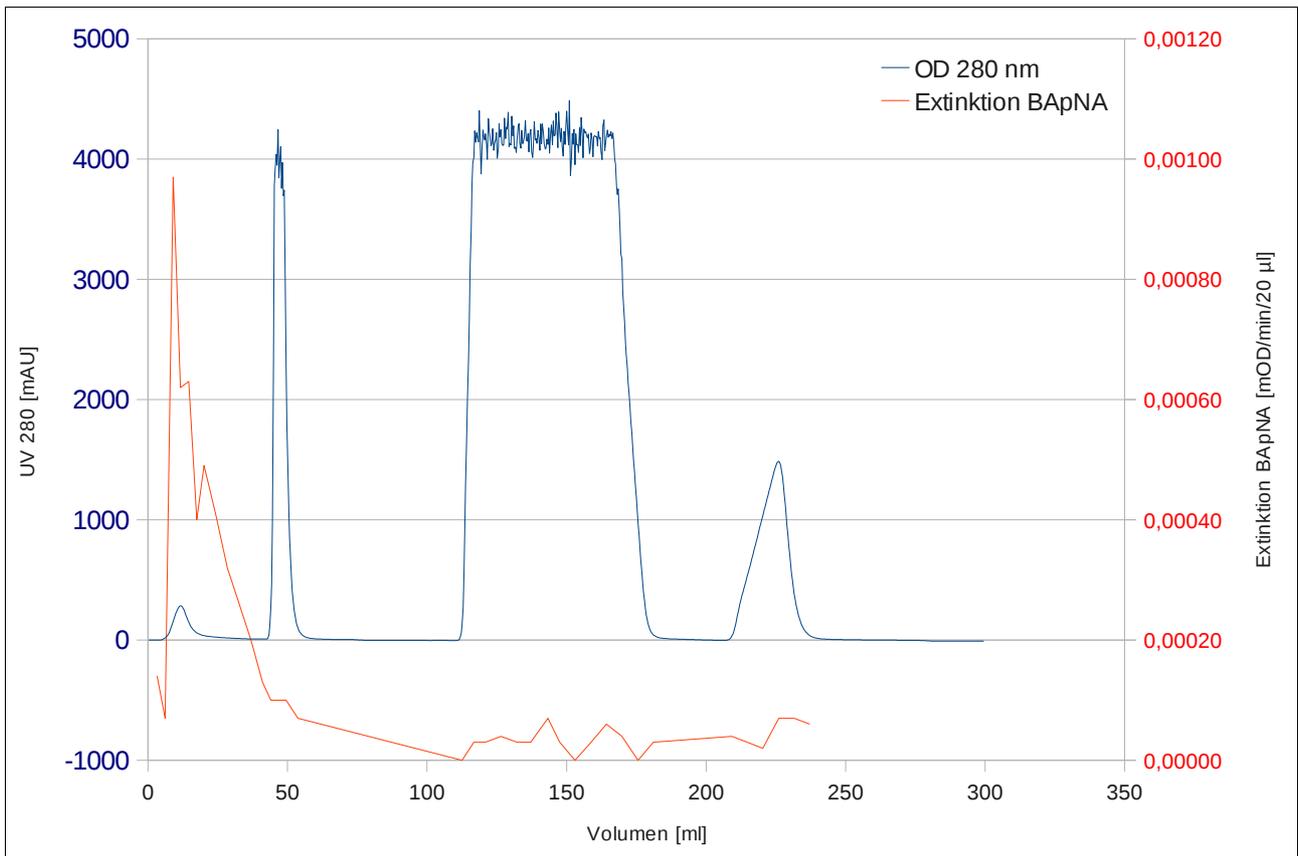


Abbildung 28: Chromatogramm und Rgp-Aktivität aus der Affinitätschromatografie für Stamm *P. gingivalis* M 5-1-2

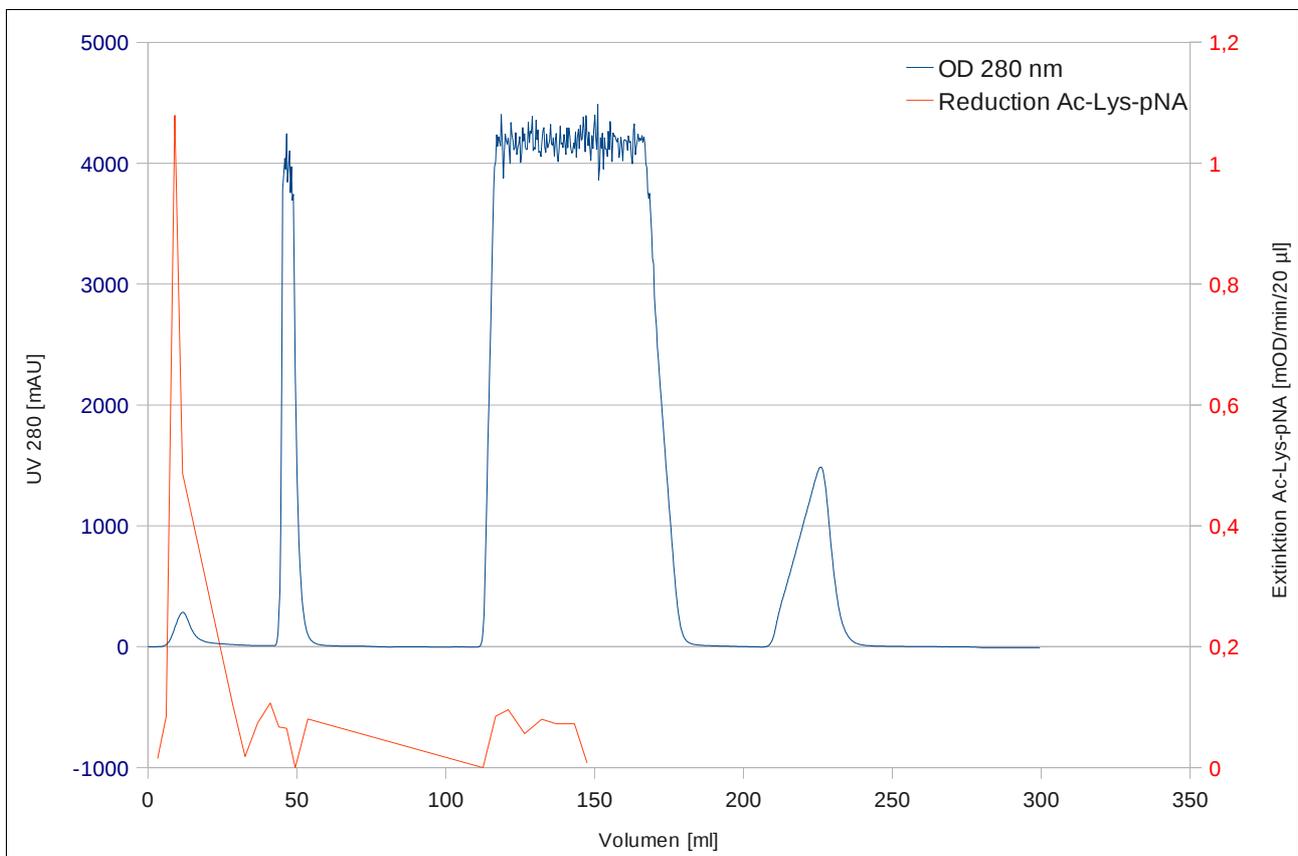


Abbildung 29: Chromatogramm und Kgp-Aktivität aus der Affinitätschromatografie bei Stamm *P. gingivalis* M 5-1-2

## ***Danksagung***

Bei allen, die auf vielfältige Weise zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, möchte ich mich an dieser Stelle ganz herzlich bedanken. Insbesondere geht mein Dank an:

PD Dr. Eick für ihre unschätzbare wertvolle Supervision, Überlassung des Themas, Unterstützung in der Datenanalyse sowie ihren Rat bei der Niederschrift. Ihre Hilfe in der Planung, Durchführung, Auswertung und Dokumentation hat die Arbeit erst möglich gemacht.

Prof. Pfister, weil er mir eine Promotion in oraler Mikrobiologie ermöglicht hat.

Claudia Ranke für die Anleitung bei der Durchführung der Versuchsreihen.

Das Team der medizinischen Mikrobiologie für Blutentnahmen und gutes kollegiales Klima.

Prof. Jan Potempa für die Möglichkeit eines Forschungsaufenthaltes an dem Institut für Biotechnologie in Krakau.

Magdalena Puklo für die Bereitstellung der elektronenmikroskopischen Aufnahmen.

Aneta Sroka für die Anleitung bei den Versuchsreihen zur Isolierung von Gingipainen.

Meine Eltern Dieter und Martina Schuster für meine Ausbildung.

### ***Ehrenwörtliche Erklärung***

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: PD Dr. Sigrun Eick, Prof. Wolfgang Pfister (Institut für Medizinische Mikrobiologie, Jena) sowie Aneta Sroka und Magdalena Puklo (Institut für Biotechnologie, Krakau),

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Jena, Datum

Unterschrift des Verfassers